

氏名 大戸梅治、所属 東京大学 D3

課題番号:2006A1578, 利用ビームライン:BL38B1, 課題名:LPS 結合蛋白質の結晶構造解析

【背景と研究目的】 免疫機構は獲得免疫系と自然免疫系に分類される。獲得免疫に関しては、抗原に対する高い親和性と選択性を抗体が担っている。一方、自然免疫に関しては Toll-like receptor (TLR)ファミリーがその役割を担っており、様々な病原体に対する感染防御反応を誘起する。

LPS 結合蛋白質(ヒト MD-2)は 2ヶ所の糖鎖結合可能部位を含むアミノ酸残基 160 個から成る分泌蛋白質であり、アミノ末端に 16 残基のシグナルペプチドを有する。MD-2 は TLR4 と会合し、この複合体がグラム陰性細菌のエンドトキシンであるリポ多糖(LPS)の活性中心本体の lipid A を認識することによって活性化し、細菌などの感染から生体を防御している。一方、過度の LPS に暴露した際にはエンドトキシンショックによる敗血症を惹起する。

本研究では、ヒト MD-2 蛋白質の三次元構造を X線結晶構造解析により解明し、さらに lipidA のアンタゴニストである lipid IVa との複合体の構造から、MD-2 による LPS 認識に関する構造生物学的知見を得ることを目的とした。

【MD-2 の発現, 精製】 アミノ末端にヒスチジンタグと factor Xa 認識配列を付加したヒト MD-2(アミノ酸残基 17-160)の cDNA を、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* 用の発現ベクターの酵母由来のシグナルペプチドである  $\alpha$ -mating factor 下流に組み込み、組換え体 MD-2 を発現させた。5 ステップのカラムクロマトグラフィー操作、factor Xa によるタグの切断と Endoglycosidase Hf による糖鎖の短鎖化を経て、SDS-PAGE 上で単一のバンドとなるまで精製し、結晶化サンプルとした。この組換え体 MD-2 は lipid A, lipid IVa と LPS への結合能を有し、また、MD-2 欠損細胞への添加が LPS 応答を惹起することを確認した。MD-2 に対して当量の lipid IVa を混合した後に陽イオン交換カラムによって lipid IVa 複合体を分取し、結晶化サンプルとした。ゲルろ過カラムの溶出時間は、ネイティブ体、lipid IVa 複合体ともに単量体であることを示す。

【結晶化】 ポリエチレングリコール 8000 を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散平衡法を用いてネーティブ体結晶を析出させた。結晶の空間群は  $P4_12_12$ , 格子定数は  $a = 53.1 \text{ \AA}$ ,  $c = 111.5 \text{ \AA}$  であり, 非対称単位に MD-2 が 1 分子存在する。ポリエチレングリコール 3350 を結晶化剤としてネーティブ体結晶と同型の lipid IVa 複合体結晶( $a = 52.8 \text{ \AA}$ ,  $c = 110.9 \text{ \AA}$ )を析出させた。

【実験結果と考察】 これまでに、MD-2の単体での結晶とリガンド複合体の結晶を得ており、課題R05A47XU-0036Nにおいて、単体結晶については $2.9 \text{ \AA}$ 、リガンド複合体結晶については $4.5 \text{ \AA}$ のデータを得ている。今回の実験では、単体についての水銀置換結晶を用いて、多波長での異常分散効果を用いた位相決定を行うこと、また高分解能での構造決定を目的とした。

MD-2結晶について、水銀置換結晶の多波長データ収集を行った。蛍光X線スペクトルを測定し、ピーク波長を $1.0066 \text{ \AA}$ 、エッジ波長を $1.0087 \text{ \AA}$ 、リモート波長を $0.993 \text{ \AA}$ と決定した(Fig.1)。これらの波長を用いて、塩化エチル水銀と塩化水銀誘導体結晶について、ともに $1.9 \text{ \AA}$ 分解能、R-merge 5%程度のMADデータを得ることができた。測定はすべて液化窒素気流下 $100\text{K}$ で行った。回折強度データの記録はCCD検出器 (Rigaku/MSJ Jupiter210)、積分強度算出およびスケールングにはプログラムHKL2000を使用した。

また同型置換結晶として、水銀置換結晶に加え、白金誘導体、ヨウ素誘導体等のデータ収集を行った。これらについても、分解能 $2.0 \text{ \AA}$ 程度の良好な回折強度を得ることができた。

さらに、ネーティブ結晶についても、 $2.2 \text{ \AA}$ の高分解能データを収集できた。データ測定の統計値をTable 1に示す。

また、リガンドとの複合体の結晶についても測定を行ったが、 $5 \text{ \AA}$ 程度の反射しか与えず、データの収集には至らなかった。

塩化エチル水銀誘導体の MAD データについてのバイフット差と分散差を Table 2 に示す。分散差は edge と remote 間で最大となるべきだが、波長間での違いが小さい。またバイフット差についても peak>remote>edge となることが期待されるが、その傾向は見られない。パターン図についてもピークが明瞭に観測されなかった。すでに分かっている Hg サイトを用いて

プログラム SHARP, MLPHARE で精密化を試みたが良好な結果は得られなかった。分子の境界が判別できる程度の電子密度も得られない。また, MIR による解析も試みたがモデル構築可能な電子密度は得られなかった。

その後の解析より, 今回得たデータは双晶によるものであることが示唆された(Fig. 2A)。Cumulative intensity distribution のシグモイド様の分布と, 強度  $I$  の 2 次のモーメントが 1.5 に近いことが双晶の可能性を示している。今回の実験で得た全てのデータはこの傾向を示しており, このことが構造解析を困難にしていると考えられる。

この双晶は  $c$  軸を共有する大きな格子と小さな格子によるものであり, 抗凍結剤を最適化することにより大きな格子から小さな格子への変換が起こることが明らかとなった(Fig. 3)。 $a$  軸と  $b$  軸にほぼ平行に存在する非結晶学的 2 回軸がこの格子変換を可能にしている。格子変換の結果得られる小さい格子についての回折強度の統計値には双晶の兆候は見られない(Fig. 2B)。この小さい格子についてのデータを用いた MIR による解析では, 解釈可能な電子密度を得ることができた。

その後の課題 2006B1687 において, 小さい格子についてのネイティブデータと重原子置換体データを測定し, MD-2 の三次元構造モデルを得ることができた。

Fig. 1. 蛍光 X 線スペクトル.

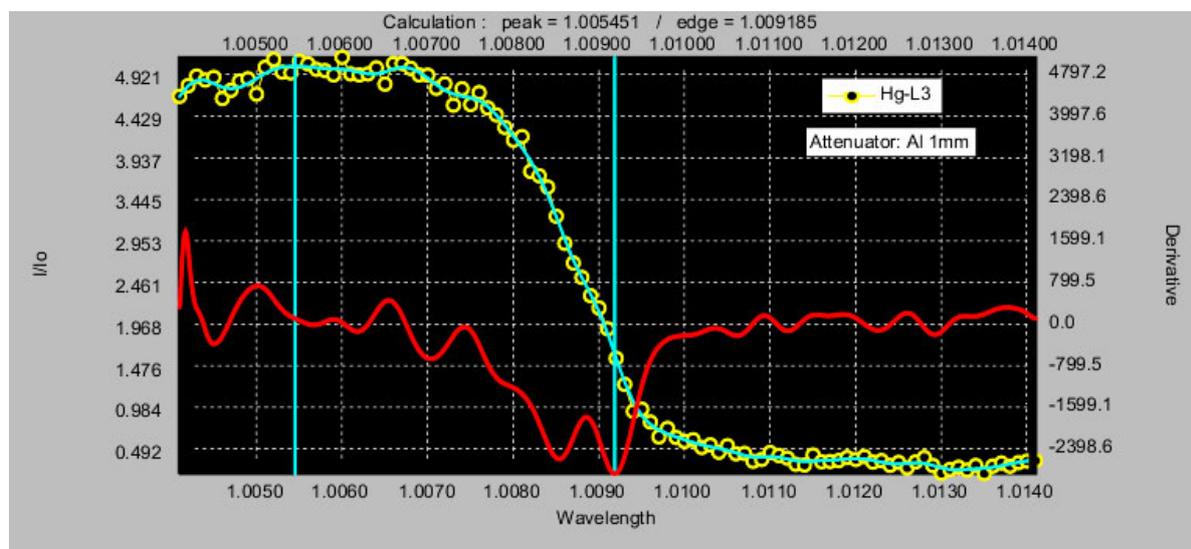
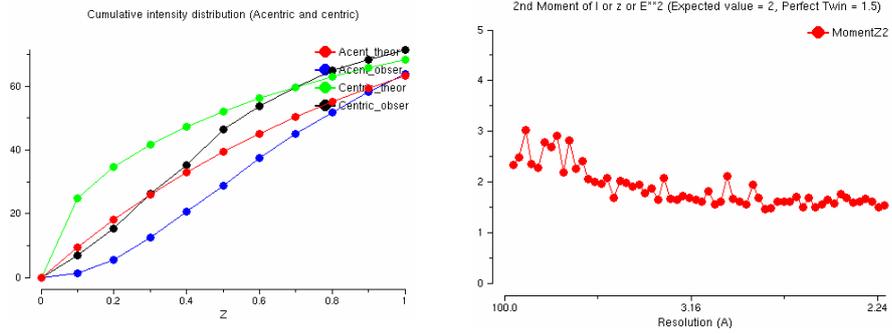


Fig. 2. 回折強度の分布.

A. Native data (Initially obtained)



B. Native data (after lattice transformation)

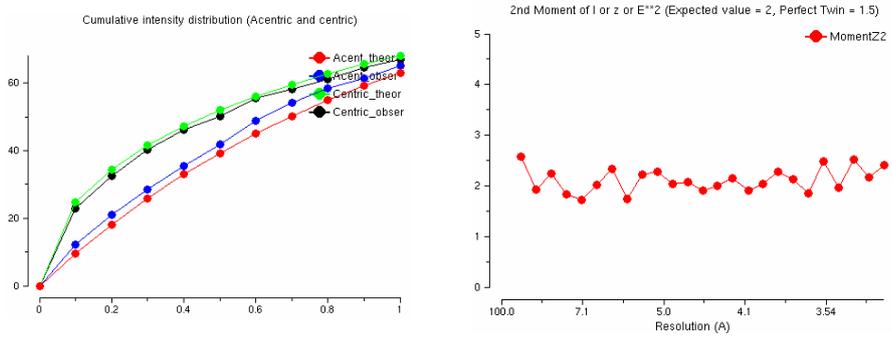


Fig. 3. 結晶格子の変換.

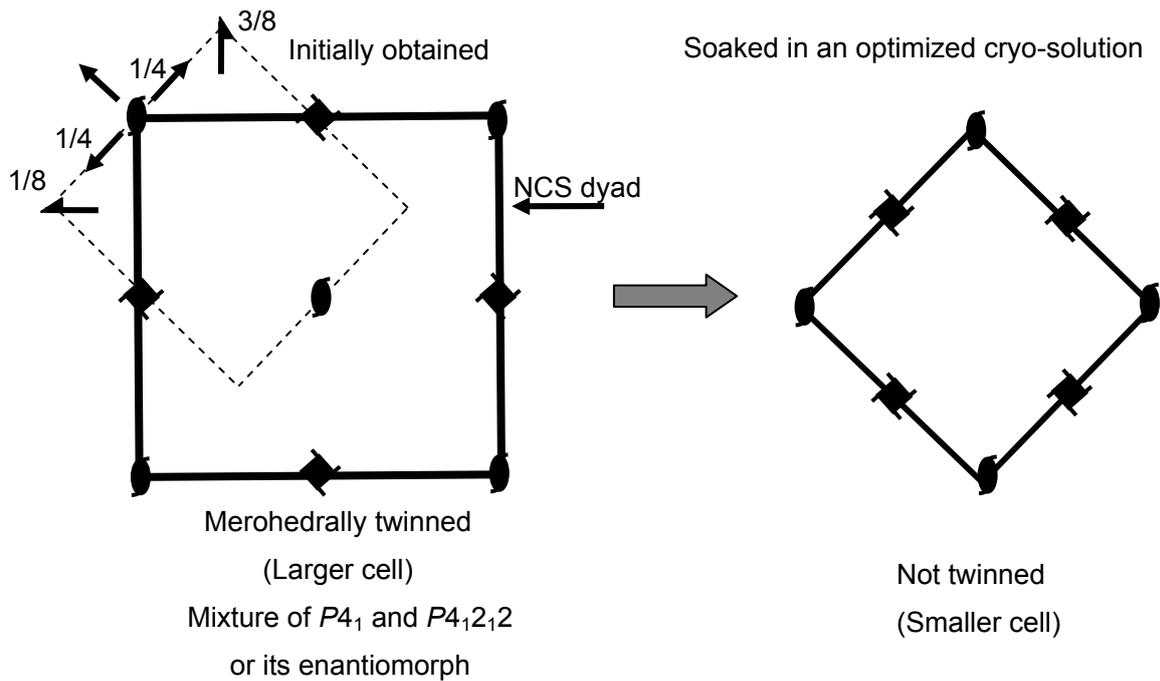


Table 1. Data collection statistics.

|  | Native | KI    | EtHg   |        |        | HgCl2                 |        |        | PCMB  | K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> |        |
|--|--------|-------|--------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|-------|----------------------------------|--------|
|  |        |       | Peak   | Edge   | Remote | Peak                  | Edge1  | Edge2  |       |                                  | Remote |
| Space group                            |        |       |        |        |        | <i>P4<sub>1</sub></i> |        |        |       |                                  |        |
| Wavelength(Å)                          | 0.993  | 0.993 | 1.0066 | 1.0087 | 0.993  | 1.0066                | 1.0087 | 1.0084 | 0.993 | 1.0066                           | 1.0720 |
| <i>a</i> (Å)                           | 74.7   | 74.9  | 74.7   | 74.7   | 74.7   | 74.7                  | 74.7   | 74.7   | 74.7  | 74.9                             | 74.8   |
| <i>b</i> (Å)                           | 111.7  | 111.8 | 111.6  | 111.6  | 111.6  | 111.6                 | 111.6  | 111.6  | 111.6 | 111.7                            | 112.1  |
| Oscillation (°)                        | 180    | 180   | 152    | 152    | 152    | 90                    | 90     | 90     | 90    | 146                              | 90     |
| Multiplicity                           | 7.7    | 7.8   | 5.6    | 5.8    | 5.8    | 3.8                   | 3.8    | 3.8    | 3.8   | 5.4                              | 3.8    |
| Resolution (Å)                         | 2.2    | 1.9   | 1.9    | 1.9    | 1.9    | 1.9                   | 1.9    | 1.9    | 1.9   | 1.9                              | 2.0    |
| Mosaicity (°)                          | 0.46   | 0.52  | 0.59   | 0.59   | 0.60   | 0.57                  | 0.56   | 0.56   | 0.58  | 0.80                             | 0.82   |
| <i>R</i> <sub>merge</sub> ( <i>I</i> ) | 15.8   | 16.2  | 5.7    | 5.7    | 5.7    | 4.9                   | 4.9    | 5.0    | 5.2   | 7.1                              | 3.6    |
| Completeness                           | 99.8   | 99.2  | 95.5   | 95.1   | 94.9   | 92.1                  | 91.9   | 91.8   | 90.2  | 92.9                             | 95.6   |
| <i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )       | 28.6   | 17.8  | 18.4   | 18.2   | 17.5   | 11.5                  | 11.4   | 11.0   | 10.3  | 11.9                             | 16.2   |
| Concentration                          |        | 0.25M |        | Sat.   |        |                       | Sat.   |        |       | Sat.                             | 10mM   |
| Soaking time                           |        | 1min. |        | 5hr.   |        |                       | 5hr.   |        |       | 3hr.                             | 15min. |
| <i>R</i> <sub>iso</sub>                |        | 0.240 | 0.229  |        |        | 0.237                 |        |        |       | 0.224                            | 0.143  |

Table 2. Anomalous and dispersive differences of EtHg derivative.

|        | Peak         | Edge           | Remote         |
|--------|--------------|----------------|----------------|
| バイフット差 | 0.065        | 0.066          | 0.060          |
|        | Peak to edge | Peak to remote | Edge to remote |
| 分散差    | 0.033        | 0.042          | 0.040          |