

萌芽的研究支援課題（課題番号：2007B1657）研究報告書

実験課題名：ヒトリソソーム糖加水分解酵素の結晶構造解析

使用ビームライン：BL38B1

実験責任者：臼井 公人  
所属：東京大学大学院薬学系研究科  
機能薬学専攻博士課程3年

## 【背景】

リソソーム是一群の加水分解酵素を含み、消化活動を営む細胞内小器官である。ヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼはリソソームに局在するリソソーム酵素の一種であり、糖脂質や糖タンパク質の非還元末端の $\beta$ -ガラクトシド結合を切断する働きを持つ。リソソーム酵素の活性が低下することにより、酵素に対する基質がリソソーム内に蓄積して起こる疾患としてリソソーム病が知られている。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性低下により、引き起こされるリソソーム病として、GM<sub>1</sub>ガングリオシドーシスと、Morquio B病が知られており、体内には、基質である GM<sub>1</sub>ガングリオシドおよびケラタン硫酸の蓄積が認められる。現在までに、ヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼの三次元構造的知見は得られていない。ヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼの三次元構造を決定することにより、ガラクトースを加水分解する機構および疾患を惹起する酵素の性状と構造との関わりを明らかにすることができ、治療薬の開発に繋がることが期待される。課題 2007B1657 においては、本酵素の三次元構造の解明を目指して BL38B1 において実験を行った。

## 【方法】

### 重原子の導入

重原子のタンパク質結晶への導入は、ソーキングにより行った。重原子試薬は、エチルリン酸水銀 (Ethylmercuriphosphate : EMP)、p-chloro-mercuribenzesulfonate (PCMBs)、K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>、NaI を用いた。EMP、PCMBs、K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> はそれぞれ 1mM、2mM、2.5mM の濃度になるように重原子試薬を安定化母液に溶かすことにより調製した。NaI は抗凍結剤に 0.25 M の濃度になるように溶かして調製した。EMP は実験室において 2 晩、PCMBs は 1 晩ソーキングを行い、バックソークは行わなかった。K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> は実験室において 2 晩ソーキングを行った後に、BL38B1 において 30 分間バックソークを行った。NaI は 30 秒間ソーキングを行った。ソーキング・バックソーキング共に、4°C で行った。

### データ測定

結晶の質を評価した後にデータ測定を行うことを考えて、上記の方法で準備した重原子結晶を、サンプルチェンジャーを利用して実験を行えるように測定前日に、Spring-8 において液化窒素気流下 100 K で凍結して準備をした。測定当日は、測定波長 1.000 Å、測定はすべて液化窒素気流下 100 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リングにはプログラム HKL2000 を使用した。白金誘導体については XAFS を測定し、peak 波長 = 1.07092 Å、edge 波長 = 1.07229 Å と決定して MAD データを測定した。

## 【結果・考察】

実験室でサンプルチェンジャー用に凍結することができなかったため、凍結せずに輸送したが、その際に結晶にダメージを与えてしまい、満足いく測定が行えなかった。Native 体では、分解能は 2.06 Å、空間群は P2<sub>1</sub>、格子定数は a = 94.8 Å、b = 116.3 Å、c = 140.6 Å、 $\beta = 92.3^\circ$ 、R<sub>merge</sub> は 12 % であった。これより、非対称単位中に 4 分子存在すると考えられる。自己回転関数を計算した結果、これは dimer が 2 分子入っているものと考え

られる。結晶の外形と、各軸との関係は、Figure 1 に示したとおりになる。白金誘導体、PCMBS 誘導体は分解能 3.5 Å まで、NaI 誘導体は 4.0 Å までのデータを測定した。これらの結果を Table 1 に示した。エチルリン酸水銀についてはダメージが大きく、データセットを取ることができなかった。格子定数は a 軸については、おおよそ 0.5 % 以内に変化が収まっているが、その他の b, c 軸および角度  $\beta$  については変化がそれ以上のものもあった。

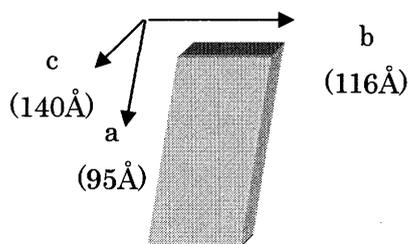


Figure 1  
結晶の外形と各軸との対応  
縦 a 軸  
横 b 軸  
厚み c 軸

	Native	Pt	Pt peak	Pt edge	PCMBS	NaI
a (Å)	94.80	95.01	95.31	95.17	95.14	94.88
b	116.25	117.10	117.4	117.29	119.70	118.49
c	140.61	140.78	141.15	140.84	142.76	142.27
$\beta$ (°)	92.28	92.31	92.37	92.37	91.26	91.45
Space group	P2 <sub>1</sub>					
Average I/ $\sigma$ (I)	6.7	4.7	5.5	6.2	4.2	8.40
Resolution (Å)	2.06	3.5	3.5	3.5	3.50	4.00
R <sub>merge</sub>	0.12	0.14	0.13	0.12	0.19	0.10
Completeness (%)	94.1	91.3	96.7	98.5	76.0	78.30
$\lambda$ (Å)	1.000	1.000	1.07092	1.07229	1.000	1.000

これらのデータ間での同型性をプログラム CCP4 によりチェックした結果、R<sub>iso</sub> 値では、すべての結晶で重原子が導入されている可能性を示していた。そこで全ての重原子データでプログラム Autosharpe を用いて、解を探したが、最終的に決定することはできなかった。差パターン図を描いて、Harker section を調べてみたが、明瞭なピークは、いずれの重原子結晶でも認められなかった。その一例を、Figure 2, 3 に示した。native データでも R<sub>iso</sub> 値が 0.1 を切るものが無く、0.15 程度のももあり、差パターン図を描いた際に、わずかではあるが、不自然に高いピークが確認できた。結晶間の同型性に問題があるようなので、MIR 法から同型性が問題にならない MAD 法に切り替えることを考え、多波長でのデータ測定を行うことにした。

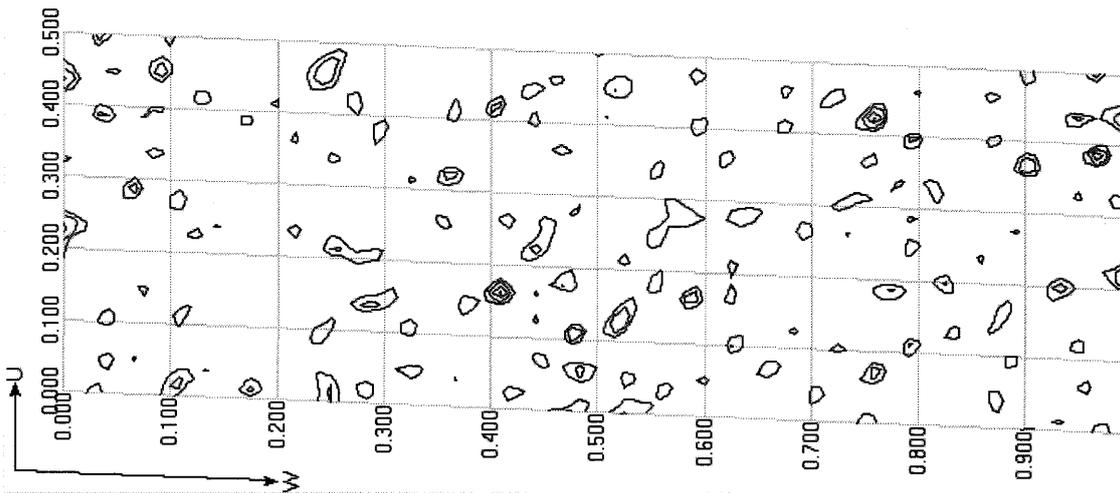


Figure 2 native 結晶間での差パターン図を描いたものを示す。Harker section、等高線は  $1\sigma$

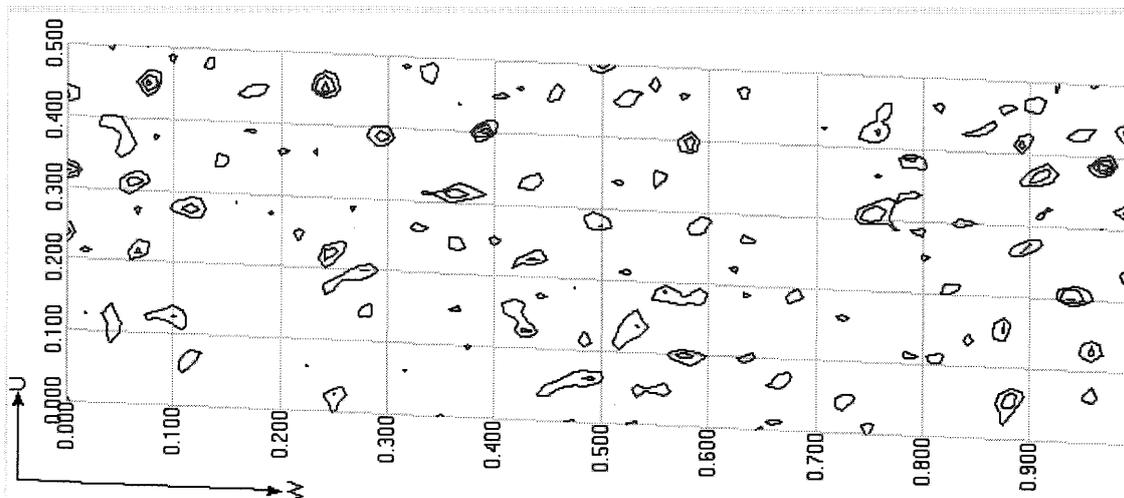


Figure 3 今回の測定での native 結晶と Pt 誘導体結晶間での差パターン図を描いたもの。やや高いピークが認められるが、native 結晶間でのものと、あまり差が無いように見える。Harker section、等高線は  $1\sigma$

$K_2PtCl_4$  結晶での XAFS の測定結果を Figure 4 に示す。これより Pt はおそらく結晶中に取り込まれていると考えられ、peak 波長を  $1.07092 \text{ \AA}$ 、edge 波長を  $1.07229 \text{ \AA}$  と決定した。これらの波長での測定結果は Table 1 に示してある。peak 波長でのデータも、edge 波長でのデータも  $R_{merge}$  値が高く、データの質が MAD 法を行えるほど十分に良くはないことを示している。anomalous パターン図を見ても、解と思われるようなピークは存在せず、プログラム Autossharp でも解を求めることはできなかった。

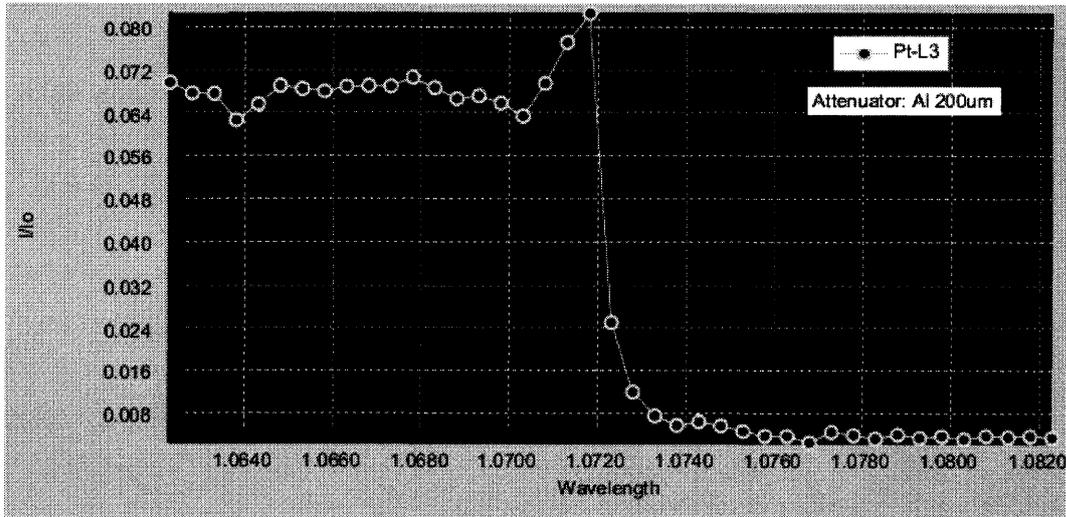


Figure 4, Pt 誘導体結晶の XAFS 測定の結果

今現在、三次元構造が明らかになっているタンパク質の中で最も高い相同性を示すタンパク質は、*Penicillium. sp* のβ-ガラクトシダーゼであり、その Identity は約 25 % である。この *Penicillium. sp* のβ-ガラクトシダーゼを基にして、分子置換法を行ってみたが、やはり解は見つからなかった。

今回の測定では、重原子位置を決定し、位相を決めるまでには至らなかった。結晶がダメージのせいで、良い回折強度データを得ることができなかったためだともいえる。しかしながらその後回折像を良く調べてみると、結晶が単結晶ではなく多結晶であることがわかった。主に同程度の大きさの結晶（割合は 5:4 ぐらいか？）2 つからなり、場合によっては割合が 1 未満の結晶がさらに 1 つか、それ以上くっついてできていることが明らかになった。2 つの主な結晶は、格子定数は同じ結晶であると考えられ、4~5° ずれてくっついてあるものと考えられる。

現在考えられる、2 つの結晶の相対配置を Figure 5 に示す。

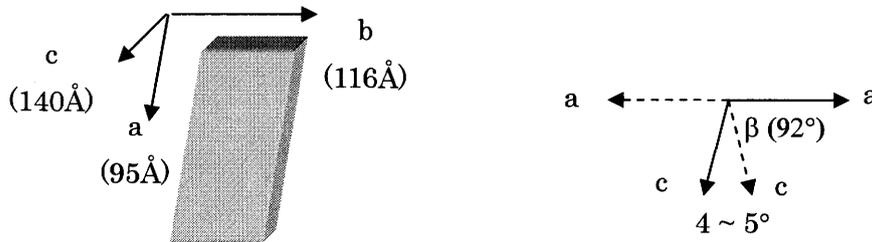


Figure 5, 2 つの結晶の相対配置 ab 面が共通と考えられる。

結晶化条件の検討をその後さらに行い、単結晶の作成を試みたが、現在までのところ得られていない。結晶化条件を検討することにより、それぞれの結晶の mosaicity は改善することができたが、2 つの結晶の相対的な配置を改善することはできなかった。この 2 つの結晶

の配置は、調べた限りではほぼ一定の関係を保っていた。改善策として、それぞれの結晶由来の回折点を別々に処理して解析するという方法も考えられるかもしれないが、像を見る限り、確実に1つの結晶由来であるはずの回折点の中にも、不自然な点列が見受けられ、解析に耐えうる結晶が2つ合わさった多結晶ではなくて、解析に耐えられない程度の質の結晶が合わさった多結晶であると考えられる。これは2つの結晶由来の回折点を別々に処理するプログラムを作るなどで対応できるような問題ではなく、結晶性を改善して、何とかして単結晶を析出させる方向で解決しなければならないだろう。現在までに添加剤なども数多く試したが、単結晶は析出しなかったため、タンパク質自体に問題があるのではないかと考えられる。今後はタンパク質の改変を中心に単結晶を得る努力が必要になると考えられる。