

小型熱ショックタンパク質の X 線結晶構造解析

京都大学大学院理学研究科 博士後期課程 3 年 秋山信彦

分子シャペロン的一种である小型熱ショックタンパク質 (sHSP) はさまざまな生物種に普遍的に存在し、熱ストレス存在下における細胞機能維持に重要な役割を果たしている。非ストレス下では大きな多量体 (9-40 量体) として存在し、熱ストレス下ではより小さな会合状態となる。この状態でタンパク質基質の折りたたみ中間体と安定な複合体を形成することによって熱凝集を防ぐ。これまでに二種類の sHSP の構造が解明されているが、会合状態を決定する要因や会合状態変化の機構、基質を熱変性から保護する仕組みについての詳細は解明されていない。そこで、分裂酵母由来の sHSP (SpHsp16.0) を対象として X 線結晶構造解析を行っている。SPRING-8 における回折実験の結果、2.4 Å 分解能の回折データを収集することに成功し、空間群を $P222$ 、格子定数を $a=78.3$ Å、 $b=121.1$ Å、 $c=122.6$ Å と決定することが出来た。また、自己回転関数から 4 回軸の存在が示唆される結果を得ることが出来た。

1. 序論

分子シャペロンのサブファミリーである小型熱ショックタンパク質 (small Heat Shock Protein, sHSP) は、あらゆる生物に普遍的に存在し[1]、*in vivo*で細胞に耐熱性を与え[2,3]、*in vitro*でタンパク質の熱凝集を防ぐことなどから[4-6]、熱ストレス存在下における細胞機能の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。sHSPは非常に変化に富むN末ドメインと、保存された α -クリスタリンドメイン、部分的に保存されたC末ドメインからなる[7]。また、sHSPは非ストレス下で大きな多量体として存在し(9-40 量体)、熱ストレス下ではより小さな会合体、おそらく2 量体となって基質で

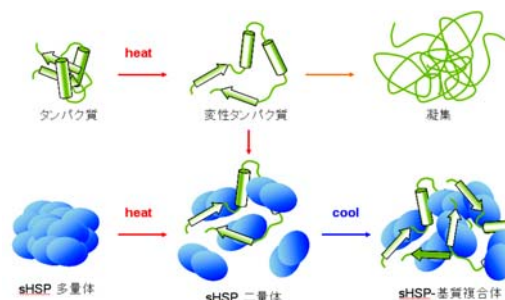


図 1. sHSP のシャペロン機能発現機構モデル。

ある変性タンパク質と結合すると考えられている (図1)。現時点で超好熱古細菌 *Methanococcus jannaschii* 由来 HSP16.5(MjHSP16.5)の24 量体の結晶構造 [8] (図 2A) と、小麦 wheat 由来の HSP16.9(wHSP16.9)の12 量体の結晶構造 [9](図2B)が決定されている。分裂酵母由来

のSpHSP16.0も上記のようなsHSPの特徴を有し、MjHSP16.5と30%の、wHSP16.9と31%の配列相同性がある。また、非ストレス下では16量体を形成していると考えられている[10]。本研究では、分裂酵母由来のSpHSP16.0の結晶構造を明らかにすることにより、会合状態を決定する要因や会合状態変化の機構、さらには、どのようなシャペロン機能発現機構が存在するのかをより詳細に明らかにすることを目的として研究を行った。

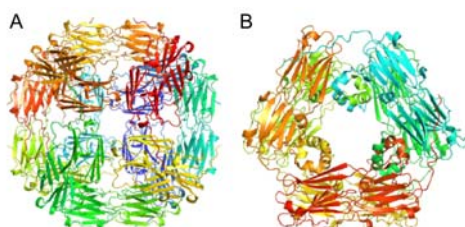


図2. これまでに構造解析されているsHSPの結晶構造。(A) 超好熱古細菌 *Methanococcus jannaschii* 由来 HSP16.5(MjHSP16.5)。(B) 小麦 wheat 由来の HSP16.9(wHSP16.9)。

2. 実験方法

結晶化実験には、東京農工大学・養王田研において発現精製された分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 由来 sHSP (SpHsp16.0)[10]を、限外濾過膜で 18 mg/ml に濃縮して使用した。市販の結晶化条件スクリーニングキットを使用して初期条件探索を行い、結晶が析出した条件について最適化を行った。極低温実験を行うために 30%(v/v) PEGMME 550 を含む溶液を調整し、クライオプロテクタントとした。X 線回折

実験を行う際には、結晶を CryoLoop (Hampton Research 社)で母液からすくい、クライオプロテクタントへ数秒間ソーキングした後、100K の窒素気流で瞬間凍結させてから行った。

X 線回折実験は、大型放射光施設・SPring-8 BL38B1で行った。回折像はCCD検出器であるJupiter 210 (リガク)を用いて記録した。

収集した回折データは、プログラム HKL2000[11]で、各回折点の指数付け、強度計算、強度補正を行い、各強度データ $I(hkl)$ を得た。また、プログラムパッケージ CCP4[12,13]のプログラム TRUNCATE[14]を用いて、 $I(hkl)$ を構造因子の振幅 $F(hkl)$ のデータに変換した。CCP4のプログラム HKLVIEWを用いることで擬似プレセッションイメージを表示させ、空間群を決定した。結晶学的な対称性や非結晶学的な対称性を分析するために、自己回転関数を計算した。

SpHSP16.0 は MjHSP16.5 と 30% の、wHSP16.9 と 31%の配列相同性がある。また、MjHSP16.5 と wHSP16.9 の多量体構造は異なっているが、2 量体構造は類似している。このため、sHSP はこの2 量体が構造単位となって、多量体が構成されていると考えられる。SpHSP16.0 においてもこれらと類似した2 量体から構成されていると仮定して、分子置換法を試みた。サーチモデルとして用いたのは、MjHSP16.5 の2 量体構造を基本とし、そこからwHSP16.9 と異なっている部位を除いたものである。SpHSP16.0 は非対称単位中に8 分子存在すると考えられるので、2 量体を4 つサーチした。その際、用いる分解能を変化させて計算を行った。

また、モデル分子の残基を全てアラニンに変えたポリアラニンモデルもサーチモデルとして用いた。回転関数と並進関数の計算にはCCP4のプログラムMOLREP[15]を用いた。

3. 結果と考察

スクリーニングの結果、Crystal Screen II #46 (Hampton Research 社)を沈殿剤とする条件[20%(v/v) PEGMME550, 100 mM Bicine pH9.0, 100 mM Sodium Chloride]から結晶が得られたが、多数の小さな結晶が生成しやすい傾向があった。また、結晶に傷が入っ

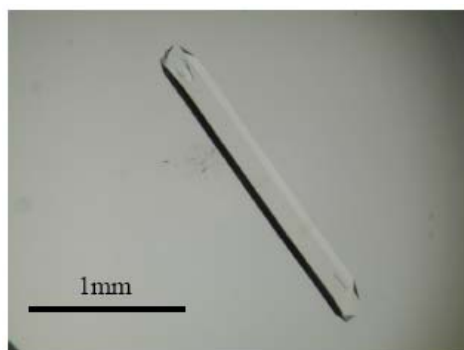


図3. SpHSP16.0の結晶。

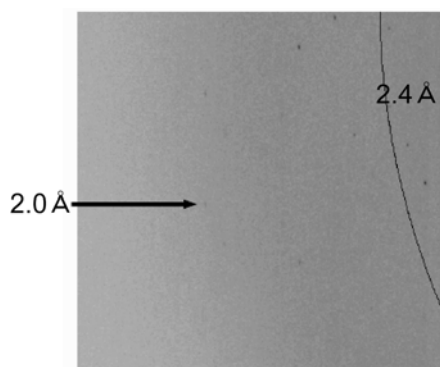


図4. SpHSP16.0結晶の回折写真。

ているものも多く、X線回折実験に適しているとはいえなかった。そこで最適化の際

には、1つの内液から生成する結晶の数を減らし、1つ1つの結晶の大きさをより大きくするために、タンパク質濃度を10 mg/mlまで希釈して、主たる沈殿剤であるPEGMME550の濃度を下げて、結晶の成長を遅くすることを試みた。その結果、最適化された条件[10 mg/ml protein, 15%(v/v) PEGMME550, 100 mM Bicine pH9.0, 100 mM Sodium Chloride]で良質な単結晶を得ることができた(図3)。

複数の結晶について回折実験を行ったが、最高で2Å分解能の回折データを記録することができた。回折像を図4に示した。データ処理の結果、2.4 Å分解能のデータセットとすることに成功し、空間群をP222、格子定数を $a=78.3$ Å、 $b=121.1$ Å、 $c=122.6$ Åと決定することが出来た。データの測定条件、回折データの統計値は表1に示した。さらに、処理した回折データを用いて自己回転関数を計算した(図5)。その結果、2回軸について計算したマップ($\chi=90^\circ$)上で、結晶学的な対称を示す3つのピークのほかに、別の2つのピークが存在した。また、4回軸についてのマップ($\chi=180^\circ$)上にもピークが認められた。これらのことから、非対称単位中の分子に非結晶学的な4回軸が存在することが推定

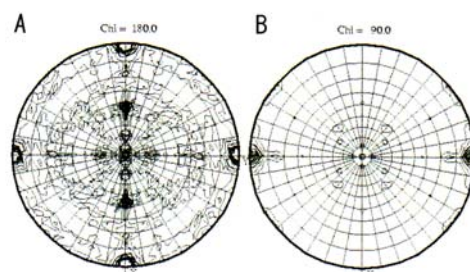


図5. SpHSP16.0結晶の自己回転関数。

(A) $\chi=180^\circ$ 、(B) $\chi=90^\circ$ 。

できた。

V_M 値は単位格子の体積と分子量の比で、多くのタンパク質結晶では V_M 値 1.7-3.5Å³/Da の間であり、最も多いのは2.15 Å³/Da の付近であるという統計がある[16]。自己回転関数の結果も考慮すると、非対称単位中に8分子存在すると考えられ、この場合 V_M 値は2.27 Å³/Daとなり溶媒含有率は45.8%となる。

類似構造を使用した分子置換法による位相決定は不成功に終わったため、現在は重原子誘導体の作成を行っている。

4. 謝辞

本研究は京都大学大学院・三木邦夫教授、東京農工大・養王田正文教授との共同研究としておこなわれた。また、(財)高輝度光科学研究センターにより萌芽的研究支援課題として多岐にわたる手厚い支援を受けました。SPring-8・BL38B1での測定の際には

ビームラインスタッフの方には大変にお世話になりました。

表1. 測定条件、結晶学的データおよび統計値。

wHSP16.0	
波長 (Å)	1.0000
温度 (K)	100
空間群	P222
格子定数 (Å)	a=78.3, b=121.1, c=122.6
分解能 (Å)	50 – 2.40 (2.49 – 2.40)
多重度	5.8
I/σ(I)	22.1 (2.9)
完全性 (%)	89.1 (79.8)
R_{sym} (%)	5.4 (27.6)

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}}$$

括弧内は最外殻の分解能に対する値である。

文献

- [1] Narberhaus, F. (2002) α -Crystallin-type heat shock proteins: Socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 64-93.
- [2] van den, I. P. R., Overkamp, P., Knauf, U., Gaestel, M., and de Jong, W. W. (1994) α A-crystallin confers cellular thermoresistance. *FEBS Lett.* **355**, 54-56.
- [3] Plesofsky-Vig, N., and Brambl, R. (1995) Disruption of the gene for hsp30, an α -crystallin-related heat shock protein of *Neurospora crassa*, causes defects in thermotolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5032-5036.
- [4] Horwitz, J. (1992) α -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10449-10453.
- [5] Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**, 1517-1520.
- [6] Muchowski, P. J., and Clark, J. I. (1998) ATP-enhanced molecular chaperone functions of the small heat shock protein human α B crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1004-1009.
- [7] Leroux, M. R., Ma, B. J., Batelier, G., Melki, R., and

- Candido, E. P. (1997) Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 12847-12853.
- [8] Kim, K. K., Kim, R., and Kim, S. H. (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**, 595-599.
- [9] van Montfort, R. L., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C., and Vierling, E. (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1025-1030.
- [10] Hirose, M., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Tsushima, R., Zako, T., Iizuka, R., Pack, C., Kinjo, M., Ishii, N., and Yohda, M. (2005) Interaction of a small heat shock protein of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, with a denatured protein at elevated temperature. *J. Biol. Chem.* **280**, 32586-32593.
- [11] Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods. Enzymol.* **276**, 307-326.
- [12] Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta. Cryst. D* **50**, 760-763.
- [13] Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., and Dodson, E. (2003) A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta. Cryst. D* **59**, 1131-1137.
- [14] French, G. S., and Wilson, K. S. (1978) On the treatment of negative intensity observations. *Acta. Cryst. A* **34**, 517-525.
- [15] Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025.
- [16] Mattherws, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.