

(様式第5号)

## ヘパラン硫酸糖鎖生合成に関わる硫酸転移酵素のX線結晶 構造解析

### Crystal Structure of Heparan Sulfate N-sulfotransferase

水上 有紗、角田 佳充

Arisa Mizukami, Yoshimitsu Kakuta

九州大学大学院 農学研究院

Faculty of Agriculture, Kyushu University

#### 1. 概要

ヒト生体内において、ヘパラン硫酸糖鎖生合成過程で働くヘパラン硫酸 N-スルホトランスフェラーゼ (NST) について、アクセプター基質であるヘパロサン糖鎖認識機構を明らかにする為に、NST、3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAP)、ヘパロサン糖鎖の3成分複合体の結晶構造解明を試みた。3成分複合体を目指して作製した結晶を用いて、X線回折実験を行った。その結果、構造精密化可能なX線回折データが得られた。共結晶化したPAPの電子密度ははっきりと観察できたが、ヘパロサン糖鎖に対応する電子密度は観察できなかった。

Heparan sulfate chains are ubiquitous as proteoglycans on cell surfaces and in the extracellular matrix. They have been increasingly implicated in various biological processes including cell growth, cell differentiation, blood coagulation, and viral and bacterial infections. Heparan sulfate N-sulfotransferase (NST) catalyzes the first and obligatory step in the biosynthesis of heparan sulfates and heparin. To better understand the structural basis for its substrate specificity, we attempted to determine the crystal structure of NST in complex with a substrate.

#### 2. 背景と目的

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、哺乳動物の細胞表面や基底膜上に存在し、広く生体内に存在する成分である。働きとしては、特定のタンパク質の活性化や、細胞表面への局在化があり、細胞成長や脂質代謝において重要な役割を担っている。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖成分であるヘパロサン糖鎖は、前駆体であるヘパロサン糖鎖からいくつかの過程を経て合成される。その最初の過程である、硫酸化を担っているのがヘパラン硫酸 N-スルホトランスフェラーゼ (NST) である。ヘパロサン糖鎖はグルクロン酸 (GlcA) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の二糖繰り返し構造を持っており、NST は GlcNAc の N 位を硫酸化する。NST は硫酸転移のドナー基質として 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) を用いるが、その反応後生成物である 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAP) との複合体の立体構造は明らかになっている。今回、さらに詳しい基質認識機構や反応メカニズムをかいめいするため、PAPに加えてNSTのアクセプター基質であるヘパロサン糖鎖を結合させた三成分複合体のX線回折データを得るため、ソーキングによるX線回折実験を試みた。NSTの構造には基質糖鎖を結合すると考えられる大きな溝が存在するので、その付近の電子密度を中心に観察した。

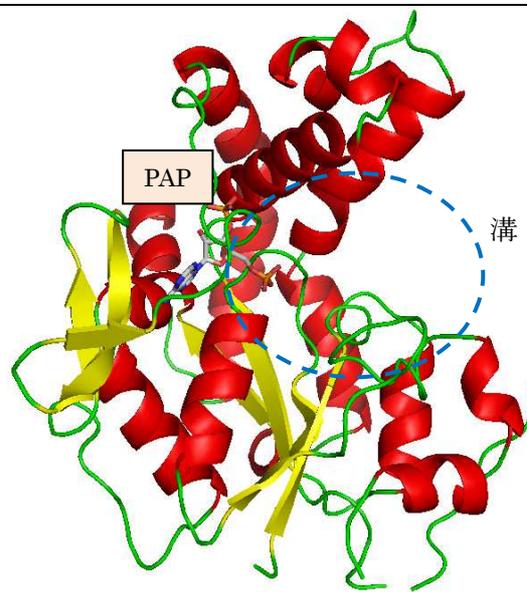


Fig.2-1 NST の立体構造

### 3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

実験には、NSTのサンプル溶液にPAP溶液を加え、Hanging drop蒸気拡散法によって得られた結晶を用いた (Fig.3-1)。



Fig.3-1 実験に用いた結晶

Sample	
NST	22.2 mg/mL
Tris-HCl pH8.0	50 mM
NaCl	50 mM
PAP	2 mM
Reservoir	
Potassium sodium tartrate	0.2 M
PEG 3350	22 %

Table3-1 結晶化条件

ソーキングに用いた基質糖鎖は、ヘパロサン糖鎖のGlcNAcのN位が脱アセチル化されたものを用意した。これは硫酸化される直前の状態を再現したものである。糖鎖の長さ四糖と六糖のものを用意し、それぞれ滅菌水で溶かし200 mMの溶液にした。この基質溶液をCryo溶液と1 : 1の割合で混合したものに結晶をソーキングしてX線回折実験を行った。(混合後はグリセロール濃度15%、基質溶液濃度100 mMとなる)

Potassium sodium tartrate	0.2 mM
PEG 3350	22 %
Tris-HCl	50 mM
NaCl	50 mM
Glycerol	30 %

Table3-2 Cryo溶液の条件

具体的な操作としては、まず、結晶をCryo溶液のみの溶液に浸してすぐにX線をあて、回折点が出るか確認した。その後Cryo溶液と基質溶液を混合したものに戻して一定時間浸し、再びX線をあてた。このとき回折点が出たものは、フルデータをとった。同様の操作をCryo+基質溶液に浸す時間を変えて数回行った。

#### 4. 実験結果と考察

基質溶液との混合により、Cryo 溶液中のグリセロール濃度は低くなるが、フラッシュクーリングによる溶液の凍結は見られなかった。基質溶液に浸す時間は、六糖で5分と1分、四糖で4分と2分と1分と変化させて実験した。それぞれの結果を表に示す。

基質糖鎖	六糖		四糖		
ソーキング時間	5 min	1 min	4 min	2 min	1 min
分解能	×	2.3 Å	×	2.7 Å	3.5 Å

Table.4-1 ソーキング時間と X 線回折実験結果

Table.4-1 において×で示しているのはソーキング後の X 線照射で回折点が得られなかった条件である。その他の条件に関しても、複結晶になっていたためか、回折点が重なってでていたが、xdsme でメインの結晶からの回折データのみを選ばせてプロセスさせることができた。この結果から、基質溶液に長時間浸すことにより、結晶に何らかのダメージを与えていることが考えられた。

得られた回折データは、NST-PAP 複合体結晶構造のタンパク質立体構造データ (PDB : ) を用いて分子置換を行った後、WinCoot による分子モデリングと ccp4 による構造精密化を行った。Fig.4-1 に、六糖基質溶液に1分間ソーキングした回折データの電子密度の図を示す。これは基質糖鎖が結合すると考えられる溝の付近を示している。

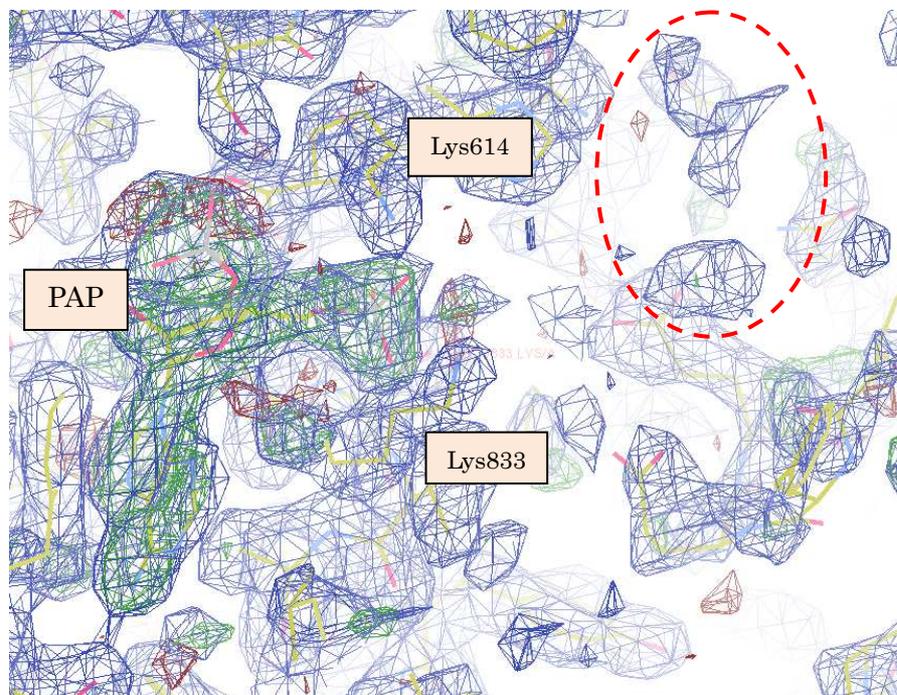


Fig.4-1 WinCootによる電子密度の図

Fig.4-1 を見ると、PAP の電子密度ははっきりと観察される。NST の触媒反応に関わっていると考えられる残基である Lys614 と Lys833 を示しているが、その周辺には基質糖鎖とみられる電子密度は観察されなかった。これはソーキング時間が十分でなかったために、基質糖鎖が酵素にあまり結合

しなかったためだと考えられる。右上の赤破線で囲った部分に NST のものではない電子密度がみられるが、これが基質糖鎖の電子密度であるかどうかは確定できなかった。

## 5. 今後の課題

今回の実験により、NST の回折データが得られ、NST と PAP の電子密度が観察された。しかし、ソーキングした基質糖鎖の明瞭な電子密度は観察されなかった。ソーキング時間が長くなると結晶にダメージを与えてしまうことが示唆されたため、長時間ソーキングすることはできない。そのため、基質溶液の濃度をより高くした条件で実験を行うことなど、基質糖鎖を酵素タンパク質に結合させるための条件を検討していく必要がある。

## 6. 参考文献

Kakuta Y, Sueyoshi T, Negishi M, Pedersen LC, *J Biol Chem.* 1999 274(16):10673-10676.

## 7. 論文発表・特許 (注: 本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

なし

## 8. キーワード (注: 試料及び実験方法を特定する用語を 2~3)

- ・ヘパラン硫酸 N-スルホトランスフェラーゼ
- ・PAP
- ・ソーキング

## 9. 研究成果公開について

②研究成果公報の原稿提出

(提出時期: 2014 年 10 月)