

(様式第5号)

蛋白質の金属イオン選択性操作の技術開発のための  
X線結晶解析による研究  
X-ray crystallographic analysis for the control  
of the metal ion selectivity of protein

新井栄揮、安達基泰、玉田太郎、黒木良太 著者・共著者 氏名  
Shigeki Arai, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Ryota Kuroki

日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門  
Quantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency

- ※1 先端創生利用（長期タイプ、長期トライアルユース、長期産学連携ユース）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の開示が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後二年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です。（トライアルユース、及び産学連携ユースを除く）

## 1. 概要

好塩性細菌由来蛋白質（以下、好塩性蛋白質）は、酸性アミノ酸含量が高いために様々な金属イオンと相互作用すると考えられる。好塩性蛋白質分子上にCs<sup>+</sup>との親和性・選択性を有する金属イオン結合部位を見出すことができれば、原子力発電所事故により環境中に漏出した放射性Cs・Srの捕集材料として蛋白質を利用できる可能性がある。本課題では、様々な濃度のCs<sup>+</sup>を含む結晶化溶液に浸漬した中度好塩菌 *Chromohalobacter* sp.560 由来β-lactamase (HaBLA)の結晶を用いてX線結晶回折測定を行い、蛋白質立体構造を決定するとともに、Csの異常分散を利用することで結晶構造中のCs<sup>+</sup>の同定を試みた。構造解析の結果、Cs<sup>+</sup>と競合するNa<sup>+</sup>が混在した溶液(25mM Cs<sup>+</sup> / 75mM Na<sup>+</sup>)からCs<sup>+</sup>を選択的に結合できる部位をHaBLA分子上に発見した。

Halophilic proteins are known to have many acidic residues on their surface that may provide suitable binding sites for specific metal ions such as Cs<sup>+</sup> which are released upon accidents of nuclear plants. To identify the location of Cs<sup>+</sup>, the tertiary structures of β-lactamase (HaBLA) from a moderate halophile *Chromohalobacter* sp.560 were determined using X-ray crystallography. Based on the anomalous diffraction, we succeeded in discovering Cs<sup>+</sup> binding sites which can binds Cs<sup>+</sup> selectively from a solution containing 25mM Cs<sup>+</sup> / 75mM Na<sup>+</sup>.

## 2. 背景と目的

蛋白質は緻密な原子・分子認識機構を有し、様々な金属イオンと相互作用する。また、蛋白質の金属イオン親和性・選択性は変異導入によって操作できる可能性がある [1,2]。蛋白質分子上に希少金属イオンや有害金属イオンの結合部位を見出して親和性・選択性を改善すれば、蛋白質を金属捕集材料として利用できる可能性がある。好塩性蛋白質は、酸性アミノ酸含量が高いために様々な金属イオンと相互作用すると考えられ、本研究に適した材料である[3]。そこで本課題では、好塩性蛋白質 HaBLA を題材にX線結晶構造を解明し、金属イオン結合部位の検出を行った。特に、原子力発電所事故により環境中に漏出した放射性Csの捕集材料の創製を目指し、Cs<sup>+</sup>親和性・選択性を有する金属イオン結合部位の抽出を試みた。

### 3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

本研究で使用したHaBLAは、0.2 M 酢酸カルシウム、18% PEG 8000を沈殿剤として結晶化させた後、Cs<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>濃度を様々に調整した結晶化溶液に結晶を浸漬してX線結晶回折測定を行った(表1)。まずXAFS測定を行い、Csの異常分散測定に適した波長( $\lambda=2.166\text{\AA}$ )を決定した。続いて、各結晶とも同波長のX線を用いて1フレーム当たり露光時間30~60秒、振動角 $\phi=1^\circ$ 、計180フレームの振動写真法による回折データ収集を行った。また、放射線損傷が軽微な結晶は、 $\lambda=1.0\text{\AA}$ のX線での回折データ収集も行った。

表1 HaBLA結晶化溶液中のCs<sup>+</sup> /Na<sup>+</sup>濃度条件と測定結果

Metal ions	0.1M Cs <sup>+</sup>	50mM Cs <sup>+</sup> 50mM Na <sup>+</sup>	25mM Cs <sup>+</sup> 75mM Na <sup>+</sup>	10mM Cs <sup>+</sup> 90mM Na <sup>+</sup>		
Wavelength (Å)	2.166	2.166	2.166	1.0	2.166	1.0
Space group	P3 <sub>1</sub>	P3 <sub>1</sub>	P3 <sub>1</sub>	P3 <sub>1</sub>	P3 <sub>1</sub>	P3 <sub>1</sub>
Unit cell	$a=b=116.4\text{\AA}$	$a=b=115.3\text{\AA}$	$a=b=115.0\text{\AA}$	$a=b=115.1\text{\AA}$	$a=b=115.1\text{\AA}$	$a=b=115.3\text{\AA}$
	$c=68.6\text{\AA}$	$c=67.4\text{\AA}$	$c=67.2\text{\AA}$	$c=67.3\text{\AA}$	$c=67.4\text{\AA}$	$c=67.5\text{\AA}$
	$\alpha=\beta=90^\circ$	$\alpha=\beta=90^\circ$	$\alpha=\beta=90^\circ$	$\alpha=\beta=90^\circ$	$\alpha=\beta=90^\circ$	$\alpha=\beta=90^\circ$
	$\gamma=120^\circ$	$\gamma=120^\circ$	$\gamma=120^\circ$	$\gamma=120^\circ$	$\gamma=120^\circ$	$\gamma=120^\circ$
Resolution (Å)	3.2	2.9	2.3	1.8	2.5	2.1
R <sub>merge</sub> (%)	9.0	9.8	4.4	4.1	8.4	7.9
Completeness (%)	97.8	99.2	96.8	99.2	95.5	93.7

### 4. 実験結果と考察

各回折データを解析した結果、Trpのベンゼン環によるカチオン- $\pi$ 相互作用およびAsp側鎖の酸素原子の負電荷によりCs<sup>+</sup>を結合する部位を発見した(図1)。この部位には、25mM Cs<sup>+</sup> / 75mM Na<sup>+</sup>の溶液に浸漬したHaBLA結晶でもCs<sup>+</sup>由来の電子密度が現れた。本研究により、Cs<sup>+</sup>選択性が比較的高い金属イオン結合部位が好塩性蛋白質分子上に存在することが明らかになった。

### 5. 今後の課題

現在、更に低Cs<sup>+</sup>濃度(10mM Cs<sup>+</sup> / 90mM Na<sup>+</sup>)で収集したX線回折データを解析し、同部位へのCs<sup>+</sup>結合の有無を確認中である。今後、今回発見したCs<sup>+</sup>結合部位周辺にAsp, Glu等、負電荷を有する残基を変位導入して配位子数を増やすことでCs<sup>+</sup>選択性を更に向上させ、Cs<sup>+</sup>捕集に利用できる蛋白質材料の創製を目指す。

### 6. 参考文献

- [1] Kuroki, R., et al., *PNAS*, (1989) 86, 6903
- [2] Kuroki, R., & Yutani, K., *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 34310
- [3] Arai, S., et al, *Protein Sci.* (2012) 21, 498

### 7. 論文発表・特許

発表準備中

### 8. キーワード

好塩性蛋白質、金属イオン結合

### 9. 研究成果公開について

- ① 論文(査読付)発表の報告
- ② 研究成果公報の原稿提出

(報告時期: 2015年 7月予定)

(提出時期: 2015年 7月予定)

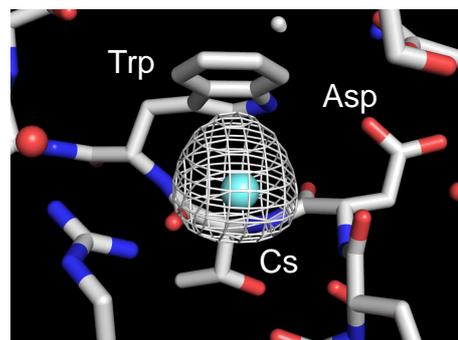


図1 HaBLA分子上に観測されたCs<sup>+</sup>。メッシュは異常分散測定で観測されたCs<sup>+</sup>の電子密度。

