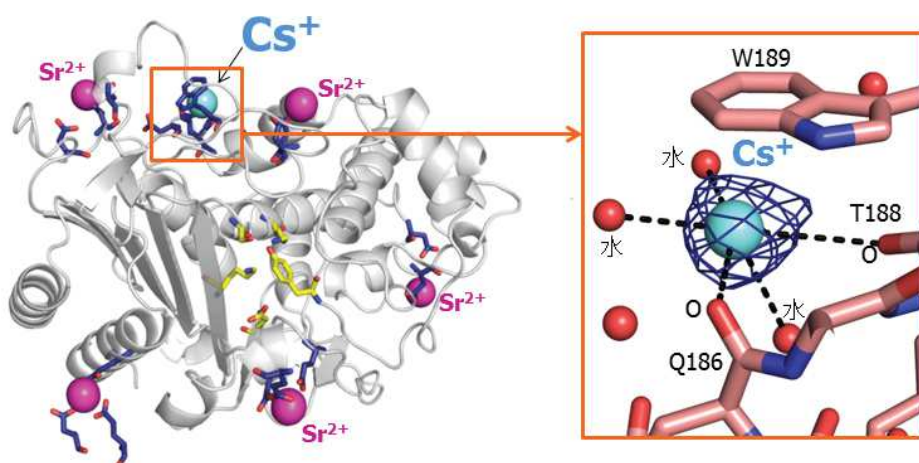


好塩性タンパク質における Cs⁺選択性結合部位の発見

新井栄揮

日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究センター

タンパク質は緻密な原子・分子認識機構を有し、金属イオンのわずかなイオン半径 (Na⁺ ~ 1.14 Å, K⁺ ~ 1.52 Å, Mg²⁺ ~ 0.86 Å, Ca²⁺ ~ 1.14 Å など) の違いも識別できる。また、好塩菌が産生する特殊なタンパク質・好塩性タンパク質は、多くの酸性アミノ酸を含有するため、分子表面に多くの負電荷を有し、数多くの金属イオンと相互作用する可能性がある。そこで我々は、好塩性タンパク質分子上に希少金属・有害金属イオンの結合部位を見出して、金属捕集タンパク質材料の創製に利用する研究を進めてきた。今回我々は、X線結晶解析により、中度好塩菌 *Chromohalobacter* sp. 560 由来・好塩性 β -Lactamase (HaBLA) の立体構造を解明するとともに、X線異常分散測定により、HaBLA 結晶構造中の Cs⁺、Sr²⁺結合部位の抽出を試みた。Cs⁺の同定には Cs 吸収端 ($\lambda = 2.175$ Å) 近傍の X 線を利用できる SAGA-LS の BL7、Sr²⁺の同定には Sr 吸収端 ($\lambda = 0.770$ Å) 近傍の X 線を利用できる SPring-8 の BL38B1 および PF の NW12A を使用した。本研究の結果、HaBLA の結晶構造中に、Cs⁺に由来する 17.5 σ レベル以上、Sr²⁺に由来する 7.0 σ レベル以上の異常分散差フーリエ電子密度を見出し、HaBLA 分子上に少なくとも 1 ヶ所の Cs⁺結合部位、3 ヶ所の Sr²⁺結合部位を発見した。特に、今回発見した Cs⁺結合部位は、Trp 側鎖のベンゼン環によるカチオン- π 相互作用、および、主鎖の 2 つの酸素原子によって Cs⁺を結合しており (下図)、Na⁺が Cs⁺の 9 倍量存在する条件下 (Na⁺/Cs⁺ = 90mM / 10mM) でも Cs⁺を選択的に結合できることが明らかになった。本研究で得た Cs⁺、Sr²⁺結合部位の立体構造情報は、原発事故によって放出された放射性 Cs⁺、Sr²⁺の捕集材料の設計に利用できる可能性がある。



【HaBLAの金属イオンの吸着】

【セシウムイオン吸着部位】

青メッシュはX線の異常分散効果を利用して観測したセシウムイオンの電子密度。
(SAGA-LSのBL7で測定)

2015年8月28日
九州シンクロtron光研究センター
合同シンポジウム

**好塩性タンパク質における
Cs⁺選択性結合部位の発見**

国立研究開発法人 日本原子力研究開発機構
量子ビーム応用研究センター

新井栄揮

【目的】有害金属・希少金属捕集バイオ材料の創製

なぜタンパク質を金属捕集に利用するのか

- タンパク質は、**金属イオンと相互作用しやすい性質**がある。
- タンパク質は緻密な原子・分子認識機構を有し、**様々な金属イオンを識別して結合**できる。

【各金属イオンに見られる特徴的な違い】
アルカリ金属: K⁺ ~1.52 Å, Cs⁺ ~1.81 Å
アルカリ土類金属: Mg²⁺ ~0.86 Å, Ca²⁺ ~1.14 Å, Sr²⁺ ~1.32 Å
タンパク質はこのわずかな違いを識別できる。

- タンパク質は自然環境で容易に分解され**環境に残らない**。
- タンパク質は**繰返し利用**できる。
- 他の金属捕集材料では困難な**新たな利用方法の開発**へ。

ファイトリメディエーションの高度化の案

金属捕集タンパク質 → 金属回収の容易化

金属イオン

金属捕集タンパク質 → 有用部位への金属蓄積を抑制

金属イオン

花卉・種子・根など特定の部位に金属イオンを集積
→回収の容易化、廃棄物量の低減
→有用部位への有害金属移行の抑制

【震災以降】福島環境浄化技術開発へ

タンパク質によるCs⁺捕集の案

本研究で創製を目指すCs⁺捕集タンパク質

土壌

被災地のCs⁺汚染植物
Cs⁺吸着組織換え植物

耐熱性セルラーゼ

セルロース分解
(植物体を外側・内側から分解)

Cs回収プロセス → Csのみ回収

Cs分離

セルロース分解物(再資源化)

水系

透析チューブ or カラム

HCl

溶離

蒸発乾燥

CsCl結晶

セメント固化

焼却等

タンパク質は繰返し利用可能

タンパク質が変化した場合は廃棄

極限環境微生物「好塩性細菌」由来の「好塩性タンパク質」

塩田

発酵・塩蔵食品

死海

NaClやMgCl₂等が0.5M～飽和塩濃度環境下には好塩性細菌が生息する。
好塩性細菌は「好塩性タンパク質」を産生する。

アミノ酸側鎖(20種類)

アルギニン(Arg) リシン(Lys) ヒスチジン(His) チロシン(Tyr) フェニルアラニン(Phe)

酸性アミノ酸

アスパラギン酸(Asp) グルタミン酸(Glu)

システイン(Cys) メチオニン(Met) トリプトファン(Trp)

アスパラギン(Asn) グルタミン(Gln) アラニン(Ala) ロイシン(Leu) イソロイシン(Ile)

セリン(Ser) アスパラギン(Asn) グリシン(Gly) バリン(Val) プロリン(Pro)

通常細菌由来及び好塩性細菌由来タンパク質におけるアミノ酸組成の比較			
局在場所	タンパク質	酸性/塩基性アミノ酸残基数の比 (Glu+Asp) / (Lys+Arg)	
		通常細菌由来	好塩性細菌由来
細胞質	ヌクレオシドニリン酸キナーゼ	AFNDK	HsNDK (高度好塩菌由来)
		1.32	2.64
ペリプラズム	β-ラクタマーゼ	SmBLA	HaBLA (中度好塩菌由来)
		0.80	2.11
	アルカリフォスファターゼ	EcAP	HaAP (中度好塩菌由来)
外膜	ポリン	OmpF Porin	Halophilic Porin (中度好塩菌由来)
		1.34	3.00
	TolC	TolC	HrdC (中度好塩菌由来)
		1.13	1.89

徳永正雄 他、生化学 (2005), 77, 4, 320-331より抜粋

好塩性タンパク質の特徴に着目

- 高い酸性アミノ酸含量
- 表面を占める多くの負電荷 = 様々な負電荷の配置
- 様々な金属イオン結合部位を有する可能性

好塩性タンパク質の結晶構造を解明して、希少金属・有害金属イオンの選択的結合部位を見つけ出せば、金属捕集タンパク質開発に利用できる。

金属捕集タンパク質(Cs+捕集)創製への道筋

好塩性タンパク質

- セシウムイオン選択的結合部位の探索
タンパク質とセシウムイオンの相互作用に関する構造的な基礎的知見の取得が必要
- Cs+選択的結合部位の構造情報
- セシウムイオン親和性の向上
- セシウムイオン結合部位の人工構築
- 類似した部位を有するタンパク質の探索

金属イオン選択性操作技術

Cs+捕集タンパク質 **タンパク質によるCs+捕集へ**

好塩性タンパク質の結晶性

様々な無機イオンの結合部位

タンパク質表面を占める多くの負電荷

多価金属イオンを介したタンパク質の会合

結晶化が困難

タンパク質立体構造のデータベースProtein Data Bank (PDB)の構造解析例
約10万件のうち、好塩性タンパク質[(Glu+Asp) / (Lys+Arg) > 1.5]は12種類・51件のみ

二価金属イオンを介した好塩性タンパク質の会合

Chromohalobacter sp.560由来
HaBLAの結晶パッキング

● Ca²⁺

Halomonas sp.593由来
HaAPの結晶パッキング

● Mg²⁺

- タンパク質分子界面に二価の金属イオンが配位し、結晶内のタンパク質分子の会合に寄与していることが観測された。
- 多価の金属イオンをタンパク質分子間の架橋剤に利用することで、好塩性タンパク質の結晶作製が改善された。

好塩性タンパク質の結晶化、および、X線結晶解析に成功

Halomonas sp.593由来 HaNDK	Chromohalobacter sp.560由来 HaBLA	Halomonas sp.593由来 HaAP
2 mM Mg ²⁺ 及び0.2 M Ca ²⁺ 存在下 (野生型2量体)	0.2 M Mg ²⁺ もしくは0.2 M Ca ²⁺ 存在下 (変異型4量体)	2 mM Zn ²⁺ 及び0.2 M Mg ²⁺ 存在下 (野生型2量体)
赤: 負電荷 青: 正電荷		
S. Arai et al., Protein Sci., 21, 498-510 (2012)	S. Arai et al., Acta Crystallogr. D, 71, 541-554 (2015)	S. Arai et al., Acta Crystallogr. D, 70, 811-820 (2014)

2011～2014年の間に、3種類の好塩性タンパク質の結晶構造を解明

- 変異体や結晶化条件の異なる構造を含めると、本研究によるPDB登録は計12件
- PDBに公開されている好塩性タンパク質(全51件)の立体構造のうち、約1/4を原子力機構が解明

謝辞

- 日本原子力研究開発機構
副ディビジョン長 黒木 良太
分子構造ダイナミクス研究グループリーダー 玉田 太郎
分子機能解析基盤技術研究グループ
サブリーダー 安達 基泰
研究員 米澤 悌
柴崎 千枝
清水 瑠美
分子シミュレーション研究グループリーダー 河野 秀俊
研究員 桜庭 俊
- 鹿児島大学農学部 徳永 正雄 教授
徳永 廣子 博士
石橋 松二郎 准教授
- フロリダ州立大学 Prof. Michael Blaber
- SAGA-LS、Photon Factory、SPring-8のスタッフの皆様

19