

が重要な働きをしているのかもしれない。

以上の結果をまとめると、プラスミド上にコードされたリコンビナーゼによってゲノムの再編を引き起こし、上皮細胞への付着能が増すなど *E. corrodens* が高病原化する可能性が示唆された。

最後に本研究の遂行にあたりご援助を頂きました(財)農

芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) H. Azakami et al. *Gene*, **351**: 143-148, 2005.
- 2) H. Azakami et al. *Microbiology*, **152**: 815-821, 2006.
- 3) M. Villar et al. *J Bacteriol*, **183**: 55-62, 2001.
- 4) H. Yumoto et al. *Infect Immun*, **67**: 384-394, 1999.

エキソサイトーシスにおける分子スイッチ機構の解明と新規 ATP 結合モチーフの同定

青山学院大学理工学部化学・生命科学科 有井康博
(現 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

【目的】 膵臓細胞の消化酵素は、チモーゲン顆粒によって運搬され、エキソサイトーシスにより細胞外に放出される。エキソサイトーシスには、チモーゲン顆粒膜と細胞膜の融合が不可欠であるが、その分子機構は明らかになっていない。本研究では、チモーゲン顆粒膜の細胞質側に結合するタンパク質である ZAP36 に注目し、エキソサイトーシスにおける分子の役割を明らかにする。

ZAP36 はチモーゲン顆粒膜に結合する分子量が約 36 kDa のタンパク質として、ラット膵臓から単離された¹⁾。そのアミノ酸配列はアネキシン IV (Anx4) と高い相同性を持ち、一次配列上は同一のタンパク質と考えられる。また、Anx4 はカルシウム濃度依存的に膜と結合し、ナトリウム濃度依存的に解離することが知られている。さらに、所属する研究室では、ZAP36 が ATP と結合することを酵素反応論的に明らかにしている。しかしながら、既存の ATP 結合モチーフを分子内に持ち合わせていない。そこで、ATP 結合型 ZAP36 の X 線結晶構造を決定し、新規モチーフの同定とエキソサイトーシスにおける役割を構造生物学的に明らかにすることを目指した。

【方法】 グルタチオン-S-トランスフェラーゼの C 末端側に ZAP36 を連結させた融合タンパク質 (GST-ZAP36) を大腸菌体内で発現させた。GST アフィニティークロマトグラフィー後に、GST を Factor Xa で除去し、陰イオン交換カラムで ZAP36 を精製した。精製タンパク質を約 20 mg/ml まで濃縮し、タンパク質母液とした。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。得られた結晶について高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory BL6 を用いて、回折データを得た。回折データをもとに、分子置換法を用いて電子密度マップとモデル分子を算出した。この電子密度マップと分子モデルを用いて精密化を繰り返

し、native 結晶構造を決定した。また、同じ結晶に γ -S-ATP をソーキングし、回折データの測定と結晶構造の決定を試みた。

【結果】 現在までのところ、ATP 類似体との複合体結晶構造を決定できていない。しかしながら、その解析に必要な native 結晶構造 (図 1) を 1.58Å の解像度で明らかにし²⁾、ZAP36 の膜結合能に関する興味深い洞察を得ることができた。この構造は Protein Data Bank に 2zhi および 2zhj として登録した。

Anx4 は分子内に 4 つのカルシウム結合部位を持ち合わせている (図 1)。差電子密度マップの結果 (Data not shown) から、今回、決定した構造には、ドメイン I のカルシウム結合部位にナトリウムイオンが結合している可能性が示された。また、ナトリウムの結合を確かなものとする為に、原子吸光分析を行った結果、一分子当たり約 2.3 個のナトリウムが存在することが明らかになった³⁾。結晶化、精製過程で結合する可能性のある金属イオン、カルシウムおよびマグネシウムは検出されなかった。また、価数スクリーニング法で結合距離 (図 2) から、結合している金属イオンの推定を行った結果、結合金属イオンがナトリウムイオンであることが示された。以上の分析結果から、Anx4 のカルシウム結合部位にはナトリウムイオンも結合することが明らかになった。ナトリウム結合型のアネキシンプ

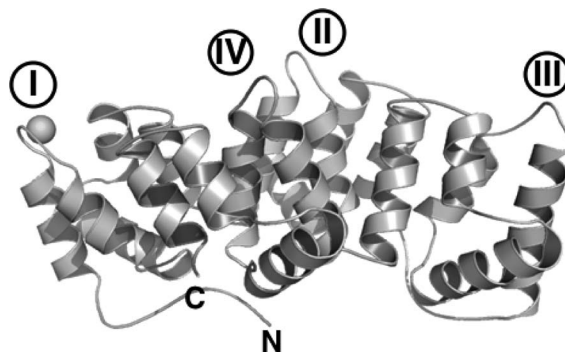


図 1 ラット ZAP36 の native 結晶構造。球はナトリウムイオンを示す。ローマ数字は 4 つのドメインにあるカルシウム結合部位を示している。N, C は N 末端, C 末端を意味する。

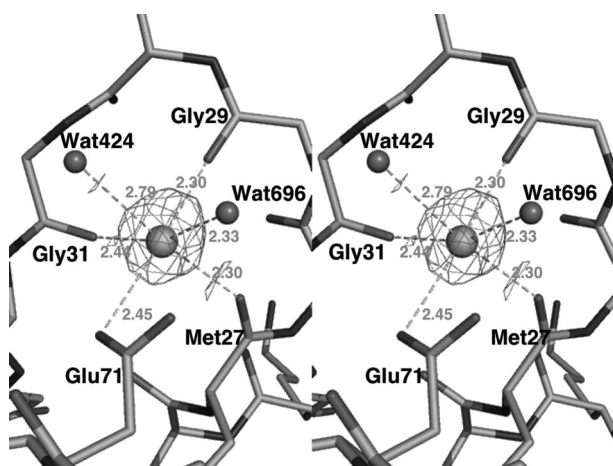


図2 ナトリウム結合様式.

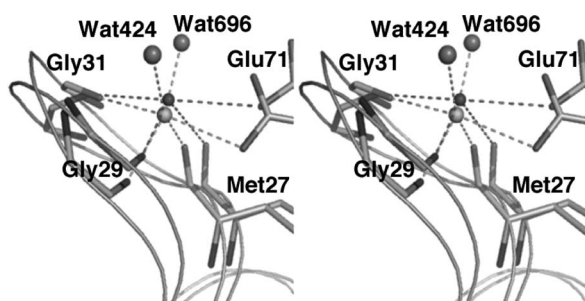


図3 カルシウム結合型とナトリウム結合型のドメインIのカルシウム結合部位の構造比較.

ファミリーの結晶構造は世界で初めての報告となる.

本結晶構造とカルシウム結合型の結晶構造を比較した(図3)ところ, ナトリウム濃度依存的な膜からの解離が起こる理由が推察できた. ナトリウムイオンがカルシウムイオンと比べて, 分子内に埋もれていることによる立体障害およびナトリウムイオンの六配位における結合力の弱さ(理論計算上, エントロピーにしてカルシウムイオンの約1/3)が引き起こすイオン結合の切断がナトリウム濃度依存的な膜からの解離に関連すると考えた. すなわち, 膜への結合はカルシウムイオンを介して行われているが, 結合カルシウムイオンとナトリウムイオンが置換することで, 膜からの解離が促されると推察された.

また, ナトリウム非存在下のカルシウム依存的膜結合能が二段階の挙動を示す一方で, 生理的ナトリウム濃度におけるカルシウム依存的膜結合は一段階で行われることが分かった(図4)³⁾. また, 膜からの解離においても二段階の解離が観られ, ナトリウムは完全な解離を引き起こすが, カリウムやマグネシウムなどの塩においては一段階目の解離のみが観察され, およそ30%の分子が結合したままであった(Data not shown)³⁾. このことは, 膜結合に必要な結合様式として少なくとも二種類(強い結合と弱い結合)

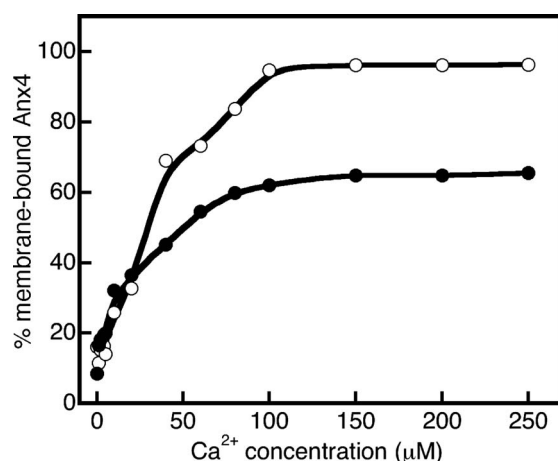


図4 カルシウム依存的膜結合能. ナトリウム存在下(黒丸)とナトリウム非存在下(白丸)における膜結合能を示す.

が存在すること, 強い結合の切断にはナトリウムが不可欠であることを意味している. また, 上述の構造解析の結果を支持するものである.

一方, 本来の目的であった, ATP 結合型 ZAP36 の構造決定については, γ -S-ATP をソーキングした結晶の回折データを取得し, コンピューティングにより構造決定を行った結果, γ -S-ATP の結合は見られなかった. 最近, ZAP36 が溶液中, 人工リボソーム上で多量体を形成していることが分かってきた. ATP の結合には, 膜との相互作用を含めた高次構造形成が必要なのかもと考えている.

【今後の展開】 今回の結果は ATP 類似体結合型の結晶構造を解く前段階である. 今後は ATP を結合する条件を見出しながら, 結晶構造を明らかにしていきたい.

最後に本研究を遂行するにあたり, 研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深謝申し上げます.

参考文献

- 1) S.-I. Fukuoka, H. Kern, R. Kazuki-Sugino, and Y. Ikeda: *Biochim. Biophys. Acta*, **1575**, 148–152 (2002).
- 2) 佛下康平, 井上慧, 有井康博, 福岡伸一, ZAP36 (チモーゲン顆粒膜結合型タンパク質) に結合している金属イオンの決定, 第30回に本分子生物学会年会, 第80回日本生化学会大会合同大会 (2007年)
- 3) 佛下康平, 福岡伸一, 有井康博, Na⁺イオン依存的 ZAP36 の膜解離の原子機構, 第31回に本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会合同大会 (2008年)

要約

ZAP36 はチモーゲン顆粒膜に結合するタンパク質として, ラット睪臓から単離された. 本タンパク質がエキソサイトシスの開始スイッチの役割を担っていると考えられている. そのアミノ酸配列はアネキシン IV (Anx4) と高い

相同性を持ち、一次配列上は同一のタンパク質と考えられる。また、Anx4 はカルシウム濃度依存的に膜と結合し、ナトリウム濃度依存的に解離することが知られている。さらに、所属する研究室では、ZAP36 が ATP を結合することを酵素反応論的に明らかにしている。しかしながら、既存の ATP 結合モチーフを分子内に持ち合わせていない。そこで、ATP 結合型 ZAP36 の X 線結晶構造を決定し、新規モチーフの同定とエキソサイトースにおける役割を構

造生物学的に明らかにすることを目指した。その結果、ナトリウム結合型の結晶構造を決定でき、その構造からナトリウム濃度依存的解離の分子機構を提唱した。

使用内訳

タンパク質調製用試薬 (10 万円)、タンパク質調製用消耗品 (10 万円) タンパク質結晶化試薬 (20 万円)、タンパク質結晶化用消耗品 (10 万円)。

植物ビタミン C 生合成調節に関わる VTC2 の機能解析

島根大学生物資源科学部 石川孝博

植物は、D-マンノース (Man) と L-ガラクトース (Gal) の誘導体を代謝中間体とする Man/Gal 経路を主要経路として、アスコルビン酸 (AsA, ビタミン C) を生合成している。VTC2 は、Man/Gal 経路構成酵素のひとつ GDP-L-Gal フォスフォリラーゼをコードする遺伝子としてシロイヌナズナ AsA 欠乏変異体から同定され、AsA 生合成調節の鍵遺伝子であることが推測されている^{1,2)}。またシロイヌナズナには、VTC2 のパラログとして VTC5 が存在する。本研究は、VTC2/5 の機能解析を行い、植物 AsA 生合成調節機構を解明することを目的としている。

1. VTC2/5 遺伝子の光応答性の検討

我々はこれまでに、Man/Gal 経路を構成する 8 個の構成酵素遺伝子の中で VTC2 が光に対して最も顕著に発現応答することを報告している¹⁾。そこで、VTC2 の光応答

性を詳細に解析するため、VTC2 および VTC5 のプロモーターの光応答性を検討した。各遺伝子の転写開始点から上流約 1.5 kbp をプロモーター領域としてシロイヌナズナゲノム DNA より単離し、ルシフェラーゼ遺伝子を含む改変型 pBI ベクターに導入した (図 1A)。定法に従ってシロイヌナズナに形質転換し、多数の T1 植物体を得た。得られた T1 植物体を用いてルミノイメージアナライザーによりルシフェラーゼ活性を画像化し、プロモーターの光応答性を評価した。その結果、VTC2 および VTC5 ともに光照射 2 時間以内に発現応答することが示された (図 1B)。VTC5 では特に若い葉において顕著な発現誘導が観察された。植物の AsA は、光により生合成が誘導される。今回の結果により、AsA 合成量の増加に先駆けて、VTC2/5 の発現誘導は光応答の早い段階で起こることが示された。

2. VTC2/5 の細胞内局在性の検討

VTC2 および VTC5 タンパク質の細胞内局在性を検討するため、各遺伝子のタンパク質コード領域を Gateway 法により CaMV35S プロモーター下流に導入し、パーテ

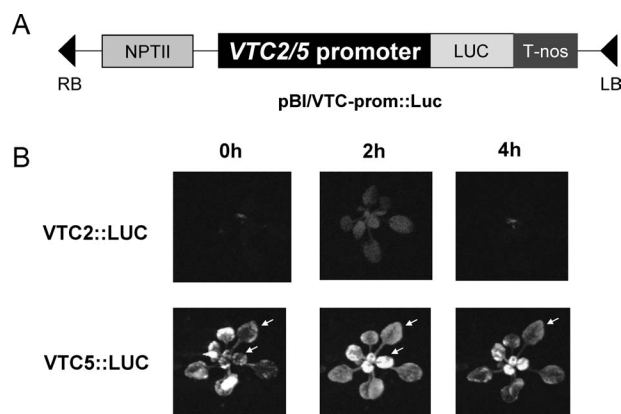


図 1 VTC2 および VTC5 プロモーターの光応答性の評価。A. 遺伝子導入用プラスミドの構成。B. ルシフェラーゼを指標にした VTC2/5 プロモーターの光応答。各 T1 植物を 24 時間暗適応させた後、 $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光照射を行い経時的にルミノイメージアナライザーにより画像化した。

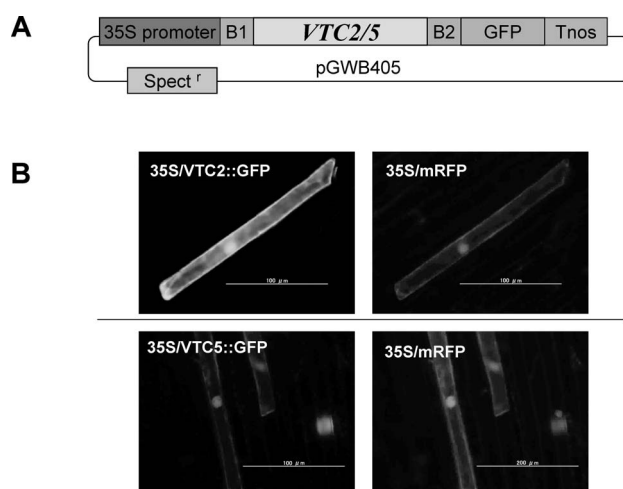


図 2 VTC2 および VTC5 の細胞内局在性の検討。A. 遺伝子導入用プラスミドの構成。B. VTC2 (上段) および VTC5 (下段) の局在性を示す GFP の蛍光画像。