

超高分解能X線結晶構造解析によるオボトランスフェリンの機能解明

三上 文三*、水谷 公彦*、田邊 愛子*、高橋 延行*、廣瀬 正明

1. はじめに

ニワトリ卵白に含まれるオボトランスフェリンは、血清トランスフェリン、ラクトフェリンと類似構造を持つ鉄輸送タンパク質であり、卵白中において抗菌作用に関与していると推定されている^{1,2)}。これらのトランスフェリンファミリーに属するタンパク質は、二つの相同なN-ローブとC-ローブから成り、それぞれのローブに Fe^{3+} と炭酸イオンが1個ずつ強固に結合する性質を有しており、血清トランスフェリンは血清中で鉄の輸送タンパク質として働くことによって体内の鉄濃度を調節している。オボトランスフェリンと鶏血清トランスフェリンは同一の一次構造を有し、これらの2つのタンパクは同じ遺伝子から発現したのち、結合する糖鎖に相違のあることが報告されている³⁾。ニワトリの胚の成長におけるオボトランスフェリンの鉄輸送機能が証明されたわけではないが、卵白オボトランスフェリンについてトランスフェリン受容体との特徴的な相互作用が明らかになっている⁴⁻⁶⁾。また、近年明らかになったニワトリ血清トランスフェリンの構造によって^{7,8)}、その主鎖の立体構造はニワトリオボトランスフェリン^{9,10)}と区別がつかないほどよく似ていることが分かっている。オボトランスフェリン分子の分子量は、約80,000で、二つの相同なN-ローブとC-ローブからなる一本鎖のタンパクである(図1)。この二つのローブは、さらに二つのよく似たドメインに分けられる(N1とN2、C1とC2)²⁾。それぞれのドメインの接触部位に1個ずつ鉄結合部位が存在している(図1)。6個の Fe^{3+} の配位する部位のうち4個がタンパク質のリガンドで占められている(2個のTyr残基、それぞれ1個のAsp、His残基)。また、残りの2個の部位は炭酸イオンによって占められている²⁾。私たちはオボトランスフェリンの全分子およびプロテアーゼによる限定加水分解後に得られる、N及びCローブの結晶構造

* 京都大学大学院農学研究科

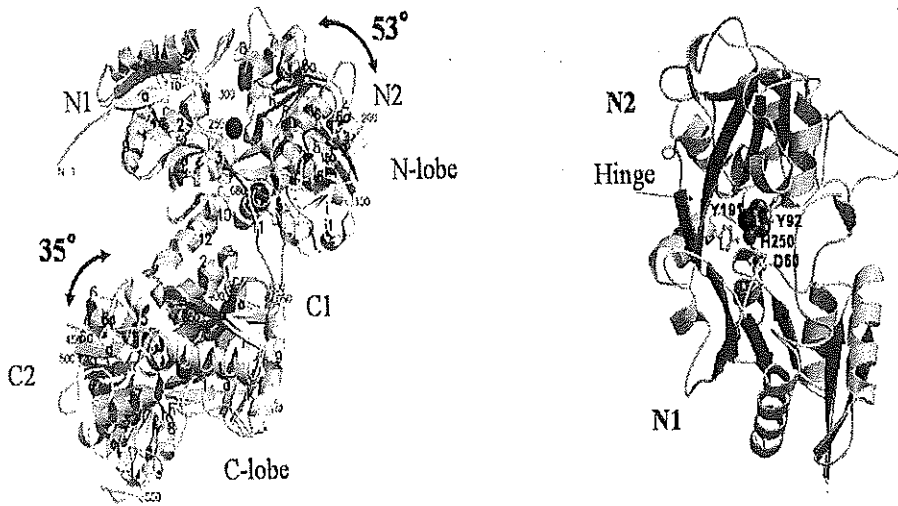


図1 オボトランスフェリン全分子とNローブの構造

左図は全分子のアポ型とホロ型を重ね合わせた構造^{9,10}を、右図はホロ型のNローブの構造^{11,12}を示した。鉄分子は黒色の球で、炭酸イオンは充填モデルで、鉄のリガンドとなるアミノ酸側鎖は ball-and-stick で示す。

を報告している¹¹⁻¹⁴)。それぞれのアポ型およびホロ型(鉄結合型)の結晶構造から鉄イオンが結合していないローブは、ドメインの開いたopen構造をとっているが、鉄結合型のトランスフェリンはclosed型の構造に変化する^{7-10,12,14-17})ことが分かっている。各々のローブには2本のポリペプチド鎖から成るヒンジ部分が存在し、これがドメインをつなぎとめている(図1)。また、ドメインの動きはrigid-body motionに分類することができる^{12,15,16})。トランスフェリンに依存した鉄輸送系では、目的の細胞において2個の鉄を結合したトランスフェリンが最初に細胞表面にある受容体と結合する¹⁸)。その後、トランスフェリン-受容体複合体はエンドサイトシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソーム内の酸性条件下で Fe^{3+} を放出する^{18,19})。Nローブでは、“dilysine trigger”(Lys209-NZとLys301-NZ間の水素結合)と呼ばれるドメイン間の相互作用の存在が、エンドソーム内部での低pH条件下でドメインが開くトリガーとなり、鉄の放出を容易にすると考えられている¹¹)。

これらの構造的知見は1.65~2.1 Å分解能で行われたX線結晶構造解析に基づくものであるが、鉄の結合部位やドメイン開閉機構の詳細を明らかにするためには、より高分解能での構造解析が必要である。そこで、今回の研究では、鉄結合型オボトランスフェリンのNローブの良質な結晶を作成し、X線による結晶構造解析を0.88 Å分解能で行った。得られた回折

データを用いて水素原子を含めて構造の精密化を行い、鉄結合部位の詳細、ドメイン間の水素結合及び側鎖の解離状態のより正確な解釈を行い、鉄の結合と解離の機構の推定を行うことを試みた。

2. 実験方法

2.1 オボトランスフェリンNローブの結晶調製

以前の報告に従って、鉄結合型オボトランスフェリンNローブを調製した²⁰⁾。結晶化は24穴のLimbrotプレートを用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって行った。母液(ボトム液)の組成は100 mM Na-HEPES, 200 mM Na-acetate, 21-23% (W/V) Polyethylene glycol 3350を含みpHは7.5である。この母液1 mlをボトム液とし、ドロップは母液5mlと20mg/mlのタンパク溶液5mlをシリコン処理したカバーガラス上で混ぜ、カバーガラスをグリースを用いてプレート穴上部に密着した。プレートは20°Cで保存し、約1ヶ月後に約1.0 x 0.4 x 0.3 mmの直方体の赤い結晶を得た。

2.2 結晶のデータ収集及び処理

得られた結晶をナイロン製のcryoloop(Hampton Research)で掬い取り、100 Kの窒素ガス気流中で凍結し、実験室の装置により回折点を調べ、分解能の高い結晶を選択した。結晶は液体窒素中で保存し、SPring-8のBL38B1において、リガク製のR-Axis Vを用いて回折データの測定を行った。得られたデータイメージの処理にはHKL2000を用いた²¹⁾。測定に用いた結晶の結晶学的性質および回折データ収集のまとめを表1に示す。

2.3 構造の精密化と評価

構造の精密化は以前に報告した1.65 Å分解能の鉄結成型オボトランスフェリンN半分子の構造¹²⁾を基にSHELXL²²⁾による精密化計算とTURBO-FRODOによるモデル修正を繰り返した。1.2 Å分解能で異方性温度因子を導入し、0.9 Å分解能で水素原子を導入した。最終的に0.88 Å分解能で精密化した結果を表1に示す。原子座標の誤差の推定にはCruickshank法²³⁾に基づいたプログラムSFCHECK²⁴⁾を使用した。ドメイン間の相互作用を決定するために、ドメイン1の範囲は4から91残基及び247から332残基まで、ドメイン2の範囲は

92から246残基までと定義した。水素結合の位置はHBPLUS²⁵⁾によって調べた。残基の露出表面積の算出にはNACCES²⁶⁾を使用した。

表 1. 回折データの収集と精密化のまとめ

A. Crystal data	
Space group	$P2_12_12_1$
Cell dimensions	
a (Å)	46.657
b (Å)	75.718
c (Å)	84.842
V_m (Å ³ /Da)	2.0
Molecules per asymmetric unit	1
Resolution (Å)	20.0 - 0.88
(highest resolution bin)	(0.93 - 0.88)
Observed reflections	2,218,990 (236,427)
Independent reflections	236,427 (33,962)
completeness (%)	99.7 (99.2)
R_{sym} (%)	4.2 (31.0)
Redundancy	9.4 (7.6)
Mean I/σ	30.6 (6.1)
Wavelength (Å)	0.7
B. Refinement statistics	
Resolution limits (Å)	20.0 - 0.88
No. of reflections used	234,654
completeness (%)	98.9
No. of protein residues	332
No. of protein atoms	2,858
No. of water molecules	678
Ions and hetero molecules	1 Fe ³⁺ , 1 HCO ₃ ⁻
R-factor / Free R value for all data	
without hydrogen	0.1132 / 0.1383
with (riding) hydrogen	0.1015 / 0.1218
Average B-factor	
protein atoms (Å ²)	9.46
solvent atoms (Å ²)	28.04
r.m.s. deviation from ideal geometry	
Bond distances (Å)	0.017
Bond angle distances (Å)	0.037
Distances from restraint planes (Å)	0.0329
Estimation of errors in atomic positions	
ESDs of fully occupied atomic positions	
Most ordered regions ($B < 5 \text{ \AA}^2$) (Å) < 0.01	
Rest of the molecule ($B < 30 \text{ \AA}^2$) (Å) < 0.05	
DPI (Å)	
(diffraction-data precision indicator)	0.019

3. 結果及び考察

3.1 最終的に得られたモデルの精度

異方性温度因子と水素原子の導入により、R-factor及びfree-Rの値はそれぞれ0.1015及び0.1218まで低下した。最も分解能の高い0.93–0.88 Åの部分でのR-factorの値は0.157であった(表1)。最終モデルは非対称単位中に1分子のオボトランスフェリンN-ローブ(332残基)と678個の水分子、1個の鉄原子と1個の炭酸イオンを含む。また、分子表面には約50残基の側鎖の構造多形が認められた。Ramachandran plotsから、約99.7%の残基が安定領域に属し、1残基(Leu299)が不安定領域に存在したが、Leu299は γ -turn中の残基で、他のトランスフェリンN-ローブの対応する残基も同様の二面角を取っている^{12,14}。原子位置の誤差の推定は、それぞれ、温度因子(B)が5 Å²以下では0.01 Å以下、5–30 Å²の範囲では0.05 Å以下であった。また、DPI(diffraction-data precision indicator; calculated by Cruickshank's method)²³から、原子位置の誤差は0.019 Åと推定された。

3.2 全体構造及び鉄結合部位の詳細な構造

0.88 Å分解能で精密化されたホロ型N-ローブの全体的な構造は基本的には1.65 Åの分解能で解析されたものと同じのものであった¹²。ポリペプチド鎖は2個の α / β ドメイン(ドメイン1とドメイン2)に折りたたまれ、これらのドメインは2個の逆平行 β -ストランドで結合している。鉄結合部位はこのドメイン接触部位の内部に存在している(図1)。

鉄イオン結合部位は4個のアミノ酸残基(Asp60, Tyr92, Tyr191 とHis250)と1個の炭酸イオンからなり、鉄イオン(3価)からのAsp60-OD1, Tyr92-OH, Tyr191-OH および His250-NE2までの距離はそれぞれ、2.13 Å、1.99 Å、2.02 Å、2.16 Åである。図2に示されているように、今回の解析で示された炭酸の電子密度マップは、炭酸イオンの2個の酸素原子が鉄原子からそれぞれ2.11 Åと2.19 Åと、ほぼ等距離にあり、炭酸イオンがFe³⁺に二座で配位していることを明らかにした。鉄のリガンドとなっている炭酸イオンは4個の水素結合によってオボトランスフェリンに固定されている。それらはO1-Ala123N, O2-Thr117OG, O2-Gly124N とO3-Arg121NE である。これらのすべての水素結合において炭酸イオンは水素原子の受容体として働いている。炭酸イオンの共有結合(C原子とO原子間)において、C-O2(Fe³⁺の反対側)の結合だけが他の結合に比べて短くなっていることから、C-O2間の結合は、二重結合で

あり、この炭酸イオンは1価の炭酸水素イオンではなく2価の炭酸イオンであると結論される。

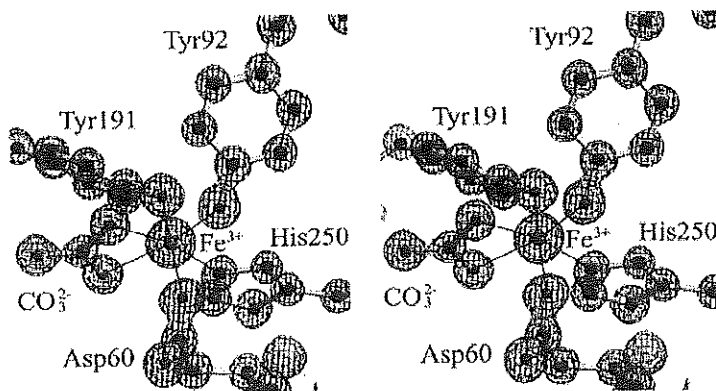


図2. 鉄結合部位の電子密度マップ($2F_o - F_c$ map contoured at 3σ)
左右ステレオで表示した。

3. 3ドメイン間の水素結合

ドメイン間の水素結合の存在は、オボトランスフェリンの全分子⁹⁾およびN-ローブ¹²⁾で報告されているが、その正確なドナーとアクセプターの同定は不可能であった。これらのドメイン間での水素結合は Fe^{3+} の結合とドメインが閉じるのを助け、オボトランスフェリンホロ型の安定性を向上させると考えられている。今回の構造解析によって同定されたドメイン間の水素結合を表2に示した。Hydrogen-omit mapから、7個の水素結合において、水素原子の受容体と供与体を同定することができた。Hydrogen-omit mapで見た典型的な水素結合を図3に示した。側鎖の構造多型を示すLys296を含む2個の水素結合では供与体と受容体の決定がなされていない。

これらのドメイン間での相互作用の中で、Lys209とLys301はLys側鎖間での水素結合を形成しており、酸性条件下での Fe^{3+} の放出で主要な役割を果たすと考えられ、dilysine triggerと呼ばれている¹¹⁾。Lys209-NZとLys301-NZ間距離は2.8 Åであり、以前に報告された距離(2.4 Å)よりも長くなっている。これらの2個のリジンNZ原子は開いたアポ型のN-ローブの構

表2 ドメイン間水素結合の同定

Donor	Acceptor	Distance (Å; between heavy atoms)
Ser122-N	Asp60-OD2	2.76
Ser122-OG	Tyr324-OH	2.67
Asn126-ND2	Tyr324-OH	3.02
Asn185-ND2	Ile12-O	2.89
Lys209-NZ	Ser303-OG	3.16
Lys204-NZ	Thr85-OG1	2.96
Lys301-NZ	Lys209-NZ	2.94
Lys296-NZ	Glu215-OE1	2.88 or 3.25
Lys296-NZ	Asn216-OD1	2.86

*donors and acceptors are not determined because of disordered side chain of Lys296

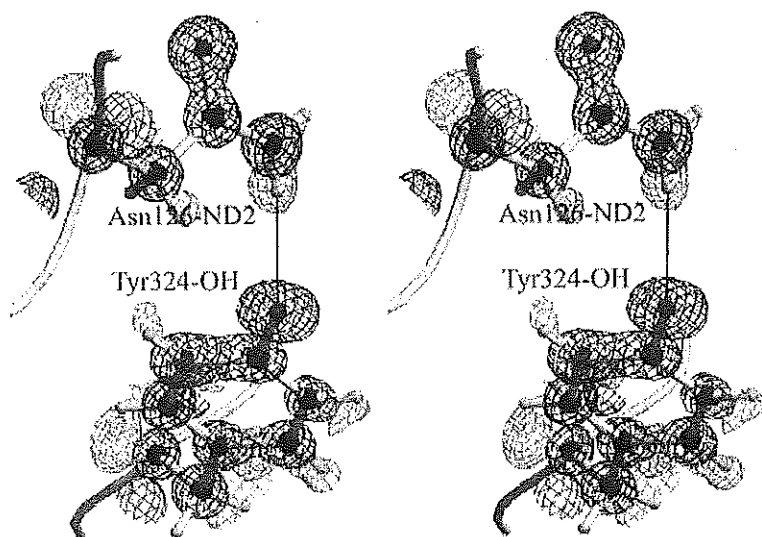


図3. ドメイン間水素結合の電子密度マップ(左右ステレオ図)

太線は $2F_o - F_c$ マップ (3 σ)、細線は Hydrogen omit マップ (2.5 σ) を示す。

造では7.6 Å離れている。Hydrogen-omit map(図4)から、Lys301が水素原子の供与体として働いていることが明らかになった。これらのLys残基の側鎖はホロ型では埋もれたドメイン接触領域にあり、その露出表面積は小さい(Lys209が 0.29 \AA^2 、Lys301が 4.33 \AA^2 、Lys残基全体

の平均値が 49.48 \AA^2 。特に、Lys209の接触可能表面積は小さく、溶媒から遮断されていることから、プロトン化されにくく、Lys301がpH7.5でプラスチャージを持った後も更にpHが低下するまで非解離状態であると推定される。また、pHの低下によりLys209がチャージを持つことによって、大きな静電的な反発力が生じ、ドメイン間の結合が不安定になり、鉄の放出に寄与すると推定される。

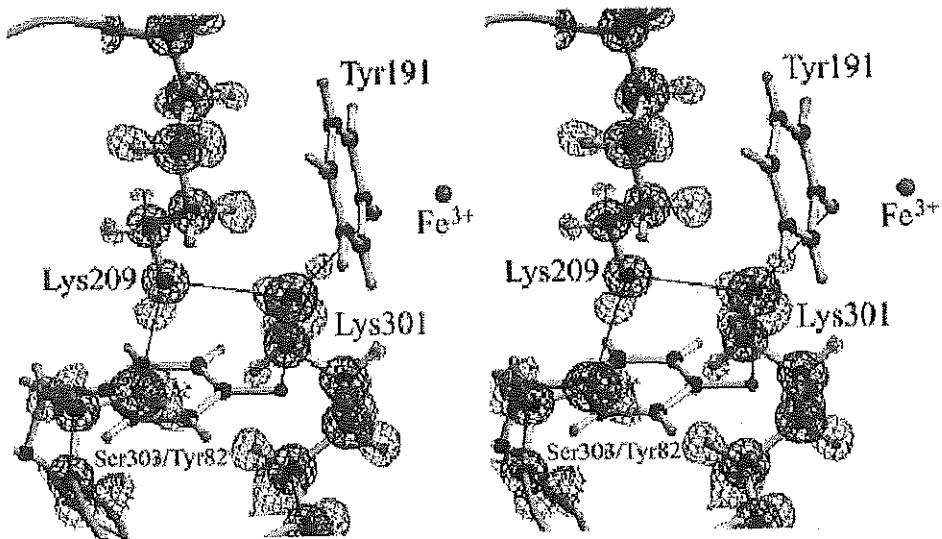


図4. Dilysine trigger (Lys209-Lys301 間)の電子密度マップ(左右ステレオ図)
太線は $2F_o - F_c$ マップ (3σ)、細線は Hydrogen omit マップ (2.5σ)を示す。

4. 結 論

- (1) 今回の 0.88 \AA 分解能で精密化した構造における原子の位置の平均誤差は、 0.019 \AA と非常に小さく、鉄原子に結合している炭酸イオンの正確な距離が判明したことによって、オボトランスフェリンに結合している炭酸は、炭酸水素イオン(HCO_3^-)ではなくて炭酸イオン(CO_3^{2-})であることが明らかになった。

(2)ドメインN1とドメインN2の開閉に重要な残基であるLys301とLys209は側鎖間に水素結合を形成し、中性条件ではLys301が解離型、Lys209が非解離型で存在していることが明らかになった。水素原子の位置から、酸性条件下ではLys209がチャージを持つことでこの水素結合が切れて、ドメインが開くことが推定された。

(3)鉄結合部位周辺は鉄イオンの3個のプラスチャージ及びArg121とLys301の側鎖の2個のプラスチャージが炭酸イオン、Tyr92、Tyr191とAsp60の5個のマイナスチャージによって中和され、安定化していることが明らかになった。

今後、より正確な水素原子の位置を明らかにするために中性子線結晶構造解析が必要である。そのために必要なNローブ半分子の巨大結晶(2 x 1 x 1 mm程度)の作成を現在行っている。

参考文献

1. Aisen, P., and Listowsky, I. (1980) Iron transport and storage proteins, *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 357-393.
2. Baker, H. M., Anderson, B. F., and Baker, E. N. (2003) Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3579-3583.
3. Thibodeau, S. N., Lee, D. C., and Palmiter, R. D. (1978) Identical precursors for serum transferrin and egg white conalbumin, *J. Biol. Chem.* **253**, 3771-3774.
4. Brown-Mason, A., and Woodworth, R. C. (1984) Physiological levels of binding and iron donation by complementary half-molecules of ovotransferrin to transferrin receptors of chick reticulocytes, *J. Biol. Chem.* **259**, 1866-1873.
5. Mason, A. B., Brown, S. A., and Church, W. R. (1987) Monoclonal antibodies to either domain of ovotransferrin block binding to transferrin receptors on chick reticulocytes, *J. Biol. Chem.* **262**, 9011-9015.

6. Mason, A. B., Woodworth, R. C., Oliver, R. W., Green, B. N., Lin, L. N., Brandts, J. F., Savage, K. J., Tam, B. M., and MacGillivray, R. T. (1996) Association of the two lobes of ovotransferrin is a prerequisite for receptor recognition. Studies with recombinant ovotransferrins, *Biochem. J.* **319**, 361-368.
7. Guha Thakurta, P., Choudhury, D., Dasgupta, R., and Dattagupta, J. K. (2003) Structure of diferric hen serum transferrin at 2.8 Å resolution, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1773-1781.
8. Thakurta, P. G., Choudhury, D., Dasgupta, R., and Dattagupta, J. K. (2004) Tertiary structural changes associated with iron binding and release in hen serum transferrin: a crystallographic and spectroscopic study, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 1124-1131.
9. Kurokawa, H., Mikami, B., and Hirose, M. (1995) Crystal structure of diferric hen ovotransferrin at 2.4 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **254**, 196-207.
10. Kurokawa, H., Dewan, J. C., Mikami, B., Sacchettini, J. C., and Hirose, M. (1999) Crystal structure of hen apo-ovotransferrin. Both lobes adopt an open conformation upon loss of iron, *J. Biol. Chem.* **274**, 28445-28452.
11. Dewan, J. C., Mikami, B., Hirose, M., and Sacchettini, J. C. (1993) Structural evidence for a pH-sensitive dilysine trigger in the hen ovotransferrin N-lobe: implications for transferrin iron release, *Biochemistry* **32**, 11963-11968.
12. Mizutani, K., Mikami, B., and Hirose, M. (2001) Domain closure mechanism in transferrins: new viewpoints about the hinge structure and motion as deduced from high resolution crystal structures of ovotransferrin N-lobe, *J. Mol. Biol.* **309**, 937-947.
13. Mizutani, K., Muralidhara, B. K., Yamashita, H., Tabata, S., Mikami, B., and Hirose, M. (2001) Anion-mediated Fe³⁺ release mechanism in ovotransferrin C-lobe: a structurally identified SO₄²⁻ binding site and its implications for the kinetic pathway, *J. Biol. Chem.* **276**, 35940-35946.
14. Mizutani, K., Yamashita, H., Mikami, B., and Hirose, M. (2000) Crystal structure at

- 1.9 Å resolution of the apoovotransferrin N-lobe bound by sulfate anions: implications for the domain opening and iron release mechanism, *Biochemistry* **39**, 3258-3265.
15. Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rumball, S. V., and Baker, E. N. (1990) Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins, *Nature* **344**, 784-787.
16. Gerstein, M., Anderson, B. F., Norris, G. E., Baker, E. N., Lesk, A. M., and Chothia, C. (1993) Domain closure in lactoferrin. Two hinges produce a see-saw motion between alternative close-packed interfaces, *J. Mol. Biol.* **234**, 357-372.
17. Mizutani, K., Yamashita, H., Kurokawa, H., Mikami, B., and Hirose, M. (1999) Alternative structural state of transferrin. The crystallographic analysis of iron-loaded but domain-opened ovotransferrin N-lobe, *J. Biol. Chem.* **274**, 10190-10194.
18. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., and Lodish, H. F. (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 2258-2262.
19. Klausner, R. D., Ashwell, G., van Renswoude, J., Harford, J. B., and Bridges, K. R. (1983) Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 2263-2266.
20. Oe, H., Doi, E., and Hirose, M. (1988) Amino-terminal and carboxyl-terminal half-molecules of ovotransferrin: preparation by a novel procedure and their interactions, *J. Biochem. (Tokyo)* **103**, 1066-1072.
21. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A.* **276**, 307-326.
22. Sheldrick, G. (1984) Shelx-84 - a Program System for Crystal-Structure Solution and Refinement, *Acta Crystallogr. A* **40**, C440-C440.
23. Cruickshank, D. W. (1999) Remarks about protein structure precision, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 583-601.
24. Vaguine, A. A., Richelle, J., and Wodak, S. J. (1999) SFCHECK: a unified set of

- procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 191-205 (1999).
25. McDonald, I. K., and Thornton, J. M. (1994) Satisfying hydrogen bonding potential in proteins, *J. Mol. Biol.* **238**, 777-793.
26. Hubbard, S. J. and Thornton, J. M. (1993), 'NACCES', Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London