



加圧による結晶性向上と高エネルギー構造の補足

永江峰幸

名古屋大学シンクロトロン光研究センター

1. 背景と研究目的

蛋白質の構造は熱力学的に揺らいでおり、基底状態や準安定状態の平衡状態にある。近年では、そういった蛋白質分子の揺らぎが機能発現に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、通常の構造解析方法では分布率が高い基底状態の構造しか捉えることが出来ない。一方、蛋白質に圧力をかけると、ルシャトリエの原理に従い、部分モル体積がより小さい準安定状態へと平衡がシフトすることが知られている。そこで我々はダイヤモンドアンビルセル (DAC) を用いて、高圧力条件下における結晶構造を解析し、分布率が小さく通常観測困難な準安定状態の観測を試みている。これまでに大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (ecDHFR) - 葉酸 (基質アナログ) - 補酵素 NADP⁺ のミカエリス複合体結晶に対して高圧力条件下の回折実験を行い、準安定構造の解析を進めている。さらに本申請課題では、ミカエリス複合体の1つ前の中間体である ecDHFR-NADP 複合体の結晶を作成し、高圧構造解析を行う。

2. 実験内容

ecDHFR-NADP 複合体結晶は最初、35 mg/mL ecDHFR, 25 mM Tris-HCl (pH7.5), 6 mM NADPH, 10 mM TCEP の組成の蛋白質溶液と、21% PEG6000, 450 mM CaCl₂, 100 mM imidazole (pH6.6), 10 mM TCEP の組成の結晶化母液を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法によって得た。得られた結晶を、抗凍結溶液に浸した後、95 K の窒素ガスによって急速凍結し、1.12 Å の X 線を用いて回折データを収集した。高圧実験に使用する水溶液 (圧力媒体) に複合体結晶を浸した後、ガラスキャピラリーに封入し、室温でも回折データを収集した。

3. 結果および考察

今回実験に使用した複合体結晶は加圧に伴い溶解度が上昇するため、結晶の回折能が低下しない範囲で圧力媒体中の沈殿剤 (PEG6000) を高濃度にしておく必要がある。回折実験の結果、43%(w/v)まで PEG6000 の濃度を上げて回折能が低下しないことが分かった。この圧力媒体に浸した結晶を用いて、回折データを収集し処理した結果、空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 34 \text{ \AA}$, $b = 45 \text{ \AA}$, $c = 97 \text{ \AA}$ であった。構造計算の結果から、補酵素が ecDHFR に結合していることが確認され、また補酵素のニコチンアミド部位が活性サイト内に位置していることが分かった (Fig. 1)。測定に用いた試料結晶は、蛋白質溶液・結晶化母液の両方に還元剤として 10 mM の TCEP を入れて作成されたものだが、複合体中の補酵素は酸化され NADP⁺ となっていた。今後高圧力条件下で回折データを収集し、準安定構造の補足を試みる。

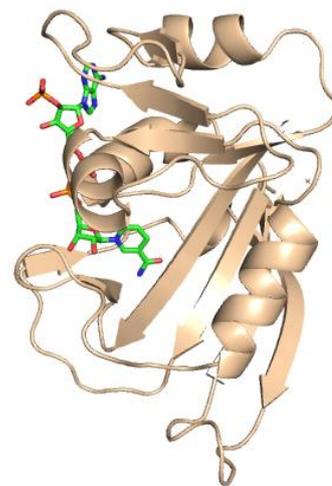


Fig.1 ecDHFR-NADPH 複合体結晶の構造