サーモライシンの高圧結晶構造解析

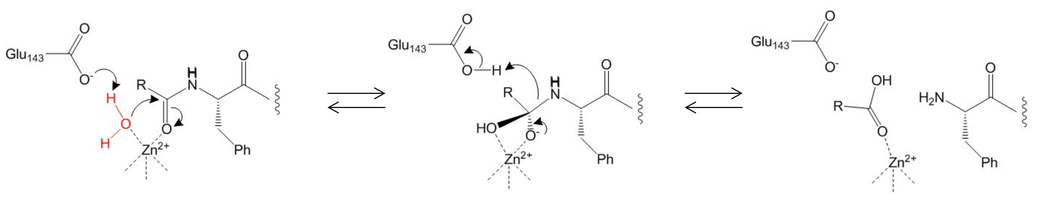
○永江峰幸[1]，森一也[2]，渡邉信久[1, 2]
[1]名大シンクロトロン光研究センター，[2]名大院工

背景

蛋白質は複数の構造間を揺らいでおり，機能を発現する際にはエネルギーの高い準安定状態を経ると考えられている．従って準安定状態の構造情報を得ることは蛋白質のメカニズムを理解する上で有用である．一方，準安定状態は占有率が低いため従来の構造解析法では観測困難という問題点がある．

蛋白質分子に圧力を与えると，部分モル体積が小さい構造へと平衡がシフトする．一般的に蛋白質分子の準安定状態は基底状態よりも小さい部分モル体積を持つため，加圧によって占有率が逆転し，準安定状態の観測が可能となる．これらのことから我々は放射光とダイヤモンドアンビルセル（DAC）を組み合わせ，高圧力下の結晶構造解析を試みている．

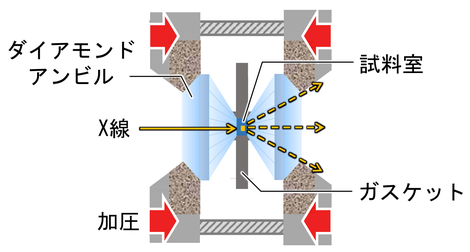
サーモライシンは熱水中の微生物から発見された金属プロテアーゼで，疎水性アミノ酸残基を含むペプチド結合を加水分解する酵素である．基質認識や反応機構を理解するために，これまでに様々な構造研究がなされている．サーモライシンによる加水分解は，Glu143によって活性化された水分子の基質ペプチドへの求核攻撃から開始すると提唱されている．これを直接的に観測した例はこれまでに無いが，圧力摂動を用いることにより，この過渡的な水和構造の観測，及び準安定構造を誘起するメカニズムの解明が期待できる．



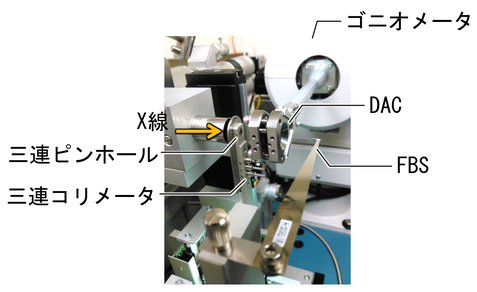
サーモライシンの反応機構

名古屋大学ビームラインBL2S1における高圧結晶構造解析

高圧力条件下の回折データ収集は，ダイヤモンドアンビルセル（DAC）を用いて行なった．DACは，2つのダイヤモンドを押し込むことで試料室に高圧力をかける装置である．あいちシンクロトロン光センターの名古屋大学ビームラインBL2S1ではフロントビームストッパー（FBS）など試料周りの環境を調整することでDACを用いた高圧実験が実施可能にしてある．通常測定用の三連コリメータはDACと干渉してしまうため，代わりに三連コリメータの上部に直径0.20，0.14，0.075 mmの三連ピンホールを追加し，ビームを適切なサイズに成形可能である．



DACの模式図



BL2S1のゴニオメータにDACを搭載した様子

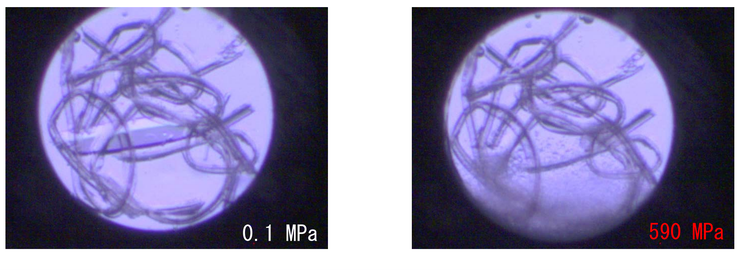
結晶化と加圧条件

結晶化条件と加圧条件	
蛋白質溶液	5.0 mM
	10 mM Tris-HCl(pH7.5)，2.3 M CsCl2，45% DMSO
結晶化溶液	3.3 mM Tris-HCl(pH7.5)，0.77 M CsCl2，15% DMSO
圧力媒体1	10 mM Tris-HCl(pH7.5)，7% DMSO，3.2mM $(CH_3COO)_2Ca$
圧力媒体2	10 mM Tris-HCl(pH7.5)，7% DMSO，3.2mM $(CH_3COO)_2Ca$，46% PEG20000

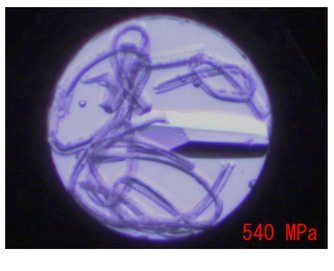
これまでの研究では，左の表に示す圧力媒体1の組成のバッファが結晶を安定に保存する際によく使われている．

しかしこの組成の水溶液中では，加圧によって結晶が溶解してしまうことが分かった．次に高濃度のPEG20000を含む圧力媒体2を用いた場合，溶解を軽減することが可能になった．

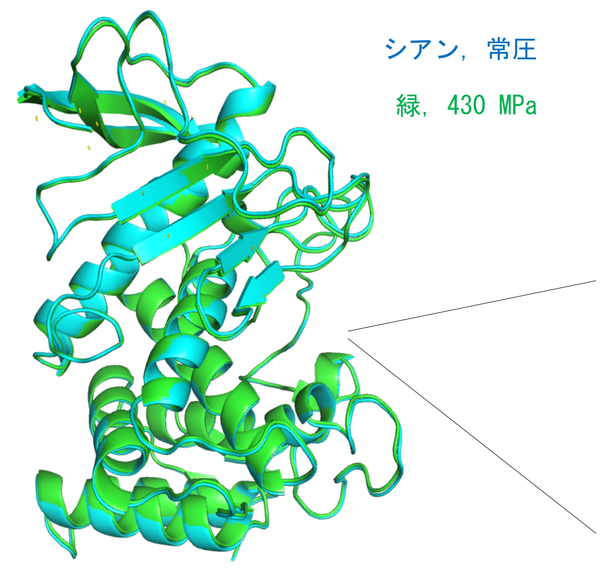
圧力媒体1



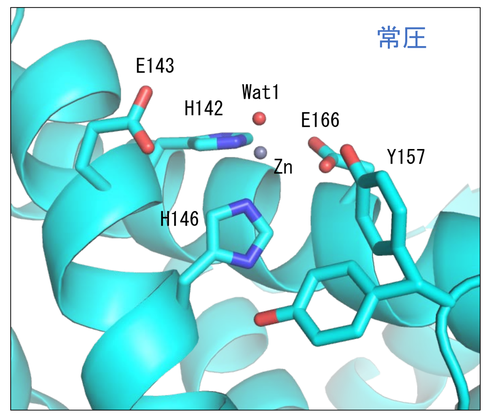
圧力媒体2

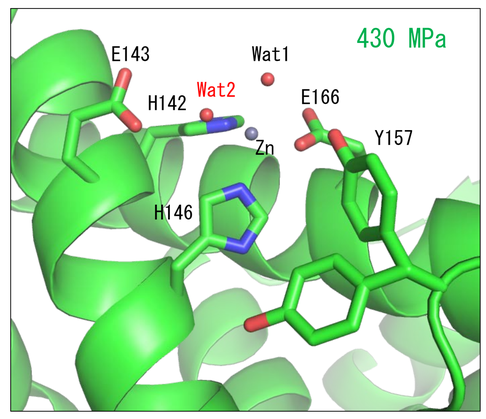


常圧構造と高圧構造の比較



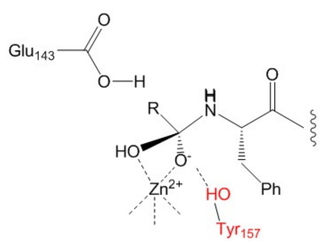
常圧構造と高圧構造の重ね合わせ





活性サイトの拡大図

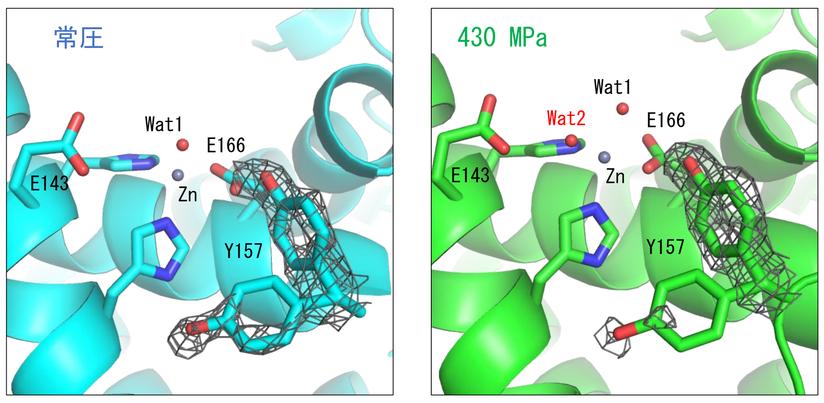
常圧下と430 MPa下でサーモライシン結晶の回折データを収集し，構造解析を行なった．高圧力条件下でも全体構造は良く保持されていた（RMSD = 0.33 Å）が，一方で活性サイトのZnイオンの配位構造に変化が観測された．常圧下ではHis142・His146側鎖の窒素原子，Glu166側鎖の2つの酸素原子，水分子の酸素原子がZnイオンに配位しているが，430 MPa下では，2個目の水分子（Wat2）が配位している様子が観測された．さらに，この第2の水分子はGlu143側鎖のカルボキシル基の酸素原子と水素結合を形成している．サーモライシンが触媒する加水分解反応は，Glu143によって活性化された水分子の基質カルボニル炭素原子への求核攻撃から始まると提唱されている．この水和サイトが，圧力摂動によって現れたと考えられる．



Tyr157による中間体安定化の模式図

Tyr157側鎖のデュアルコンフォーマーを精密化した結果，高圧力下では，基質方向のコンフォメーションの割合が上がっていた．このTy157の動きはGlu166側鎖を移動させ，Znイオンの配位構造変化に寄与している．また水分子の求核攻撃によって生じる正四面体中間体の酸素アニオンは，Tyr157との水素結合によって安定化されると提唱されている．高圧構造中で観測されたTyr157の動きは，これを支持する構造となっている．

Tyr157側鎖の向きの変化		
	コンフォメーションの占有率	
	基質方向	反対方向
0.1 MPa	0.58	0.42
430 MPa	0.76	0.24



Tyr157の電子密度　メッシュは2Fo-Fcマップ（σ=1.5）

結語

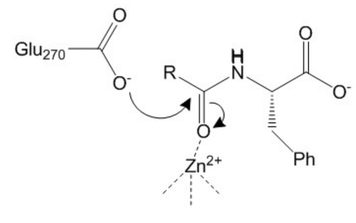
圧力を摂動として用いることで，

- 触媒反応サイクル中に存在する求核攻撃の水分子のサイト
- 中間体を安定化するTyr157の動き

を観測することに成功した．

今後　～　カルボキシペプチダーゼA

サーモライシンと類似の金属プロテアーゼであるカルボキシペプチダーゼAでは，同様にGluによって活性化された水分子が求核攻撃する機構と，Gluが直接カルボニル炭素原子を求核攻撃する機構の2つが提唱されている．未だ直接的な証拠は得られていない．今後このカルボキシペプチダーゼAについても高圧構造解析を適用し，準安定構造の解析を試みる．



カルボキシペプチダーゼAで提唱されている反応機構