

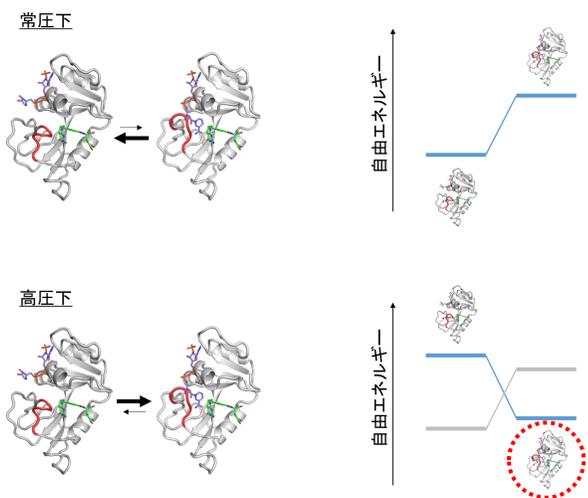
# BL2S1を利用した高压タンパク質結晶構造解析

名大シンクロtron光研究センター 永江峰幸

## 背景

タンパク質は複数の構造間を揺らいでおり、機能を発現する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タンパク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。

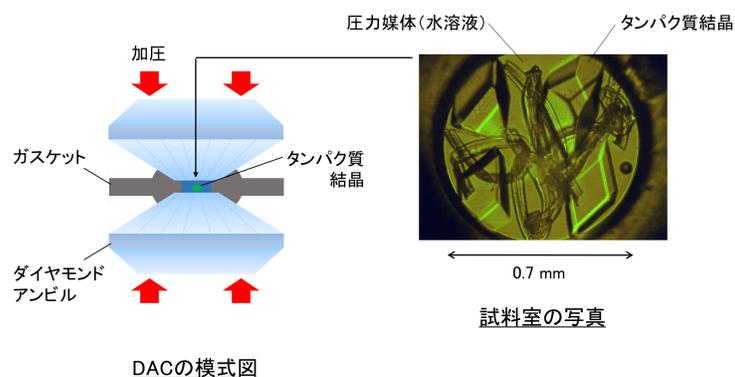
一方でタンパク質分子に圧力を与えると、部分モル体積が小さい準安定状態へと平衡がシフトする。これを利用して、高压力下の結晶構造解析を実施することで、準安定状態の構造情報を得ることが可能となる。



加圧による分布率の逆転

## 高压結晶構造解析

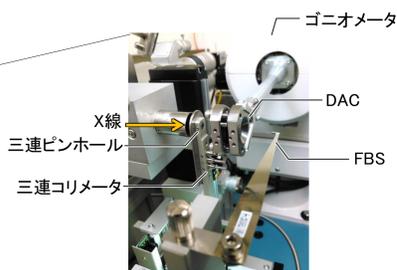
高压力下の回折データ収集は、ダイヤモンドアンビルセル(DAC)を用いて行なう。DACは、2つのダイヤモンドを押し込むことで試料室に高压力かける装置である。あいちシンクロtron光センターの名古屋大学ビームラインBL2S1ではフロントビームストップ(FBS)など試料周りの環境を調整することでDACを用いた高压実験が実施可能にしてある。通常測定用の三連コリメータはDACと干渉してしまうため、代わりに三連コリメータの上部に直径0.20, 0.14, 0.075 mmの三連ピンホールを追加し、ビームを適切なサイズに成形可能である。



DACの模式図

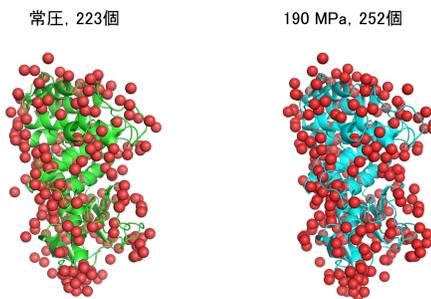


名古屋大学ビームラインBL2S1



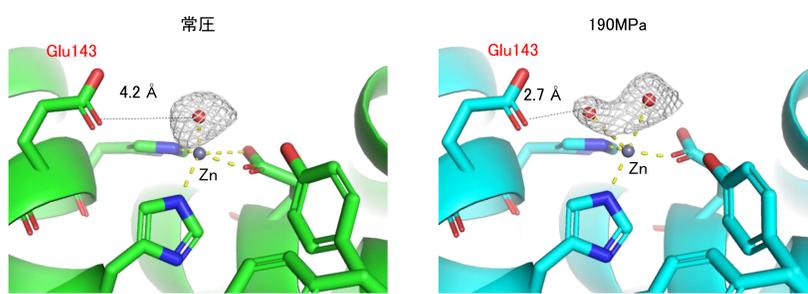
ゴニオメータにDACを搭載した様子

## 高压構造解析例 (1) サーマライシン



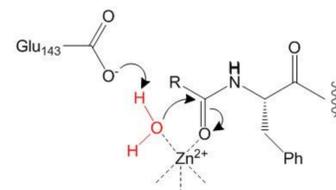
各圧力条件下におけるサーモライシンの水和水

サーモライシンはペプチド結合を加水分解する酵素である。常圧下と190 MPa下でサーモライシンの結晶構造解析を行なった。常圧下では活性サイトのZnイオンに水分子が1つ配位していたが、190 MPa下では新たに2つ目の水分子が配位していた。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。



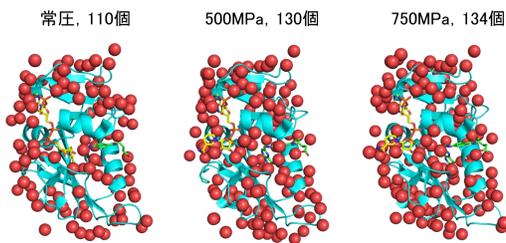
メッシュ、差電子密度マップ(4σ)

サーモライシン活性サイトの常圧構造と高压構造



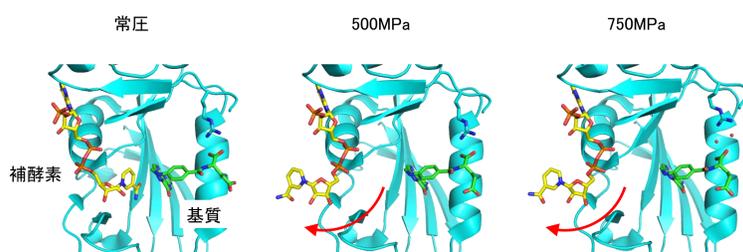
サーモライシンの触媒反応機構

## 高压構造解析例 (2) ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)

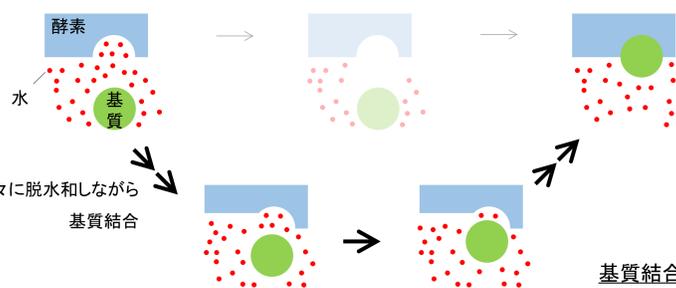
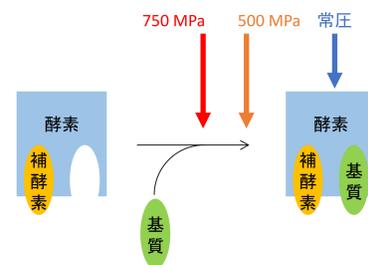


各圧力条件下におけるDHFRの水和水

DHFRは生体内のアミノ酸合成経路もしくは核酸合成経路で働く酵素である。DHFR、基質、補酵素の複合体結晶を作成し、常圧、500 MPa、750 MPa下で構造解析を行なった。500 MPaでは補酵素のコンフォメーション変化が生じ、さらに750 MPa下では基質と酵素のArgの間に水分子が入り込んでいた。圧力摂動によってDHFRの複合体形成の途中に存在する構造を捉えたと考えられる。



DHFR活性サイトの常圧構造と高压構造



基質結合と脱水和の模式図

## 結語

高压結晶構造解析によって

- サーマライシン触媒反応サイクル中に存在する求核攻撃の水和サイトを
- DHFRの複合体形成過程にある構造を観測することに成功した。