

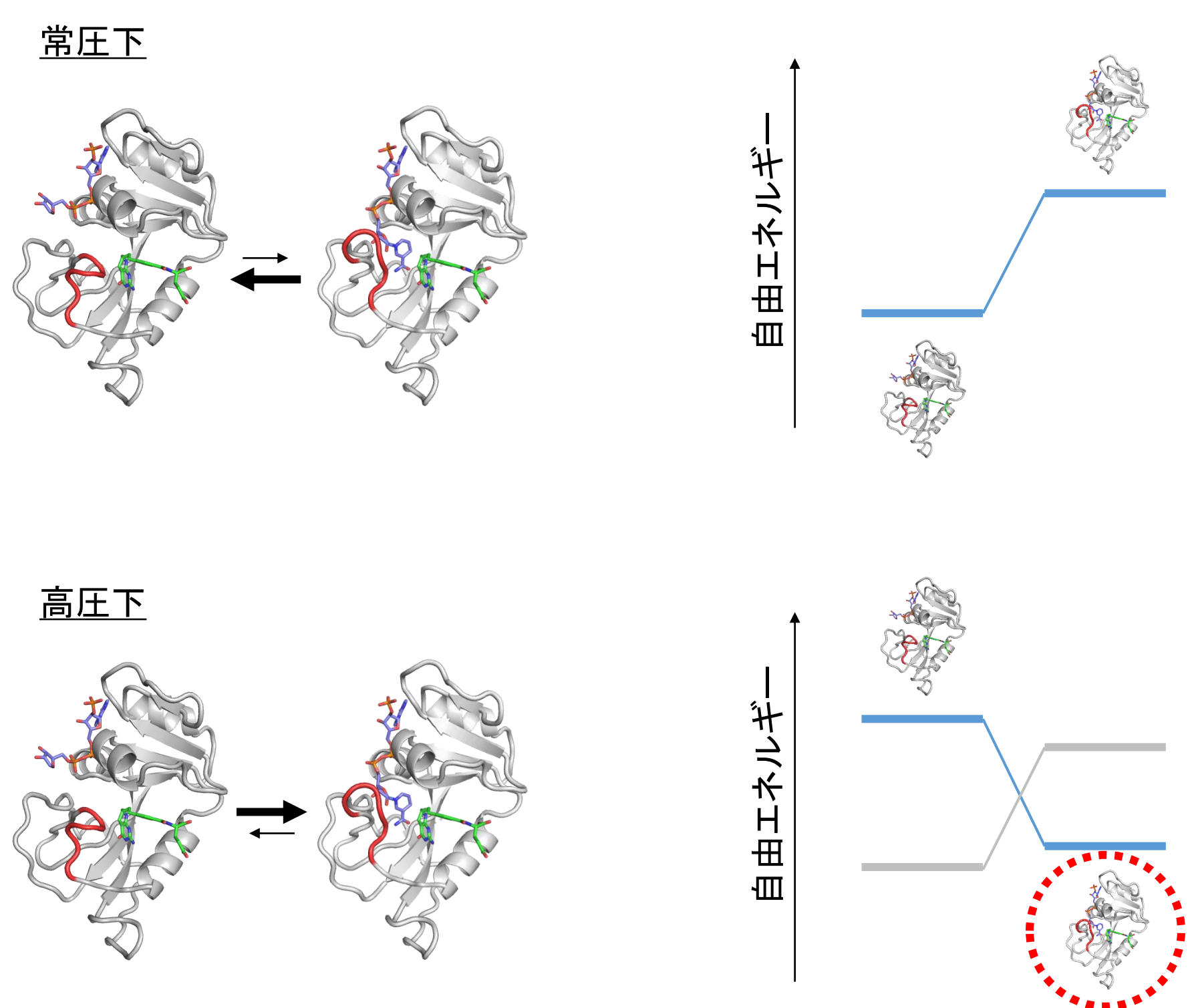
# BL2S1を利用した大腸菌DHFRの高圧結晶構造解析

名大シンクロトロン光研究センター・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。

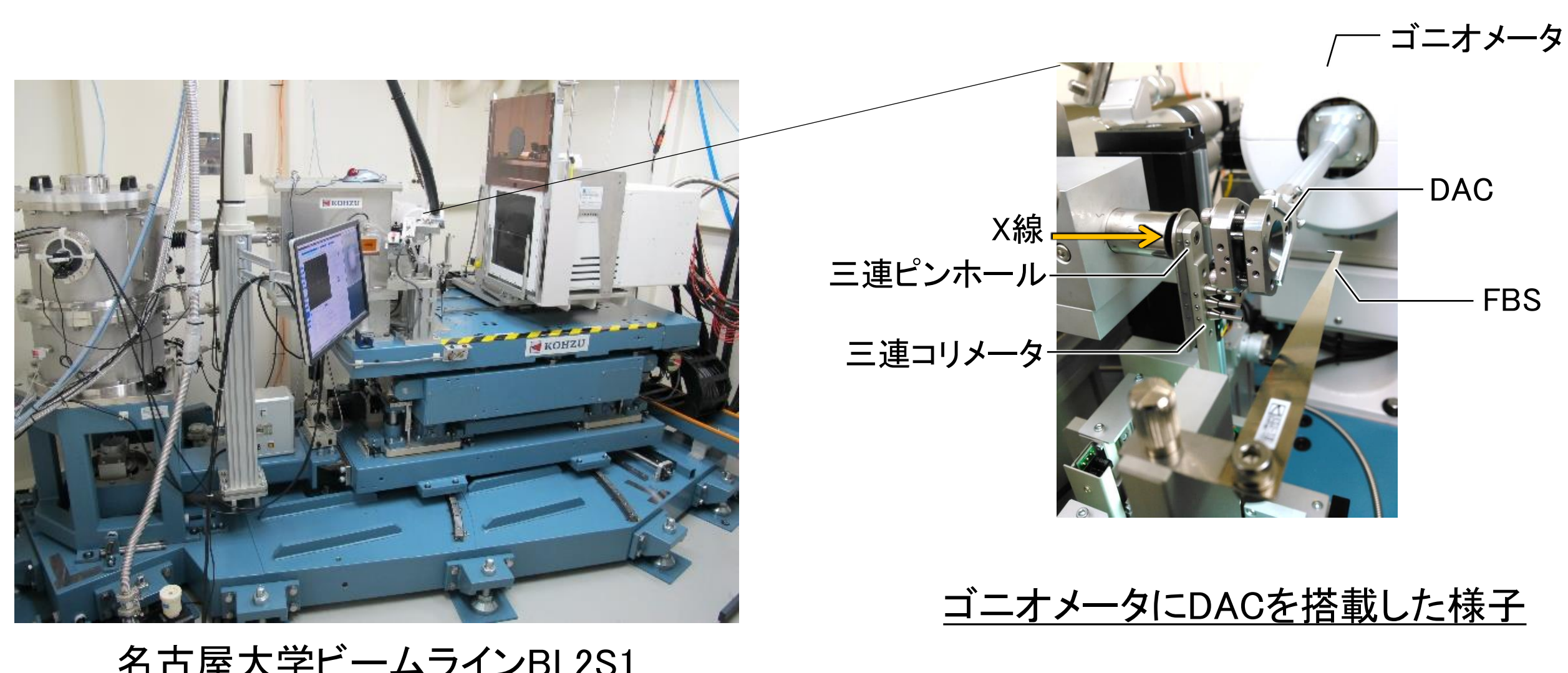
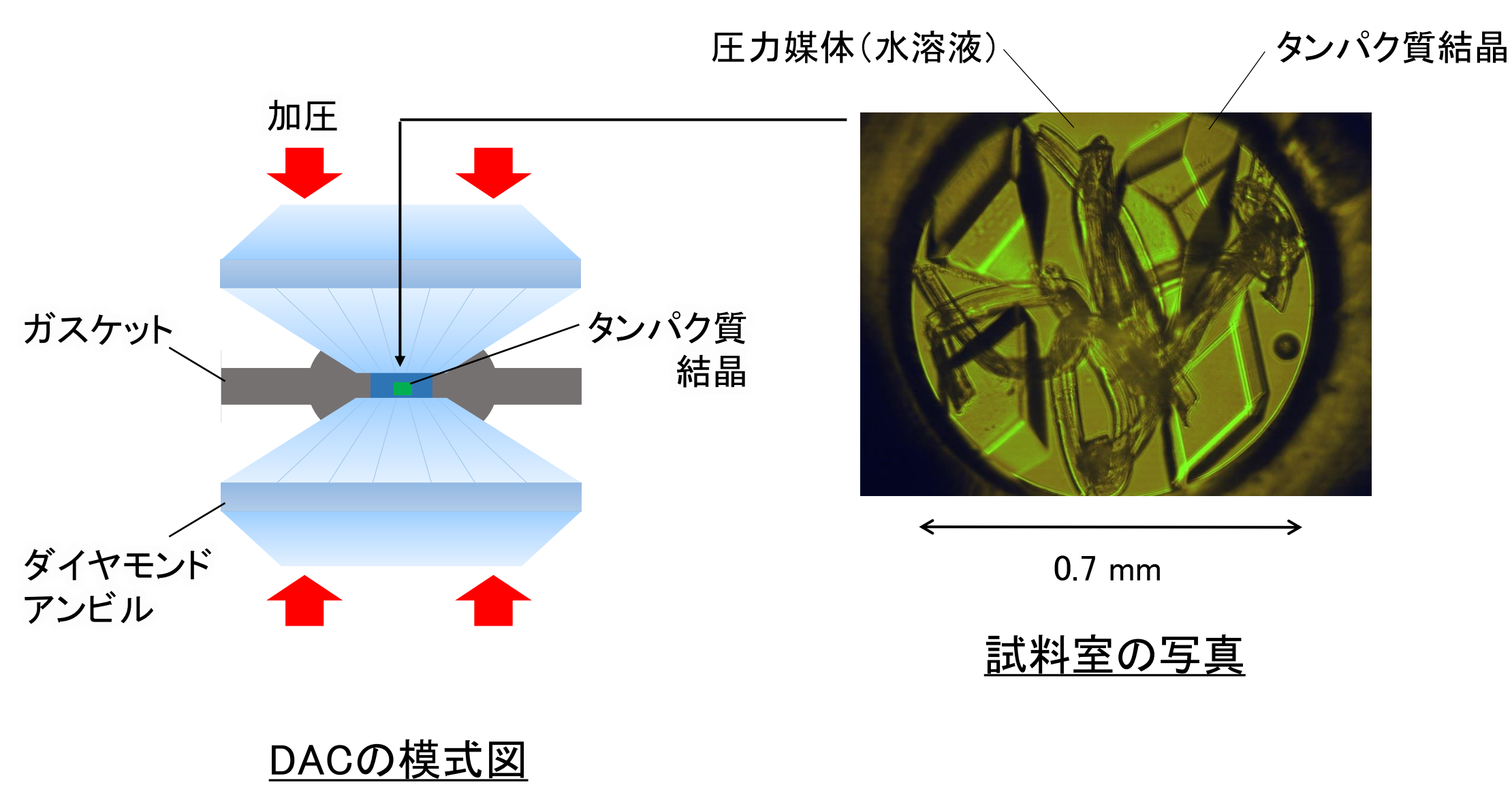
一方でタンパク質分子に圧力を与えると、部分モル体積が小さい準安定状態へと平衡がシフトする。これを利用して、高圧力下の結晶構造解析を実施することで、準安定状態の構造情報を得ることが可能となる。



加圧による分布率の逆転

## 高圧結晶構造解析

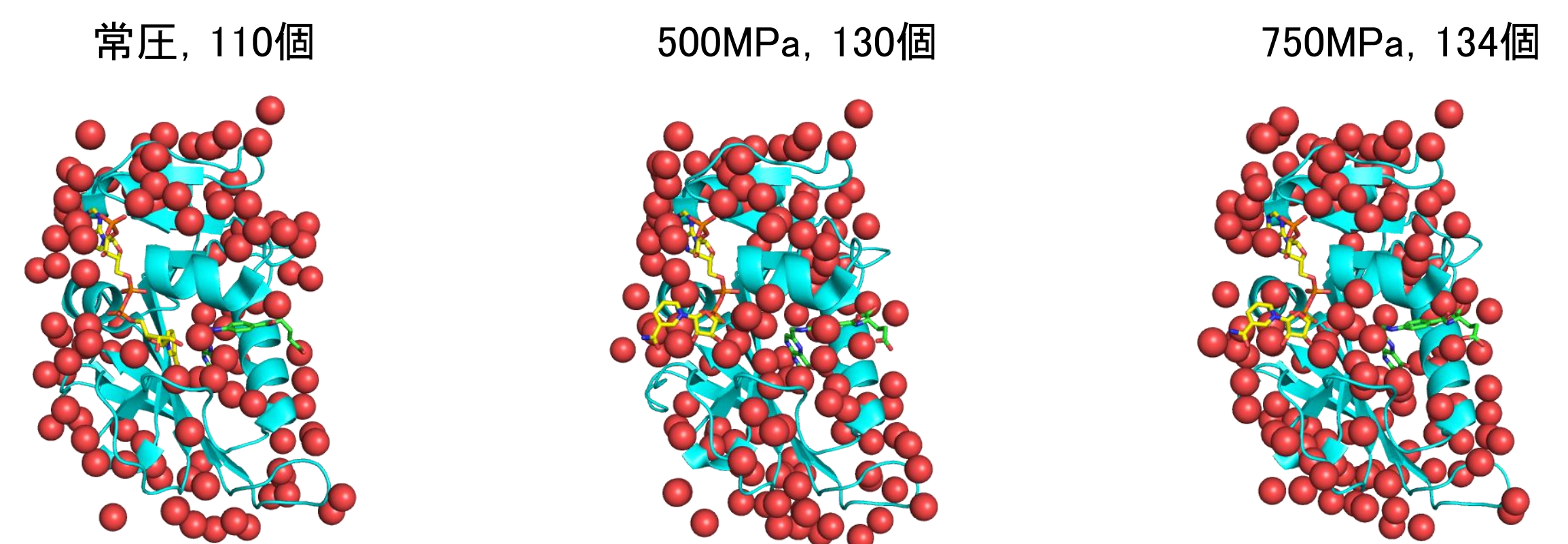
高圧力下の回折データ収集は、ダイヤモンドアンビルセル(DAC)を用いて行なう。DACは、2つのダイヤモンドを押し込むことで試料室に高圧力を与える装置である。あいちシンクロトロン光センターの名古屋大学ビームラインBL2S1ではフロントビームストップパー(FBS)など試料周りの環境を調整することでDACを用いた高圧実験が実施可能にしてある。通常測定用の三連コリメータはDACと干渉してしまうため、代わりに三連コリメータの上部に直径0.20, 0.14, 0.075 mmの三連ピンホールを追加し、ビームを適切なサイズに成形可能である。



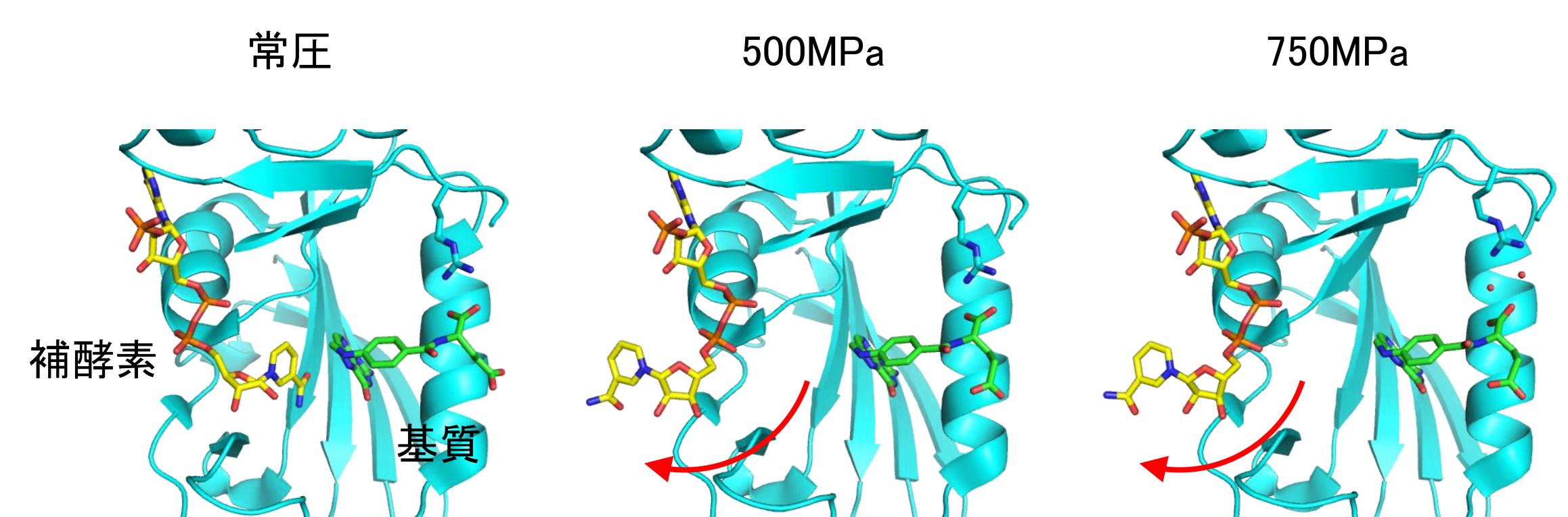
名古屋大学ビームラインBL2S1

## ジヒドロ葉酸還元酵素の高圧構造解析

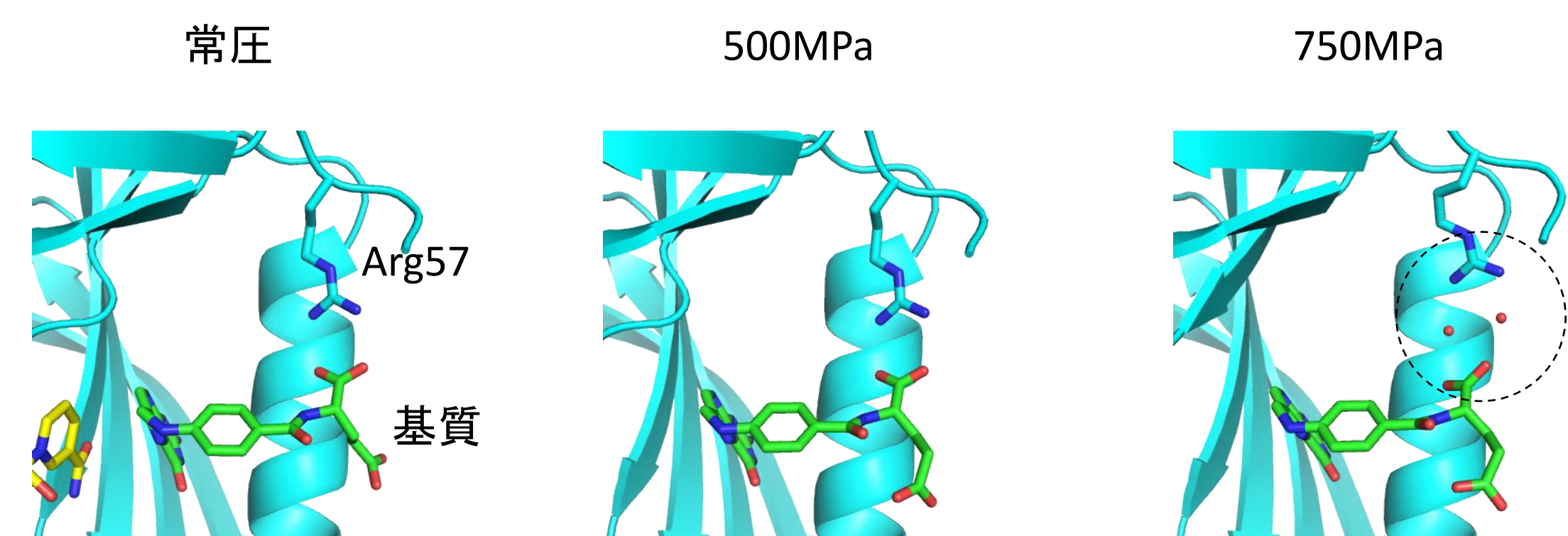
DHFRは生体内のアミノ酸合成経路もしくは核酸合成経路で働く酵素である。DHFR, 基質, 補酵素の複合体結晶を作成し、常圧, 500 MPa, 750 MPa下で構造解析を行なった。



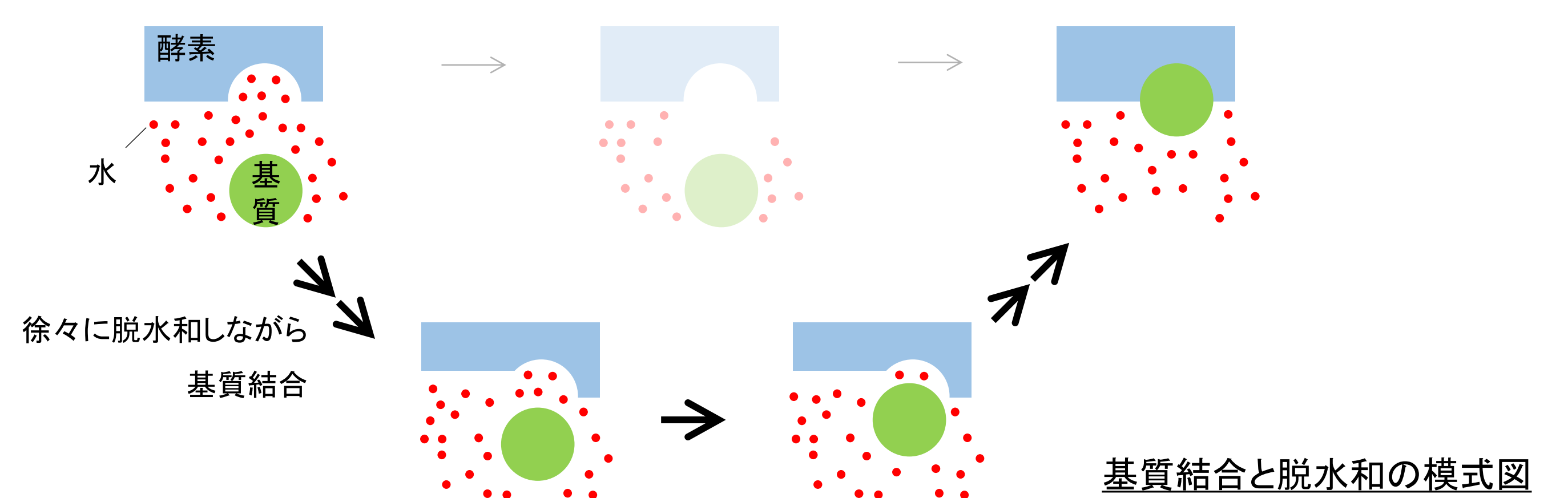
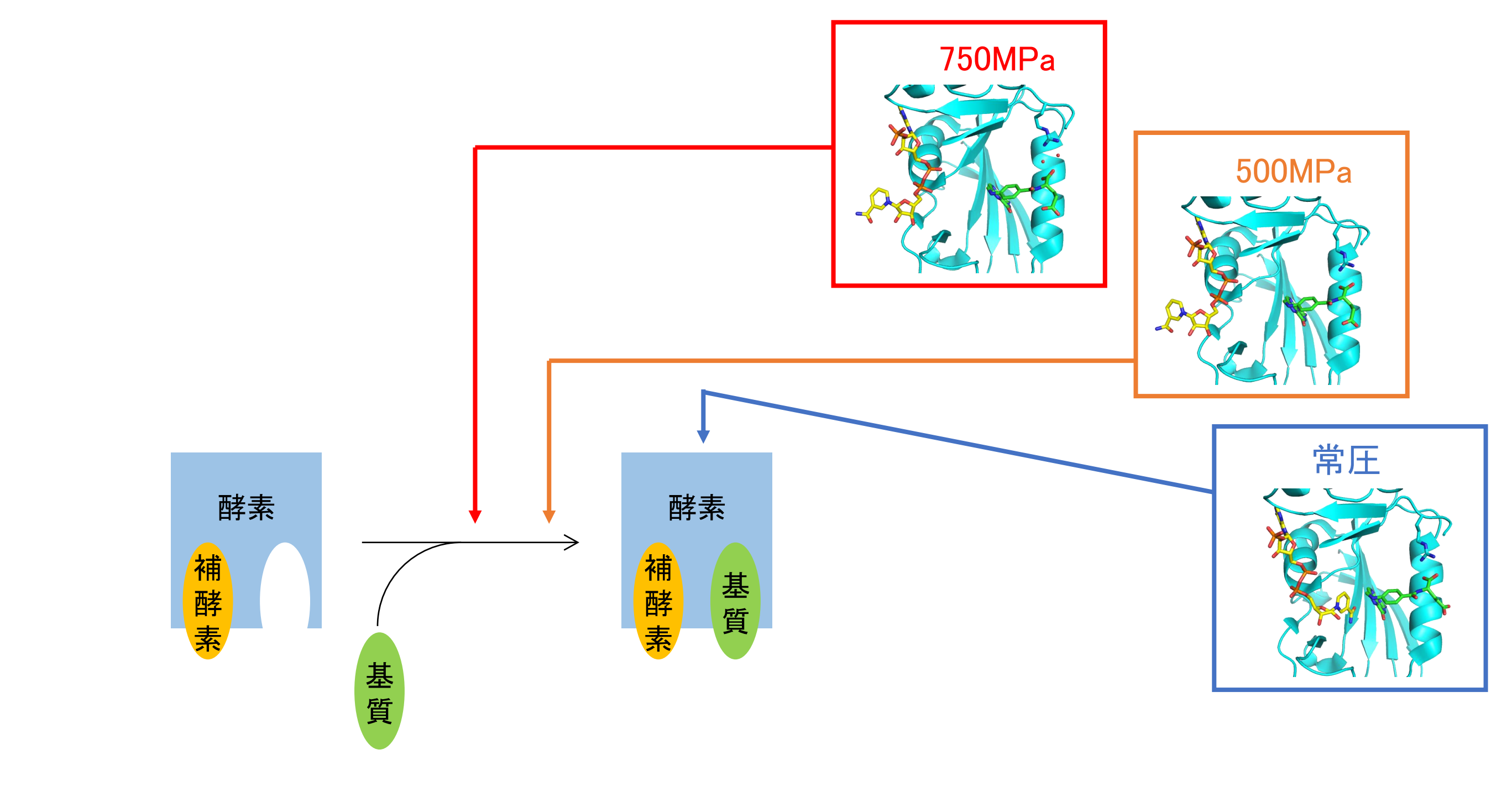
各圧力条件下におけるDHFRの水和水 圧力の増加に伴い観測される水和水が増加している。



DHFR活性サイトの常圧構造と高圧構造 常圧下ではDHFRに結合している補酵素が基質の方を向いているが、500MPa以上ではコンフォメーション変化して、フリップアウトしている。



酵素と基質の結合様式の変化 500MPa以下では、アルギニン側鎖と基質が直接静電相互作用しているが、750MPaでは水分子が介入する。



基質結合と脱水和の模式図

## 結語

- DHFR複合体結晶に高圧構造解析を適用し
- 500MPaで補酵素の結合様式が変化した。
- 750MPaで基質の結合様式が変化した。
- 複合体形成の途中の構造を捉えたと考えている。