



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

深海に生息している生物の蛋白質は、過酷な高压条件下においてもその機能を保持しており、圧力適応機構を備えていると考えられる。しかし、深海生物の蛋白質のどのような構造的特徴が圧力適応機構に寄与しているのか、その分子メカニズムは十分に解明されていない。我々はダイヤモンドアンビルセル (DAC) と放射光 X 線による高压結晶構造解析法を用いて、様々な生育深度の微生物が持つリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) の高压構造を決定・比較し、圧力適応機構を解明することを試みている。MDH は全ての生物が所持しており、補酵素 NAD の存在下でリンゴ酸をオキサロ酢酸に変換 (またはオキサロ酢酸をリンゴ酸に変換) する重要な酵素である。本研究ではまず深海の中でも比較的浅い 2,220 m で採取された *Moritella* sp. 5710 由来 MDH (M5710MDH) の高压構造解析に取り組む。

2. 実験内容

M5710MDH は大腸菌組換え発現系によって生産し、Ni-Affinity とゲル濾過カラムを用いて精製した。精製した M5710MDH に補酵素 NADH を混合した蛋白質溶液を用いて、複合体結晶を作成した。結晶化母液に NADH とグリセロールを混合したものを抗凍結溶液として用い、名古屋大学ビームライン BL2S1 にてクライオ (95 K) 条件下で X 線回折実験を行った。

3. 結果および考察

得られた結晶は、空間群 $P2_1$ 、格子定数 $a = 72.0$, $b = 84.3$, $c = 101.2$ Å, $\beta = 99.7^\circ$ で、試料セルの開口角に制限のある DAC 実験を行うには対称性にやや難があるが、 1.5 Å の高分解能まで回折データが得られた。構造解析の結果、MDH 活性サイトには補酵素 NADH が結合していることが確認できた (Fig. 1)。今後高压実験用の圧力媒体・ソーキング方法の検討を行っていく予定である。

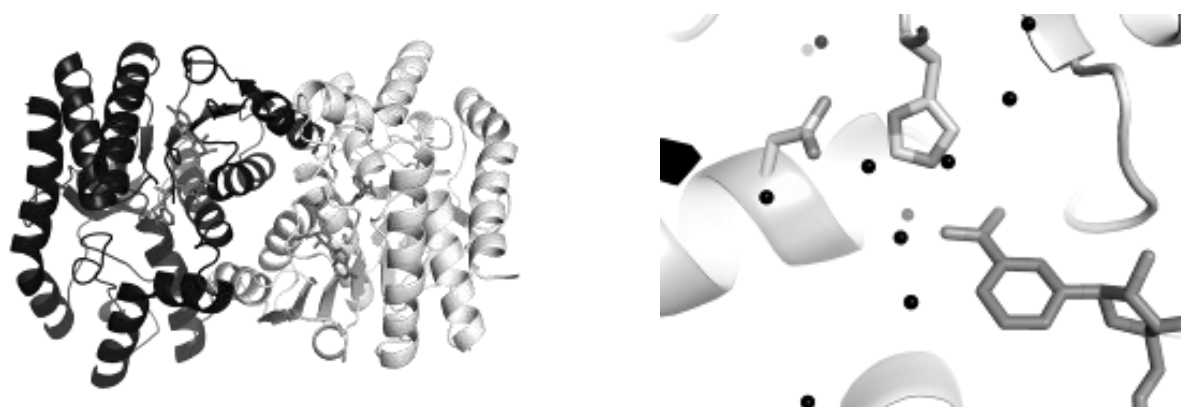


Fig.1 M5710MDH-NADH 複合体結晶の構造。
(左) ホモ二量体の全体構造。(右) 活性サイトの拡大図