



## 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

X線結晶構造解析法によって決定された蛋白質の立体構造は、酵素-基質の結合様式や遷移状態安定化の仕組み等を調べる上で重要な知見となる。また、そういった構造情報を用いて薬剤の設計等も行われている。一方でアミノ酸側鎖や結合水の構造等の詳細な構造情報を解析するには、 $2 \text{ \AA}$  分解能程度の高分解能の回折データ収集が必要となる。しかしながら、対象としている蛋白質の結晶化に成功したもののそれらが低分解能の回折能しか示さないという事態にしばしば直面する。蛋白質結晶の結晶性を改善し高分解能の回折データを得る手法としては、例えば結晶のアニーリング・脱水などがよく知られている。また近年、低分子を含む複数のソーキング液に結晶を浸し、分解能を向上させるといった方法も報告されている。一方我々はこれまでに、蛋白質結晶に圧力をかけることで回折データが顕著に改善し、分解能が向上することを見出している。そこで分解能向上のツールとして圧力に着目し、どういった蛋白質結晶ならば分解能がどの程度向上するのかその適用範囲を調べている。圧力と分解能の関係性を調べるためのテストサンプルとして、これまでにウシ肝臓由来のカタラーゼの結晶を作成し、BL2S1で結晶性の評価を行った。本申請課題では、さらに HIV-1 由来 RNaseH の結晶を作成し、高压実験に使用出来る結晶であるか否か評価を行うことを目的とし実験を行った。

### 2. 実験内容

RNaseH 結晶は、 $20^\circ\text{C}$  の条件下でハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて 2 種類の条件下で得ることに成功した (結晶 A, 結晶 B とする)。各条件で得られた結晶を、結晶保存液に移した後、ガラスキャピラリー内に移し常圧・室温条件下で波長  $1.12 \text{ \AA}$  の X 線を用いて回折データを収集した。

### 3. 結果および考察

結晶 A については、回折データを処理した結果、晶系は単斜晶、格子定数は  $a = 82 \text{ \AA}$ ,  $b = 93 \text{ \AA}$ ,  $c = 120 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 95^\circ$ , モザイク性は  $0.35^\circ$  であった。回折スポットは  $2.0 \text{ \AA}$  分解能程度まで観察出来た (Fig. 1)。

結晶 B は、晶系は直方晶、格子定数は  $a = 50 \text{ \AA}$ ,  $b = 64 \text{ \AA}$ ,  $c = 92 \text{ \AA}$ , モザイク性は  $0.10^\circ$  であった。回折スポットは  $2.0 \text{ \AA}$  分解能程度まで観察出来た

(Fig. 2)。従って結晶 A・結晶 B の両者ともに高压実験を行う上で十分な結晶性であることが分かった。今後これらの結晶を生産し、常圧～高圧力下の回折データを収集・比較し、圧力と分解能の関係を調べる。

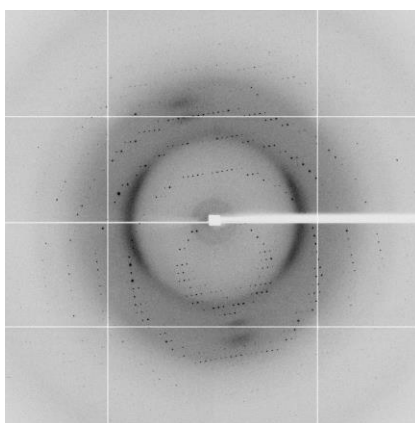


Fig.1 RNaseH 結晶 A の回折像

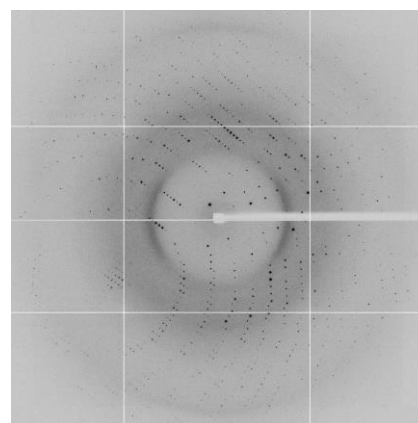


Fig.2 RNaseH 結晶 B の回折像