



## 加圧による結晶性向上と高エネルギー構造の捕捉

永江峰幸

名古屋大学シンクロトロン光研究センター

キーワード：タンパク質結晶構造解析, 圧力, 高エネルギー準安定構造

### 1. 背景と研究目的

蛋白質の構造は熱力学的に揺らいでおり、基底状態や準安定状態の平衡状態にある。近年では、そういった蛋白質分子の揺らぎが機能発現に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、通常の構造解析方法では分布率が高い基底状態の構造しか捉えることが出来ない。一方、蛋白質に圧力をかけると、ルシャトリエの原理に従い、部分モル体積がより小さい準安定状態へと平衡がシフトすることが知られている。そこで我々はダイヤモンドアンビルセル (DAC) を用いて、高圧力条件下における結晶構造を解析し、分布率が小さく通常観測困難な準安定状態の観測を試みている。本申請課題では、好熱菌由来金属プロテアーゼである Thermolysin を用いて高エネルギー準安定構造の補足を試みる。

### 2. 実験内容

2 $\mu$ L の蛋白質溶液 (5.5 mM Thermolysin, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 2.3 M CsCl, 45% DMSO) と、400 $\mu$ L のリザーバー (3.3 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.78 M CsCl, 15% DMSO) を用いて蒸気拡散法を行ない、Thermolysin の六方晶結晶を得た。これを圧力媒体に浸した後、ダイヤモンドアンビルセル (DAC) にマウントし、常圧から数百 MPa の高圧力条件下で回折データを収集した。

### 3. 結果および考察

圧力媒体として 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 3.2 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca, 7% DMSO を用いた場合、440 MPa 下では結晶の溶解は見られないが (Fig. 1(a)), 590 MPa 下で結晶が溶解することが分かった (Fig. 1(b))。次に高圧条件下における結晶の溶解を防ぐために結晶をパラトンオイルでコートしたが、570 MPa 下で溶解は見られなかったものの (Fig. 1(c)), 回折能を保持することはできなかった。一方、平均分子量が異なる 2 種類の Polyethylene glycol 6000, 20000 を圧力媒体に混合し Thermolysin 結晶の加圧による溶解の有無を調べたところ、46%(w/v) PEG20000 を圧力媒体に加えることで、700 MPa 程度の圧力下でも溶解せず、さらに回折能も良好に保持することが分かった。今後この条件を用いて常圧から数百 MPa の高圧力条件下の回折データを収集し、構造解析を行なう。

(a)



(b)



(c)

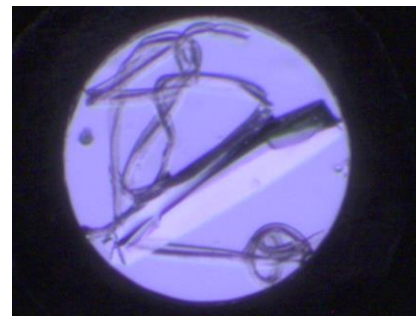


Fig.1 加圧による Thermolysin 結晶の溶解. (a) 440 MPa, (b) 590 MPa, (c)570MPa