



## 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，熱水中の微生物 *Bacillus thermoproteolyticus* から発見された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 (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 3.2 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca, 7% DMSO, 42% PEG20000) 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

常圧下の結晶構造では，図 1(a)に示すように活性サイトの Zn イオンに，His142・His146 側鎖の窒素原子，Glu166 側鎖の 2 つの酸素原子，水分子の酸素原子が配位していた．一方，高圧力下の結晶構造では，図 1(b)に示すように Zn イオンの配位構造が変化し，2 個目の水分子 (Wat2) が配位している様子が観測された．さらに，この第 2 の水分子は Glu143 側鎖のカルボキシル基の酸素原子と水素結合距離にあることが分かった．これまでの研究から，Thermolysin 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求核攻撃から始まると提唱されている．しかし，この活性化された水分子を直接的に観測した報告はこれまでに無い．圧力を摂動として用いることで，触媒機能に重要な水和サイトを観測することが出来たと考えている．

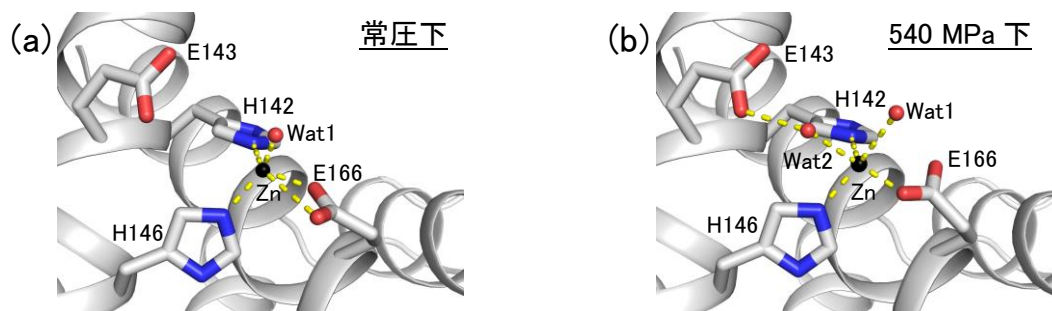


図 1 Thermolysin 活性サイトの常圧構造 (a) と 540 MPa 構造 (b)．加圧により配位構造が変化し，第 2 の水分子 (Wat2) が観測された．