



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

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，HIV-1 RNase H を用いて，加水分解反応に必要な Mn イオンあるいは阻害剤との複合体結晶の高圧構造解析を試みた．

2. 実験内容

20 mg/mL RNase H の蛋白質溶液と，100 mM Tris-HCl (pH8.0)，17% PEG1500 の組成の結晶化母液を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法によって斜方晶結晶を作成し，得られた結晶を Mn イオンを含む結晶保存液 (100 mM Tris-HCl (pH8.0)，30% PEG1500，11.9 mM MnCl₂) にソーキングした．また，RNase H 阻害剤 F3385-2581，F3385-2588，F3385-2590 (Life Chemicals 社) の3種類を同様の結晶保存液に溶解し，ソーキングを行なった．結晶はキャピラリーにマウントし，常圧条件下で回折データを収集した．また高圧条件下の回折データ収集については，結晶をダイヤモンドアンビルセル (DAC) にマウントし実施した．

3. 結果および考察

複数のソーキング液に浸して回折実験を行なったが，いずれも 600 MPa 以上の高圧力条件下まで回折能を示した．解析の結果，Mn²⁺イオンを含む結晶保存液にソーキングした場合，RNase H 活性サイトの2つの金属結合サイトのうち，一方のサイトに Mn²⁺イオンの電子密度が観測された．次に 750 MPa 条件下で回折データを収集した結果，配位子 Glu58 のコンフォメーション変化を観測した．従って圧力の摂動によって配位構造の揺らぎを観測することに成功した．一方で RNaseH 阻害剤を含むバッファに浸した結晶を常圧条件下で回折データ収集し，構造解析を行なったが，活性サイトに阻害剤の電子密度は観測できなかった．

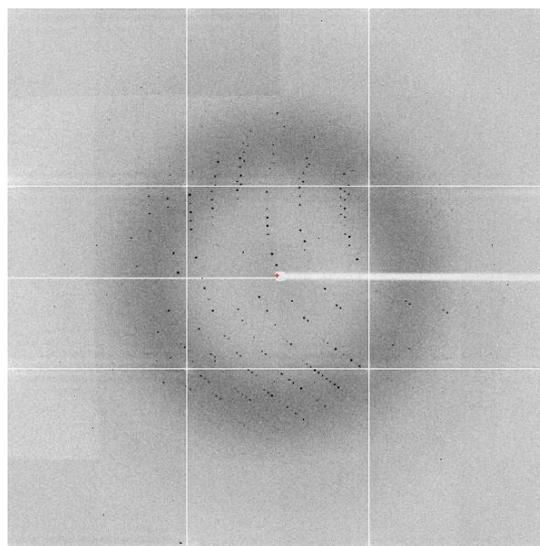


Fig.1 Mn²⁺イオンと阻害剤を含む結晶保存液にソーキングした結晶の回折写真．