



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

X線結晶構造解析法は現在もっとも頻繁に利用されるタンパク質構造決定法である。X線結晶構造解析法には、良質のタンパク質結晶を用いれば非常に精度の高い構造情報が得られるという利点があり、またそれらの構造情報は薬剤設計等にも利用されている。一方で研究対象としているタンパク質の結晶化に成功しても、得られた結晶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。従ってタンパク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の開発が望まれる。これまでに我々は、タンパク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、加圧によって全てのタンパク質結晶の分解能が向上するのか、そうでないならば、どういったタンパク質結晶ならば分解能が向上するのかその適用範囲を調べている。本実験では、HIV-1由来RNase Hを用いて圧力と分解能の関係について調べた。

2. 実験内容

RNase Hのタンパク質溶液（20 mg/mL RNaseH, 10mM Tris-HCl(pH7.5)）と、結晶化母液（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た。得られた結晶を圧力媒体（100 mM Tris-HCl (pH8.0), 25% PEG1500）にソーキングした後、結晶をダイヤモンドアンビルセル（DAC）にマウントし、波長 0.75 Å の X 線を用いて室温で回折データを収集した。露光時間は、回折データの統計値に放射線損傷の影響が露に出ない範疇に留めた。

3. 結果および考察

まず常圧下で回折データを収集した後、DAC 試料室を 500 MPa 程度まで加圧し、同じ結晶の同じ箇所を用いて再び回折データを収集した。この測定を 4 つの結晶を用いて行ない、 $1/\sigma(I)=2$ を分解能の基準にとって解析した結果、常圧下での分解能は 2.26 ± 0.14 Å, 500 MPa 下での分解能は 2.20 ± 0.15 Å であった。同様のデータセットを常圧および 720 MPa 下でも行なった結果、常圧下では 2.22 ± 0.13 Å, 720 MPa 下では 2.11 ± 0.13 Å であった（表 1）。これらの実験結果から、RNase H 結晶については、加圧による分解能向上の効果はほぼ見られないことが明らかとなった。引き続きその他のタンパク質試料についても、常圧下と高圧力下で回折データを収集し圧力と分解能の関係を調べる。

表 1. RNase H 結晶における圧力と分解能の変化

比較	データ数	分解能(Å)	
		常圧	高圧
常圧-500MPa	4	2.26 ± 0.14	2.20 ± 0.15
常圧-720MPa	6	2.22 ± 0.13	2.11 ± 0.13