



## 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

タンパク質の構造は、基底構造と準安定構造の間の平衡状態にある。近年では、タンパク質が機能を発現する際、分布率の低い準安定構造が重要な役割を果たしていると考えられている。タンパク質に圧力をかけると、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ため、我々は高圧力条件下における結晶構造を解析し、通常観測困難な準安定状態の観測を試みている。本実験では、熱水中の微生物 *Bacillus thermoproteolyticus* から発見された金属プロテアーゼ Thermolysin (TLN) を用いて、分布率の低い準安定構造を調べる。

### 2. 実験内容

TLN のタンパク質溶液 (5.5 mM TLN, 45% DMSO, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.3 M CsCl) を、3.8% DMSO, 4.2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 M CsCl の組成のリザーバー液に対して蒸気拡散させ、六方晶結晶を作成した。得られた結晶を圧力媒体 (3.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 42% PEG20,000) 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。

### 3. 結果および考察

圧力媒体に浸した TLN 結晶を慎重に 3 つに分割し、これらを試料室に同時にサンプリングした。1 つ目の結晶は常圧下で、2 つ目の結晶は 190 MPa 下で、3 つ目の結晶は 350 MPa 下でデータ収集を行った。各々の結晶に対して、露光時間 10 秒、振動角 1° で 40 枚の回折像を収集した。解析の結果、元は 1 つの結晶であったにも関わらず、1 つ目の結晶 (常圧構造) と、2 つ目もしくは 3 つ目の結晶 (190 MPa もしくは 350 MPa 構造) は、活性サイトの Zn イオンの配位構造が変化していた (図)。従って、この活性サイトの構造変化は圧力摂動によって誘起されたものと考えられる。高圧力条件下で観測された水 (Wat2) は触媒残基 Glu143 と水素結合を形成する位置にあり、基質ペプチドに求核攻撃を行なう活性化された水分子のサイトであると推測される。

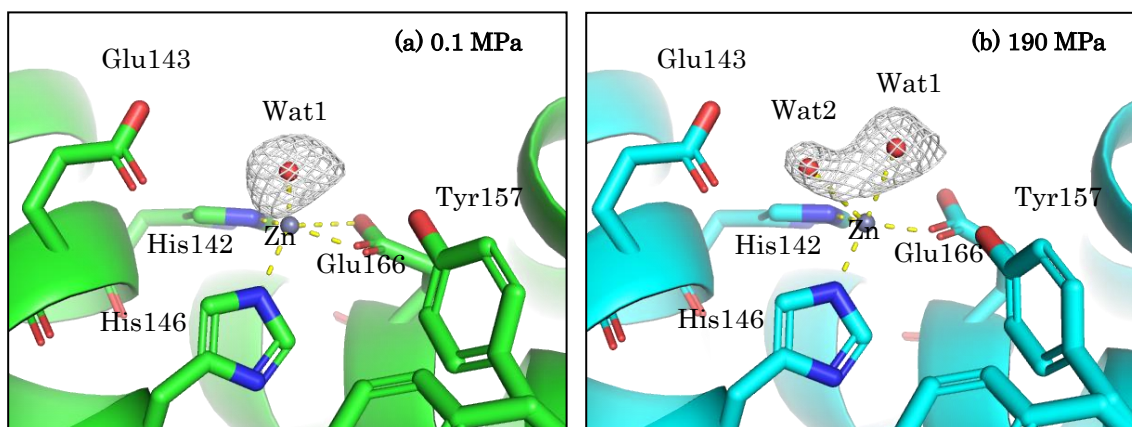


図. TLN 活性サイトの常圧構造 (a) と 190 MPa 構造 (b).