



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

タンパク質は基底構造と準安定構造の間の平衡状態にあり、準安定構造は機能発現の際に重要な役割を果たしていると考えられている。通常の構造解析法を用いた場合、そういった準安定構造の観測は難しい。一方、タンパク質に圧力をかけると部分モル体積が小さい準安定構造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を用いて、高圧力下における結晶構造解析を行ない、準安定構造の観測を試みている。これまでに、リゾチーム、ジヒドロ葉酸還元酵素、サーモライシン等のタンパク質結晶に高圧構造解析法を適用してきた。本実験では、トランスサイレチン (TTR4)、イネ由来ジベレリン代謝酵素、シアノバクテリオクロム (CBCR) を実験対象とした。

2. 実験内容

TTR4 については、野生型 (正常なアミノ酸配列) 及び V30M 変異体を用いて蒸気拡散法で結晶化し、結晶性評価のために 95 K・常圧下で回折実験を行なった。分解能 1.8 Å 程度の良いデータが得られたため、次に室温・常圧及び室温・100 MPa の条件下で回折実験を行なった。イネ由来ジベレリン代謝酵素については、結晶化条件スクリーニングで得られた結晶を用いて、まずは 95 K・常圧下で回折実験を行なったが、測定した結晶からは残念ながら反射点が得られなかった。CBCR については、暗室で蒸気拡散法を用いて結晶を作成し、まずは 95 K・常圧下で回折実験を行なった。約 1.6 Å 分解能の反射点が得られたため、室温・常圧及び室温・200 MPa の条件下で回折実験を行なった。

3. 結果および考察

TTR4 は通常四量体を形成しているが、V30M などの病原性変異によって不安定化し、単量体への解離を経てアミロイド繊維化すると考えられている。野生型と V30M 変異型の常圧構造を決定し比較した結果、四量体及び単量体の構造・変異箇所近傍の局所的な構造に大きな差は見られなかった。TTR4 は加圧によって四量体から単量体へと平衡がシフトする (すなわち解離しやすくなる) ことが、溶液 NMR によって明らかにされている。従って今回得られた 100 MPa 構造中に、解離の引き金を示す「動き」が観測されることを期待したが、常圧構造と 100 MPa 構造の間にも、有意な差は観測されなかった (図 1)。これは、結晶を構成している TTR4 分子が、隣接する分子同士で支えあっているため、圧力に対する応答が鈍くなっているためと考えている。結晶の場合、溶液状態よりも高い圧力を加える必要があると考えられる。CBCR は、光照射によって、吸収波長のシフトを伴う構造変化が生じる。圧力摂動によってこの「動き」の初期段階が捕捉されることを期待したが、回折データが 1.6 Å から 3 Å 分解能に悪化してしまった。今後、高圧力条件で結晶性を損なわない結晶を探索する必要がある。

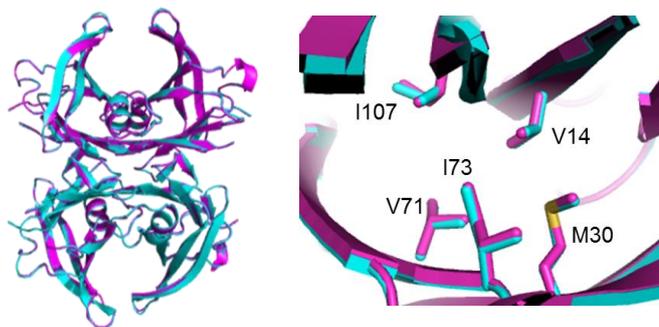


図 1. V30M 変異型 TTR4 の構造. 常圧 (青), 100 MPa (紫).