

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18502

研究課題名(和文) 加圧による蛋白質結晶の分解能向上の研究

研究課題名(英文) Improving diffraction resolution of protein crystal by high pressure

研究代表者

永江 峰幸 (Nagae, Takayuki)

名古屋大学・シンクロトロン光研究センター・特任助教

研究者番号：90735771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では蛋白質結晶における圧力と分解能の関係を調べた。複数の蛋白質を用いて高圧力下でX線回折データを収集した結果、分子量が小さいほど加圧によって結晶性・分解能が向上していた。これは加圧によって蛋白質の水和殻が秩序化し結晶全体の回折能が向上しているためと推察される。蛋白質の種類や結晶化条件に依らず、低分子量であれば加圧によって分解能を向上させることが出来ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study we researched relationship between diffraction resolution of protein crystals and high pressure. For several kinds of proteins, diffraction data of crystals were collected and analyzed. High pressure tended to improve diffraction resolution of proteins which have low molecular weight. The reason is considered that high pressure makes hydration structure ordered and as a result diffraction ability of entire crystal improve. High pressure could improve crystal resolution of proteins which have low molecular weight, regardless of kinds of proteins or crystallization conditions.

研究分野：蛋白質結晶構造解析

キーワード：圧力 水和 分解能

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析法によって精密な構造情報を得るには、良質の結晶を用いて高分解能の回折データを収集する必要がある。酵素蛋白質の仕組みを調べる上では、触媒残基側鎖の位置や配向が重要な情報となるし、薬剤設計を行う上では側鎖や水分子を含めた精密な基質認識様式の情報が必要である。このような詳細な構造情報を取得するには2 Å分解能程度の高分解能の回折データが望ましい。しかし、現実的には結晶性が悪く低分解能の回折データしか得られないという問題にしばしば直面する。従って、蛋白質結晶の結晶性を改善し分解能を向上させるための方法が開発できればその意義は大きい。

結晶性を改善方法としては、試料調製の段階まで立ち回り、コンストラクトの変更・変異の導入・精製方法の変更などが挙げられる。他の方法としては、現状得られている結晶を複数の抗凍結液に浸す多段階ソーキング法・沈殿剤濃度の上昇による脱水・湿度の調整による脱水などもある。いずれの方法も実績を挙げている有効な方法であるが、全ての蛋白質結晶に対して効果を発揮する普遍的な方法は無く、各結晶に合った方法を探していくしかない。一方我々は、結晶性が悪く低分解能の回折データしか得られない結晶でも、圧力をかけると分解能が顕著に向上することを見出している。分解能向上のツールとして圧力を積極的に利用した例はこれまでにほとんど無く、構造生物学者にとって分解能向上のための新たな選択肢となると期待される。

2. 研究の目的

上記のように圧力は分解能向上の新たなツールとして期待できるが、一方で圧力と分解能の関係を体系的に調べた研究例はこれまでにない。そこで本課題では、複数の蛋白質結晶を用いて、圧力と分解能の関係を調べ、どういった条件の結晶ならば分解能向上が期待できるのかその指針を出すことを目的とした。また加圧による分解能向上のメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 試料結晶の作成

まず試料蛋白質が再現良く結晶化する条件を確立した。試料蛋白質としては、ヒトユビキチン、HIV-1由来RNase H、サーモライシン、ウシ膵臓由来カタラーゼを選んだ。ユビキチンとRNase Hは大腸菌発現系を用いて生産し、精製・結晶化を行なった。サーモライシンはnacalai tesqueより購入し、結晶化した。カタラーゼはSigma-Aldrichより購入し、精製を行なった後に結晶化した。

(2) 加圧条件の検討

蛋白質結晶の加圧は、ダイヤモンド・アンビルセル (DAC) を用いて行なった。蛋白質

結晶の中には加圧に伴って溶解度が大きく上昇するものがある。このような結晶については、適切な圧力媒体を用いて溶解を防ぐ必要がある。例えばサーモライシンの六方晶結晶は、加圧によって溶解度が上昇する結晶であった (図1)。これまでサーモライシンの結晶保存液としては、10 mM Tris-HCl (pH8.0), 7% DMSO, 3.2 mM (CH₃COO)₂Ca が良く使用されてきたが、これに42% (w/v) PEG20000を添加することで加圧による溶解を防ぐことに成功した。

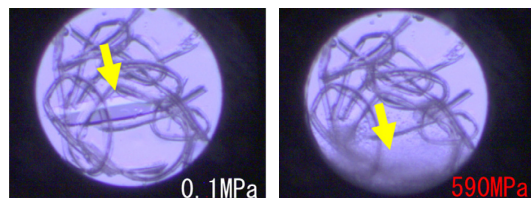


図1. 加圧によるサーモライシン結晶の溶解

(3) X線回折実験

各試料蛋白質結晶の圧力媒体の検討を行なった後、常圧下と高圧力下における回折データを収集した。ビームラインは、あいちシンクロトロン光センターの名古屋大学ビームラインBL2S1と高エネルギー加速器研究機構PF-ARのビームラインNW12Aを使用した。

全く同じ結晶化条件の結晶であっても、サイズの違い・成長速度の違い・結晶取扱い時の影響などがあるため個々の結晶毎に回折能が異なる。そういったサンプル依存の問題を避けるために、同じ結晶の同じ箇所にX線を照射し、常圧データと高圧データを収集・比較した。また長時間の露光によって放射線損傷が問題になる可能性があるため、回折データの統計値に有意な影響が出ない露光時間を予め調べてから回折データ収集を行なった。

(4) フルデータ収集・常圧構造と高圧構造の比較

各試料蛋白質結晶について、(3)の方法を用いて分解能と圧力の関係を調べた後、次は加圧による分解能向上がどういった変化に起因しているのかそのメカニズムを調べるために、フルデータ収集と構造解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 加圧による結晶性と分解能の向上

ユビキチンの立方晶と六方晶結晶、RNase Hの直方晶結晶、サーモライシンの六方晶結晶、カタラーゼの直方晶結晶の回折データを解析した結果、分子量が小さいユビキチンは加圧によってデータの統計値と分解能の向上が顕著に観られた。例えばユビキチンの六方晶結晶では、図2aに示すように $I/\sigma(I) = 2$

を基準にすると常圧下では2.8 Å分解能であるが500 MPa下では2.0 Å分解能まで向上している。一方で分子量が大きいカタラーゼは分解能の向上が観られなかった。例えば、常圧下では $I/\sigma(I)=2$ となるのは4.0 Å分解能であるが、380 MPa下では4.5 Å分解能まで悪化している(図2b)。それらの間の分子量を持つRNase Hとサーモライシンについては、統計値と分解能向上は観られたが、しかしユビキチンよりも小さかった。例えば図4に示すようにRNase Hの直方晶結晶では、 $I/\sigma(I)=2$ となるのは2.8 Å分解能であるが、530 MPa下では2.4 Å分解能である(図2c)。従って加圧による結晶性・分解能の向上は、分子量に依存していると考えられる。この分解能と圧力の関係は、本研究課題によって初めて明らかにされたものである。

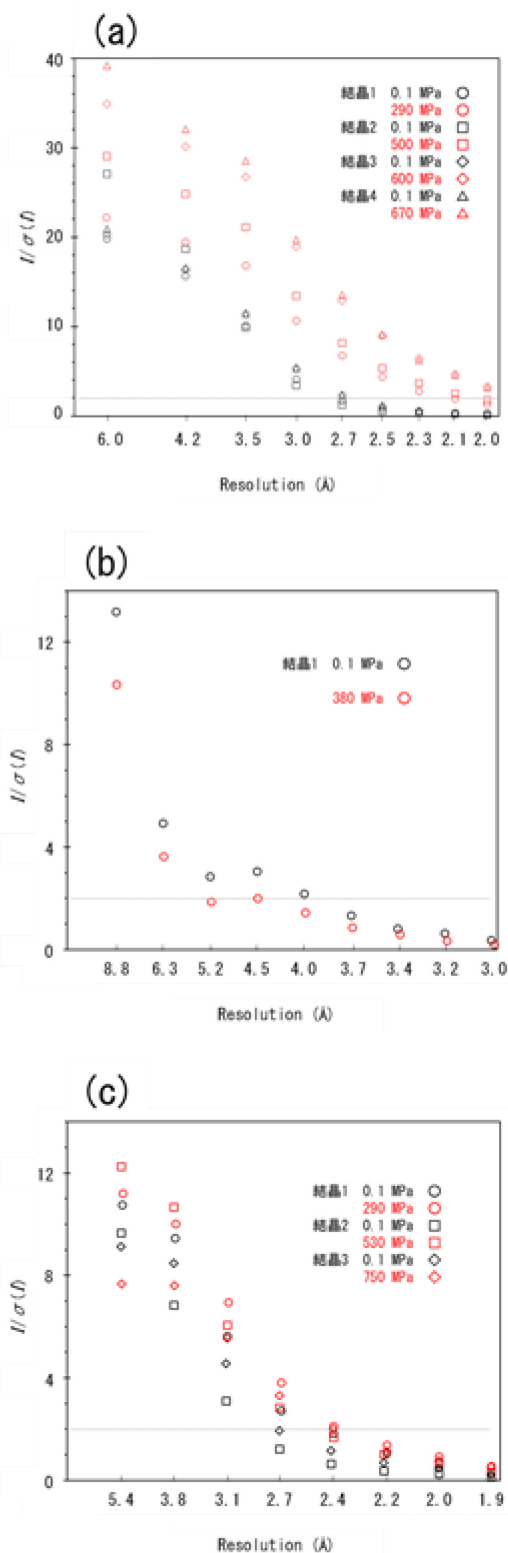


図2. $I/\sigma(I)$ の変化。(a) ユビキチン、(b) カタラーゼ、(c) RNaseH

ては、統計値と分解能向上は観られたが、しかしユビキチンよりも小さかった。例えば図4に示すようにRNase Hの直方晶結晶では、 $I/\sigma(I)=2$ となるのは2.8 Å分解能であるが、530 MPa下では2.4 Å分解能である(図2c)。従って加圧による結晶性・分解能の向上は、分子量に依存していると考えられる。この分解能と圧力の関係は、本研究課題によって初めて明らかにされたものである。

(2) 水和水の秩序化

加圧による分解能向上の効果が蛋白質の分子量に依存する原因を調べるため、ユビキチン(立方晶と六方晶)、RNase H、サーモライシン、カタラーゼ結晶について、高圧力下の構造解析を行なった。その結果カタラーゼを除く全ての蛋白質結晶で、高圧力下で蛋白質の水和水が顕著に増加することが明らかとなった。例えば、図3に示すようにRNase Hの斜方晶結晶では、常圧下で80個、510 MPa下で112個、710 MPa下で155個の水和水が帰属された。高圧力下ではルシャトリエの原理に従い、部分モル体積がより小さい状態へと系がシフトしていくため、水和水サイトに水分子が留まりやすくなったためと考えられる。この水和水の秩序化によって、結晶全体の回折能が向上していると推察される。ユビキチンのように小さい分子は、蛋白質自身の体積に対して水和水の体積の比が大きいため、その寄与は大きい。このように分子の大きさのみに依存して、蛋白質の種類や結晶化条件に依らず分解能を向上させるという点は、本手法の特徴の1つであると考えられる。高圧力下で蛋白質と水の相互作用が強くなることは高圧NMR法によって提唱されているが、本研究課題の高圧X線結晶構造解析法によって直接的に確かめられた。

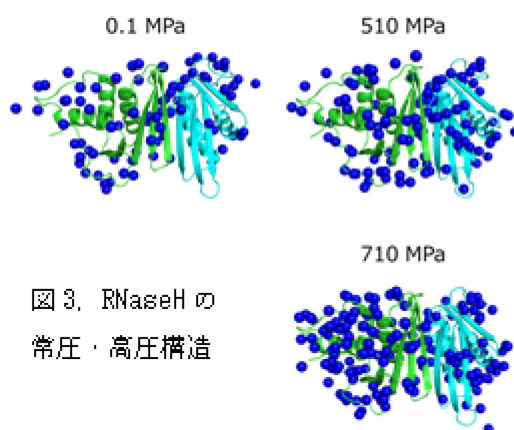


図3. RNaseHの常圧・高圧構造

(3) 圧力摂動による準安定構造の補足

サーモライシンの常圧構造と430 MPa構造を比較した結果、全体構造はRMSD = 0.33 Åと良く保持されていた。一方で図4に示すように、活性サイトのZnイオンの配位構造に

変化が観測された。常圧下では 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 Zn イオンに配位しているが, 430 MPa 下では, 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を形成している。サーモライシン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基質カルボニル炭素原子への求核攻撃から始まると提唱されており, この水和サイトが現れたと考えられる。このことは当初予期していなかったが, 圧力摂動によって機能発現に重要な準安定構造を観測するツールとして利用可能であることを示している。

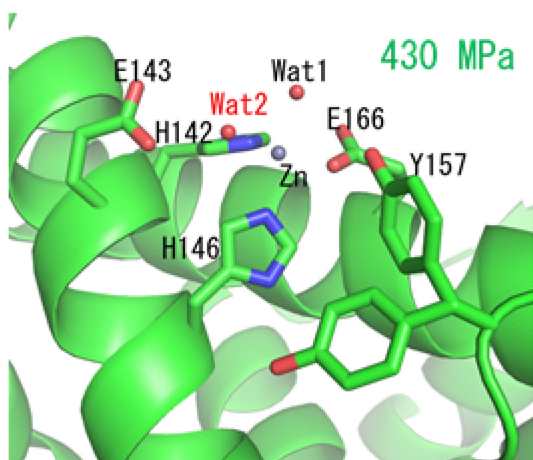


図 4. サーモライシンの水和構造変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 永江峰幸, 森一也, 渡邊信久: サーモライシンの高圧結晶構造解析, 第 6 回あいちシンクロトロン光センター事業成果発表会 (2018. 3. 23) 名古屋国際センター
- ② 森一也, 永江峰幸, 渡邊信久: サーモライシンの高圧結晶構造解析, 2017 年度生物物理中部支部講演会 (2018. 3. 5) 名古屋大学
- ③ 森一也, 永江峰幸, 渡邊信久: サーモライシンの高圧結晶構造解析, 第 7 回名古屋大学シンクロトロン光研究センターシンポジウム (2018. 1. 19) 名古屋大学
- ④ 永江峰幸, 森一也, 渡邊信久: サーモライシンの高圧結晶構造解析, 第 31 回日本放射光学会年会 (2018. 1. 8-10) つくば国際会議場
- ⑤ 森一也, 永江峰幸, 渡邊信久: 加圧によ

- るタンパク質結晶の結晶性向上, 第 58 回高圧討論会 (2017. 11. 8-10) 名古屋大学
- ⑥ 森一也, 永江峰幸, 渡邊信久: タンパク質構造解析における高圧力の利用, 特殊環境微生物セミナー2017 (2017. 10. 6) 広島大学
- ⑦ 永江峰幸, 森一也, 渡邊信久: 加圧による蛋白質結晶の分解能向上, 第 30 回日本放射光学会年会 (2017. 1. 7-9) 神戸芸術センター
- ⑧ 永江峰幸, 森一也, 渡邊信久: 加圧による蛋白質結晶の結晶性向上, 日本結晶学会平成 28 年度年会 (2016. 11. 17-18) 茨城県立県民文化センター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永江 峰幸 (NAGAE, Takayuki)
名古屋大学・シンクロトロン光研究センター・特任助教
研究者番号: 90735771

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者 ()