

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21657027

研究課題名（和文）

高圧下での蛋白質結晶構造解析

研究課題名（英文）

High pressure protein crystal structure analysis

研究代表者

渡邊 信久 (WATANABE NOBUHISA)

名古屋大学・シンクロトン光研究センター・教授

研究者番号：70212321

研究成果の概要（和文）：蛋白質の圧力適応メカニズムを解明するため、ダイヤモンドアンビルセルを用いる高圧結晶構造解析を開発した。深海細菌 *Shewanella benthica* DB21MT-2 の IPMDH と常圧菌 *S. oneidensis* MR-1 の IPMDH の一次構造は 85%類似だが耐圧性には差がある。大気圧から 650MPa の高圧下まで、約 2 Å 分解能で構造解析を実施し、高圧下で分子内に水分子が侵入していく様子を初めて直接捉えることに成功し、耐圧性と構造の関係を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the mechanism of pressure adaptation of proteins, we have developed structural studies of proteins by a high-pressure protein crystallography method using a diamond-anvil cell. IPMDH from the deep-sea bacterium *Shewanella benthica* DB21MT-2 is more tolerant towards HP stress than its counterpart from the land bacterium *S. oneidensis* MR-1, even though these two enzymes share 85% amino-acid identity. Crystal structures of IPMDH have been determined at about 2 Å resolution under pressures ranging from 0.1 to 650 MPa. Penetration of water molecules into IPMDH is observed at high-pressure, and relationship of the structure and pressure resistance has been elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
2010年度	800,000	0	800,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,200,000	210,000	3,410,000

研究分野：蛋白質結晶学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：生物物理, X線, 結晶構造, 圧力, ダイヤモンドアンビルセル, 好圧菌

1. 研究開始当初の背景

蛋白質に圧力をかけると大よそ 300 MPa 以上で可逆的な変性が始まり、さらに圧力を増すと不可逆的な変性が起こる。それに伴い、多くの場合蛋白質の活性は低下し、最終的には失活する。この高圧変性は非常に古くから知られている蛋白質の特徴的な性質の一つであり、加圧による水分子の蛋白質内部への侵入が引き金となっているとされているが、実はその分子メカニズムは完全に解明され

ていない。今井らが、加圧による水分子の蛋白質内部への侵入を計算機シミュレーションしている[1]が、実験的な裏付けは無い。高圧下での蛋白質の挙動を研究する手段として、高圧電気泳動法[2]や高圧可視紫外分光法[3]、さらには高圧 NMR 法[4]が開発されている。これらを用いるとサブユニットの会合状態、体積変化、コンフォメーション変化は解析可能であるが、いずれも蛋白質分子の水和水を直接観察することは不可能である。

一方、X線結晶構造解析は水を含む「構造」を直接見ることが可能な点で他の測定手法と比較して優れている。Fourmeらによってダイヤモンドアンビルセル(DAC)を用いた高压下での蛋白質X線結晶構造解析の可能性が提案されている[5]。日本はDACを利用した超高压物性研究に高い技術レベルを有している。それらの技術を取り入れ、蛋白質結晶構造解析に適した高压システムを開発することを考えた。

2. 研究の目的

本研究は蛋白質結晶用DAC装置を用いた高压下での蛋白質高压構造物性研究を推進することを目標とした。特に他の手法では直接観察することが出来ない高压下での蛋白質の水和構造の解析を実施し、蛋白質高压物性研究を推進することを目指した。これにより、好圧生物の蛋白質構造とその耐圧性の関係の基礎的理解に重要な知見を得られるようになると共に、応用面でも耐圧酵素蛋白質の創成等、新しい技術開発の道を拓くことも将来の目的である。

3. 研究の方法

(1) 高压下蛋白質X線結晶構造解析法の開発

研究期間前半にDACと高輝度短波長放射光を用いた高压蛋白質X線回折実験環境を構築し、後半はその改良を行いつつ、それを用いた高压下結晶構造解析を実施した。具体的には、対称性の低い蛋白質結晶からの回折強度データを収集するため、試料室が大きくかつ開口角の広いDACを試作し、短波長の高輝度X線の使用可能な高エネルギー加速器研究機構PF-ARのビームラインNW12Aに蛋白質結晶の高压X線回折実験の可能な環境を構築した。NW12Aでは、ビームラインの仕様のほぼ上限の波長0.7Åを使用した。

(2) 高压下蛋白質X線結晶構造解析

深海に棲息する生物の蛋白質は、高压環境下でも活性を失うことなく機能しており、耐圧機構を所持していることが知られている。例えばマリアナ海溝で採取された*S. benthica* DB21MT-2由来のIPMDH

(3-isopropylmalate dehydrogenase: 以下SbIPMDH)は、150 MPaの高压下でも常圧下の活性の70%程度の活性を保持している。一方、常圧菌*Shewanella oneidensis* MR-1由来のIPMDH(以下SoIPMDH)は150 MPaでは酵素活性は常圧下の活性の20%程度まで低下してしまう。ところが、SbIPMDHとSoIPMDHのアミノ酸配列相同性は85%と非常に高い。すなわち耐圧性を有するSbIPMDHは、極めてわずかなアミノ酸の変異で耐圧性を獲得しており、両者の高压構造解析の比較は、蛋白質の耐圧機構を研究する上で非常に良いモデルであ

る。このため本研究ではこれらIPMDHをモデル蛋白質として高压下蛋白質X線結晶構造解析を実施した。

IPMDHはMn²⁺あるいはMg²⁺イオンと補酵素NAD⁺の存在下で3-isopropylmalate(IPM)を2-isopropyl-3-oxosuccinateへと還元する酵素である。いくつかの酵素反応中間体のIPMDHの結晶構造も既に報告されており、構造的知見が蓄積されていることは耐圧機構を探る上で有利な点の1つである。そこで本研究では好圧菌由来の酵素の高压環境への適応メカニズムを解明するためにSoIPMDH-IPMおよびSbIPMDH-IPM複合体結晶の常圧低温(100 K)構造と、SoIPMDH-IPM複合体の高压構造を決定し解析した。

4. 研究成果

SoIPMDH, SbIPMDH-IPM複合体は、両者とも生物学的ユニットとして二量体を形成している。サブユニット(単量体)はドメイン1とドメイン2と呼ばれる2つのドメインで構成される。本研究で明らかにした構造は基質IPMとの結合によって活性サイト入り口が閉じた状態にある。SoIPMDH, SbIPMDH二量体は非常に類似した構造であるが、C α 原子間の変位ベクトルを計算するとSbIPMDHの方が活性サイト入り口が開いた構造になっていることが明らかになった。また常圧下ではSbIPMDH二量体の方がSoIPMDH二量体よりも分子内の空隙体積が大きいことも明らかになった。これは高压環境に適応している*S. benthica* DB21MT-2由来のSbIPMDHが常圧環境に置かれることで分子のパッキングが緩むためであると考えられる。SbIPMDHが常圧下で備えている隙間が加圧による天然構造の歪みを緩衝することができるため、高压条件下での活性の低下が緩和されていることが示唆される。

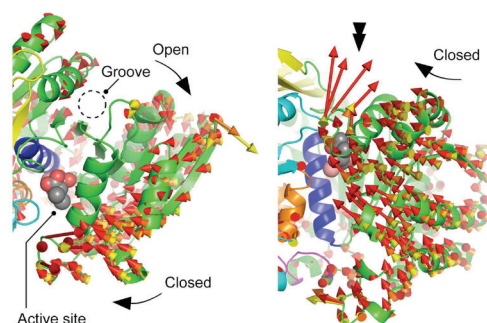


図1. 圧力と分子の構造変化。常圧構造とのC α 原子間の変位ベクトルを矢印で示す。黄色340 MPa, 橙410 MPa, 赤580 MPa)。

SoIPMDH-IPM複合体結晶は、室温常圧(0.1 MPa)および160, 340, 410, 580, 650 MPa下で2 Å程度の分解能で構造決定された。常圧構造と各高压構造のC α 原子間の変位ベク

トルを計算することで、圧力の増加に伴って全体的に活性サイトの裏側の溝が開くように構造が歪んでいくことが明らかになった(図1)。

圧力の増加に伴ってほとんどの分子内空隙は単調に圧縮されるが、二量体界面に存在する疎水性の残基に囲まれた空隙の1つは常圧から160 MPaへの加圧によって一旦圧縮されるが、340 MPa以上の圧力では逆に膨張していくことを発見した(図2)。このサブユニット間の空隙内には、410 MPa以上の圧力下で水分子の電子密度が観測され、さらに圧力の増加に伴って侵入している水分子の占有率が上昇していることが分かった。このことから160 MPa程度の圧力までは全ての分子内空隙が圧縮されることで分子の部分モル体積の減少が引き起こされており、340から410 MPa以上の圧力では、二量体界面にあるサブユニット間空隙に分子外の溶媒領域から空隙内に水分子を収容することで空隙体積を相殺し部分モル体積の減少に寄与していると示唆される。

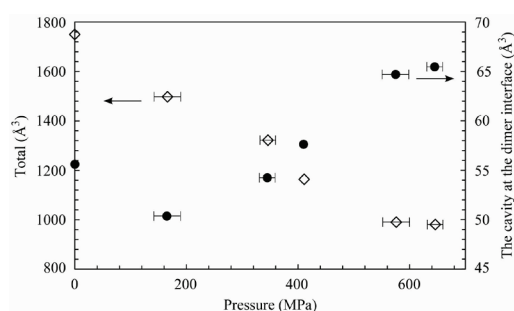


図2. 圧力と分子内空隙の体積変化. ◇全空隙体積の合計, ●サブユニット間空隙.

SoIPMDHはその活性サイトの裏側に溝を持っており、溝の底にPro108とLeu305が局在している。常圧から650 MPaまでの圧力の増加に伴って、Pro108とLeu305の側鎖の間の距離は約1 Å 拡がりさらに深い溝が形成されている。加えて580 MPa以上の圧力下では、この新たな溝の内部に2つの水分子W197とW198が、さらにその近傍にはW199が現れている(図3)。また、SoIPMDHは圧力の増加に伴って全体的に活性サイト裏側の溝が開く方向に構造変化していることから、圧力による新たな溝の形成はPro108とLeu305の周辺のみ局所的な構造変化ではなく、分子全体の構造変化であることが示唆される。これは以前に高圧NMR分光法によって報告されたユビキチンの部分変性状態の構造変化と類似した構造変化であり、従って本研究で決定したSoIPMDHの580 MPa構造は圧力変性の初期状態であることが示唆される。同時に圧力変性状態のSoIPMDH内部(溝の深部)に実際に水分子が侵入している様子も直接観測した。

このように圧力変性状態の蛋白質分子内部に水分子が侵入している様子を原子分解能で実験的に観測したのは、本研究が初めての例である。

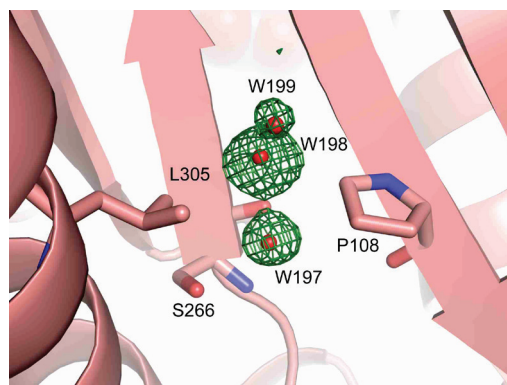


図3. 高圧状態でPro108とLeu305付近に新たに観察された電子密度. 圧力580MPa. 緑のメッシュは3.0σレベル.

一方、Ser266のOγ原子は水分子W197と水素結合を形成しており、W197を溝内部に留める役割をしている。興味深いことに、SoIPMDHでは266番目のアミノ酸残基はSerであるが、SbIPMDHはAlaである。この266番目のアミノ酸残基の違いは、SbIPMDHの深海高圧環境への適応の1つであることが推測される。266番の残基がAlaの場合、W197の位置に水分子が一時的に侵入してもAla側鎖とは水素結合を形成することができないため、侵入した水分子は安定して局在できない。W197の位置に水分子が局在できないために、水素結合ネットワークが減じてW198, W199も安定して局在できなくなると予測される。従ってS266A変異体SoIPMDHは、高圧下で水分子W197, 198, 199に侵入されにくいことが予測される。実際この変異体S266A SoIPMDHは野生型のSoIPMDHよりも耐圧性が上昇することが高圧下の活性測定から分かった。高圧下でSoIPMDHの活性が低下してしまう原因の1つはこのSer266近傍への水分子の侵入とそれに伴う分子全体のコンフォメーション変化が関わっていると考えられる。それに対して絶対好圧菌由来SbIPMDHはSer266をAlaに変えることで水分子の侵入と部分変性を阻止し高圧環境へ適応していることが示唆される。本研究によって、深海微生物由来の酵素の圧力適応の仕組みが初めて原子レベルで詳細に説明された。

参考文献

- [1] Imai, T. *et al.*, *Protein Sci.* **16**, 1927–1933 (2007). [2] Kawano, H. *et al.*, *Extremophiles*, **8**, 367-375 (2004). [3] Kimura, T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 670-671 (2006). [4] Yamada,

H. *et al.*, *Rev. Sci. Inst.* **72**, 1463-1471 (2001).
[5] Girard, E. *et al.*, *Biophysical J.*, **88**, 3562-3571 (2005).

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2件)

- ① Nagae, T., Kawamura, T., Chavas, L.M.G., Niwa, K., Hasegawa, M., Kato, C. and Watanabe, N.: High-pressure-induced water penetration into 3-isopropylmalate dehydrogenase, *Acta Cryst.*, D68(3), 300-309 (2012). 査読有,
DOI:10.1107/S1744309112001443
- ② Nagae, T., Kato, C. and Watanabe, N.: Structural analysis of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the obligate piezophile *Shewanella benthica* DB21MT-2 and the nonpiezophile *Shewanella oneidensis* MR-1, *Acta Cryst.*, F68(3), 265-268 (2012). 査読有,
DOI:10.1107/S0907444912001862

[学会発表] (計8件)

- ① T. Nagae, T. Kawamura, L. Chavas, K. Niwa, M. Hasegawa, C. Kato, N. Watanabe; Structure study of IPMDH from piezosensitive and piezophilic *Shewanella* species, XXII Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2011), 22-30 August, 2011, Madrid, Spain.
- ② 永江峰幸, 河村高志, Leonard Chavas, 丹羽健, 長谷川正, 加藤千明, 渡邊信久: 高压蛋白質結晶構造解析, 第28回PFシンポジウム(2011.7.12-13) つくば国際会議場
- ③ Chavas L.M.G, Nagae T, Watanabe N, Hiraki M, Yamada Y, Igarashi N, Matsugaki N, Wakatsuki S: Photon Factory and High-Pressure Macromolecular Crystallography, 第28回PFシンポジウム(2011.7.12-13) つくば国際会議場
- ④ 永江峰幸, 河村高志, レオナルドシャバス, 丹羽健, 長谷川正, 加藤千明, 渡邊信久: *Shewanella* 属常圧菌と好圧菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の高压蛋白質結晶構造解析, 日本蛋白質科学会年会(2011.6.7-9) ホテル阪急エキスポパーク
- ⑤ Chavas L.M.G, Nagae T, Watanabe N,

Hiraki M, Yamada Y, Igarashi N, Matsugaki N, Wakatsuki S: High-Pressure Macromolecular Crystallography at PF, 日本放射光学学会年会(2011.1.7-10) つくば国際会議場

- ⑥ 永江峰幸, 河村高志, Leonard Chavas, 加藤千明, 渡邊信久: *Shewanella* 属好圧性細菌由来 3-isopropylmalate dehydrogenase の高压結晶構造解析, 結晶学会年会(2010.12.3-5) 大阪大学コンベンションセンター
- ⑦ 永江峰幸, 河村高志, 山根隆, 加藤千明, 渡邊信久: *Shewanella* 属好圧性細菌由来 3-isopropylmalate dehydrogenase の結晶構造解析と圧力耐性の構造基盤, 蛋白質科学会年会(2010.6.16-18) 札幌コンベンションセンター
- ⑧ 永江峰幸, 河村高志, 山根隆, 渡邊信久: *Shewanella* 属好圧性細菌の 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の結晶構造解析, 日本結晶学会年会(2009.12.5-6) 関西学院大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 信久 (WATANABE NOBUHISA)
名古屋大学・工学研究科・教授
研究者番号: 70212321

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし