

報告番号	※ 甲 第 11035 号
------	---------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 高圧X線結晶構造解析法を用いた蛋白質の高エネルギー準安定構造の研究

氏 名 山田 裕之

## 論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質の構造は熱力学的に揺らいでおり、基底状態や準安定状態などの様々な状態間の平衡状態にあると考えられている。近年では、そういった蛋白質分子の揺らぎが機能の発現に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、通常の構造解析法では、存在率が高い低エネルギーの基底状態の構造しか捉えることができない。圧力は体積の共役変数であり、体積はすなわち蛋白質分子の構造である。従って、蛋白質に圧力をかけることで、常圧下では存在率が少なく観測困難な準安定な高エネルギー状態を観測することが可能となる。そういった蛋白質の高圧構造を解析する手法としてこれまでは、蛍光分光法、高圧X線小角散乱法、高圧NMR分光法などが利用されている。蛋白質の揺らぎは蛋白質そのものだけでなく、蛋白質周囲の水分子の水和構造が密接に関与していることから、本研究では水和構造を含めた蛋白質分子の構造を解析するため、唯一水分子の観測が可能な高圧X線結晶構造解析法を用いた。

最初の高圧X線結晶構造解析の研究は、ベリリウムベッセルの高圧セルを用いて行われ報告されている。ベリリウムセルは開口角が広い点で優れているが、使用できる圧力が200 MPa程度までに限られているという制限と、セル内部の試料結晶が見えないという制限がある。一方、1990年代にダイヤモンドアンビルセル(DAC)を高圧発生装置として用いたX線結晶構造解析の研究が模索され、2000年頃からその利用が試みられ初めた。DACによる高圧X線結晶構造解析法には、ダイヤモンドによるX線の吸収を軽減するために短波長X線の使用が必須であること、開口角の制限があることなどの問題点があるが、内部が目視可能なため試料結晶のセンタリングが容易であることや、1 GPaを超える広い圧力領域を利用できる点で優れている。本研究では、DACによる高圧X線結晶構造解析の手法を改良し、ニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)と大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素(ecDHFR)の高圧構造解析を行った。これにより従来手法では観測出来なかった高エネルギー準安定構造を捉えることに成功した。第一章では序章として蛋白質の高圧研究を中心に記述した。

第二章では、蛋白質結晶の高圧X線結晶構造解析を可能とするためのDACの改良、さらにDAC実験用の放射光ビームライン環境の調整について記述した。DACは元々鉱物や機能性低分子の研究のために開発・利用されてきたが、そういった無機化合物や低分子の結晶と比較すると蛋白質結晶は回折強度が弱く、また対称性も低いため、蛋白質結晶のX線回折実験用にDACを最適化

する必要があった。DAC 本体に Merrill-Bassett 型を採用し、試料加圧部に Boehler-Almax 型のダイヤモンドアンビルを使用することで広い開口角を得、キュレット径やガスケット厚の最適化で試料室を広くすることで複数の結晶をサンプリングし、対称性の低い蛋白質結晶でも完全性の高いデータを取れるようにした。また、試料室を広くしたことでより大きな結晶を使用することができるようになり、構造解析に必要な回折強度を得ることが可能となった。

DAC による高圧 X 線結晶構造解析は、ダイヤモンドアンビルによる X 線吸収の問題点を有しているが、これは短波長の X 線を用いることで解決することが可能である。そのため、本研究では 0.7 Å の短波長 X 線を利用することができる放射光施設 Photon Factory のビームライン AR-NW12A で実験を行った。一方、結晶の回折能は波長の三乗に比例して減少するため短波長の利用は不利であるが、AR-NW12A は比較的ビームサイズの大きい X 線を利用することができるため、試料結晶サイズを大きくすることで十分な回折強度を得ることを可能とした。また、AR-NW12A のゴニオメータに DAC をマウントするためのアダプタの作成、ダイヤモンド越しでの結晶センタリングを容易にする同軸カメラの導入及びマウント時の作業空間確保などビームライン周りの整備を行った。これにより加圧から、圧力測定、ビームラインの回折計への DAC の搭載、そして高圧下の回折測定を容易に行える環境を整備した。こうして整備した環境を使用して常圧から 1 GPa 程度までの圧力下で HEWL の高圧実験を行った。また ecDHFR については、基質アナログである葉酸と補酵素である NADP<sup>+</sup>との複合体（ミカエリス複合体アナログ）の結晶を作成し、常圧から 750 MPa までの高圧実験を行った。

第三章では HEWL を用いた高圧実験とその構造解析の結果について詳細に記述した。HEWL 分子と分子内空隙の体積を算出したところ、どちらも加圧にともなって常圧から 710 MPa までは圧縮されたが、710 MPa から 890 MPa の領域では圧縮されず、さらに 950 MPa まで加圧すると空間群  $P4_32_12$  から  $P4_3$  への圧力誘起相転移が観測された。高圧構造を解析した結果、水和構造の変化をとまなう局所的構造変化と分子全体にわたる構造変化が観測された。特に HEWL の触媒残基の一つである Glu35 については、従来の結晶構造解析法では観測されていなかった触媒反応機構に重要なコンフォメーションを観測することに成功した。

Glu35 に隣接する Trp108 上には分子内の疎水性空隙が存在する。高圧構造解析によって、この空隙には、Trp 側鎖の芳香環の  $\pi$  電子雲との相互作用によって水分子が安定に存在出来ることが明らかになった。この水分子と水素結合を形成することで Glu35 側鎖は分子の内側を向いていると考えられる。Glu35 は一般酸触媒として機能するために通常のグルタミン酸残基と比べると異常に高い  $pK_a$  を持つことが知られているが、これまでは隣接する Trp108 の疎水性のみによって説明されてきた。本研究によって、Glu35 側鎖のプロトン化に対する Trp108-水分子-Glu35 の機構が明らかになった。

第四章では ecDHFR を用いた高圧実験とその高圧構造解析の結果について記述した。常圧から 660 MPa の領域では、加圧によって分子体積・空隙体積が収縮すること、さらに 750 MPa 下では分子体積の膨張することが観測された。また、270 MPa から 500 MPa の圧力領域で空間群  $P2_1$  から  $C2$  への圧力誘起相転移が観測された。この相転移には蛋白質分子そのものと周囲の水和構造の変化が伴っている。ecDHFR の基質結合残基の一つである Arg57 は 660 MPa までの圧力では葉酸（基質類似物）と直接相互作用している。しかしながら、750 MPa においては Arg57 と葉酸の結合部位に水分子が侵入し、水分子を介した相互作用へと変化した。同時に基質結合部位に隣接する Leu54 や Met42 などの残基においても構造変化が生じる。それらに先駆けて 500 MPa では葉酸と Leu28 の間に水分子が侵入していた。このような葉酸が弱く結合している構造は、結晶構造解析を行った複合体がミカエリス複合体であることから、基質が ecDHFR に認識されて結合が確立する直前の構造を捕らえたものであると考えられる。このような過渡的な構造は従来の構造解析法では捕らえることができず、本研究の高圧構造解析によって初めて観測されたものである。補酵素である NADP<sup>+</sup>についても、基質と相互作用するニコチンアミド環がコンフォメーション変化を起こし、活性サイトの溝から外に出ている構造を 500 MPa 以上の高圧構造において捕捉することに成功した。元々ニコチンアミド環が存在した場所には水分子が局在して葉酸と相互作用を形成する。この構造は NADP<sup>+</sup>と ecDHFR の結合初期の構造を捉えていることが推測され

る。一方でこれまでの緩和分散 NMR 実験の報告で NADP<sup>+</sup>のニコチンアミド環が活性サイトから出た構造が常圧下でも高エネルギー状態として僅かに存在することが示されていることから、ヒドリド移動を終え NADP<sup>+</sup>が ecDHFR から解離する段階の構造を捕捉している可能性もある。どちらの構造かを断定することはできないが、NADP<sup>+</sup>が ecDHFR に対して結合した直後もしくは ecDHFR から解離する直前に弱く結合している構造を圧力によって捕捉していると考えられる。

第五章では第二章から第四章までの内容を要約し本研究の成果をまとめた。本研究では DAC による高圧結晶構造解析の手法の改良を行い、HEWL と ecDHFR の高圧構造を決定し、従来の手法では観測されていなかった高エネルギー準安定構造を観測することに成功した。今後、その他の蛋白質にも高圧構造解析を適用し、高エネルギー構造を解析することで蛋白質機能発現に関する理解が深まっていくと期待される。