

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

Structural study of high-energy metastable conformational
substates of proteins using high-pressure X-ray
crystallography

山田裕之

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はなく、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 は元々鉱物や機能的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⁺ 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 π 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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ると期待される。

目次

第一章 序論	7
1.1 蛋白質の圧力効果.....	8
1.2 蛋白質の高圧構造の解析.....	8
1.3 ニワトリ卵白リゾチーム.....	9
1.4 ジヒドロ葉酸還元酵素.....	10
第二章 高圧 X 線結晶構造解析法.....	11
2.1 高圧装置の改良	12
2.2 試料用ゴニオメーター及び周辺の整備.....	12
2.3 高圧結晶構造解析.....	13
第三章 ニワトリ卵白リゾチームの高圧 X 線結晶構造解析.....	19
3.1 結晶化, 高圧 X 線回折実験, 構造決定.....	20
3.1.1 結晶化	20
3.1.2 高圧 X 線回折実験.....	20
3.1.3 位相決定, 構造精密化, 構造解析.....	21
3.2 結果.....	22
3.2.1 圧力による結晶格子と分子の圧縮.....	22
3.2.2 圧力によって誘起された分子の構造変化.....	22
3.2.3 温度因子の減少.....	23
3.2.4 水和構造の変化.....	23
3.3 考察.....	24
3.3.1 圧力によって誘起された相転移.....	24
3.3.2 HEWL の体積と構造の変化.....	24
3.3.3 HEWL 表面の水和構造の変化.....	26
3.3.4 活性残基 Glu35 の構造変化.....	26
第四章 大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の高圧 X 線結晶構造解析.....	46
4.1 発現・精製, 結晶化, X 線回折実験, 構造決定.....	47
4.1.1 ecDHFR の発現・精製	47
4.1.2 ecDHFR の結晶化	47
4.1.3 X 線回折実験.....	48
4.1.4 位相決定, 構造精密化, 構造解析.....	48
4.2 結果.....	49
4.2.1 結晶格子と分子の圧縮.....	49
4.2.2 分子内空隙の体積変化.....	49
4.2.3 圧力によって誘起された分子構造の変化.....	49

4.2.4 水和構造の変化.....	50
4.3 考察.....	51
4.3.1 圧力によって誘起された分子の構造変化.....	51
4.3.2 活性サイトの水和構造変化.....	51
第五章 結論	67
参考文献.....	71

第一章

序論

1.1 蛋白質の圧力効果

蛋白質に圧力をかけると、多量体の解離や凝集、蛋白質分子内部への水分子の侵入など、体積変化に依存した構造変化が起こり、多くの場合活性が低下する。蛋白質の濃度や種類にもよるが、おおよそ数百 MPa で不可逆的な変性が起きる。蛋白質の圧力効果は 1914 年に加圧による卵白の凝集 (Bridgman, 1914) が報告されて以来 100 年にわたって研究が進められており、加圧による水分子の蛋白質分子内部への侵入が引き金となっているとされているが、その分子メカニズムは完全には解明されてはいない。この圧力効果は、外的要因による影響を最小化するように平衡が移動するルシャトリエの原理に支配されており、蛋白質は高圧下では部分モル体積がより小さい状態で存在する。部分モル体積 V_m は、蛋白質分子を構成する原子のファンデルワールス体積 V_w 、蛋白質内部の空隙体積 V_c 、および水和による体積変化 ΔV_h の 3 つの項の和として

$$V_m = V_w + V_c + \Delta V_h$$

のように表される。

一方、蛋白質は熱力学的ゆらぎを持ち、基底状態や準安定状態などのさまざまな構造変化をしていると考えられているが、一般的な X 線結晶構造解析や NMR、電子顕微鏡により得られた構造の多くは基底状態に限られている。上記のように、圧力は部分モル体積差を利用して平衡を移動させることで部分モル体積の小さな準安定状態を安定化させることができ、常圧下では存在率が少なく観測することが難しい準安定構造を観測することができる。このため、圧力は蛋白質の構造研究に新たな知見を与える要素として注目されている。本研究ではこれを利用して、蛋白質の機能に迫ることを試みた。

1.2 蛋白質の高圧構造の解析

蛋白質の高圧下の構造研究は高圧 NMR や高圧可視紫外分光法などの手法で行われている (Yamada *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2006)。2005 年に可変圧力 NMR 法によるユビキチンの高圧構造が決定され、ユビキチン分子が 300 MPa の高圧下で閉構造から開構造へと構造を変化させることが報告された (Kitahara *et al.*, 2005)。このユビキチンの閉構造と開構造それぞれの部分モル体積は、3D-RISM 理論に基づいた計算機シミュレーションによって計算され、圧力によって誘起された構造変化を通じて部分モル体積が減少していること、また高圧下でユビキチン分子中央の疎水性チャネルに水分子が侵入していることが報告された (Imai *et al.*, 2007)。高圧シミュレーションと高圧結晶構造解析を組み合わせることで T4 リゾチームの L99A 変異体の大きな疎水性空隙への水分子の侵入も報告されている (Collins *et al.*, 2005)。このような蛋白質分子内の空隙への水分子の侵入は、空隙体積の相殺と水和体積の減少によって部分モル体積を減少させている。

NMR は蛋白質の高圧構造を決定する上で非常に有力な手段であるが、圧力効果の鍵とされている水分子を直接観測することが原理的に不可能である。水分子を含む構造を直接観測する方法としては高圧 X 線結晶構造解析法が唯一である。高圧 X 線結晶構造解析には多

様な圧力セルが利用でき、各圧力セルはそれぞれの利用法に最適化されている。早期の高圧結晶構造解析では Kundrot らの筒状セルが使用されていた (Kundrot & Richards, 1986)。このセルはベリリウム製であり、回折角の広いデータの収集が可能であったが、使用できる圧力は 200 MPa 程度に限られている。また、ベリリウムセル内部のサンプルを可視化することが困難であることもこの手法の不利な点である。蛋白質の高圧 X 線結晶構造解析としては、1987 年にベリリウムセルを用いたニワトリ卵白リゾチームの 100 MPa 構造が報告されたものが最初の例である (Kundrot & Richards, 1987)。一方、ダイヤモンドアンビルセル (DAC) は X 線実験に向けて Merrill らが開発し (Merrill & Bassett, 1974)、1996 年には Katrusiak らによってリゾチーム結晶の圧縮実験に使用された (Katrusiak & Dauter, 1996)。DAC を用いた蛋白質の高圧構造解析法は主として Fourme らによって開発されており (Fourme *et al.*, 2001)、高圧構造解析結果についても報告をしている。ニワトリ卵白リゾチームについては、2001 年に 820 MPa における構造研究が報告されている (Fourme *et al.*, 2001)。その他の蛋白質の解析例としては、2005 年にはササゲモザイクウイルスの 330 MPa における構造、2010 年には銅・亜鉛スーパーオキシドジスムターゼの 570 MPa 構造が報告されている (Girard *et al.*, 2005, Ascone *et al.*, 2010a)。また、我々の研究グループでは 2012 年に 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の高圧構造を報告している (Nagae *et al.*, 2012)。銅・亜鉛スーパーオキシドジスムターゼと 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素については、蛋白質の機能や活性に関係する構造に対して圧力が及ぼす影響を直接観測することに成功している。DAC を使用することのできる光源の制限や手法としての難しさから高圧結晶構造解析は世界的にも極めて限られたグループが行っているのみである。

本研究では高圧結晶構造解析法を用いて、蛋白質の機能を研究する手法を確立し、その応用の道を拓くために、標準蛋白質として多方面からの先行研究が蓄積されているニワトリ卵白リゾチームと、酵素反応について詳細な先行研究があるジヒドロ葉酸還元酵素について、高圧 X 線結晶構造解析を行った。

1.3 ニワトリ卵白リゾチーム

リゾチームは動物や植物などに広範囲に存在し、細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解することで細菌を溶菌する生体防御物質である。ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) は鶏卵卵白から抽出される 129 のアミノ酸残基からなる比較的小さな蛋白質で、結晶構造が決定された最初の酵素であり (Blake *et al.*, 1965)、構造解析や計算機シミュレーションの発展において標準蛋白質として最も研究されている酵素の一つである。HEWL の活性残基は Glu35 と Asp52 であり、その反応機構についても議論が重ねられて来た。比較的最近になって、Asp52 によるグリコシルー酵素共有結合中間体の形成を経て加水分解反応が進むことが明らかにされている (Vocadlo *et al.*, 2001)。一方、Glu35 は一般酸触媒として働き、そのカルボニル基が非常に高い pK_a を持ちプロトン化されていることが触媒反応において重要であることが知られている (Phillips, 1967)。通常のグルタミン酸の pK_a が 4.1 であるのに対し、

実験的に確認された Glu35 の pK_a は 6.0~6.8 であった (Kuramitsu & Hamaguchi, 1980; Webb, *et al.*, 2011). 変異実験の結果, この異常に高い pK_a は Glu35 の近傍にある Trp108 の疎水性によってもたらされていると考えられている (Inoue, *et al.*, 1992). リゾチームは計算機シミュレーションの分野でも標準蛋白質として多くの研究がなされており (Wallace, *et al.*, 2011; Goh, *et al.*, 2014), 水素原子位置の観測が可能な中性子を用いた結晶構造研究も行われているが (Niimura, *et al.*, 1997; Bon, *et al.*, 1999), これまでに解析されている構造では Trp108 と Glu35 の側鎖は直接相互作用しておらず, Glu35 の高い pK_a 値に対する Trp108 の分子構造上の関係は明らかになっていない.

1.4 ジヒドロ葉酸還元酵素

ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) はプリン類やチミジル酸, 一部のアミノ酸の合成に必須の酵素である. DHFR は NADPH を電子供与体として 7,8-ジヒドロ葉酸を 5,6,7,8-テトラヒドロ葉酸へと還元する反応を触媒し, 非常に多様な生物種において葉酸の管理に重要な役割を果たしている. 大腸菌 *Escherichia coli* 由来 DHFR (ecDHFR) の反応経路は既に報告されており (Fierke *et al.*, 1987), その反応メカニズムに関しては様々な補酵素及び基質アナログと ecDHFR の複合体の結晶構造解析を用いた詳細な研究がなされている (Sawaya & Kraut, 1997). DHFR の構造のダイナミクスは核磁気共鳴法 (NMR) によっても研究されている (Falzone *et al.*, 1994; Schnell *et al.*, 2004; Boehr *et al.*, 2006). これら先行する構造学的研究及び反応速度論研究から, M20 ループ, F-G ループ, G-H ループと呼ばれる 3 つの柔軟なループが基質と補酵素の結合において重要な役割を担っていることが示唆されている (Sawaya & Kraut 1997; Miller *et al.*, 2001). M20 ループの構造は F-G ループ及び G-H ループとの水素結合ネットワークによって安定化されている. これらのループの協動的な動きは酵素の触媒に必須であり, その動きを損なうようなアミノ酸変異は DHFR の活性を損なうことが様々な手法で研究されている (Agarwal *et al.*, 2002; Venkitakrishnan *et al.*, 2004). また, DHFR は多様な生物が広く持っていることから, 高塩濃度環境や高温環境, 高圧力環境などの極限環境への生物の適応メカニズムを明らかにするための研究もなされている (Wright *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Binbuga *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2010). 本研究では高圧結晶構造解析を用いて, ecDHFR の反応メカニズムの詳細に迫ることを試みた.

第二章

高压 X 線結晶構造解析法

2.1 高圧装置の改良

本研究では高圧装置としてダイヤモンドアンビルセル (DAC) を使用した。Fig. 2.1 に DAC の模式図を示す。DAC は 2 つのダイヤモンドを向かい合わせ、その間に穴の開いたガスケット (金属板) を挟んで試料室を作り、ダイヤモンドを押しこむことによって試料室に高圧力を印加する装置である。

DAC はこれまで鉱物や無機化合物などの無機材料に対して多く使用されており、蛋白質測定用に改良する必要があった。DAC を蛋白質の高圧構造解析に応用する問題点の 1 つとして、蛋白質結晶が無機材料と比較して回折強度が低く、回折実験には大きな結晶を用いる必要があるため、試料室を大きくしなければならない。また、蛋白質結晶は対称性が低いため、DAC の限られた開口角では十分な回折データが得られない。さらに、無機材料で使用される数百 GPa と比較して、蛋白質の高圧結晶構造解析に用いる圧力領域は 1 GPa 程度と低く、圧力を安定させることが難しいなどの問題があった。

Fig. 2.2 に初期に導入した DAC の写真を掲載した。この DAC に使用したアンビルは Boehler-Almax タイプ (Boehler, 2006) で開口角が広く、およそ 70° 以上の回転角でデータ収集が可能である (Fig. 2.2(b))。これにより完全性の高いデータを収集することが可能であり、特に対称性の低い結晶において有利である。ダイヤモンドのキュレット径は 1 mm で、厚さ 300 μm 口径 600~700 μm の焼き入ステンレス鋼製ガスケットを挟むことで試料室を広く取り、低圧力領域での圧力の安定も実現している。

Fig. 2.2 のタイプの DAC は、試料室周りが狭くサンプリングが難しく、また後述する NW12A のゴニオメーターの ω 軸が機械ベアリングからエアベアリングに改良されたことにもない軽量化が必要などの問題があった。この問題を解決するために Merrill-Bassett 型の DAC (Merrill & Bassett, 1974) を元に改良したものが Fig. 2.3 の DAC である。この DAC はサンプリング時の操作を容易にするために試料室周りに広く空間を確保している。ゴニオメーターヘッドに搭載するためのアダプターを含めた重量は 250 g から 90 g と大幅に軽量化し、また同時に小型化によって、ビームラインの他のコンポーネントと干渉することなく容易に回折実験を行うことが可能になった。

2.2 試料用ゴニオメーター及び周辺の整備

ダイヤモンドアンビルセルを用いた回折実験ではダイヤモンドによって X 線が吸収されてしまうという問題が存在するが、短波長の X 線を用いることで吸収を低減することができる。本研究では高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory のビームライン AR-NW12A の放射光を使用している。AR-NW12A は元々、高輝度 X 線と高速データ処理システムを備えたハイスループット結晶構造解析のために設計された多用途実験ステーションであり、多様なオプションを利用できる (Chavas *et al.*, 2012)。我々は高圧結晶構造解析のサンプル環境をこの AR-NW12A に構築した (Chavas *et al.*, 2013a)。

AR-NW12A は通常の回折実験のために単軸の水平ゴニオメーターを備えており、様々なサンプルホルダーに対応できるようにゴニオメーターヘッドを交換することが可能であり、専用のマウント治具 (Fig. 2.3(d)) を接続することで DAC をマウントすることができる。このマウント治具を使用することで、回折計のサンプルマウント軸 (ω 軸) 上で DAC を 120° ずつ回転して使用でき、対称性の低い蛋白質結晶の方位を変えてデータの完全性を上げることができる。

DAC を使用する場合、ダイヤモンドの屈折率のため、通常は空気中に置かれている試料結晶を観察しているカメラの焦点位置がずれてしまう。同軸カメラ (シグマ光機株式会社) を導入することで試料室を X 線ビームと同じ方向から見ることを可能とした。実際に X 線が入射する位置を視覚的に確認できるため、サンプル操作が容易になった。本カメラの焦点は 45° 傾斜ミラーからおよそ 160 mm の位置にあり、Fig. 2.4 に示されているクライオノズル (CN) を退避させ、通常測定時にミラーと試料位置の間に挿入する迷光防止用のガードスリット (GS) とビームストップ (BS) を使用しないことで、DAC 周りに広い作業スペースを確保している (Fig. 2.4)。7 倍の光学倍率と CCD カメラの高い解像度によって試料室をはっきりと見ることができる。バックライトの明るさと位置をビームラインコントロールソフトウェアで調整することで、DAC 中の結晶にコントラストを付け、結晶の観察が容易に行えるように工夫をしている。DAC をビームラインに搭載した様子を Fig. 2.5 に示した。

なお、NW12A での実験環境の構築に際しては、SPring-8 BL41XU での実験で明らかになった問題点に配慮した。

2.3 高圧結晶構造解析

高圧結晶構造解析実験では、圧力は試料室の体積変化に由来するため、圧力の測定は間接的に行わなければならない。高圧研究において、研究試料にかかる圧力の正確な測定法は実験手法ごとに異なる。本研究では圧力の決定にはルビーの蛍光スペクトルの圧力依存性 (Forman *et al.*, 1972) を利用した。AR-NW12A での測定の際に、DAC の試料室にサンプリングしたルビー結晶のスペクトルを AR-NE1 に設置されているヘリウム-ネオンレーザー (昭和光学株式会社) 励起の蛍光測定装置を用いてオフラインで測定した。

高圧結晶構造解析実験において、高品質の回折データを得るためには最適な X 線の波長を選択する必要がある。エネルギーの選択は、分解能や S/N 比、セルによる X 線吸収に直接的に影響を及ぼし、検出器の特性に依存する。回折 X 線のダイヤモンドによる吸収を軽減する必要から、過去の研究では、 $0.25 \sim 0.05 \text{ \AA}$ の超短波長が高圧結晶構造解析には適していると報告されている (Fourme *et al.*, 2001)。X 線の回折能は波長の三乗に比例するため、短波長を用いると急激に回折能が低下する。そのため Fourme らは、集光した高輝度の X 線ビームを使用しているが、その条件では放射線により結晶がダメージを受けることが報告されている (Fourme *et al.*, 2001)。AR-NW12A で利用できる最も短い X 線の波長が 0.70 \AA 程

度である (Chavas *et al.*, 2013b) ことも考慮し, 本研究では 0.70 \AA 付近の波長を使用し, かつ大きいビームサイズすなわち大きい結晶を用いることで高い回折能を得ることとした. これは室温において構造解析に用いることができるデータを収集する上で優れている. そこで我々は $0.70 \sim 0.75 \text{ \AA}$ の波長を用いて高圧結晶構造解析を行った. 高圧結晶構造解析の回折パターンの例を Fig. 2.6 に示した.

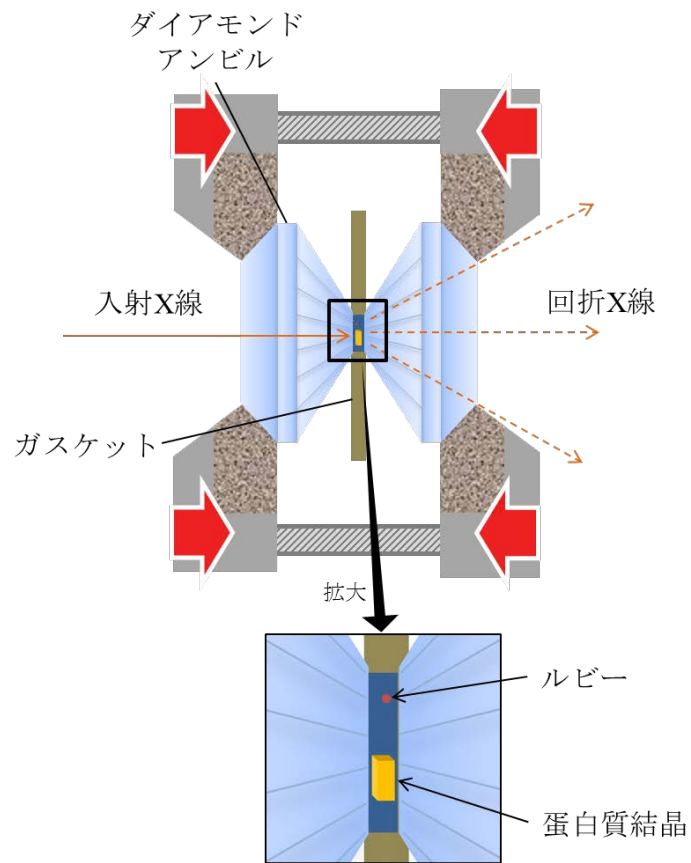


Figure 2.1 ダイヤモンドアンビルセルとその中心部の模式図. 穴の空いたガスケットと2つのダイヤモンドアンビルで試料室を作り, ダイヤモンドを押しこむことで試料室に圧力を印加する. X線をダイヤモンド越しに入射し, 同じくダイヤモンド越しに回折X線を検出する.

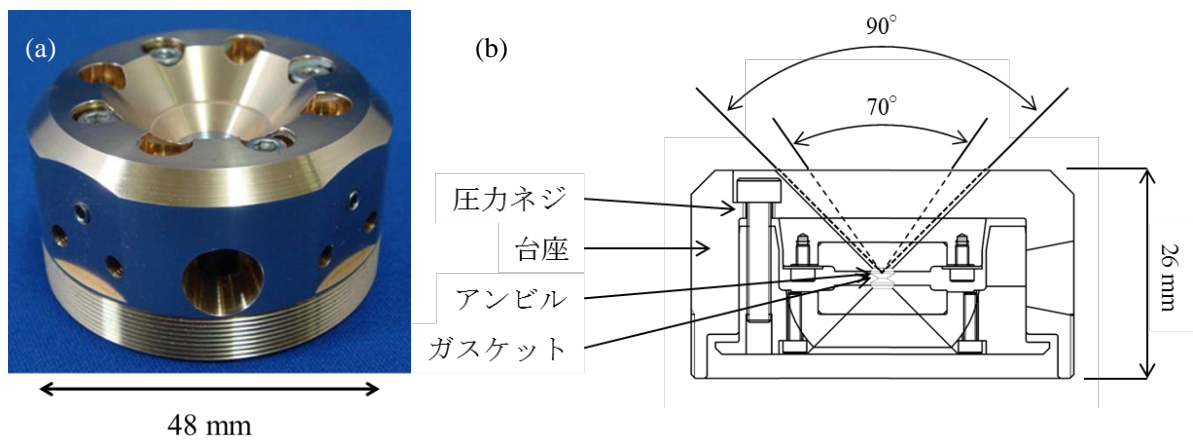


Figure 2.2 初期型 DAC. (a) 写真, (b) 側面方向の線図.

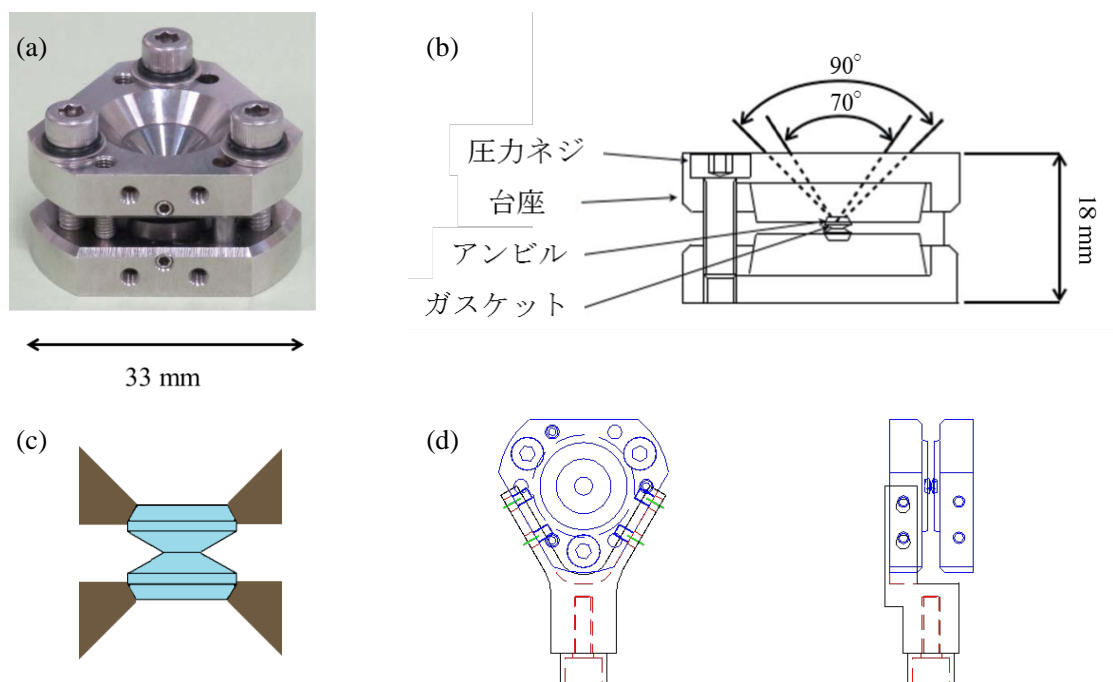


Figure 2.3 Merrill-Bassett 型 DAC を元に改良した改良型 DAC.

(a) 写真, (b) 側面方向の線図, (c) Boehler Almax 型のアンビル, (d) マウント治具.

初期型の DAC と比較して大幅に軽量化した. Boehler Almax 型のアンビルは台座の中に埋め込まれており, 広い開口角を実現できる. また, マウント治具 (d) の工夫により DAC を 120° ずつ回転 (初期型は 90°) して測定できるようにした. 結晶の方位を変えてデータの完全性を上げることができる.

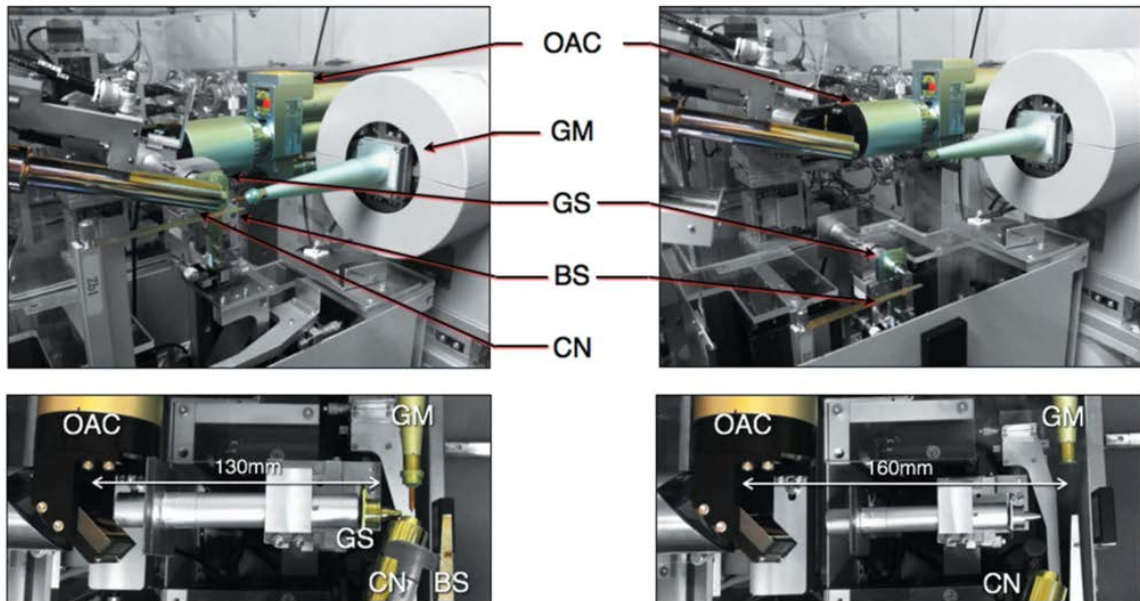


Figure 2.4 PFAR-NW12A の写真. (左) クライオ実験時. (右) 高圧結晶構造解析実験時. 同軸カメラの採用により, DAC 試料室中の結晶を直接観察できるようになった. (OAC, 同軸カメラ; GM, ゴニオメーター; GS, ガードスリット; BS, ビームストップ; CN, クライオノズル)

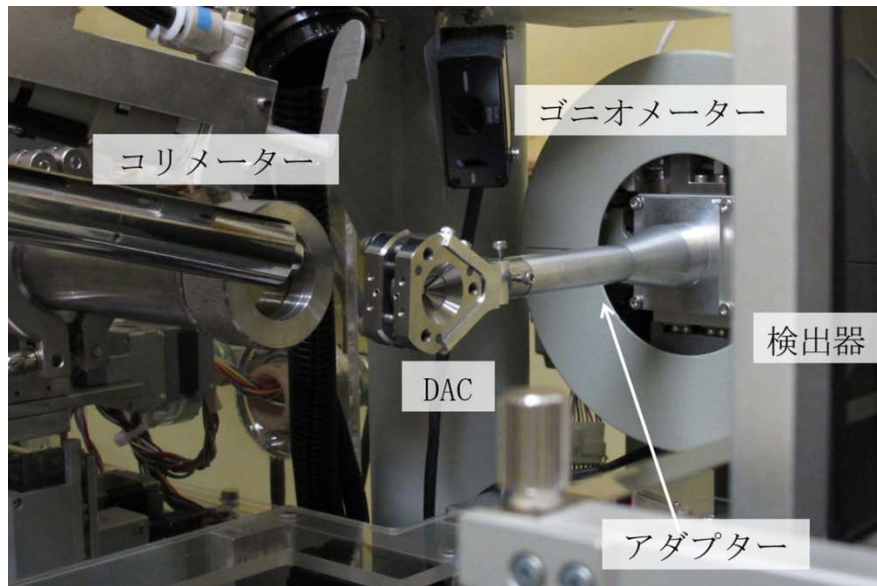


Figure 2.5 PFAR-NW12A の回折計に DAC を搭載した様子. X 線は図の左方向から入射され, 回折パターンは右の検出器で計測される.

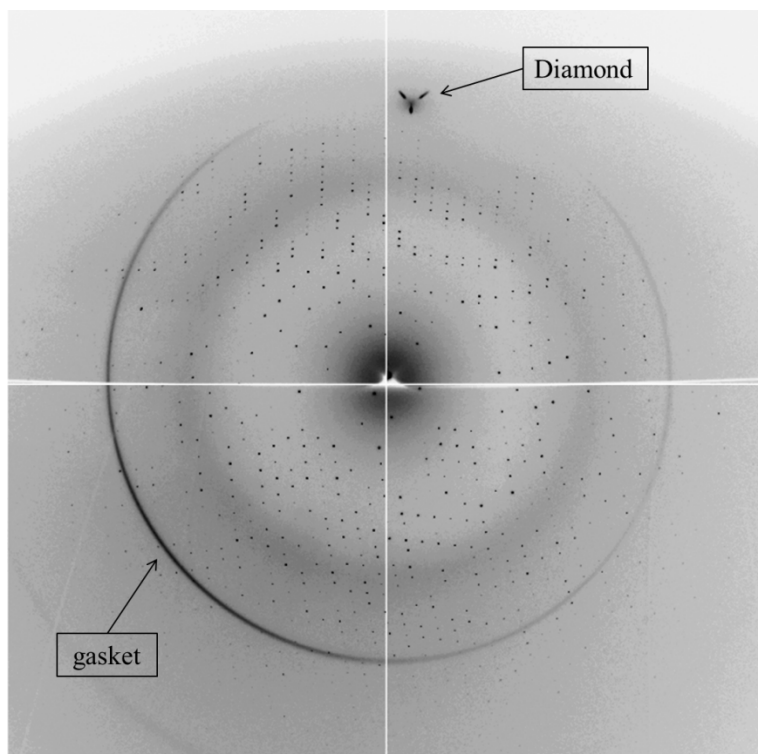


Figure 2.6 高圧 X 線回折実験で得られた回折パターンの例. サンプル-カメラ間の距離は 200 mm で、このときの分解能の限界は検出器の端で 1.2 \AA である. ダイヤモンドの回折とガスケットの散乱が 2 \AA 程度の位置に観測されるが、蛋白質試料結晶の回折とは容易に区別できる.

第三章

ニワトリ卵白リゾチームの高圧 X 線結晶構造解析

3.1 結晶化, 高圧 X 線回折実験, 構造決定

3.1.1 結晶化

DACを用いた高圧下の回折実験では, DACの開口角によって総振動角が制限されるため, 高い対称性を持つ正方晶系 (空間群 $P4_32_12$) の HEWL 結晶を使用した. HEWL (和光純薬工業株式会社) の正方晶系単結晶はバッチ法を用い, 40 mg/ml の蛋白質, 50 mM 酢酸バッファ (pH 4.5), 0.8 M 塩化ナトリウムを含む結晶化溶液を 20°C で静置することで得た. 活性残基 Glu35 の動きにおける基質結合の効果を議論するために, HEWL と tetra-N-acetylchitotetraose (GlcNAc)₄ (Dextra Laboratories) 複合体についても 25 mg/ml の蛋白質に基質を 1:1.2 の比で添加し, 遊離型酵素と同じバッファ条件で結晶化を行った. 単結晶は 2-3 日後に 0.2~0.3 mm 程度に成長したものを使用した.

3.1.2 高圧 X 線回折実験

HEWL 正方晶は高圧下において溶解度が上昇することが報告されている (Suzuki *et al.*, 2002). 結晶の崩壊を避けるため, 高圧実験を行う前に結晶化溶液の塩濃度を 0.8 M から 1.5 M まで上昇させた. 試料結晶のマウントは下記のようにして行う. まず, DAC の下側の台座にガasketを固定し, ガasketの穴を試料室として結晶化溶液を流し込み, 結晶化バッチから結晶をループで掬って試料室に移す. その後, 上側の台座をかぶせて密閉し, ゆっくり押しこむことで試料室を加圧した. 第二章に記述したように, DAC の開口角が限られているため, より完全性の高いデータを収集するために複数の結晶を異なる向きで固定した (Fig. 3.1). 回折実験では DAC を回転させながら回折データを測定するため, 試料室内で結晶が動かないようにタバコフィルタのループを一緒に封入した (Nagae *et al.*, 2012). このループはタバコフィルタを解して取り出した 1 本の繊維をゆるく結んで作成したもので, 適度な弾力性を持っており, 結晶を傷つけることなく固定することが可能である.

試料室内には結晶とともに直径 20 μm 程度のルビーボールを封入し, ルビー蛍光法を用いて試料室内の圧力を測定した. 圧力の測定は回折実験の前と後に行い, 圧力が保たれていることを確認した. Fig. 3.2 に 710 MPa の回折実験前に測定したルビー蛍光スペクトルを示した. 竹村らの方法 (竹村, 2005) に従い, ルビースペクトルの 2 つのピークのうち R_1 のピークトップのみをガウス関数でフィットした. 本研究ではピークトップの前後 10 点をフィット領域とした.

遊離型 HEWL の高圧 X 線回折実験は 190, 280, 380, 500, 600, 710, 800, 890, 950 MPa の圧力下で, (GlcNAc)₄ 複合体は 920 MPa の圧力下で, 波長 0.71~0.75 Å の X 線を用い, 室温で行った.

また, 高圧下の結晶構造と比較するための常圧下の結晶構造解析を行った. 結晶は高圧実験と同じように結晶化溶液の塩濃度を 1.5 M まで上昇させたものを使用した. 外径 0.7 mm, 肉厚 0.01 mm のガラスキャピラリに結晶を少量の母液とともに封入した. 回折実験は常温で, リガク FR-E SuperBright (Cu ターゲット) とリガク R-AXIS VII を使用して行った. 完全

性の高い回折データを得るために3つの結晶を使用し、放射線損傷が少ない回折データをマージして構造解析に使用した。データ収集の統計値を Table 3.1 に示す。

3.1.3 位相決定, 構造精密化, 構造解析

回折データの処理とスケーリングは HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997) を使用した。結晶のモザイシティの上昇を放射線損傷の確認に用いた。常圧におけるデータは FR-E の X 線ビームの角度発散のため、見かけのモザイシティが放射光を用いて測定したものより大きくなっている。890 MPa 以下の圧力では X 線照射前のモザイシティはおおよそ 0.05° であった。950 MPa では結晶-結晶間相転移が起こったためにモザイシティはおおよそ 0.6° であった。各圧力においてモザイシティが上昇し始める前の損傷の少ないフレームのみをマージして構造解析に使用した。

HEWL の常圧における初期構造は、CCP4 suite (Winn *et al.*, 2011) の MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) を使用し、PDB に登録された HEWL の構造 (PDB ID: 2LYZ) をサーチモデルとして分子置換法で決定した。(GlcNAc)₄ 複合体は PDB ID: 1LZC の構造を使用した。その後、REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011) と Coot (Emsley & Cowtan, 2004) を用いて構造の精密化を行った。高压条件下の HEWL 構造は、常圧構造を初期構造として REFMAC5 と Coot による精密化によって決定した。相転移後の 950 MPa では空間群が変化し、メロヘドラル双晶になっていた。そのため、構造決定と精密化は、CCP4 の DETWIN で処理したデータセットに対して行った。このときの双晶率は 0.36 と評価された。水分子は ARP/wARP Solvent (Lamzin & Wilson, 1993) で電子密度に自動アサインし、それらのうち B-factor が 60 \AA^2 を超えるもの、マップの σ 値が $1.00 \text{ electrons/\AA}^3$ を下回るもの、近接原子との最短距離が 2.30 \AA 未満または最長距離が 3.5 \AA より大きいものは削除した。各圧力における HEWL 結晶構造の精密化における統計値を Table 3.2 に示す。常圧, 190, 280, 380, 500, 600, 710, 800, 890, 950 MPa における原子座標と構造因子はそれぞれ PDB ID: 4WLD, 4WLT, 4WLY, 4WLM1, 4WLM2, 4WLM3, 4WLM4, 4WLM5, 4WLM6 として Protein Data Bank に登録した。同様に (GlcNAc)₄ 複合体も PDB ID: 4XEN で登録した。

HEWL の溶媒排除体積はプログラム VOIDOO (Kleywegt & Jones, 1994) を用いてプローブ半径 1.4 \AA で決定した。分子内部の空隙の体積はプログラム CASTp (Dundas *et al.*, 2006) を使用してプローブ半径 0.9 \AA で計算した。結晶構造の模式図は描画ソフトウェア PyMOL (DeLano, 2002) を用いて作成した。Fig. 3.5, 3.7 の変位ベクトルは PyMOLWiki (<http://www.pymolwiki.org>) の modevector.py スクリプトを使用した。Fig. 3.14, 3.15 の内部空隙は HOLLOW (Ho & Gruswitz, 2008) を用いて描画した。二次構造情報は UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/P00698>) に従った。

3.2 結果

3.2.1 圧力による結晶格子と分子の圧縮

Fig. 3.3 に各圧力における格子定数及び分子体積を、常圧を基準とした相対値としてプロットしたグラフを示す。格子体積は常圧では $2.38 \times 10^6 \text{ \AA}^3$ であり、890 MPa では $2.19 \times 10^6 \text{ \AA}^3$ まで圧縮される。格子の圧縮率は $9.4 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$ で、過去に報告された結果とほぼ一致する ($9.8 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$; Fourme *et al.*, 2001 または $9.4 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$; Ascone *et al.*, 2010b)。単位格子 a 軸は c 軸に比べて遥かに縮みやすく、 a 軸の圧縮率は $4.6 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$ だったのに対し、 c 軸はほぼ一定であった。これも過去に報告された結果と一致している (Fourme *et al.*, 2001)。

HEWL の分子体積と空隙体積は常圧においてそれぞれ $2.49 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ と $7.48 \times 10^3 \text{ \AA}^3$ であり、890 MPa ではそれぞれ $2.40 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ と $3.67 \times 10^3 \text{ \AA}^3$ まで圧縮された (Fig. 3.4)。分子体積と空隙体積は 710 MPa までほぼ線形的に圧縮された。分子体積の圧縮率も $4.8 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$ で過去に報告されたものとほぼ等しい ($4.7 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$; Kundrot & Richards, 1987)。また、空隙体積の圧縮率は $0.80 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$ であった。しかしながら、分子体積と空隙体積は 710 から 890 MPa までの相転移の前段階では圧縮が進まず、ほぼ一定になった。

3.2.2 圧力によって誘起された分子の構造変化

常圧構造と比較した 890 MPa と 950 MPa における分子の構造変化を Fig. 3.4 に示した。それぞれの構造の重ね合わせと RMSD の計算は CCP4 のプログラム SUPERPOSE (Krissinel & Henrick, 2004) を使用し、HEWL の全て (残基番号 1-129) の $C\alpha$ 原子を基準として行った。高压条件下では HEWL の構造は常圧 (0.1 MPa) 構造から歪んでいた。890 MPa において、 β スtrandドメイン (残基番号 42-82) と α ヘリックスドメイン (残基番号 1-41 及び 83-129) は互いに活性サイトを閉じるように移動していた (Fig. 3.5)。

この圧力領域を超えると結晶-結晶間相転移が観測された (Fig. 3.6)。950 MPa では結晶の対称性は低下し、空間群は $P4_32_12$ から $P4_3$ へと変化した。新たな $P4_3$ 結晶格子の a 軸は元の $P4_32_12$ 結晶格子の a 軸と b 軸 の対角線に相当する。 $P4_3$ 結晶の非対称単位には 4 分子 (A 分子, B 分子, C 分子, D 分子) が含まれているが、これらの 4 分子は非対称単位に 1 分子が含まれる $P4_32_12$ 結晶では結晶学的に等価であった。0.1 MPa と 950 MPa において対応する 4 分子の構造における全体の動きを Fig. 3.7 に示した。同時に、元の $P4_32_12$ 格子として換算した場合、相転移後の単位格子の体積は急激に減少しており、特に c 軸の縮みが大きかった。0.1 MPa と 890 MPa における $C\alpha$ 原子の RMSD は 0.42 \AA であった。一方で、950 MPa の A~D 分子についてはそれぞれ 0.57 , 0.70 , 0.72 , 0.63 \AA であった。分子の歪みは非対称単位の 4 分子のうちの一つ (C 分子) で著しく増大していた。C 分子において、活性サイトの溝を閉じるような特に大きい動きが観測された (Fig. 3.5, Fig. 3.8)。0.1 MPa と 950 MPa の C 分子の間のドメインの動きは DynDom を使って解析した (Hayward & Berendsen, 1998)。この動きのヒンジ領域は残基番号 41-42 と 82-83 であり、Fig. 3.6 において緑色で示した。

前者は $\beta 1$ と $\beta 2$ の間にあり、後者は $\alpha 4$ の半ばにある。0.1 MPaと950 MPaのC分子の間で、 α ドメインと β ドメインの回転角と動きはそれぞれ 6.5° と 0.5 \AA であった。

3.2.3 温度因子の減少

Fig. 3.9 に示したように、ウィルソン温度因子は0.1 MPaから890 MPaまで加圧にともなって低下している。Fig. 3.10 には、0.1 MPa, 890 MPa, 950 MPa 構造のそれぞれの残基について全原子の平均温度因子を示す。890 MPa では構造の全体にわたって一様に平均温度因子が低下している。950 MPa では、0.1 から890 MPaの結果と比べて分解能が低いにもかかわらず、平均温度因子は分子全体で減少している。しかしながら、 $\beta 2$ から $\beta 3$ と $\beta 6$ の温度因子は0.1 MPaに比較して減少していない。

3.2.4 水和構造の変化

(i) 分子表面

観測される水分子の数は圧力の上昇とともに徐々に増加している。例えば、常圧では100個の水分子がアサインされたが、890 MPaでは171個であった (Fig. 3.11)。これらの水分子の内、81個の水分子は0.1 MPaと890 MPaの両方で保存されており、90個の水分子は890 MPaで新たに観測されたものである。890 MPaで増加した水分子は主に活性サイトの背面に位置しており、周囲の残基や水分子との水素結合によって補助された蛋白質の疎水性表面への水和が観測された。このような水和構造の例としては Ile78, Pro79, Phe34, Phe38, Trp123 の疎水性側鎖群の近傍の水が挙げられる (Fig. 3.12)。高压下で新たに観測された水分子は、蛋白質の側鎖や常圧で観測されていた水分子と水素結合を形成していた。蛋白質の側鎖のコンフォメーション変化も新たに観測された水分子のネットワークの形成に関与していた。例えば、Asn103は890 MPaにおいて側鎖のコンフォメーションを変化させ、新たに2つの水分子が水素結合を形成することを可能にしている (Fig. 3.13)。しかしながら、観測された水分子の数は950 MPaで再び減少している (Fig. 3.11)。これはおそらく相転移によって誘起された分子の大きな動きに起因する水分子のディスオーダーを反映しており、それは950 MPaの回折データの分解能の低さにも表れている。

(ii) 分子内空隙

蛋白質にかかる圧力が上昇すると Fig. 3.14 に示すように大部分の分子内空隙は圧縮され、これは Fig. 3.4 にも反映している。しかしながら、Trp108 上の空隙は異なった応答を示している。すなわち0.1 MPaから600 MPaまでは 62.5 \AA^3 から 39.5 \AA^3 へと単調に圧縮されるが、710 MPaでは一旦 44.6 \AA^3 に膨張し、その後800 MPaでは 42.4 \AA^3 、890 MPaでは 43.0 \AA^3 にわずかに圧縮されていた。解析の結果、この空隙体積の増加は空隙への水分子の侵入と周囲の残基の動きに起因することが分かった (Fig. 3.15(a))。710 MPaで水分子が侵入した後、さらに圧力が800 MPaまで上昇すると Glu35 がデュアルコンフォマーになっていた。新た

に観測された側鎖のコンフォメーションは、侵入した水分子と相互作用できるように空隙の方を向いていた。Trp108 は疎水性残基であるが、この水分子は Trp108 と孤立電子対- π 相互作用 (Egli & Sarkhel, 2007; Jain, *et al.*, 2009) を形成していると考えられる。

相転移後の圧力では Glu35 は 4 つの分子でそれぞれ異なるコンフォメーションをとっていた (Fig. 3.15(b))。A 分子の Glu35 は 890 MPa 構造と同じようにデュアルコンフォーマーだった。しかしながら、B, C, D 分子において Glu35 の側鎖は空隙に挿入され、侵入した水分子と相互作用する内向きのコンフォメーションのみが観測された。C 分子と D 分子においては Trp108 上に侵入した水分子と相互作用する形で、そのさらに上に 2 つ目の水分子が侵入し、Trp28 の主鎖カルボニル酸素と水素結合を形成していた。

しかしながら、HEWL-(GlcNAc)₄ 複合体は 920 MPa においても相転移せず、Glu35 は外向きのコンフォメーションのみが観測され、Trp108 上の空隙への水分子の侵入も観測されなかった (Fig. 3.16)。

3.3 考察

3.3.1 圧力によって誘起された相転移

溶液中では HEWL 分子は数百 MPa で変性する (Heremans & Wong, 1985; Jonas, 1990)。しかしながら、本研究において、結晶中では HEWL 分子は 950 MPa の圧力でも分子構造を保持しており、変性しないことが明らかになった。Katrusiak らによって、おそらくは結晶のパッキングが圧力による影響を緩和していると指摘されている (Katrusiak & Dauter, 1996)。しかし、興味深いことに本研究では、HEWL の正方晶では圧力の上昇にともなって 890 MPa から 950 MPa の間で圧力誘起の相転移が起こることが観測された。これまでの HEWL に対する高圧結晶構造解析の研究は、915 MPa までしか実施されていない (Fourme *et al.*, 2001)。Fourme らは 915 MPa における格子体積の急激な減少、散乱能の低下、回折の消失を報告している。我々の結果から、Fourme らはおそらく相転移の直前を観測したのと考えられる。一方、本研究では相転移において非対称単位に含まれる 4 分子のそれぞれ異なる動きが観測された (Fig. 3.8)。特に C 分子と A 分子は *c* 軸方向に近づくように動いており、これにより Fig. 3.3 に示した *c* 軸の長さの減少が起きたと考えられる。高圧下で観測される構造は、常圧で観測される通常の構造よりもエネルギー状態が高く、常圧ではその存在率が低いいため、通常の結晶学的手法では観測することが困難な過渡的な構造であると考えられる。このような構造は蛋白質の反応や機能に重要であることが指摘されており (Collins, *et al.*, 2011; Fourme, *et al.*, 2012)、後に議論する。

3.3.2 HEWL の体積と構造の変化

蛋白質にかかる圧力が上昇するとルシャトリエの原理に従って系の体積が減少する方向に平衡が移動する。Fig. 3.3 に示すように、HEWL の正方晶結晶の格子体積は単調に減少した。しかし興味深いことに分子体積と空隙体積は 710 MPa から 890 MPa の間は圧縮がほと

んど止まった (Fig. 3.4, Fig. 3.14). 710 MPa において格子体積と分子体積はそれぞれ常圧の 93.4%と 96.4%に圧縮されていた。分子体積と比べて格子体積の圧縮率が大きいことは以前にも報告されている (Ascone *et al.*, 2010a; Refaee *et al.*, 2003)。蛋白質の部分モル体積は、第一章で示したように全原子のファンデルワールス体積、空隙体積、水和による体積変化の 3 つの項の和で表される。部分モル体積として本研究で得られている結果を考察すると、710 MPa までは分子内空隙を圧縮することが部分モル体積を減らすことに主要な寄与をしているが、710 MPa を超えると分子内空隙の圧縮は限界に達し、新たに Trp108 上の空隙にバルク領域から水分子が侵入することで部分モル体積を減少させていることが明らかになった (Fig. 3.15)。このことは 710~890 MPa の領域で結晶格子の体積が減少を続けているにも関わらず分子内空隙の体積はほぼ一定であることにも現れている。このような高圧下における水分子の侵入による空隙の膨張は *Shewanella oneidensis* MR-1 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (SoIPMDH; Nagae *et al.*, 2012) においても観測されており、おそらく空隙の元々の体積に依存していると考えられる。HEWL の活性ポケットにある空隙と SoIPMDH の二量体界面に存在する空隙の体積はそれぞれ常圧下で 62.5 \AA^3 と 55.6 \AA^3 であった。一方で、T4 リゾチーム L99A 変異体の高圧結晶構造解析及び MD シミュレーションの研究においては 160 \AA^3 の大きな空隙が膨張することなく水分子が侵入することが報告されている (Collins *et al.*, 2005)。この場合、空隙は水分子を取り込むために十分な大きさを持っているため、空隙の体積を増加させる必要がなかったと考えられる。

疎水性環境に水分子が局在することは本来不利であるはずであるが、このような水分子の侵入は、空隙の圧縮が物理的限界に達した場合に分子の部分モル体積を減少させるための主要な方法となっていると考えられる。3D-RISM 理論を用いた分子溶媒和の研究において、圧力によって誘起されたユビキチンの構造変化と協同した部分モル体積の減少メカニズムが解析され、部分モル体積減少の主な要因はユビキチンの疎水性コアへの水分子の侵入に帰されている (Imai *et al.*, 2007)。今井らの高圧下 MD シミュレーションはそれ以降も続けて行われており、水分子の侵入に関連するコンフォメーション変化が確認されている (Imai *et al.*, 2010)。我々の HEWL においては、疎水性領域への局在という不利を相殺するために、侵入した水分子は Trp108 側鎖のインドール環と孤立電子対- π 電子相互作用を形成している (Fig. 3.15)。高圧 NMR の研究において、0.1~200 MPa の領域において Trp108 の大きな ^1H 化学シフトが報告されている (Akasaka *et al.*, 1997)。Trp108 上の空隙に隣接している Trp28 と Met105 に帰属されるシグナルについても同様に顕著にシフトしていた。これらは我々の高圧結晶構造解析研究における水分子の侵入と空隙の膨張という結果に一致している。800 MPa 以上の圧力においては活性残基 Glu35 がデュアルコンフォーマーになっていた。この新たに出現したコンフォメーションも、おそらく HEWL 分子の部分モル体積を減少させていると考えられ、内向きの側鎖は空隙に侵入した水分子との水素結合で安定化されている。

圧力によって誘起された構造変化についてはKundrotらが常圧構造と100 MPa構造の間の距離の差マップを報告しており、圧力の増加にともなって α ドメインと β ドメインの間の距離が減少することが示されている (Kundrot & Richards, 1987). この結果は、いくらかの方向の差は存在するものの、圧力下では蛋白質がその重心に向かって圧縮されるという一般的な傾向を示している. この α ドメインと β ドメインの接近は我々の890 MPaの構造と一致する (Fig. 3.5, Fig. 3.8). さらに、950 MPa構造のC分子においては、 β ドメインの大きな構造変形が観測された. DynDomで検出した結果をFig. 3.7に示したように、C分子は β ドメインの大きなねじれと活性部位を閉じる変化をしていた. この β ドメインのねじれは高圧NMR研究の結果と一致している (Rafaeel *et al.*, 2003).

3.3.3 HEWL 表面の水和構造の変化

これまでのリゾチーム、ササゲモザイクウイルス、IPMDHの高圧研究から、高圧構造では観測される水分子が増加していることが報告されていた (Kundrot & Richards, 1987; Girard *et al.*, 2005; Nagae *et al.*, 2012). 今回の我々の結果もまた加圧による水分子の増加を示した (Fig. 3.11). 一方、ウィルソン温度因子は0.1 MPaから890 MPaの間で 8.7 \AA^2 低下した (Fig. 3.9). 常圧から190 MPa間の顕著な減少は測定方法の違いによるものであると考えられるが、加圧による温度因子の低下はササゲモザイクウイルスの構造研究でも観測されている (Girard *et al.*, 2005). MDシミュレーションでも加圧による原子の動きの減少が再現されており (Brunne & van Gunsteren, 1993), 水分子と蛋白質の間の相互作用も強くなることが示されている (Marchi & Akasaka, 2001).

今回の高圧結晶構造解析の結果では、複数の水分子が蛋白質の疎水性表面で互いに水素結合ネットワークを形成していることが観測された (Fig. 3.12, Fig. 3.13). このような局内には加圧による部分モル体積の減少の必要性によって引き起こされる水分子の構造変化を示していると考えられる. いくつかの残基の側鎖も構造をとった水分子と相互作用するように構造を変化させ、疎水性表面の水素結合ネットワークを強固にしている.

3.3.4 活性残基 Glu35 の構造変化

活性残基の1つであるGlu35は圧力の増加にともなってその構造変化が観測された. 常圧から600 MPaまでの領域ではGlu35は活性サイトの基質側(外側)に側鎖を突き出している. しかし、800 MPaではGlu35はデュアルコンフォマーになっており、側鎖が基質側とは反対のTrp108上の疎水性空隙の側を向いた新たな内向きコンフォメーションが観測された. さらに高い圧力、例えば950 MPaのB、C、D分子では内向きのコンフォメーションのみが観測された (Fig. 3.15(b)). Glu35は生理条件下でリゾチームのグリコシダーゼ活性において一般酸触媒として働くために、通常のグルタミン酸の pK_a が4.1程度であるのに対し、Glu35の pK_a は6.0~6.8と異常に高いことが知られている (Kuramitsu *et al.*, 1977; Webb *et al.*, 2011). Trp108を疎水性の低いTyrやGlnに変異させるとGlu35の pK_a はそれぞれ0.2と0.6低下し、

HEWL の活性が低下する (Inoue *et al.*, 1992). 我々の知るかぎりでは, これらの内向きコンフォメーションはこれまでの結晶リゾチームにおいては中性子散乱実験を含めて結晶構造解析では観測されていない (Niimura *et al.*, 1997; Bon *et al.*, 1999).

DEPTH (Tan *et al.*, 2013) と PROPKA (Søndergaard *et al.*, 2011) を用いて高圧結晶構造解析で決定した構造の Glu35 の pK_a を見積もったところ, 予想通り pK_a 値は内向きコンフォメーションの方が外向きコンフォメーションよりも高かった (Table. 3.3). DEPTH によって計算された内向き Glu35 の pK_a は 6.3~6.5, 外向き Glu35 の pK_a は 4.5 以下であり, 過去の実験的に求められた値と一致する (Fig. 3.17). PKAPRO においても内向きコンフォメーションの方が高い pK_a が見積もられるが, この値は過大評価であると思われる.

興味深いことに, HEWL の NMR 構造 (PDB ID 1E8L; Schwalbe *et al.*, 2001) において, 50 個の低エネルギー構造の内, 外向きの Glu35 の構造は 5 つしかなく, 残りの 45 個の構造が内向きの Glu35 を持っている. 従って, 溶液状態の HEWL では Glu35 は内向きであると考えられる. なぜ従来の結晶構造解析では常圧 NMR 構造の内向きコンフォメーションが観察されないのかは明らかでない. また, NMR による構造解析では Glu35 がなぜ内向きコンフォメーションを好むのかを説明することはできないが, 本研究の高圧結晶構造解析の結果から, 疎水性空隙に水分子が侵入し, Glu35 と水素結合を形成することで内向きコンフォメーションを安定化する機構が明らかになった. これらの結果は Glu35 の高い pK_a には Trp108 のいわゆる疎水性だけではなく, 孤立電子対- π 相互作用を介して水分子を安定化する能力が重要であることを示している.

一方, HEWL-(GlcNAc)₄ 複合体では 920 MPa までの加圧によっても, 分子の大きな動きをともなう圧力誘起相転移は観測されず, Glu35 の内向きコンフォメーションと Trp108 上への水分子の侵入も観測されなかった (Fig. 3.16). これらの結果は HEWL 分子の柔軟性が基質の結合後は制限されることを示している. Glu35 の内向きコンフォメーションは HEWL に基質が結合していない反応前の状態でのみ起こるのだろう.

本研究は, 結晶化した HEWL に高圧力を印加することでコンフォメーションの分布が変化し, 常圧の結晶中では見られなかった構造 (Collins *et al.*, 2011; Fourme *et al.*, 2012) が現れることを示した. これらの高圧によって得られるコンフォメーションの状態を研究することで触媒機構などの蛋白質の活性について様々な情報を得ることができる可能性がある.

Table 3.1 HEWL 結晶の高圧 X 線回折実験のパラメータと統計値

PDB code	4WLD	4WLT	4WLX	4WLY	4WM1	4WM2	4WM3	4WM4	4WM5	4WM6	4XEN
Pressure (MPa)	0.1	190	280	380	500	600	710	800	890	950	920
Diffraction source	FR-E SuperBright				PF-AR NW12A						
Wavelength (Å)	1.54178	0.75	0.75	0.71	0.75	0.75	0.71	0.75	0.71	0.71	0.75
Temperature (K)	Room temperature										
Detector	R-AXIS VII				ADSC Quantum 210r						
Crystal-detector distance (mm)	70				200						
Rotation range per frame (°)	1										
Exposure time per frame (s)	30	1	1	5	5	1	1	1	5	3	2
Number of crystals used	3	3	2	2	2	2	2	2	2	3	2
Space group										$P4_3$	$P4_32_12$
Unit-cell parameters											
a (Å)	79.197	78.219	78.023	77.510	77.287	76.713	76.661	76.434	76.203	107.269	76.152
c (Å)	37.900	38.036	38.031	37.967	37.938	37.836	37.772	37.743	37.643	36.891	37.962
Mosaicity (°)	0.35 - 0.37	0.04 - 0.09	0.04 - 0.06	0.04 - 0.06	0.05 - 0.21	0.04 - 0.06	0.04 - 0.08	0.04 - 0.08	0.03 - 0.15	0.35 - 0.54	0.20-0.40
Resolution range (Å)	50.00-1.54 (1.57-1.54)	50.00-1.60 (1.63-1.60)	50.00-1.60 (1.63-1.60)	50.00-1.62 (1.65-1.62)	50.00-1.60 (1.63-1.60)	50.00-1.60 (1.63-1.60)	50.00-1.55 (1.58-1.55)	50.00-1.60 (1.63-1.60)	50.00-1.60 (1.63-1.60)	50.00-1.85 (1.88-1.85)	50.00-1.55 (1.58-1.55)
Total No. of reflections	1450455	96458	998865	104019	75894	96701	112558	91102	89579	130892	122549
No. of Unique reflections	18464	16148	16058	15293	15744	15483	16944	15331	15201	36471	16785
Completeness (%)	99.4 (99.9)	99.2 (99.9)	99.6 (100.0)	92.7 (95.0)	97.4 (99.5)	99.4 (99.6)	99.4 (100.0)	98.2 (99.3)	99.3 (100.0)	99.3 (99.5)	99.3 (98.9)
Redundancy	7.8 (8.0)	6.0 (6.0)	6.2 (6.4)	7.6 (8.0)	5.0 (5.1)	6.3 (6.5)	6.7 (7.0)	6.1 (6.0)	5.9 (6.1)	4.0 (3.4)	7.4 (6.4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	47.3	46.4	51.5	50.3	46.2	52.9	48.9	49.0	39.1	19.1	44.5
R_{merge}^\dagger (%)	5.3 (38.8)	4.9 (32.3)	4.5 (24.8)	5.6 (38.6)	4.7 (20.1)	4.2 (15.2)	5.3 (35.9)	4.6 (22.4)	6.6 (38.2)	11.8 (53.3)	5.8 (28.6)

$^\dagger R_{\text{merge}}$ is defined as $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the i th observation of reflection hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the weighted mean of all observations (after rejection of outliers).

最外殻の値は括弧内に示した。

Table 3.2 HEWL 構造の精密化の統計値

PDB code	4WLD	4WLT	4WLY	4WLY	4WM1	4WM2	4WM3	4WM4	4WM5	4WM6	4XEN
Pressure (MPa)	0.1	190	280	380	500	600	710	800	890	950	920
No. of reflections, working set	16667	15188	15164	13435	14528	14593	15945	14276	14298	30495	15797
No. of reflections, test set	896	800	794	716	762	766	851	752	758	1606	839
$R_{\text{work}}^{\ddagger}$ (%)	14.51	15.30	15.18	15.45	16.01	15.53	18.14	16.76	16.30	19.92	16.40
R_{free}^{\S} (%)	17.42	19.70	19.31	19.38	20.80	20.09	25.91	22.38	21.67	28.45	20.94
Cruickshank DPI	0.07	0.08	0.08	0.10	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09	0.24	0.09
No. of non-H atoms											
Protein	1009	1031	1031	1031	1020	1025	1023	1032	1026	4013	1063
Ligand/ion	1	7	7	7	7	5	4	5	5	4	62
Water	100	118	129	135	142	144	149	164	171	615	172
Total	1110	1156	1167	1173	1169	1174	1176	1201	1202	4632	1297
B factor (\AA^2)											
Protein	25.14	18.79	16.99	19.32	17.63	14.65	16.76	15.74	16.28	17.38	11.92
Ligand/ion	39.51	37.17	34.76	34.14	29.83	27.80	22.17	29.27	28.95	29.56	23.32
Water	38.72	33.21	32.34	34.41	33.10	28.64	29.78	30.53	30.31	24.16	27.08
R.m.s.d. from ideality											
Bond lengths (\AA)	0.024	0.024	0.024	0.024	0.025	0.022	0.022	0.025	0.023	0.015	0.021
Bond angles ($^{\circ}$)	2.166	2.151	2.146	2.099	2.157	2.132	2.132	2.011	2.036	1.728	2.202
Ramachandran plot											
Most favoured (%)	99	99	98	98	98	98	98	98	98	96	97
Allowed (%)	1	1	2	2	2	2	2	2	2	4	3

$\ddagger R_{\text{work}}$ is defined as $\sum_{hkl} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$. $\S R_{\text{free}}$ is calculated using 5% of the data that were randomly chosen and excluded from the refinement.

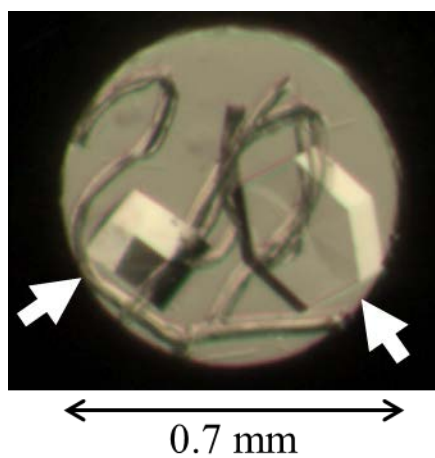


Figure 3.1 DAC の試料室中にマウントした HEWL 結晶の例. 2 つの結晶 (白矢印) を異なる向きで試料室に入れ, 結んだタバコフィルタの繊維で固定してある.

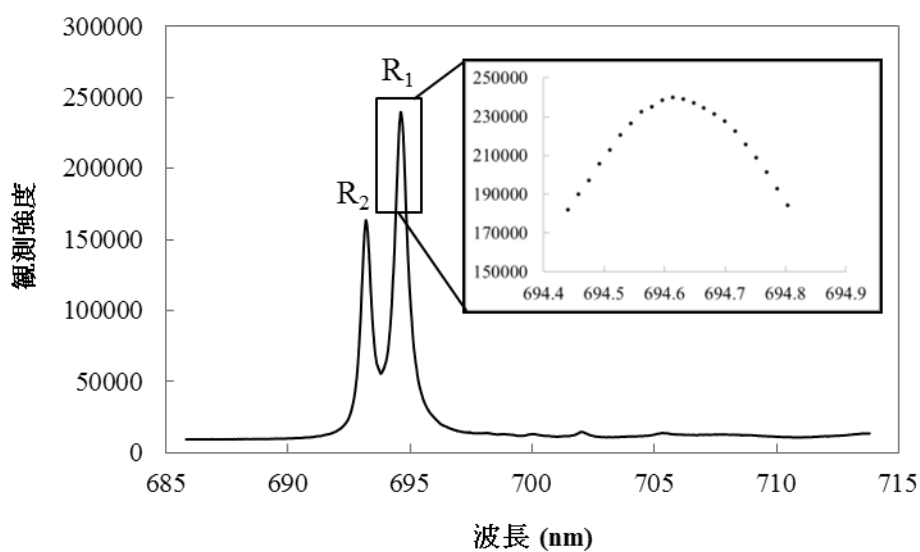


Figure 3.2 710 MPa におけるルビー蛍光スペクトル. 差し込み図はルビーR₁ 蛍光線のピークトップを拡大したもの. 波長の決定は R₁ 線のピークトップ前後 10 点を使用し, ガウス関数でフィットした.

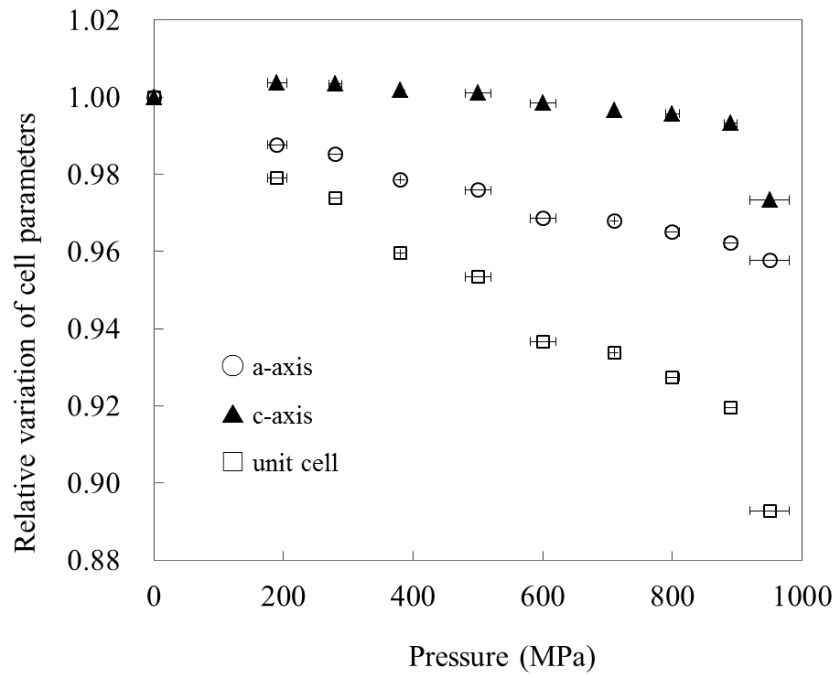


Figure 3.3 HEWL 正方晶の結晶格子と格子体積の圧力依存性. a 軸 (○), c 軸 (▲), 格子体積 (□). 950 MPa の値は $P4_32_12$ の格子に換算している. 縦軸の誤差はシンボルの大きさよりも小さい.

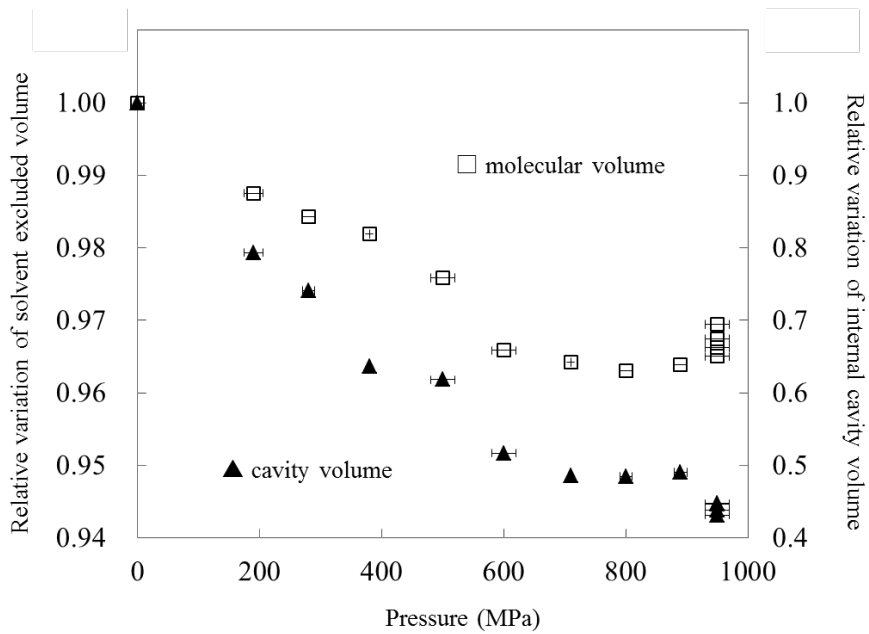


Figure 3.4 HEWL の溶媒排除体積 (□) と分子内空隙体積 (▲) の圧力依存性. 縦軸の誤差はシンボルの大きさよりも小さい.

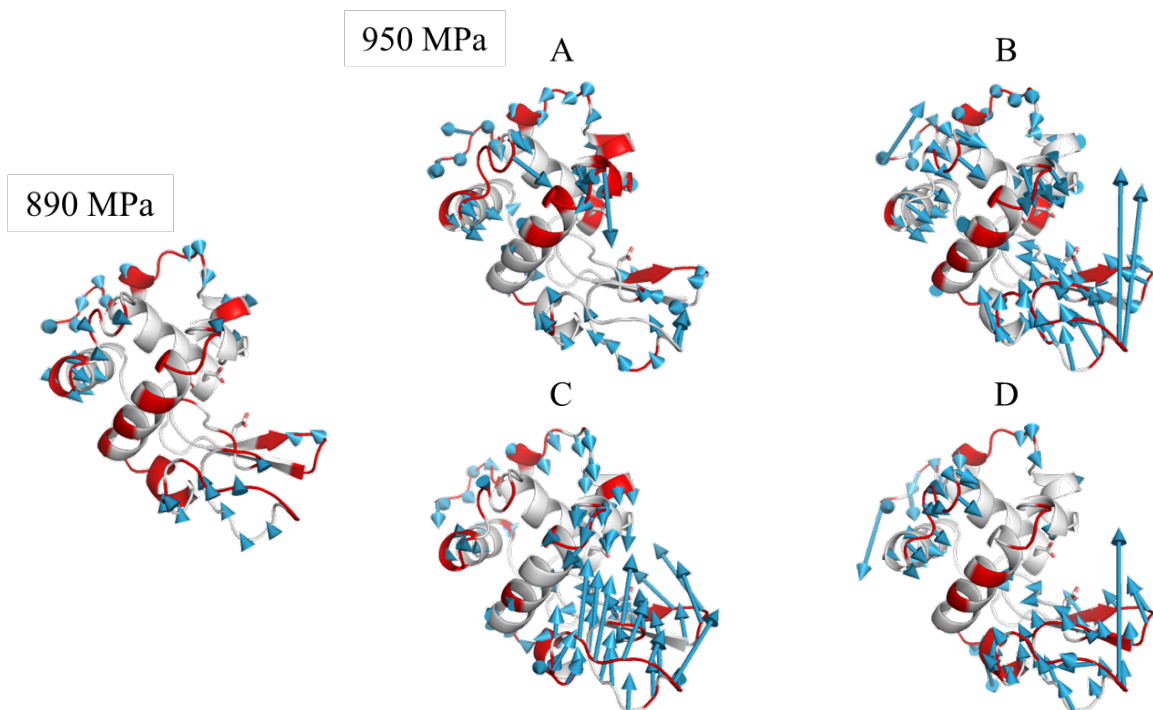


Figure 3.5 圧力によって誘起された HEWL の構造変化. 常圧から 890 MPa, 950 MPa の各分子に対する $C\alpha$ 原子の変位を矢印で示している. 見やすくするために矢印の長さは 10 倍にしている. 890 MPa では活性サイトを閉じる方向に動きが見られるが, 950 MPa ではさらに動きが大きくなっている. 常圧構造との $C\alpha$ 原子の RMSD が 0.6 を超える残基はカートゥーンモデル上に赤で示している.

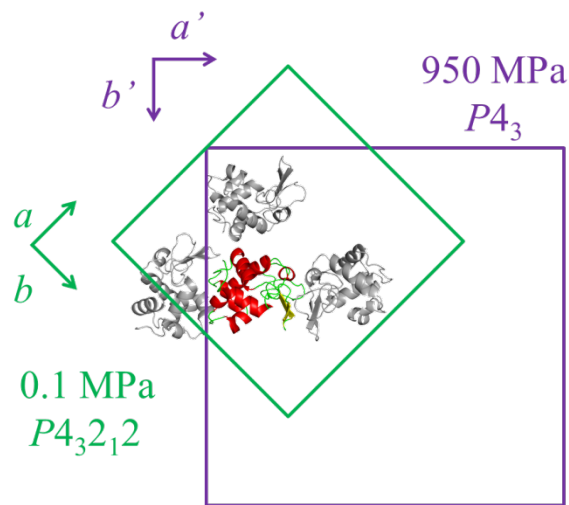


Figure 3.6 890 MPa と 950 MPa の間で観測された結晶-結晶間相転移にともなう格子の変化。空間群は $P4_32_12$ から $P4_3$ に変化した。 $P4_32_12$ 格子では非対称単位中に 1 分子が含まれるが、新たに生じた $P4_3$ 格子では非対称単位中に 4 分子が含まれていた。 $P4_32_12$ 格子の非対称単位に含まれる 1 分子を二次構造で色分けし、残りの 3 分子は灰色で示している。

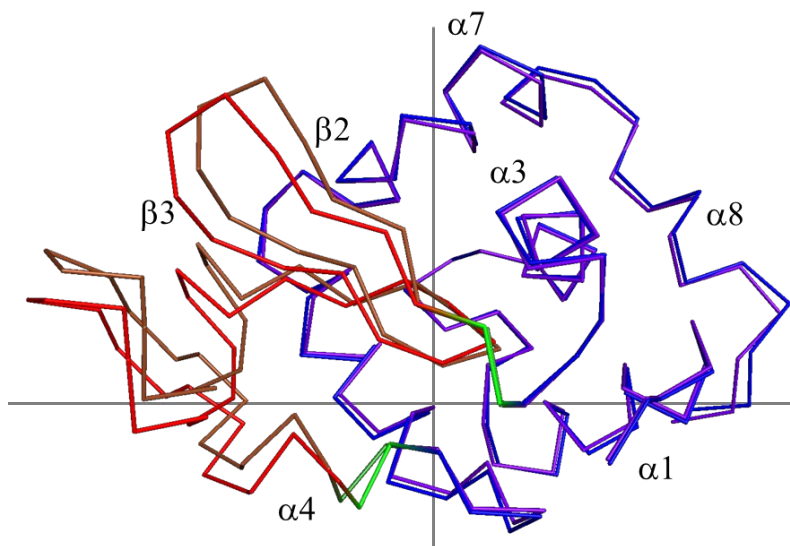


Figure 3.7 常圧構造と 950 MPa の C 分子の構造におけるドメイン間の動き。常圧構造は青， α ドメイン；赤， β ドメインで、950 MPa は紫， α ドメイン；茶， β ドメインで示す。DynDom でアサインされたヒンジ領域 Gln41-Ala42 及び Ala82-Leu83 部分は緑で示している。

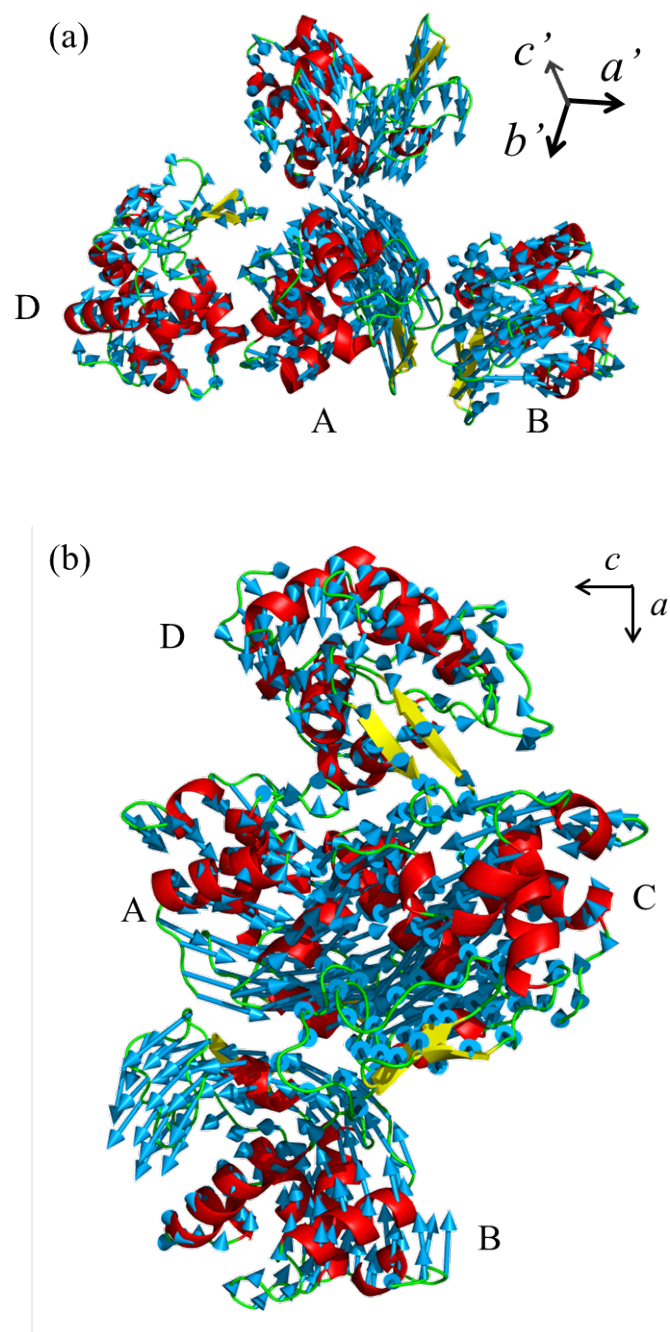


Figure 3.8 相転移前後における対応する4分子全体の動き. 常圧からのCa原子の動きを矢印で示している. ベクトルの長さは3倍にしている.

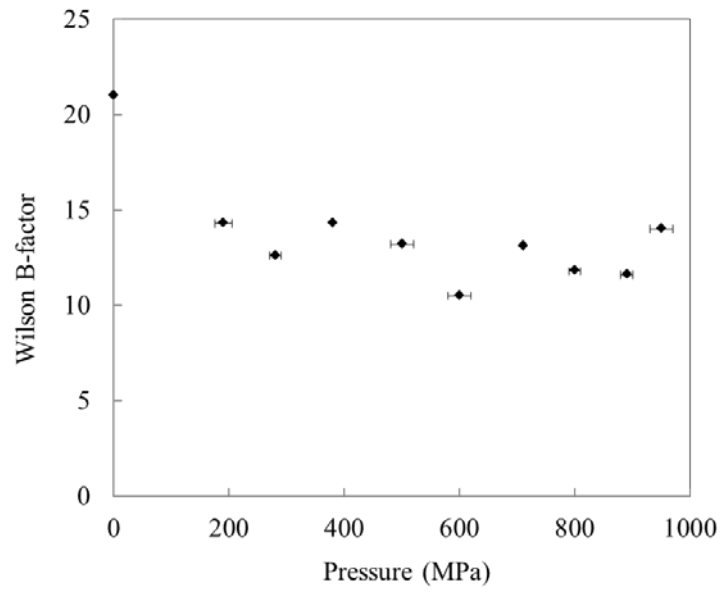


Figure 3.9 ウィルソン温度因子の圧力依存性. 0.1 MPa から 890 MPa まで圧力の増加にともなって低下している.

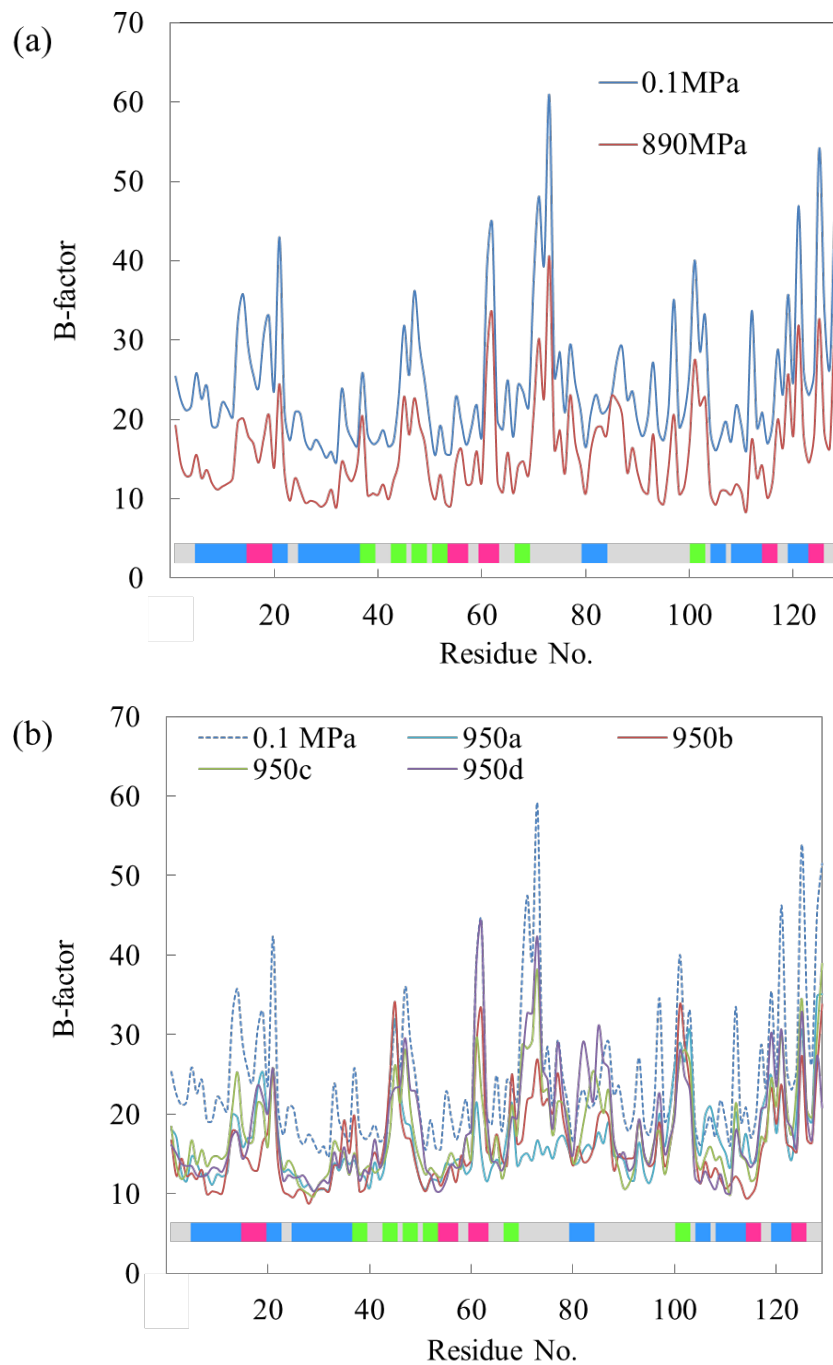


Figure 3.10 圧力による各残基の平均温度因子の変化. 横軸は残基番号, 縦軸は各残基全体の平均温度因子. (a) 常圧は青線, 890 MPa は赤線. (b) 常圧は青点線, 950 MPa A, B, C, D 分子はそれぞれシアン, 赤, 緑, 紫. カラーバーは UniProt に従って HEWL の二次構造を表示している (ヘリックス, 青; ターン, 赤; シート, 緑).

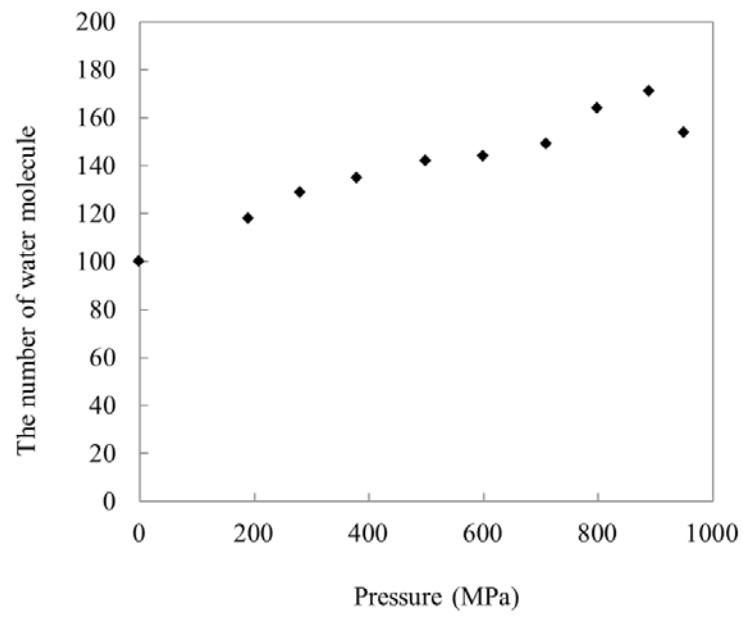


Figure 3.11 圧力と観測された水分子の数の関係. 950 MPa の値は非対称単位に含まれる 4 分子の平均値を示した.

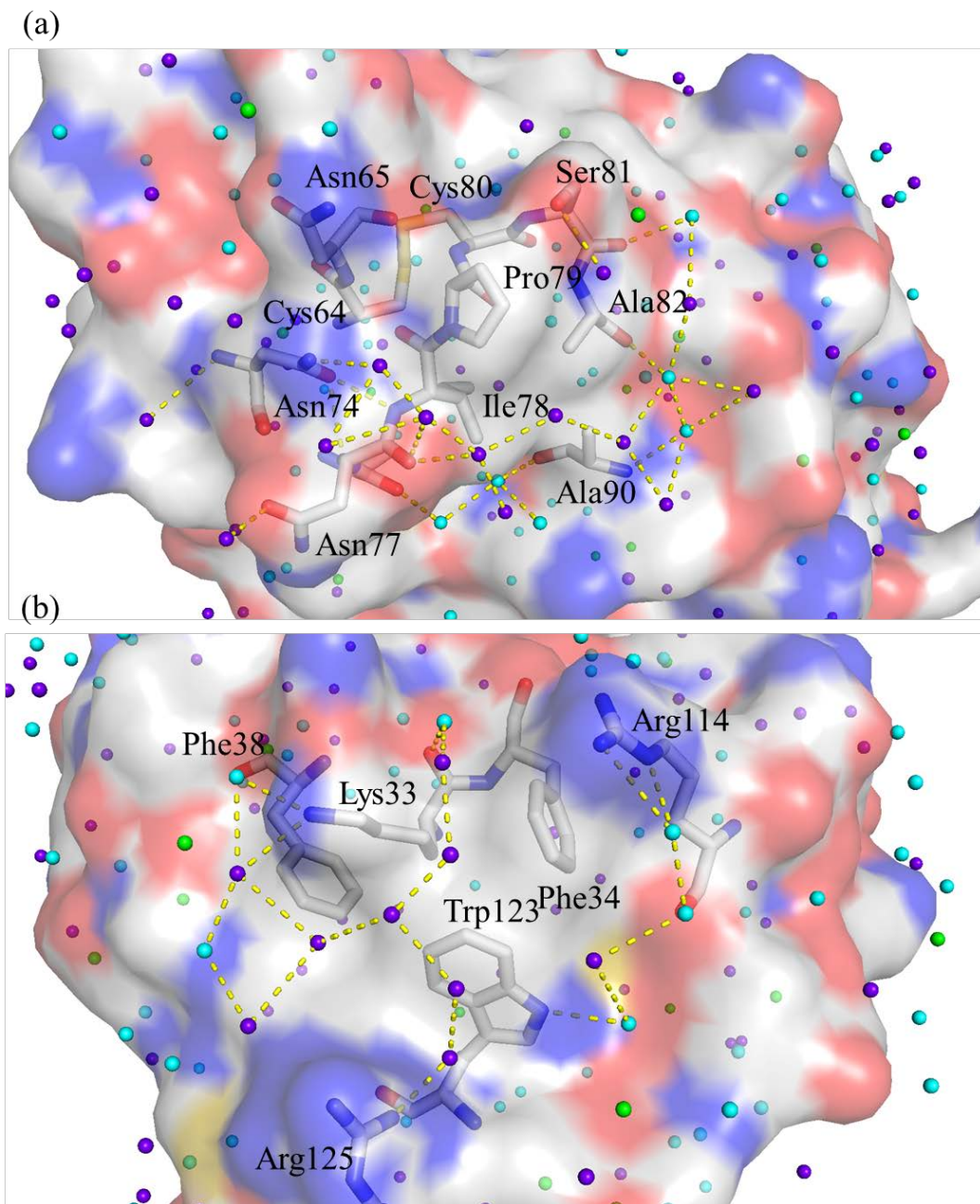


Figure 3.12 HEWL の 890 MPa 構造において疎水性表面に観測された水分子. (a) Ile78 と Pro79 周辺の水和構造. (b) Phe34, Phe38, Trp123 周りの水和構造. 複数の水分子が新しく互いに水素結合ネットワークを形成しながら疎水性表面に観測された. 分子表面の色は負に荷電 (赤), 電荷なし (白), 正に荷電 (青) している領域を示す. 水分子は常圧構造にのみ見られるもの (緑), 890 MPa 構造にのみ見られるもの (紫), 2つの構造に共通して見られるもの (シアン) で色付けされている. 高圧下で紫の水分子が疎水性表面上に現れることがわかる.

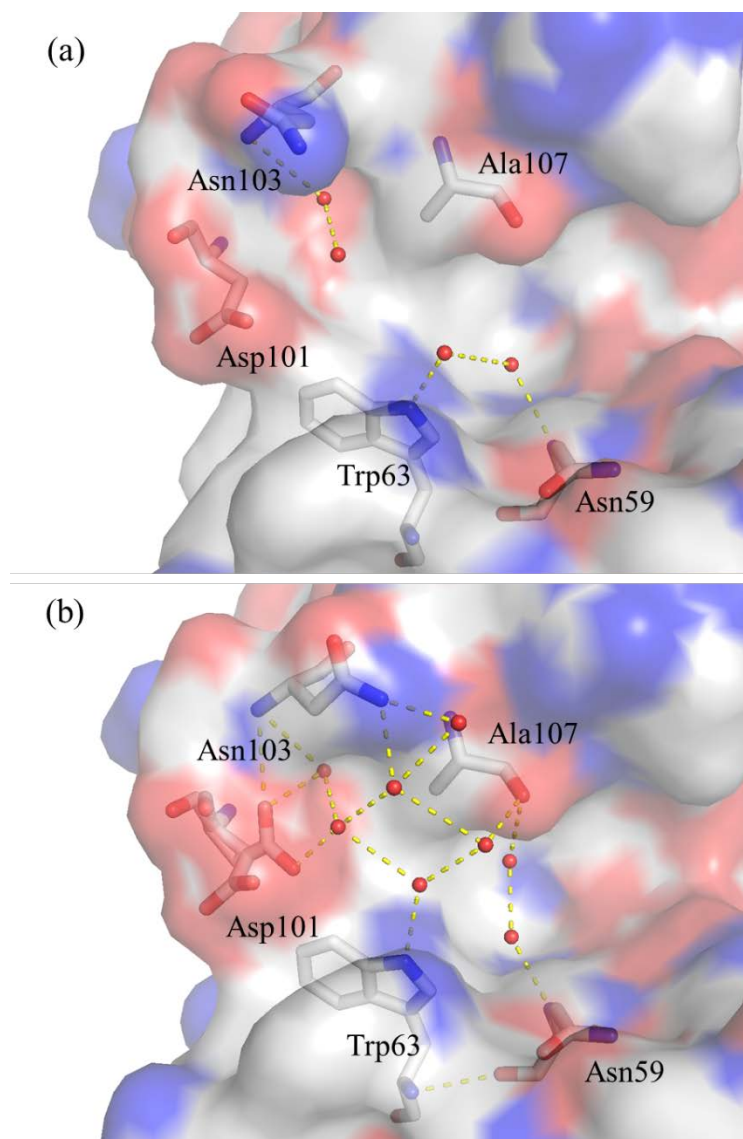
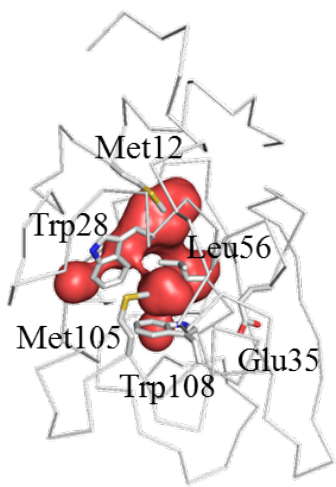
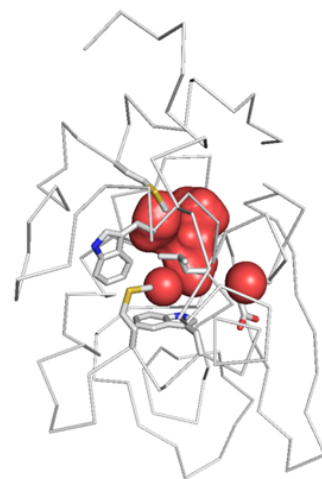


Figure 3.13 加圧による HEWL 表面残基の構造変化と水和. (a) 常圧構造, (b) 890 MPa 構造. 890 MPa では, 新たに観測された水分子と水素結合を形成できるように Asn103 のコンフォメーションが変化し, 疎水性表面部分の水分子の安定化に寄与していることがわかる. 蛋白質表面の色分けは Fig. 3.12 と共通.



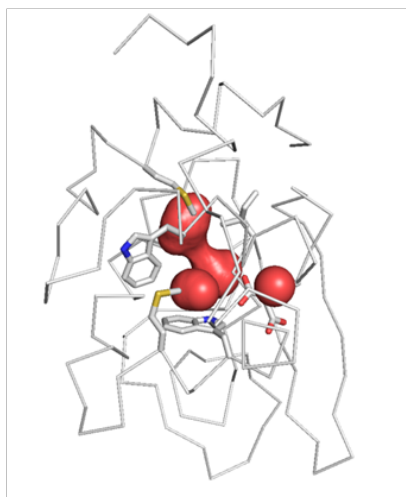
0.1 MPa



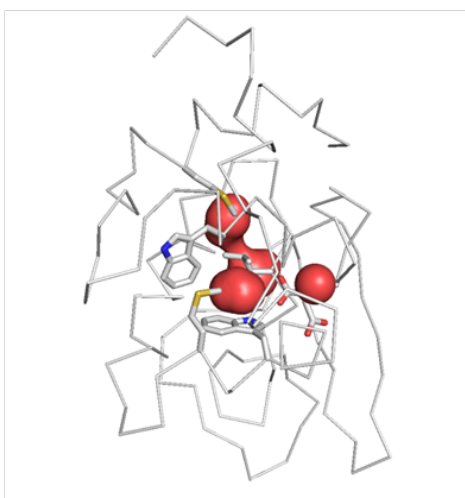
600 MPa



710 MPa

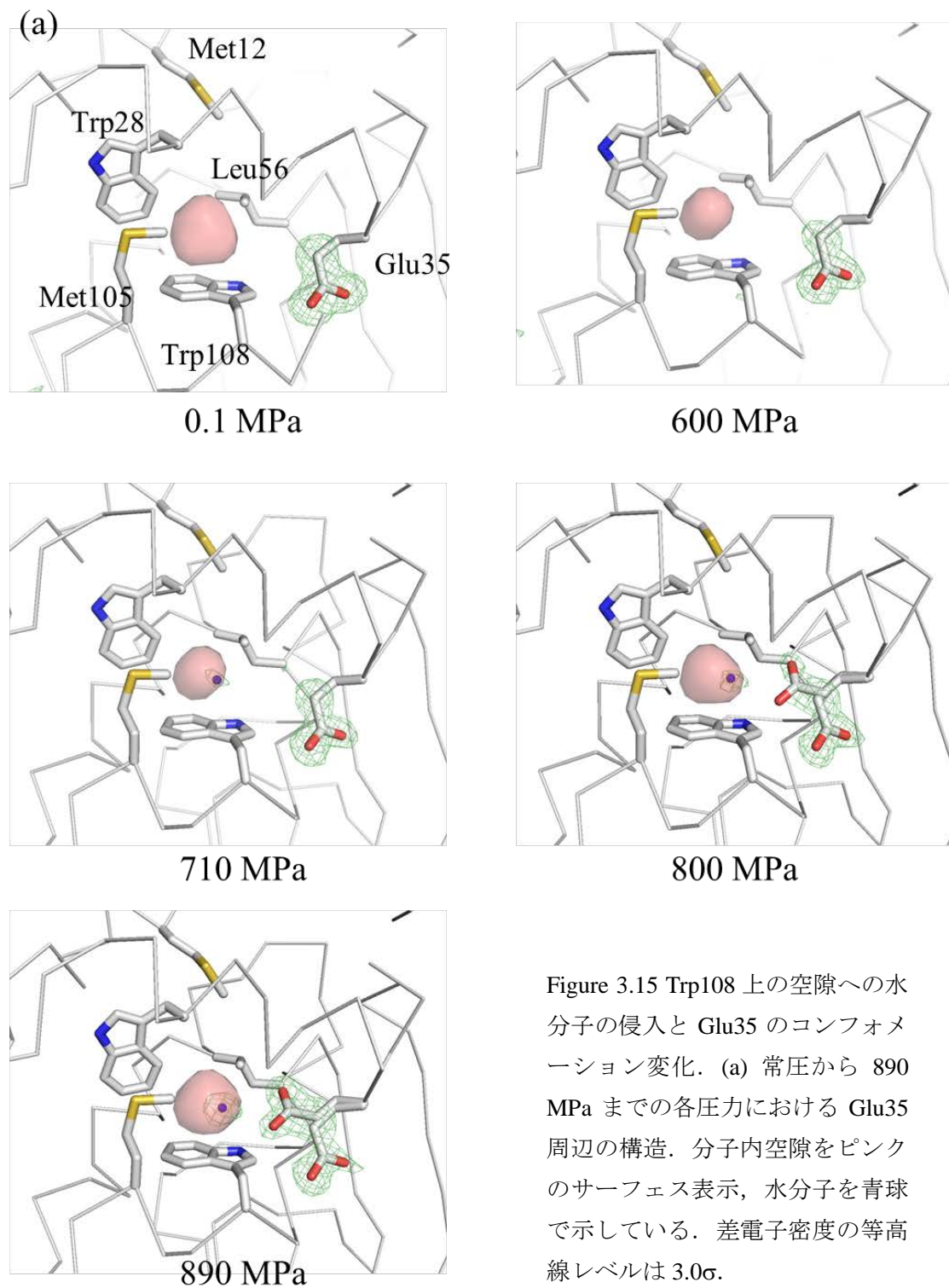


800 MPa



890 MPa

Figure 3.14 常圧から 890 MPa までの各圧力における分子内空隙. 分子内空隙を赤いサーフェス表示で示している. ほとんどの空隙は圧力の増加に伴って圧縮されたが, 710 MPa 構造に矢印で示した空隙は水分子の侵入によって体積が増加していた.



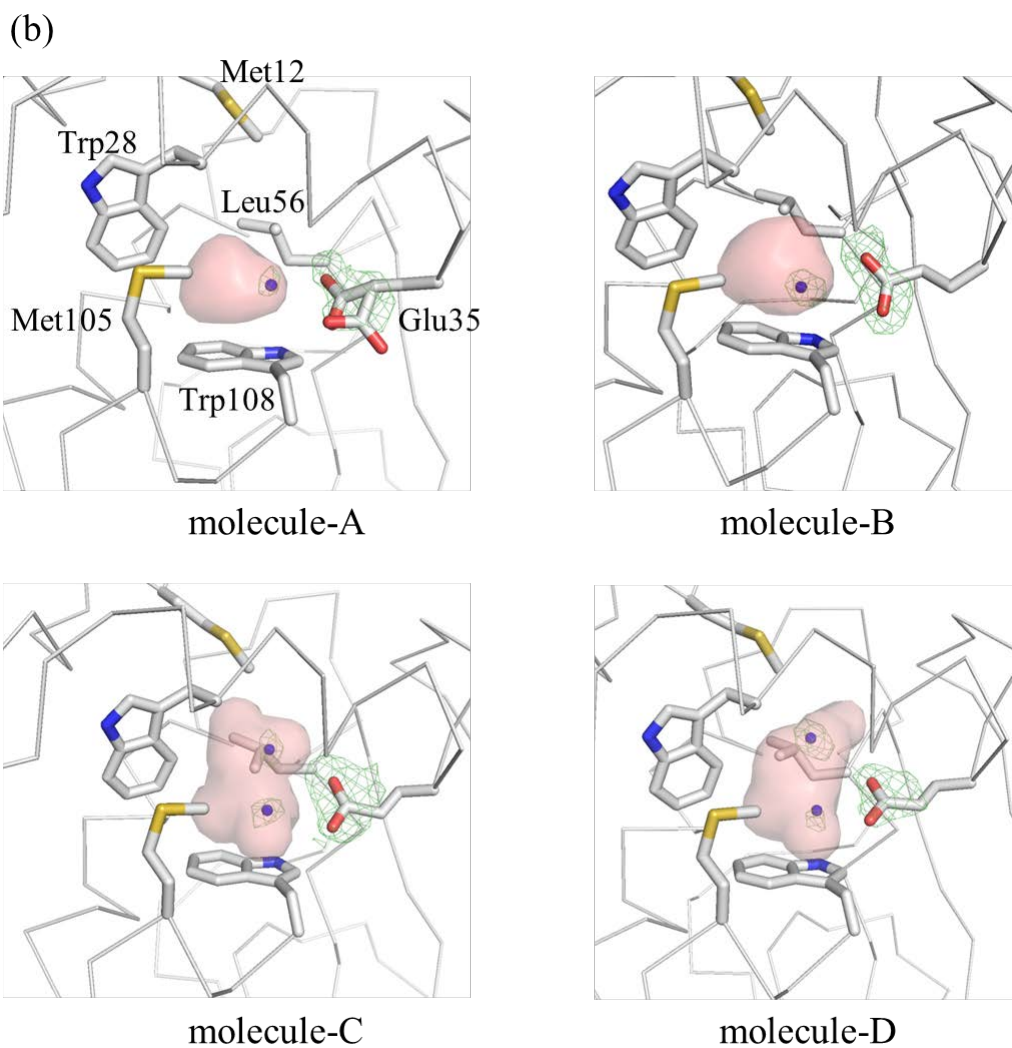


Figure 3.15 Trp108 上の空隙への水分子の侵入と Glu35 のコンフォメーション変化 (続き).
 (b) 950 MPa 構造の 4 分子における Glu35 周辺の構造. 分子内空隙をピンクのサーフェス表示, 水分子を青球で示している. 差電子密度の等高線レベルは 2.5σ .

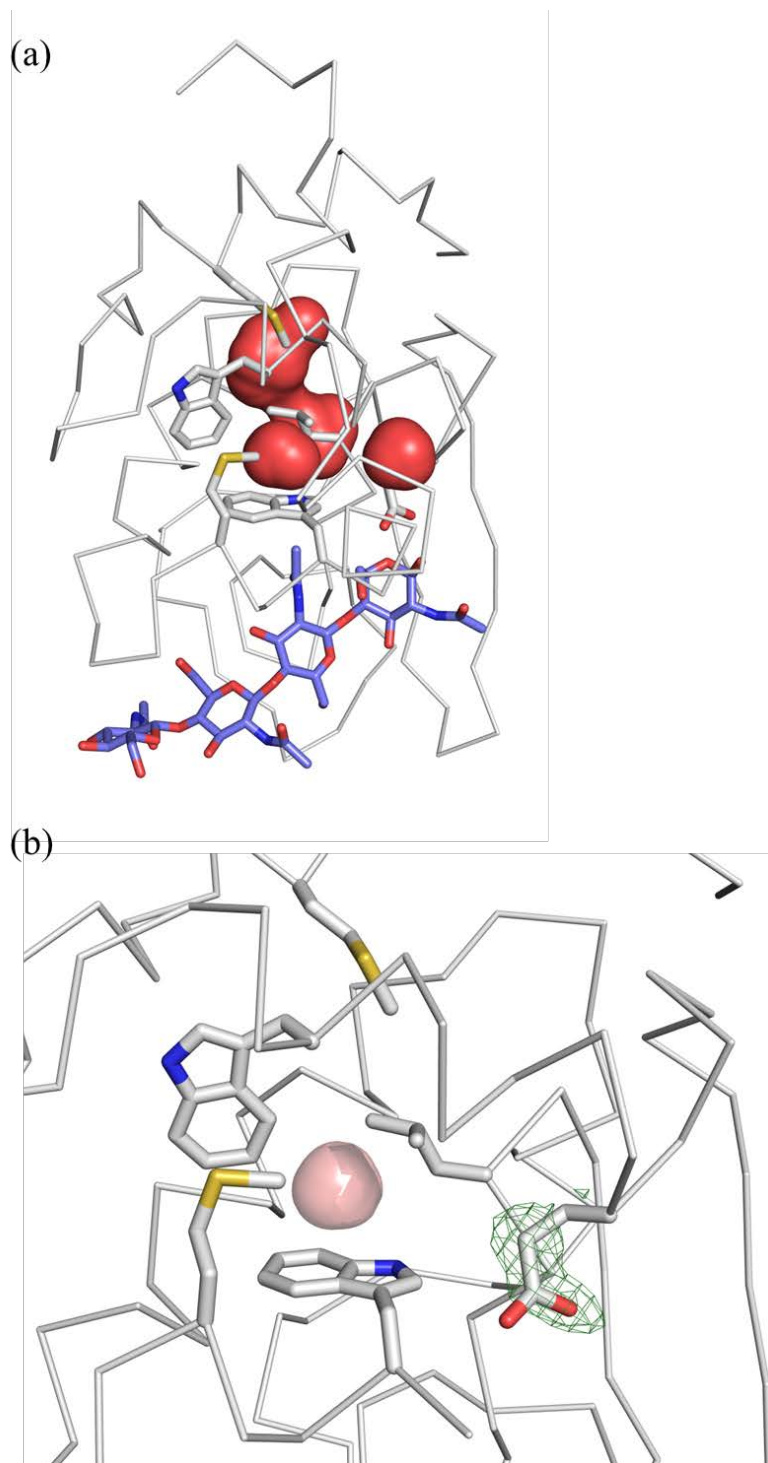


Figure 3.16 HEWL-(GlcNAc)₄ 複合体の 920 MPa における構造. (a) HEWL-(GlcNAc)₄ 複合体の全体構造. 分子内空隙を赤いサーフェス表示で示している. (b) Trp108 上の空隙と Glu35 の周辺の構造. 差電子密度の等高線レベルは 2.5σ .

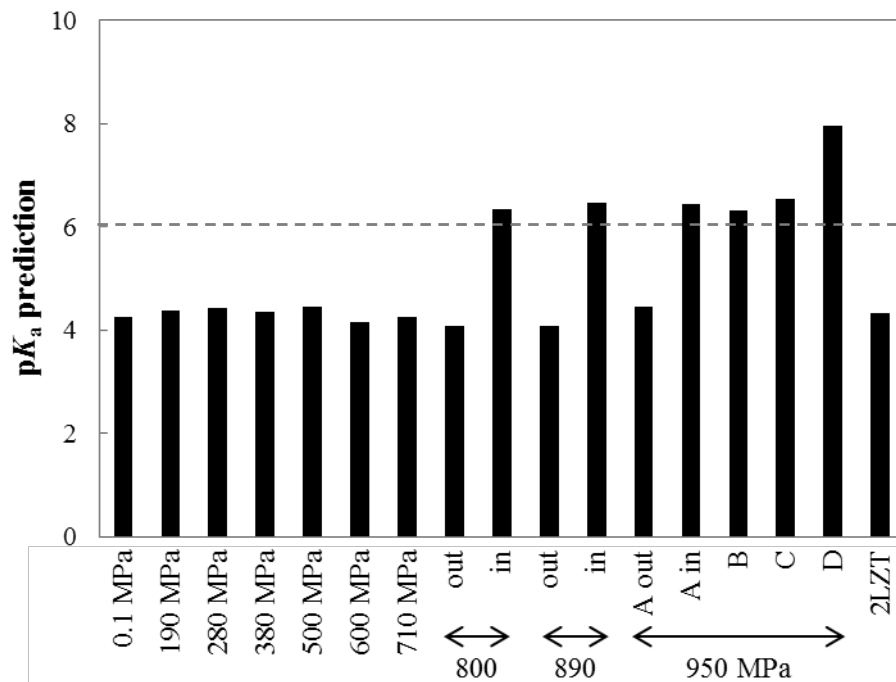


Figure 3.17 DEPTH を使用して評価した各構造の Glu35 の pKa. in と out は内向きと外向きのコンフォメーションをそれぞれ示す. 点線は pKa が 6.0 の位置を示している.

Table 3.3 DEPTH と PROPKA を使用して計算した各圧力における Glu35 の外向き・内向きコンフォメーションの pKa.

Glu35 conformation	DEPTH		PROPKA	
	outer	inner	outer	Inner
Pressure (MPa)	pKa	pKa	pKa	pKa
0.1	4.25	-	6.51	-
190	4.37	-	6.62	-
280	4.42	-	6.63	-
380	4.36	-	6.67	-
500	4.46	-	6.76	-
600	4.15	-	6.80	-
710	4.25	-	7.02	-
800	4.09	6.34	6.84	10.97
890	4.08	6.48	6.73	10.00
950 A	4.45	6.44	7.08	10.06
B	-	6.32	-	10.19
C	-	6.54	-	10.58
D	-	7.97	-	9.76
PDB ID: 2LZT	4.34	-	6.51	-

第四章

大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の高圧 X 線結晶構造解析

4.1 発現・精製, 結晶化, X線回折実験, 構造決定

4.1.1 ecDHFR の発現・精製

ecDHFR は *Escherichia coli* BL21(DE3) 株 (Agilent Technologies) を発現ベクター pfolA-ec で形質転換することで発現させた. pfolA-ec は *E. coli* の DHFR をコードする *folA* 遺伝子を pET28b (Novagen) に対して制限酵素 *NdeI* と *XhoI* のサイトを使用して挿入したプラスミドで, ecDHFR は N 末端に 6×His タグとトロンビンサイトを保持している. 大腸菌の培養は 50 mg l⁻¹ カナマイシンを含む LB 培地で, 温度は 37°C で行った. 培養液の OD₆₀₀ が 0.6 に達した後, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) を終濃度 0.5 mM で添加して ecDHFR の発現誘導を行い, 4 時間の培養後に 4000×g で 15 分間遠心分離して菌体を回収した. 残存した培地を取り除くために沈殿した菌体を 150 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) で菌体を洗浄し, -80°C で凍結保存した.

菌体は氷上で 0.1 mg ml⁻¹ リゾチームを含むリシスバッファー (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl バッファー pH 7.5) で再度懸濁し, 超音波破碎した. 破碎液を 20,000×g で 30 分間遠心分離し, 上澄みをリシスバッファーで平衡化した Ni-NTA カラム (QIAGEN) に添加した. その後, 100 ml のリシスバッファーと洗浄バッファー (20 mM イミダゾール, 10 mM β-メルカプトエタノール, 300 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl バッファー pH 7.5) でカラムを洗浄し, 最後に 50 ml の溶出バッファー (250 mM イミダゾール, 10 mM β-メルカプトエタノール, 300 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl バッファー pH 7.5) で目的蛋白質を溶出した. イミダゾールを除くためにゲルろ過バッファー (10 mM β-メルカプトエタノール, 25 mM Tris-HCl バッファー pH 7.5) に透析したのち, トロンビンを添加して His タグを切断し, Ni-NTA カラムに 2 回通すことで His タグが切断された蛋白質を回収した. さらにゲルろ過クロマトグラフィ (HiLoad Superdex 75 26/600 prep-grade column, GE Healthcare) で精製した. 目的蛋白質を含む画分を限外ろ過によって 10 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) にバッファー交換した後, 60 mg ml⁻¹ まで濃縮した.

4.1.2 ecDHFR の結晶化

ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体の初期結晶は, 1.5 μl の蛋白質溶液 (40 mg/ml ecDHFR, 5 mM FOL, 5mM NADP⁺を含む 10 mM Tris-HCl pH 7.5) と, 1.5 μl の結晶化溶液 (32%(w/v) PEG 6000, 10 mM CaCl₂, 100 mM イミダゾール pH 6.5) を混合し, 500 μl の結晶化溶液に対して 4°C で静置することで得られた.

回折実験に用いた結晶はマイクロシーディング法で得た. 結晶化ドロップは 1.5 μl の蛋白質溶液を, 29%(w/v) PEG 6000 を含んだ 1.5 μl の結晶化溶液と混合して作成した. 結晶 (空間群 P2₁) は 3~4 日で 0.2×0.5×0.05 mm 程度の大きさに成長した.

4.1.3 X線回折実験

結晶は回折実験の前に結晶化母液よりも PEG 濃度を上げた圧媒体 (35%(w/v) PEG 6000, 10 mM CaCl₂, 100 mM imidazole バッファー pH 6.5) に移した。

第三章に記述した HEWL の高圧実験と同様にして DAC に複数の結晶を異なる向きで封入し、ルビー蛍光法を用いて試料室内の圧力を測定した。圧力の測定は回折実験の前と後に行い、圧力が保たれていることを確認した。

ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体の高圧 X 線回折実験は 270, 500, 660, 750 MPa の圧力下で、波長 0.71~0.75 Å の X 線を用い、室温で行った。常圧下の回折実験はガラスキャピラリを用いて行った (Fig. 4.1(b), 操作は第三章参照)。データ収集のパラメータを Table 4.1 に示した。

4.1.4 位相決定, 構造精密化, 構造解析

回折データの処理とスケーリングは HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997) を使用した。反射強度の積分時には結晶のモザイシティの上昇を放射線損傷の確認に用い、各圧力においてモザイシティが上昇し始める前の損傷の少ないフレームのみをマージして構造解析に使用した。

ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体の常圧と 750 MPa における初期構造は, CCP4 suite (Winn *et al.*, 2011) の MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) を使用し, PDB に登録された ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体の構造 (PDB ID: 常圧構造は 1RB2, 750 MPa 構造は 1RA2) をサーチモデルとして分子置換法で決定した。その後, REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011) による自動精密化と Coot (Emsley & Cowtan, 2004) による手動精密化を繰り返して構造の精密化を行った。高圧条件下の構造は, 270 MPa 構造は常圧構造を初期構造として, 500 MPa 及び 660 MPa の構造は 750 MPa を初期構造として, REFMAC5 と Coot による精密化によって決定した。水分子は ARP/wARP Solvent (Lamzin & Wilson, 1993) で自動アサインし, B-factor が 60 Å² を超えるもの, 電子密度の σ 値が 1.00 electrons/Å³ を下回るもの, 近接原子との最短距離が 2.30 Å 未満または最長距離が 3.5 Å より大きいものは除いた。各圧力における ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体結晶構造の精密化における統計値を Table 4.2 に示す。常圧, 270, 500, 660, 750 MPa における原子座標と構造因子はそれぞれ PDB ID: 4X5F, 4X5G, 4X5H, 4X5I, 4X5J として Protein Data Bank に登録した。

ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体の溶媒排除体積はプログラム VOIDOO (Kleywegt & Jones, 1994) を用いてプローブ半径 1.4 Å で決定した。内部空隙の体積はプログラム CASTp (Dundas *et al.*, 2006) を使用してプローブ半径 0.9 Å で計算した。結晶構造の模式図は描画ソフトウェア PyMOL (DeLano, 2002) を用いて作成した。Fig. 4.9 の変位ベクトルは PyMOLWiki (<http://www.pymolwiki.org>) の modevector.py スクリプトを使用し, 分子内空隙は HOLLOW (Ho & Gruswitz, 2008) を用いて描画した。

4.2 結果

4.2.1 結晶格子と分子の圧縮

ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体結晶は 750 MPa までは回折が得られたが、800 MPa では完全に回折を失った。常圧から 750 MPa までの高圧構造を分解能 1.7~1.9 Å で決定した。すべての構造で DHFR の M20 ループは open コンフォメーションをとっていた。今回の複合体結晶では 270 MPa と 500 MPa の間で結晶-結晶間相転移が観測された。相転移において、HEWL の場合と異なり、対称性が向上して空間群は $P2_1$ から $C2$ へと変化した (Fig. 4.2)。元の $P2_1$ 格子は非対称単位に 2 分子 (A 分子, B 分子) を含んでいたが、この 2 分子は $C2$ 格子では結晶学的に等価になり、非対称単位に 1 分子が含まれる。常圧における A 分子と B 分子の構造の違いは Fig. 4.11 に示すように特に M20 ループと F-G ループに見られ、これらの領域の構造変化が相転移に大きく寄与している。 $P2_1$ の格子を $C2$ として換算した場合、結晶格子は 660 MPa まで単調に減少した (Fig. 4.3)。

$P2_1$ 格子の 2 つの ecDHFR 分子の溶媒排除体積は常圧でそれぞれ $3.23 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ と $3.24 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ であり、660 MPa と 750 MPa ではそれぞれ $3.10 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ と $3.12 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ になった (Fig. 4.4)。分子体積の減少も 660 MPa まではほぼ一様であった。分子体積の平均の圧縮率は $6.5 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$ で、第三章で述べた HEWL の値 $4.8 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$ や 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) ($5.4 \times 10^{-2} \text{ GPa}^{-1}$; Nagae *et al.*, 2012) に近い。また、Fig. 4.3 で見られるように、格子体積と分子体積は一旦圧縮された後、660 MPa から 750 MPa にかけて増加した。

4.2.2 分子内空隙の体積変化

ecDHFR の分子内空隙体積は 750 MPa まで単調に減少し、いくつかの空隙は HOLLOW で 1.4 Å プローブを用いた計算では検出されないほど圧縮された (Fig. 4.4, Fig. 4.5)。 $P2_1$ 格子の非対称単位に含まれる 2 つの分子の分子内空隙体積はそれぞれ常圧で $6.1 \times 10^2 \text{ \AA}^3$ と $5.7 \times 10^2 \text{ \AA}^3$ で、750 MPa では $3.1 \times 10^2 \text{ \AA}^3$ まで圧縮された。ほとんどの分子内空隙は圧力の増加にともなって圧縮され、特に Met42 と Leu54 に隣接する空隙は圧力によって誘起された Leu54 のコンフォメーション変化 (Fig. 4.6) を受けて 660 MPa から 750 MPa にかけて急激に圧縮された (Fig. 4.8)。一方で、Tyr151 上の空隙は圧力とともに圧縮された後、膨張が観察された (Fig. 4.8)。この空隙の体積は常圧で 20.1 \AA^3 と 20.4 \AA^3 、270 MPa では 18.8 \AA^3 と 19.1 \AA^3 であったが、相転移後は見かけの体積が増加し、500, 660, 750 MPa においてそれぞれ 26.0, 25.3, 25.0 \AA^3 であった。500 MPa 以上の圧力下では、Tyr151 上の空隙に水分子が侵入していることが観測され、これにより 270 MPa よりも空隙の見かけの体積が膨張していた。この水分子の侵入は近隣の残基の構造には影響を与えていなかった (Fig. 4.7)。

4.2.3 圧力によって誘起された分子構造の変化

ecDHFR 分子はアデノシン結合サブドメイン (残基番号 1~37, 89~159; Fig. 4.9 では青, 紫, シアン, 薄青で示す) とループサブドメイン (残基番号 38~88; Fig. 4.9 では緑, 黄,

橙で示す) から構成される。本研究では ecDHFR は葉酸と NADP⁺との複合体として結晶化されており、これらの化合物は活性サイトの溝に結合していた。M20 ループは、Sawaya らによって報告された類似条件の常圧構造 (Sawaya & Kraut, 1997) と同じように、すべての圧力構造において open コンフォメーションをとっていた (Fig. 4.10)。P2₁ 格子である低圧構造では、M20 ループの構造は A 分子と B 分子でわずかに異なっており (Fig. 4.11)、これは Pro21 と Trp22 が、結晶中で隣り合っている等価な分子と接触していることにより生じていた。常圧構造の A 分子に対する 270, 500, 660, 750 MPa の C α 原子の位置の RMSD はそれぞれ 0.17, 0.51, 0.57, 0.61 Å であった。常圧構造に対する 750 MPa 構造の分子の構造変化を Fig. 4.9 に示した。750 MPa において、B-C ループの後半 (残基番号 55~57) は α 1 (残基番号 25~35) に対して大きく動いている。一方、 α 3 (残基番号 78~85) と F-G ループの終わり (残基番号 126~132) は分子全体に対して動いており、分子全体としては活性サイトの溝の NADP⁺側が閉じるように分子がゆがんでいる。

Fig. 4.12 に示すように、分子全体の温度因子は、一部のループ領域を除くと、加圧によって減少した。一方で、Arg57 周りのループ領域と F-G ループの後半においては加圧による温度因子の増加が見られた。Arg57 周りのループ領域は Lys32 と Leu36 の間への水分子の侵入によって 750 MPa では大きく動いており (Fig. 4.13)、F-G ループの後半も Fig. 4.9 に示すように大きな動きが見られた領域であり、その平均 RMSD は 1.51 Å であった。

4.2.4 水和構造の変化

基質結合部位に近い残基において、圧力によって誘起された水分子の侵入をともなう ecDHFR の構造変化が観測された (Fig. 4.13)。常圧と 270 MPa においては Lys32 と Leu36 の間の分子表面に溝は存在しないが、500 MPa では水分子の侵入と Lys32 及び Leu36 の構造変化によって新たに溝が形成された。これらの水分子は Lys32, Thr35, Arg57 と水素結合を形成している。660 MPa において、Lys32 の側鎖のコンフォメーションが変化して侵入した水分子と水素結合を形成できるようになっており、Leu36 は B-C ループから離れるように移動している。750 MPa では Asp37 と Gly56 の間に新たな溝が形成され、B-C ループのコンフォメーション変化が観測された。Arg57 の移動によって Lys32 と Leu36 の間の溝はさらに広がっている。さらに、ecDHFR の基質結合サイトである Arg57 と葉酸の間に水分子が侵入して Arg57 側鎖のコンフォメーション変化が観測された (Fig. 4.14)。660 MPa までは Arg57 のグアニウム部分は基質アナログである葉酸のカルボキシル基と直接相互作用をしていたが、750 MPa 構造では水分子を介した相互作用になっていた。Arg57 の N η 2 原子と葉酸の O2 原子の距離は常圧から 660 MPa では 2.7 Å で、750 MPa では水分子をはさんで 4.6 Å になっていた。同様に、Arg57 の N η 1 原子と葉酸の O1 原子の距離は常圧、270, 500, 660 においてそれぞれ 2.8, 2.8, 2.6, 2.6 Å、750 MPa では水分子をはさんで 5.2 Å に増加した。

Fig. 4.15 に示すように、500 MPa 以上の圧力において NADP⁺のコンフォメーション変化が観測された。270 MPa 以下では NADP⁺のニコチンアミド部分は葉酸のプテリジン部分と

ファンデルワールス接触をしているが、500 MPa以上の圧力ではニコチンアミドーリボース部分がPN-O3軸周りに回転して結合サイトから離れている。ニコチンアミドーリボース部分があった場所には水分子が存在しており、葉酸のプテリジン部分と相互作用していた。この外側を向いたNADP⁺の構造は生成物複合体アナログであるecDHFR-ddTHF-NADP⁺(ddTHF, 5,10-dideazatetrahydrofolic acid; PDB ID, 1RC4; Sawaya & Kraut, 1997)において見られる構造と同様のものである。

4.3 考察

4.3.1 圧力によって誘起された分子の構造変化

本研究の結晶学的実験は常温で行っていることから、Keedyらによって指摘された凍結によるecDHFRの構造への影響(Keedy *et al.*, 2014)を回避することができていると考えられる。高圧力条件ではルシャトリエの原理に従って系の部分モル体積が減少する。加圧にともなって、270 MPaから500 MPaの間で空間群 $P2_1$ から $C2$ への圧力誘起相転移が観測されたが、 $P2_1$ 格子の非対称単位中の2分子が $C2$ 格子において等価になるにあたって、M20ループとF-Gループの構造変化が大きな寄与をしていた。元々の $P2_1$ 格子においてこれらの領域の2分子の間のRMSDは0.5 Åであり、分子全体のRMSDが0.19 Åであることを考えるとこの動きは非常に大きい。

Fig. 4.3に示すように、格子体積は660 MPaまで単調に減少し、750 MPaでは膨張した。過去に報告された高圧X線結晶構造解析において、 $d(\text{GGTATACC})_2$ 結晶の格子体積が1.5 GPa以上で膨張した例がある。この膨張の原因は結晶外から水を格子内に取り込んだことであると考えられている(Ascone, 2010a)。ecDHFRの場合は、水分子の取り込みだけではなく、おそらく分子体積の膨張が格子体積の膨張に寄与している。Fig. 4.4に示すように、分子体積は660 MPaまで圧縮されているが、750 MPaでは空隙体積は減少を続ける一方、分子の体積は増加している。分子内空隙の体積は分子体積よりも大きい圧縮性を示すことから、ecDHFRは基本的には分子内空隙を圧縮することで部分モル体積を減少させていると考えられる(Fig. 4.4)。さらにFig. 4.7に示すように、バルク領域からの水分子が、Tyr151上の空隙に侵入しチロシル基の芳香環との孤立電子対- π 相互作用(Egli & Sarkhel, 2007; Jain, *et al.*, 2009)によって局在していた。その結果として、空隙の見かけ上の体積は水分子を取り込めるように膨張するが、水分子の侵入によってバルク水の減少と空隙体積の相殺によって部分モル体積を減少させている。これは第三章のHEWLでも同じように見られた圧力応答機構である。

4.3.2 活性サイトの水和構造変化

Fig. 4.13に示すように、水分子の侵入は基質結合サイトにおいても観測された。葉酸のカルボキシル基は、疎水性の溝に存在する3つの正に荷電した残基Lys32, Arg52, Arg57に囲まれている。750 MPaにおいて、2つの水分子がArg57と葉酸の間に侵入しているが(Fig.

4.14), これらは 660 MPa では観測されない. 500 MPa ではこの水分子の侵入に先駆けて葉酸と Leu28 の間に水分子が侵入していた. また, 葉酸の O ϵ 原子との相互作用距離にあった Lys32 の N ζ 原子は側鎖のコンフォメーション変化によって葉酸とは反対を向き, Leu36 の構造変化にともなって侵入した水分子と水素結合を形成していた. ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体は DHFR のヒドリド移動反応前を模した構造 (Fig. 4.16, 赤い網掛け) であることから, Arg57 と葉酸の相互作用の変化と Lys32 のコンフォメーション変化による基質結合様式の変化は DHFR が基質を認識して結合する過渡的プロセス (Fig. 4.16, 紫の破線で囲った部分) のスナップショットであると考えられる. こうした反応の過程の観察は, 従来の結晶構造解析では不可能であったことから, 高压結晶構造解析の有効性を示している.

Met42 と Leu54 近くの空隙もまた ecDHFR の酵素活性に影響を与える可能性がある. 空隙に隣接する Met42 は活性サイトから離れているにもかかわらず, DHFR の機能にアロステリックに影響していることが M42W 変異体の NMR 研究から示唆されている (Mauldin & Lee, 2010). 計算機シミュレーション研究において, M42W 変異体は, Met42 と直接的な接触がない G-H ループの柔軟性を損なうことが報告されている (Roston *et al.*, 2014). 一方で, Leu54 は葉酸結合サイトに位置しており, 葉酸と Leu54 との直接的なファンデルワールス相互作用はミカエリス複合体において葉酸の p-アミノ安息香酸部分の適切な配向に寄与していることが示唆されており, L54I 変異体ではヒドリド移動の速度が低下することが報告されている (Liu *et al.*, 2013). 本研究で 750 MPa において観測した Leu54 のコンフォメーション変化は, Fig. 4.6 に示すように Arg57 による基質の認識に関係している. これらの結果は 42 番または 54 番の残基をトリプトファンやイソロイシンなどの嵩高い残基で置換した場合, 空隙の体積は 54 番の残基の側鎖を収納するにはあまりに小さくなり, 結果として Arg57 による基質の認識能力が低下するのではないかということを示している.

補酵素である NADP⁺については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て活性サイトの溝から外に出た構造を補足することに成功した. 葉酸は代わりに侵入した水分子と相互作用を形成していた. これらの結果は高压構造の研究によって, ecDHFR のミカエリス複合体の完成の直前の過渡的状态 (Fig. 4.16, 緑の 2 点鎖線で囲った部分) を捕捉することができたことを示している. ただし一方, NADP⁺のニコチンアミド環が外側を向いた構造については, ecDHFR-FOL-NADP⁺複合体の緩和分散 NMR 実験において常圧下でも僅かながら存在することが報告されており (McElheny *et al.*, 2005), ecDHFR のヒドリド移動反応後の構造 (Fig. 4.16 の青い網掛け) に近い構造を捕らえているとも考えられる. 反応サイクルにともなう補酵素の結合・解離の過程で ecDHFR に対して NADP⁺が弱く結合している状態の構造を圧力によって捕捉することに成功した.

Table 4.1 ecDHFR-FOL-NADP⁺ 結晶の高圧 X 線回折実験のパラメータと統計値

PDB code	4X5F	4X5G	4X5H	4X5I	4X5J
Pressure (MPa)	0.1	270	500	660	750
Diffraction source	FR-E SuperBright			PF-AR NW12A	
Wavelength (Å)	1.54178	0.75	0.75	0.71	0.71
Temperature (K)			Room temperature		
Detector	R-AXIS VII			ADSC Quantu 210r	
Crystal-detector distance (mm)	100	250	200	250	200
Rotation range per image (°)			1		
Exposure time per image (s)	30	10	5	5	5
Number of crystals used	3	3	3	3	3
Space group		$P2_1$		$C2$	
Unit-cell parameters					
a (Å)	38.96	38.72	74.18	73.49	73.88
b (Å)	59.93	59.37	58.64	58.52	58.59
c (Å)	72.32	71.70	38.28	38.11	38.20
β (°)	102.81	102.54	106.78	107.01	107.10
Mosaicity (°)	0.37-0.45	0.10-0.23	0.20-0.91	0.56-0.93	0.25-1.28
Resolution range (Å)	50.00-1.70 (1.73-1.70)	50.00-1.90 (1.93-1.90)	50.00-1.90 (1.93-1.90)	50.00-1.80 (1.83-1.80)	50.00-1.85 (1.88-1.85)
Total No. of reflections	141078	74935	52919	32396	67111
No. of unique reflections	35866	25274	12674	14675	13475
Completeness (%)	95.9 (80.1)	91.8 (95.0)	98.5 (99.8)	95.1 (94.8)	98.3 (100.0)
Redundancy	4.1 (3.5)	3.2 (3.0)	4.2 (4.4)	2.3 (2.2)	5.1 (5.1)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	20.7	29.3	27.0	16.8	16.7
R_{merge}^\dagger	7.8 (34.0)	5.4 (14.7)	7.6 (43.0)	6.3 (49.7)	8.4 (48.3)

$^\dagger R_{\text{merge}}$ is defined as $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the i th observation of reflection hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the weighted mean of all observations (after rejection of outliers).

最外殻の値は括弧内に示した。

Table 4.2 ecDHFR-FOL-NADP⁺ 構造の精密化の統計値

PDB code	4X5F	4X5G	4X5H	4X5I	4X5J
Pressure (MPa)	0.1	270	500	660	750
No. of reflections, working set	32606	21946	11688	13017	12504
No. of reflections, test set	1696	1166	597	695	657
Final R_{work} ‡	15.23	15.47	16.02	17.07	20.30
Final R_{free} §	18.97	20.85	22.22	24.05	26.45
Cruickshank DPI	0.10	0.16	0.16	0.15	0.18
No. of non-H atoms					
Protein	2546	2546	1268	1265	1268
Ligand/Ion	162	162	81	81	81
Water	217	173	130	137	134
Total	2925	2881	1479	1483	1483
R.m.s. deviations					
Bonds (Å)	0.022	0.019	0.019	0.019	0.018
Angles (°)	2.283	2.085	2.007	2.082	2.044
Average B factors (Å ²)					
Protein	21.10	19.62	25.02	21.91	19.20
Ion	29.17	25.71	39.38	38.31	32.80
Water	34.45	28.77	34.78	31.42	26.61
Ramachandran plot					
Most favoured (%)	98	98	99	99	98
Allowed (%)	2	2	1	1	2

‡ R_{work} is defined as $\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$. § R_{free} is calculated using 5% of the data that were randomly chosen and excluded from the refinement.

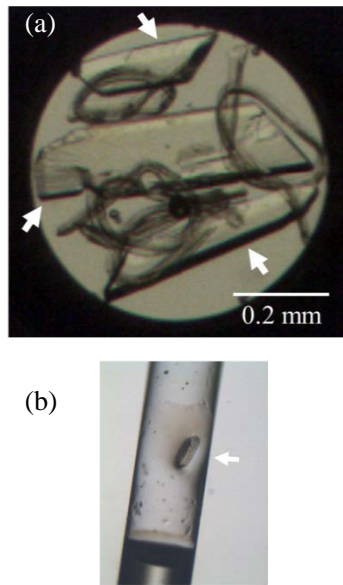


Figure 4.1 測定に用いた結晶の写真. (a) 高圧解説実験で使用した DAC に封入した結晶. 3 つの結晶 (白矢印) を異なる向きで試料室に入れ, 繊維で固定してある. (b) 常圧回折実験で使用したガラスキャピラリに封入した結晶. 結晶 (白矢印) は乾燥を防ぐために少量の結晶化母液とともに封入してある.

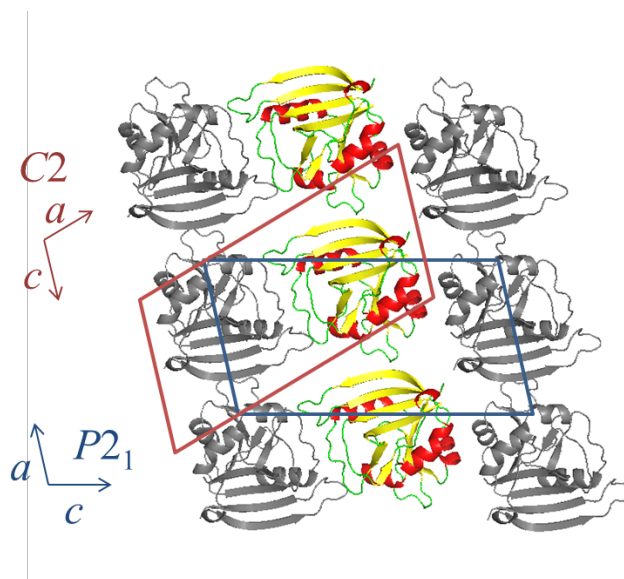


Figure 4.2 270 MPa と 500 MPa の間で観測された結晶-結晶間相転移にともなう空間群の変化. 空間群は $P2_1$ から $C2$ へと変化した. 元々の $P2_1$ 格子では非対称単位中に 2 分子が含まれていたが, $C2$ 格子では非対称単位中に 1 分子が含まれていた. $C2$ 格子の非対称単位に対応する分子を二次構造に従って色付けし, 他の分子は灰色で示した.

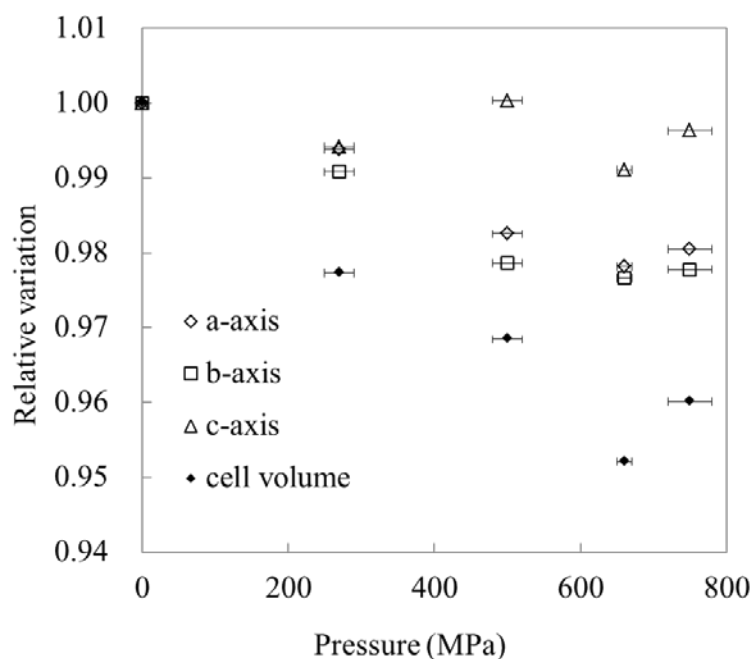


Figure 4.3 格子パラメータと格子体積の圧力依存性. *a* 軸 (◇), *b* 軸 (□), *c* 軸 (△), 格子体積 (●). 常圧と 270 MPa の値は $P2_1$ 格子を $C2$ 格子に換算している. 縦軸の誤差はシンボルの大きさよりも小さい.

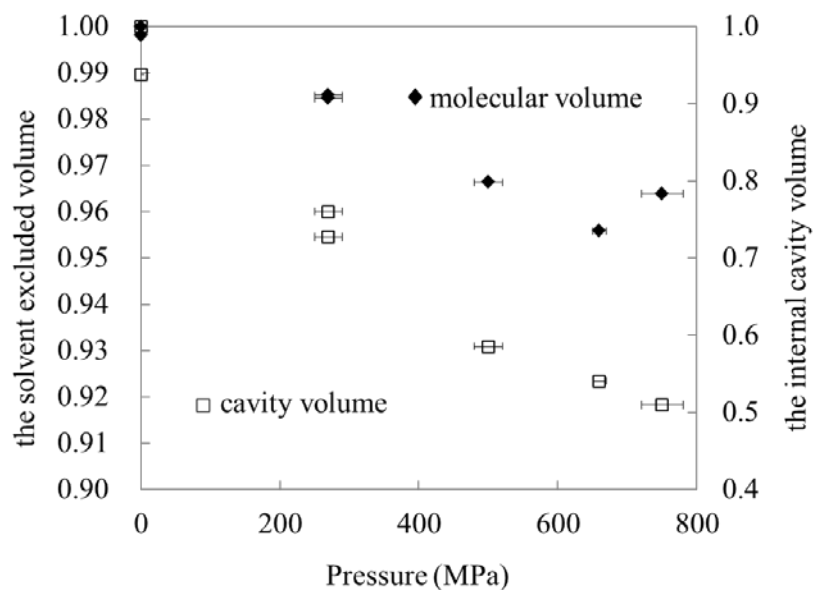


Figure 4.4 ecDHFR の溶媒排除体積 (◇) と分子内空隙体積 (□) の圧力依存性. 縦軸の誤差はシンボルの大きさよりも小さい. 加圧にともなって空隙体積は単調に圧縮されるが, 分子体積は 750 MPa において膨張が観測された.

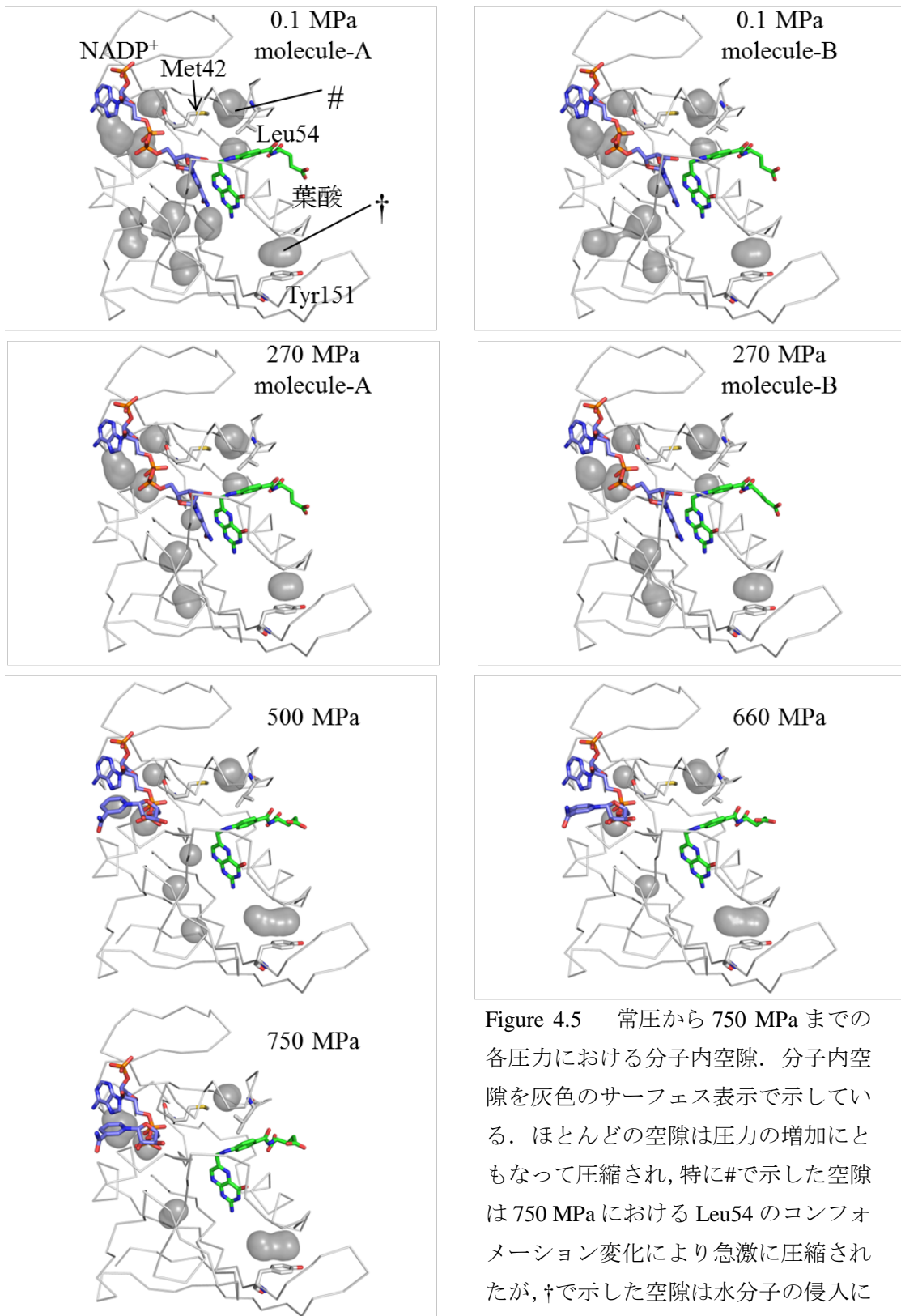


Figure 4.5 常圧から 750 MPa までの各圧力における分子内空隙. 分子内空隙を灰色のサーフェス表示で示している. ほとんどの空隙は圧力の増加とともに圧縮され, 特に#で示した空隙は 750 MPa における Leu54 のコンフォメーション変化により急激に圧縮されたが, †で示した空隙は水分子の侵入によって体積が増加していた.

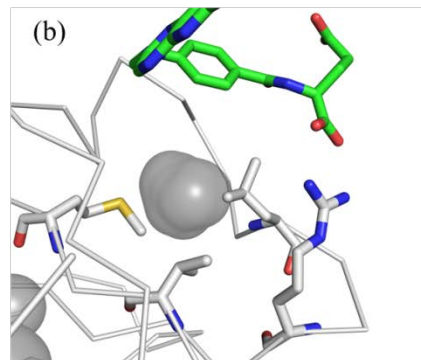
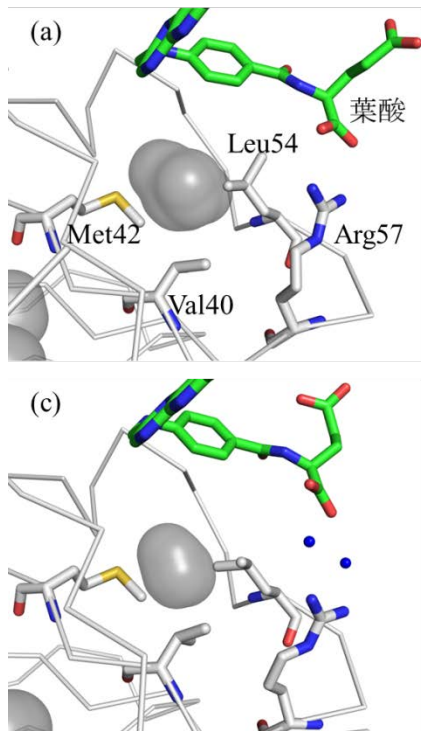


Figure 4.6 Leu54 近傍の分子内空隙 (Fig. 4.5 では “#” で示している). 750 MPa において Arg57 と葉酸の間に水分子が侵入していた. (a) 0.1 MPa. (b) 660 MPa. (c) 750 MPa.

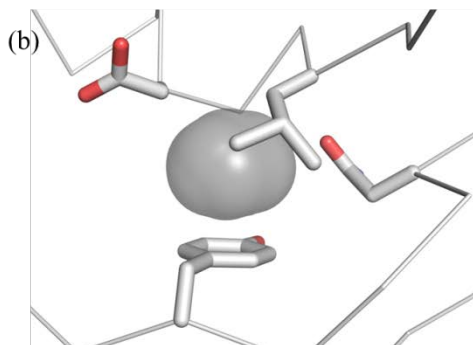
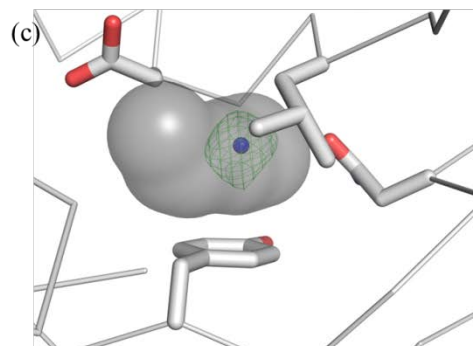
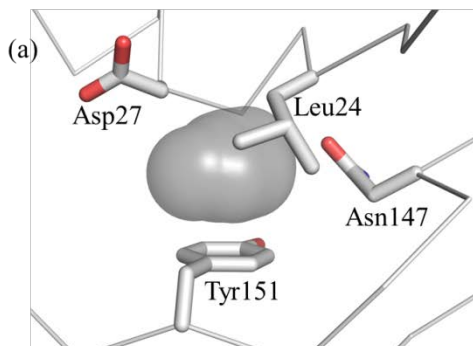


Figure 4.7 Tyr151 近傍の分子内空隙 (Fig. 4.5 では “†” で示している). 大部分の空隙は圧力の増加とともに圧縮されたが、この空隙には相転移後に水分子 (青球) が侵入し、体積が増加していた. 差電子密度の等高線レベルは 2.5σ . (a) 0.1 MPa. (b) 270 MPa. (c) 500 MPa.

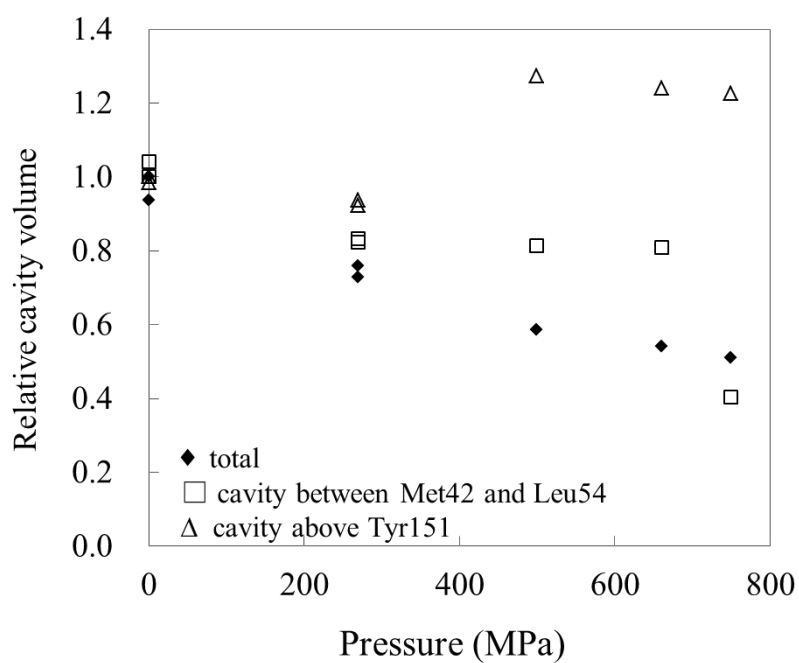


Figure 4.8 分子内空隙体積の圧力依存性. ecDHFR の全分子内空隙の体積の和 (◆), Met42 と Leu54 に隣接する空隙の体積 (□), Tyr151 上の分子内空隙の体積 (△). Met42 と Leu54 に隣接する空隙は加圧による Leu54 側鎖のコンフォメーション変化により 750 MPa において急激に圧縮された. 一方, Tyr151 上の空隙は 500 MPa 以上の圧力で水分子が侵入して膨張した.

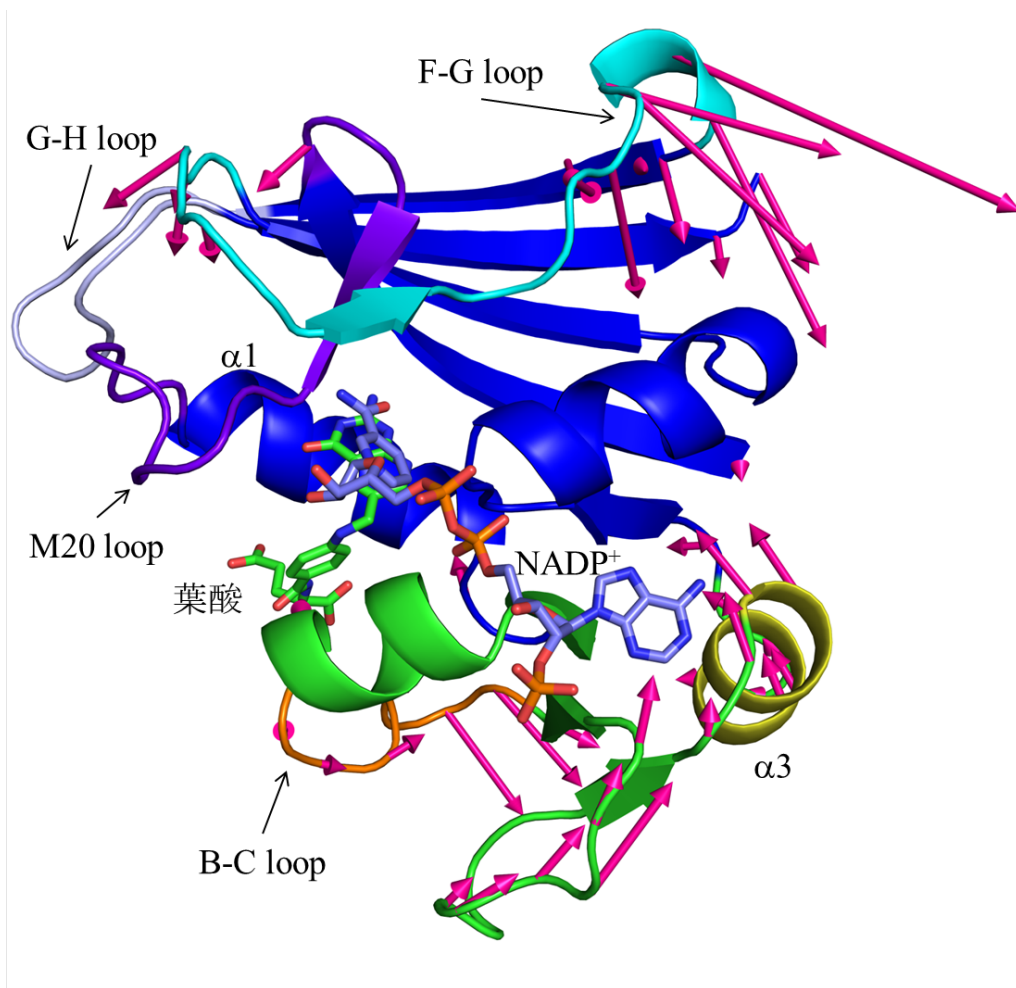


Figure 4.9 ecDHFR 分子の常圧と 750 MPa の間の構造変化. 2つの構造の $C\alpha$ 原子の位置の差をベクトルで示している. 矢印の長さは 10 倍で表示している. (青, アデノシン結合サブドメイン; 緑, ループサブドメイン; 黄, $\alpha 3$; 紫, M20 ループ; 橙, B-C ループ; シアン, F-G ループ; 薄青, G-H ループ).

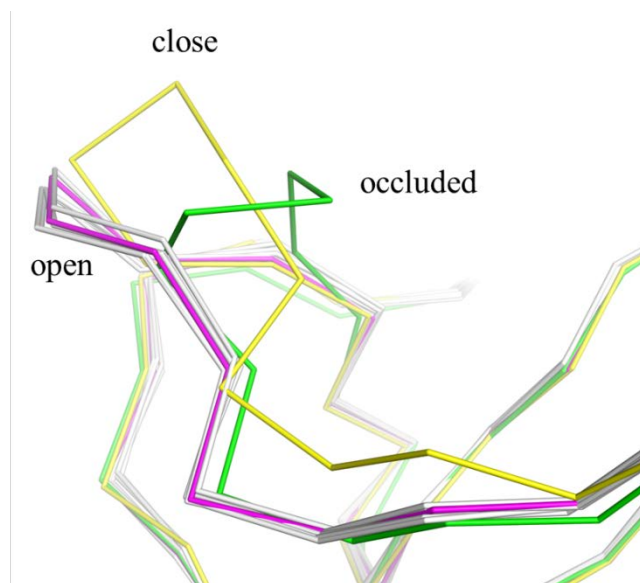


Figure 4.10 M20 ループのコンフォメーションの比較. マゼンタ, open 構造 (PDB ID: 1RA2); 黄, close 構造 (PDB ID: 1RX2); 緑, occluded 構造 (PDB ID: 1RX5); 白, 常圧から 750 MPa の構造. 我々が構造を決定した常圧から 750 MPa までの各構造はすべて PDB ID: 1RA2 で報告された open 構造とよく一致した.

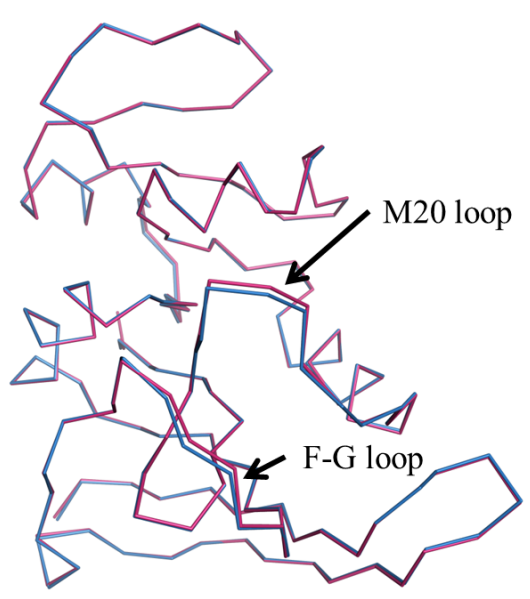


Figure 4.11 $P2_1$ 格子の非対称単位中に含まれる 2 分子の間の構造の違い. マゼンタ, A 分子; 青, B 分子. M20 ループと F-G ループに大きな構造の違いが見られる.

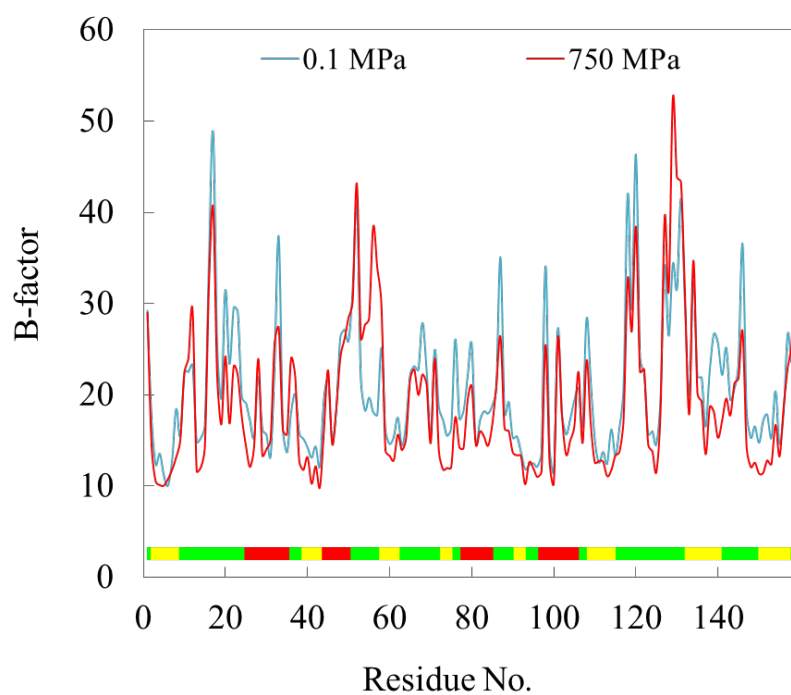


Figure 4.12 常圧と 750 MPa における各残基の平均温度因子. 常圧構造 (シアン), 750 MPa 構造 (赤). カラーバーは ecDHFR の二次構造を示す. 赤, ヘリックス; 緑, ループ; 黄, シート. 加圧によって全体的に温度因子が低下しているが, 一部のループ領域においては加圧による温度因子の増加が見られた.

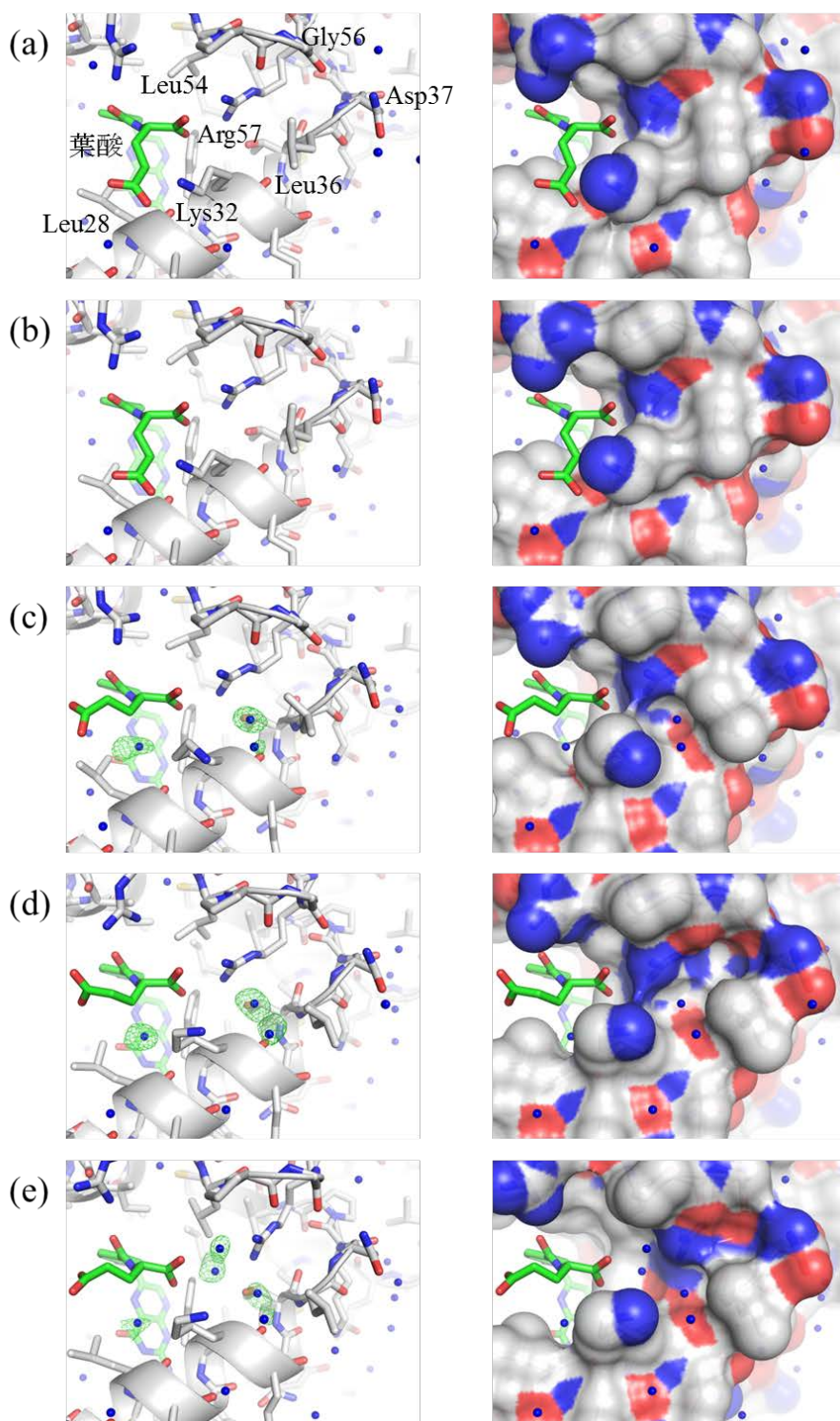


Figure 4.13 常圧から 750 MPa にかけての水和構造変化. 赤, 負に荷電した表面; 白, 電荷を持たない表面; 青, 正に荷電した表面; 青球, 水分子. 水分子の侵入にともなう Lys32 と Leu36 の構造変化が観測された. 差電子密度の等高線レベルは 3.0s. (a) 0.1 MPa. (b) 270 MPa. (c) 500 MPa. (d) 660 MPa. (e) 750 MPa.

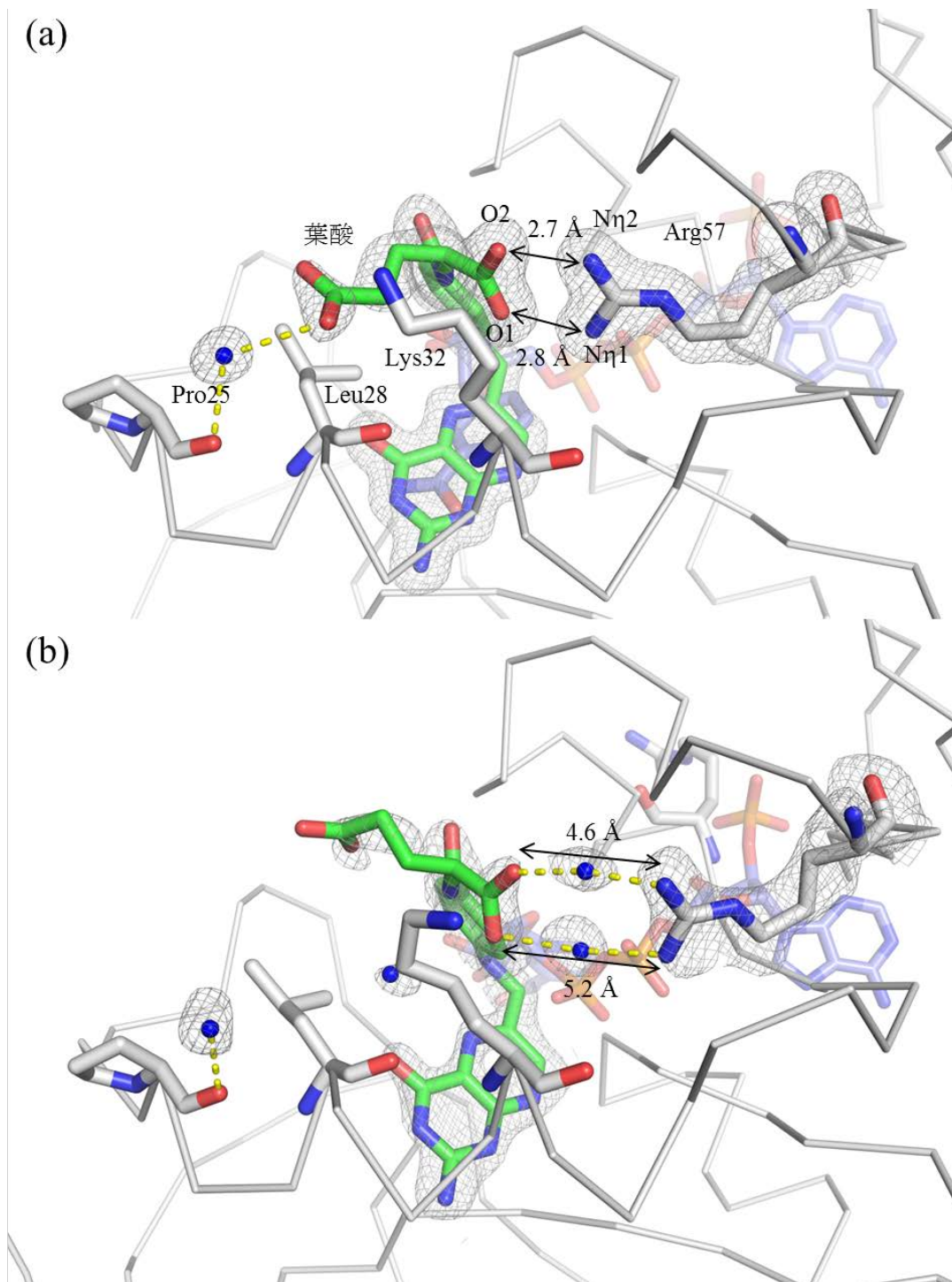


Figure 4.14 基質結合サイトへの水分子の侵入. (a) 0.1 MPa. (b) 750 MPa. 灰色で示した電子密度図の等高線レベルは 1.0σ . 750 MPa において Arg57 と葉酸の間に水分子が侵入して相互作用の様式が変わるとともに、水分子の侵入をとまなう Leu28 と Lys32 のコンフォメーション変化によって葉酸と Pro25 との相互作用が失われた。

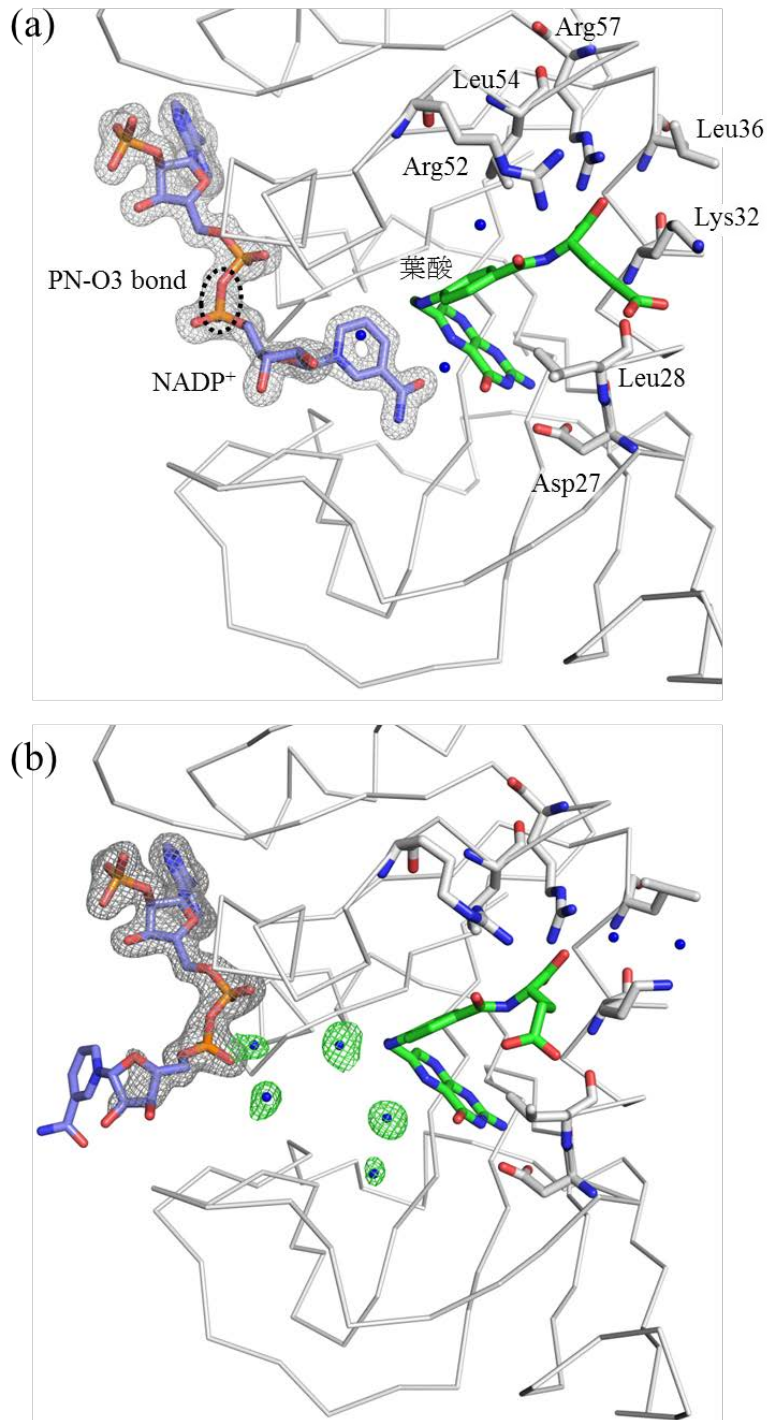


Figure 4.15 PN-O3 結合周りの回転による NADP⁺ のコンフォメーション変化. (a) 0.1 MPa. (b) 500 MPa. NADP⁺ と葉酸はスティック表示で示した. 500 MPa において, ニコチンアミドーリボース部分が PN-O3 結合周りで回転し, 代わりに侵入した水分子 (青球) が葉酸のプテリジン部分と相互作用を形成していた. 差電子密度の等高線レベルは 2.5σ .

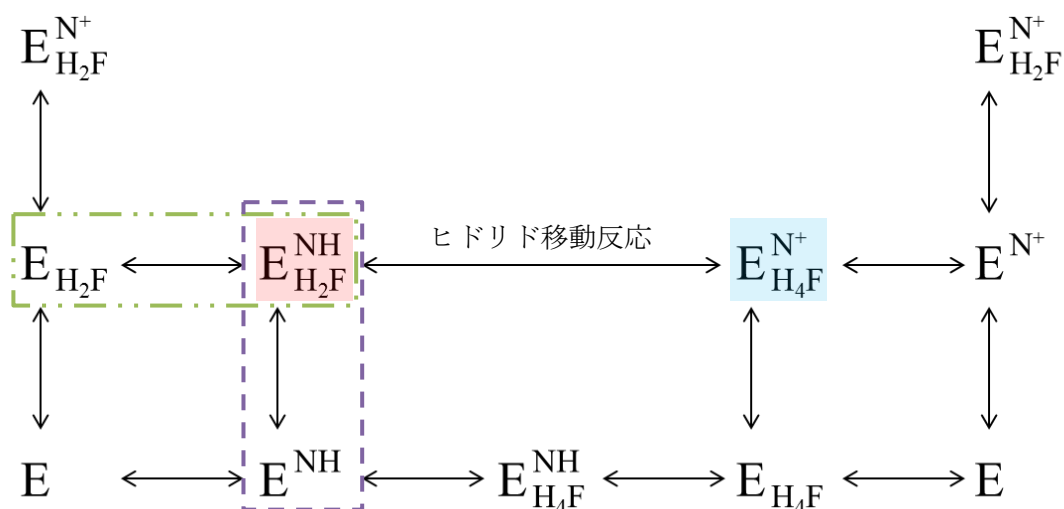


Figure 4.16 ecDHFR の反応経路の模式図. E, DHFR ; NH, NADPH ; N^+ , $NADP^+$; H_2F , 7,8-ジヒドロ葉酸 ; H_4F , 5,6,7,8-テトラヒドロ葉酸. Fierke らの反応経路 (Fierke et al., 1987) を参考にした. 本研究で使用したのは図中に赤い網掛けで示したミカエリス複合体のアナログ (ecDHFR-FOL- $NADP^+$ 複合体) である. また, ecDHFR-FOL- $NADP^+$ 複合体の緩和分散NMR実験において, 青い網掛けで示した反応後複合体がわずかに存在することが報告されている (McElheny et al., 2005). 本研究で捕捉することに成功したと考えている基質と補酵素の認識プロセスを, 紫の破線と緑の2点鎖線でそれぞれ示した.

第五章

結論

本研究によって、高圧結晶構造解析を行うための環境を PFAR-NW12A に整備し、HEWL と ecDHFR の高圧下における構造を 2 Å 以下の高分解能で決定することに成功した。DAC に結晶をサンプリングする上で多少の操作の習熟は必要であるが、加圧、圧力測定、ビームラインの回折計への DAC の搭載、そして高圧回折測定を容易に行える環境を整備できたと考えている (Chavas *et al.*, 2013a).

HEWL と ecDHFR はともに、常圧構造と高圧構造を比較することで蛋白質の準安定高エネルギー状態を観測することに成功した。加圧による分子内空隙の圧縮、疎水性空隙への水分子の侵入と孤立電子対- π 相互作用による水分子の局在、それにとまなう空隙の膨張、分子表面における溝の形成、生じた溝への水分子の侵入とそれにとまなう分子のコンフォメーション変化は両方の分子に共通して見られた。蛋白質分子内部の空隙での、水分子と芳香環の孤立電子対- π 相互作用は本研究で初めて観察されたものである。本研究では、これらの観察によって、蛋白質の部分モル体積を減少させるメカニズムとして一般的な機構を明らかにしたと考えている。

HEWL においては触媒機構にかかわる Glu35 の異常に高い pK_a を実現している分子メカニズムについて重要な情報を得ることに成功した (Yamada *et al.*, 2015a)。これまで、Glu35 の高い pK_a の原因についての分子構造に基づく議論は無い。本研究の結果、高圧で分子内に侵入した水分子が Glu35 と相互作用することで Glu35 側鎖の内向きコンフォメーションを安定化していた。この内向きコンフォメーションであれば、Glu35 の高い pK_a が説明出来る。NMR の結果には、Glu35 が Trp108 上の空隙の内側を向いた構造解析の例があった。溶液状態では Glu35 が内向きコンフォメーションを取ることで pK_a を上げている可能性を考えるとできる。しかし、NMR の構造では、なぜ Glu35 側鎖がエネルギー的に不利な疎水性空隙側を向くのかについては分からない。本研究で、Trp108 の上に水分子が局在し、その水分子が Glu35 と相互作用することで内向きコンフォメーションを安定化するという機構が明らかになった。この構造は通常の結晶構造解析法では観測できず、圧力によって蛋白質の高エネルギーの準安定構造の解析を可能としたことで初めて観測できたものである。

ecDHFR においては基質認識部位である Arg57 と基質アナログである葉酸について、DHFR の反応過程の過渡的プロセスにおいて、水分子を介した弱い相互作用が重要であることを明らかにした (Yamada *et al.*, 2015b)。補酵素である $NADP^+$ についてもニコチンアミド環が活性サイトの外側に向いた構造を捕捉することに成功しており、こちらの構造は $NADP^+$ が DHFR に結合する過渡的構造、もしくはヒドリド移動反応後の構造を捕らえている可能性があると考えられる。

本研究ではミカエリス複合体アナログについて高圧結晶構造解析を行ったが、ecDHFR は遷移状態アナログや生成物複合体アナログなど様々な複合体の結晶化条件が既に確立され

ている。そのため、他の複合体の高圧結晶構造解析によって現在構造が決定されている DHFR の反応サイクルの各状態間の過渡的な構造を捕捉することができると考えている。

本研究で高圧結晶構造解析によって、HEWL においては Glu35 が高い pK_a を獲得するメカニズムを初めて構造学的に明らかにし、DHFR においては酵素の反応サイクル間の過渡的構造を捕捉することに成功した。これらは従来の結晶構造解析では捕捉することが不可能であった高エネルギーの準安定構造であり、高圧結晶構造解析という手法の有用性を実証するものである。今後、その他の蛋白質についても高エネルギー構造を解析することで、蛋白質の機能に関する理解が深まると期待される。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 No. 21657027, No. 24657071 および, Photon Factory (課題番号 2012G648, 2014G566 ; ビームライン AR-NW12A) 及び Spring-8 (課題番号 2012A1242 ; ビームライン BL41XU) を利用したものである.

参考文献

- Agarwal, P. K., Billeter, S. R., Rajagopalan, P. R., Benkovic, S. J., & Hammes-Schiffer, S. (2002). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 2794-2799.
- Akasaka, K., Tezuka, T., & Yamada, H. (1997). *J. Mol. Biol.* **271**, 671-678.
- Ascone, I., Kahn, R., Girard, E., Prangé, T., Dhaussy, A.-C., Mezouar, M., Ponikwicki, N. & Fourme, R. (2010a). *J. Appl. Cryst.* **43**, 407-416.
- Ascone, I., Savino, C., Kahn, R. & Fourme, R. (2010b). *Acta Cryst.* **D66**, 654–663.
- Balny, C. (2006). *Biochim Biophys Acta*, **1764**, 632-639.
- Boehler, R. (2006). *Rev. Sci.Inst.* **77**, 115103.
- Boehr, D. D., McElheny, D., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2006). *Science*, **313**, 1638-1642.
- Bon, C., Lehmann, M. S. & Wilkinson, C. (1999). *Acta Cryst.* **D55**, 978-987.
- Brunne, R. M., & Van Gunsteren, W. F. (1993). *FEBS lett.* **323**, 215-217.
- Chavas, L. M. G., Matsugaki, N., Yamada, Y., Hiraki, M., Igarashi, N., Suzuki, M., & Wakatsuki, S. (2012). *J. Synchrotron Rad.* **19**, 450-454.
- Chavas, LMG, Nagae, T., Yamada, H., Watanabe, N., Yamada, Y., Hiraki, M. & Matsugaki, N., (2013a). *J. Synchrotron Rad.* **20**, 838-842.
- Chavas, L. M. G., Yamada, Y., Hiraki, M., Igarashi, N., Matsugaki, N. & Wakatsuki, S. (2013b). *J. Phys. Conf. Ser.* **425**, 012008.
- Cioni, P., & Gabellieri, E. (2011). *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 934-941.
- Collins, M. D., Hummer, G., Quillin, M. L., Matthews, B. W. & Gruner, S. M. (2005). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 16668–16671.

- Collins, M. D., Kim, C. U., & Gruner, S. M. (2011). *Annu. rev. biophys.* **40**, 81-98.
- DeLano, W. L. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System*, <http://www.pymol.org>
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y. & Liang, J. (2006). *Nucleic Acids Res.* **34**, W116–W118.
- Egli, M. & Sarkhel, S. (2007). *Acc. Chem. Res.* **40**, 197–205.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Cryst.* **D60**, 2126–2132.
- Falzone, C. J., Wright, P. E., & Benkovic, S. J. (1994). *Biochemistry*, **33**, 439-442.
- Fierke, C. A., Johnson, K. A., & Benkovic, S. J. (1987). *Biochemistry*, **26**, 4085-4092.
- Forman, R. A., Piermarini, G. J., Barnett, J. D. & Block, S. (1972). *Science*, **176**, 284-285.
- Fourme, R., Ascone, I., Kahn, R., Girard, E., Mezouar, M., Lin, T., & Johnson, J. E. (2003). *In Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. R. Winter, editor. Springer-Verlag, Berlin. 161–170.
- Fourme, R., Girard, E., & Akasaka, K. (2012). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 636-642.
- Fourme, R., Kahn, R., Mezouar, M., Girard, E., Hoerentrup, C., Prangé, T. & Ascone, I. (2001). *J. Synchrotron Rad.* **8**, 1149–1156.
- Girard, E., Dhaussy, A. C., Couzinet, B., Chervin, J. C., Mezouar, M., Kahn, R., Ascone, I. & Fourme, R. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 912-918.
- Girard, E., Kahn, R., Mezouar, M., Dhaussy, A.-C., Lin, T., Johnson, J. E. & Fourme, R. (2005). *Biophys. J.* **88**, 3562–3571.
- Goh, G. B., Hulbert, B. S., Zhou, H., & Brooks, C. L. (2014). *Proteins*, **82**, 1319-1331.
- Hayward, S., & Berendsen, H. J. (1998). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **30**, 144–154.

- Heremans, K., & Wong, P. (1985). *Chem. phys. lett.* **118**, 101-104.
- Ho, B. K. & Gruswitz, F. (2008). *BMC Struct. Biol.* **8**, 49.
- Imai, T., Ohyama, S., Kovalenko, A. & Hirata, F. (2007). *Protein Sci.* **16**, 1927–1933.
- Imai, T. & Sugita, Y. (2010). *J. Phys. Chem. B*, **114**, 2281–2286.
- Inoue, M., Yamada, H., Yasukochi, T., Kuroki, R., Miki, T., Horiuchi, T., & Imoto, T. (1992). *Biochemistry*, **31**, 5545-5553.
- Jain, A., Ramanathan, V., & Sankararamakrishnan, R. (2009). *Protein Sci.* **18**, 595-605.
- Jonas, J. (1990). *Ber. Bunsen. Phys. Chem.* **94**, 307-315
- Katrusiak, A. & Dauter, Z. (1996). *Acta Cryst.* **D52**, 607-608.
- Keedy, D. A., van den Bedem, H., Sivak, D. A., Petsko, G. A., Ringe, D., Wilson, M. A., & Fraser, J. S. (2014). *Structure*, **22**, 899-910.
- Kim, H. S., Damo, S. M., Lee, S. Y., Wemmer, D., & Klinman, J. P. (2005). *Biochemistry*, **44**, 11428-11439.
- Kimura, T., Sakamoto, K., Morishima, I., & Ishimori, K. (2006). *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 670-671.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 178–185.
- Krissinel, E., & Henrick, K. (2004). *Acta Cryst.* **D60**, 2256-2268.
- Kundrot, C. E. & Richards, F. M. (1986). *J. Appl. Cryst.* **19**, 208-213.
- Kundrot, C. E. & Richards, F. M. (1987). *J. Mol. Biol.* **193**, 157–170.
- Kuramitsu, S., & Hamaguchi, K. (1980). *J. biochem.* **87**, 1215-1219.
- Kuramitsu, S., Ikeda, K. and Hamaguchi, K., (1977) *J. Biochem.* **82**, 585-597.

- Lamzin VS. & Wilson KS. (1993). *Acta Cryst. D***49**, 129-147.
- Liu, C. T., Wang, L., Goodey, N. M., Hanoian, P., & Benkovic, S. J. (2013). *Biochemistry*, **52**, 5332-5334.
- Marchi, M. & Akasaka, K. (2001). *J. Phys. Chem. B*, **105**, 711–714.
- Mauldin, R. V., & Lee, A. L. (2010). *Biochemistry*, **49**, 1606-1615.
- McElheny, D., Schnell, J. R., Lansing, J. C., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 5032-5037.
- Merrill, L. & Bassett, W. A. (1974). *Rev. Sci. Instrum.* **45**, 290-294.
- Miller, G. P., Wahnon, D. C., & Benkovic, S. J. (2001). *Biochemistry*, **40**, 867-875.
- Murakami, C., Ohmae, E., Tate, S. I., Gekko, K., Nakasone, K., & Kato, C. (2010). *J. biochem.* **147**, 591-599.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst. D***67**, 355–367.
- Nagae, T., Kawamura, T., Chavas, L. M., Niwa, K., Hasegawa, M., Kato, C., & Watanabe, N. (2012). *Acta Cryst. D***68**, 300–309.
- Niimura, N., Minezaki, Y., Nonaka, T., Castagna, J.-C., Cipriani, F., Høghøj, P., Lehmann, M. S. & Wilkinson, C. (1997). *Nature Struct. Biol.* **4**, 909-914.
- Osborne, M. J., Schnell, J., Benkovic, S. J., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2001). *Biochemistry*, **40**, 9846-9859.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Phillips, D. C. (1967). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 484-495.

- Refaee, M., Tezuka, T., Akasaka, K., & Williamson, M. P. (2003). *J. Mol. Biol.* **327** 857–865.
- Roston, D., Kohen, A., Doron, D., & Major, D. T. (2014). *J. comput. chem.* **35**, 1411-1417.
- Roxby, R., & Tanford, C. (1971). *Biochemistry*, **10**, 3348-3352.
- Sawaya, M. R., & Kraut, J. (1997). *Biochemistry*, **36**, 586-603.
- Schnell, J. R., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2004). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **33**, 119-140.
- Schwalbe, H., Grimshaw, S.B., Spencer, A., Buck, M., Boyd, J., Dobson, C.M., Redfield, C., Smith, L. (2001) *Protein Sci.* **10**, 677-688.
- Søndergaard, C. R., Olsson, M. H., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 2284-2295.
- Suzuki, Y., Sasaki, G., Miyashita, S., Sawada, T., Tamura, K., & Komatsu, H. (2002). *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 345-356.
- Suzuki, Y., Tsukamoto, M., Sakuraba, H., Matsumoto, M., Nagasawa, M., & Tamura, K. (2010). *Rev. Sci. Inst.* **81**, 084302.
- Tan, K. P., Nguyen, T. B., Patel, S., Varadarajan, R., & Madhusudhan, M. S. (2013). *Nucl. acids res.* **41**, W314-W321.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.
- Vehlow, C., Stehr, H., Winkelmann, M., Duarte, J.M., Petzold, L., Dinse, J. & Lappe, M. (2011) *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btr163.
- Venkitakrishnan, R. P., Zaborowski, E., McElheny, D., Benkovic, S. J., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2004). *Biochemistry*, **43**, 16046-16055.
- Wallace, J. A., & Shen, J. K. (2011). *J. Chem. Theory and Comput.* **7**, 2617-2629.

Webb, H., Tynan–Connolly, B. M., Lee, G. M., Farrell, D., O'Meara, F., Søndergaard, C. R., Søndergaard, C. R., Teilum, K., Hewage, C., McIntosh, L. P., & Nielsen, J. E. (2011). *Proteins*, **79**, 685-702.

Winn, M. D. *et al.* (2011). *Acta Cryst. D* **67**, 235–242.

Wright, D. B., Banks, D. D., Lohman, J. R., Hilsenbeck, J. L., & Gloss, L. M. (2002). *J. mol. biol.*, **323**, 327-344.

Yamada, H., Nagae, T. and Watanabe, N., (2015a). *Acta cryst. D*, in press.

Yamada, H., Nagae, T. and Watanabe, N., (2015b). 投稿準備中

Yamada, H., Nishikawa, K., Honda, M., Shimura, T., Akasaka, K., & Tabayashi, K. (2001). *Rev. Sci. Inst.*, **72**, 1463-1471.

竹村謙一. (2005). *高圧力の科学と技術*, **15**, 3-8.