

# 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 High-pressure protein crystallography of dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*

山田裕之<sup>1</sup>, 永江峰幸<sup>2</sup>, 渡邊信久<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー,

<sup>2</sup>名古屋大学シンクロトロン光研究センター, <sup>3</sup>名古屋大学 大学院工学研究科,  
〒464-8603 名古屋市千種区不老町

Hiroyuki Yamada<sup>1</sup>, Takayuki Nagae<sup>2</sup>, Nobuhisa Watanabe<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Venture Business Laboratory, <sup>2</sup>Synchrotron radiation Research center,

<sup>3</sup>Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya, Aichi 464-8603, Japan

## 1 はじめに

蛋白質は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り, 通常の X 線結晶構造解析法や NMR 分光法によって得られる構造の多くは存在率が高い基底状態の構造である. 一方で, 蛋白質に圧力をかけると平衡状態がシフトするため, 通常の実験手法では観測困難な準安定状態が観測可能となると期待されている. そこで本研究課題では, *Escherichia coli* 由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (ecDHFR) を高圧条件下で結晶構造解析することでその準安定構造を解析し, 酵素反応メカニズムの詳細に迫ることを試みる.

## 2 実験

本研究課題ではダイヤモンドアンビルセル (DAC) を圧力発生装置として使用した. DAC による高圧構造解析実験ではダイヤモンドによる X 線の吸収が問題となるが, NW-12A の短波長 X 線 (0.71–0.75 Å) を使用することで X 線の吸収の低減を図った.

## 3 結果および考察

常圧から 750 MPa までの圧力条件下で, 補酵素 NADP<sup>+</sup> と葉酸 (基質アナログ) とのミカエリス-メンテン複合体の構造を解析した. 500 MPa 以上の圧力下では NADP<sup>+</sup> のコンフォメーション変化が生じ, ニコチンアミド環が活性サイトから外れることが明らかとなった (図 1). 元々ニコチンアミド環が存在していた位置には代わりに水分子が局在している. これは加圧によってミカエリス-メンテン複合体形成の初期段階の構造が現れていると考えられる.

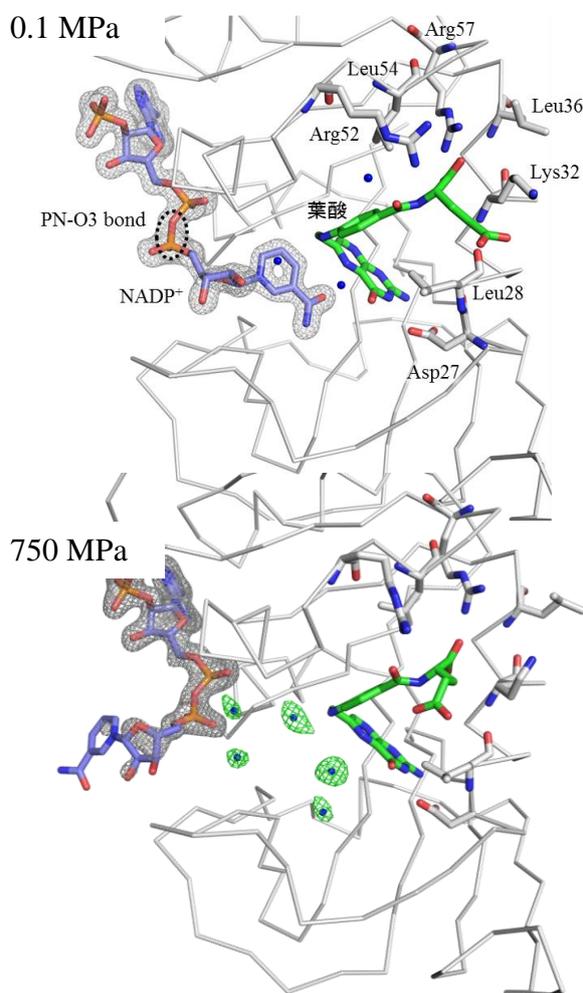


図 1 : 加圧による NADP<sup>+</sup> のコンフォメーション変化. PN-O3 結合周りの回転によりニコチンアミド環が活性サイトの外に出ている. 緑のメッシュは水分子の差電子密度マップ (2.5 $\sigma$ ) .

750 MPa 下の構造を解析した結果、葉酸と Arg57 の間に 2 つの水分子が侵入することが明らかとなった (図 2)。このような葉酸が弱く結合している構造は、基質が ecDHFR に認識されて結合が確立する途中の構造を捕らえたものであると考えられる。

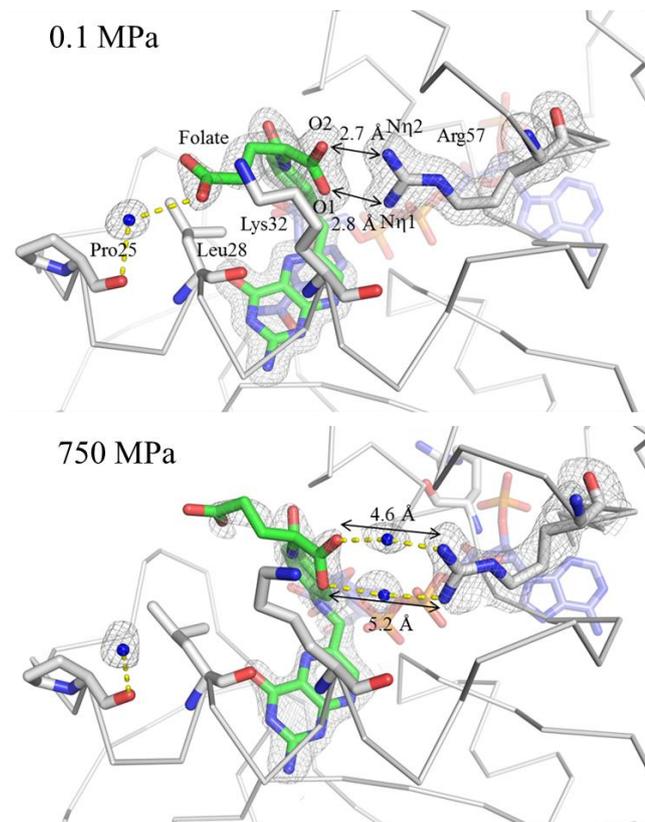


図 2 : 加圧による葉酸 (基質アナログ) の結合様式の変化. 750 MPa 下では水分子を介した相互作用になっている. Pro25 との水分子を介した相互作用も失われている.

#### 4 まとめ

本研究では *Escherichia coli* 由来ジヒドロ葉酸還元酵素の高圧構造解析によって、これまで観測されていなかった高エネルギー構造を新たに観測した。これらの構造から、ミカエリス-メンテン複合体の形成もしくは生成物複合体への移行といった触媒反応サイクルの仕組みを今後解明していく。

#### 参考文献

[1] Sawaya, M. R., & Kraut, J. (1997). *Biochemistry*, **36**, 586-603.

\* [nobuhisa@nagoya-u.jp](mailto:nobuhisa@nagoya-u.jp)