

重水素化蛋白質の温度因子精密化による重水効果の評価 An evaluation of deuterated protein by temperature refinement

上村拓也¹、喜田昭子¹、森本幸生^{1,*}

¹京都大学原子炉実験所, 〒590-0494 大阪府熊取町朝代西 2 丁目

Takuya Uemura¹, Akiko Kita¹ and Yukio Morimoto^{1,*}

¹Research Reactor Institute, Kyoto University, Kumatori, Osaka, 590-0494, Japan

1 はじめに

生体内蛋白質の構造と機能の解明は生命科学を進展させる上で重要なことであり、特に化学反応場である活性部位の精密な機能解析には水素、プロトン(化)の決定が必要である。蛋白質構造に関しては放射光利用による結晶構造解析が最も精度よく構造を決定できる。電子による散乱であるX線・放射光では電子数に差がない水素・重水素は区別がつかない。しかしながら平均自乗変位量で定義される原子の温度因子は、測定温度が同一であれば質量の増大に伴って原子核の熱振動速度は小さくなる。従って蛋白質分子内の水素(重水素)の温度因子精密化解析を行えば、軽水素と重水素の区別が可能であると考えられる。そのためには、水素原子位置が解釈可能な超高分解能(約 0.8Å 以下)データが必要である。本研究では、変性重水素化卵白リゾチームを用いてデータ収集、精密化を行い、分子全体の重水置換効果を評価した。

2 実験

卵白リゾチームを軽水溶媒で調製し結晶化を行った。同時に酸あるいは塩基を添加し立体構造を変性させたうえで重水溶媒に暴露し、巻戻しを行って結晶化を行った。結晶はそれぞれ大きさ約 0.5mm、空間群 $P4_32_12$ と従来の結晶晶系と変化が無かった。

回折実験は、BL17A を使い、波長 0.98Å、カメラ長 155mm、露出時間 1 秒で 210 フレーム/結晶で測定を行った。軽水型、酸変性重水型、塩基性変性重水素型の 3 種類のデータセットを得た。データ収集、スケーリングには iMosflm, Scala/CCP4i を使い、初期位相の決定に Molrep/CCP4i、精密化には Refmac5/CCP4i を用いた。表 1 にデータの統計値を示した。

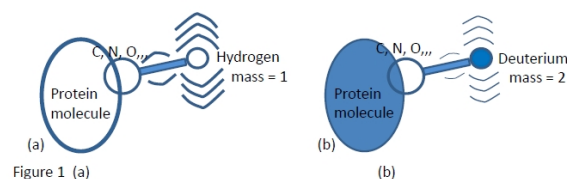
3 結果および考察

軽水型 H-Lyz と重水置換型結晶(HCl-Lyz, NaOD-Lyz)について、格子定数には有意な差はなかった。分解能については最大 0.93Å であったが、このデータからは水素原子の位置決定ができる電子密度は得られなかった。従って riding-model による水素発生を行い温度因子の精密化を進めた。R/Rfree は、19.8/21.3(HLyz), 19.5/21.8(DCl), 20.0/21.(NaOD)。

Table.1 Data statistics

Lysozyme	H-Lyz (PF)	DCl-Lyz (PF)	NaOD-Lyz (PF)
Wavelength (Å)	0.98	0.98	0.98
Resolution range (Å)	55.63 – 0.93 (55.63 – 0.93)	55.80 – 0.93 (0.95 – 0.93)	55.85 – 0.93 (0.95 – 0.93)
Space group	$P4_32_12$	$P4_32_12$	$P4_32_12$
Unit cell (Å, deg.)	78.7 78.7 36.8 90 90 90	78.9 78.9 36.9 90 90 90	79.0 79.0 36.9 90 90 90
Total reflections	799,857	719,283	772,845
Unique reflections	61,327 (2)	106,754 (31)	63,093 (4)
Multiplicity	13.0 (1.0)	6.7 (0.0)	12.2 (1.2)
Completeness (%)	79.0 (0.1)	71.0 (0.0)	80.3 (0.1)
Mean I/sigma(I)	36.5 (0.095)	13.1 (0.17)	11.6 (-0.31)

温度因子については以下の図に示すように原子の質量に伴って熱ゆらぎ振動が大きくなると考えられる。



X線回折における温度因子(B-Factor)は蛋白質中の原子あるいは蛋白質一分子の熱ゆらぎの大きさを表すファクターであり、原子(分子)の平均二乗変位に比例する。この変異量について一原子の運動として、2原子間に働くばねモデルとして式の展開、解析を行った。原子1(C,N,O)の質量は重水素化しても一定なので、水素の質量の変化のみが変化量式に影響を与える。

4 まとめ

今回のデータ収集では水素原子の位置決定ができなかったため個々の原子の温度因子変化量は決定できなかったが、分子全体の質量増加による温度因子変化量を先に述べたばねモデルに従う各種パラメータを用いて決定することができた。

成果

1. T.Uemura, etl. al., Evaluation of molecular perturbation of a deuterated protein by temperature factor refinement in X-ray structural analysis of high-resolution diffraction data.

J.Biotech.Biomat., in press

* morimoto@rri.kyoto-u.ac.jp