

変性重水素化リゾチームの結晶構造解析 Crystal structure analysis of H/D exchanged lysozyme

上村拓也^{1,2}、森本幸生^{2,*}

¹京都大学大学院理学研究科, 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

²京都大学複合原子力科学研究所, 〒590-0494 大阪府熊取町朝代西 2 丁目

Takuya Uemura^{1,2} and Yukio Morimoto^{2,*}

¹Graduate School of Science, Kyoto University, Kita-shirakawa, Kyoto, 606-8502, Japan

²Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University,
Kumatori, Osaka, 590-0494, Japan

1 はじめに

蛋白質分子内の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）の決定が必要であり、そのための中性子利用は放射光利用とともに反応場解明の必須の解析手段である。精度のよい中性子解析のためには重水置換された試料、結晶が必要である。我々は天然状態にある蛋白質の変性・重水暴露・巻き戻しという重水素化方法を考案してきた(A. Kita, Y. Morimoto, 2016)。この方法では少量の重水溶媒で重水交換率を向上させることができたと考えている。重水素、プロトン化などの位置決定には中性子を用いて決定するが、放射光によっても超高分解能データが取得できれば水素位置の決定も可能である。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）の温度因子はこれに追従し、結果的に電子密度表示に違いがでるものと考えられる。直接水素原子が観測されない場合でも、そこにつながる主鎖・側鎖の温度因子には差が出るのが Artero I. B., et al., 2005 に報告されている。

2 実験

Sigma から購入した卵白リゾチームを用いた。軽水で精製されたもの(H-Lys)、強酸(DCl)で変性させて巻き戻したもの(DCl-Lys)、強塩基(NaOD)で変性させて巻き戻したもの(NaOD-Lys)、3種類を用意した。それぞれの濃度は、H-Lys: 40 mg/mL, DCl-Lys: 40 mg/mL, NaOD-Lys: 60 mg/mL である。結晶化溶液として 0.1 M 酢酸・酢酸ナトリウム 0.1 M (pH 4.6)、25% エチレングリコール、6~15% NaCl、D₂O を使用した。20°C で微量蒸気拡散法による結晶化を行い、いずれも tetragonal 結晶を得た。

BL-17A 放射光測定ではカメラ長 155 mm、波長 0.98 Å、露出時間 1 sec、210 フレームの回折像を得た。データ収集には CCP4i/iMosflm、CCP4i/SCALA を用いた。

3 結果および考察

放射光回折で得られたデータを解析した結果、空間群はいずれも $P4_32_12$ であり、H-Lys: $a=b=78.7$, $c=36.8$ Å、DCl-Lys: $a=b=78.9$, $c=36.9$ Å、NaOD-Lys: $a=b=79.0$, $c=36.9$ Å であった。PDB に登録されている卵白リゾチームの構造 1LYZ をモデル分子として、CCP4i/Refmac5、Coot を用いて構造精密化を行った。構造解析の結果、軽水試料と重水素化試料はほぼ同じ構造をとっており、巻き戻し重水素化による構造の変化はないことが確認された。また蛋白質全体の温度因子を比較すると、軽水試料の方が重水置換試料よりもわずかながら大きかった。

表 1 リゾチーム軽水結晶、重水置換結晶の放射光回折データおよび精密化

Lysozyme	H Lys (PF)	DCl Lys (PF)	NaOD Lys (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)
Wilson B-factor (Å ²)	19.705	18.638	19.437
R-merge	0.016 (0.000)	0.047 (0.000)	0.058 (0.000)
R-work	0.198	0.195	0.200
R-free	0.213	0.218	0.214
Number of non-hydrogen atoms	1175	1090	1092
macromolecules	1961	1961	1961
ligands (Na,Cl)	0	0	0
water	174	89	101
Protein residues	129	129	129
RMS(bonds) (Å)	0.026	0.028	0.030
RMS(angles) (deg.)	2.2	2.2	2.3

本実験においては高い分解能まで有効なデータが取れていることから、水素原子に相当する電子密度を数か所確認できることが期待できた。

4 参考文献

A. Kita and Y. Morimoto, *Mol. Biotechnol.*, 58, 130-136 (2016)

Artero, J.B., et al., *Acta Cryst. D*, 61, 1541-1549 (2005)

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