

センターを中心に展開される研究

蛋白質結晶構造解析の手法開発とその応用

1. 研究成果:

1-1. 高圧結晶構造解析:

圧力が蛋白質の構造に及ぼす効果は分子レベルでは未解明です。例えば深海生物の蛋白質は数百MPa (数千気圧) 以上の水圧にも耐えますが、それを可能にしている分子構造上の原理は不明です。我々はダイヤモンドアンビルセル(DAC)と放射光の短波長X線による高圧蛋白質結晶構造解析法を駆使して構造解析を実施し、水和構造を含む蛋白質の圧力挙動と耐圧メカニズムを解明することを目的とした研究を進めています。これまでにイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)の圧力耐性メカニズムを研究し、マリアナ海溝から採取された細菌のIPMDHでは高圧下での分子表面からの水分子の侵入を防ぐことで活性を維持する仕組みが備わっていることを明らかにしました(図1)。他にも、このような耐圧性酵素だけではなく、むしろ高圧下で活性が増大するような酵素について、その分子機構の解明や、さらには部分モル体積といった熱力学的概念と分子構造の接続を目指した研究を進めています。



教授
渡邊 信久

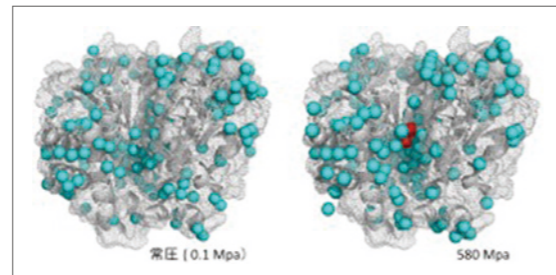


図1: IPMDHの分子表面の水分子。右(580MPa)の赤色の水分子は高圧力下で始めて分子表面に出現する。この水分子の侵入を阻止するわずかな残基の変異体蛋白質は耐圧性を獲得する。

1-2. 長波長利用結晶構造解析:

近年、セレンメチオニル化や重原子誘導体作製によらない新規タンパク質の構造解析法として、蛋白質中に始めから存在するイオウ原子の異常散乱を利用するS-SAD法が注目されてきました。イオウ原子のK吸収端は5.0Å付近にあるため異常散乱効果の測定には長波長X線の利用が必要ですが、長波長のX線は物質との相互作用が大きいため、結晶自体や周辺の物質で吸収されるため、微弱な異常散乱効果を高精度で計測することは困難です。我々は、S-SAD法構造解析に適用可能な、タンパク質結晶のみを周辺に氷の無い状態で容易に凍結マウントする方法を開発し、その改良を続けています。

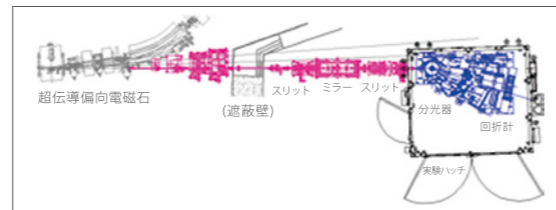


図2: 蛋白質結晶構造解析用ビームライン全体図

2. 得意とする考え方・手法:

2-1. 高圧結晶構造解析:

蛋白質の耐圧性研究のみならず、圧力をパラメタとして蛋白質の高エネルギー準安定構造の研究を行うことにDACを用いた高圧結晶構造解析法を利用することが出来ます。DACによる蛋白質結晶の加圧は水が固相にならない1GPa程度まで可能ですが、蛋白質の溶解度は圧力に依存するため、高圧状態を実現するためには事前の十分な条件検討が必要です。

2-2. 長波長利用結晶構造解析:

セレンメチオニル化や重原子誘導体作製が困難な蛋白質の場合、蛋白質中に始めから存在するイオウ原子の異常散乱効果を利用したS-SAD法で構造解析を試みる事が可能です。名古屋大学超強力X線回折実験室には長波長のCr K α 特性線(波長2.3Å)を使用可能な蛋白質結晶用構造解析システムも備えられており、その利用のサポートが可能です。

2-3. シンクロトロン放射光利用:

シンクロトロン光研究センターでは、2013年末から、あいちシンクロトロン光センターのBL2S1に蛋白質結晶構造解析用のビームラインの建設整備を開始しました。大面積の二次元検出器を備え、通常の波長1Å程度の利用に加えて、DAC使用のための短波長0.7Åと、S-SAD法を考慮した長波長1.8Å用の分光結晶を整備する予定です(図2, 3)。なお、供用形態や利用方法は協議中です。

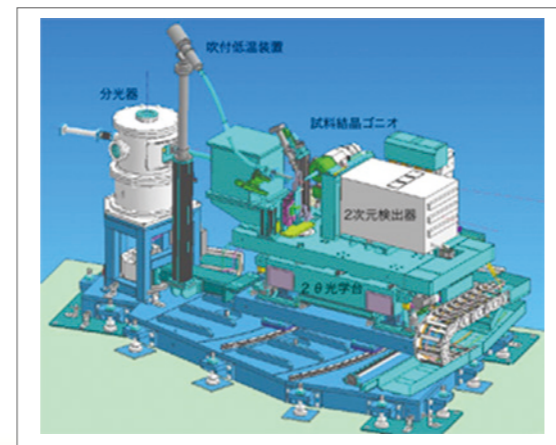


図3: 蛋白質結晶構造解析用回折計のイメージ図

3. 論文発表:

Chavas, LMG, Nagae, T., Yamada, H., Watanabe, N., Yamada, Y., Hiraki, M. and Matsugaki, N.: New methodologies at PF AR-NW12A: implementation of high-pressure macromolecular crystallography, *J. Synchrotron Rad.*, 20(6), 838-842 (2013).

Kitamura, S., Ode, H., Nakashima, M., Imahashi, M., Naganawa, Y., Kurosawa, T., Yokomaku, Y., Yamane, T., Watanabe, N., Suzuki, A., Sugiura, W. and Iwatani, Y.: The crystal structure of APOBEC3C and the interface for HIV-1 Vif binding, *Nature Structural & Molecular Biology*, 19, 1005-1010 (2012).

Goddard-Borger, ED., Sakaguchi, K., Reiting, S., Watanabe, N., Ito, M. and Withers, SG.: Mechanistic Insights into the 1,3-Xylanases: Useful Enzymes for Manipulation of Algal Biomass, *J. Am. Chem. Soc.*, 134(8), 3895-3902 (2012).

Nagae, T., Kawamura, T., Chavas, LMG, Niwa, K., Hasegawa, M., Kato, C. and Watanabe, N.: High-pressure-induced water penetration into 3-isopropylmalate dehydrogenase, *Acta Cryst.*, D68(3), 300-309 (2012).

Kitago, Y., Watanabe, N., and Tanaka, I.: Semi-automated protein crystal mounting device for the sulphur SAD method, *J. Appl. Cryst.*, 43(2), 341-346 (2010).

Watanabe, N., Takasaki, Y., Sato, C., Ando, S. and Tanaka, I.: Crystal structures of restriction endonuclease *HindIII* complex with its cognate DNA and divalent cations, *Acta Cryst.*, D65(12), 1326-1333 (2009).

Kitago, Y., Karita, S., Watanabe, N., Kamiya, M., Aizawa, T., Sakka, K. and Tanaka, I.: Crystal structure of Cel44A, GH family 44 endoglucanase from *Clostridium thermocellum* *J. Biol. Chem.*, 282(49), 35703-35711 (2007).

Watanabe, N.: From phasing to structure refinement in-house: Cr/Cu dual wavelength system and an loopless free crystal mounting method, *Acta Cryst.*, D62(8), 891-896 (2006).

4. 招待講演:

N. Watanabe: Practical crystal mounting method for the longer wavelength SAD phasing, ACA2010 Workshop (2010.7.24) The Univ. Illinois at Chicago.

N. Watanabe: On the Use of a New Crystal Mounting Method for the Longer X-ray S-SAD Phasing, ACA2007, 2007.7.21-26, Salt Lake City, Utah, USA.