

中性子結晶解析によるタンパク質分解機構の解明

Neutron diffraction study of Proteinase K.

茶竹 俊行¹⁾ 森本 幸生¹⁾ 栗原 和男²⁾

Toshiyuki CHATAKE Yukio MORIMOTO Kazuo KURIHARA

¹⁾京都大学・原子炉 ²⁾原子力機構

セリンプロテアーゼは、その高い酵素活性により洗剤や食品加工等の工業分野に積極的に応用されている。サブチリシン型セリンプロテアーゼの一つである Proteinase K の中性子結晶構造解析を行い、水素・水和構造の観点からそのタンパク質分解機構の解明を行う。

キーワード: プロテアーゼ, タンパク質結晶, 中性子回折, 重水素化

1. 目的 プロテアーゼはペプチド結合を加水分解する酵素であり、様々な種類のものが、栄養吸収、タンパク質の廃棄、生体防御など、多様な生体内反応に関わっている。その中でも、特定のタンパク質・ペプチドの特定の部位だけを特異的に切断する高度な選択性を持つタイプのセリンプロテアーゼは、その特性により洗剤や食品加工等の工業分野に積極的に応用されている。本研究では、サブチリシン型セリンプロテアーゼの一つである Proteinase K の中性子結晶構造解析を行い、水素・水和構造の観点からそのタンパク質分解機構の解明を行う。今回は、中性子回折に適した結晶の作成と、中性子回折の予備実験を行った。

2. 方法 Proteinase K は硝酸ナトリウムを用いた結晶化により、高分解能の X 線結晶構造が報告されているが⁽¹⁾、この条件では中性子回折実験に適した結晶を得ることが出来ていない。これは、結晶化に利用される高濃度の硝酸ナトリウムによるものであると推測される。また、この影響により多数の硝酸イオンが結晶中に混入してしまい、本当に活性構造をとっているかも疑問がある。今回は、無機塩類を出来るだけ排除して、ネイティブ状態に近い結晶化条件で中性子用の高品質・大型結晶の作成を試みた。また、中性子回折では溶媒として軽水を重水に置換して用いることが多いが、この効果についても検討を行った。これらの情報を基にして結晶を作成して、中性子回折実験を行った。

3. 研究成果 Proteinase K (Sigma) を用いてスクリーニングを行い、酢酸カルシウムとポリエチレングリコール 8000 (PEG8000) の組合せで結晶を得ることに成功した。また、カルシウム塩は亜鉛塩や他の二価金属イオンに変更しても、同等の結晶を得ることが出来る。以下の条件を最終的な結晶化条件とした。

結晶化法: ハンギングドロップ蒸気拡散法

溶液組成(液滴): 10mg/ml Proteinase K, 50mM Sodium Cacodylate (pD6.7), 25mM Ca(Ac)₂, 4.5%PEG8000

溶液組成(リザーバー液): 100mM Sodium Cacodylate (pD6.7), 50mM Ca(Ac)₂, 9% PEG8000

本条件は、核形成を抑えつつ結晶成長を早めるバランスを考慮して決定した。本法により 1 週間程度で 0.3-0.7mm 角の結晶を得ることが出来る。

次に、放射光を用いて結晶の品質の評価と結晶構造の決定を行った。現在、1.32 Å 分解能で R 値 13.5% (R_{free} 値 15.5%) の構造を得ている。この結晶は非常に良質であり、従来の硝酸アンモニウム法と同等、もしくはそれ以上の精度で解析が達成できた。しかも、硝酸ナトリウム法で結晶中に多数混入していた硝酸イオンが水分子に置き換わり、Tyr60 と Arg250 で起こっていた側鎖の構造の歪みが解消している。これにより今回の立体構造はよりネイティブ状態に近い構造をとっていると思われる。

この結果を基にして、中性子用の結晶を重水中で作成した。この段階で、放射光を用いて溶媒の重水化が結晶に与える影響を測定した。溶媒を 100%H₂O から 100%D₂O まで 25%刻みで変化させて結晶

化し、X線回折データを収集した。結晶の品質は結晶の相対温度因子の比較⁽²⁾により行った。温度因子は、 3.69 \AA^2 (H₂O 100%)、 3.99 \AA^2 (H₂O 75%/D₂O 25%)、 4.04 \AA^2 (H₂O 50%/D₂O 50%)、 5.18 \AA^2 (H₂O 25%/D₂O 75%)、 4.86 \AA^2 (D₂O 100%)となり、重水の含有量の増加とともに結晶の品質の劣化が僅かながら観測された。

中性子回折実験は JRR-3M の BIX-3(モノクロメーターSi(111))を用いて行った。結晶体積は 0.03mm^3 で、16時間の露光撮影を0,90度の2方向で行った。この結果、1フレームあたり3-5個の回折斑点を最大分解能 7.9 \AA で観測することが出来た。

4. 結論・考察 今回は中性子結晶解析に向けた Proteinase K の単結晶作成と中性子回折の予備実験を行った。結晶化では、水素・水和構造に適したよりネイティブに近い単結晶の作成に成功した。また、重水中での結晶化でも、温度因子の僅かな低下 (1.17 \AA^2) した結晶の作成を行い、中性子回折実験に使用できた。しかしながら、低角の反射しか観測することが出来なかった。この原因として、結晶の大きさが 0.03mm^3 と小さかったこと、格子定数が大きい ($4.7 \times 10^5 \text{ \AA}^3$) こと⁽³⁾が考えられる。今後、中性子回折実験に供するための方策としては、以下の2つが必要である。

(1) 低温での中性子回折実験: この結晶は、液体窒素温度 (~100K) では非常に温度因子が低い ($3-5 \text{ \AA}^2$)。中性子散乱長は回折角に対してほぼ一定であるため、温度因子が十分低いならば高角から低角までの反射を一律に測定することが容易である⁽⁴⁾。現在、BIX-3 で検討されている低温装置が実現すれば、Proteinase K 結晶の中性子回折結果は大きく改善すると思われる。

(2) Proteinase K の高純度化: Proteinase K は市販品を未精製状態で使用しても良質な単結晶が得られるが、ゲル濾過クロマトグラフィーで検査したところ、約30%が Proteinase K の自己切断物であり、純度は比較的高くない。これが、Proteinase K の結晶化における核形成を誘発していると考えられる。ゲル濾過クロマトグラフィーとプロテアーゼインヒビターの組合せによる精製⁽⁵⁾を現在検討中である。

これらの問題が解決した後に、中性子回折実験を再度試みることを希望する。

5. 引用(参照)文献等

- (1) Bajorath J., Hinrichs W., Saenger W., (1988) The enzymatic activity of Proteinase K is controlled by calcium. *Eur. J. Biochem.* **176**, 441-447.
- (2) Arai S., Chatake T., Suzuki N., Mizuno H., Niimura N. (2004) More rapid evaluation of biomacromolecular crystals for diffraction experiments. *Acta Crystallogr.* **D60**, 1032-1039.
- (3) Kurihara K. (2007) International Workshop on Ibaraki Biological Crystal diffractometer Proceedings.
- (4) Niimura N., Chatake T. (2003) Neutron structural biology, complementarity between neutron and X-ray. *Hamon* **13**, 47-50.
- (5) Bajorath J., Saenger W., Pal G.P. (1988) Autolysis and inhibition of Proteinase K, a subtilisin-related serine Proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album limber*. *Biochimica et Biophysica Acta* **954**, 176-182.