

Neutron Diffraction Studies on the F29G Mutant Rubredoxin F29G 変異体ルブレドキシンの中性子回折

新村信雄¹⁾ 田中伊知朗¹⁾ 栗原和男²⁾ 大原高志²⁾ バウ, ロバート³⁾

Nobuo NIIMURA Ichiro TANAKA Kazuo KURIAHRA Takashi OHHARA Robert BAU

¹⁾茨城大学 ²⁾原子力機構 ³⁾南カリフォルニア大学

F29G 変異体ルブレドキシンの中性子回折実験を行い、それを解析することで、このタンパク質の特異な熱安定性の機構解明を行う。送られて来た単結晶が変質しており、十分な解析に耐えるブラッグ反射データが得られなかった。

キーワード:

ルブレドキシンの変異体、熱安定性、中性子回折、構造生物、水素結合、H/D 交換

1. 目的

野生型ルブレドキシンは90℃でも半日近く立体構造を保つ高度な熱安定性を有するタンパク質で、この機構解明はタンパク質の構造安定性の機構解明に貢献する。すでに多くの熱不安定変異体が作られ熱安定性に関与するアミノ酸残基の同定と構造的役割が検討されている。F29G (29番残基フェニルアラニンをグリシンに置換) 変異体の中性子回折実験もそのための一環である。

2. 方法

結晶化溶液の調製において重水素化した試薬を用いて、タンパク質を部分的に重水素化した単結晶を得る。またさらに、発現系の段階から重水素化試薬を用いることによって、完全重水素化した単結晶を得る。両結晶から、JRR-3 設置の生体高分子用中性子回折装置 BIX-4 を用いて回折データ収集を行い、その水素・水和構造を含めた立体構造を解析する。

3. 研究成果

タンパク質試料を完全重水素化及び部分的重水素化した単結晶が得られたので、常温で中性子回折測定を行った。完全重水素化結晶の場合、露出時間を最大 6 時間/フレームで測定を行ったが、明確なブラッグ反射を得ることができなかった。一方、部分的重水素化結晶からは、露出時間 2 時間/フレームで $d=2.2\text{\AA}$ までの反射を得た。

4. 結論・考察

部分的重水素化結晶から反射を得ることはできたが、必要な露出時間が長く、割り当てのマシントイム中では立体構造解析に耐えるデータ収集は行えなかった。これまでの実験結果から、通常であればルブレドキシンの結晶は短時間で高分解能なデータが得られる試料である。本実験では結晶をキャピラリーに封入して実験を行う。今回の結果は、その封入が不完全であったため、結晶中の水分子が蒸発し結晶の品質が劣化したためと推察している。キャピラリー封入など試料取扱いに対し十分に配慮すれば、同試料結晶からは短い露出時間で高分解能データを収集可能であると推測する。

5. 引用(参照)文献等

1. Bau, R. *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.* **3** (1998) 484.
2. Kurihara, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** (2004) 11215.
3. Chatake, T. *et al.*, *Acta Crystallogr.* **D60** (2004) 1364
4. Vondrášek, J. *et al.*, *Chemistry - A European Journal*, **13** (2007) 9022.