

直接法による中性子結晶構造解析データ解析の基本データ収集とそれらの結果を踏まえた構造生物化学の確立

Neutron Protein Crystallography for Direct Method and
Establishment of Nature of Chemical Bond in Biology

新村信雄¹⁾ 田中伊知朗¹⁾ 栗原和男²⁾

Nobuo NIIMURA Ichiro TANAKA Kazuo KURIAHRA

¹⁾茨城大学 ²⁾原子力機構

ウシ・リボヌクレアーゼ (RNase A) の中性子回折実験を 1.5Å 分解能で実施した。プロトン移動を直接観測することで従来提案されていた RNA 分解機構を証明できた。また、 α ヘリックスと β シートの水素結合強度を明確にした。

キーワード:

リボヌクレアーゼ A、RNase A、中性子回折、構造生物、水素結合、H/D 交換、直接法

1. 目的

Hauptman らが新たに開発した、生体物質の中性子回折データ解析における「直接法」の可能性を検討するために中性子回折データ収集を行う。そのためには高分解能且つ高品質な回折データが必須である。そこで、高品質で大型なウシ RNase A 単結晶を育成し、それを用いて中性子回折実験を行って立体構造解析を実施する。その詳細な水素・水和構造情報から、水素に関する構造化学的な特性を明らかにするとともに酵素活性機構にも迫る。

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。こうして得たウシ RNase A 単結晶から、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

大型の部分的重水素化単結晶を得ることができた (3.5×1.5×1.1mm)。この結晶からは、露出時間 30 分/フレームで、1.5Å 分解能の回折データ取得に成功した。独立な反射 15,039 個を観測し、R-因子 17.9%で結晶構造解析を完了した。その結果、665 個の水素、225 個の重水素及び 115 個の水分子を同定した。

4. 結論・考察

これまでの最高記録に並ぶ高分解能中性子回折データを得ることができた。今後はこのデータも含めて新たな「直接法」の検討が進められる予定である。

RNase A の酵素活性機構研究は古く、これまで十分に調べられてきている。しかし、その活性部位のプロトン化状態に対して、中性子や NMR の実験からモデル機構を裏付ける決定的な報告はなかった。今回の解析結果から、His12 の一般塩基としての single protonation が観測され、プロトン移動による機構の解明ができた。また、水素結合距離及び H/D 交換率には α ヘリックスと β シート間において違いがあり、その差から β シートの水素結合強度が α ヘリックスより強いことが推察できた。

5. 引用(参照)文献等

1. Hauptman, H. A. and Langs D. A., *Acta Crystallogr.* **A59** (2003) 250.
2. Usher, D. A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69** (1972) 115.
3. Wlodawer, A., *Acta Crystallogr.* **B36** (1980) 1826.