

ヒトトロンビンと阻害剤複合体の結晶構造解析

Neutron Crystallographic Analysis of Human α -Thrombin-Inhibitor Complex利用者 山田 太郎¹⁾、栗原 和男²⁾、玉田 太郎²⁾、田中 伊知朗¹⁾、黒木 良太²⁾、新村 信雄¹⁾

Taro YAMADA Kazuo KURIHARA Taro TAMADA Ichiro TANAKA Ryota KUROIKI Nobuo NIIMURA

所属 ¹⁾茨城大学、 ²⁾原子力機構

キーワード 中性子タンパク質結晶構造解析、プロトン化状態、水素水和構造、血液凝固因子

1. 目的

ヒト α -トロンビンは血液凝固過程において中心的な役割をもつ36kDのセリンタンパク質分解酵素である。トロンビンの阻害剤は抗血栓症薬として使用されている。この研究ではトロンビンとその阻害剤である抗血液凝固ビバリルジンとの複合体の中性子単結晶構造解析をおこなうことにより、触媒活性部位や阻害剤結合部位のプロトン化状態や水和状態などを観察した。

2. 方法

ヒト α -トロンビンとビバリルジン複合体の複合体結晶をマクロシーディング法に作製よりした。結晶化は2%w/v PEG4,000, 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝溶液pD5.0の重水溶液で行った。結晶を人工母液と共に石英製キャピラリーに封入した後、BIX-4のゴニオメータにマウントした。図1に結晶写真を示す。結晶の大きさは2.6 mm x 2.2 mm x 1.4 mmである。結晶を0.3°回転毎に静止させ、波長2.6Åの中性子ビームを4時間露光して、合計288枚の回折像を記録した。図2に得られた回折像をしめす。プログラムDenzoを用いて回折斑点の指数付け、強度積分、データ処理を行った。中性子回折データの分解能は2.8Åであった。同一の結晶を用いてPFにてX線回折実験を行い、同様に1.6Å分解能の回折強度データを得た。プログラムPhenixを用いてX線と中性子回折データに対して同時に構造精密化を行った。

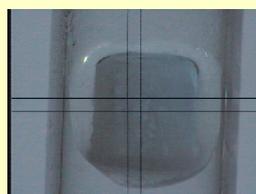
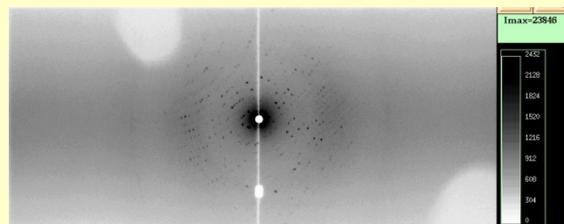
図1 キャピラリーに封じたヒト α -トロンビン-ビバリルジン複合体結晶

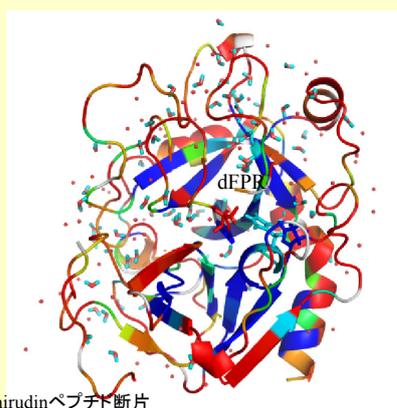
図2 BIX-4で4時間露光にて測定した中性子回折像

表1 結晶学的データおよび構造精密化パラメータ

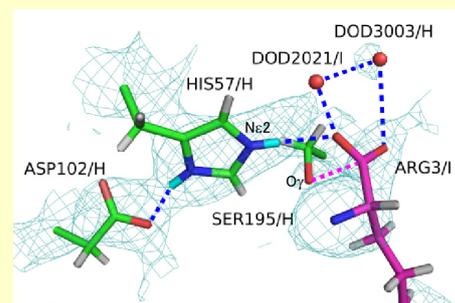
α -thrombin – bivalirudin, pD5.0	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2
a, b, c / Å	80.7, 107.7, 45.8
Diffractionmeter (X-ray / neutron)	KEK PF BL-6A / JAEA JRR-3 BIX-4
Resolution (X-ray / neutron) / Å	1.60/2.80
Rwork/Rfree (X-ray)	0.16/0.18
Rwork/Rfree (neutron)	0.18/0.23
No of Reflections (X-ray / neutron)	51,136/8,476

3. 実験結果

表1に結晶学データおよび構造精密化パラメータを示す。X線および中性子回折データに対して構造精密化を良好に行うことができた。図3に全体構造とペプチド結合アミド水素の重水素置換率を示す。結晶中でビバリルジンはdFPRとヒルジンペプチド断片に加水分解されており、それぞれ活性部位と結合部位に結合している。タンパク質表面に存在するループ領域ではほとんど重水素置換が起こっているが、タンパク質内部の β -バレルコア領域の重水素置換率が小さくなっており、これまでに報告されているセリン分解酵素の中性子構造解析と同様の傾向を示している。図4に触媒活性部位の構造と核散乱長密度図を示す。His57のN ϵ 2窒素上には重水素による核散乱長密度が観測された。O γ 上には重水素の核散乱長密度は観測されず、脱プロトン化している。そしてSer195の水酸基酸素原子O γ は阻害剤のdFPR断片Arg3のカルボキシル炭素と2.7Åと近い位置にあり強い相互作用を持つと考えられる。



hirudinペプチド断片

図3 ヒト α -トロンビン-ビバリルジン複合体の全体構造およびペプチド結合の重水素置換率 (青: 0%, ->赤: 100%)図4 ヒト α -トロンビン-ビバリルジン複合体の活性部位の構造と2Fo-Fc核散乱長密度図 (1.1 σ レベル)

4. まとめ

ヒト α -トロンビンと抗血液凝固剤ビバリルジンの複合体結晶の中性子回折実験をBIX-4で行い、2.8Å分解能で構造精密化を行った。この複合体はトロンビンの生成物複合体と見なすことができるが、活性部位のS195の水酸基はHis57により水素引き抜き反応による活性化を受けており、生成物複合体から四面体型中間体を形成するのに必要な相互作用を有することを明らかにすることができた。またdFPRやヒルジンペプチド断片がそれぞれトロンビンのS1サブサイトやエキソサイトIIIに結合する際にも水分子による水素結合ネットワークが関与する様子が核散乱長密度図から確かめられた。

