

特異的アルカリ金属塩類が起こすリゾチームの結晶化 -時間分割X線小角散乱法による機構検証

小沼一雄(産業技術総合研究所)、伊中浩治(株式会社丸和栄養食品)、
杉本泰伸(名古屋大学シンクロトロン光研究センター)

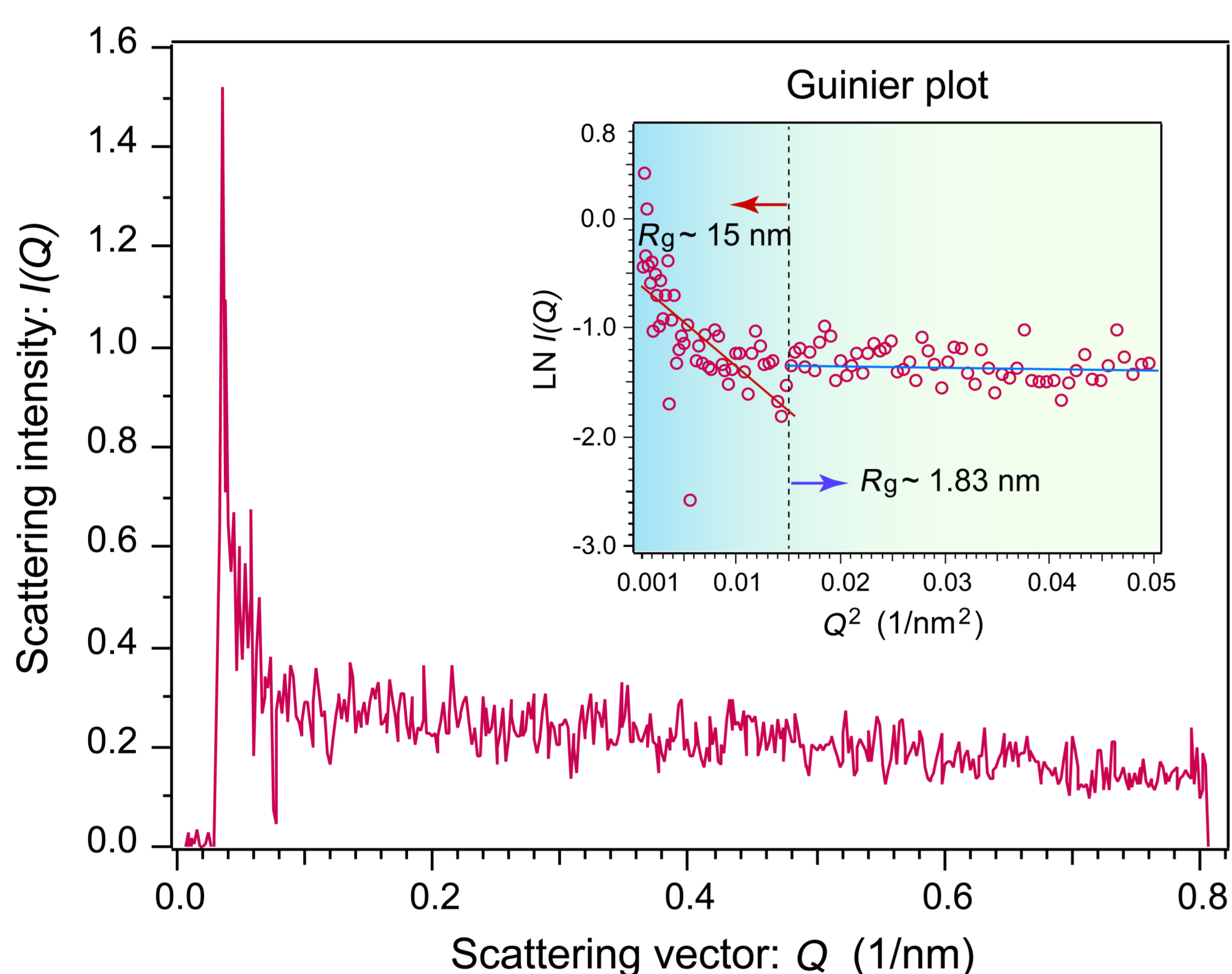
1. 背景と研究目的

リゾチームはタンパク質構造学研究の最初期に、単結晶化と構造解析に成功したタンパク質の一つである。しかし、純水溶解条件では最も普遍的な結晶化剤であるポリエチレングリコール(PEG)による結晶化が不可能であり、結晶形成には金属塩類を用いる必要がある。特に1価アルカリ金属塩化物を用いた場合、溶液中の分子表面電荷がプラスであるにも関わらず、特定のカチオンで結晶化が極めて容易に進む「塩特異性」を示す。この現象は従来のタンパク質結晶化理論(分子表面電荷の塩イオンによる遮蔽とvan der Waals引力による凝集)では説明ができず、重要な未解決問題となっている。本実験の狙いは、詳細な研究例のないリゾチーム結晶化過程と結晶化塩の種類との関連を解明し、「結晶化を誘起する最適結晶化剤」に関する高精度短時間予測に繋げることにある。

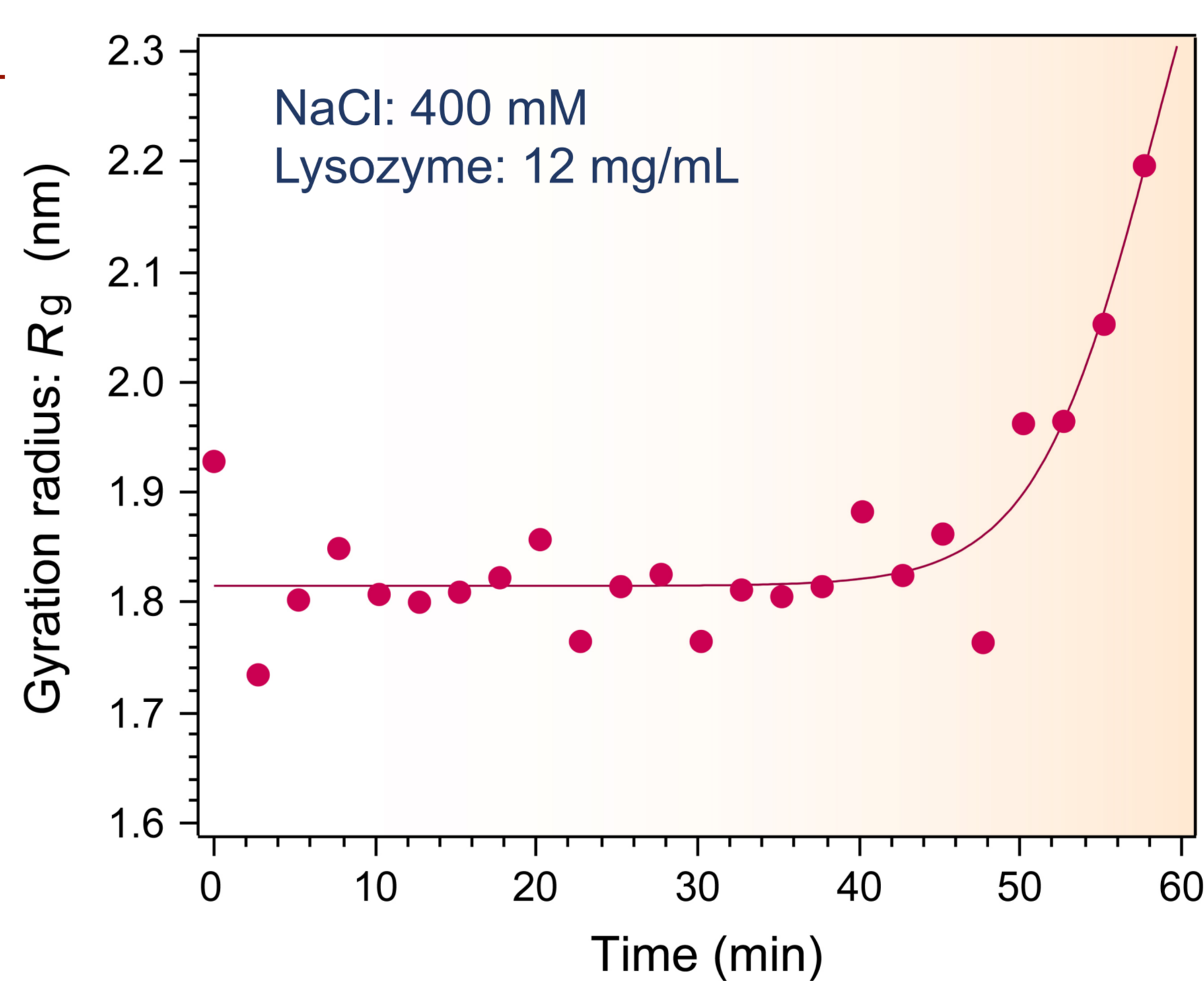
2. 測定条件

市販リゾチームを陽イオン交換樹脂により高純度化・高均一化し、さらにバッファの影響を除くために純水中に透析したサンプルを準備した。このタンパク質溶液に、結晶化剤としてNaCl, KCl, LiClそれぞれを「結晶化が起こらない濃度」で添加し、溶液中の粒子慣性半径の時間変化をBL8S3 X線小角散乱で測定した。また、別途NaCl系とKCl系で育成した結晶に関して、BL2S1を用いた単結晶構造解析を実施して比較検討した。

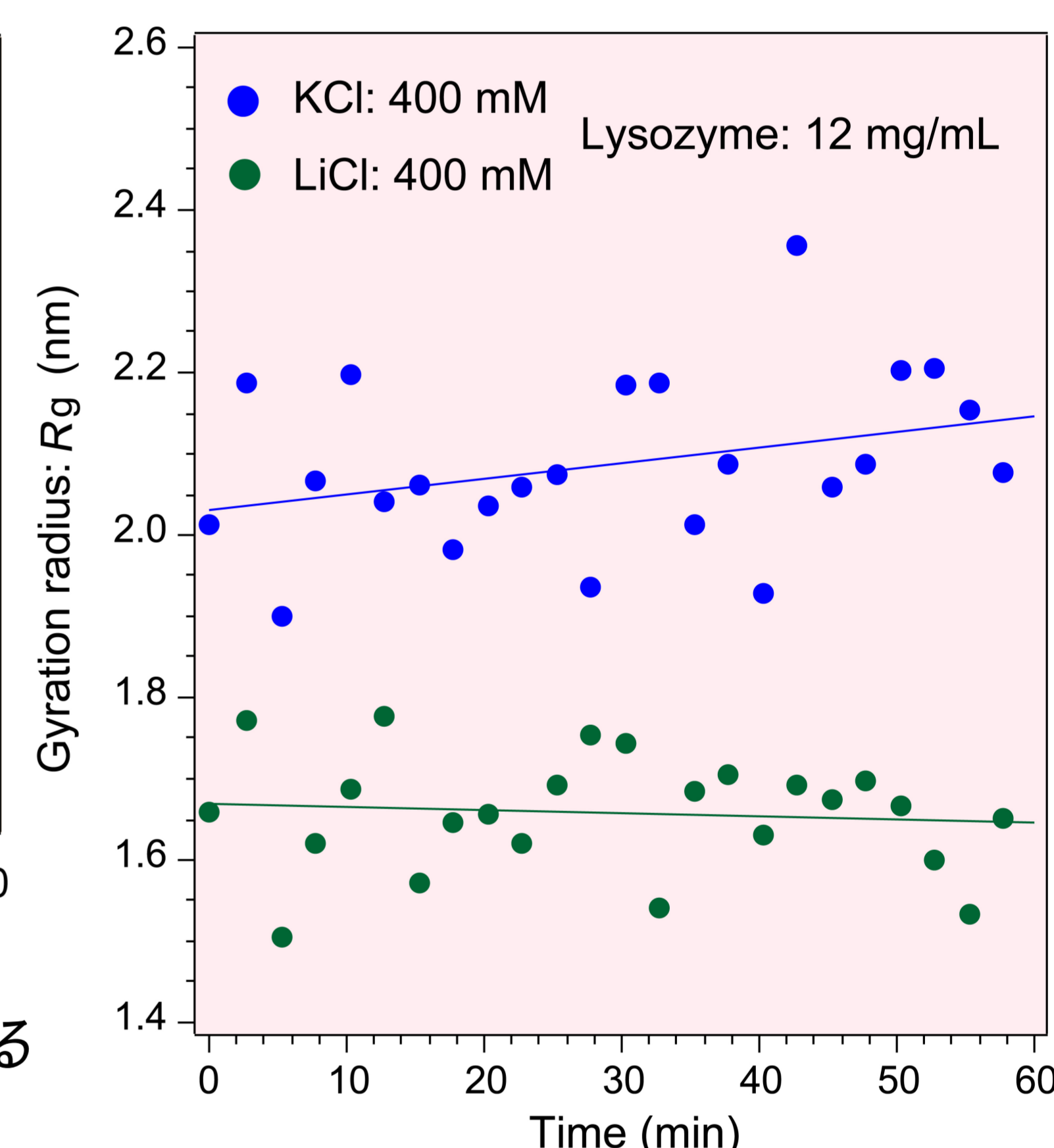
3-1. SAXS測定結果—超小角領域に検出される会合体



NaCl 400mMにおけるSAXSプロファイルとGuinierプロット

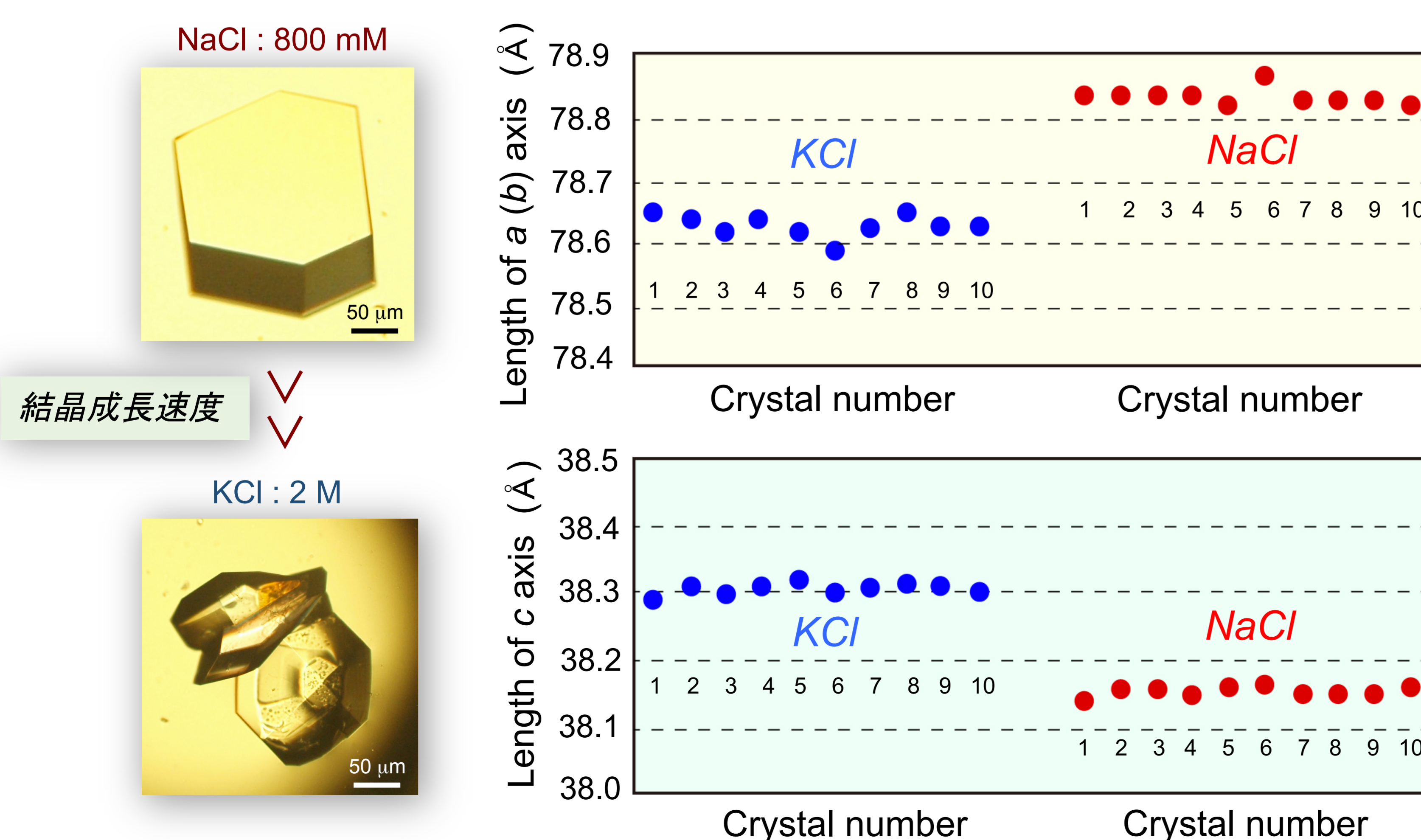


全散乱ベクトル領域のGuinierプロットによる平均Rg vs time



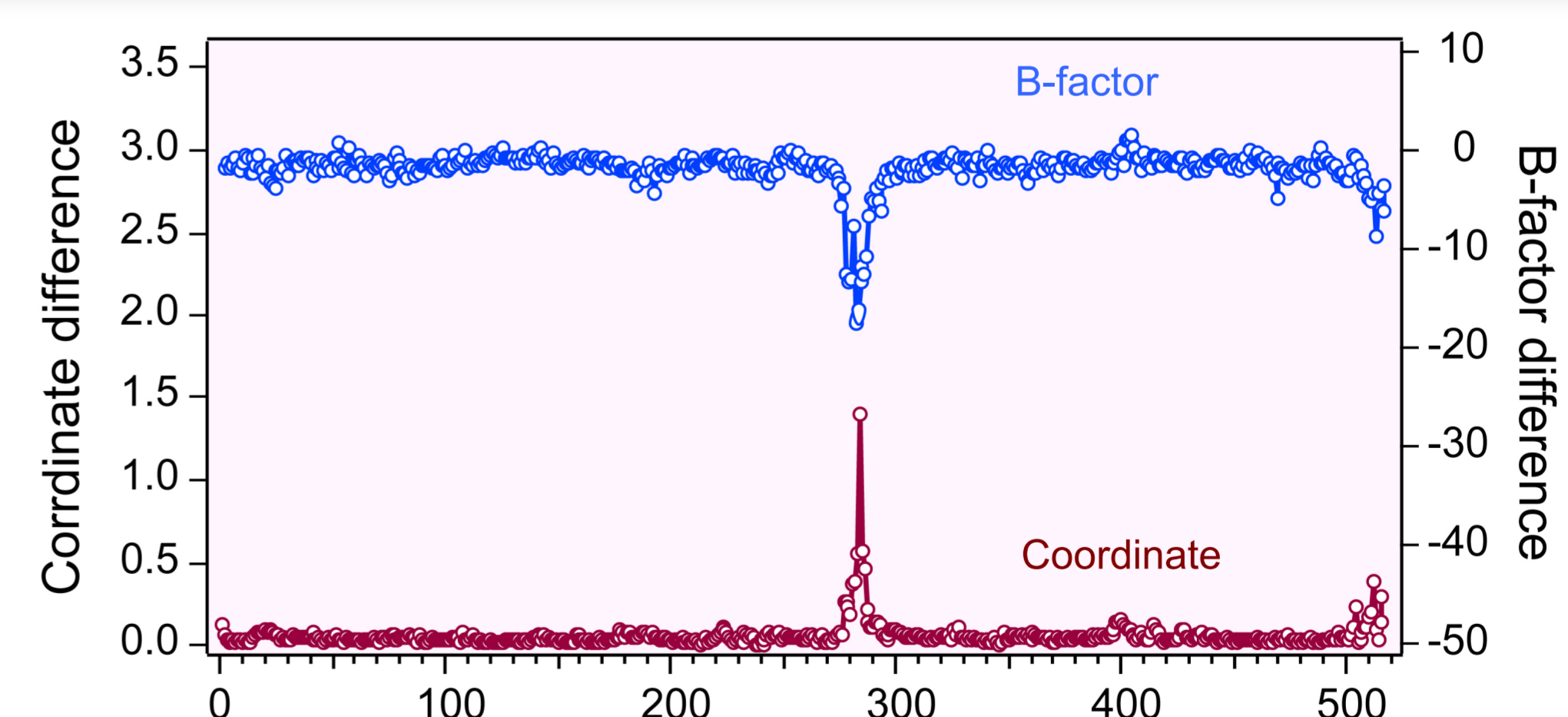
結晶形成が起こらない準安定塩濃度において溶液中には既に会合体が形成 (pre-crystallization oligomer)。その時間変化挙動は塩の種類に強く依存する。臨界塩濃度以上でNaCl系とKCl系では結晶が形成するが、LiCl系では結晶形成が全く起こらない。最終的に結晶が析出するか否かはpre-crystallization oligomerの挙動から予測可能

3-2. 単結晶構造解析結果—NaCl系とKCl系との相違

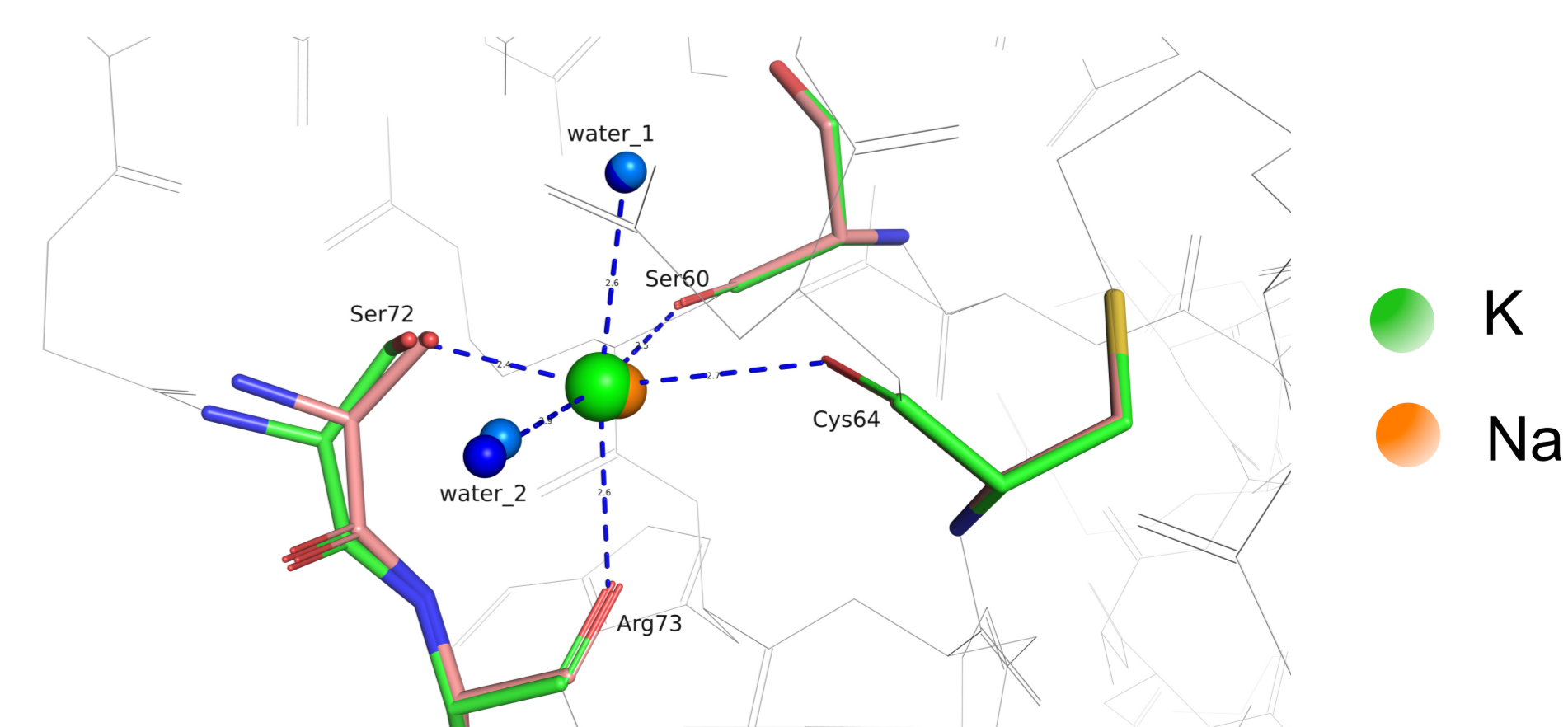


NaCl系とKCl系で育成した結晶形態の比較

結晶軸長の比較



NaCl系結晶とKCl系結晶の構造の相違は71-72番残基のSerに現れる。ここはカチオンによる6配位構造部分に相当



分子内でカチオンが作る6配位構造の変化が結晶成長速度の差に反映していると考えられる