



加圧による結晶性向上と高エネルギー構造の補足

永江峰幸

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

蛋白質の立体構造決定法はいくつかあるが、X線結晶構造解析法は現在もっとも頻りに利用される手法である。X線結晶構造解析法には、良質の蛋白質結晶を用いれば非常に精度の高い構造情報が得られるという利点があり、またそれらの構造情報は薬剤設計等にも利用されている。一方で研究対象としている蛋白質の結晶を得ることに成功しても、いざX線を当てると低分解能の回折データしか得られないという事態にしばしば直面する。従って、蛋白質結晶の結晶性を改善し、高分解能の回折データを得る手法の開発が望まれる。これまでに我々は、蛋白質結晶に圧力をかけることで回折データが顕著に改善し、分解能が向上することを見出している。そこで本研究課題では、分解能向上のツールとして圧力に着目する。そして、加圧によって全ての蛋白質結晶の分解能が向上するのか、そうでないならば、どういった蛋白質結晶ならば分解能が向上するのかその適用範囲を調べる。

2. 実験内容

圧力と分解能の関係性を調べるためのテストサンプルとして、ウシ肝臓由来のカタラーゼと有機低分子のエトフィリンの結晶を作成した。カタラーゼについては、20 mg/mL カタラーゼ、25 mM Tris-HCl (pH7.5) の組成の蛋白質溶液と、100 mM Tris-HCl (pH8.0)、7% PEG8000 の組成の結晶化母液を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。得られた結晶を100 mM Tris-HCl (pH8.0)、10~20% PEG8000 の組成のバッファに移した後、ガラスキャピラリー内に移し常圧・室温条件下で回折データ収集を行い、高圧実験に使用出来る結晶であるか評価を行った。エトフィリンについては、エタノールに飽和濃度まで溶解した後に20度のインキュベータ中でゆっくりと溶媒を揮発させ結晶化した。得られた結晶をパラフィンオイルに浸した後、ナイロンループで掬い、95 Kの窒素ガスで瞬間凍結して回折データ収集と結晶性の評価を行った。

3. 結果および考察

カタラーゼ結晶については、20% PEG8000 を含むバッファに移した結晶にはクラックが入り、結晶がダメージを受けることが分かった。一方で10または15% PEG8000 を含むバッファに移した結晶はクラックが入らず、これをガラスキャピラリーにマウントし回折データを収集することに成功した。回折データを処理した結果、空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 87.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 140.8 \text{ \AA}$ 、 $c = 231.4 \text{ \AA}$ 、モザイク性は 0.13° であった。 $I/\sigma(I) = 2$ を基準にした場合の分解能は 3.5 \AA 程度であった。従って今後の高圧実験に進むに十分な結晶性であることが分かった (Fig. 1)。エトフィリン結晶については、分解能 0.8 \AA 程度まで回折スポットが観測されたが、結晶性が悪く複数の結晶からのスポットが観測されたため、結晶作成の工夫が必要と考えられる。

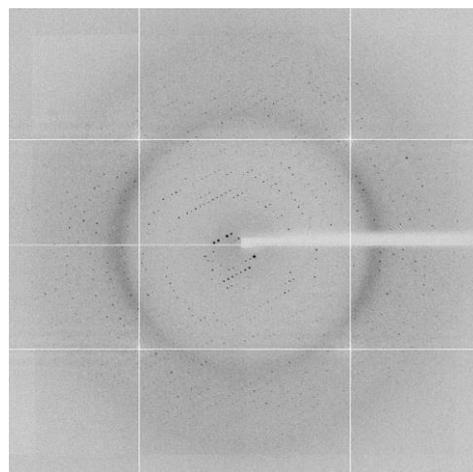


Fig.1 カタラーゼ結晶の回折像