



位相決定の予備的解析

日 弁隆雄、伊藤貴文、新倉春香、濱野吉十
福井県立大学・生物資源学研究所

キーワード：酸化還元酵素、生合成、FAD

1. 背景と研究目的

本研究では、これまでに研究対象とする新規酵素のネイティブの結晶を得ており、これは空間群 $I222_1$ 、格子定数 $a = 127, b = 210, c = 117$ (Å)であり、 2.7 \AA 分解能程度の反射データを与えることを明らかにしている。本酵素は大腸菌では発現されなかったため、放線菌にて組換え酵素の構築を行った。しかしながら、放線菌でのセレノメチオニン化酵素の作製法は報告が無かったことから、大腸菌のセレノメチオニン化酵素の作製法^{1,2}を参考に、セレノメチオニンを用いた放線菌の培養条件検討を行った。これによってセレノメチオニン化酵素の取得に成功し、結晶化を行ったものの、高い分解能を示す結晶の作製には未だに至っていない。そこで、ネイティブの結晶に対して重原子をソーキングする方法を用いて重原子置換体結晶を作製し、放射光実験施設にて X 線単結晶回折測定を行った。

2. 実験内容

酵素の結晶化は、ネイティブの結晶化条件と同様にして行った (4 M ギ酸ナトリウム、0.3 M DNSB-195、2.5 mg/ml 酵素、10 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 mM DTT、0.5 mM EDTA)。重原子置換体の調製には、ジシアノ金 (I) 酸カリウム、テトラクロロ金 (III) カリウム、塩化カドミウム 2.5 水和物の 3 種類を利用した。ソーキング実験は、重原子の濃度 0.1 mM ~ 10 mM、浸漬時間 1~4 時間で検討した。ソーキング後の結晶は、窒素ガス気流下 100 K で凍結した。結晶を放射光実験施設に運搬後、波長 1.12 \AA の X 線を用いて CCD 型ディテクターで回折点を収集した。

3. 結果および考察

ジシアノ金 (I) 酸カリウムと塩化カドミウム 2.5 水和物を用いて得られた結晶に関して、差パターンマップを作成し解析したところ、重原子と考えられるピークが得られた。しかし、位相決定には至らなかった。今後はこれら 2 つの重金属を中心に、より細かな検討を行う予定である。また、凍結後、氷や重金属が析出していたため、バックソーキングやクライオプロテクタントの条件も検討する必要がある。

4. 参考文献

1. *J.Mol. Biol.*, 229, 105 (1993)
2. *Methods Enzymol.*, 276, 523 (1997)