



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¹、伊中浩治²、杉本泰伸³

1 国立研究開発法人産業技術総合研究所、2 株式会社丸和栄養食品、
3 名古屋大学シンクロトロン光研究センター

キーワード：タンパク質、凝集体の経時変化、結晶化剤、アルカリカチオン

1. 測定実施日

2018年7月3日 BL8S3 (2シフト)
2018年8月29日 BL8S3 (2シフト)
2018年10月3日 BL8S3 (2シフト)
2018年11月7日 BL8S3 (2シフト)

2. 概要

Hen Egg White リゾチームを高純度且つ高均一に生成し、その結晶化挙動と添加塩類との関係を調べた。通常リゾチームはNaClによって容易に結晶化するが、結晶化剤をKClに変えると結晶化速度は極端に低下し、LiClに変えた場合には（蒸気拡散法及びバッチ法では）全く結晶が形成しない。その原因を放射光X線小角散乱の時間分割測定により解明することを試みた。測定の結果、上記のアルカリ塩類を添加した系では、全て極低濃度の結晶化剤条件で会合体が形成されていた、しかし、その会合体が結晶まで成長できるか否かは塩の種類に強く依存し、アルカリカチオンのリゾチーム分子内への取り込みによる構造の微小変化も、結晶化に大きな影響を及ぼすと推定された。

3. 背景と研究目的

タンパク質分子の構造解析は、当該タンパク質が原因となる疾病の究明と対処薬剤の開発に直結する極めて重要な課題である。タンパク質結晶化において最も重要なポイントは「最適な結晶化剤の選択」であり、現在までに結晶化に成功したタンパク質のうち、約75%にポリエチレングリコール(PEG)が使用されている。しかし、本研究で対象とするリゾチームのような特定のタンパク質はPEGによる結晶化が不可能であり、結晶化剤として金属塩類を用いる必要がある。更にこれらのタンパク質は、特定の塩でのみ結晶化が極めて容易に進む「塩特異性」を示すことが大きな特徴である。この現象は、従来のタンパク質結晶化理論（分子表面電荷を塩イオンによって遮蔽し、van der Waals 引力によって凝集を励起する）では説明ができず、且つタンパク質結晶化の本質に直結する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、その原理を一般のタンパク質に拡張することで、「結晶化を誘起する最適結晶化剤」に関する高精度予測を可能にすることである。実験の特色は、周期律表の同一族に分類される塩に注目して、塩添加時の会合体サイズの時間変化を検証する点にある（特にカチオンの違いによる影響）。

4. 実験内容

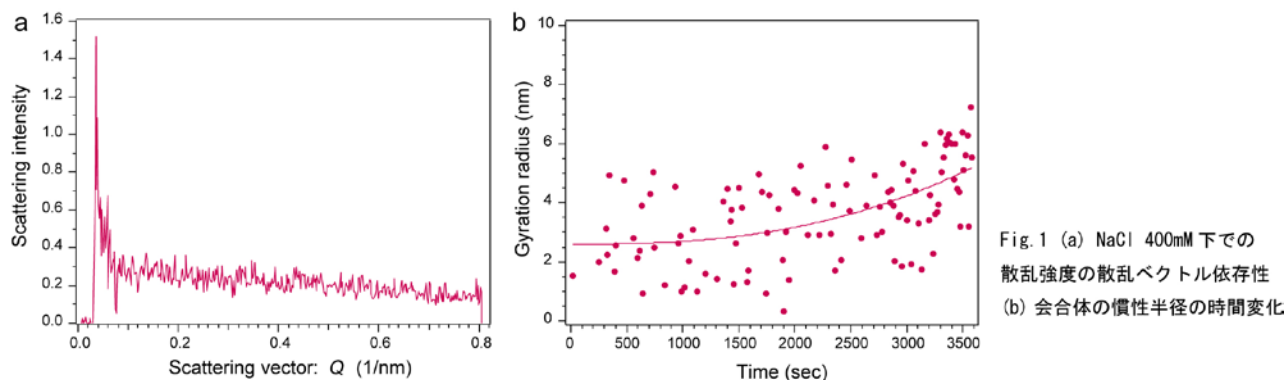
市販リゾチームを陽イオン交換樹脂により高純度化高均一化し、さらにバッファーの影響を除くために純水中に透析したサンプルを準備した。このタンパク質溶液に、結晶化剤としてNaCl, KCl, LiClそれぞれを「結晶化が起こらない準安定濃度」で添加し、溶液中の会合体慣性半径の時間変化を小角散乱で測定した。比較対象実験として、PEG及び硫酸アンモニウムを結晶化剤として純水溶解リゾチームに添加した系での（濃度は低濃度から高濃度まで変化）小角散乱測定も実施した。これらの結晶化剤添加の

場合も、リゾチーム自身の濃度はアルカリ塩類添加時と同一に設定した。

5. 結果および考察

Fig.1a は結晶化剤として NaCl を 400mM 添加した場合の、リゾチーム溶液の散乱強度 vs 散乱ベクトルの関係である。 $Q < 0.08$ (1/nm) の超小角領域で散乱強度が急激に上昇しており、溶液中に単分子より遥かに大きな会合体が生じていることがわかる。また、この会合体が時間的に成長する様子も観察された (Fig.1b)。Fig.1a での結果を全ての散乱ベクトル領域でギニエプロットすると単一直線では回帰できず、溶液中には単分子と会合体が独立して共存するデータとなる。これは、申請者が過去に行った可視光動的散乱によるリゾチーム集積過程の追跡で見出した結果と、(測定会合体の大きさは異なるが) 本質的に同一である (参考文献 1 参照)。

結晶化を誘発する塩濃度以下での会合体の存在は KCl, LiCl を用いた場合でも観察されたが、リゾチーム結晶を形成できない PEG 及び硫酸アンモニウムを用いた場合には観察されなかった。すなわち、低塩濃度下での会合体形成が結晶化を導く第一関門になると予想される。ただし LiCl の場合には会合体が生じても結晶化まで至らず、別途実施した BL2S1 での結晶構造解析実験の結果から、アルカリカチオンがリゾチーム分子内で安定 6 配位構造を構築できるか否かも、結晶化に影響している可能性が強い。



6. 今後の課題

本実験において最も予想外であったデータは、LiCl 添加時のリゾチーム分子の会合挙動である。既に 1M 濃度 LiCl 存在下での可視光時間分割静的散乱測定を実施しており、その結果によると慣性半径が 10 nm 程度の会合体が溶液中に存在している。従って、結晶化に至らない会合体の形成自体が小角散乱実験で確認されたことは妥当であるが、問題はこのような準安定会合体が、本来結晶化とは無縁の極めて低い塩濃度で観察された事実である。これは 5 項で述べたように、「最終的な結晶化」のためには「会合体形成」が必須であるが、その逆は真ではないことを意味する。今後は、会合体が時間的に結晶構造を形成するか否かを簡単に判別する手法が必要になる。

5. 参考文献

1. “Multi-angle static and dynamic light scattering investigation of lysozyme association: From crystallization to liquid-liquid phase separation” K. Onuma, N. Kanzaki *J. Crystal Growth*, vol.304 (2007) 452-459.