



加圧による結晶性向上と高エネルギー構造の捕捉

永江峰幸

名古屋大学シンクロトロン光研究センター

キーワード：タンパク質結晶構造解析，圧力，高エネルギー準安定構造

1. 背景と研究目的

X線結晶構造解析法は現在もっとも頻繁に利用されるタンパク質構造決定法であり，良質のタンパク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る．逆に，研究対象としているタンパク質の結晶化に成功しても，得られた結晶の結晶性が悪いと低分解能の回折能しか示さないという事態にしばしば直面する．従ってタンパク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が開発出来れば非常に有意義である．これまでに我々は，タンパク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．そこで分解能向上のツールとして圧力に着目し，加圧によって全てのタンパク質結晶の分解能が向上するのか，そうでないならば，どういったタンパク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ている．本実験では，ユビキチンの六方晶の結晶を用いて圧力と分解能の関係について調べた．

2. 実験内容

ユビキチンのタンパク質溶液（25 mg/mL ユビキチン，10mM Tris-HCl(pH7.5)）と，100 mM Bis-Tris (pH 6.4)，20% PEG3350 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六方晶結晶を作成した．得られた結晶を圧力媒体（100 mM Bis-Tris (pH 6.4)，38% PEG3350) にソーキングした後，結晶をダイヤモンドアンビルセル（DAC）にマウントし，波長 0.75 Å の X 線を用いて室温で回折データを収集した．露光時間は，回折データの統計値に放射線損傷の影響が露に出ない範疇に止めた．DAC 試料室にルビーボールを同梱し，ルビー蛍光の波長シフトを利用して，DAC 試料室の圧力を算出した．

3. 結果および考察

まず常圧下で回折データを収集した後，DAC 試料室を 590 MPa 程度まで加圧し，同じ結晶の同じ箇所を用いて再び回折データを収集した．露光時間は 10 秒，振動角は 1°で 20 枚測定し，これを 6 つの結晶を用いて行なった．分解能は， $I/\sigma(I)=2$ を基準とし，各結晶の常圧および高圧下の回折データを解析し，統計値を算出した（表）．その結果，常圧下での分解能は 3.0 ± 0.3 Å，590 MPa 下での分解能は 2.1 ± 0.3 Å となり，加圧によって顕著に分解能が向上することが明らかとなった．これまでに，HIV1 RNaseH の直方晶結晶に対して，同様に常圧下と高圧力下の回折データを収集している．分解能に対する加圧の効果は，RNase H よりもユビキチン結晶の方が明らかに大きいことが分かる．引き続きその他のタンパク質および結晶系を用いて圧力と分解能変化の関係を調べる．

表. 加圧による分解能の変化

比較	データ数	分解能(Å)	
		常圧	高圧
ユビキチン (六方晶)	6	3.0 ± 0.3	2.1 ± 0.3 (590 MPa)
RNase H (直方晶)	6	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1 (730MPa)