



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

タンパク質の構造は、基底構造と準安定構造の間の平衡状態にある。近年では、タンパク質が機能を発現する際、分布率の低い準安定構造が重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、通常の構造解析方法では分布率が高い基底状態の構造しか捉えることが出来ない。一方、タンパク質に圧力をかけると、ルシャトリエの原理に従い、部分モル体積がより小さい準安定状態へと平衡がシフトすることが知られている。そこで我々はダイヤモンドアンビルセル (DAC) を用いて、高圧力条件下における結晶構造を解析し、分布率が小さく通常観測困難な準安定状態の観測を試みている。本実験では、ユビキチンの六方晶の結晶を用いて高エネルギー準安定構造の補足を試みた。これまでに行なった高圧実験によって、300 MPa から 600 MPa 程度の中程度の圧力下では、結晶の回折能が顕著に向上することが分かった。一方で準安定構造への転移はというと、通常溶液中では 300 MPa 程度で生じることが知られているが、この六方晶結晶中では 800 MPa 程度の高圧力をかけて漸く生じ始める。ところが 800 MPa 程度の高圧力下では結晶の回折能が落ちてしまい、精度の高い解析はおろか、場合によっては全く反射が出なくなってしまうこともある。そこで本実験では、圧力媒体を工夫し、800 MPa 程度の圧力条件下でも高分解能の回折データ収集を可能とすることを試みた。

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), 24% PEG3350, 14%PEG20,000) 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

DAC 試料室は直径 0.7mm, 厚み 0.3mm 程度で、これに約 0.6 mm x 0.23 mm x 0.23 mm の結晶をサンプリングした。DAC 試料室を 790 MPa まで加圧し、試料結晶の右半分と左半分にそれぞれ、露光時間 12 秒, 振動角 1° で X 線照射し、36 枚ずつ回折像を収集した。分解能の基準を $I/\sigma(I)=2$ とした場合、1.76 Å の回折データを収集でき、高い分解能で構造決定ができた (図)。従って、高分子量の沈殿材 (PEG20,000) を圧力媒体に使用することで、構造転移を起こす高圧力条件下においても回折能を損なうことなくデータ収集できることが分かった。得られた回折データを用いて詳細に構造情報を調べる。

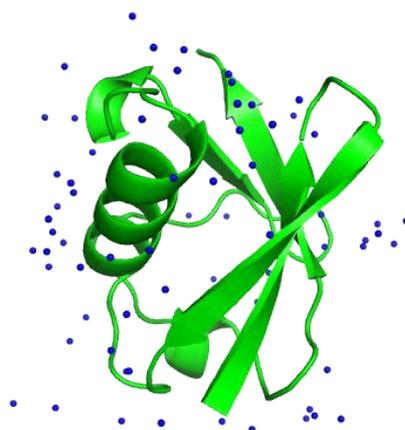


図. ユビキチンの 790 MPa 構造。