



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．ところが，研究対象としているタンパク質の結晶化に成功しても，得られた結晶が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．これまでに HIV-1 RNaseH の立方晶結晶とユビキチンの六方晶結晶について常圧下と高圧下の回折データを収集・比較し，圧力と分解能の関係を調べた．本実験では，同じユビキチン分子であるが，結晶系が異なる立方晶結晶を用いて実験を行なった．

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 8.0), 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立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 8.0), 30% 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．

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 330 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．本実験で使用したユビキチン立方晶結晶は 400 MPa まで加圧すると，回折を示さなくなることがこれまでの実験で分かっている．そのため，結晶への加圧は 330 MPa 程度に止めた．データ収集は，露光時間 8 秒，振動角 1°で，各圧力で 20 枚ずつ回折像を得た．これを 5 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 3.3 ± 0.2 Å，330 MPa 下での分解能は 2.8 ± 0.2 Å となり，加圧によって分解能が向上することが明らかとなった．

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)
ユビキチン (立方晶)	5	3.3 ± 0.2	2.8 ± 0.2 (330 MPa)
RNaseH (立方晶)	4	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.2 (500MPa)
RNaseH (立方晶)	6	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1 (730MPa)