



## カチオンが蛋白質構造に与える影響の解明

小沼一雄<sup>1</sup>, 伊中浩治<sup>2</sup>

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

キーワード：蛋白質, 結晶化, 条件探索

### 1. 背景と研究目的

蛋白質の結晶化条件探索は未だに理論的な手法が見出されていない。現在ではスクリーニングキットを用いた条件探索が一般的で唯一の方法であるが、スクリーニングで結晶化条件が見つからない場合、タンパク質の結晶化とそれに続く構造解析は実施できないのが現状である。我々は蛋白質の結晶化が起きる溶液状態での蛋白質分子の挙動に結晶化の重要なポイントがあると考え、種々の蛋白質を用いて結晶化試薬と共存している状態での分子の会合状態を調べてきた。今回、ニワトリ卵白由来リゾチーム (HEWL) の溶液を用いて、ナトリウムイオンとカリウムイオンの結晶化に与える影響を調べることを考えた。HEWL は NaCl よりも KCl で結晶が得られにくく LiCl では結晶化しない。そこで、これら陽イオンが蛋白質の結晶化にどのような影響を与えているかを調べるため、緩衝剤等の余分な成分を排除したきわめて単純な系で得られた結晶を用いて回折実験を行い、結晶中での分子パッキングと分子構造に陽イオンがどのように影響しているかを調べることにした。

### 2. 実験内容

結晶化には市販 HEWL を、陽イオン交換樹脂を用いて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用いた。結晶は蒸気拡散法により 0.8M NaCl および 2.0M KCl で得られたものを用いた。さらに結晶凍結に伴う影響も排除するために回折データ取得は 20°C においてあいち SR BL2S1 ビームラインにて取得し、プログラム XDS を用いて数値化した。

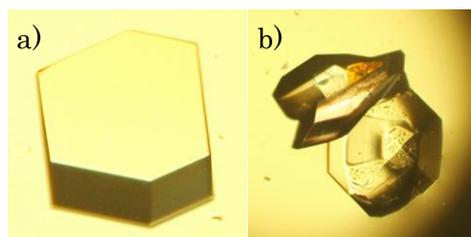


Fig.1 a) NaCl で得られた結晶  
b) KCl で得られた結晶

### 3. 結果および考察

Fig.1 は NaCl と KCl を用いて得られた結晶の写真であるが、明らかに外形が異なる。得られた結晶各々 10 個を用いて回折データの収集を行い、それぞれの結晶の格子定数の変化を測定した。Fig.2 は、NaCl と KCl で得られた結晶の格子定数の変化を示したグラフである。HEWL 結晶は空間群 P43212 に属するが、KCl 結晶と NaCl 結晶とを比較すると格子定数が明らかに変化していた。その結果、KCl 結晶の格子体積は NaCl 結晶と比べてわずかながら減少していた。また、各結晶から得られた回折データ (KCl 結晶: 1.62 Å, NaCl 結晶 1.45 Å) を用いて構造解析を実施したところ、KCl 結晶中の蛋白質分子構造では分子内に 1 個存在している Na イオンが K イオンに置き換わり、蛋白質分子の主鎖構造がその近傍で大きく影響を受けていることが明らかになった。一方結晶内に存在している Cl イオンの位置に変化がなくその近傍でも蛋白質構造に変化がないことが明らかになった。これらの事から、HEWL 分子の結晶構造は、陰イオンではなく陽イオンによる構造の変化が顕著であり、その結果蛋白質分子全体に影響が及び最終的には結晶全体にその影響を与えていると考えられた。陽イオンによる結晶化の違いはこれらの変化に起因した現象と考えられた。

