



加圧による結晶性向上と高エネルギー構造の捕捉 ：トランスサイレチンの高圧構造解析

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，トランスサイレチン

1. 背景と研究目的

アミロイドーシスは、アミロイドと呼ばれる繊維状の異常タンパク質が沈着して臓器の機能障害を起こす病気の総称であり、難治性の特定疾患として厚生労働省に指定されている。結合中でサイロキシンを運搬する役割を持つトランスサイレチン (TTR4) は、アミロイドーシス原因タンパク質として知られている。TTR4 は、生理条件下でホモ四量体を形成するが、この四量体の解離がアミロイド繊維化を引き起こすと考えられている。病変、すなわちアミロイド繊維化は、V30M などの病原性変異による TTR4 の構造不安定化による解離が原因と考えられており、四量体を安定化するタファディミス (Vyndaqel) がアミロイド繊維形成阻害薬として認可され使用されている。しかし、アミロイド繊維化の分子メカニズムは明らかになっておらず、通常の X 線結晶構造解析などの研究方法ではその解明が難しい。実際これまでに数多くの結晶構造解析がなされて Protein Data Bank (PDB) に登録されているが、メカニズムの詳細はいまだに明らかにされていない。本研究では、我々が開発した、シンクロトロン放射光とダイヤモンドアンビルセル (DAC) を用いる「高圧タンパク質結晶構造解析法 (HPPX 法)」を駆使して、この問題を解決することを目指す。TTR4 の野生型や病原変異型のアポ体や、さらにはアントラキノン誘導体などの薬剤複合体の結晶を用いて、HPPX 法によって高圧力が誘起する分子揺らぎ (構造変化) を観測して比較することで、TTR4 のアミロイド繊維化の分子メカニズムを解明し、高機能阻害薬開発に貢献することを目指す。

2. 実験内容

TTR4 のタンパク質溶液 (15 mg TTR, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を、15% 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD), 200 mM MgCl₂, 100 mM CH₃COONa (pH 4.8) の組成のリザーバー液に対して蒸気拡散させ、TTR4 結晶を作成した。得られた結晶を抗凍結剤入りのバッファ (20% MPD, 200 mM MgCl₂, 100 mM CH₃COONa (pH 4.8), 10% Glycerol) に浸した後、95K の窒素ガスで凍結し、X 線回折データを収集した。次に TTR4 結晶を 30% MPD, 200 mM MgCl₂, 100 mM CH₃COONa (pH 4.8) の組成の圧力媒体に浸した後、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・高圧力条件下で回折データを収集した。

3. 結果および考察

凍結常圧条件下で収集した TTR4 結晶の回折データを解析した結果、空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a=43.9 \text{ \AA}$, $b=66.1 \text{ \AA}$, $c=86.3 \text{ \AA}$ 、分解能 1.8 Å 程度のデータが得られた。一方で、室温 200 MPa 下で収集した TTR4 結晶の回折データは、空間群等は同じであったが分解能が 3 Å 程度まで低下してしまった。これまでに実施したいくつかの HPPX 法の例から、タンパク質結晶の中には、高圧力条件下で溶解度が上昇し、結果的に結晶性が著しく悪化するものがある。本実験で使用した TTR4 結晶は、200 MPa 程度の比較的低い圧力であっても、溶解度の上昇と結晶性の悪化が生じてしまっている。今後、高圧力下でも結晶性を保持できるような、他のパッキングによって形成される結晶を用いて、HPPX 法の実施を試みる。