



緑内障原因タンパク質の結晶のソーキングによる影響評価

友池 史明¹, 板橋 剛¹, 永江 峰幸², 岡田 哲二¹

1 学習院大学 理学部生命科学科, 2 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, オプチニューリン, 緑内障

1. 背景と研究目的

オプチニューリン(OPTN)は小胞輸送時の足場として働いていることが知られているタンパク質であり、様々な機構に関わっていることが示唆されている。近年の研究で、OPTNの変異が緑内障や筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因になることが示唆されており、OPTNの構造に基づいた薬剤設計が求められている。また、我々がヒト由来のOPTN全長を大腸菌で発現、精製したところ、興味深いことにOPTN単体では三量体をとるが、塩濃度およびpH条件によっては、安定した6量体をとること、また、相互作用ペプチドと結合することで、ヘテロ四量体をとることを見出した。このようなオリゴマー状態が環境によって大きく変化する機構は未だわかっていない。以上のように、創薬および基礎研究の観点から、OPTNの立体構造情報が求められているものの、OPTNの構造は部分構造がホモログで報告されているのみであり、全長構造は決定されていない。そのため、我々はOPTNの結晶化スクリーニングを行い、OPTN全長の結晶をえることに成功した。また、得られた結晶が条件によって単位格子が大きく変化することが見出された。そこで本研究では、各条件での結晶の単位格子を回折像から計算し、単位格子のズレが最小限に収まる条件を検討した。

2. 実験内容

OPTN全長およびヒスチジンタグと融合したOPTNと相互作用するペプチドを大腸菌内で共発現し、アフィニティークラムクロマトグラフィーおよびゲルろ過で単一のオリゴマー状態のOPTNを精製した。これをハンギングドロップ法で結晶化することで、OPTNの結晶化を行った。この結晶を、不凍剤等を含む溶液に時間をかけて浸けたのち、液体窒素中に保存し、あいちシンクロトロン光センターのビームラインBL2S1に輸送し、X線を照射し、回折像を得た。得られた回折像から空間群および単位格子の大きさを計算した。

3. 結果および考察

OPTN全長および相互作用ペプチドを大腸菌で発現させ、アフィニティークラムクロマトグラフィーとゲルろ過を用いて精製することでOPTNと相互作用ペプチドの複合体の精製標本が得られた。また、精製標本を用いてハンギングドロップ法による結晶化を行ったところ、OPTNと相互作用ペプチドの複合体結晶と思われる結晶が得られた。この結晶をトレハロース溶液に浸けることでOPTNの結晶が液体窒素下でも凍らないことが、回折像から確認された。回折像から空間群を計算したところ、 I_{222} の空間群をとる結晶がえられた。次に単位格子の大きさを計算したところ、およそ $107\text{Å} \times 135\text{Å} \times 175\text{Å}$ であった。ただし、不凍剤等の溶液の組成および溶液に浸けた時間によって、単位格子が最大、三辺合計 1Å 以上のズレがみられることが確認された。今回得られた結果から、単位格子の変化が最小で、かつ、結晶に不凍剤等を十分に染み込ませる条件の範囲が絞りこめたため、今後は絞り込んだ条件をさらに最適化し、十分な回折像をえることでOPTNの全長構造の決定を試みる予定である。