



ゲルに包埋されたタンパク質結晶の構造解析

友池 史明¹, 室山 晴菜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, ハイドロゲル

1. 背景と研究目的

タンパク質結晶は無機塩の結晶と異なり、およそ 50% を水が占めているため、物理的衝撃に弱いという特徴がある。そのため、ハンドリング操作の過程で物理的損傷を受け、得られるデータの質が劣化しやすいという問題点がある。この問題を解決するために、ハイドロゲルによって結晶を保護する手法が提案されている。これまで我々はタンパク質結晶を調製後、アルギン酸等のハイドロゲルで保護する手法を検討してきた。その結果、アルギン酸ハイドロゲルで保護した結晶からでも、従来と同様に構造決定できることが確認された。しかし、これまではカルシウム溶液の中にハイドロゲルでタンパク質結晶を押し出す形であり、結晶を含むファイバー状のハイドロゲルの径を制御できなかった。そこで本実験では、シリコンチューブ中で結晶を含むアルギン酸溶液とカルシウムイオン溶液を混合することで、形状が制御されたハイドロゲルを調製し、ハイドロゲル中の結晶に X 線を照射することで立体構造を決定した。

2. 実験内容

100 mM 酢酸ナトリウムおよび 1.5 M 塩化ナトリウムを沈殿剤として用いて、カウンターディフュージョン法により、リゾチーム結晶をガラスキャピラリー中に調製した。キャピラリー中の結晶を、アルギン酸を含む沈殿剤溶液で押し出した。アルギン酸を含む溶液で押し出された結晶は、T 字コネクタで接続したシリコンチューブを用いることで、塩化カルシウムを含む沈殿剤溶液と混合した。これにより、リゾチーム結晶を含むファイバー状のアルギン酸ハイドロゲルを調製した。

実体顕微鏡観察下でファイバー状のアルギン酸ハイドロゲルの中で、結晶を含む部分を切り出し、クライオプロテクタントであるグリセロールを含む溶液に浸した後、液体窒素により凍結した。あいちシンクロトロン光センター BL2S1 にて、凍結した試料に X 線を照射し、回折像を取得した。

3. 結果および考察

T 字コネクタで接続したシリコンチューブ内でアルギン酸を含む溶液と塩化カルシウムを含む溶液を混合させた場合でも、ファイバー状のハイドロゲルを得ることができた。また、タンパク質結晶を含むキャピラリーを接続したところ、タンパク質結晶を含むファイバー状のハイドロゲルを得ることができた。また、ファイバー状であるため、結晶を含む部分のみを容易に切り出すことができた。しかし、グリセロールを含む沈殿剤溶液に結晶を浸した後、凍結し、X 線を照射したところ、アイスリングが観察された。色素を用いた予備検討では、ハイドロゲル中であっても、タンパク質結晶に低分子が染み込む速さは変わらないという結果が得られていたが、ハイドロゲルの体積が大きいほど、長時間、クライオプロテクタントの溶液に浸す必要があることが示唆された。

今後の研究として、今回の実験で用いたチューブよりも径の小さいチューブ、またはマイクロ流路を用いることで、タンパク質結晶を包むハイドロゲルの体積を小さくする手法の確立を目指す。