



## ゲルで保護されたタンパク質結晶の検証

友池 史明<sup>1</sup>, 加藤 誠一<sup>1</sup>, 室山 晴菜<sup>1</sup>, 永江 峰幸<sup>2</sup>, 岡田 哲二<sup>1</sup>

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

タンパク質結晶は物理的衝撃に弱いため、ハンドリング操作で損傷を受け、得られる回折像の質が劣化するという課題がある。そこで当研究室では、これまでタンパク質結晶をハイドロゲルで保護する手法の開発を進めてきた。既にアルギン酸ハイドロゲルによってタンパク質結晶を保護する手法を確立している。しかし、アルギン酸ハイドロゲルのゲル化では二価の金属イオンが必要であるため、二価の金属イオンを捕囚子として利用する多くの酵素では利用できなかった。そこで二価の金属イオンをゲル化に用いない他のハイドロゲルの利用が期待される。そこで本研究では、ソーマチンの結晶をアルギン酸以外のハイドロゲルで保護し、あいちシンクロトロン光センターで回折像を得ることで、ゲルで保護された結晶について調べた。

### 2. 実験内容

100 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM 酒石酸を沈殿剤として利用した蒸気拡散法により、市販のソーマチンを結晶化した。得られた結晶をガラスキャピラリー中にうつし、ゲル化することで、ソーマチンの結晶を保護したハイドロゲルを得た。実体顕微鏡でハイドロゲルを観察し、結晶を含む部分を切り出すことで、結晶を含むハイドロゲルを得た。得られたハイドロゲルをグリセロール溶液につけた後、液体窒素で凍結し、あいちシンクロトロン光センターに輸送した。あいちシンクロトロン光センターBL2S1にて、凍結したハイドロゲルにX線を照射し、回折像を取得した。えられた回折強度をスケーリング後、CCP4iによる分子置換法によって初期位相を決定し、Phenixを利用して立体構造モデルを精密化した。

### 3. 結果および考察

ソーマチンの結晶化に用いる酒石酸は、二価の金属イオンと結合して沈殿が生じるため、アルギン酸のハイドロゲルによる保護が難しい。一方、二価の金属イオンを用いずにゲル化する他のハイドロゲルを利用した場合には、ソーマチンの結晶を保護したハイドロゲルを容易に得ることができた。ハイドロゲル中のソーマチン結晶にX線を照射し、回折像を得て、単位格子の大きさ、および空間群を決定したところ、既知のソーマチンと同じ単位格子の大きさ、および空間群を得られた。このことから、ハイドロゲルによる保護が、タンパク質結晶に影響を与えないことが示唆された。

また、回折像をスケーリングし、分子置換法によって立体構造を決定したところ、1.7 Åの分解能で立体構造を決定することができた(図1)。この決定された構造からも、ハイドロゲルで保護されたタンパク質結晶からも、従来と同等の立体構造が決定できることが示唆された。また、グリセロールと思われる電子密度も観察されたことから、ハイドロゲルを通して、低分子を導入できることがわかった。

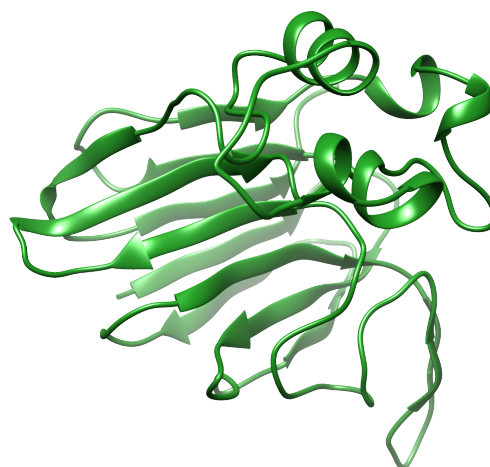


図1 決定されたソーマチンの立体構造