

光化学反応をトリガとするタンパク質の結晶化の機構

(群馬大院工¹・さががけ²) ○奥津哲夫^{1,2}, 田口徹¹, 高瀬裕太¹, 堀内宏明¹, 平塚浩士¹

【序】我々はタンパク質溶液に光を当てると、タンパク質の結晶が出現しやすくなるという現象を見だし、その機構を明らかにしてきた。¹⁾本討論会では、アミノ酸残基レベルでタンパク質の反応を明らかにし、結晶化促進の機構を考察した。

Fig. 1 に結晶成長の初期過程を示す。溶液が過飽和状態であっても臨界核以下の大きさのクラスターは表面自由エネルギー不利のため不安定である。もっとも不安定なのは $n=2$ の二量体である。光化学反応でタンパク質の共有結合性ダイマーが生成する。このダイマーは安定であるので、これが臨界核に成長し結晶化が促進されると考えている。モノマーから出発する場合と、ダイマーから出発する場合には、臨界核形成頻度が 10^7 倍大きくなることがわかっている。

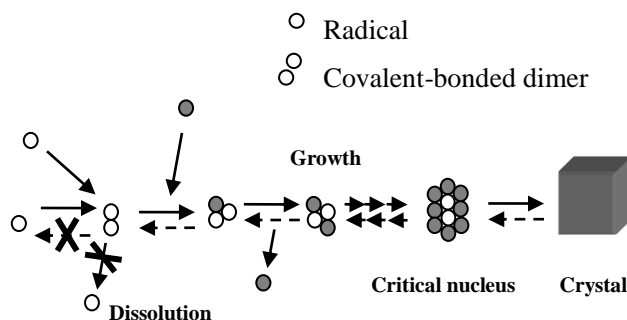


Fig. 1 Light-induced nucleation mechanism of protein. Photochemical product, protein dimer, behaves as smallest cluster. The photochemical dimer is stable and the nucleation is accelerated.

一方、反応で生成したダイマーが結晶中の隣り合う二つの分子と似た構造をとるならば、結晶へと成長できると考えられるが、反応でどのようなダイマーが生成するのか今までわからなかった。反応で生成したダイマーのうち結晶に成長できるダイマーを良いダイマー、成長できないダイマーをダメダイマーと呼んできたが、本研究では良い/ダメダイマーの構造をアミノ酸の反応性で調べることにした。

タンパク質として、ニワトリ卵白リゾチームを用い、反応中間体として生じたアミノ酸のラジカルが、他のどのアミノ酸と反応するのか過渡吸収法を用いて調べた。その結果、リゾチームの場合、53番の Tyr 残基同士が結合したダイマーが結晶中の隣り合う二つの分子とよく似た構造をとるために結晶化が促進されることが明らかとなった。この考察から、反応で生じたダイマーの構造が結晶中の構造と似たのは偶然であることがわかった。このため、偶然に頼ることなく結晶化を促進させるダイマーを積極的に作り出す検討も始めた。

【実験】過渡吸収法はナノ秒過渡吸収法を用いた。タンパク質としてニワトリ卵白リゾチーム（生化学工業6回再結晶品）を用いた。最初にタンパク質の光化学反応中間体として生成する Trp および Tyr のラジカルを生成させ、20種類のアミノ酸のうちどれがスカベンジャーとなり得るか調べた。次に、リゾチームの反応中間体を生成させスカベンジャーとなるアミノ酸を加えてラジカルの寿命を調べた。これらの結果から、タンパクの光化学反応中間体が他のタンパクのどの部分と結合するのか、その結果得

られるダイマーの構造はどのような形か検討した。

【結果と考察】Trp 溶液にアミノ酸を加え Trp ラジカルの減衰を観測したところ、Trp ラジカルは Trp および Tyr のみと反応することが明らかとなった。Trp 残基同士が結合してダイマーが形成される時は結晶核になり得ないことがわかっている。Trp 残基のラジカルは Trp と反応して Tyr のラジカルを生じることが判明した。次に Tyr のラジカルを生成させ、20 種類のアミノ酸を加えていった。その結果、Tyr のラジカルは Tyr ともっともよく反応することが明らかとなった。つまり、タンパク質は光励起されて Tyr 残基同士が結合して二量体を作る可能性が高いことがわかってきた。リゾチームは、放射線化学反応で Tyr 残基同士が結合したダイマーを形成することが報告されている。²⁾ リゾチームでは表面に存在する Tyr 残基は 20, 23, 53 番目にある。これらが結合してできるダイマーの構造は 6 通りである。Fig. 2 に構造を示した。このうち、Tyr⁵³-Tyr⁵³ 同士でダイマーを形成したときの構造が結晶中の隣り合う二つの分子と同じ構造をとることが判明した。この構造が良いダイマーであり、他のものはダメダイマーである。本研究ではリゾチームをもちいて構造を検討したが、アミノ酸レベルの反応様式はタンパク質に共通であり、Tyr 残基同士が反応してダイマーを形成すると思われる。このとき生じたダイマーが結晶中で隣り合う二つの分子と同じ配置をとったことはリゾチームの場合偶然の出来事である。他の分子でも同じことが起こるとは限らない。また、Tyr 残基が表面に出ていないタンパクではダイマーを生成しないこともある。多様な構造のダイマーを生成させる方法を現在検討中である。

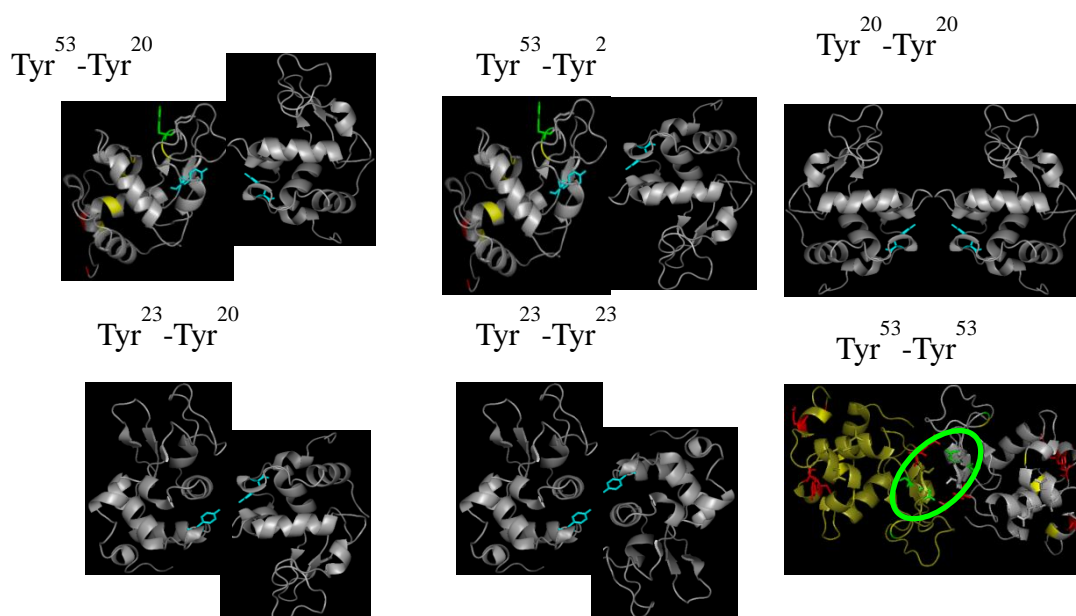


Fig. 2 Conformations of lysozyme dimers which are expected to be produced by photochemical reaction. The dimer bound at Tyr⁵³-Tyr⁵³ residues has an identical configuration to the neighbor two molecules in crystal.

- 1) T. Okutsu *J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews*, **8**, 143-155 (2008).
- 2) S. Hashimoto, *INT. J. RADIAT. BIOL.*, **41**, 303 (1982).