

タンパク質の光誘起結晶化 テンプレート分子の考察

(群馬大院工¹・JST さきがけ²) 奥津哲夫^{1,2}, 黒岩高志¹, 高瀬裕太¹, 堀内宏明¹

我々はタンパク質の光誘起結晶化の現象を見だし、機構の解明を進め、実用化の検討を行ってきた¹⁾。Fig. 1 に結晶化の初期過程を示す。モノマーから分子の集合体が形成され、臨界核を超えた大きさになると自発的に結晶成長が始まる。過飽和であっても臨界核以下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、核形成が起こらない準安定状態の領域が存在する。タンパク質は結晶となるための分子間力が弱く、かつ分子の異方性が大きいという特徴があり、核形成が起こりにくいいため溶解度の数十倍も溶けてしまうことがある。

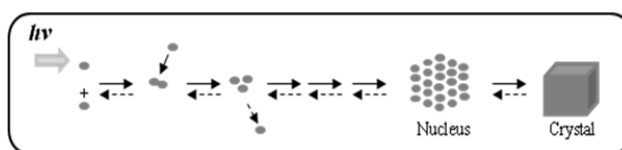


Fig.1. Light-induced crystallization mechanism of protein.

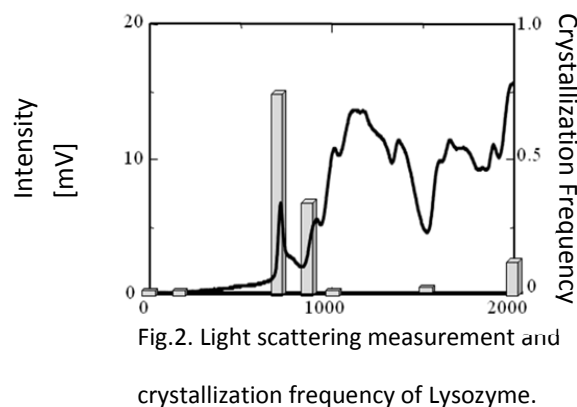
このように過飽和でありながら、核形成が自発的に始まらない溶液中のタンパクに化学反応を起こさせ、ダイマーを生成させると核形成が始まる現象が光誘起結晶化である。反応で生成したダイマーは共有結合性で安定であり、モノマーから出発する場合に比べて臨界核を超えるための段階が一つ減り、結晶化頻度が高くなると説明してきた。

本討論会では反応で生成したダイマーが臨界核に成長する構造をしているか検討する。ダイマーが結晶に成長するためには、ダイマーが結晶中の隣り合う二つの分子と同じ構造をしていることが必要と考えられる。このような分子のことをテンプレート分子と言うことにする。光化学反応で生成したダイマーは、Tyr 残基同士で結合する構造を取ることが多いので、必ずダイマーがテンプレート分子として機能するとは考えられない。そこで、テンプレート分子が生成するような反応の機構を検討した。そのために、キノンの光化学反応を応用し、様々な構造のダイマーを形成させそのうちのどれかがテンプレート分子となることを期待した。

また、一旦テンプレート分子が形成され、自発的に結晶成長が始まれば、溶液に光を当て続ける必要が無くなり、タンパク質の損傷を最小限にとどめることができる。テンプレート分子の形成を光散乱で検出した。

実験 タンパク質にはニワトリ卵白リゾチームあるいはリボヌクレアーゼ A を用いた。反応用の光源に 355nm のレーザー光を用いた。キノンにフェナンスレンキノンを用いた。タンパクは 355nm の光を吸収せずキノンのみが吸収する。散乱光は HeNe レーザー光を用い、フォトダイオードを用いて 90 度方向から検出した。

結果と考察 Fig. 2 に光散乱測定の結果を示す。横軸に光照射時間、縦軸に散乱光の強度をプロットした。試料溶液は 2mg のリゾチームを含む等電点の pH の溶液で、自発的には何も起こらない溶液である。照射を始めて 600 s 経過した頃から散乱光が急激に立ち上がり、その後増減を繰り返しながら散乱光は増えていった。途中で光照射を止めても、200s 照射すると散乱光は増加した。散乱光をもたらした物質がテンプレート分子であるか確認するために、この溶液を過飽和な溶液に滴下し成長するか確かめた。Fig. 2 の右軸に結晶の出現頻度を棒グラフで示した。この結果から、散乱光が急激に立ち上がる時、すなわちクラスターが急激に成長した時、テンプレート分子が生成したと考えられる。この実験は、リボヌクレアーゼ A でも成立した。



次にテンプレート分子として求められる構造について考察した。リゾチームの場合分子表面の Tyr 残基は 3 個ある。このうち、 ^{53}Tyr - ^{53}Tyr 部位で結合したダイマーは結晶中の単位格子の中で隣り合う二つの分子と近い配置を有するのでテンプレート分子であると考えられる。しかしながら、反応で生じるダイマーの構造は必ずしもテンプレート分子にならないことがわかった。そこで、キノンを加えキノンのみを励起し、タンパクダイマーが生成するか確認した。電気泳動によりダイマーの存在が確認できた。次に散乱光測定を行った。結果を Fig. 3 に示す。キノンを加えた溶液に光を当てると散乱光が急激に増加する様子が確認された。また、キノンの励起でリゾチームの結晶化が促進されることも確認した。

次にテンプレート分子として求められる構造について考察した。リゾチームの場合分子表面の Tyr 残基は 3 個ある。このうち、 ^{53}Tyr - ^{53}Tyr 部位で結合したダイマーは結晶中の単位格子の中で隣り合う二つの分子と近い配置を有するのでテンプレート分子であると考えられる。しかしながら、反応で生じるダイマーの構造は必ずしもテンプレート分子にならないことがわかった。そこで、キノンを加えキノンのみを励起し、タンパクダイマーが生成するか確認した。電気泳動によりダイマーの存在が確認できた。次に散乱光測定を行った。結果を Fig. 3 に示す。キノンを加えた溶液に光を当てると散乱光が急激に増加する様子が確認された。また、キノンの励起でリゾチームの結晶化が促進されることも確認した。

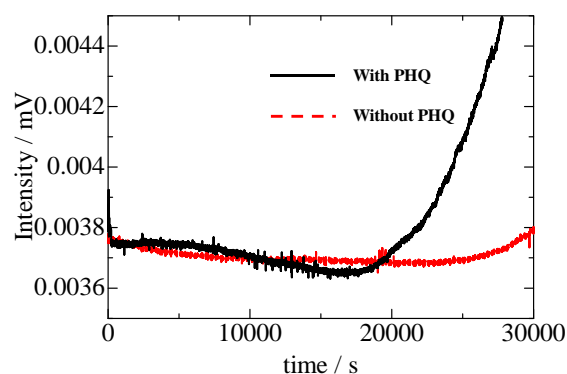


Fig. 3 Light scattering measurement of Lysozyme and PHQ mixture solution.

1) T. Okutsu, J. Photochem. Photobiology C: Photochemistry Reviews **2007**, 8, 143.