

## 2P158

### ポリエチレングリコールを用いた lysozyme の光誘起核生成の促進

(群馬大工) ○佐藤正樹, 奥津哲夫, 平塚浩士

【序論】ゲノム新薬を実現するためには、疾患に関わるタンパク質を明らかにし、そのタンパク質の基本構造と機能を明らかにする必要がある。そのためにはタンパク質の良質な単結晶を育成し、X線結晶構造解析を行うことが必須の過程である。本研究では自発的に結晶化が起こらない条件の溶液に光照射を行い、核生成を誘起することを目指している。これまでに、過飽和度2程度の結晶化が起こらない準安定状態にある lysozyme 溶液から核生成が誘起されることを報告した。<sup>1)</sup> 本報告では、光を用いた結晶化を行う場合により適した結晶化方法の検討を行なった。

光照射によりタンパク分子の拡散定数は低下し、分子間相互作用が引力方向に変化する事が判明した。このことから光による核生成促進の機構は、反応中間体の分子間相互作用の変化によると考えられる。分子間相互作用の変化が核生成を促進しているのであれば、塩析だけでなく非電荷ポリマーを用いる結晶化の方がより効率良く結晶化が促進されると期待される。非電荷ポリマーを用いたときに期待される結晶化の機構を図1に示す。非電荷ポリマーは排除体積効果を有し、見かけのタンパク質濃度を上げる働きがあると考えられている。<sup>2)</sup> これを確かめるために、タンパク質として lysozyme を、非電荷ポリマーとしてポリエチレングリコールを用い、光誘起結晶化の効率を塩析のみの場合と比較した。

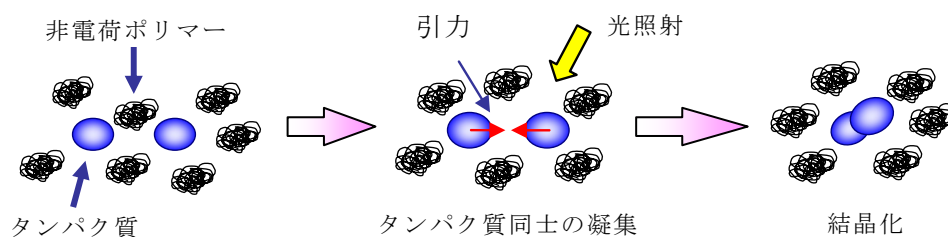


図1 非電荷ポリマーを用いたときに期待される結晶化の機構

【実験】Lysozyme は生化学工業社製の6回再結晶品をそのまま使用した。ポリエチレングリコール (PEG 分子量 4000) は Hampton Research 社製を用いた。光照射は 150 W キセノンランプを分光せず、180 秒間行なった。溶解度曲線の作製は 1.5 ml マイクロチューブに lysozyme (10.2 mg ml<sup>-1</sup>) と NaCl (1.4 M) + PEG (0, 0.1, 0.2 %) を加えた溶液を調製し、結晶化を行なった。これらの溶液中には結晶が析出し成長したので、溶液中の lysozyme 濃度は減少した。上澄み溶液を 100 μl 取り出し、吸光度を測定して溶液の濃度を決定した。調製してから 16 日後と 26 日後の濃度が一定となったので 26 日後に観測された濃度を溶解度とした。タンパク質の結晶化は、蒸気拡散法を用いずバッチ法により行なった。沈殿剤に NaCl のみを用いた場合と PEG を含む場合の lysozyme 溶液を同じ過飽和度に調製し、光誘起結晶化の比較を行なった。過飽和度は lysozyme 濃度を変化させて等しくした。

【結果】最初に PEG が lysozyme の沈殿剤として適当かどうか検討するために、Lysozyme に PEG を用い結晶化を行なったところ、PEG の濃度を高くしても結晶は析出してこなかった。このことから、PEG 単独では沈殿剤として結晶を析出させることができないと判断した。そこで、lysozyme に NaCl を加え、塩析による結晶化が起こる直前の準安定状態の溶液を調製し、その溶液に PEG を加え結晶を行い、結晶の析出数を比較した結果、PEG を加えた NaCl を沈殿剤として用いた場合に光誘起結晶化が起こることを確認した。

光誘起結晶化の程度を議論するためには、過飽和度を定量的に設定して比較する必要がある。そこで、PEGを加えたNaClを沈殿剤に用いた系の溶解度を決定した。結果を表1に示す。

Solubility (mg mL <sup>-1</sup> )	1.4 M NaCl		
	PEG 0 %	PEG 0.1 %	PEG 0.2 %
( $\beta = 3.0$ )	1.06	0.45	0.37
( $\beta = 3.5$ )	3.17	1.11	1.34
( $\beta = 3.5$ )	3.71	1.30	1.56

表 1 PEG 0, 0.1, 0.2 % での各過飽和度における lysozyme の濃度 (mg mL<sup>-1</sup>)

沈殿剤にNaClのみを用いた場合とPEGを含む場合のlysozyme溶液を過飽和度 $\beta = 3.0$ 、 $3.5$ に調製して、光誘起結晶化を行なった。結果を図2に示す。NaClのみの溶液からは結晶は出現しなかったが、PEGを0.2%加えた溶液から、 $\beta = 3.0$ の溶液で3個、 $\beta = 3.5$ の溶液からは15個以上の結晶が析出した。このことから同じ過飽和度で比較してもPEGを含む溶液では、光による核生成がより促進されることが判明した。

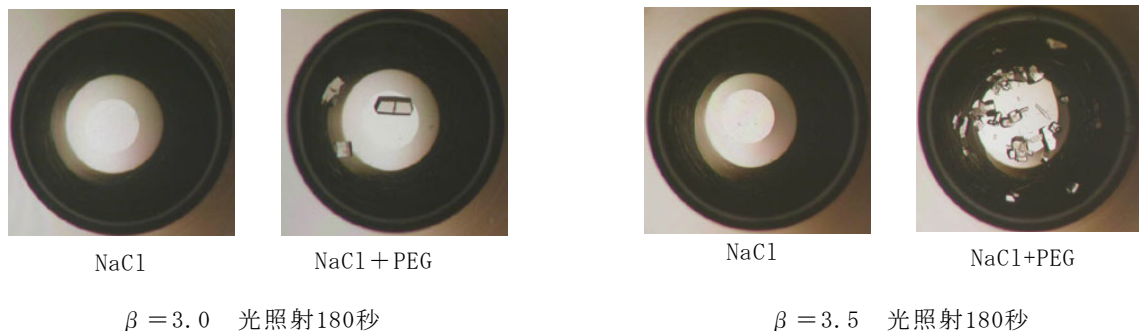


図 2

光照射時間を変化させたときの結晶の析出数を図3に示す。 $\beta = 3.0, 3.5$ ともにPEGを加えていないものは光照射を行っても結晶は析出しなかった。PEGを加えたものは光照射時間の増加に伴い結晶の析出数が増加した。また、過飽和度が高いもののほうが結晶の析出数が高くなった。

以上の結果から、非電荷ポリマーPEGには光誘起核生成をより促進する働きがあることが判明した。

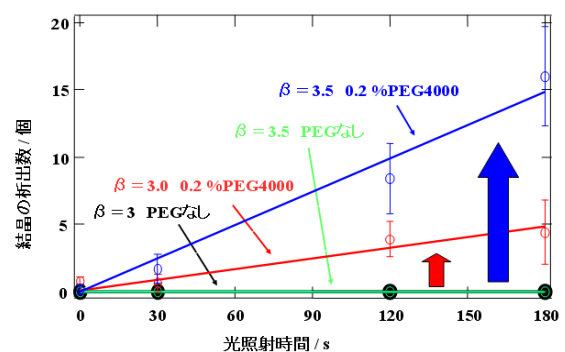


図 3 光照射時間に対する結晶の析出数

【参考文献】

- 1) T. Okutsu et al., *Crystal Growth & Design*, **5**, 1393-1398, **2005**.
- 2) 溶液からの結晶成長、佐藤 清隆、共立出版、2002年 p.150-151.