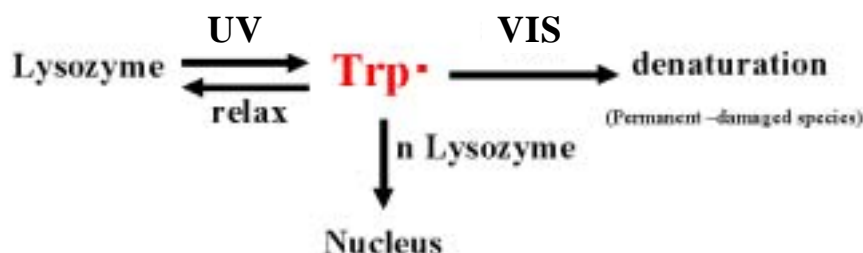


光を用いたリゾチームの誘起核形成促進の機構の解明

(群馬大工) 古田 憲司, 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。しかし、結晶の作製は困難で、優れた結晶核の作製方法が待望されている。本研究では自発的に結晶化が起こらない溶液に光照射を行ない、光により核形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卵白リゾチーム溶液から核形成が誘起されることを報告した。¹⁾ 本研究ではその機構の解明を進めた。酵素活性の測定からリゾチームは 2 光子過程で中間体が生成し、段階的に変性すること、短時間の光照射では結晶は析出するが、長時間の光照射では結晶は析出しなくなることがわかっている。そこで Scheme 1 に予想される光誘起核形成の機構を提案した。リゾチームは 280 nm 光 (UV 光) を吸収して反応中間体 (Trp \cdot) を生成する。この反応中間体が結晶核となるために核形成が起こると予想した。短時間の光照射であれば、Trp \cdot はリゾチームに戻ることができるが、Trp \cdot はもう 1 光子吸収することにより変性し、酵素活性を失う。本研究では、Scheme 1 に示した変性の機構および中間体が核形成に関与するか検討した。中間体である Trp \cdot だけを選択的に励起するため、照射光を UV 光と VIS 光の 2 種類に分けて光照射を行い、酵素活性の変化と結晶化の関連性を調べ、光誘起核形成機構の解明を行った。



Scheme 1 予想される光誘起核形成の機構

【実験】卵白リゾチームは生化学工業の 6 回再結晶品をそのまま使用した。光誘起核形成機構の解明のため、照射光源を分光して Trp \cdot を生成するための約 280 nm UV 光と、光学フィルターで 355 nm 以下をカットした Trp \cdot を消光するための VIS 光を別々に照射して、2 色の光を用いた酵素活性の測定および結晶化を行った。照射光源には 300, 500W のキセノンランプを用いた。

リゾチーム溶液の光照射による酵素活性の変化はマイクロコッカス・ルテウス法 (ML 法) を用いて測定した。結晶化はバッチ法を用いた。1.4 M の NaCl を含む $\mu = 2$ の準安定状態のリゾチーム溶液に光照射を行なった後、濃厚なリゾチーム溶液と混合し、パラフィンオイル中で気液界面における不均一核形成を抑制した条件で液滴を作製し、22 で結晶成長させた後に観察した。

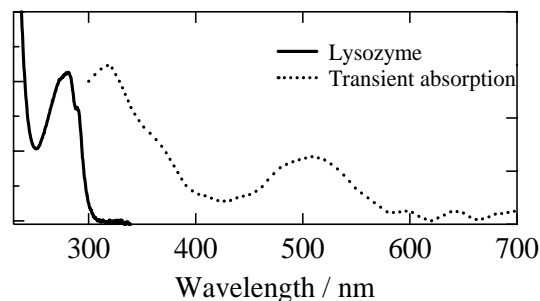


Fig.1 リゾチームと過渡種の吸収スペクトル

【結果と考察】Fig.1 にリゾチームと過渡種の吸収スペクトルを示す。この過渡種の吸収はリゾチーム分子内のトリプトファン残基が中性ラジカルとなったものであることが確認された。Fig.2 にリゾチームの光照射時間に対する酵素活性の変化を示す。VIS

光を照射しても，ほとんど活性は変化しなかった．UV 光を照射すると，30 s 程度までは活性は変化せず，さらに長時間の光照射を行なうと，活性は低下した．UV 光と VIS 光を同時に照射すると，酵素活性は速やかに低下した．リゾチームは Fig.1 に示すように UV 光により可視領域に吸収を有する Trp \cdot が生成する．VIS 光の照射で Trp \cdot がさらに励起されることにより酵素活性が低下したことから，Scheme 1 に示した 2 光子過程による酵素活性の失活を示すことができた．

Fig.3 に 2 色の励起光を用いた光誘起核形成の結果を示す．実験は結晶が自然発生しない過飽和条件に設定した．光照射を行わないサンプルを Type とした．Type の実験では，液滴から結晶の析出は観察されなかった．VIS 光のみを照射したときにも液滴に結晶の析出は観察されなかった．これは，可視光ではリゾチームが励起されないことから Type と一致する．UV 光を照射すると液滴から結晶の析出が観察された．これは UV 光照射により核形成が促進される以前の報告のとおりである．UV 光と VIS 光を同時に照射すると結晶の析出は観察されなくなった．これは，UV 光により Trp \cdot が生成しても，VIS 光を吸収して変性したために結晶化が起らなかったと考えられた．以上の結果から，中間体が核形成の促進に関与することが結論された．

Fig.4 にソーマチンとパパインの過渡吸収スペクトルを示す．過渡吸収スペクトルはどちらもリゾチームとよく似ていることから、リゾチームと同様の反応中間体が生成している．ソーマチンでは光誘起核形成が確認されていることから、パパインでもこのスペクトルから光誘起核形成が期待され検討中である．

【結論】リゾチームは UV 光を吸収し，分子内のトリプトファン残基がラジカルとなった反応中間体 (Trp \cdot) を生成する．Trp \cdot は可視光を吸収することにより活性を失う．このときに結晶化も阻害される．結晶核形成の促進には反応中間体が関与していることが明らかとなった．

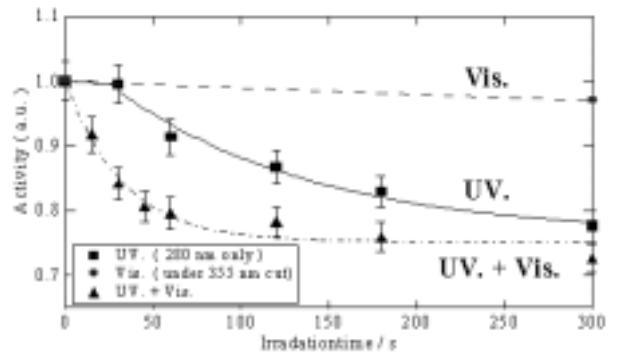


Fig.2 照射時間に対する 2 色を用いた酵素活性の変化

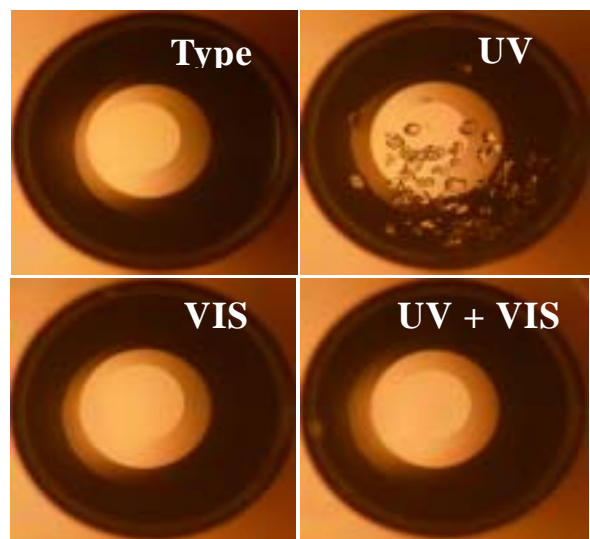


Fig.3 2 色の励起光を用いた光誘起核形成

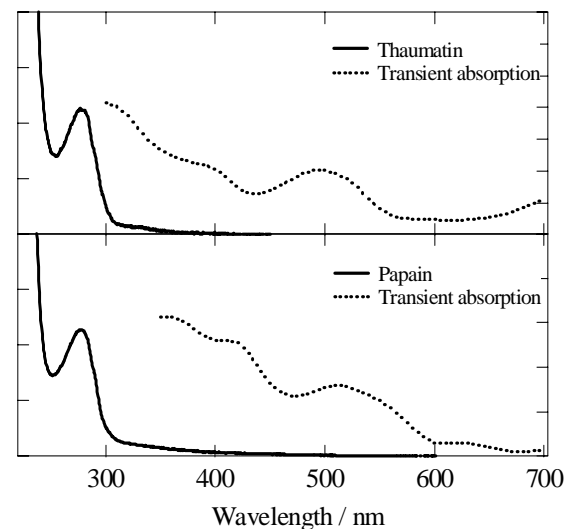


Fig.4 ソーマチン,パパインと過渡種の吸収スペクトル

1) T. Okutsu, K. Furuta, M. Terao, H. Hiratsuka, A. Yamano, N. Ferte, and S. Veessler, *Crystal Growth & Design*, 5 (2005) 1393-1398