

## タンパク質の光による結晶化

(群馬大工) 奥津哲夫, 古田憲司, 佐藤正樹, 杉山恵介, 平塚浩士

【序】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作業である。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い、核形成を光で誘起することを目指している。今までに、過飽和度2の準安定状態にあるニワトリ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。<sup>1)</sup> 本報告では再現性良く光誘起結晶化を起こさせるための実験方法の構築、光を用いた結晶化を行う場合により適した結晶化処方検討、およびリゾチーム以外のタンパクにおける光誘起結晶化を検討した。

【実験】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。ソーマチンは和光純薬より入手しそのまま使用した。照射に使用した光は150 W キセノンランプを分光せず用いた。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った。

【結果】1. 光誘起核形成を確実に観察するための実験方法の改良。

タンパク質の結晶化は、過飽和度7~10程度のタンパク溶液を10 $\mu$ l程度の液滴とし、この液滴を溶液が乾燥しないようにリザーバー溶液を含むチャンバー中に封入し、数日後に析出した結晶を観察するのが一般的な方法である。我々は、当初このようにして調製した液滴に光を直接当て、数日後に観察していた。しかしながら、液滴に直接光照射をすると、気液界面からの溶媒の蒸発により過飽和度が高まることが予想された。また、液滴のタンパク濃度が高いため、光が液滴表面でしか吸収されず、溶液全体に影響を及ぼしていないという問題があった。これらの問題点を排除し、光化学的な効果のみを議論するために、核形成とその後の成長段階を分離する実験方法を考案した。図1に実験方法を示す。光を照射する溶液は数 mg ml<sup>-1</sup>のタンパク溶液とし、沈殿剤を加えて過飽和度が2程度の準安定溶液とした。これを光路長2 mmの石英セルに入れ、キセノンランプ光を照射した。照射時間は最大で数分である。このセルの中のタンパク溶液は均一に励起され、蒸発は起こらない。光照射により結晶核の生成が期待される。核を成長させるために溶液を濃厚なタンパク溶液と混合した。タンパク溶液を混合させるバッチプレート上には予めパラフィンオイルをはっておき、液滴が空気と触れないようにした。混合後の溶液の過飽和度は3程度と低くし、自発的な核形成は起こらないようにし、溶液中に結晶核が存在すれば2日程度で成長させるようにした。これは種晶法の一つであるが、核形成と成長のステップを分けることにより、光を照射しない溶液からは結晶が出現せず、照射溶液からは析出させることがリゾチームの系では再現

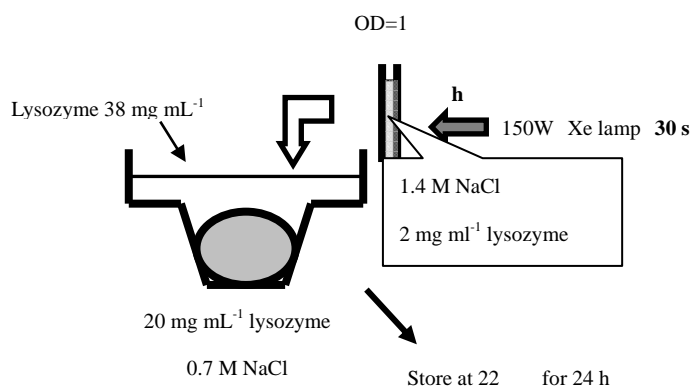


図 1

性良く観察できるようになった。

## 2. ソーマチンの光誘起核形成

ソーマチンの光誘起核形成がリゾチームと同様に起こるか検討した。ソーマチンの結晶化には酒石酸ナトリウムカリウム(PST)を沈殿剤に用いた。最初に溶解度曲線を作製した。上澄み溶液のタンパク濃度を測定し、濃度が一定となったときの値を溶解度とした。図2に得られた溶解度曲線を示した。次に光により結晶化が促進されるか検討した。タンパク濃度  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ 、PST 濃度  $0.8 \text{ M}$  の過飽和度1の溶液を作製し、種晶法により結晶育成を行った。結果を図3に示す。光照射を行わない溶液からは、いくつかの結晶が析出しているが、光照射を行った溶液からは多数の結晶が析出した。出現した結晶の形は過去に報告されているソーマチンの結晶と同じであった。次に未飽和溶液に光を当て、同様の実験を行った。図2に示したの濃度(過飽和度0.5)を調製し光照射を行った。2日後に観察すると、光照射した溶液には結晶が多く析出していた。これらのことから、ソーマチンでも光誘起核形成が認められた。

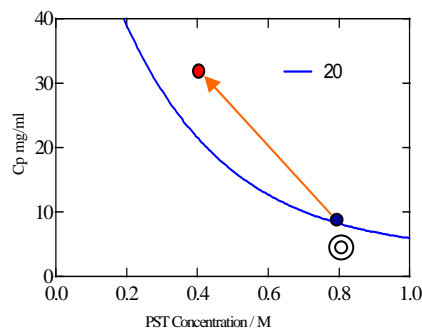


図2 ソーマチンの溶解度曲線



図3 ソーマチンの光誘起核形成。

(左) 光照射無し。(右) 光照射 60 秒

## 3. 新たな結晶化処方案の提案

動的光散乱測定を行うと、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。光による核形成促進の機構は、反応中間体とタンパク分子の分子間相互作用の変化によるものと考えられるが、詳細は今のところ明らかではない。

分子間相互作用の変化を利用し、より効率よく光誘起結晶化を行おうとするならば、塩析だけでなく非電荷ポリマーを用いる結晶化の方が好ましいと考えた。非電荷ポリマーは排除体積効果を持ち、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。これを確かめるために、タンパクとしてリゾチームを、非電荷ポリマーとしてポリエチレングリコール PEG (分子量 4000) 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。最初に PEG のみで結晶化が起こるか調べた。その結果、PEG 単独では沈殿剤として作用しないことが判明した。そこで、結晶化が起こらない程度に塩化ナトリウムを加えた溶液に PEG を添加し効果を比較した。最初に食塩と PEG を含む沈殿剤を用いた場合も光誘起結晶化が起こることを確認した。次に、光誘起結晶化の程度を定量的に議論するために、この沈殿剤を用いた溶液の溶解度を決定した。次に過飽和度を等しくして比較したところ PEG を含む沈殿剤の方が光誘起結晶化は効率よく起こることが判明した。