

3A14

タンパク質の光誘起結晶化方法の検討

(群馬大工) 奥津哲夫, 古田憲司, 佐藤正樹, 治田将, 戸丸 卓真, 平塚浩士

タンパク質の高次構造を明らかにし、機能を理解する方法は X 線結晶構造解析である。このためには結晶化は必須の作業である。しかし、この工程には定法がなく、熟練した研究者の経験と勘に頼っている。解析作業は SPring-8 の稼働により飛躍的に進歩しているため、優れた結晶作成方法の出現が待ち望まれている。我々は弱い UV 光をリゾチームの過飽和溶液に数分間照射するとタンパク質の白濁が生じることを見いだした(図 1)。この白濁は塩析を起こさせる沈殿剤が存在する場合に限り生成した。このことから、白濁はタンパク質が凝集したものであり、光照射により結晶核が形成されると予想した。

実験方法の構築、核形成頻度の定量的な取り扱い、光による酵素活性の変化、および結晶化が起こる機構に関して検討を進めてきた。図 2 に示した実験方法を取り入れることにより、極めて再現性良く光誘起結晶化を起こさせることが可能になった。実験結果の一例を図 3 に示す。準安定状態の溶液(過飽和度 7)の溶液にキセノンランプ光を 60 秒間照射し、1 日後に観察するとリゾチームの結晶が成長した。光照射を行わない溶液(図 3 左)には結晶は出現しない。今までに、

(1) 波長依存性を調べたところ、リゾチームの電子遷移に対応する光を照射すると核形成が促進されることから、光化学的な現象であることが判明した。

(2) 酵素活性と光照射時間・照射光強度の関係を調べたところ、酵素活性の失活が段階的二光子過程で進むことが判明した。このことから一光子吸収により生成する反応中間体の存在が示唆された。二色励起の実験を行った結果、この反応中間体がもう一光子吸収するとタンパク質が変性することが判明した。

(3) 過渡吸収法による測定を行い、リゾチームのトリプトファン残基がラジカル化した反応中間体が検出された。中間体は二次過程で減衰した。その寿命はクラスターを十分形成する程度あることを確認した。反応中間体が結晶化に関与していることが示唆された。¹⁾

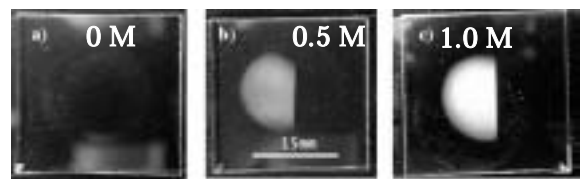


図 1 リゾチームの溶液に光照射すると白濁が生じる。白濁の濃度は沈殿剤として用いる食塩の濃度(0, 0.5, 1.0 M を比較した)が高いときにより顕著である。

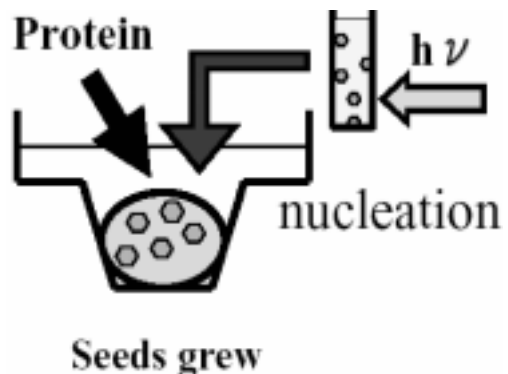


図 2 光照射を用いた結晶化法(種晶法)

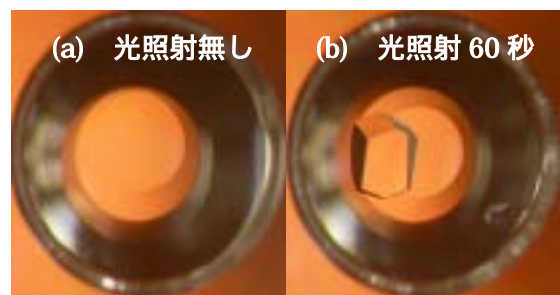


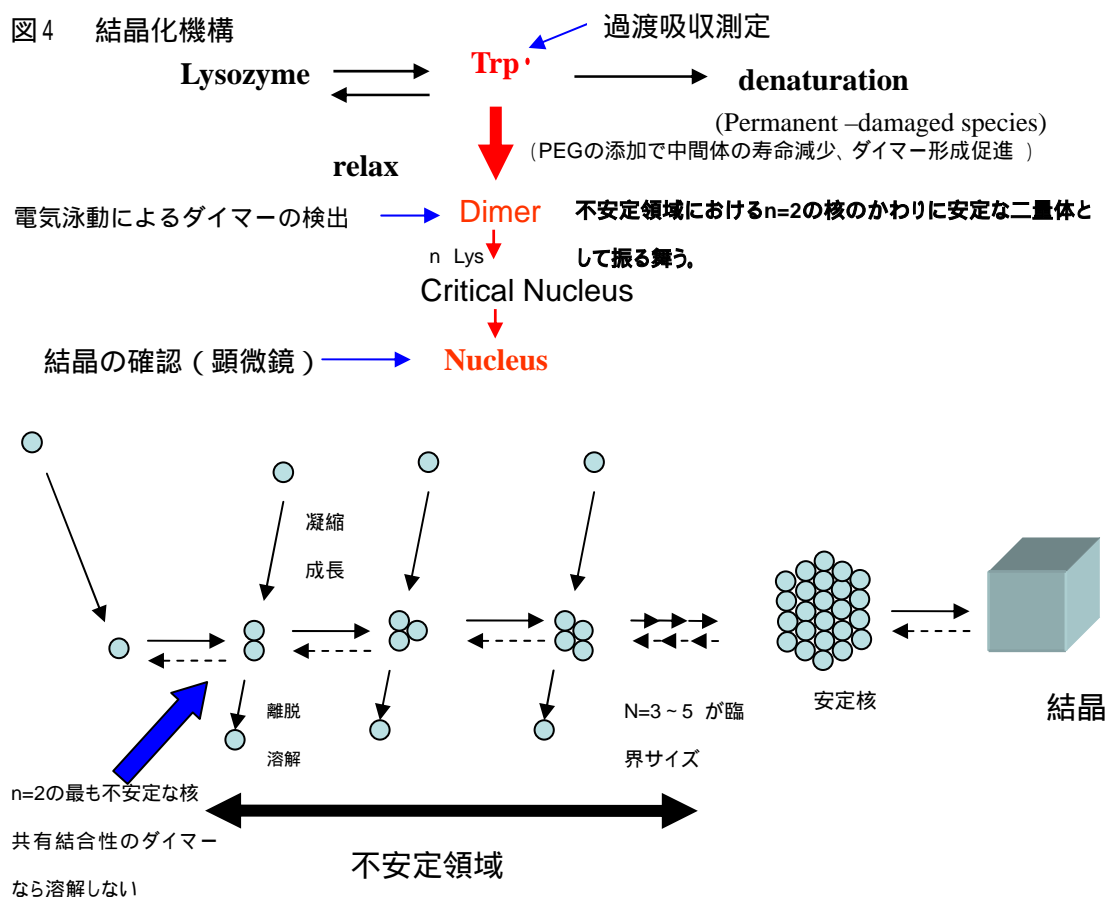
図 3 光誘起核形成の実験結果。(a) 光照射を行わない溶液からは結晶は出現しないが、(b) 光照射を行った溶液を混合した溶液からは結晶が出現する。

- (4) 光誘起により得られた結晶は定法で得られた結晶と格子定数が一致していた。
- (5) 反応中間体ラジカルをスカベンジする実験を行い、中間体ラジカルを消滅させると結晶が出現されなくなることから反応中間体が核形成に関与していることを確認した。²⁾

本当論会では反応中間体が二分子反応してダイマー形成を行うことが明らかとなったので報告する。リゾチーム溶液に紫外光を1時間照射し、SDS-PAGE法で観察したところ、二倍の分子量を持つスポットが観測された。スポットの濃度は照射時間の増加と共に濃くなった。また、沈殿剤(0.7 M NaCl)を加えると、ダイマーのスポットはさらに濃度が増した。以上のことから、反応中間体ラジカルがダイマーを形成していることが明らかとなった。リゾチームの光誘起核形成の機構を図4上のスキームにまとめた。

結晶化とは、分子が凝集し、クラスターを形成して臨界核サイズとなり、結晶に成長するプロセスである(図4下)。この過程でファンデルワールス力により会合した二量体は最も不安定なクラスターであり、結晶核形成の律速段階である。光化学的に生成したダイマーは、共有結合性であり安定である。このダイマーが、ファンデルワールス二量体と同じ役割を果たすことにより、光誘起核形成が起きたと考えている。これまでの研究から中間体 → ダイマー → 結晶の機構を、過渡吸収法、電気泳動法、顕微鏡観察により追跡することができるようになった。

図4 結晶化機構



- 1) T. Okutsu et al., *Crystal Growth & Design*, **5**, 1393-1398, **2005**.
- 2) T. Okutsu et al., *Crystal Growth & Design*, in press.