

# 核偏極中性子回折実験に向けた TEMPOL 導入リゾチーム単結晶の X線結晶構造解析と ESR 実験

## X-ray structure analyses and preliminary ESR experiments of Lysozyme crystal induced by TEMPOL towards neutron protein crystallography with nuclear polarization technique

小松崎直也<sup>1</sup>, 田中伊知朗<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>茨城大学大学院理工学研究科, 〒316-8511 日立市中成沢町 4-12-1

<sup>2</sup>茨城大学工学部, 〒316-8511 日立市中成沢町 4-12-1

<sup>3</sup>茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター, 〒319-1106 東海村白方 162-1

Naoya Komatsuzaki<sup>1</sup>, and Ichiro Tanaka<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Sci. and Eng., Ibaraki Univ., 4-12-1, Naka-narusawa, Hitachi, 316-8511, Japan

<sup>2</sup>College of Eng., Ibaraki Univ., 4-12-1, Naka-narusawa, Hitachi, 316-8511, Japan

<sup>3</sup>Frontier Res. Center for Appl. Atomic Sci., Ibaraki Univ., 162-1, Shirakara, Tokai, 319-1106, Japan

### 1. はじめに

中性子結晶構造解析における水素の検出感度向上の方法として、動的核偏極法 (Dynamic Nuclear Polarization ; DNP) がある。この手法を応用すると水素からの散乱長が従来の約 8 倍となり、より高感度の測定が可能である。また、軽水素のままでも測定が可能という特徴を持つ。この技術の実現には試料結晶内にラジカルを導入する必要がある。先行研究では安定なラジカル TEMPOL を導入したリゾチーム結晶の X 線解析[1]、および ESR 実験によるラジカルの定量が行われたが、X 線解析では TEMPOL の電子密度は確認できなかった。また、ESR 実験では TEMPOL が低溶解度だったためと較正がうまくいかず、結晶内のラジカルは目標の数分の一以下であった。また、米国では TEMPOL 導入リゾチームにて 30%の偏極度を達成している報告があるが、単結晶かどうかは不明である[2]。そこで結晶中にラジカルをより多く導入するために、TEMPOL よりも水に対する溶解度の高い TEMPOL をリゾチーム結晶に導入し、構造解析結果からラジカルによるタンパク質への影響および結晶内の結晶構造としての TEMPOL の有無の確認、さらに同じような条件で作成した TEMPOL 導入結晶の ESR 実験を行うことで、結晶内のラジカル分子数の定量を試みた。

### 2. 実験

タンパク質は SIGMA-Aldrich のニワトリ卵白リゾチームを用いた。結晶育成条件はタンパク質濃度 30 - 60 [mg/ml]、結晶化剤は塩化ナトリウムを用い、濃度は 4 - 9 [% (wt/vol)]、緩衝溶液は 50 [mM] 酢酸ナトリウム (pH 4.5)、温度は 293 [K]、結晶化法はマイクロバッチ法で行い、ドロップ内の TEMPOL 濃度が 0 - 200 [mM] になるように結晶化剤に加えて結晶化を行った。

X 線回折実験では、得られた結晶を抗凍結剤(25% グリセリン)で瞬間凍結して温度 100 [K], AR-NW12A で測定した。

ESR 実験では、較正試料は体積が 5 [μl] TEMPOL 溶液を用い、サンプルは結晶を石英キャピラリー内に封入し、結晶周辺の母液を吸い取ったものを用いて測定を行った。装置は JEOL 製 JES-FA300 (9.4GHz ; X バンド) を使用した。

### 3. 結果及び考察

初期モデルデータは PDB ID = 2HU3 を、ソフトウェアは Coot 及び Phenix を用いて構造解析を行ったところ、TEMPOL 濃度毎に三種類の解析結果が得られた。分解能はいずれも約 1.2 Å と、データの質は良好であった。以下に三種類の解析結果を表として示す(表. 1)。

表. 1 X 線結晶構造解析結果

TEMPOL Conc [mM]	0	20	200
Space Group	<i>P</i> 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub>		
a	78.71	77.60	78.54
b	78.71	77.60	78.54
c	36.95	37.28	36.97
Number of water	143	113	84
Resolution [Å]	1.20	1.23	1.25
R <sub>work</sub> [%]	20.82	20.88	25.12
R <sub>free</sub> [%]	22.77	24.15	27.72
RMS Bonds [Å]	0.006	0.006	0.007
RMS Angles [deg]	1.052	1.019	1.113
B-factor [Å <sup>2</sup> ]	17.24	17.63	20.14

得られた電子密度を観察した結果 TEMPOL のものと思われる電子密度は確認できなかったが、表 1 より TEMPOL 濃度毎のデータを比較すると高濃度になるにつれて水和水の減少が見られた。

以上の結果から、電子密度が得られなかったのは TEMPOL がリゾチーム結晶内で自由に移動でき、一定の位置に固定されないため、水和水の減少は TEMPOL の導入によって結晶内の水和水が追い出されたためではないかと推測した。これは DNP には好ましい条件である。

また、TEMPOL 濃度毎のリゾチーム分子骨格の比較を行った結果を以下に示す(図. 1, 図. 2)。図. 1 においては重ねた時の r.m.s.d は 0.099 Å と、ほとんど違いは見られなかった。図. 2 では重ねた時の r.m.s.d は 0.205 Å と、図. 1 と比べると大きなずれがある。

図. 1 および図. 2 の結果より、TEMPOL 濃度が 200mM になると構造に影響を及ぼすことが分かった。

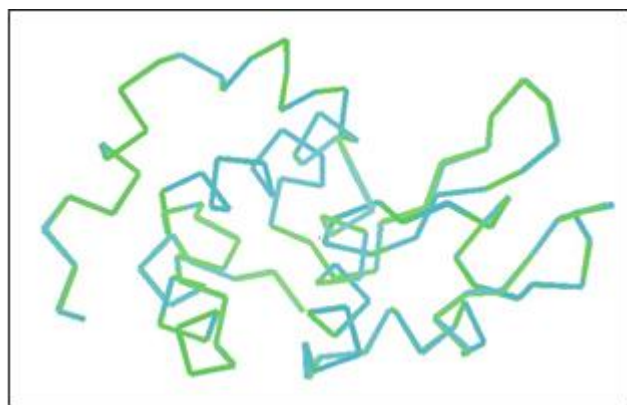


図. 1 TEMPOL 濃度 0mM と 20mM の骨格の比較。青色が 0mM、緑色が 20mM の骨格である。

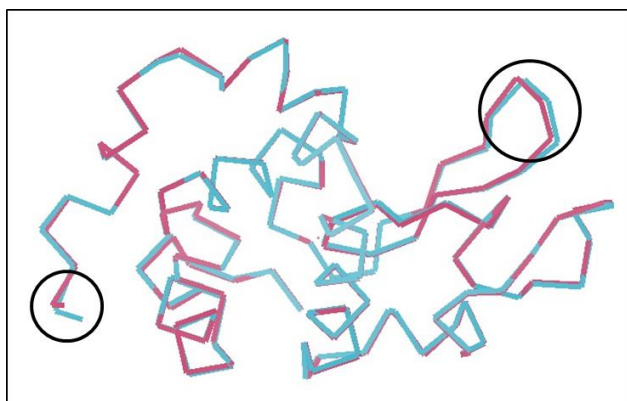


図. 2 TEMPOL 濃度 0mM と 200mM の骨格の比較。青色が 0mM、赤色が 200mM の骨格である。黒丸部分は特にずれが大きい部分。

ESR 実験の結果、結晶体積  $0.03 \sim 0.20 \text{ mm}^3$  に対してラジカルのピークが得られた。得られた結果をまとめたグラフを図. 3 に示す。図. 3 より、リゾチーム結晶内に TEMPOL が導入されており、リゾチ

ームに対する TEMPOL の分子数比は結晶化溶液の TEMPOL 濃度に比例することが分かった。また、DNP を行うには水素原子 1000 個当たり 1 つの割合でラジカルを導入する必要がある。リゾチーム分子一つには約 1000 個の水素原子が存在するため、リゾチーム分子 : TEMPOL = 1 : 1 である必要がある。図. 3 より、この条件を満たすためには結晶化溶液内の TEMPOL 濃度が約 60mM 程度必要となることが分かった。つまり、水に対する飽和溶解度が低い TEMPO よりも高溶解度の TEMPOL の方が DNP に向いているといえる。

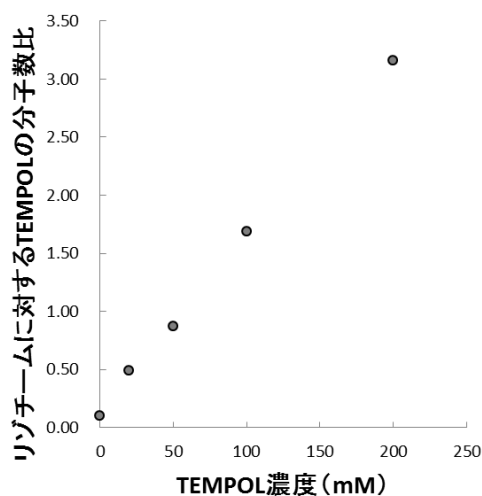


図. 3 TEMPOL 濃度に対する結晶内のリゾチームと TEMPOL の分子数比。ESR 結果から TEMPOL 分子数を計算し、結晶体積からリゾチーム分子数を計算した。

#### 4. まとめ

TEMPOL 導入リゾチーム結晶の X線解析を行った結果、TEMPOL のものと思われる電子密度は得られなかったが水和水の減少が確認できた。また、タンパク質の構造は TEMPOL 濃度 20mM ならばほとんど変化が見られず、200mM では若干の変化が見られた。

TEMPOL 導入リゾチーム結晶の ESR 実験を行った結果、ラジカルが検出され、結晶体積にかかわらず、結晶化条件の TEMPOL 濃度に比例したきれいな直線が得られた。また、リゾチームの動的核偏極を行うのに必要な結晶化溶液内の TEMPOL 濃度は約 60mM であることが分かった。

今後は TEMPOL のみならずタンパク質に共有結合するスピンラベルなどのラジカルを使用した結晶化を試みるほか、実際に単結晶による DNP を試す予定である。

5. 謝辞

本研究は山形大・岩田高弘教授、宮地義之准教授、京都大・茶竹俊行准教授、茨城大・日下勝弘准教授、新村信雄特任教授にお世話になりました。

6. 参考文献

[1] I. Tanaka *et al.*, *J. Synchrotron Rad.* 20 (2013) 958 - 961.

[2] J. K. Zhao *et al.*, *Physics Procedia* 42 (2013) 39 - 45.

\* i.tanaka@mx.ibaraki.ac.jp