

タンパク質の高圧凍結法の汎用化 Generalization of high-pressure freezing method of proteins

杉山玲¹, 田中伊知朗^{2,3,*}

¹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

²茨城大学工学部, 〒316-8511 日立市中成沢町 4-12-1

³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

Rei Sugiyama¹, and Ichiro Tanaka^{2,3,*}

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

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

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

1 はじめに

タンパク質結晶を X 線で測定する際、放射線損傷軽減のために、結晶を凍結する必要がある。しかし、タンパク質結晶を凍結すると結晶内部や外側に含まれる水分子が氷の結晶となり膨張し、結晶が壊れてしまう。そこで、抗凍結剤を結晶化母液と混合してタンパク質結晶を浸すことにより、水分子をアモルファス状に凍結するという手段を用いる。

しかしながら、抗凍結剤を使用するとタンパク質に影響を及ぼすことがあるため、最適な種類や濃度等にする必要がある。また、中性子回折実験用の大型結晶を凍結する際、結晶内部と外部の大きな温度差から、瞬間凍結することが難しい。そこでこれらの問題を解決するために、高圧条件下 (200MPa) で結晶を凍結する方法 (高圧凍結法) に注目した。

本研究では、抗凍結剤を用いた常圧凍結、さらには抗凍結剤を含まない室温による結晶構造などと比較し、高圧凍結の影響も含め、抗凍結剤の水和構造やタンパク質構造そのものへの影響がないかどうかを、微妙な議論となることの多い水和水の構造やその近傍のタンパク質アミノ酸側鎖構造などを、高分解能で詳細に信頼性高く検証することを目的とする。

高圧凍結が有効であれば、より生理的条件に近い構造を明らかにでき、最適な抗凍結剤条件をスクリーニングする必要もなくなる。この手法をうまく利用すれば、反応中間体のトラップなど、タンパク質の重要な機能解析にも適用できる可能性がある[1]。

2 実験

タンパク質結晶を高圧凍結するために、茨城量子ビーム研究センター (IQBRC) に設置された米国 ADC 社製の高圧凍結装置 HPC-201 を用いて実験を行った。この装置はヘリウムガスによって 200MPa まで昇圧してから凍結することが可能である。図 1 の青い線は抗凍結剤を用いる従来の常圧凍結を示しており、常温から一気に 77K まで温度を下げて瞬間凍結を行う。そして赤い線が高圧凍結を示しており、常温常圧の状態から 200MPa まで昇圧し、その後

77K まで温度を下げ、最後に常圧に戻す。200MPa 付近では水の粘度が最大となったあと瞬間凍結を行い、バルク水をアモルファス状に凍結できる。まず、ループで母液から結晶を取り出し、凍結ピンに入れた。凍結ピンの下部には鉄が埋め込まれているため、事前に磁石を圧力管にセットしておくことで、凍結ピンを圧力管に入れた際に、ピンが磁石の位置で留まる。次に、圧力管を高圧凍結装置にセットし、200MPa まで加圧した。磁石を外すと凍結ピンが圧力管下部に落ちる。常圧に戻し、開放装置を使って、圧力管下部のネジを開放する。凍結した結晶を、約 -180°C の窒素気相中で操作可能な LEICA 製 EM-CPC に移動させ、ループをキャップを立ててからクライオ保存用専用容器に入れ、液体窒素中に保存するという手順を取った。常圧に戻した状態で液体窒素中に保管することによって準安定的にその状態を継続でき、常圧下での X 線回折実験にもその凍結状態のままですることができるからである[2]。

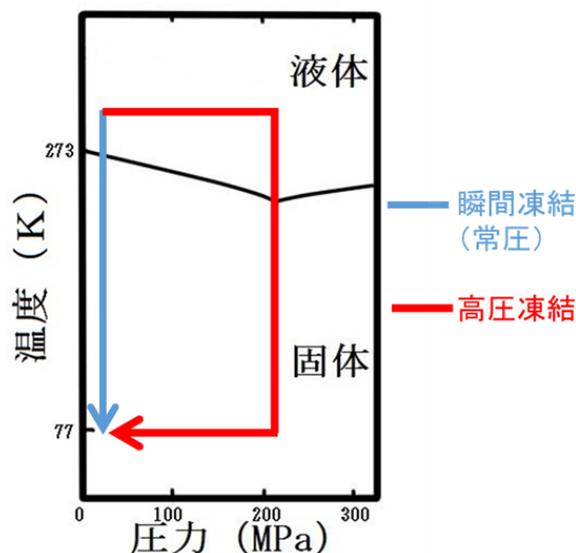


図 1 : 高圧凍結の原理

3 結果および考察

結晶の落下等の問題を防ぐためにループや凍結ピンの改良を行い、凍結の成功率を上げた結果、抗凍結剤を使わずに Lysozyme、Lysozyme-NAG₄ (N,N',N'',N'''-Tetraacetylchitotetraose) 複合体、TEMPOL を含む Lysozyme、Ferritin、Thaumatin、Glucose Isomerase、DAPK の単結晶の高圧凍結に成功した。また、Lysozyme-NAG₄ 複合体、Lysozyme + TEMPOL、Ferritin に関しては、X 線回折実験まで成功させることができた。

X 線回折実験により得られたデータの処理・解析結果を下に示す。また、常圧凍結した試料と高圧凍結した試料の骨格構造を比較し、常圧凍結を青、高圧凍結を赤で示した。まず、Lysozyme-NAG₄ 複合体の構造比較で、平均の r.m.s.d は 0.17 Å であった。次に、Ferritin での平均の r.m.s.d は 0.20 Å となった。これらの値から、高圧凍結によるタンパク質の骨格構造への影響はほとんど見られないことが分かった。

表 1: Lysozyme-NAG₄ 複合体の結晶化条件

タンパク質	Lysozyme 10[mg/ml]
結晶化剤	NaCl 0.6[M]
凍結条件	高圧凍結
緩衝溶液	CH ₃ COONa(pH=4.5)
結晶化方法	ハンギングドロップ法
結晶化温度	293[K]

表 2: Thaumatin の結晶化条件

タンパク質	ソーマチン5~25[mg/ml]
結晶化剤	酒石酸ナトリウムカリウム0.5~1.0[M]
緩衝溶液	HEPES pH7.0
結晶化方法	ハンギングドロップ 5μl+5μl
結晶化温度	293[K]

表 3: DAPK の結晶化条件

タンパク質	DAPK 4~12[mg/ml]
結晶化剤	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.25~2.0[M]
緩衝液	0.1M MES-NaOH, 150mM NaCl 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl
pH	6.5/8.0
ATP類似体	ANP/ADP/AGS/ATP/ACP
金属	MgCl ₂
タンパク: ATP類似体 : 金属 (モル比)	1:0.5:50
温度	293[K]
結晶化法	ハンギングドロップ法 (5μl+5μl)

表 4: Lysozyme-NAG₄ 複合体のデータ処理結果
使用ソフトウェア (HKL2000)

Space group	P43212	
Unit cell parameter	a [Å]	77.74
	b [Å]	77.74
	c [Å]	38.28
Resolution [Å]	1.28	
Unique reflections	30095	
Completeness [%]	97.6 (100.0)	
Rmerge	0.089 (0.376)	
I/σ	37.2 (8.9)	
Redundancy	13.3	

表 5: Lysozyme-NAG₄ 複合体のデータ解析結果
使用ソフトウェア (HKL2000)

Number of amino acid [residue]	128	
Number of water [molecule]	202	
Resolution [Å]	1.28	
Rwork [%]	21.25	
R _{free} [%]	24.16	
r.s.m.d	Bonds [Å]	0.0064
	Angled [Å]	0.987
B-factor [Å ²]	12.81	

表 6: Ferritin のデータ処理・解析結果
ビームライン「あいち SR: BL2S1」
使用ソフトウェア (iMOSFLM)

Space group	F432	
Rwork [%]	0.1994	
R _{free} [%]	0.2237	
r.s.m.d	Bonds [Å]	0.008
	Angled [Å]	0.958
Resolution [Å]	1.76	
Unique reflections	25833	
Completeness [%]	99.9 (100.0)	
Rmerge	0.071 (0.388)	
I/σ	129.4 (17.5)	
Redundancy	44.3 (42.6)	

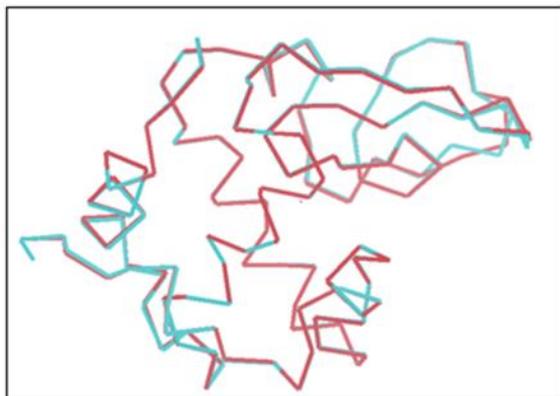


図 2: Lysozyme-NAG₄ 複合体の骨格比較

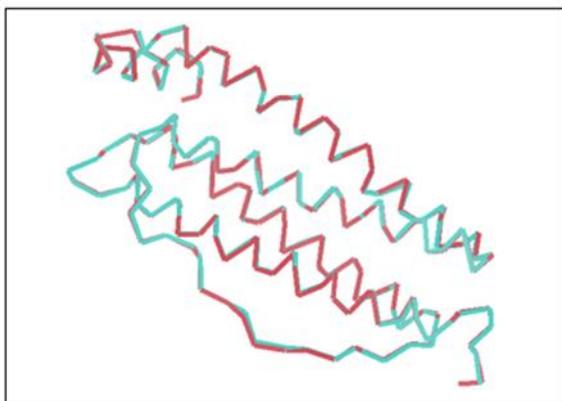


図 3: Ferritin の骨格比較

4 まとめ

Lysozyme の他にも、Lysozyme-NAG₄ 複合体、TEMPOL を含む Lysozyme、Ferritin、Thaumatococcus、Glucose Isomerase、DAPK 単結晶の、抗凍結剤を用いない高压凍結に成功した。

上記の内、Lysozyme-NAG₄ 複合体、Lysozyme + TEMPOL、Ferritin に関してはその後の X 線回折実験まで成功させることができた。

常圧凍結した試料と、高压凍結した試料との骨格構造の比較を行った結果、それらの平均の r.m.s.d 値から、高压凍結によるタンパク質の骨格構造への影響や結晶へのダメージはほとんど見られなかった。

謝辞

実験に協力していただいた茨城大学フロンティアセンターの二宮聖治、廣木淳一の各氏に感謝します。また、この実験の一部はあいち SR でなされたものである（課題番号 2016N5010）。

参考文献

[1] 岳文雪, 平成 27 年度 茨城大学修士論文

[2] C.-U. Kim, R. Kapfer, S.-M. Gruner, "High-pressure cooling of protein crystals without cryoprotectants", Acta Cryst. D 61, 881-890 (2005).

* ichiro.tanaka.h27@vc.ibaraki.ac.jp