

リゾチーム-糖複合体の中性子構造解析に向けて
Preparation of sugar-Lysozyme complexes
for neutron structure analysis

後藤亮祐¹, 日下勝弘², 矢野直峰², 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

3 茨城大学工学部, 〒316-8511 日立市中成沢町 4-12-1

Ryosuke Goto¹, and Katuhiro Kusaka² and Yano Naomine² and Ichiro Tanaka^{2, 3}

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

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

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

1 はじめに

リゾチームは細菌の細胞壁ペプチドグリカンの N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンの間のグリコシド結合を切断する酵素である。しかし、50 年以上前からリゾチームの触媒機構は提案されているが、いまだに様々な議論がされている[1]。本研究では、この系では解析例のない中性子構造解析によって同定が期待される、プロトネーションの有無や水素原子ドナー相手を直接確認できる方向性が決定された水和水の位置情報を用いて、反応機構解明に役立たせることを目的とする。まずはその準備のために、抗凍結剤を用いない高压凍結法も含めた X 線解析による複合体の概要、および中性子回折を用いた結晶性の確認を行った。

2 実験

実験に用いたリゾチームは SIGMA-ALDRICH 社の HEWL(ニワトリ卵白リゾチーム)を使用し、糖は N,N',N'',N'''-Tetraacetylchitotetraose((NAG)₄)であり、Dextra Laboratories 社より購入したものをそのまま用いた。

Lysozyme-(NAG)₄ の結晶育成条件はそれぞれ、モル比でリゾチーム：糖=1：1.2 で混合させ、リゾチーム濃度 30mg/mL、NaCl 結晶化剤濃度は 0.6M、緩衝溶液(酢酸ナトリウム)：0.050 M pH 4.5、温度 293 K にて結晶育成を行った[2]。さらに、タンパク質結晶を高压凍結するために、茨城量子ビーム研究センター (IQBRC) に設置された米国 ADC 社製の高压凍結装置 HPC-201 を用いて抗凍結剤を用いずに結晶を凍結させた。X 線回折実験は、BL-5A にて行い、温度は 100K で測定した。データ処理は HKL2000 を用いて行い、Phenix と Coot を用いてデータ解析を行った。また、中性子回折データは、pD 4.1 の重水置換結晶を室温にて出力 150KW、測定時間約 18 時間の条件で J-PARC MLF BL-03 (iBIX) で測定した。データ処理は STAR Gazer を用いて行った。

それぞれの結晶化条件を表 1、2 にまとめた。

表 1 X 線回折実験に用いた結晶化条件

	Lysozyme-(NAG) ₄	Lysozyme-(NAG) ₄ ^(*)
タンパク質溶液	Lysozyme 10[mg/ml]	Lysozyme 40[mg/ml]
結晶化剤	NaCl 0.6[M]	NaCl 0.7[M]
凍結条件	高压凍結	抗凍結剤として 30%エチレングリコールを使用した常圧凍結
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	バッチ法
結晶化温度	293[K]	

(*)先行研究[3]

表 2 中性子回折実験に用いた結晶化条件

	Lysozyme-(NAG) ₄
タンパク質溶液	Lysozyme 30[mg/ml]
結晶化剤	NaCl 0.5[M]
緩衝溶液	CH ₃ COONa(pD=4.1)
結晶化方法	シッティングドロップ法
結晶化温度	293[K]

3 結果および考察

今回測定によって得られた Lysozyme-(NAG)₄ の分解能は 1.28 Å だった。先行研究で得られた 1.07 Å を超える分解能のデータは得られなかったが抗凍結剤を用いない高压凍結を用いた X 線のデータを得ることが出来た。

データ処理および解析の結果を以下の表 3 に記す。

表3 データ処理・解析結果 ()は最外殻の値

		Lysozyme-(NAG) ₄	Lysozyme-(NAG) ₄ ^(c)
Space group		P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Unit-cell parameters	a[Å]	77.74	77.31
	b[Å]	77.74	77.31
	c[Å]	38.28	38.21
Total Number of Reflections		400788	740940
Number of Unique Reflections		30095	50535
Resolution[Å]		1.28	1.07
Completeness[%]		97.6(100)	97.9(100)
Rmerge		0.089 (0.376)	0.074 (0.367)
I/σ		37.2(8.9)	74.1(9.3)
Number of amino acid [residue]		129	129
Number of water [molecule]		134	154
R-work[%]		21.67	22.21
R-free[%]		24.97	22.61
B-factor[Å ²]		9.58	11.37

先行研究のデータを Coot 及び Phenix を用いて再解析を行ったところ以下に示す糖と水との相互作用が分かった。

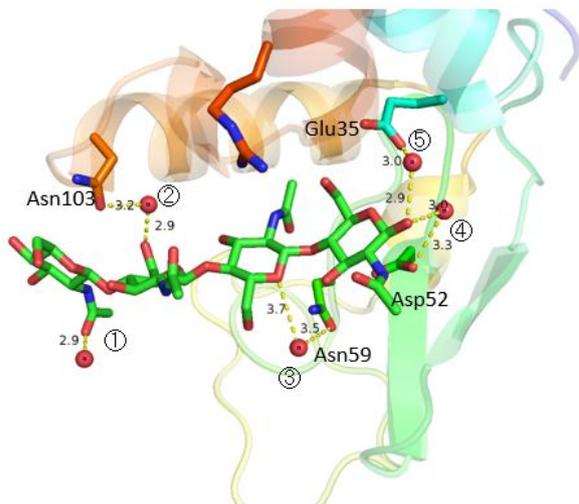


図1 糖と水の相互作用

表4 水分子との相互作用

O7(NAG/A)	←2.9 Å	H2O/①	
O6(NAG/A)	←2.9 Å	H2O/②	3.2 Å → OD1/Asn103
O5(NAG/C)	←3.7 Å	H2O/③	3.5 Å → OD1/Asn59
O1(NAG/D)	←3.0 Å	H2O/④	3.3 Å → O/Asp52
O1(NAG/D)	←2.9 Å	H2O/⑤	3.0 Å → O/Glu35

不十分であった構造解析を改めて行ったところ、今まで見つけることの出来なかった⑤の新たな水を発見することができ、④、⑤の水は Lysozyme の触媒残基である Asp52 と Glu35 に相互作用していることが分かった。これらの水は Lysozyme の触媒機構に深く関係している可能性があるため、これからさらに研究する必要があると考えた。高圧凍結を用いた測定と抗凍結剤を用いた測定の凍結条件の違いで Lysozyme 骨格の比較を行ったが、大きな違いはないことが分かった。

中性子回折実験では、本来タンパク質のような生体高分子を中性子で構造決定しようとするとして 10 日間ほど必要だが、今回与えられたマシンタイムは 2 日間だったので、将来的にフルデータ測定を行ったときに構造解析ができるほどの結晶品質があるかテスト測定を行った。今回テスト測定に用いた結晶を図2に示す。測定の結果、図3のような回折像が得られ、目視最高分解能 2.42 Å の反射を確認することができた。データ処理は STARGazer を用いて行った。

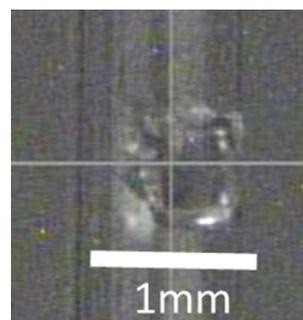


図2 テスト測定に用いた結晶
体積：0.7×0.7×0.25 = 0.123 [mm³]

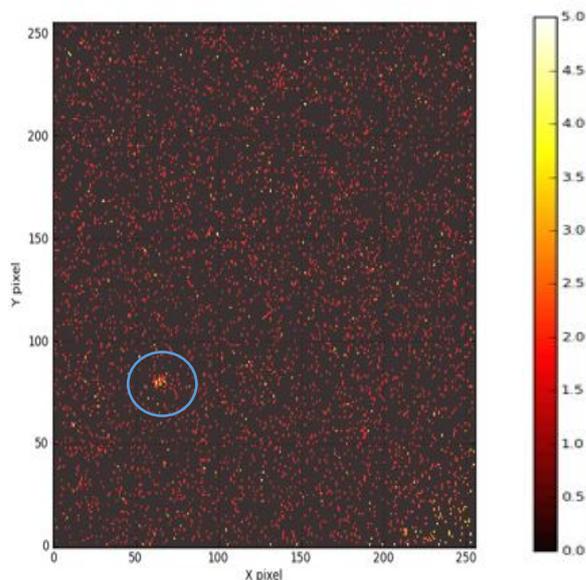


図3 測定での中性子回折像
(検出器#9 2θ = 156.55)

今回、実験に用いた結晶は 0.123mm^3 と小さい結晶であったが、中性子回折実験において目視による分解能 2.42\AA の反射を確認できたことから、結晶性は良いものだと考えられる。今後、体積が $1\text{-}2\text{mm}^3$ の結晶が作成できれば、よりよい分解能でフルデータ測定ができると予想できる。

4 まとめ

X 線回折実験によって得られた Lysozyme-(NAG)₄ の分解能は 1.28\AA であり、先行研究で得られた 1.07\AA を超える分解能のデータは得られなかったが高压凍結を用いたデータを得ることが出来た。その後、先行研究のデータを再解析した結果 Lysozyme の触媒残基である Asp52 と Glu35 に相互作用している水を確認することができた。

中性子回折実験では目視による分解能 2.42\AA の反射を確認できた。今回、実験に用いた結晶は 0.123mm^3 と小さい結晶であったが、 2.42\AA の反射が確認できたため、結晶性は良いものだと判断した。今後、体積が $1\text{-}2\text{mm}^3$ の結晶が作成できれば、よりよい分解能でフルデータ測定ができると予想した。

謝辞

本研究を行う際に適切な助言をいただきご指導くださった Photon Factory の職員の方々に深くお礼申し上げます。さらに、本研究を行うにあたり様々な有益な助言や日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた田中研究室の皆様に感謝します。

参考文献

- [1] 尾形慎, 碓氷泰市, 梅本尚之, 大沼貴之, 深溝慶, 沼田倫征 化学と生物 Vol. 52, 819-824 (2014)
- [2] Hiroyuki Yamada, Takayuki Nagae, Nobuhisa, Watanabe Acta Cryst. D71, 742-753 (2015)
- [3] 嶋崎隼 茨城大学卒業論文 (2016)

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