

超濃厚・超低塩濃度水溶液中でのリゾチームのコロイド結晶化・結晶化 とそれらの結晶構造解析

Colloidal crystallization, crystallization and structure analysis of highly concentrated lysozyme molecules in very dilute electrolyte solution

鈴木良尚^{1*}, 山田悠介²

¹徳島大学ソシオテクノサイエンス研究部、〒770-8506 徳島市南常三島町 2-1

²KEK-PF 〒305-0801 つくば市大穂 1-1

1 はじめに

ほとんどのタンパク質結晶は沈殿剤を使って結晶化されているが、多くの“柔らかい”タンパク質が結晶化できていない。これは、主に構造が大きく揺らいだまま無理やり引力によりひきつけたことによる不規則な凝集体形成ものと考えられる。

もし、タンパク質結晶を通常の引力結晶ではなく、斥力的な相互作用を利用したコロイド結晶にすることができるのであれば、これらの柔らかいタンパク質の結晶化の可能性は増加すると考えられる。

筆者らはこの研究に先立ち 2010P104 において、沈殿剤を用いなくてもニワトリ卵白リゾチームが針状の結晶を生成し、更にそれらが結晶性の回折スポットを生じることを発見している。本研究では、2010P104 において得られた結晶と同条件で育成した単結晶の回折スポットから、コロイド結晶化の有無を確認することを試みた。

2 実験

本研究では、モデルタンパク質としてニワトリ卵白リゾチーム（生化学工業、6 回再結晶）を、更なる精製なしに用いた。0.6 g のリゾチームを 15 mL の超純水（抵抗率 > 18.2 MΩcm）に溶解し、遠心濃縮を 3 回行って脱塩し、最終濃度が 300 mgmL⁻¹ 程度になるようにすると 25°C で結晶化した。その結晶スラリーから、0.1 – 0.2 mm のナイロンループを用いて比較的大きな結晶を掬い上げて、~ 90 mgmL⁻¹ リゾチーム、~ 40 mgmL⁻¹ グリセロールの水溶液で洗い、フラッシュクーリングを行って、KEK-PF BL-5A におけるシンクロトン放射光を使って振動写真を撮影した。

3 結果および考察

撮影に使用した結晶の写真を図 1 に示す。

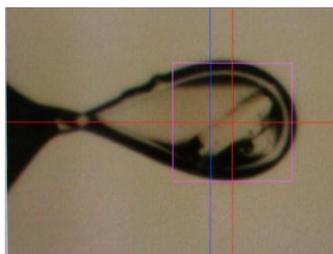


図 1: 構造解析に用いたリゾチーム結晶。ピンクの枠の一辺は 0.2 mm。

実際には、波長 1.00 Å の放射光を用いて、1° 振り、1 秒露光、1.7 Å までの分解能で 0 ~ 180° までの撮影を行った。その結果、図 2 に示したようにきれいな単結晶からの回折斑点を得ることができた[1]。

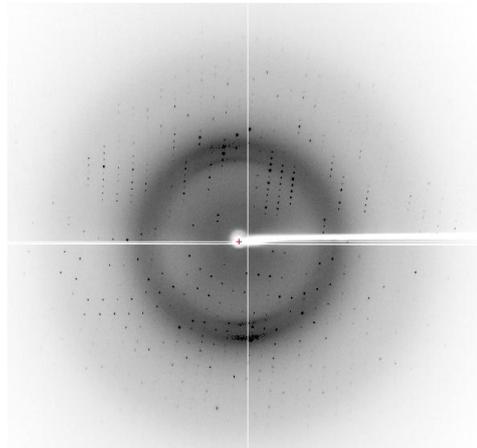


図 2: 波長 1.00 Å の放射光で、1° 振り、1 sec 露光の振動写真。

HKL2000 を使用した予備的な解析により、この結晶が $a = 30.49 \text{ \AA}$, $b = 57.99 \text{ \AA}$, $c = 67.28 \text{ \AA}$ の格子定数の斜方晶系結晶であることが判明した。実は、この格子定数は、既に報告されている沈殿剤使用の斜方晶系リゾチーム結晶とほぼ変わらず、コロイド結晶ではない可能性が高い。しかし、既出の結晶では、Na⁺もしくは Cl⁻イオンを結晶格子内に含むものが多く、脱塩した本研究の結晶では、それらのイオンが存在しえないという点が大きく異なる。

今後、更なる詳細な構造精密化を行い、より詳細な結晶構造の差異の議論を行う予定である。

参考文献

[1] 鈴木良尚, 津下英明, 沈殿剤フリーのタンパク質結晶化法の開発, 日本物理学会 2012 年年会 25aCK-10.

* suzuki@chem.tokushima-u.ac.jp