

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、沈殿剤を用いず、濃縮のみによって得られたニワトリ卵白リゾチームが針状の単結晶の回折スポットから、格子定数レベルでは、NaClによる塩析によって、数多く報告されている従来の結晶と変わらない、斜方晶系結晶であることを明らかにした。2012年度は、更なるデータ収集と、構造解析により、従来の塩析結晶との違いがあるかどうかを確認した。

2 実験および構造解析

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。

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、きれいな単結晶からの回折斑点を得ることができた[1]。

得られた回折データを使って、構造解析ソフトウェア CCP4i の molrep, refmac を使って、分子置換および構造精密化を行い、WinCoot0.7 を使って構造の修正を行った。分子置換法の際には PDB ID: 2ZQ3 の構造を用いた。

3 結果および考察

得られた電子密度マップの一部を図1に示す。

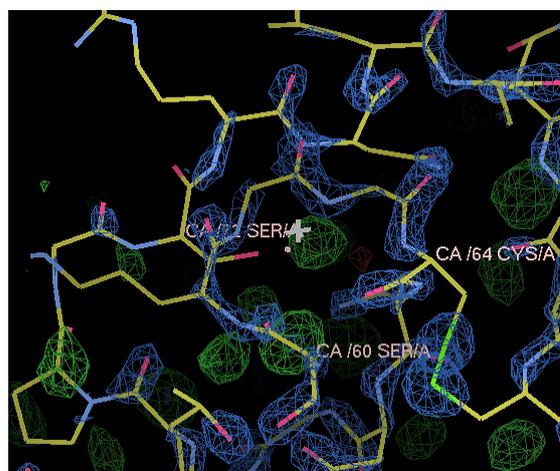


図1: 沈殿剤フリーで得られたリゾチーム結晶の電子密度マップの一部。クロス部位には2ZQ3ではNa⁺がアサインされている。

この結晶は、P2₁2₁2₁で、a = 30.49 Å, b = 57.99 Å, c = 67.28 Åの格子定数を持つ。これに対して分子置換で出発モデルとした2ZQ3は、結晶中にNa⁺が含まれる、a = 57.54 Å, b = 67.49 Å, c = 30.39 Åの格子定数を持つ。図1のクロス部には、この結晶ではNa⁺がアサインされているが、本研究の結晶は超純水(>18.2 MΩcm)を用いて5回透析しているため、ラフに見積もっても物質で10⁻⁶倍程度に減少しており、格子中にはほとんど存在しないはずである。また、周囲の水分子の酸素原子と同程度の電子密度を示していることから、沈殿剤フリーの結晶においては、沈殿剤イオンが水分子に置き換わって結晶化していることが示唆される。

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.
- [2] 鈴木良尚, 沈殿剤フリーで結晶化したリゾチーム結晶の構造解析, 第42回結晶成長国内会議 10aD01.

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