

中性子回折計の標準タンパク質結晶探索に向けた単斜晶リゾチームの X 線解析
 析沈殿剤としたリゾチームタンパク質のヨウ素配位
 X-ray analysis of monoclinic Lysozyme as a standard protein candidate for a neutron
 diffractometer

小林政義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

Masayoshi Kobayashi^{1,*} 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

茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) は茨城県東海村 J-PARC にある、中性子の波としての性質を利用した回折現象から有機化合物・タンパク質などの構造を測定するための装置である。iBIX において、大量に入手でき、安定で高分解能反射能をもち、様々な格子長をもつタンパク質標準結晶はまだ十分準備されていない。標準結晶とは、実験環境が変化した場合、その前後で正確なデータが得られるかの評価をするための結晶で、装置の調整や条件標準化のためには必要である。本研究では、タンパク質標準結晶を作製する前段階として、リゾチームの中でもまだ中性子解析されていない単斜晶系リゾチームの X 線解析を行うことで、水等の溶媒の数、位置、温度因子等を過去の単斜晶系リゾチームデータと比較し、中性子解析のための足がかりとなる解析を行うことを目的とする。今回は、特徴的な結晶化剤と晶系、低温測定を組み合わせた初めての組み合わせの実験・解析が進行したのでその中途報告を行う。

2 実験

タンパク質は、ニワトリ卵白リゾチームで、生化学工業より購入したものをを用いた。結晶育成条件は、リゾチーム濃度: 30mg/ml、NaI 濃度: 67mM、緩衝液: 50mM 酢酸/酢酸ナトリウム pH=4.5、温度 293K、結晶化法: マイクロバッチ法で、約 0.5mm 角の結晶が得られ、KEK-PF AR-NW12A において低温 100K にて X 線回折実験を行った。抗凍結剤はエチレングリコール 30%を用い、液体窒素による瞬間凍結の直前にソーキングした。波長は 1.00Å、1.00° の振動写真法にて 180 フレーム収集し、HKL2000 によりデータ処理した。

X 線実験により単斜晶リゾチームであると確認でき、また、分解能が 1.19Å と比較的データの質が良

かった (表 1)。構造解析は Phenix(1.8.2-1309), Coot(0.6.2)を用いた。R_{free} で 21.67% に収束した。

表 1: データ処理結果。() 内は最外殻の値。

Space group	P2 ₁
a (Å)	27.50
b (Å)	62.58
c (Å)	59.52
β(°)	89.64
Resolution(Å)	1.19
Completeness(%)	91.2(76.1)
Rmerge(%)	5.7(7.1)
I/σ(I)	46.1(28.8)
No of Unique Ref.	64661

3 結果および考察

得られた立体構造を実験室系 X 線源で室温での 1.6Å データ (PDB ID=1B2K) [1] と比較した結果、タンパク質主鎖に大きな変化は見られなかったが、温度因子の値とヨウ素の数に差が生じた。これは、低温測定で放射光を利用したために分解能が向上し、オーダーしたヨウ素の数が増加したことが主な理由として挙げられる。

リゾチームの触媒基である Glu35、Asp52 付近の環境を調べてみると、ヨウ素の存在が見られなかった。一方で重原子であるヨウ素がタンパク質 1 分子中に 31 個確認することができたが、Occupancy が 1 として同定できないものが複数あったため、構造解析の完了が極めて困難であった。また、低角にアイスリングのような反射があり、低角の Completeness が悪い値となった。この反射については現在考察中

である。現在は、さらに良い分解能データでの構造解析を試みており、近いうちに中性子実験も計画している。

4 まとめ

結晶化剤として NaI を用いた低温環境でのリゾチーム単斜晶系の比較的高分解能のデータを収集することができた。いくつかの問題点を、別の条件の X 線解析、さらにヨウ素が他の原子と同様に見える中性子解析によって解決したいと考えている。

謝辞

本研究は、茨城県受託研究「茨城県中性子ビームラインの特性を活かした中性子構造解析の先導的研究事業」および茨城大学重点研究「量子ビームを用いた材料・生体の構造と機能の研究」のサポートを受けた。

参考文献

[1] M.C. Vaney *et al.*, *Acta Cryst. D* **57**, 929 (2001).

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