2M1400

動的光散乱法による高磁場下でのニワトリ卵白リゾチーム結晶成長における分子集合過程の観察

○田中 晋平¹、安宅 光雄¹、木吉 司² (¹生命研、²金材研)

最近、タンパク質の結晶成長に高磁場が影響を及ぼすことが注目されつつある。磁場中で成長したタンパク質結晶の結晶構造の完全性が向上した例もあり、生体物質の結晶成長技術の一つとして高磁場の利用が期待されている。しかし、これまで高磁場中におけるミクロなスケールでの結晶成長過程の観察がなされた例はなく、高磁場中の結晶成長メカニズムは不明である。

我々はこれまで、卵白リゾチームの結晶成長過程を動的光散乱法によって追跡してきた。過飽和状態にある卵白リゾチーム溶液中には、ランダムな分子集合体が結晶析出よりも早い段階に形成される。この分子集合体の形成が結晶核形成過程とどのように関係しているかは今のところ明らかではないが、未飽和溶液中ではそのような集合体形成は観察されないことから、この集合体の形成が過飽和溶液に特徴的な構造形成であることが分かる。

今回我々は高磁場中でのリゾチーム結晶成長に動的光散乱法を適用し、その分子集合過程を追跡することを試みた。図に磁場 0T と 10T の場合に観察される分子集合体サイズの時間変化を示す。集合体の形成の様子が磁場の有無によって異なることがわかる。当日はこのような変化について詳細に検討する。

S. Tanaka, M. Ataka, and T. Kiyoshi : Molecular association in crystallization process of hen egg lysozyme under high magnetic field studied by dynamic light scattering

2M1430

タンパク質結晶成長のための磁場・磁化力の利用

リン スン・シャン¹、ゾー ミン¹、アッジ アレツキ¹、若山 信子²、○安宅 光雄³ (¹ラバル大学 (カナダ)、²物質研、³生命研)

タンパク質単結晶の良否は、X線構造解析の質や精度を左右する。良質の結晶の必要性は多くの宇宙実験を企画・実行させ、微小重力環境での成長が品質向上につながる例が見つかった。タンパク質の結晶や溶液の多くは磁気的には反磁性体で、磁束密度に勾配があると、磁場の最も小さい方向へ逃れる力(磁化力)を受ける。我々はこの力を鉛直上向きに作用させ、重力と重ねることで、低重力に相当する環境を地上で作ることを考えた。反磁性体の磁気浮上はよく知られているが、それには 2.5 T 程度の超強磁場が必要で、数時間しか作れない。一方、1.0 T 程度の超電導磁石では重力の 3 割相当の磁化力しか発生できないが、密度にはほぼ比例した体積力が 1 週間から 1 ヶ月継続して作れる。糖新生の最終段に関与するフルクトース・ビス・ホスファターゼ (ヘビ筋肉) (FBP) と、性腺ホルモンの合成に関与する 17 β ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (ヒト胎盤) を、磁化力の作用するマグネットの中で結晶化させ、マグネット外と比べた。比較には振動写真で S/N 比が 2 を越す限界の分解能を用いた (FBP)。また、構造解析用のデータセットの組を取得した。いずれの指標でも、マグネット内で作った結晶は良好な反射を与え、分解能が向上していた。マグネット内では対流・沈降とも抑制されたことが、結晶の高品質化に役だったのではないかと考えている。我々が用いたのは地上の約 7 割相当の低重力環境である。これまで、地上で低重力相当の環境を作る試みは少なく、重力値と結晶の質との正確な関係は分かっていない。今後、対象とするタンパク質の種類を増やすと共に、結晶の質を左右する要因の理解を深めていきたい。

S.-X. Lin, M. Zhou, A. Azzi, N.I.Wakayama, M. Ataka : Use of magnetic field and magnetization force for protein crystal growth

2M1415

チトクロム c 結晶のモルフォドローーム

本間 康平¹、○久保田 智巳²、安宅 光雄² (¹筑波大院・理工、²工技院・生命研)

モルフォドローームは様々な結晶化条件に対して得られた結晶や析出物の形態をマッピングしたもので、結晶化実験を整理し、全体像を把握するのに有効である。特にタンパク質の結晶は多形であることが多く、このような解析から興味深い情報が得られることが期待できる。本研究では、いろいろなチトクロム c のモルフォドローームを作成し、それらの比較を行った。

まず、ウマのタンパク質で、一定の条件下 (50 mM リン酸アンモニウム緩衝液 pH 6.0、1% タンパク質、20℃) で、2つの塩 ((NH₄)₂SO₄ と NaNO₃) の濃度の組み合わせで得られる実験平面上的モルフォドローームを作成した (図)。図の様にチトクロム c はこの平面にある限られた領域で結晶化した。このことは、チトクロム c は単にある一定のイオン強度下におくだけでは結晶化しないことを示している。また、モルフォドローームはチトクロム c の由来や酸化還元状態を異にすることで変化が見られた。わずか数残基のアミノ酸の置換や、酸化還元では分子の概形に大きな変化がないことが結晶学的に示されている。このことを考えると、結晶成長は構造上の微妙な変化を反映するような物理現象であり、モルフォドローームは結晶化の挙動の変化を明示できるツールであると言える。

図 3-3 馬のチトクロム c の結晶化条件 (濃度と濃度ナトリウムの濃度) (濃度と濃度ナトリウムの濃度) (濃度と濃度ナトリウムの濃度)

K. Homma, T. Kubota and M. Ataka : Morphodrome of cytochrome c crystals

2M1445

常磁性金属蛋白質の結晶成長に及ぼす磁場効果

○佐藤 真紀¹、渡辺 博義¹、安宅 光雄²、若山 信子³、和田 仁⁴、高妻 孝光¹ (¹茨城大・理、²生命研、³物質研、⁴金材研)

蛋白質-蛋白質、蛋白質-DNA 間の相互作用や蛋白質フォールディングなどに見られるように生体高分子は自己集積化によってその機能を発現する。生体高分子のアッセンブル機構を検討する上で、主に自己会合過程のみから成る結晶成長はシンプルな分子間相互作用のモデルとして取り扱うことが可能である。無配向の溶液状態から配向し秩序だった結晶状態へと移行する中間には、特異的な分子間相互作用の起こるメソスコピック状態があると考えられる。自己集積化プロセスを調べるにあたって、メソスコピック状態での分子間相互作用によって引き起こされる特異的な構造変化を検討することが重要である。このためには、溶液状態および結晶状態での構造に関する詳細な知見が必要である。本研究においては、脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* 由来のチトクロム c を用いて磁場中での結晶配向について検討を行った。結晶化剤には硫酸アンモニウムを用い、静置パッチ法によって結晶成長実験を行った。チトクロム c を磁場の外で結晶化させた場合、結晶の配向は認められなかった。しかし磁場中 (H = 8.3 T) で結晶化させたところ結晶が磁場に沿って配向していることが確認された。均一磁場と不均一磁場における結晶配向の差異について調べたところ、磁束密度が疎から密になるような不均一磁場では上向きの磁気力を受けて結晶が液面に析出していることが確認された。このことは、磁場の影響を受けて配向プロセスへと向かう結晶成長単位が常磁性種であることを強く示唆している。

M.Sato, H.Watanabe, M.Ataka, N.I.Wakayama, H.Wada and T.Kohzuma : Magnetic Field Effect on the Crystal Growth of Paramagnetic Metallo-proteins