3P341

中性子結晶構造解析に用いるPYP結晶の調整

○山口 繁生¹、上久保 裕生¹、清水 伸隆²、山崎 洋一¹、今元 泰¹、片岡 幹雄¹ (¹奈良先端大・物質創成、²Spring-8/JASRI)

中性子蛋白質結晶構造解析は、X線では同定困難な蛋白質中の水素原子の位置を同定することが可能である。しかしながら、現在の中性子線源で構造解析に十分な回折強度を得るには、体積1mm³以上の結晶が必要である。本年会では、Photoactive Yellow Protein(PYP)の中性子結晶構造解析を目的とし、大型単結晶を得るための結晶化条件の探索を行った結果を報告する。PYPは硫酸アンモニウムを沈殿剤として用いることでP6₃の結晶が得られることが報告されている。しかし、この条件ではc軸方向に長軸を持つ針状結晶になりやすく、ab軸方向に十分な大きさまで成長させるのが困難であることがわかった。結晶化条件の再検討を行った結果、硫酸アンモニウム溶液に添加物として高濃度の塩化ナトリウムを加えることで、同一の晶系(P6₃)でありながら、ある程度等方的に結晶が成長することがわかった。これまでに、蛋白質の飽和濃度より若干低い蛋白質濃度(準安定領域)において、単結晶の成長が促されることが報告されている。そこで、硫酸アンモニウム濃度に対する、蛋白質の飽和濃度曲線、並びに結晶融解濃度曲線を測定し、準安定領域を示す相図を作成した。塩の存在下、非存在下での相図を比較したところ、塩存在下では結晶融解濃度が下がり、低蛋白質濃度で結晶が成長していることが明らかとなった。これが等方的に結晶が成長する要因の一つであると考え、硫酸アンモニウム/塩化ナトリウム溶液を沈殿剤として、相図をもとに、準安定領域内の低蛋白質濃度条件下で結晶を成長させた。この結果、現在までに2×1×1mm³まで結晶を成長させることに成功した。このようにして得られた結晶を用いSpring8でX線回折測定を行ったところ、0.9Åを超える高い回折能を示すことが明らかになったので、現在、結晶性を乱さない重水交換条件を検討している。

S.Yamaguchi, H.Kamikubo, N.Shimizu, Y.Yamazaki, Y.Imamoto and M.Kataoka : Crystallization of PYP for neutron crystallography

3P343

毛髪損傷によるキューティクルCMCの変化

○藤山 泰三¹、清水 秀樹¹、川副 智行¹、太田 昇²、井上 勝品²、八木 直人²、八田 一郎³ (¹資生堂 製品開発センター、²Spring-8/JASRI、³福井工大 工)

ヒト毛髪は、中心よりメデュラ、コルテックス、キューティクルという同心円状の3層構造であり、キューティクルの角化細胞間には、細胞膜複合体(CMC)が存在する。CMCは2層の脂質膜層(β -layer)とその間に挟まれたタンパク質層(δ -layer)からなるサンドイッチ構造になっており、毛髪内部への物質の拡散・透過に寄与していると考えられる[1]。高密度X線を得るSpring-8のBL40XUでは、毛髪CMCの β -layer、 δ -layerそれぞれの厚さが測定できることが既に報告されている[2]。今回、ヘアカラーやパーマなどの美容的なケミカル施術や紫外線曝露による毛髪の損傷とCMCの変化を、過型電子顕微鏡(TEM)・走査プローブ顕微鏡(SPM)・BL40XUでのX線散乱を用いて観察・測定を行ったので報告する。損傷毛髪として、ヘアカラー施術(アルカリ過酸化水素処理)、パーマ施術(チオグリコール酸塩で還元処理後、臭素酸塩で酸化処理)、紫外線曝露(UVランプを用いて照射)をそれぞれ調整し、健康毛との比較を行った。切片化毛髪のTEM観察を行った結果、CMCの損傷が確認でき、紫外線曝露よりもヘアカラーやパーマ施術といった薬液処理の方が損傷が大きいことが示唆された。また、SPMを用いてCMC部位の水平力値を測定した結果、損傷毛のCMCは、健康毛に比べ水平力値が増加していることがわかった。このことから、毛髪の損傷によりCMCは弾性率が低下、すなわち柔軟化がおこることが示唆される。さらに、X線散乱によるCMCの厚さ測定の結果、すべての損傷毛で δ -layerの厚さが減少していることがわかった。これらの結果から、ケミカル施術等による毛髪の損傷により、CMCは厚みが減少し柔軟化することが示唆される。[1]最新の毛髪科学、松崎他著、フレイグランスジャーナル社[2]N. Ohta et al., (2005). J. Appl. Cryst. 38, 274-279

T.fujiyama, H.shimizu, T.kawasoe, N.Ohta, K.Inoue, N.Yagi, I.Hatta : Change of cell membrane complex of a hair fiber caused by hair damage

3P342

シスタチン結晶化における制御要因としてのN末端揺動運動

○高橋 大輔¹、上妻 由章²、西本 悦子¹、山下 昭二¹ (¹九大 院・農・植物資源、²茨城大・農・資源生物)

蛋白質の結晶化機構は一義的にはG.Feher等により示された過飽和度によって説明される。 $\Delta\mu=kT\ln(C/S)=kT\ln\sigma$ 即ち、溶解度以上に溶液内に存在する蛋白質分子が結晶化されると考えられている。従って、蒸気拡散法等による過飽和度の制御が主たる蛋白質の結晶化法である。しかしながら、多くの蛋白質は結晶化のために、その蛋白質に固有の結晶化剤の存在を必要とし、また時には、結晶化能向上のために、蛋白質内部の柔軟領域の除去、各ドメインの分離といった蛋白質自体の加工も施される。このことから、X線、中性子線による結晶構造解析に適した蛋白質結晶の作成の向上を図るためには、蛋白質の結晶核形成、結晶成長を制御する物理化学的要因を詳しく探り、結晶化との関係を明らかにする必要がある。我々はこの間、ニガウリ種子より得られるトリプシンインヒビター(BGTI)を例にとり、その結晶化に関する幾つかの物理的要因を明らかにしてきた。今回、比較的小型の蛋白質でありながら結晶化が困難と考えられているヒマワリ種子シスタチンのN末端ドメインの運動性に着目した。このシスタチンは、システインプロテアーゼのインヒビターであり、N末端アミノ酸残基の第1ヘアピンループとの相互作用、及びその運動性が、酵素阻害、構造安定性に深く関わっている。発表では大腸菌内で大量発現後、分離精製したヒマワリ種子シスタチンrScbとそのN末端を2残基、4残基欠損させたrScb-N2,rScb-N4について、様々な結晶化条件の下での並進、回転拡散速度を動的分散法、時間分割蛍光偏角解消法を用いて解析し、シスタチンの結晶化効率に及ぼすN末端ドメインの影響について得られた結果を報告する。特にN末端のアミノ酸残基の動力学特性とシスタチンの結晶化との関係について詳しく議論する。

D.Takahashi, Y.Kouzuma, E.Nishimoto and S.Yamashita : N-terminal segmental dynamics of Cystatin as a regulatory factor for its crystallization

3P344

毛髪の損傷にともなうキューティクル微細構造の変化

○川副 智行、藤山 泰三、清水 秀樹(資生堂 製品開発センター ヘアスタイリング製品研究所)

【目的および方法】毛髪は、ヘアカラーやパーマなどの化学的な施術(ケミカル処理)や紫外線曝露によって、構成タンパク質の変性による不可逆的な構造変化(損傷)を起こし、美的外観を損なうことが知られている。毛髪の損傷に関する研究は、毛髪タンパク質の電気泳動やX線構造解析などのミクロな視点と毛髪繊維の物性値測定などのマクロな視点での研究とが主流であり、数多くの報告がなされている。しかしながら、これら2つの視点ではカバーできない毛髪微細構造に着目した毛髪損傷の研究は、測定機器の問題もありこれまであまり行われていなかった。そこで、我々は透過型電子顕微鏡(TEM)と走査プローブ顕微鏡(SPM)を用い、ケミカル処理や紫外線照射を施した毛髪のCuticle微細構造の構造変化と力学特性を測定し、Cuticleの微細構造の損傷に伴う変化の詳細を検討した。【結果および考察】TEM観察によりCuticleの3つの微細構造であるA-layer, Exocuticle, Endocuticleはいずれも毛髪の損傷による染色性の変化があり、質的な変化が確認された。なかでも最内層にあるEndocuticleはSS結合の少ない柔軟な構造であることから質的な変化に加え構造変化も見られ、損傷の進行につれて空洞が形成されていた。さらに詳細な観察から、この空洞は健康毛髪のEndocuticleで確認される顆粒状物質の内部成分の流出により形成されることが示唆された。また、毛髪の横断切片および毛髪表面でのSPMによる水平力値測定により、毛髪の損傷に伴いCuticleの3つの微細構造はいずれも硬度低下を引き起こすことが確認された。なかでもExocuticleでの硬度低下が大きく、Endocuticleの構造変化との関連が示唆された。また、紫外線照射による損傷はケミカル処理に比べ毛髪表面付近で大きいことが確認された。

T.Kawasoe, T.Fujiyama and H.Shimizu : Change of cuticle ultra-structure caused by hair damage