

脂質高次構造を利用したタンパク質の結晶化

田中晋平[†] (広大総合科)

【はじめに】

タンパク質の結晶はタンパク質分子の立体構造解析のために必要不可欠なものであるが、タンパク質分子およびその溶液の複雑な構造を反映して、その結晶化は一般に容易ではない。タンパク質の結晶核形成および成長のメカニズムを解明し、合理的な結晶化法を開発しようという試みは、1990年代から盛んに行われてきた。本講演ではまず、タンパク質の結晶化の重要性、難しさ、面白さを簡単に紹介し、その後、最近我々が取り組んでいる脂質高次構造内におけるタンパク質溶液物性の研究について説明する。

タンパク質を結晶化するためには、(1) 溶液の純度 (分子の単分散性) の向上、(2) 分子間相互作用の制御、(3) 溶液の過飽和化などの手順を踏まなくてはならない。タンパク質溶液の特徴である、溶液を高い過飽和状態にしても長時間準安定な状態を保つことが可能であること、また、過飽和度を大きくしすぎるとアモルファス状態で急激に析出してしまうことなどの性質から、(3) の段階に対する制御は特に困難で、これまでに蒸気拡散法やシーディング法など、様々な手法が考案されている。本研究では新たに、脂質高次構造を用いてタンパク質溶液を濃縮する手法を提案する。

【脂質高次構造内でのタンパク質結晶化】

脂質や界面活性剤は濃度や温度、圧力に応じて様々な高次構造を形成する。そのうちの一つに、キュービク相と呼ばれる、脂質膜間に複雑な迷路状水路が形成される構造がある。この構造内でのタンパク質結晶化は、まず膜タンパク質に対して試みられた [1]。膜タンパク質は生体内では生体膜上に存在するが、その結晶化の際には通常界面活性剤を用いて可溶化しなくてはならない。脂質膜が空間を連続的に埋め尽くすキュービク相を利用すれば、生体内に近い環境で膜タンパク質を結晶化できるというのがアイデアであった。この場合、タンパク質はキュービク相の脂質膜中に存在する。実際、それまで結晶化が困難であったいくつかの膜タンパク質が、この手法で結晶化されている。

構造 一方我々は、キュービク相の膜間のナノメートルサイズの水路に水溶性タンパク質を封入した場合について興味を持って調べてきた [2,3]。タンパク質分子のサイズとこの水路のサイズはほぼ同程度であり、タンパク質は脂質膜によって強く拘束されることになる。我々は、タンパク質としてリゾチーム、脂質としてモノオレインをもちいてこのような系の性質を調べてきた。キュービク相内へのタンパク質溶液の拘束は、その溶液物性に大きな影響を与える。また逆に、タンパク質がキュービク相の構造を変化させることも明らかになっている。図1は、X線小角散乱

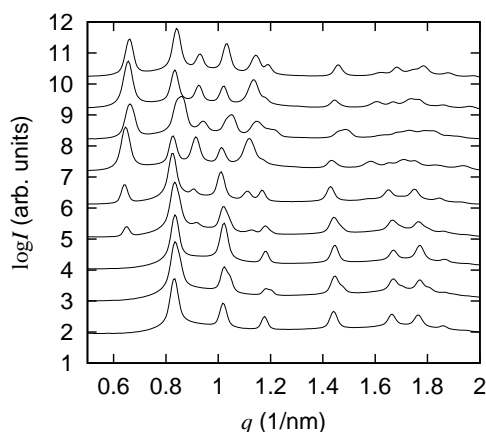


図1: モノオレインキュービク相のX線小角散乱。リゾチーム濃度0% (一番下) から7% (一番上)。

[†]shinpei@hiroshima-u.ac.jp

法によって測定されたモノオレインキュービック相の構造転移の様子である。タンパク質の添加に伴って、新たなピークが観察されるようになる。このピークは水路がより太いキュービック相構造の形成を表している。このことは、水路中にタンパク質という異物を受け入れなくてはならないキュービック相が、できるだけそのことによるストレスを緩和させる方向に構造を変化させていることの結果として理解することができる。

相図 図2は、タンパク質の結晶化に注目して作成した相図である。縦軸は結晶化剤である NaCl 濃度、横軸はタンパク質濃度である。キュービック相内では溶解度曲線が低濃度側にシフトしており、キュービック相内に溶液を封入した場合には、溶液が実効的に濃縮され、リゾチーム分子が実際の数倍の濃度を感じることを示している。実際、キュービック相内でのリゾチーム濃度を約4倍してプロットし直すと、キュービック相内の溶解度と通常の溶解度がよく一致することがわかる。我々は、このようなキュービック相内での実効的な濃縮効果を、狭い空間に拘束されることによるリゾチーム分子の自由体積の減少ととらえ、濃縮の程度を定性的に見積もることに成功している。

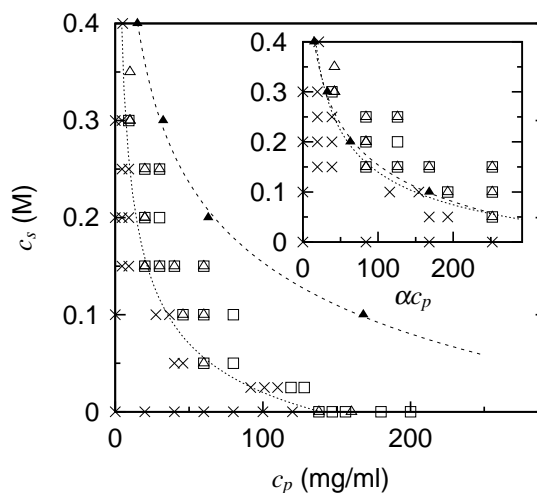


図2: リゾチーム-NaCl 水溶液の相図。破線は通常の結晶化の場合、点線はモノオレインキュービック相内に溶液を封入した場合の溶解度曲線。挿入図は、キュービック相内のリゾチーム濃度を4.2倍したものの。

拡散 キュービック相内でのリゾチーム分子の並進拡散係数は、Fluorescence Recovery After Photobleaching法を用いて測定することができる。これまでに得られた拡散係数は、 $6 - 8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ で、通常溶液内での拡散係数 $80 - 90 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と比較して、キュービック相内では拡散が1/10以下に押しえられていることがわかる。これは、狭い水路の立体障害によるものと考えられる。水路の一番狭い部分はリゾチーム分子と同程度かそれより細く、リゾチームの拡散は、水路の比較的広い部分間をホッピングすることにより起きると推測される。拡散が遅いことは、結晶成長も遅くし、良質の結晶を生成する目的には利点となる。

【まとめ】

モノオレインキュービック相内でリゾチームは実効的な濃縮を受け、通常より低いタンパク質および結晶化剤濃度で結晶化が可能である。また、キュービック相内ではタンパク質の拡散は遅く、急激な集合によるアモルファス化も防ぐことができる。このように脂質キュービック相は、水溶性タンパク質溶液の過飽和化を行う新しい手法の一つとして利用できる可能性がある。講演では、これまでに我々が得た結果をもとに、この可能性について詳しく考察する。

【参考文献】

- [1] E. M. Landau, G. Rummel, S. W. Cowan-Jacob and J. P. Rosenbusch, J. Phys. Chem. B, **101**, 1935, (1997).
- [2] S. Tanaka, S. Maki, and M. Ataka, Phys. Rev. E **73** (2006) 061510.
- [3] S. Tanaka, S. U. Egelhaaf, and W. C. K. Poon, Phys. Rev. Lett., **92** (2004) 128102.