



Taka-amylase A の X 線小角散乱測定による結晶化前会合体の検出

小沼一雄¹、伊中浩治²、杉本泰伸³

1 国立研究開発法人産業技術総合研究所、2 株式会社丸和栄養食品、
3 名古屋大学シンクロトロン光研究センター

キーワード：タンパク質、凝集体の経時変化、結晶化剤、アルカリカチオン

1. 背景と研究目的

タンパク質分子の構造解析は、当該タンパク質が原因となる疾病の究明と対処薬剤の開発に直結する極めて重要な課題である。タンパク質結晶化において最も重要なポイントは「最適な結晶化剤の選択」であり、現在までに結晶化に成功したタンパク質のうち、約 75% にポリエチレングリコール (PEG) が使用されている。しかし、リゾチームや Taka-amylase A (TAA) のような特定のタンパク質は PEG による結晶化が不可能であり、結晶化剤として塩類を用いる必要がある。更にこれらのタンパク質は、特定の塩でのみ結晶化が極めて容易に進む「塩特異性」を示すことが大きな特徴である。この現象は、従来のタンパク質結晶化理論（分子表面電荷を塩イオンによって遮蔽し、van der Waals 引力によって凝集を励起する）では説明ができず、且つタンパク質結晶化の本質に直結する未解決問題となっている。本実験は TAA の結晶化過程と結晶化塩の種類との関連を解明し、その様相が既に測定を終了したリゾチームの結晶化過程と整合性を持つか（すなわち、一般的な現象か否か）を検証する。

2. 実験内容

先に行ったタンパク質リゾチームの X 線小角散乱測定において（2018 年度成果公開無償利用課題）、結晶化を誘発する塩類と結晶化不可の塩類をそれぞれ添加した際に、塩の種類に応じて超小角に結晶化前会合体の存在が検出された。この会合体の有無によって結晶化の成否の少なくとも第一ステップが決定されると考えられ、小角散乱測定が、従来の絨毯爆撃的な結晶化探索過程を大幅に簡略化できる可能性を持つことが示唆された。今回はリゾチームで見られた現象が、他のタンパク質に拡張適用できるかを検証する。試料は、高純度精製した Taka-Amylase A をリゾチームの場合と同様に純水透析したサンプルとし、結晶化を誘発する塩と誘発しない塩、それぞれを添加して時間分割小角散乱測定を行う。その際に、散乱ベクトルの超小角領域に会合体が出現するか否か、またその出現と最終的な結晶化の可否の相関に対する確認を行う。

3. 結果および考察

注) 詳細な解析は現在進行中であり、データとしてまとまっていないため、本書には測定時に確認した定性情報のみ記述する。

硫酸アンモニウム及び塩化ナトリウムを結晶化剤として添加した場合の小角散乱プロファイルの時間変化を観察した。TAA は硫酸アンモニウムで結晶化が起こる一方で、塩化ナトリウムでは結晶形成が起こらないことをバッチ法にて確認している。測定の結果、硫酸アンモニウムを添加した場合には、結晶化剤の濃度に応じて散乱プロファイルの強度が上昇し、超小角に会合体と推定される物体の存在を認めた。一方で、塩化ナトリウムを添加した場合には、塩濃度を上昇させても散乱強度に顕著な変化が生じず、溶液中に何ら会合体が形成されていないことを示唆する結果となった。このことからリゾチームで観察された現象、すなわち、「不飽和状態で溶液中に pre-crystallization oligomer が形成されることが結晶化の必須条件」が TAA にも当てはまると推定した。