

タンパク質の低温度での X 線測定

日影達夫¹⁾

¹⁾ 工学研究科・工学部技術部 分析・物質技術系

はじめに

近年タンパク質の X 線構造解析を行う場合は、結晶を凍結した状態（100K 以下）で X 線回折データを収集するのが主流である。その理由として、現在研究目標とされるタンパク質結晶がこれまで構造解析してきたタンパク質よりサイズが小さいため、キャピラリーに封入して測定する事が難しくなっている事があげられる。また、タンパク質を凍結した状態で測定する事は、タンパク質結晶の放射線損傷を劇的に抑制するという効果がある。低温度での X 線測定を行う時は、これまでは測定者が溶液中のタンパク質をループ等ですくい、液体窒素等につけて凍結保存した物を用いて X 線測定を行っていた。

今回の研鑽で、溶液中から結晶をすくうためのループの製作、溶液中からタンパク質をすくい X 線測定を行ったので報告する。

1. タンパク質の凍結について

1) 抗凍結剤

タンパク質結晶を冷却する場合問題となるのは、水分子が氷の結晶になってしまうことである。水を含む生体試料全体を急速冷却できれば、試料に含まれる水はアモルファス状に凍結される事が知られている。実際、電子顕微鏡による生体高分子の観察で、液体エタンを用いた急速冷却によりアモルファス状の氷に包埋された試料が作製されている。しかし、X 線測定の結晶は電子顕微鏡での試料の千倍程度の体積をもつため、電子顕微鏡で行われる冷却操作をそのまま結晶に適用することはできない。冷却速度が遅い場合は六方晶の氷が析出しタンパク質結晶を破壊し、冷却速度が十分に速くても立方晶の氷が析出する事がある。後者の場合タンパク質結晶を破壊することはなくても、氷の粉末パターンに重なる反射は使用する事ができなくなる。これらの問題については古くから検討されており、抗凍結剤と呼ばれる試薬を結晶化母液に導入することで避けられることがわかってきた。抗凍結剤とは、グリセロールや MPD (2-Methyl-2,4-PentaneDiol) といった有機化合物である。これらの試薬を適量、結晶化母液に加えその中にタンパク質結晶を浸す操作を行う事により、水はアモルファス状で凍結される。

2) 結晶の冷却方法

当実験室で行われているタンパク質結晶の冷却方法は、窒素吹付型低温装置を用いた方法と液体窒素を用いた方法の 2 種類がある。

窒素吹付型低温装置を用いた方法は、低温（100K 程度）窒素ガスの噴き出し口をプラスチック板等で覆って窒素気流を遮ったところに、ループ等ですくった結晶をゴニオメータヘッドにマウントしその後、板をすばやく取り除くことにより結晶を一気に低温窒素ガスにさらし、冷却する。

液体窒素を用いた方法は、結晶をすくったループもろとも液体窒素に一気に入れ、冷却するというものである。この方法では、液体窒素は沸点が低いために、結晶が液体窒素に触れたとたんに結晶の周りで発泡が起り、十分な冷却速度が得られないといわれている。しかし、結晶を液体窒素の中に入れるだけの簡単な方法であり、冷却された結晶は、専用の器具を用い凍結したままゴニオ

メータヘッドにマウントすることができる。

2. ループの製作

結晶をすくうループは、今回の研鑽では市販品の CrystalCapSystem (Hampton Research 社製) を使用することにした(図. 1 参照)。これは結晶をすくう線径 $\phi 10 \mu\text{m}$ または $\phi 20 \mu\text{m}$ のナイロン製ループ (CryoLoop) とそれを支持するための支持台 (Micro-Tube) とゴニオメータヘッド等に接続する部分 (CrystalCap) の3点からなる。CryoLoop はループ円の直径が数種類あり、結晶サイズにあわせて選択した(予算の関係上 $0.1\text{--}0.2\text{mm}$ の1種類で行った)。CryoLoop は全長 10mm 程度で1枚の台紙に10個貼り付けられており、これをピンセット等ではずし長さを 5mm 程度にカットする。カットしたCryoLoop をCrystalCapに取り付けたMicro-Tubeの内径 $650 \mu\text{m}$ の穴の中に入れ瞬間接着剤で固定する。この時、ループに接着剤がつかないように注意をし、製作した。

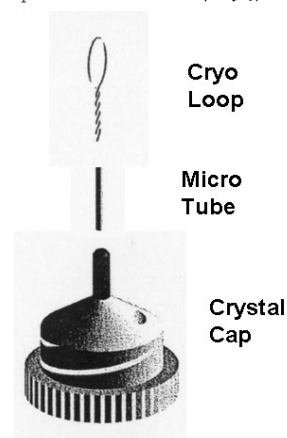


図1. CrystalCap
-Systemの概略

3. 結晶及び測定について

今回、低温度でのデータ測定は phospholipase A2 (PLA2) を使用した。結晶サイズは $50 \times 100 \times 30 \mu\text{m}$ 程度であった。PLA2 の結晶化母液には抗凍結剤として使用されているMPD (ヘキシレングリコール) が含まれていることから、ドロップ内から結晶をすくった後、そのまま凍結する事ができる。また、すくう様子やマウントした状態が写真でわかりやすいように結晶サイズが大きい catalase 結晶(写真1参照、サイズは $0.25 \times 0.25 \times 0.1\text{mm}$) も使用した。

測定はX線源にFR-E(出力 $45\text{kV}\text{--}45\text{mA}$ 、ターゲットはCu)とコンフォーカルミラーを組合せ $\text{CuK}\alpha$ 線 ($\lambda = 1.5418 \text{\AA}$) を使用した。検出器に R-AXIS VII、低温装置は窒素吹付低温装置で行った(写真2参照)。この低温装置は、大気中から分離注出した窒素ガスを極低温冷凍機と熱交換させて冷却しヒータにより温度調整を行い、ノズルの先端より約 1cm 先まで 100K の窒素ガスを吹き出すことができる。

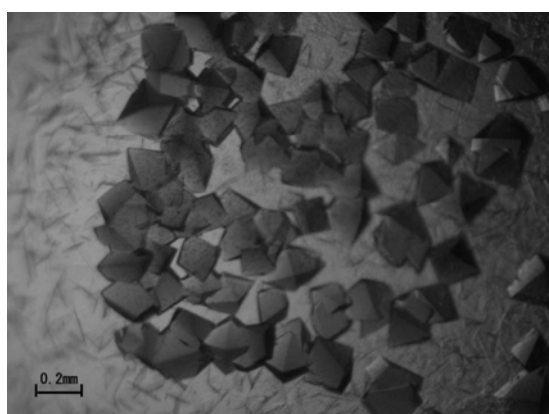


写真1. catalase 結晶の顕微鏡写真

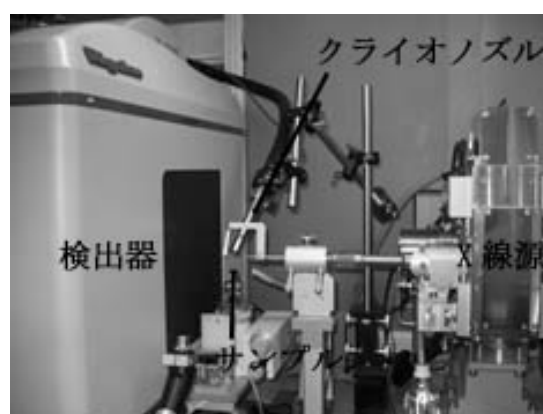


写真2. 測定装置外観

写真3は catalase 結晶をすくう様子をデジタルカメラの動画撮影機能を利用して撮影した1コマである。写真4は結晶を母液からすくい液体窒素につけて凍結した後、窒素気流が吹きつけるゴニオメータヘッドにマウントした時の様子である。

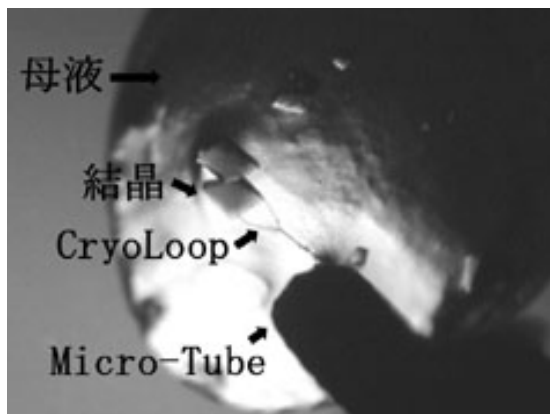


写真3. catalase 結晶をすくう様子

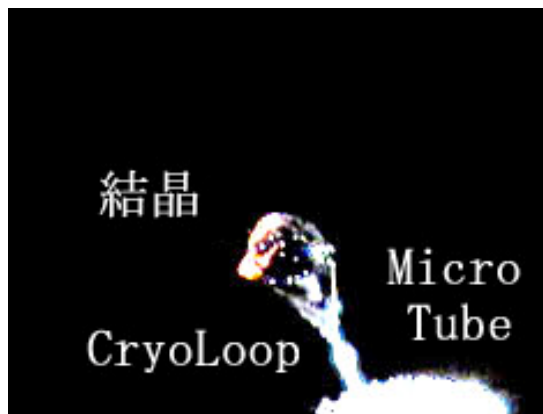


写真4. 結晶をマウントした時の状態

写真5に PLA2 の回折パターンを示す。また、測定データは DENZO 及び Scalepack で指数付けを行い、その結果を表1に示す。

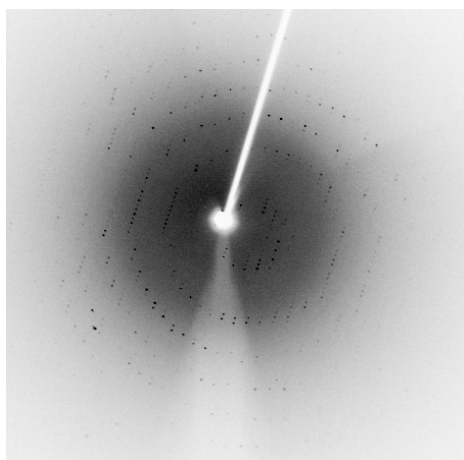


写真5. PLA2 の回折パターン

表1. 測定データの処理結果

Crystal size	0.05 × 0.1 × 0.03mm ³
Exp time	5min
Total osc.range	183°
Resolution	1.8 Å
Mosaicity	0.69
Completeness	99.3%
Rmerge	0.074

4. まとめ

データ処理の結果、1.8 Å分解能で完全性が99%、Rmergeも許容範囲のデータを収集することができた。

クリスタルキャップシステムを巧く製作しているか（クライオループを平行にマイクロチューブに固定できているか等）、結晶サイズとループ径の大きさの関係により、結晶をすくう時間が左右される事がわかった。クライオループからマイクロチューブまでの長さを200 μm程度に調整するこ

とにより液体窒素中にループをいれた時に起こるループの変形等の不具合がおきにくい事がわかった。

謝辞

今回の研鑽でサンプルや、機材等を貸して頂いたバイオマテリアル講座生体高分子機能化学グループの水島恒裕助手をはじめ皆様に感謝致します。また、分析・物質技術系の技術開発費から支援を頂き、分析・物質技術系技術の諸氏に感謝致します。

参考文献

構造生物 Vol.2 No1 1996年4月発行 低温下での蛋白質 X線結晶構造解析(2) 中追雅由
X線回折研究のあゆみの No20 極低温下でのタンパク質結晶の X線回折データ収集 秋田昌岳