

修 士 論 文 の 和 文 要 旨

研究科・専攻	大学院 情報理工学研究科	先進理工学専攻	博士前期課程
氏 名	梅林 亮輔	学籍番号	1133014
論 文 題 目	<i>TtGuaB</i> の結晶化および <i>SrPurC</i> の構造精密化		

1. 研究の目的と概要

プリンヌクレオチド生合成系は、PRPPを出発物質としてIMPを経て、AMPやGMPを合成する全部で14の反応から構成されている。13番目の反応では、IMPデヒドロゲナーゼ(*GuaB*)が酵素として働き、 NAD^+ でIMPを酸化してXMPに変換する。また、7番目の反応では、SAICARシンテターゼ(*PurC*)が酵素として働き、ATPの加水分解と共役してアスパラギン酸とCAIRを縮合してSAICARを合成する。

本研究では、*Thermus thermophilus* HB8 由来 *GuaB* (*TtGuaB*)については、立体構造を決定し、その生化学的な特性における新たな知見を得ることを目的とした。*Sulfolobus tokodaii* strain7 由来 *PurC* (*SrPurC*)については、立体構造解析を行い、他生物種由来 *PurC* との構造比較および活性部位の比較を行うことで、共通点や相違点などを発見することを目的とした。

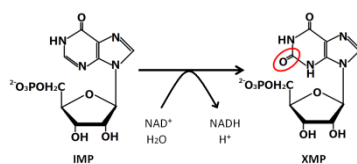


図 1. *GuaB* の触媒反応

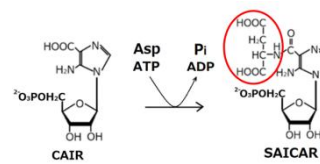


図 2. *PurC* の触媒反応

2. 方法・結果

・ *TtGuaB*

発現ベクターpET-3aを宿主菌 Rosetta-gami 株に形質転換して大量発現を行い、HPLCにて精製した。精製後、様々な条件下で酵素活性を測定し、さらにハンギングドロップ蒸気拡散法にてタンパク質の結晶化を行った。その結果、結晶は得られたものの、析出までに約6~12ヶ月もかかってしまった。そこで、より高濃度かつ高純度なタンパク質を得るために再精製を試みた。

・ *SrPurC*

理化学研究所播磨研究所の倉光先生の研究グループとの共同研究で、大量発現、精製、結晶化、X線回折、回折データの収集・処理を行って頂いた。現在、モデルの修正および構造精密化を行っており、*R* 値 24.9%, free *R* 値 30.6%のモデルが得られている。また、現時点での *SrPurC* の構造と既に立体構造が決定されている他生物種由来 *PurC* の構造を比較した。その結果、*SrPurC* を含むほとんどの原核生物由来の *PurC* は、二量体構造を形成していることが分かった。さらに、基質結合部位の特定や単量体構造との比較も行った。

平成 24 年度修士論文

TtGuaB の結晶化および *StPurC* の構造精密化

大学名	電気通信大学大学院
研究科名	情報理工学研究科
専攻名	先進理工学専攻
コース名	生体機能システムコース
学籍番号	1133014
氏 名	梅林 亮輔
主任指導教員名	三瓶 巖一 講師
指導教員名	中村 整 教授
提出年月日	平成 25 年 2 月 28 日

目次

第一章 序	4
1.1 プリンヌクレオチド生合成系	4
1.2 本研究で対象とした生物について	10
1.2.1 <i>Thermus thermophilus</i> HB8.....	10
1.2.2 <i>Sulfolobus tokodaii</i> strain7.....	10
1.3 本研究の目的	11
1.4 GuaB と PurC の X 線結晶構造解析の現状	13
第二章 実験方法	16
2.1 はじめに	16
2.1.1 網羅的タンパク質立体構造解析	16
2.1.2 結晶構造解析における放射光の利用	17
2.1.3 タンパク質の精製および結晶化のハイスループット化.....	18
2.1.4 位相決定方法の効率化	20
2.1.5 精密化	21
2.2 方法	22
2.2.1 目的タンパク質遺伝子のクローニング	22
2.2.2 タンパク質の大量発現・精製	22
2.2.3 活性測定	24
2.2.4 結晶化	25
2.2.4.1 結晶化の原理	25
2.2.4.2 結晶化の方法	27
2.2.4.3 結晶化の流れ	29
2.2.4.3.1 ファーストスクリーニング.....	29
2.2.4.3.2 保管・観察.....	35
2.2.4.3.3 最適化	35
2.2.5 X 線回折実験と構造解析.....	36
2.2.5.1 X 線回折の原理.....	36
2.2.5.2 位相問題の解決	37
2.2.5.3 異常分散効果	39
2.2.5.4 実験手順	40
2.2.5.4.1 タンパク質結晶の測定.....	40
2.2.5.4.2 クライオ条件の検討および結晶のマウント.....	41
2.2.5.4.3 回折データのスクリーニング，測定.....	42
2.2.5.4.4 回折データの処理.....	44

2.2.5.4.5 分子置換法による位相決定とモデル構築.....	49
2.2.5.4.6 電子密度図.....	53
2.2.5.4.7 構造の検討.....	55
第三章 結果	56
3.1 <i>Tt</i> GuaB.....	56
3.1.1 タンパク質の大量発現および精製	56
3.1.2 活性測定	57
3.1.2.1 KCl 濃度依存性	57
3.1.2.2. pH 依存性	58
3.1.2.3 フィードバック阻害	58
3.1.3 結晶化	60
3.1.3.1 結晶化サンプルの調製	60
3.1.3.2 ファーストスクリーニング	60
3.1.4 再精製	62
3.1.5 再々精製	63
3.2 <i>St</i> PurC.....	65
3.2.1 タンパク質の大量発現と精製	65
3.2.2 結晶化	65
3.2.3 回折データの収集, 処理	65
3.2.4 MAD 法による位相決定およびモデル構築.....	66
3.2.5 構造精密化	67
3.2.6 構造解析	67
3.2.6.1 他生物種由来 PurC との構造比較.....	67
3.2.6.2 アミノ酸配列比較	68
3.2.6.3 基質結合部位の特定	70
3.2.6.3.1 ATP 結合部位	70
3.2.6.3.2 CAIR 結合部位	71
3.2.6.3.3 単量体との差異.....	72
第四章 考察	73
4.1 <i>Tt</i> GuaB.....	73
4.1.1 活性測定	73
4.1.1.1 KCl 濃度依存性	73
4.1.1.2 pH 依存性	73
4.1.1.3 フィードバック阻害	74

4.1.2 結晶化(ファーストスクリーニング).....	75
4.1.3 再精製	75
4.2 <i>StPurC</i>	77
4.2.1 単量体との差異	77
4.2.2 反応メカニズム	77
参考文献	78
謝辞	79

第一章 序

1.1 プリンヌクレオチド生合成系

<ヌクレオチドとは>

ヌクレオチドとは、ペントース(五単糖)であるリボースまたはデオキシリボースの1位に窒素塩基が結合したヌクレオシドにリン酸が結合した化合物(図1)であり、DNAやRNAを構成する単位である。一つのヌクレオチドのリン酸基と別のヌクレオチドの糖がホスホジエステル結合を形成してDNAやRNAとなる。ヌクレオチドは全生物界に存在し、ほとんど全ての生化学過程に関与する。即ち、多くの代謝反応は、ATP(アデノシン三リン酸)の加水分解と共役する形で推進される。プリンヌクレオチドは、ヌクレオチド内の塩基がプリン塩基(アデニンまたはグアニン)であるものを指す。プリンヌクレオチドは、新規合成経路(生合成経路)とサルベージ経路によって合成される。サルベージ経路とは、核酸が分解されて得られた塩基を再利用してヌクレオチドを合成する経路のことである。

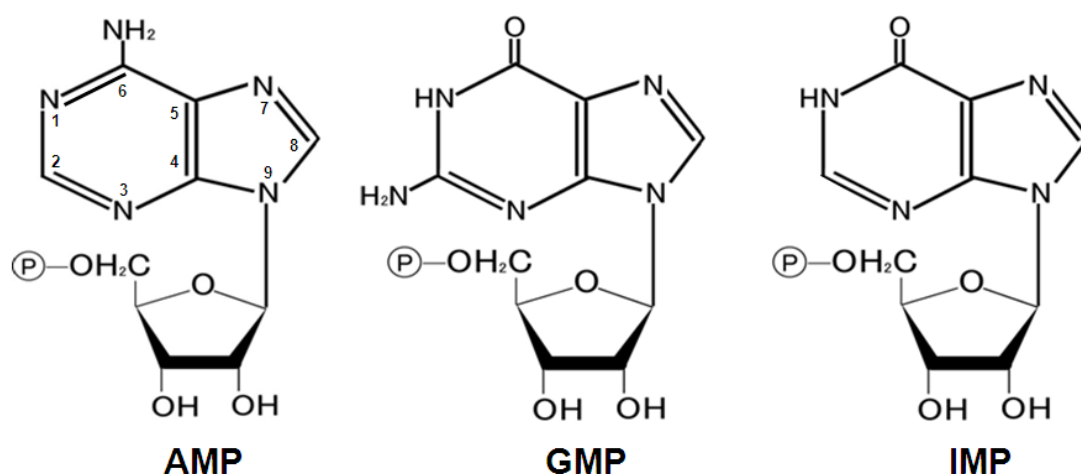


図1. プリンヌクレオチド

プリンヌクレオチド生合成系(以下、プリン生合成系と略す)は、5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸(PRPP)を出発材料にイノシン酸(IMP)を経由し、アデニル酸(AMP)とグアニル酸(GMP)を合成する全部で14の反応からなる。大腸菌の場合、3番目の反応に関与する酵素は2つ(PurN, PurT)が存在し、それぞれ N^{10} -ホルミルテトラヒドロ葉酸、ギ酸をホルミル基転移の基質とする。ギ酸供給のためには、PurU が利用される。6番目の反応は、真正細菌、植物、酵母、古細菌の一部では、PurE (Class I)と PurK の2つの酵素によってなされる。その他の真核生物や古細菌では、PurE (Class II)単独で反応が進行する。また、生物種によっては、4番目の反応に関与する PurL は PurQ, PurL, PurS の三つのサブユニットに分かれている。9番目の反応に関与する GuaA は GuaA1, GuaA2 の二つのサブユニットに分かれている。図2に、プリンヌクレオチド生合成系を代謝物質(PRPP, PRA など)と各反応を触媒する酵素名(PurF, PurD など)とともに示した。酵素名は大腸菌の遺伝子名をそのまま使用した遺伝子産物名で示した。中間代謝産物の略号、遺伝子産物名と酵素名の対応については、各々まとめて示した(表1, 表2)。また、プリン生合成系ではAMP合成にはGTPが、GMP合成にはATPが利用されることで、AMPとGMPの合成量のバランスがとれるように調節するネットワークが存在する。このような調節をフィードバック阻害と呼び、生体内におけるプリンヌクレオチドの過剰な蓄積を防ぐ役割がある。

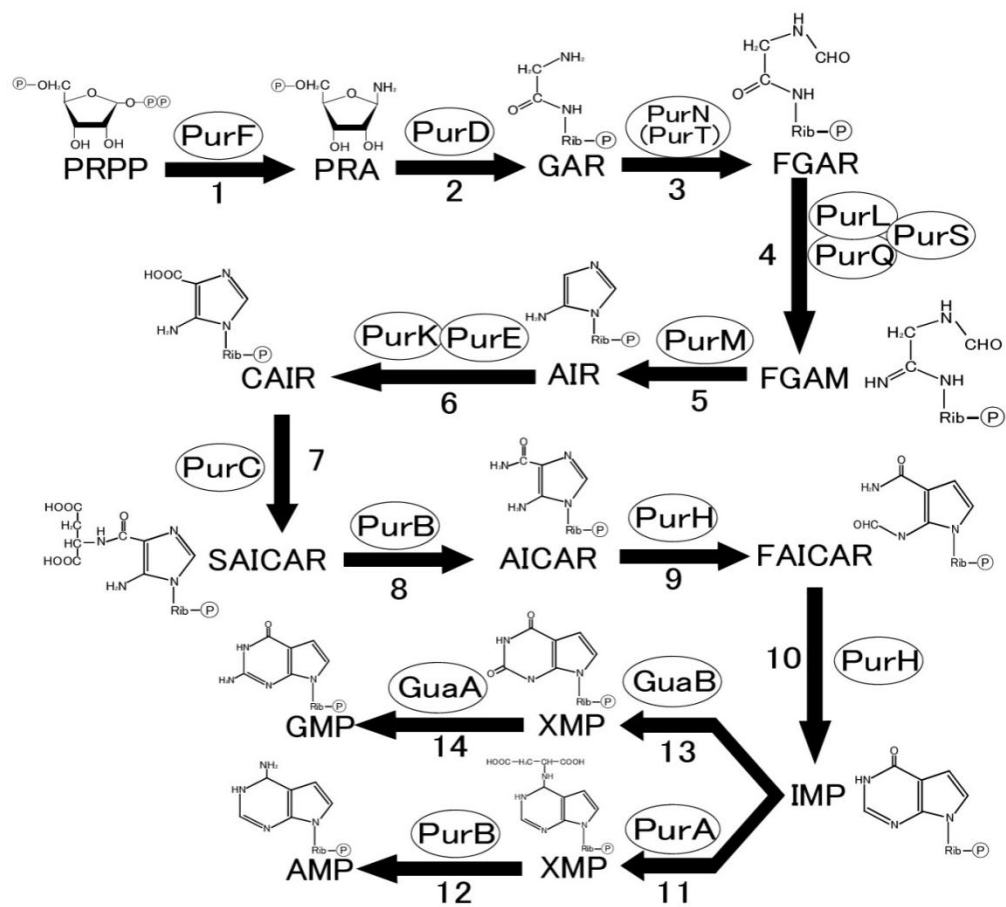


図 2. プリン生合成系

略号	化合物名
PRA	5-phosphoribosyl-1-amine
GAR	glycinamide ribotide
FGAR	N-formylglycinamide ribotide
FGAM	N-formylglycinamide ribotide
AIR	5-aminoimidazole ribotide
CAIR	4-carboxy-5-aminoimidazole ribotide
<i>N</i> ⁵ -CAIR	<i>N</i> ⁵ -carboxyaminoimidazole ribotide
SAICAR	5-aminoimidazole-4-N-succinocarboxamide ribotide
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide
FAICAR	5-formaminoimidazole-4-carboxamide ribotide
SAMP	adenylosuccinate
XMP	xanthylic acid

表 1. 中間代謝産物の略号

遺伝子産物名	酵素名
PurF	glutamine PRPP amidotransferase
PurD	GAR synthetase
PurN	GAR transformylase 1
PurT	GAR transformylase 2 or GAR transformylaseT
PurU	formyltetrahydrofolate deformylase
PurL (lgPurL, =PurSLQ)	FGAR amidotransferase
PurQ	FGAR amidotransferase I , glutamine amidotransferase subunit
PurL (smPurL)	FGAR amidotransferase II
PurS	FGAR amidotransferase , PurS subunit
PurM	AIR synthetase
PurK	<i>N</i> ⁵ -CAIR synthetase
PurE (Class I)	<i>N</i> ⁵ -CAIR mutase
PurE (Class II)	AIR carboxylase
PurC	SAICAR synthetase
PurB	adenylosuccinate lyase
PurH	AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase
PurA	adenylosuccinate synthetase
GuaB	IMP dehydrogenase
GuaA	GMP sythetase
GuaA1	GMP sythetase, glutamine amidotransferase subunit
GuaA2	GMP sythetase, PP-ATPase subunit

表 2. 遺伝子産物名と酵素名の対応

＜プリン環の原子の由来＞

John Buchanan (1948)は、ハトに様々な同位体ラベル化合物を投与した後に、排泄される尿酸(プリン的一种)を調べて、プリン環の組成原子を調べた。その結果、図3に示すようにプリン環のN1はアスパラギン酸のアミノ基、C2とC8はギ酸、N3とN9はグルタミンのアミド基、C4、C5、C7はグリシン、C6はCO₂ (HCO₃⁻)に由来することを明らかにした。

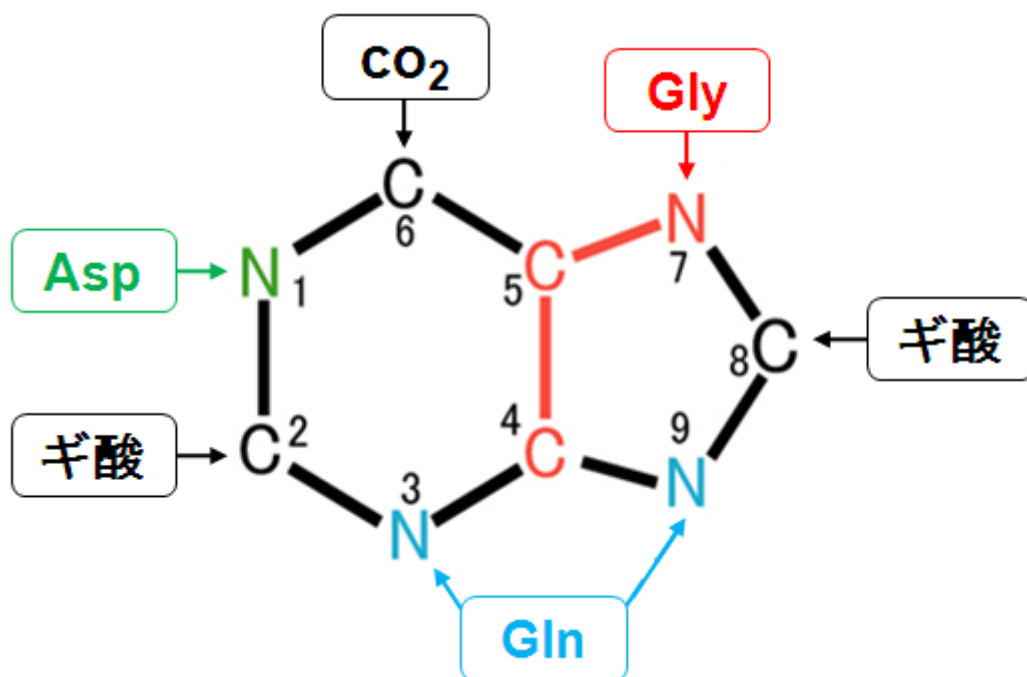
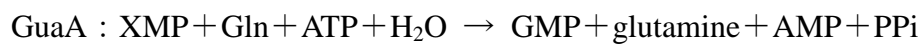
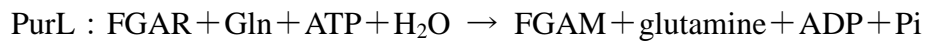
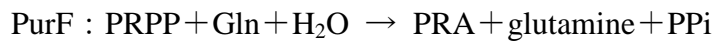


図3. プリン環の原子の由来

<酵素反応について>

プリン生合成系では、プリン環がリボース-リン酸を土台構造にして、少しずつ合成されていく。また、互いに類似した反応が数多く存在する。

- PurF, PurL および GuaA はグルタミンアミド基の窒素原子の転移反応を行う。



- PurN, PurH は N^{10} -ホルミルテトラヒドロ葉酸(N^{10} -formylTHF)を利用したホルミル基転移反応を行う。



- PurC, PurA はアスパラギン酸に依存したアミノ化反応を行う。



- PurL, PurM, PurA は反応過程で基質であるリボチドの異性体化が必要であると考えられている。イソメラーゼと類似の反応が含まれることが予想される。

1.2 本研究で対象とした生物

本研究で対象とした *Thermus thermophilus* HB8 と *Sulfolobus tokodaii* strain7 について、以下に詳細を紹介する。

・ 1.2.1 *Thermus thermophilus* HB8

伊豆の峰温泉で大島泰郎博士により発見された 65～85°C で生育可能な高度好熱菌(真正細菌)である。ゲノムサイズは 2.69 Mbp であり、最小培地で生育可能なことから、自立的に増殖可能な遺伝子のセット(特に物質生合成系など)を一揃い保有していると考えられる。また、遺伝子操作系(組換え DNA 技術)が利用できる生物としては最も高温で生育できる。HB8 株は、細胞中に 2 つのプラスミド(pTT27, pTT8)を含み、共に細胞増殖に必須であることが示されている。

同じく大島博士により単離された菌株として HB27 株があるが、HB8 株についての研究は日本で最も進んでいるのに対し、HB27 株の研究は主にヨーロッパで行われている。

・ 1.2.2 *Sulfolobus tokodaii* strain7

1983 年に大分県別府温泉から採取された好熱性古細菌で、分類上はクレンアーキオータ(Crenarchaeota)に属する。好気条件で生育し、至適生育温度は 80°C、至適 pH は 2～3 である。単独で硫化水素を分解する特徴を持ち、工業的な利用が検討されている。ゲノムサイズは 2.69 Mbp であり、2001 年に独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)によって全塩基配列が決定された。

1.3 本研究の目的

本研究で対象としたタンパク質は、inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (GuaB)と 5-phosphoribosylaminoimidazole-4- succinocarboxamide ribotide synthetase (PurC)である。以下、inosine 5'-monophosphate を IMP, 5-phosphoribosylaminoimidazole-4- succinocarboxamide ribotide を SAICAR と略す。

GuaB は、プリンヌクレオチド生合成系の 13 番目の反応、すなわち NAD^+ (β -nicotinamide adenine dinucleotide) で IMP を酸化して XMP (xanthosine 5'-monophosphate)に転換する反応を触媒する(図 4)。GuaB は、この系の最終産物である GMP (guanosine 5'-monophosphate)からフィードバック阻害を受ける。

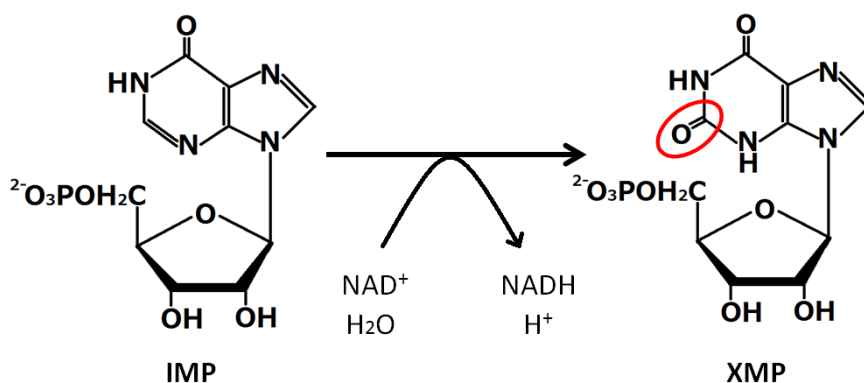


図 4. GuaB の反応

Thermus thermophilus HB8 由来 GuaB (以下, *Tt*GuaB と示す)については、現在、精製および結晶化の段階である。将来的に立体構造を決定し、その生化学的な特性および代謝システムの仕組みや形成過程における新たな知見を得ることを目的としている。また、14 番目の反応を触媒する GuaA (GMP synthetase)は、GuaB の反応と連続する反応であるため、2つの酵素間に相互作用がある可能性も考えられる。そこで、その可能性を検証することも目的としている。

PurC は、7 番目の反応、すなわち ATP (adenosine triphosphate)の加水分解と共

役し、アスパラギン酸と CAIR (4-carboxy-5-aminoimidazole ribotide)を縮合して、SAICAR を合成する反応を触媒する(図 5)。

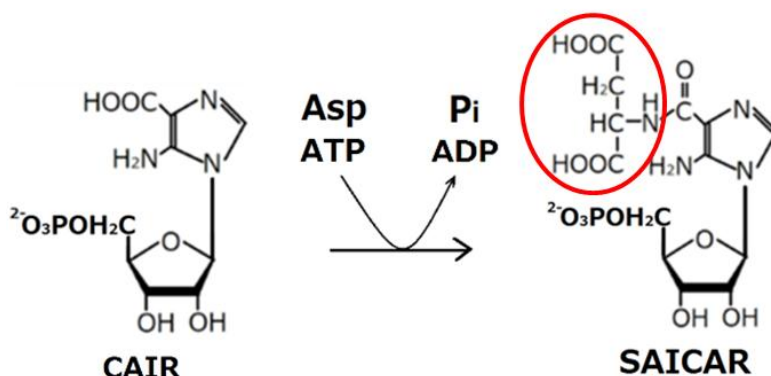


図 5. PurC の反応

Sulfolobus tokodaii strain7 由来 PurC (以下, *StPurC* と示す)については, 理化学研究所播磨研究所の倉光先生の研究グループとの共同研究で, タンパク質サンプルの精製および結晶化, 回折データの収集を行って頂いた。そのデータをもとに, 位相決定および初期モデルの作成まで完了しており, 現在, 構造精密化を進めている。将来的に立体構造を決定し, その生化学的な特性および代謝システムの仕組みや形成過程における新たな知見を得ることを目的としている。また, 様々な生物種由来の PurC が既に構造決定されていることが分かっている(1.4 項に記載)。そこで, それらの構造と *StPurC* の構造を比較し, 共通点や相違点などを発見することも目的としている。

上記の, 酵素の大量発現・精製・活性測定・結晶化・構築精密化に関する詳細な手順については, 以下に示す。

1.4 GuaB と PurC の X 線結晶構造解析の現状

ここで，GuaB と PurC の X 線結晶構造解析の現状について述べる。

GuaB は，真核生物(*Homo sapiens*, *Cricetulus griseus*, *Tritrichomonas foetus*, *Cryptosporidium parvum*) および真正細菌 (*Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pyogenes*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus anthracis*)，超好熱性真正細菌 (*Thermotoga maritime*)，超好熱性古細菌(*Pyrococcus horikoshii*)において立体構造が決定され，データベース化(PDB 登録)されている。

PurC は，真核生物 (*Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*)，真正細菌 (*Escherichia coli*, *Geobacillus kaustophilus*, *Clostridium perfringens*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Mycobacterium abscessus*)，超好熱性真正細菌(*Thermotoga maritime*)，古細菌(*Methanocaldococcus jannaschii*)において立体構造が決定され，データベース化(PDB 登録)されている。

PDB ID およびリガンド(基質，金属イオンなど)の結合の詳細は，以下の表に示す(表 3, 表 4)。この内，PurC の 2YWV, 2YZL, 2Z02 は我々の研究グループで構造決定したものである。

生物種	PDB ID	リガンド				
		基質またはイオン			阻害剤	
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1AK5	なし				
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1LRT	IMP	K ⁺		TAD	
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1ME7	Na ⁺	K ⁺		RVP	MOA
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1ME8	Na ⁺	K ⁺		RVP	
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1ME9	IMP	K ⁺			
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1MEH	IMP	K ⁺		MOA	
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1MEI	XMP	K ⁺		MOA	
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1MEW	XMP	NAD ⁺	K ⁺		
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1PVN	K ⁺			MZP	

<i>Homo sapiens</i>	1B3O				CPR	SAE
<i>Homo sapiens</i>	1JCN				CPR	
<i>Homo sapiens</i>	1NF7	K ⁺			RVP	MYD
<i>Homo sapiens</i>	1NFB	NAD ⁺			CPR	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1EEP	None				
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1ZFJ	IMP				
<i>Cricetulus griseus</i>	1JR1	IMP	K ⁺		MOA	
<i>Thermotoga maritime</i>	1VRD	なし				
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	2CU0	XMP				
<i>Cryptosporidium parvum</i>	3FFS	なし				
<i>Cryptosporidium parvum</i>	3KHJ	IMP	acetate		C64	
<i>Legionella pneumophila</i>	3R2G	なし				
<i>Bacillus anthracis</i>	3TSB	なし				
<i>Bacillus anthracis</i>	3TSD	XMP				
<i>Bacillus anthracis</i>	3USB	IMP	glycerol	Cl ⁻		

表 3. GuaB に関する登録データ

GuaB は創薬のターゲットとなっており, PDB に登録されているものの多くに阻害剤が結合している。以下, 略号で示した阻害剤の正式名称について示す。

- TAD

β-methylene thiazole-4-carboxamide adenine dinucleotide

- RVP

ribavarin monophosphate

- MOA

mycophenolic acid

- MZP

4-carbamoyl-1-β-D-ribofuranosyl-imidazolium- 5-olate-5'-phosphate

- CPR

6-chloropurine riboside 5'-monophosphate

- SAE

selenazole-4-carboxamide adenine dinucleotide

- MYD

{[5-(6-amino-purin-7-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydro- furan-2-ylmethoxy]-hydroxy-phosphorylmethyl}- phosphonic acid mono-[2-(4-hydroxy-6-methoxy- 7-methyl-3-oxo-1,3-dihydro-isobenzofuran- 5-yl)-ethyl] ester

- C64

N-(4-bromophenyl)-2-[2-(1,3-thiazol-2-yl)-1H-benzimidazol-1-yl]acetamide

生物種	PDB ID	リガンド			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1A48	なし			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1OBD	ATP	AMP	sulfate	Mg ²⁺
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1OBG	AMP	sulfate	Mg ²⁺	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2CNQ	CAIR	ADP	AMP	Mg ²⁺
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2CNU	Asp	sulfate		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2CNV	SAICAR	Asp	sulfate	
<i>Thermotoga maritime</i>	1KUT	なし			
<i>Escherichia coli</i>	2GQR	ADP	Mg ²⁺		
<i>Escherichia coli</i>	2GQS	CAIR	ADP	formic	Mg ²⁺
<i>Homo sapiens</i>	2H31	CO ₂			
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	2YWV	ADP	sulfate	Mg ²⁺	
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	2YZL	ADP	sulfate		
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	2Z02	ATP	citrate	sulfate	
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	3KRE	なし			
<i>Clostridium perfringens</i>	3NUA	ADP	AMP	glycerol	citrate
<i>Mycobacterium abscessus</i>	3R9R	Mg ²⁺			

表 4. PurC に関する登録データ

第二章 実験方法

2.1 はじめに

・ 2.1.1 網羅的タンパク質立体構造解析

タンパク質をはじめとする生体分子の立体構造を基にして機能を解析し、一つの細胞システム全体の生命現象を原子レベルで理解するために、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 が有するタンパク質をターゲットとした、「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」が 1999 年に開始され、三瓶研究室は千葉工業大学工学部生命環境科学科の河合研究室(河合剛太教授)と共同で、“プリン・ピリミジンヌクレオチド生合成系丸ごと解析”を分担担当している。さらに、三瓶研究室では、理化学研究所播磨研究所の倉光先生の研究グループとの共同研究で、代謝系研究グループの一環として、*Sulfolobus Tokodaii* strain7, *Thermotoga maritima* や *Geobacillus kaustophilus* 等の好熱菌をターゲットとしたプリン・ピリミジンヌクレオチド生合成系タンパク質の立体構造解析にも着手している。これらの細菌を用いる理由は、タンパク質の熱安定性が非常に高く、精製や結晶化が容易であり、かつ多くの生命に共通する基本的な生命情報を持つことから、立体構造解析や機能解析のモデル生物として適しているからである。これらの細菌の酵素の立体構造を決定することで、基質認識部位や熱安定性に寄与する部位などのような、配列からは得られない三次元の情報を得ることができる。これらの研究は、システム生物学を推進するための基礎資料を提供するばかりでなく、抗がん剤などの創薬への貢献にも繋がることが期待される。

・ 2.1.2 結晶構造解析における放射光の利用

網羅的タンパク質の立体構造解析を行うにあたり、より迅速な構造決定や解析精度の向上が求められた。そこで広く利用されているのが、SPring-8をはじめとする高輝度放射光施設である。現在、タンパク質立体構造データベース(RCSB_PDB)に登録されている構造の70%以上が放射光を利用して解析されたものである。高輝度放射光は、タンパク質結晶構造解析の実験手法や解析精度などに飛躍的な進歩をもたらした。その結果、以前までは回折強度不足により構造解析ができなかった微小サイズの結晶の構造解析を可能にした。また、放射光施設の波長可変性は、金属などの異常散乱原子を含んだタンパク質結晶の解析手段として多波長異常分散法(MAD法: Multi-wavelength Anomalous Diffraction method)による位相決定を可能にした。MAD法は、ひとつの結晶から得られる回折強度データで位相を決定することを可能にした。このため、数多くのタンパク質新規立体構造解析において迅速な位相決定法として利用されている。近年は、単波長異常分散法(SAD法: Single-wavelength Anomalous Diffraction method)による位相決定も増えてきている。SAD法の大きな特徴は、MAD法では最低三波長の回折データが必要であるのに対して、一波長のデータで位相を決定できる点である。また、放射光でのデータ収集の自動化も進められている。

SPring-8の理化学研究所(理研)構造ゲノムビームラインI & II & III (BL26B1, BL26B2, BL38B1)では、データ収集を迅速に行うために大量のタンパク質結晶を自動交換するサンプルチェンジャーSPACE (SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger)が設置されている。これにより、結晶を測定用のループにマウントし、凍結させた後に専用サンプルトレイ(最大52個/トレイ)にセットしてビームラインへ持ち込むことによって、実験ハッチに立ち入ることなく凍結結晶の交換を行うことが可能になった。また、コンピューターネットワーク

を介してビームラインの全機器を集中管理するソフトウェア BSS (Beam line Scheduling Software)の導入により、データベースと連携しながら回折強度を測定することも可能になっている。マウントされたタンパク質試料は、Web ブラウザを介して研究者がデータベースに登録し、サンプルトレイ ID を基にビームラインで測定を行えるようになっている。この SPACE の利用により、結晶の回折データのスクリーニングを行い、結晶位置のセンタリングなどを登録したデータベースを基に自動測定が可能となった。

現在では上記の技術に加え、結晶をトレイに封入して送付すれば、代わりに施設のオペレーターが回折データを収集するというメールインサービスも行われている。SPRING-8 までの移動とビームラインでの実験操作の習熟をスキップできることから、以前よりこのサービスが望まれていた。

・ 2.1.3 タンパク質の精製および結晶化のハイスループット化

大量のタンパク質を大腸菌で大量生産するために、理化学研究所播磨研究所ストラクチュロームグループ及び大阪大学理学部の倉光研究所において、タンパク質の精製と結晶化のハイスループット化が検討された。以下にその概要を示す。

はじめに、ターゲットである高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のゲノム解析が行われた。ゲノム解析の情報を基に、個々の遺伝子領域を PCR で増幅してクローニングが行われる。具体的には、Novagen 社の発現ベクター pET-11a のマルチクローニングサイト *NdeI/BamHI* サイトに目的タンパク質遺伝子を導入して、プラスミドを作製した(現在では、理研バイオリソースセンターから購入可能)。作製したプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3)に形質転換を行い、大量発現させると全体の約 72%が IPTG (イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド : Isopropyl- β -D-

1-thiogalactopyranoside)誘導なしに発現した。また、発現しないタンパク質に対しては、IPTG 誘導(IPTG がラクトースリプレッサーに結合し、ラクトースを分解する β -ガラクトシダーゼの発現を誘導)を行う、宿主大腸菌を変える、培地組成を変えるなどの試みによって、約 80%のタンパク質の量産化に成功した。結晶構造解析の位相問題を容易にするため、分子内の含硫アミノ酸メチオニンをセレノメチオニン(SeMet)に置換したタンパク質についても生産が容易になった。SeMet 置換体を生産する場合、メチオニン要求株(メチオニンを自分で合成できず、外部から取り込む必要がある) BL21 の親株でもある B834 (DE3)を用いて形質転換を行い、SeMet を加えた培地を用いることで大量生産が可能になった。メチオニンと SeMet は性質が非常に類似しており、メチオニンが SeMet に置き換わったタンパク質においても、構造や性質はほとんど変わらないことが実証されている。

これらの方法で大量発現したタンパク質は、好熱菌や好熱性古細菌由来のタンパク質であるため、熱処理により大腸菌タンパク質を変性させることが可能である。その結果、精製に必要な手順が少なくなり、効率よくタンパク質を精製することが可能になった。結晶化には、様々なリザーバー(結晶化沈殿剤溶液)条件がパッケージされた結晶化用キットを用いる。約 500 条件の初期スクリーニングを行い、そこから最適な結晶化条件を模索していく。初期スクリーニングをより迅速に行うために、自動結晶化用ロボットを作製し、現在活用している。また、結晶の観察作業も自動で行う観察ロボットも存在する。尚、本研究室における結晶化の作業は手作業で行っており、初期スクリーニングは約 250 条件である。

・ 2.1.4 位相決定方法の効率化

タンパク質の結晶に X 線を照射すると、結晶中に規則正しく並んだタンパク質原子の一つ一つによって入射 X 線の回折が生じる。しかし、その回折データは、回折光の強度のみを観測したものであるため、回折光の位相情報は含まれていない。それ故、位相を決定する必要がある。

従来、タンパク質の新規構造決定の際には、重原子同型置換法(MIR 法: Multiple Isomorphous Replacement method)を利用することが多かった。しかし、この方法は、複数の同型の重原子置換体結晶を必要とするため、それに対し慎重な調整条件の検討と多くの結晶性評価実験を行わなければならない。それ故、非常に多大な労力と時間が掛かっていた。

しかし近年、タンパク質精製において簡便な SeMet 置換体生産法が確立し、放射光施設の利用による高輝度放射線の多波長測定が可能になったことで MAD 法が利用できるようになった。それ故、一つの結晶から位相決定に必要な回折データを得ることが可能になった。さらに、従来の X 線に比べて高分解能のデータが得られることで位相決定までにかかる時間も大幅に短縮された。それに加えて、PDB などのデータベースの充実により、既知構造を容易に探索できるようになった。このため、分子置換法(MR 法: Molecular Replacement method)による初期構造の構築も容易になった。

今もなお、高性能なモデリングソフトが多数開発されている。これらの技術進歩によって、位相決定がより効率的に行われるようになってきている。

・ 2.1.5 精密化

電子密度マップが得られた後，そのマップの中にフィットするようにタンパク質分子を構築していく。このようにしてできたモデル(初期モデル)は，精密化と呼ばれるプロセスを経ることで，より実験データに合致し，且つ立体構造的にもより高精度なものへと練り上げられていくのである。

2.2 方法

X 線結晶構造解析におけるタンパク質の立体構造解析は大まかに以下の手順で進める。

1. 目的タンパク質の遺伝子のクローニング
2. タンパク質の大量発現・精製
3. 活性測定
4. 結晶化
5. X 線回折データ収集
6. モデルの構築および精密化
7. 構造決定

これらの実験方法および手順の詳細については、以下の項で述べる。

・2.2.1 目的タンパク質遺伝子のクローニング

ゲノム解析が完了した生物においては PCR (Polymerase Chain Reaction) で遺伝子を増幅させ、ベクターにクローニングすることが可能である。*TtGuaB*, *StPurC* の発現プラスミドは、理化学研究所播磨研究所の倉光先生の研究グループとの共同研究で構築して頂いた。

・2.2.2 タンパク質の大量発現・精製

大量の目的タンパク質を得るために大腸菌を用いた発現系の一つである Novagen 社の pET システムを用いた。Native タンパク質(SeMet などの置換がさ

れていないタンパク質)には pET-3a か pET-11a を、His-Tag 付加タンパク質の発現には pET-15b を用いた。pET システム発現系では大腸菌ゲノム上の T7RNA ポリメラーゼおよび発現プラスミド上の目的遺伝子の発現がラクトース(*lac*)オペレーターによって制御されている。それ故、宿主大腸菌の対数増殖期にラクトース誘導体である IPTG を添加することで目的タンパク質の大量発現を誘導できる。しかし、通常は Native タンパク質の大量発現においては、IPTG による発現誘導なしに十分量の発現が確認されることもある。細胞にとって有害であるタンパク質が IPTG 誘導なしに発現している場合は細胞の増殖自体に影響を及ぼすため、グルコースを添加するなどによって非誘導時の発現を抑えるなどしている。発現が確認できない場合には、宿主菌を BL21 株から Rosetta-gami 株へ変更したり、培地の成分や製造会社の変更を行ったりする。その他の方法として、His-Tag (6~10 残基のヒスチジンを含む短いペプチド)を付加することで、発現が改善する場合もある。His-Tag を付加することで、高速液体クロマトグラフィー(HPLC : High Performance Liquid Chromatography)においてアフィニティーカラムを用いることができる。具体的には、ヒスチジンが Ni^{2+} などの遷移金属に特異的に結合する性質を利用して Ni カラムが用いられる。

また、目的タンパク質の発現の確認には SDS-PAGE (SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動)を用いた。

タンパク質の精製においては、HPLC を用いて高純度のタンパク質を得た。以下に、いくつかの HPLC の例を示す。

- 疎水性相互作用クロマトグラフィー：タンパク質の分子表面の疎水性の違いを利用
- イオン交換クロマトグラフィー：タンパク質が持つ電荷の違いを利用

- ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー：Ca²⁺による陰イオン交換およびリン酸基による陽イオン交換を利用
- ゲルろ過クロマトグラフィー：タンパク質を大きさと形によって分離
- アフィニティークロマトグラフィー：タンパク質が持つある物質との特異的親和力を利用

・ 2.2.3 活性測定

精製したタンパク質が、目的タンパク質か否かを調べるためには、活性測定を行う必要がある。GuaB の活性測定は、脱水素酵素の補酵素として働く NADH (β -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form)や NAD⁺を用いて行う。NADH や NAD⁺は、ヌクレオチドが基本骨格となるために、DNA の光吸収極大域である波長 260 nm の紫外線をよく吸収する。NADH のみにおいては、波長 340 nm の紫外線もよく吸収する(図 6)。そのため、NAD⁺ \rightleftharpoons NADH の変化は、波長 340 nm の吸光度の測定によって容易に調べることができる。そこで、触媒反応と NAD⁺ \rightleftharpoons NADH の変化を関連付けた後、活性測定を行う。

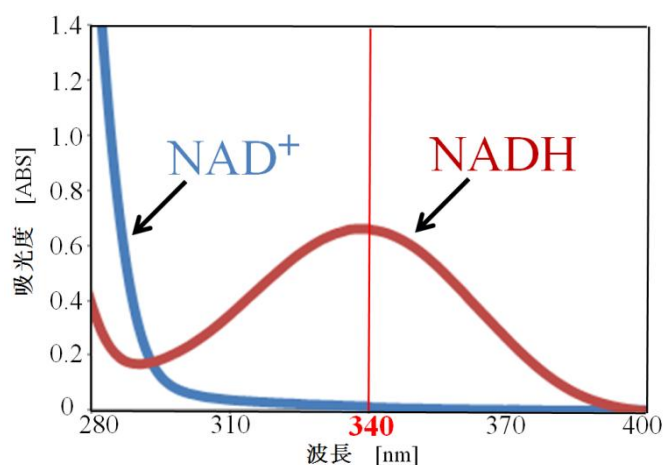


図 6. NADH と NAD⁺の吸光度比較

GuaB の場合，NADH は触媒反応に直接関与しており，反応によって増加している(図 4)。従って NADH の吸光度の増減を調べることで，触媒反応が進行しているか否か，あるいは，進行具合をモニターできる。

・ 2.2.4 結晶化

タンパク質の結晶化は，X 線を用いた立体構造解析における最大の難関である。それは，各々のタンパク質で結晶核形成や結晶成長が起こるかを予見することが不可能であるからである。また，結晶化沈殿剤溶液の濃度や pH，温度，タンパク質濃度などの様々なパラメーターが存在するなかで，結晶化は限られた条件でしか成功しないからである。現在も，新たなタンパク質結晶化法の開発が進められている。以下に，タンパク質結晶化の流れを示す。

1. ファーストスクリーニング(結晶化条件の絞り込み)
2. 保管・観察
3. 再現性の確認および結晶化条件の最適化
4. 回折実験可能な結晶の作成

・ 2.2.4.1 結晶化の原理

タンパク質の結晶化の過程は，基本的にタンパク質濃度と溶解度の相変化図(図 7)によって考察できる。硫酸塩・リン酸塩・クエン酸塩などの塩類，PEG などの高分子化合物，アルコールなどの親水性有機溶媒を単独，もしくは組み合わせて結晶化沈殿剤溶液として用いることで，タンパク質溶液の溶解度を下げ

ることによって行われる。溶解度曲線(飽和点の軌跡)の上側の過飽和領域では、タンパク質分子同士の凝集は無秩序に進行して非晶質の沈殿を生じる(沈殿生成領域)。過飽和度がある程度高い領域では、タンパク質分子同士が規則正しく凝集して結晶核が形成する(核形成領域)場合がある。そして、結晶核の形成後に核形成領域と溶解度曲線との間の比較的低い準安定領域に置かれると、タンパク質分子が規則的に結晶核の表面に蓄積して巨視的結晶への成長が期待される(結晶成長領域)。このように、それぞれの過程における状態変化の経路と速度によって結晶化の成否が決定されることが考えられる。

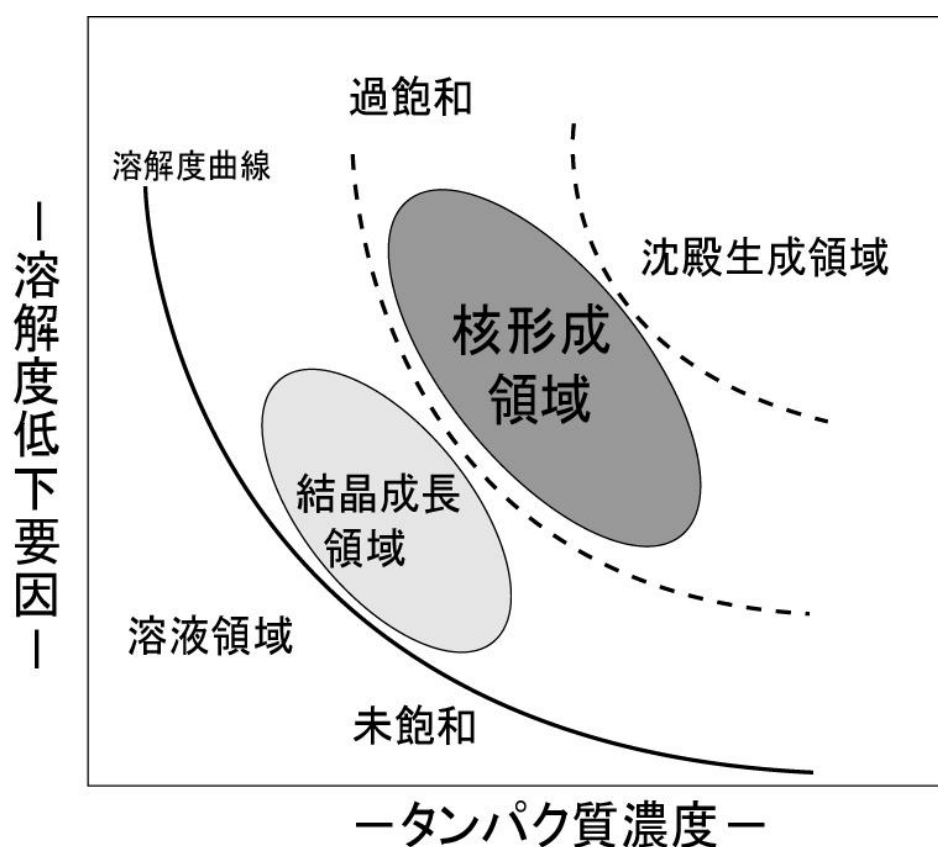


図 7. タンパク質濃度と溶解度の相変化図

・ 2.2.4.2 結晶化の方法

結晶化の方法によって結晶形成の条件が変わることも知られている。以下に代表的な結晶化方法を挙げ、各々の原理と特徴について示す(図 8 - 図 10)。

- 蒸気拡散法

タンパク質の結晶化に最も多く利用されている。タンパク質溶液に等量の沈殿剤溶液を加え、さらに過剰量の同じ沈殿剤溶液を同一容器内に分離密封する。蒸気の拡散とともにタンパク質溶液が濃縮していく過程で核形成と結晶成長を図る手法である。

- バッチ法

タンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合した後、密封するというものである。

- 透析法

透析膜で透析外膜と隔てた透析外液と隔てた沈殿剤溶液を様々な条件の外液にさらし検討するものである。同一の試料で複数の条件が検討可能である。

- シーディング法

結晶核まではできるが成長がよくない場合(回折実験には使えないサンプル)に用いる方法。既存結晶を用いるために結晶核形成を省いて結晶成長過程へと直接持っていく方法である。この方法は種結晶を新たに作成したドロップ(目的タンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合したもの)に植え継ぐため、結晶化を行う際にはあらかじめ結晶成長領域(平衡化状態)まで持っていく必要がある。シーディング法には、種結晶を数個すくって、そのまま新たなドロップに植え継ぐマクロシーディング法と、微結晶が確認できるドロップをピペットマンでポンピングを行い粉碎した状態の溶液を、新たなドロップに植え継ぎ 10 倍、100 倍、1000 倍と希釈していくミクロシーディング法がある。

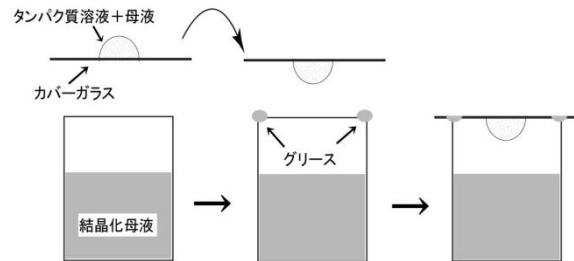
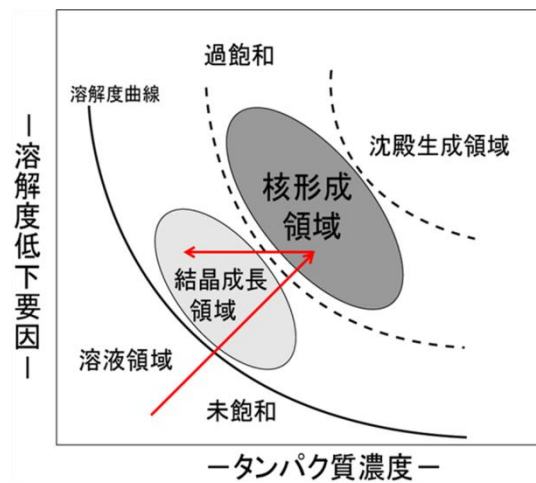


図 8. 蒸気拡散法

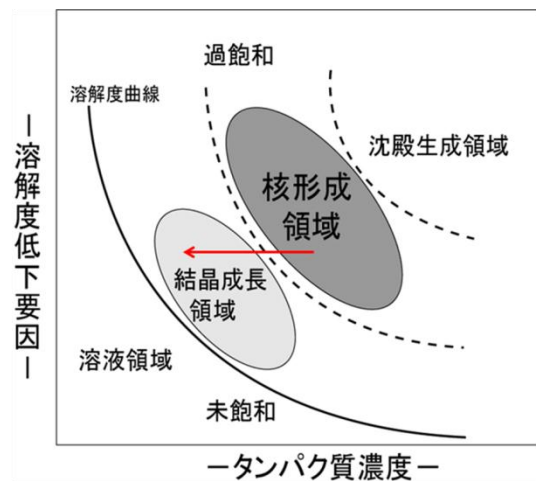


図 9. バッチ法

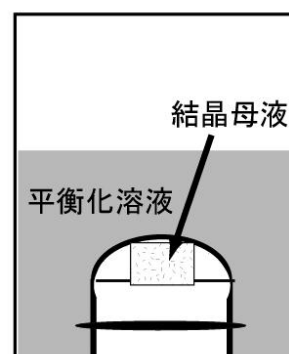
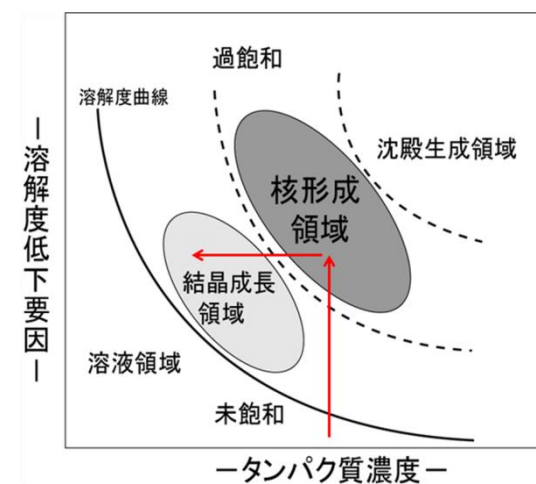


図 10. 透析法

それぞれの結晶化方法の特性を活かして、結晶の良質化を目指すことが重要である。本研究では、スクリーニングおよび最適化には蒸気拡散法を用いた。

・ 2.2.4.3 結晶化の流れ

・ 2.2.4.3.1 ファーストスクリーニング

スクリーニングでは、市販されている専用の試薬キットを用いることが多い。このキットは、多種の結晶化用溶液・緩衝液・添加剤を組み合わせる互いに重なり合わない多数の条件を出す sparse matrix 方式と、代表的な沈殿剤溶液の濃度と pH を格子状に展開した grid 方式の 2 種類に大きく分別できる。以下に、代表的なスクリーニングキットを示す。尚、三瓶研究室では、sparse matrix 方式である Hamton Resarch 社の CrystalScreen I & II と Natrix および Emerald Biostructures 社の Cryo I & II (図 11 - 図 15)を使用している。

Crystal Screen™

HR2-110 Reagent Formulation

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◊	Tube #	Precipitant
1.	0.02 M Calcium chloride dihydrate	1.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	1.	30% wv (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
2.	None	2.	None	2.	0.4 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
3.	None	3.	None	3.	0.4 M Ammonium phosphate monobasic
4.	None	4.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	4.	2.0 M Ammonium sulfate
5.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	5.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	5.	30% wv (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
6.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	6.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	6.	30% wv Polyethylene glycol 4,000
7.	None	7.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	7.	1.4 M Sodium acetate trihydrate
8.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	8.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	8.	30% wv 2-Propanol
9.	0.2 M Ammonium acetate	9.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	9.	30% wv Polyethylene glycol 4,000
10.	0.2 M Ammonium acetate	10.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	10.	30% wv Polyethylene glycol 4,000
11.	None	11.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	11.	1.0 M Ammonium phosphate monobasic
12.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	12.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	12.	30% wv 2-Propanol
13.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	13.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	13.	30% wv Polyethylene glycol 400
14.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	14.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	14.	28% wv Polyethylene glycol 400
15.	0.2 M Ammonium sulfate	15.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	15.	30% wv Polyethylene glycol 8,000
16.	None	16.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	16.	1.5 M Lithium sulfate monohydrate
17.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	17.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	17.	30% wv Polyethylene glycol 4,000
18.	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate	18.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	18.	20% wv Polyethylene glycol 8,000
19.	0.2 M Ammonium acetate	19.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	19.	30% wv 2-Propanol
20.	0.2 M Ammonium sulfate	20.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	20.	25% wv Polyethylene glycol 4,000
21.	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate	21.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	21.	30% wv (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
22.	0.2 M Sodium acetate trihydrate	22.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	22.	30% wv Polyethylene glycol 4,000
23.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	23.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	23.	30% wv Polyethylene glycol 400
24.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	24.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	24.	20% wv 2-Propanol
25.	None	25.	0.1 M Imidazole pH 6.5	25.	1.0 M Sodium acetate trihydrate
26.	0.2 M Ammonium acetate	26.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	26.	30% wv (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
27.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	27.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	27.	20% wv 2-Propanol
28.	0.2 M Sodium acetate trihydrate	28.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	28.	30% wv Polyethylene glycol 8,000
29.	None	29.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	29.	0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
30.	0.2 M Ammonium sulfate	30.	None	30.	30% wv Polyethylene glycol 8,000
31.	0.2 M Ammonium sulfate	31.	None	31.	30% wv Polyethylene glycol 4,000
32.	None	32.	None	32.	2.0 M Ammonium sulfate
33.	None	33.	None	33.	4.0 M Sodium formate
34.	None	34.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	34.	2.0 M Sodium formate
35.	None	35.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	35.	0.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate
36.	None	36.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	36.	0.8 M Potassium phosphate monobasic
37.	None	37.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	36.	8% wv Polyethylene glycol 8,000
38.	None	38.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	37.	8% wv Polyethylene glycol 4,000
39.	None	39.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	38.	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
40.	None	40.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	39.	2% wv Polyethylene glycol 400
41.	None	41.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	40.	2.0 M Ammonium sulfate
42.	0.05 M Potassium phosphate monobasic	42.	None	40.	20% wv 2-Propanol
43.	None	43.	None	41.	20% wv Polyethylene glycol 4,000
44.	None	44.	None	42.	10% wv 2-Propanol
45.	0.2 M Zinc acetate dihydrate	45.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	42.	20% wv Polyethylene glycol 4,000
46.	0.2 M Calcium acetate hydrate	46.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	43.	20% wv Polyethylene glycol 8,000
47.	None	47.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	44.	30% wv Polyethylene glycol 1,500
48.	None	48.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	44.	0.2 M Magnesium formate dihydrate
49.	1.0 M Lithium sulfate monohydrate	49.	None	45.	18% wv Polyethylene glycol 8,000
50.	0.5 M Lithium sulfate monohydrate	50.	None	46.	18% wv Polyethylene glycol 8,000
				47.	2.0 M Ammonium sulfate
				48.	2.0 M Ammonium phosphate monobasic
				49.	2% wv Polyethylene glycol 8,000
				50.	15% wv Polyethylene glycol 8,000

◊ Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen contains fifty unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
E-mail: tech@hmr.com
Website: www.hamptonresearch.com

HAMPTON
RESEARCH

Solutions for Crystal Growth

© 2000-2007 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or parts thereof may not be reproduced in any form without the written permission of the publishers.

☒ 11. CrystalScreen I

Crystal Screen 2™

HR2-112 Reagent Formulation

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◊	Tube #	Precipitant
1.	2.0 M Sodium chloride	1.	None	1.	10% w/v Polyethylene glycol 6,000
2.	0.5 M Sodium chloride	2.	None	2.	0.01 M Hexadecyltrimethylammonium bromide
3.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	3.	None	3.	25% v/v Ethylene glycol
4.	None	4.	None	4.	35% v/v 1,4-Dioxane
5.	2.0 M Ammonium sulfate	5.	None	5.	5% v/v 2-Propanol
6.	None	6.	None	6.	1.0 M Imidazole pH 7.0
7.	None	7.	None	7.	10% w/v Polyethylene glycol 1,000
8.	1.5 M Sodium chloride	8.	None	8.	10% w/v Polyethylene glycol 8,000
9.	None	9.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	9.	10% v/v Ethanol
10.	0.2 M Sodium chloride	10.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	10.	2.0 M Sodium chloride
11.	0.01 M Cobalt (II) chloride hexahydrate	11.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	11.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
12.	0.1 M Cadmium chloride hydrate	12.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	11.	1.0 M 1,6-Hexanediol
13.	0.2 M Ammonium sulfate	13.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	12.	30% v/v Polyethylene glycol 400
14.	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	14.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	13.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
15.	0.5 M Ammonium sulfate	15.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	14.	2.0 M Ammonium sulfate
16.	0.5 M Sodium chloride	16.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	15.	1.0 M Lithium sulfate monohydrate
17.	None	17.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	16.	2% v/v Ethyleneimine polymer
18.	0.01 M Iron (III) chloride hexahydrate	18.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	17.	35% v/v tert-Butanol
19.	None	19.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	18.	10% v/v Jeffamine M-600®
20.	None	20.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	19.	2.5 M 1,6-Hexanediol
21.	0.1 M Sodium phosphate monobasic monohydrate	21.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	20.	1.6 M Magnesium sulfate heptahydrate
22.	0.1 M Potassium phosphate monobasic	22.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	21.	2.0 M Sodium chloride
23.	1.6 M Ammonium sulfate	23.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	22.	12% w/v Polyethylene glycol 20,000
24.	0.05 M Cesium chloride	24.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	23.	10% v/v 1,4-Dioxane
25.	0.01 M Cobalt (II) chloride hexahydrate	25.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	24.	30% v/v Jeffamine M-600®
26.	0.2 M Ammonium sulfate	26.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	25.	1.8 M Ammonium sulfate
27.	0.01 M Zinc sulfate heptahydrate	27.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	26.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
28.	None	28.	None	27.	25% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
29.	0.5 M Ammonium sulfate	29.	0.1 M HEPES pH 7.5	28.	1.6 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 6.5
30.	None	30.	0.1 M HEPES pH 7.5	29.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
31.	None	31.	0.1 M HEPES pH 7.5	30.	10% w/v Polyethylene glycol 6,000
32.	0.1 M Sodium chloride	32.	0.1 M HEPES pH 7.5	31.	5% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
33.	None	33.	0.1 M HEPES pH 7.5	32.	20% v/v Jeffamine M-600®
34.	0.05 M Cadmium sulfate hydrate	34.	0.1 M HEPES pH 7.5	33.	1.6 M Ammonium sulfate
35.	None	35.	0.1 M HEPES pH 7.5	34.	2.0 M Ammonium formate
36.	None	36.	0.1 M HEPES pH 7.5	35.	1.0 M Sodium acetate trihydrate
37.	None	37.	0.1 M HEPES pH 7.5	36.	70% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
38.	None	38.	0.1 M HEPES pH 7.5	37.	4.3 M Sodium chloride
39.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	39.	0.1 M Tris pH 8.5	38.	10% w/v Polyethylene glycol 8,000
40.	None	40.	0.1 M Tris pH 8.5	39.	8% v/v Ethylene glycol
41.	0.01 M Nickel (II) chloride hexahydrate	41.	0.1 M Tris pH 8.5	40.	20% w/v Polyethylene glycol 10,000
42.	1.5 M Ammonium sulfate	42.	0.1 M Tris pH 8.5	41.	3.4 M 1,6-Hexanediol
43.	0.2 M Ammonium phosphate monobasic	43.	0.1 M Tris pH 8.5	42.	25% v/v tert-Butanol
44.	None	44.	0.1 M Tris pH 8.5	43.	1.0 M Lithium sulfate monohydrate
45.	0.01 M Nickel (II) chloride hexahydrate	45.	0.1 M Tris pH 8.5	44.	12% v/v Glycerol
46.	0.1 M Sodium chloride	46.	0.1 M BICINE pH 9.0	45.	50% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
47.	None	47.	0.1 M BICINE pH 9.0	46.	20% v/v Ethanol
48.	None	48.	0.1 M BICINE pH 9.0	47.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
				48.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
					2.0 M Magnesium chloride hexahydrate
					2% v/v 1,4-Dioxane
					10% w/v Polyethylene glycol 20,000

◊ Buffer pH is that of a 1.0 M (0.5 M for MES monohydrate) stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen 2 contains forty-eight unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
E-mail: tech@hrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

HAMPTON
RESEARCH

Solutions for Crystal Growth

© 2000-2007 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or
parts thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publishers.

☒ 12. CrystalScreen II

Natrix™

HR2-116 Reagent Formulation



Shelton, CT 06484

34 Jones
Aliso Vieja, CA 92656-3377 U.S.A.
Tel: (949) 453-1324 • Fax: (949) 453-1611
E-mail: info@hamptonresearch.com
Website: www.hamptonresearch.com

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◊	Tube #	Precipitant
1.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	1.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	1.	2.0 M Lithium sulfate monohydrate
2.	0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate	2.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	2.	2.5 M Ammonium sulfate
3.	0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate	3.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	3.	20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
4.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate	4.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	4.	10% v/v Polyethylene glycol 400
5.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	5.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	5.	5% w/v Polyethylene glycol 8,000
6.	0.1 M Ammonium sulfate, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	6.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	6.	20% w/v Polyethylene glycol 8,000
7.	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate	7.	0.05 M MES monohydrate pH 6.0	7.	15% v/v 2-Propanol
8.	0.1 M Ammonium acetate, 0.005 M Magnesium sulfate heptahydrate	8.	0.05 M MES monohydrate pH 6.0	8.	0.6 M Sodium chloride
9.	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	9.	0.05 M MES monohydrate pH 6.0	9.	10% v/v Polyethylene glycol 400
10.	0.005 M Magnesium sulfate heptahydrate	10.	0.05 M MES monohydrate pH 6.0	10.	5% w/v Polyethylene glycol 4,000
11.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	11.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	11.	1.0 M Lithium sulfate monohydrate
12.	0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate	12.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	12.	1.8 M Lithium sulfate monohydrate
13.	0.015 M Magnesium acetate tetrahydrate	13.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	13.	1.7 M Ammonium sulfate
14.	0.1 M Potassium chloride, 0.025 M Magnesium chloride hexahydrate	14.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	14.	15% v/v 2-Propanol
15.	0.04 M Magnesium chloride hexahydrate	15.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	15.	5% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
16.	0.04 M Magnesium acetate tetrahydrate	16.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	16.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
17.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate	17.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	17.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
18.	0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate	18.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	18.	1.3 M Lithium sulfate monohydrate
19.	0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate	19.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	19.	2.0 M Ammonium sulfate
20.	0.1 M Ammonium acetate, 0.015 M Magnesium acetate tetrahydrate	20.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	20.	10% v/v 2-Propanol
21.	0.2 M Potassium chloride, 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate	21.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	21.	10% w/v 1,6-Hexanediol
22.	0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate	22.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	22.	15% v/v Polyethylene glycol 400
23.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	23.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	23.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
24.	0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Calcium chloride dihydrate	24.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	24.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
25.	0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate	25.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	25.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
26.	0.2 M Potassium chloride, 0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate	26.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	26.	10% w/v Polyethylene glycol 8,000
27.	0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate	27.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	27.	30% w/v Polyethylene glycol 8,000
28.	0.05 M Magnesium sulfate hydrate	28.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	28.	1.6 M Lithium sulfate monohydrate
29.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	29.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	29.	4.0 M Lithium chloride
30.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	30.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	30.	1.6 M Ammonium sulfate
31.	0.005 M Magnesium chloride hexahydrate	31.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	31.	25% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
32.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	32.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	32.	20% w/v 1,6-Hexanediol
33.	0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	33.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	33.	30% w/v 1,6-Hexanediol
34.	0.1 M Potassium chloride, 0.005 M Magnesium sulfate hydrate	34.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	34.	15% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
35.	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	35.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	35.	5% v/v Polyethylene glycol 400
36.	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate	36.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	36.	10% v/v Polyethylene glycol 400
37.	0.2 M Potassium chloride, 0.025 M Magnesium sulfate hydrate	37.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	37.	20% v/v Polyethylene glycol 200
38.	0.2 M Ammonium acetate, 0.15 M Magnesium acetate tetrahydrate	38.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	38.	5% w/v Polyethylene glycol 4,000
39.	0.1 M Ammonium acetate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate	39.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	39.	5% w/v Polyethylene glycol 8,000
40.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	40.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	40.	1.6 M Ammonium sulfate
41.	0.1 M Potassium chloride, 0.015 M Magnesium chloride hexahydrate	41.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	41.	10% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
42.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	42.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	42.	5% v/v 2-Propanol
43.	0.05 M Ammonium acetate, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	43.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	43.	10% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
44.	0.2 M Potassium chloride, 0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	44.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	44.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
45.	0.025 M Magnesium sulfate hydrate	45.	0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5	45.	1.8 M Ammonium sulfate
46.	0.005 M Magnesium sulfate hydrate	46.	0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5	46.	35% w/v 1,6-Hexanediol
47.	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	47.	0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5	47.	30% v/v Polyethylene glycol 400
48.	0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate	48.	0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5	48.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000

◊ Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

Natrix contains forty-eight unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

☒ 13. Natrix

#	Precipitant	Buffer(100 mM)	Salt/Additives	Final pH
1	40% (v/v) MPD	Phosphate-citrate pH 4.2	none	5
2	40% (v/v) ethylene glycol	Acetate pH 4.5	none	5
3	50% (v/v) PEG-200	Citrate pH 5.5	none	5.9
4	40% (v/v) PEG-300	HEPES pH 7.5	0.2 M NaCl	7.3
5	40% (v/v) PEG-400	Citrate pH 5.5	0.2 M MgCl ₂	4.6
6	40% (v/v) PEG-600	Caodylate pH 6.5	0.2 M Ca(OAc) ₂	7
7	40% (v/v) ethanol	Tris pH 8.5	0.05 M MgCl ₂	8.4
8	35% (v/v) 2-ethoxyethanol	Caodylate pH 6.5	none	6.9
9	35% (v/v) 2-propanol	Phosphate-citrate pH 4.2	none	4.9
10	45% (v/v) glycerol	Imidazole pH 8.0	none	7.6
11	35% (v/v) MPD	Tris pH 8.5	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	8.3
12	50% (v/v) ethylene glycol	Acetate pH 4.5	5% (w/v) PEG-1000	5.1
13	30% (v/v) PEG-200	MES pH 6.0	5% (w/v) PEG-3000	6.1
14	20% (v/v) PEG-300, 10% (v/v) glycerol	Phosphate-citrate pH 4.2	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	4.5
15	50% (v/v) PEG-400	CHES pH 9.5	0.2 M NaCl	9.2
16	30% (v/v) PEG-600, 10% (v/v) glycerol	MES pH 6.0	5% (w/v) PEG-1000	6.2
17	40% (v/v) 1,2-propanediol	HEPES pH 7.5	none	7.2
18	35% (v/v) 2-ethoxyethanol	Imidazole pH 8.0	0.05 M Ca(OAc) ₂	7.5
19	35% (v/v) 2-propanol	Tris pH 8.5	none	8.3
20	30% (v/v) 1,2-propanediol	Citrate pH 5.5	20% (v/v) MPD	6.4
21	40% (v/v) 1,2-propanediol	Acetate pH 4.5	0.05 M Ca(OAc) ₂	5.3
22	40% (v/v) ethylene glycol	Na/K phosphite pH 6.2	none	6.8
23	40% (v/v) MPD	Tris pH 7.0	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	7.3
24	40% (v/v) PEG-400	Na/K phosphite pH 6.2	0.2 M NaCl	6.9
25	30% (v/v) PEG-200	Tris pH 8.5	0.2 M (NH ₄) ₂ HPO ₄	8.7
26	40% (v/v) PEG-300	CHES pH 9.5	0.2 M NaCl	9.4
27	30% (v/v) PEG-400, 10% (v/v) glycerol	CAPS pH 10.5	0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	8.2
28	30% (v/v) PEG-600, 10% (v/v) glycerol	HEPES pH 7.5	0.05 M Li ₂ SO ₄	7.4
29	20% (v/v) PEG-300	CHES pH 9.5	0.2 M sodium citrate	9.3
30	35% (v/v) 2-ethoxyethanol	Citrate pH 5.5	none	6.3
31	35% (v/v) 2-propanol	Citrate pH 5.5	5% (w/v) PEG-1000	6.2
32	40% (v/v) 1,2-propanediol	CHES pH 9.5	0.2 M sodium citrate	9.3
33	25% (v/v) 1,2-propanediol, 10% (v/v) glycerol	Imidazole pH 8.0	0.2 M Zn(OAc) ₂	5.9
34	40% (v/v) MPD	Imidazole pH 8.0	0.2 M MgCl ₂	7.6
35	40% (v/v) ethylene glycol	HEPES pH 7.5	5% (w/v) PEG-3000	7.4
36	50% (v/v) PEG-200	Tris pH 7.0	0.05 M Li ₂ SO ₄	6.7
37	40% (v/v) PEG-300	Caodylate pH 6.5	0.2 M Ca(OAc) ₂	7
38	40% (v/v) PEG-400	Tris pH 8.5	0.2 M Li ₂ SO ₄	8.4
39	40% (v/v) PEG-600	Phosphate-citrate pH 4.2	none	5.4
40	40% (v/v) ethanol	Phosphate-citrate pH 4.2	5% (w/v) PEG-1000	5.2
41	25% (v/v) 1,2-propanediol, 10% (v/v) glycerol	Phosphate-citrate pH 4.2	5% (w/v) PEG-3000	4.9
42	40% (v/v) ethylene glycol	Tris pH 7.0	none	7.4
43	50% (v/v) ethylene glycol	Tris pH 8.5	0.2 M MgCl ₂	8.5
44	50% (v/v) PEG-200	Caodylate pH 6.5	0.2 M Zn(OAc) ₂	6.2
45	20% (v/v) PEG-300, 10% (v/v) glycerol	Tris pH 8.5	5% (w/v) PEG-8000	8.7
46	40% (v/v) PEG-400	MES pH 6.0	5% (w/v) PEG-3000	6.2
47	50% (v/v) PEG-400	Acetate pH 4.5	0.2 M Li ₂ SO ₄	5.1
48	40% (v/v) PEG-600	Imidazole pH 8.0	0.2 M Zn(OAc) ₂	5.8
-	Oil 1: Light Silicone	DC-200		
-	Oil 2: Heavy Paraffin	BDH #6302-4N		
-		Fluka #76325		

図 14. Cryo I

#	Precipitant	Buffer(100 mM)	Salt/Additives	Final pH
1	40% (v/v) MPD	Gacodylate pH 6.5	5% (w/v) PEG-8000	7
2	50% (v/v) PEG-200	CHES pH 6.5	none	6.6
3	40% (v/v) ethylene glycol	Phosphate-citrate pH 4.2	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	4.5
4	40% (v/v) PEG-400	HEPES pH 7.5	0.2 M Ca(OAc) ₂	7.2
5	40% (v/v) PEG-300	Tris pH 7.0	5% (w/v) PEG-1000	6.4
6	30% (v/v) PEG-600, 10% (v/v) glycerol	Gacodylate pH 6.5	1 M NaCl	6.6
7	40% (v/v) ethanol	Tris pH 7.0	none	6.9
8	35% (v/v) 2-ethoxyethanol	Na/K phosphate pH 6.2	0.2 M NaCl	6.7
9	35% (v/v) 2-propanol	Imidazole pH 8.0	0.2 M Zn(OAc) ₂	6.1
10	40% (v/v) 1,2-propanediol	Acetate pH 4.5	none	6
11	25% (v/v) 1,2-propanediol, 10% (v/v) glycerol	Na/K phosphate pH 6.2	none	6.8
12	40% (v/v) 1,2-propanediol	Citrate pH 5.5	0.2 M NaCl	6
13	35% (v/v) MPD	Gacodylate pH 6.5	0.05 M Zn(OAc) ₂	6.6
14	40% (v/v) ethylene glycol	Imidazole pH 8.0	0.2 M Ca(OAc) ₂	7.8
15	50% (v/v) PEG-200	Na/K phosphate pH 6.2	0.2 M NaCl	7.2
16	20% (v/v) PEG-300, 10% (v/v) glycerol	Imidazole pH 8.0	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	7.4
17	50% (v/v) PEG-400	MES pH 6.0	none	6.3
18	40% (v/v) PEG-300	Phosphate-citrate pH 4.2	none	5.2
19	40% (v/v) PEG-600	Acetate pH 4.5	0.2 M MgCl ₂	4.8
20	50% (v/v) ethylene glycol	CHES pH 9.5	0.5 M K/Na tartrate	6.3
21	35% (v/v) 2-ethoxyethanol	Tris pH 8.5	0.2 M Li ₂ SO ₄	8.6
22	35% (v/v) 2-propanol	Gacodylate pH 6.5	0.2 M MgCl ₂	6.9
23	30% (v/v) 1,2-propanediol	HEPES pH 7.5	20% (v/v) PEG-400	7.4
24	25% (v/v) 1,2-propanediol, 10% (v/v) glycerol	Tris pH 8.5	0.2 M MgCl ₂	8.5
25	40% (v/v) MPD	CAPS pH 10.5	none	10.1
26	40% (v/v) ethylene glycol	MES pH 6.0	0.2 M Zn(OAc) ₂	6.1
27	50% (v/v) PEG-200	Tris pH 7.5	none	6.2
28	40% (v/v) PEG-300	Imidazole pH 8.0	0.2 M Zn(OAc) ₂	6.9
29	30% (v/v) PEG-400, 10% (v/v) glycerol	HEPES pH 7.5	5% (w/v) PEG-3000	7.4
30	40% (v/v) PEG-600	Citrate pH 5.5	none	6.5
31	40% (v/v) PEG-600	CHES pH 9.5	none	6.6
32	35% (v/v) 2-propanol	Acetate pH 4.5	none	5.3
33	45% (v/v) glycerol	Gacodylate pH 6.5	0.2 M Ca(OAc) ₂	6.5
34	25% (v/v) 1,2-propanediol, 10% (v/v) glycerol	Tris pH 7.0	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	7.4
35	40% (v/v) MPD	Citrate pH 5.5	none	6.2
36	50% (v/v) PEG-200	Gacodylate pH 6.5	0.2 M MgCl ₂	6.6
37	50% (v/v) ethylene glycol	Imidazole pH 8.0	none	7.7
38	40% (v/v) PEG-400	Acetate pH 4.5	none	5.4
39	30% (v/v) PEG-600, 10% (v/v) glycerol	Tris pH 7.0	0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	6.6
40	40% (v/v) MPD	CHES pH 9.5	none	9.2
41	50% (v/v) ethylene glycol	HEPES pH 7.5	0.2 M Li ₂ SO ₄	7.3
42	30% (v/v) PEG-200	Acetate pH 4.5	0.1 M NaCl	5
43	40% (v/v) PEG-400	Imidazole pH 8.0	none	7.4
44	35% (v/v) MPD, 10% (v/v) glycerol	Acetate pH 4.5	none	5.2
45	40% (v/v) PEG-300	Acetate pH 4.5	0.2 M NaCl	5.3
46	30% (v/v) PEG-200	CAPS pH 10.5	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	8.7
47	50% (v/v) PEG-200	HEPES pH 7.5	none	7.5
48	50% (v/v) PEG-200	Phosphate-citrate pH 4.2	0.2 M NaCl	5.2
-	Oil 1: Light Silicone	DC-200		
-		BDH #6302-4N		
-	Oil 2: Heavy Paraffin	Fluka #76325		

☒ 15. Cryo II

・ 2.2.4.3.2 保管・観察

沈殿剤溶液をセットされた結晶化容器は、密封された後に一定の温度に制御された場所(インキュベーター)に静置される。結晶化の温度は 20°C で行うのが通常である。また、温度も結晶化におけるパラメーターの一つであるので、 $\pm 10^{\circ}\text{C}$ の範囲で温度を振って保管する場合もある。

観察は結晶化を行ってから、1 日後・3 日後・1 週間後などと定期的に行う。10 倍ほどの実体顕微鏡を用いて、ドロップの状態は専用の観察シートに記録する。結晶が確認でき、再現性の確認を行うときに重宝する。また、結晶がタンパク質結晶なのか塩の結晶かが判断できない場合は、Crystal Judge 溶液を用いて判断する。Crystal Judge 溶液がアミノ酸に特異的に結合する特性から、結晶がタンパク質の場合は結晶が青色に呈色する。

・ 2.2.4.3.3 最適化

保護・観察から X 線回折に適する大きさの結晶が出ていない場合は、微結晶などが形成した条件からさらに良質の結晶核形成や結晶成長を促すために最適化を行う。具体的には、沈殿剤溶液の pH や塩濃度、高分子化合物の濃度を変化させ、再度結晶化を行う。

・ 2.2.5 X 線回折実験と構造解析

結晶が得られた後, X 線回折実験によってタンパク質の立体構造を決定する。

以下に, X 線結晶構造解析の流れを示す。

1. X 線回折実験
2. 回折データの処理
3. 位相決定
4. 電子密度計算
5. モデル構築
6. モデル修正&精密化

・ 2.2.5.1 X 線回折の原理

タンパク質結晶は 3 次元の周期的な構造を持つ。タンパク質結晶に, X 線が入射した時に起こる回折現象によって分子構造を決定する。仮に, 波長 λ の X 線が入射した場合, タンパク質中の原子によって散乱された X 線は互いに干渉して, 特定の方向では強め合って回折 X 線を生じる。回折 X 線の振幅は, 散乱後の足し合わせとして原子散乱因子 f を用いて表せる。ある原子 j の原子散乱 f_j から結晶構造因子 $F(hkl)$ への寄与は, 反射指数 hkl と原子 j の座標 x, y, z を用いて以下のように示すことができる。尚, T は原子 j の温度因子を表す。

$$F(h\ k\ l) = \sum_j f_j T_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)]$$

構造因子は電子密度のフーリエ変換であり, 単位格子中の電子密度分布 $\rho(x\ y\ z)$

は構造因子の逆フーリエ変換式として表すことができる。

$$\rho(x\ y\ z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l F(h\ k\ l) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (V : \text{単位胞の体積})$$

また、構造因子は複素数で定義されており、以下のように振幅と位相で表すことができる。

$$F(h\ k\ l) = |F(h\ k\ l)| \exp i\alpha(h\ k\ l) \quad (\alpha(h\ k\ l) : \text{位相})$$

反射強度は構造因子の絶対値の二乗からなるため、これを測定することで構造因子の絶対値を求めることができる。しかし、位相情報は回折実験から直接的には求めることはできない。従って、反射強度のみでは電子密度分布を計算することはできない。何らかの方法で位相を求めた後に、構造因子を逆フーリエ変換することで電子密度を得ることができる。

・ 2.2.5.2 位相問題の解決

位相を求める方法として、分子置換法(MR 法)、重原子同型置換法(MIR 法)、多波長異常分散法(MAD 法)/単波長異常分散法(SAD 法)などがある。以下に、各々の手法について述べる。

● 分子置換法(MR 法 : Molecular Replacement method)

既知の構造をモデル分子にして、既知構造と未知構造の相対的な関係により両者を比較しながら精密化を進め、位相を決定し構造を求める方法である。モデル分子となり得るのは、構造未知の分子とアミノ酸配列の相同性（同一

性) が 30%以上ある構造既知の分子である。位相を求めるにあたって、まず非対称中にタンパク分子が何分子入るかを確認する。具体的には、Matthews 定数を基に得られた溶媒率から最も可能性の高い分子数を選択する。次に、既知構造を回転と並進の操作によって結晶の単位胞中に当てはめていく。回転の操作において既知構造と未知構造の空間的配向を決定し、配向が決定した分子を平行移動させ構造を決定していく。

- **重原子同型置換法(MIR 法 : Multiple Isomorphous Replacement method)**

タンパク質の結晶を水銀や白金、銀などの重原子溶液に浸潤(soaking)して同型の重原子置換体結晶を調製し、二つ以上の回折データから位相を決定する方法である。重原子置換されたタンパク質の散乱能は、ネイティブ結晶のタンパク質の散乱能と重原子の散乱能の和であるので、

$$\mathbf{F_{PH}} = \mathbf{F_P} + \mathbf{F_H} \Rightarrow \mathbf{F_P} = \mathbf{F_{PH}} + \{-\mathbf{F_H}\}$$

※ 重原子置換結晶の構造因子 : $\mathbf{F_{PH}}$

※ ネイティブ結晶の構造因子 : $\mathbf{F_P}$

※ 重原子の構造因子 : $\mathbf{F_H}$

となる。 $|\mathbf{F_P}|$ と $|\mathbf{F_{PH}}|$, $\mathbf{F_H}$ は回折実験から求めることができるため、 $\mathbf{F_P}$ が求まる。しかし、等価な解が二つ存在しているので一義的には決められない。つまり、位相は一つの重原子置換体のデータからだけでは決定できない。よって、二つ以上の重原子置換体(別の重原子)を調製して位相の解を一義的に決める必要がある。

・ 2.2.5.3 異常分散効果

X 線のエネルギーが原子の吸収端のエネルギーに近いとき，あるいは X 線の振動数が束縛電子の固有振動数に近いとき，共鳴現象によって強い散乱が起きる。このことを異常分散(anomalous dispersion)といい，重原子ほど顕著に現れる。異常分散の効果を考慮した原子散乱因子 f は，以下のようになる(図 16)。

$$\mathbf{f} = \mathbf{f}_0 + \mathbf{f}' + i\mathbf{f}''$$

※ f_0 ：波長に依存しない項

※ $f' + if''$ ：波長に依存する項(異常分散項)

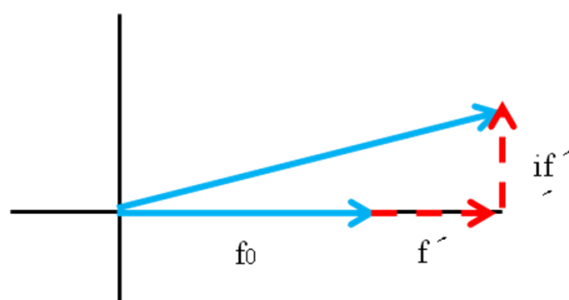


図 16. 異常分散効果を反映した原子散乱因子

この異常分散効果を利用して，重原子同型置換法と同様の取扱いで位相を決定することができる。

● 多波長異常分散法(MAD 法: Multi wavelength Anomalous Diffraction method)

異常分散効果は吸収端近傍の波長で急激に増加するため，吸収端近傍の異なる波長(通常 3 波長：Ede (吸収端)，Peak (吸収極大)，Remote (遠隔点))でデータ収集を行う。尚，吸収端は XAFS (X-ray Absorption Fine Structure：X 線吸

収微細構造)測定により求められる。MAD 法は、原理的には波長の数と同じ数の重原子置換体結晶を用いた重原子同型置換法と同じであり、一つの結晶で位相決定が可能である。

- **単波長異常分散法(SAD 法: Single wavelength Anomalous Diffraction method)**

最近は SAD 法による位相決定が増えてきている。SAD 法は、一波長の回折データから位相を決定する方法である。本来は、一波長からでは位相を一義的に決定することはできないが、溶媒領域平滑法などから電子密度を改良することが可能となり、さらにアルゴリズムの開発によって一義的に位相を決定することが可能となった。

- ・ **2.2.5.4 実験手順**

- ・ **2.2.5.4.1 タンパク質結晶の測定**

SPring-8 BL38-B1 にて回折データ収集を行う。SPring-8 BL38-B1 (<http://bioxtal.spring8.or.jp/>, <http://www.spring8.or.jp/ja/>)は、光源に偏光電磁石を利用したタンパク質のルーチン構造解析を目的とした構造生物学ビームライン(構造生物学 III)である。検出器には、Rigaku/MSB 社製 Jupiter210 CCD と Rigaku 社製イメージングプレート式自動カメラ R-AXIS5 の2種類の検出器が備え付けてあり、利用者の目的に応じて切り替えが可能である。

XAFS のスペクトル測定や MAD 測定を含む測定は、ビームラインの制御ソフトウェアである BSS (Beam line Scheduling Software)から行うことができる。現在は、サンプルチェンジャー SPACE (SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger)の導入およびビームラインデータベースシステム D-Cha (Database for

Crystallography with Home-lab Arrangement)の導入を行うことによって、研究者が遠隔地にいながらビームラインオペレーターとチャット機能を用いて、実験の進捗状況や方針をリアルタイムで確認でき、研究者は自分の研究室にしながら SPring-8 での回折データ測定を行うことができるメールインデータ測定サービスも開始されている。

・ 2.2.5.4.2 クライオ条件の検討および結晶のマウント

ドロップ中の結晶のサイズに応じた大きさのクライオループ (Hampton Research 社 <http://www.hamptonresearch.com/>)を選択し、実体顕微鏡を用いてループ内に沈殿剤溶液と共に素早くマウントする(結晶がダメージを受ける)。次にループをマグネットヘッドにセットして、100K ほどの窒素ガスを吹き付け、放射光の強力な X 線による結晶の損失を最小限に抑えるために瞬間凍結を行う(図 17)。また、この作業には、沈殿剤溶液中の結晶の動きを制御する目的もある。

マウントを行い瞬間凍結した際に、沈殿剤溶液および結晶が凍結してしまうことがある。この場合、測定に悪影響が出てしまい良好なデータが得られない。この凍結を防ぐため、測定の前に凍結しない条件(クライオ条件)の検討を行う。尚、沈殿剤溶液のみで凍結しない場合はクライオ条件を検討する必要はない。凍結してしまう場合は、不凍液{グリセロール, PEG (polyethylene glycol), MPD (2-methyl-2,4-pentanediol)}などを沈殿剤溶液に段階的に加えて凍結しない条件を探す。クライオ条件が決定した後、沈殿剤溶液＋不凍液の溶液に結晶を移す。ここで結晶が崩れたり溶解したりしなければクライオ条件の検討が完了したことになる。

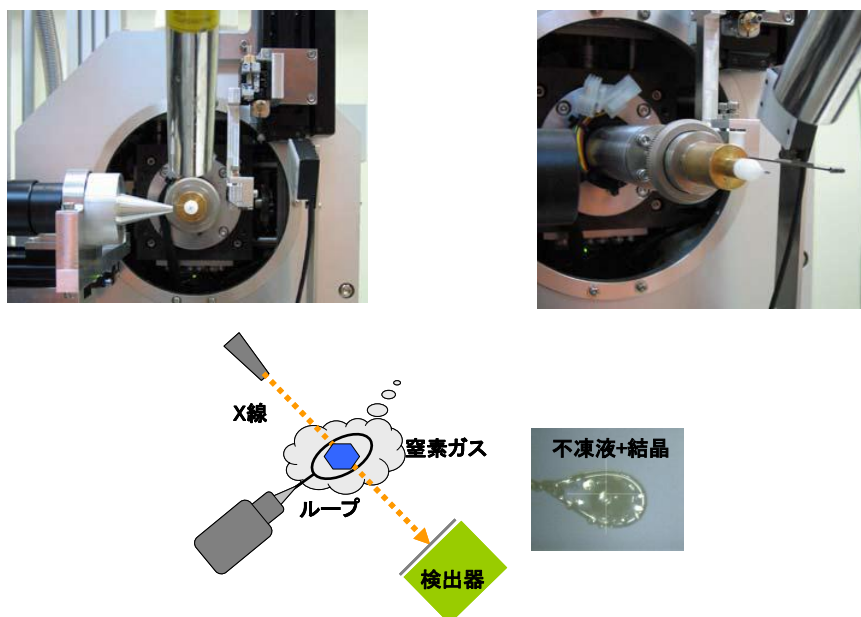


図 17. ゴニオヘッド(SPring-8 Bioxtal Beamlines : <http://bioxtal.spring8.or.jp/>)

・ 2.2.5.4.3 回折データのスケーリング，測定

クライオ条件の検討が完了した後，結晶の回折データのスクリーニングを行う。手動マウントで行う場合は，結晶をマウントした後に X 線を的確に当てるために，ビームスポットの中心にセンタリングを行ってから X 線を照射し，回折点の状態を確認する(予備測定)。結晶の位置決めは，GUI (グラフィックインターフェイス)上で行うことができるため，微調整が可能である。ここで良好なデータが得られた場合は，そのデータを基に露光時間の見積もり，回転角，刻み角，カメラ長や露光時間などの測定条件を設定し，本測定(回折データ収集)へと移る。

MAD 法および SAD 法では，吸収端付近の異常分散効果の変化を正確に測定する必要があるため，まずは XAFS 測定(吸収端測定)から行わなければならない。測定した回折像は，データ処理ソフト HKL2000 (有償ソフト)を利用して，指数

付け、積分、平均化などの処理を行う。また、BL38B1には解析用PCも設置されているため、回折データの測定を行いながら構造解析を進めることが可能である。

<結晶のマウントおよび瞬間凍結方法>

● クライオ装置を用いる場合 (試料を SPring-8 へ直接持って行って測定)

結晶をその場で凍結させる場合は、吹き付け低温装置の気流(窒素ガス)をカードなどで遮断し、ループをマグネットヘッドに装着させた後、素早く吹き付けを再開する。使用する道具(<http://bioxtal.spring8.or.jp>)については、以下に示す(表 5, 図 18)。

品名	製造元・型番
① ドライシッパー	Cryo Sipper Mini (+3 インチ吸着ブロック)
② トレイ固定金具	リガク
③ 液体窒素デュワー	Thermos サーモカット D3000 1
④ トレイ容器	リガク
⑤ サンプルトレイ	リガク
⑥ トレーフタ	リガク
⑦ ビット型マウントソケット	リガク
⑧ 電動ドライバー	松下電工 EZ6120A15
⑨ トレイ用 tong	リガク
⑩ トレーフタ用 tong	リガク
⑪ ハンプトン用アダプタ	リガク
⑫ タブ付きマグネット	リガク
⑬ マウントソケットガイド (オプション)	リガク
⑭ サンプルピン	リガク
⑮ クライオループ	Hampton Mounted Cryo Loops
⑯ 工業用ドライヤー	プラジェット PJ-206A 等

表 5. 使用する工具一覧



図 18. 使用する工具の写真

● 直接冷却

メールインサービスの際に用いる手法である。専用の工具の先端にループを装着し、液体窒素を入れておいた発砲スチロール容器で瞬間凍結させる。その後、ドライバーを用いてループをトレイ容器に入れ, SPring-8 に郵送する。

・ 2.2.5.4.4 回折データの処理

HKL Research 社製パッケージプログラム HKL2000 (<http://www.hkl-xray.com/>) を使用する。収集した回折イメージの反射点を一枚ずつ処理して統合し、消滅則等を用いて空間群をある程度絞り込み、最終的に独立的な反射データを作成する。以下に、詳細を示す。

① Peak search

回折データの指数付けを行うにあたって、回折イメージ上の位置情報を得る。

② Auto Index

空間群(ブラベ格子), 格子定数, 結晶の配向性を決定する。

③ パラメータリファインメント

Auto Index で決定した空間群, 格子定数, 結晶の配向性の精密化を行う。

④ 積分

回折イメージの積分を行う。回折点を数値化して足し合わせることで各反射の強度を見積っている。

⑤ スケーリング

積分によって得られた反射強度のスケールを合わせる。等価な反射強度どうしを平均することで, 独立な反射強度を求める。

以上の操作から, sca ファイル(指数, それに対する反射強度, 反射強度の測定誤差などの反射ファイル)を作成する。

<タンパク質の空間群>

結晶の空間群は全部で 230 種類に及ぶ。この空間群は 7 つの晶系(表 6)に分類できる。しかし, タンパク質は基本的には L-アミノ酸から成るため, タンパク結晶は鏡面および反転中心の対称がない。それ故, タンパク質の取り得る空間群は 65 種類(表 7)にとどまる。

結晶系		単位胞の幾何学的条件
三斜晶系	triclinic	なし
単斜晶系	monoclinic	$\alpha=\gamma=90^\circ$ あるいは $\alpha=\beta=90^\circ$
斜方晶系	orthorhombic	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
正方晶系	tetragonal	$a=b, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
三方晶系	trigonal	$a=b, \alpha=\beta=90^\circ, \gamma=90^\circ$ あるいは $a=b=c, \alpha=\beta=\gamma$
六方晶系	hexagonal	$a=b, \alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$
立方晶系	cubic	$a=b=c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$

表 6.7 つの結晶系

ブラベ格子	Laue class	空間群 (番号)	空間群 (名称)	らせん軸での消滅則	ブラベ格子による消滅則	Z
Primitive Cubic	m-3	195	$P 2 3$		none	12
		198	$P 2_1 3$	$(2n, 0, 0)$		
	m-3m	207	$P 4 3 2$			24
		208	$P 4_2 3 2$	$(2n, 0, 0)$		
		212	$P 4_3 3 2$	$(4n, 0, 0)^*$		
		213	$P 4_1 3 2$	$(4n, 0, 0)^*$		
I Centered Cubic	m-3	197	$I 2 3$	*	H+K+L=2N only	24
		199	$I 2_1 3$	*		
	m-3m	211	$I 4 3 2$			48
		214	$I 4_1 3 2$	$(4n, 0, 0)$		
F Centered Cubic	m-3	196	$F 2 3$		H,K,L all even or H,K,L all odd only	48
	m-3m	209	$F 4 3 2$			96
		210	$F 4_1 3 2$	$(2n, 0, 0)$		
Primitive Rhombohedral	-3	146	$R 3$		-H+K+L=3N only	9
	-3m1	155	$R 3 2$			18
Primitive Hexagonal (Trigonal)	-3	143	$P 3$		none	3
		144	$P 3_1$	$(0, 0, 3n)^*$		
		145	$P 3_2$	$(0, 0, 3n)^*$		
	-31m	149	$P 3 1 2$			6
		151	$P 3_1 1 2$	$(0, 0, 3n)^*$		

		153	$P 3_2 1 2$	$(0, 0, 3n)^*$		
		-3m1	150	$P 3 2 1$		
			152	$P 3_1 2 1$		
			154	$P 3_2 2 1$		
		6/m	168	$P 6$		
			169	$P 6_1$		
			170	$P 6_5$		
			171	$P 6_2$		
			172	$P 6_4$		
			173	$P 6_3$		
		6/mmm	177	$P 6 2 2$		
			178	$P 6_1 2 2$		
			179	$P 6_5 2 2$		
			180	$P 6_2 2 2$		
			181	$P 6_4 2 2$		
			182	$P 6_3 2 2$		
Primitive Tetragonal	4/m	75	$P 4$		none	4
		76	$P 4_1$	$(0, 0, 4n)^*$		
		77	$P 4_2$	$(0, 0, 2n)$		
		78	$P 4_3$	$(0, 0, 4n)^*$		
	4/mmm	89	$P 4 2 2$			8
		90	$P 4 2_1 2$	$(0, 2n, 0)$		
		91	$P 4_1 2 2$	$(0, 0, 4n)^*$		
		95	$P 4_3 2 2$	$(0, 0, 4n)^*$		
		93	$P 4_2 2 2$	$(0, 0, 2n)$		
		94	$P 4_2 2_1 2$	$(0, 0, 2n),$ $(0, 2n, 0)$		
		92	$P 4_1 2_1 2$	$(0, 0, 4n),$ $(0, 2n, 0)^{**}$		
		96	$P 4_3 2_1 2$	$(0, 0, 4n),$ $(0, 2n, 0)^{**}$		
I Centered Tetragonal	4/m	79	$I 4$		H+K+L=2N only	8
		80	$I 4_1$	$(0, 0, 4n)$		
	4/mmm	97	$I 4 2 2$			16
		98	$I 4_1 2 2$	$(0, 0, 4n)$		

Primitive Orthorhombic	mmm	16	$P 2 2 2$		none	4
		17	$P 2 2 2_1$	(0, 0, 2n)		
		18	$P 2_1 2_1 2$	(2n, 0, 0), (0, 2n, 0)		
		19	$P 2_1 2_1 2_1$	(2n, 0, 0), (0, 2n, 0), (0, 0, 2n)		
C Centered Orthorhombic	mmm	20	$C 2 2 2_1$	(0, 0, 2n)	H+K=2N only	8
		21	$C 2 2 2$			
I Centered Orthorhombic	mmm	23	$I 2 2 2$	*	H+K+L=2N only	8
		24	$I 2_1 2_1 2_1$	*		
F Centered Orthorhombic	mmm	22	$F 2 2 2$		H,K,L all even or H,K,L all odd only	16
Primitive Monoclinic	2/m	3	$P 2$		none	2
		4	$P 2_1$	(0, 2n, 0)		
C Centered Monoclinic	2/m	5	$C 2$		H+K=2N only	4
Primitive Triclinic	-1	1	$P 1$		none	1

表 7. タンパク質の取り得る空間群(<http://enzyme13.bt.a.u-tokyo.ac.jp/sgroup.html>)

注:* または ** の付いた空間群は, scaling/merging しただけでは区別できない。

[消滅則]

ブラッグの回折条件を満たしているにもかかわらず、構造因子がゼロになるために反射が生じないことがある。このような反射の消滅は、格子の型と対称要素(らせん、映進面のみ)に依存する。

・ 2.2.5.4.5 分子置換法による位相決定とモデル構築

データ処理によって出力された sca ファイル(反射ファイル)を用いて位相決定およびモデル構造の構築を行う。ここでは、パッケージプログラム CCP4 (<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>)を使用する(図 19)。CCP4 には、構造構築や精密化など様々なプログラムがまとめてパッケージされている。以下に詳細を示す。

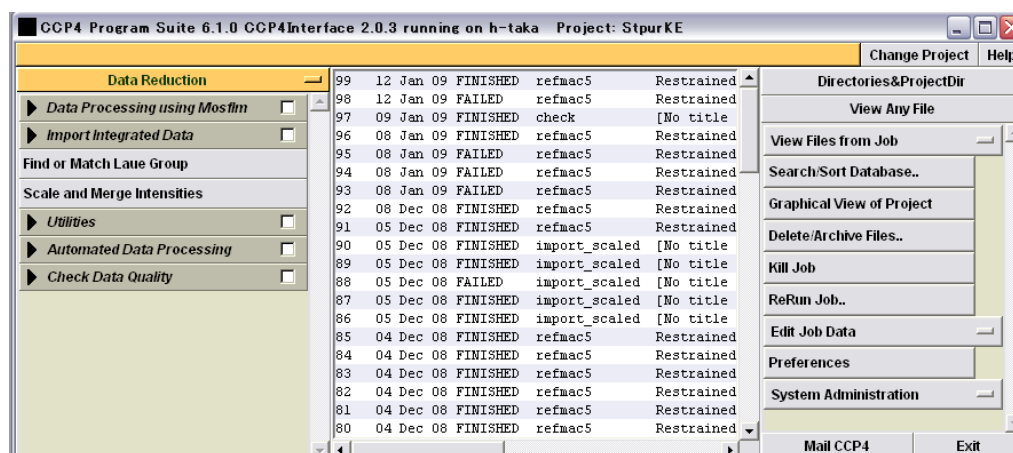


図 19. CCP4 の画面

① データの変換

HKL2000 から出力された sca ファイルに対して分子置換を行うために、はじめに、CCP4 を起動して mtz ファイルにデータ変換を行う。

② 非対称単位中の分子数の推定

非対称単位とは、結晶中に現れる繰り返し構造の一つを取り出したものである。実際の結晶中では、この構造がある規則に沿って前後左右に繰り返されている。分子置換法とは、この非対称単位にモデル分子をはめ込む操作である。そこで、まず、非対称単位に何分子が含まれているかを見積もる必要がある。ここでは、Matthews 係数から計算できる溶媒含有率を利用する。

Matthews 係数 V_m = 非対称単位の単位体積/(分子量×非対称単位中の分子数)

溶媒含有率 = $1 - 1.23 / V_m$

③ 分子置換法による位相決定

モデル分子の **pdb** ファイル(原子座標ファイル)を用意する。続いて、回転/並進の操作により、このモデル分子を非対称単位中にはめ込む。尚、非対称単位中に複数分子がある場合は、その数だけこれを繰り返す。

④ モデル構築

上記の結果をもとに目的分子の構造を作成する。このとき、目的分子のアミノ酸配列を指定すれば、側鎖を適当にモデリングしたものを作成してくれる。

⑤ 精密化

mtz ファイルと分子置換法で得た初期構造を用いて、構造の初期精密化を行う。 R 値(R factor)が十分に下がっているようであれば、さらに構造精密化を進めるために、**Coot** (<http://www.yasbl.york.ac.uk/~emsley/coot/>)を用いて視覚的に分子モデルを電子密度に合わせていく。あるいは、**CNS** (<http://bio.nagaokaut.ac.jp/~sakamoto/cns/main/frame.html>)による精密化計算を行う。

<構造精密化因子>

- ***R* 値**

R 因子とも呼ばれ、モデル構造の妥当性を表す値である。構築したモデルと実際の電子密度の差を表す。この値が 0 に近いほど電子密度マップとの一致を示す。タンパク質に代表されるような生体高分子では、25%より小さくなると構造の妥当性は高くなる。

- **free *R* 値**

精密化に用いるパラメーターが多すぎた場合や精密化計算の過程でアミノ酸残基を無理に繋げた場合は、構造が間違っているにもかかわらず見かけ上の *R* 値が良好になってしまうことがある。このような状況を避けるために、free *R* 値という指標を設けている。free *R* 値は、精密化によって偏りを受けない値を計算する。精密化過程では、free *R* 値が *R* 値の±5%以内に収まることが望ましいとされる。

<分子置換法を行うプログラム>

- **AMoRe**

分子置換法を行うための CCP4 内のプログラム。分子置換の操作において、各々自分で回転・並進などの出力結果を判断・選択し進めていく。

- **Molrep**

AMoRe よりも自動化されたプログラム。非対称単位中の分子数も自動的に判断し、最適解を出力する。Molrep は、相同性の低いものに対しては精度が良くないため、状況に応じて 2 つのプログラムを使い分ける必要がある。

<構造精密化を行うプログラム>

● REFMAC

CCP4 内にある精密化プログラム(<http://www.ysbl.york.ac.uk/~garib/refmac/>)。

このプログラムで温度因子の計算や ARP/wARP (<http://www.embl-hamburg.de/ARP/>)を用いた水分子の付加を行う。電子密度の計算もここで行い、 $|F_o|-|F_c|$ マップと $2|F_o|-|F_c|$ マップを含んだマップファイルを出力する。

● CNS (Crystallography & NMR System)

様々なインプットファイル(.inp)があり、各々を組み合わせで行う。CNS のホームページに inp ファイルの雛形がある。以下にいくつかファイルを示す。

- make_cv.inp

freeR フラグをつける。

- generate.inp

CNS の計算に必要な mtf ファイルの作成および pdb ファイルの出力を行う。

- rigid.inp

分子内の構造を全く変えずに、分子を剛体とみなし、剛体の位置を移動させて精密化を行う。分子内の結合距離や角度が変化しない。

- anneal.inp

系の温度を仮想的に高温高圧状況におき、徐々に冷ましていくことにより正しい位置に導いていく。

- minimize.inp

原子同士の相互作用のうち、結合に関与しない非結合作用(水素結合, Van der Waals 結合, 静電相互作用)が最小の歪みのエネルギーになるように原子位置の精密化を行う。

- bindividual.inp, bgroup.inp

個々の原子の温度因子(B-factor)を精密化する。(原子位置の変化はない)

- water_pickup.inp

自動的に余っている水分子と思われる電子密度に水分子を付加する。

• 2.2.5.4.6 電子密度図

回折データの反射強度と位相から構造因子が求まれば、電子密度を計算することができる。電子密度は、構造因子の逆フーリエ変換の関係にある。求めた電子密度をフーリエマップとして出力する(図 20)。

● $|F_o|-|F_c|$ マップ

$$\rho(x\ y\ z) = 1/V \sum (|F_{obs}|-|F_{calc}|) \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha(h\ k\ l)]$$

モデルが完全に正しいのであれば、 $|F_{obs}|-|F_{calc}|=0$ となり、このマップは生じない(図 20 の緑色と赤色のマップ)。 $|F_{obs}|-|F_{calc}|$ を係数として電子密度を計算することで、間違っている箇所が浮かび上がる。

● $2|F_o|-|F_c|$ マップ

$$\rho(x\ y\ z) = 1/V \sum (2|F_{obs}|-|F_{calc}|) \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha(h\ k\ l)]$$

$|F_o|$ マップと $|F_o|-|F_c|$ マップ合成の和である。このマップには、タンパク質がはまっているはずである(図 20 の青色のマップ)。ただし、モデルの PDB ファイルに引きずられて電子密度も多少は歪む。実際の分子モデリングでは、 $2|F_o|-|F_c|$ マップと $|F_o|-|F_c|$ マップを重ね合わせて出力し、修正を行っていく。

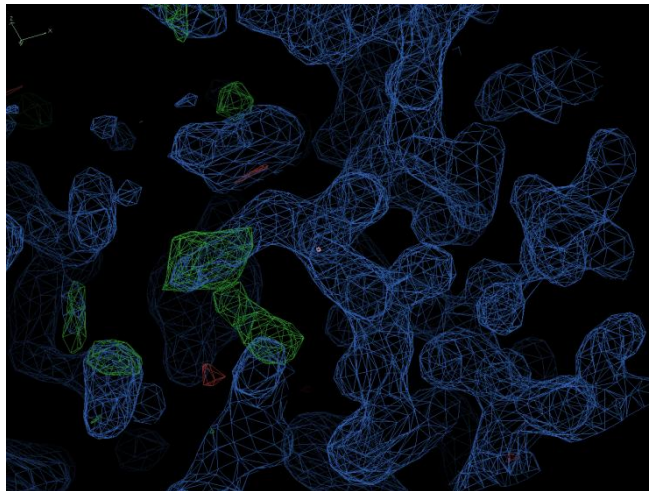


図 20. 計算された電子密度の例

<モデリングソフト>

代表的なものに、モデリングソフトの COOT がある(図 21)。COOT 上で PDB ファイルと mtz ファイルを読み込み、アミノ酸残基や水分子などが正しい電子密度に収まるように残基の修正や追加を行い、モデル構築を行っていく。COOT が持つモデリング機能は多様で、強力なフィッティング能力がある。

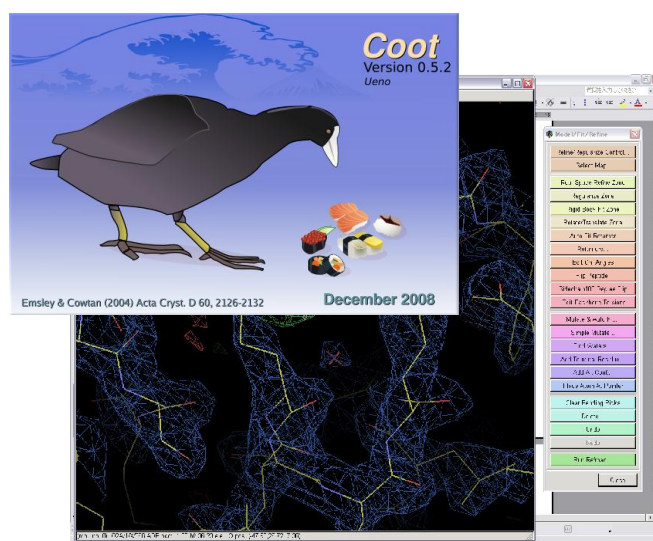


図 21. モデリングソフト COOT

・ 2.2.5.4.7 構造の検討

タンパク質を形成するアミノ酸残基の構造は、制限された範囲内に存在する。ペプチド結合を形成していく上で、他のアミノ酸のコンフォメーションを考慮しなければならない。ここで一つの指標となるものが、Ramachandran Plot (図 22) である。

Ramachandran Plotは、ペプチド結合面における結合角 Ψ : $C_{\alpha}-C$ と結合角 Φ : $C_{\alpha}-N$ が立体的に許容される範囲を図示したものである。縦軸に Ψ , 横軸に Φ をとる。赤色部分が許容領域になり、黄色部分が限界領域になる。許容範囲外にプロットされた残基については、結合角を修正する必要がある。

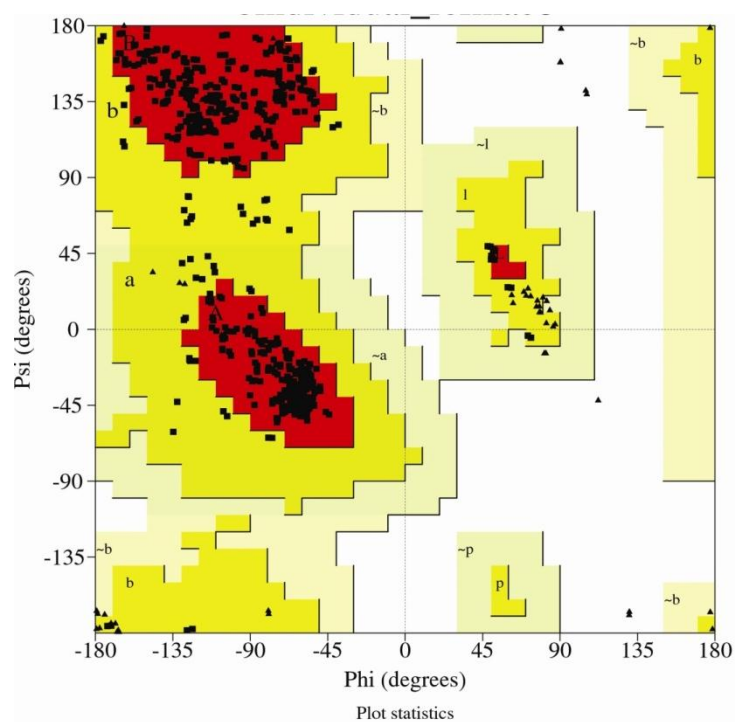


図 22. Ramachandran Plot

第三章 結果

3.1 *TtGuaB*

・ 3.1.1 タンパク質の大量発現および精製

大量発現では、発現ベクターpET-3a を宿主菌 Rosetta-gami 株に形質転換し、グルコースを添加した LB 培地にて IPTG 誘導を行った。以下に、HPLC による精製の手順、精製後のデータおよび SDS-PAGE の写真を示す(表 8-9, 図 23)。

Column & treatment	Buffer
Resource ISO 6 mL (疎水性相互作用)	50 mM NaPi (pH7.0), 0.90 M (NH ₄) ₂ SO ₄
HiPrep 26/10 Desalting 53 mL (脱塩)	20 mM Tris-HCl (pH8.0)
Resource Q 6 mL (イオン交換)	20 mM Tris-HCl (pH8.0)
HiPrep 26/10 Desalting 53 mL	20 mM Tris-HCl (pH8.0)
Hydroxyapatite CHT5 (ヒドロキシアパタイト)	10 mM NaPi (pH7.0), 150 mM NaCl
HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (ゲルろ過)	20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl

表 8. 精製の手順

<i>TtGuaB</i> (TTHA0432)	
M.W.	53,180
pI (等電点)	6.9
<i>E. coli</i> cells	14.3 g
Volume	6 L
Final Volume	2.5 mL
Concentration	4.35 mg/mL

表 9. 精製後のデータ

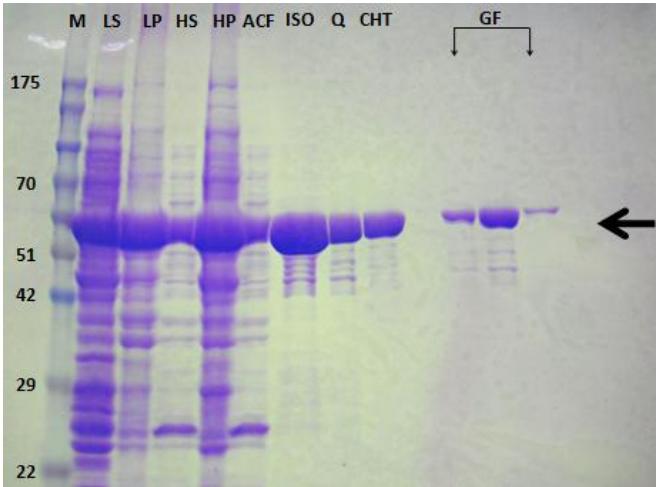


図 23. SDS-PAGE

・ 3.1.2 活性測定

精製したタンパク質が目的タンパク質か否か，また，目的タンパク質の生化学的な特性を調べるために活性測定を行った。

・ 3.1.2.1 KCl 濃度依存性

先行研究より，GuaB の触媒反応では KCl が基質として用いられていることが分かっている。そこで，KCl の濃度による酵素活性への影響の有無を調べた。様々な濃度の KCl を各々加えて反応させ，分光光度計を用いて，生成される NADH の吸光度を調べた。図 24 は，KCl 0 mM での吸光度を基準とし，各々の濃度での吸光度の相対的な値を計算し，それをグラフ化した相対活性図である。

図 24 より，KCl の濃度が 40 mM 付近のときに最大活性を示すことが分かった。

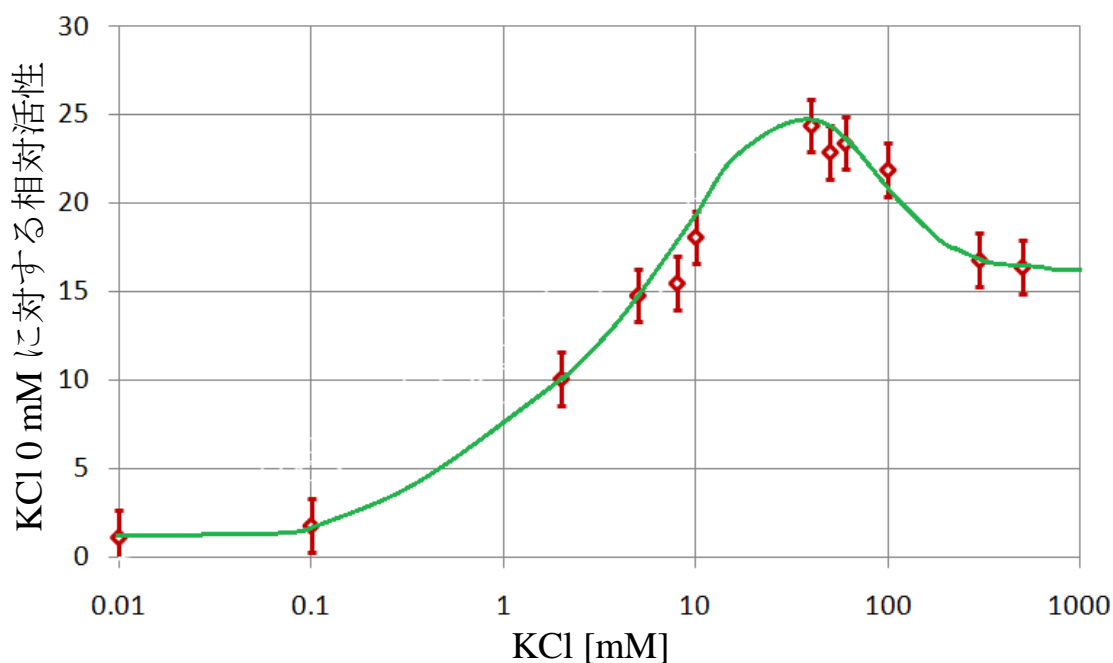


図 24. KCl 0 mM に対する相対活性図

・ 3.1.2.2 pH 依存性

一般的に、生体内の pH は 6.5～8.0 程度といわれている。これは、高度好熱菌においても同様のことが言えると考えられている。そこで、様々な pH 状況下で反応させ、各々の吸光度を調べた。図 25 は、pH 6.8 に対する相対活性図である。

図 25 より、pH 9.0 付近のときに最大活性を示すことが分かった。

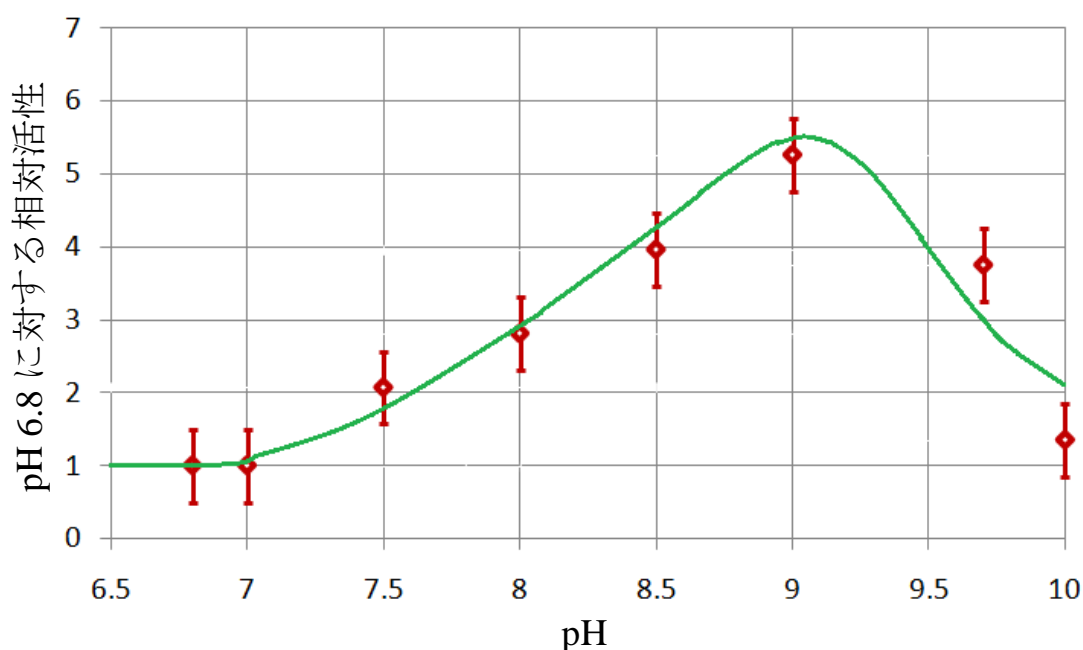


図 25. pH 6.8 に対する相対活性図

・ 3.1.2.3 フィードバック阻害

生物には、生体内の恒常性や多様性を支える仕組みが存在する。この仕組みの一つに、フィードバック阻害というものがある。これは、代謝系のある反応の触媒活性が、その生成物によって抑制される現象のことである。フィードバック阻害は、アロステリック効果の一種である。ここで、アロステリック効果とは、タンパク質の機能が基質以外の化合物の結合によって、立体構造の変化を伴って調節される効果のことである。以下に、GuaB が受けると考えられるフ

フィードバック阻害を示した(図 26)。

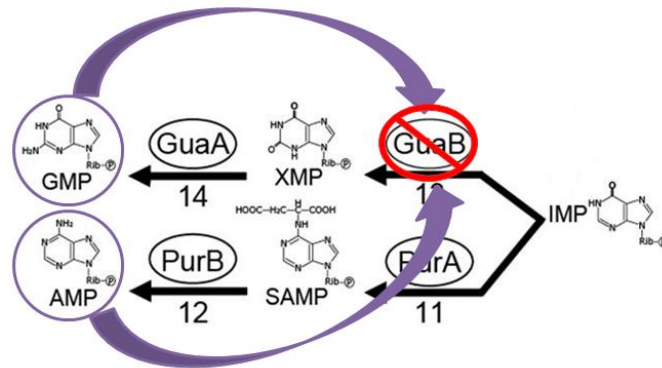


図 26. フィードバック阻害

図 26 より，GuaB は，最終生成物である GMP からフィードバック阻害を受けると考えられる。このことを証明するために，3.1.2.1 と同様にして様々な濃度の GMP での吸光度を調べた。また，もう一つの最終生成物である AMP からも阻害を受けるのかを，同様に調べた。図 27 は阻害剤 0 mM に対する GMP および AMP の相対活性図である。図 27 より，高濃度の AMP でも阻害効果はあるものの，GMP の方がより強い阻害効果があることが分かった。

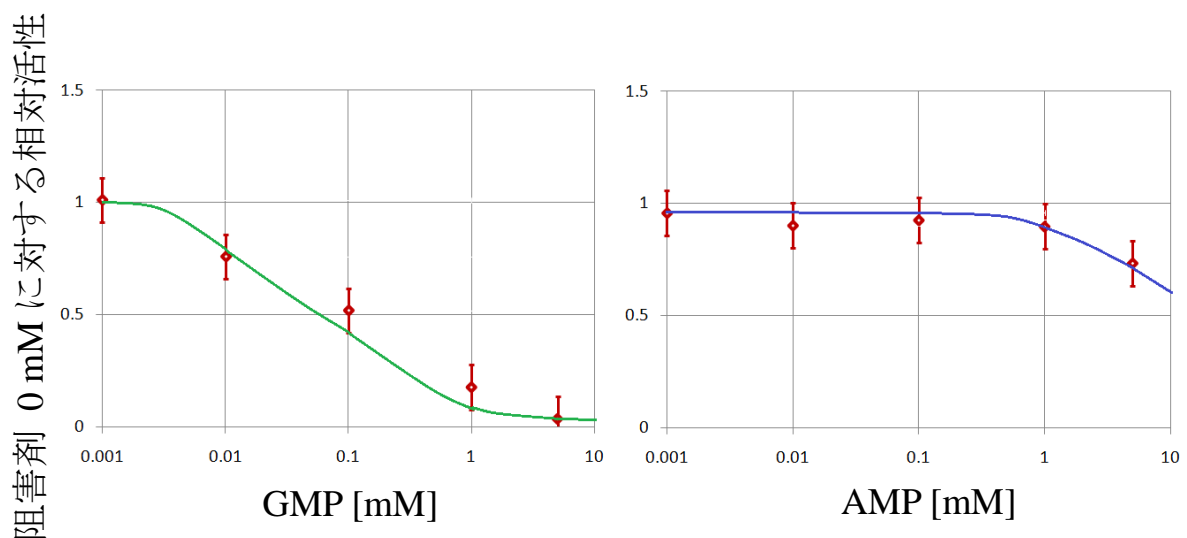


図 27. 阻害剤 0 mM に対する相対活性図

・ 3.1.3 結晶化

・ 3.1.3.1 結晶化サンプルの調製

結晶化用タンパク質溶液として、基質 IMP, NAD^+ , Cl^- の入ったものを調製した。その組成は、以下の通りである(表 10)。

	ストック濃度	最終濃度
<i>Tt</i> GuaB	$8.18 \times 10^{-5} \text{ M}$	$4.31 \times 10^{-5} \text{ M}$ (2.29 mg/mL)
IMP	$2.00 \times 10^{-2} \text{ M}$	$4.31 \times 10^{-3} \text{ M}$ (1.69 mg/mL)
NAD^+	$2.00 \times 10^{-2} \text{ M}$	$4.31 \times 10^{-3} \text{ M}$ (2.86 mg/mL)
KCl	$1.00 \times 10^{-1} \text{ M}$	$4.31 \times 10^{-3} \text{ M}$ (0.32 mg/mL)

表 10. 結晶化用タンパク質溶液

・ 3.1.3.2 ファーストスクリーニング

結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法(図 28)を用いて行った。結晶が確認できた結晶化条件と写真を以下に示す。

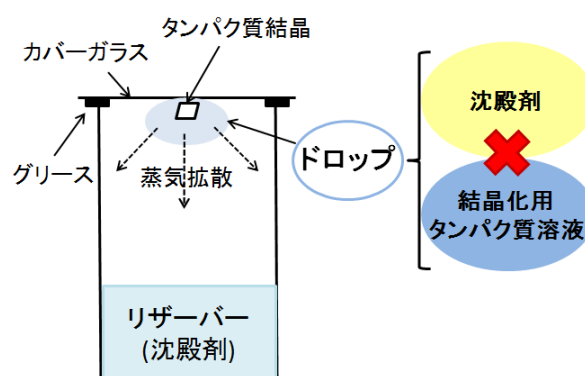


図 28. ハンギングドロップ蒸気拡散法

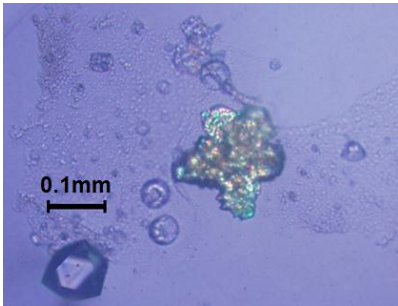
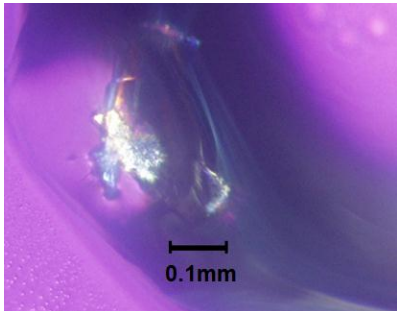
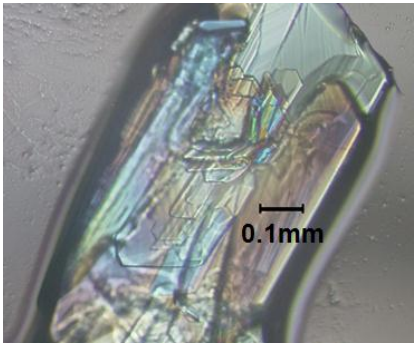
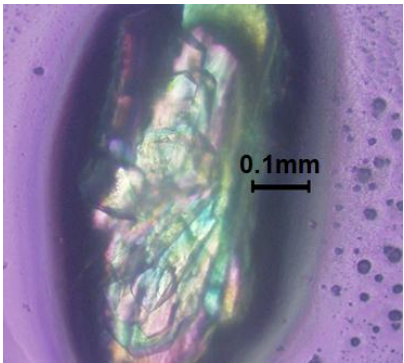
Cryo II No.8 35 % (v/v) 2-ethoxyethanol 0.1 M Na/K phosphate (pH 6.2) 0.2 M sodium chloride	
Cryo II No.41 50 % (v/v) ethylene glycol 0.02 M lithium sulfate 0.1 M HEPES (pH 7.5)	
Crystal Screen II No.41 1.0 M lithium sulfate monohydrate 0.01M Nickel (II) chloride hexahydrate 0.1M Tris-HCl (pH 8.5)	
Natrix No.1 2.0 M lithium sulfate monohydrate 0.01M Magnesium chloride hexahydrate 0.05M MES (pH 5.6)	

表 11. 結晶化条件

いくつかの結晶化条件にて結晶が得られた。しかし、析出までに約 6～12 ヶ月も有する上にドロップやリザーバーが枯渇した頃に現れるため、本当に目的タンパク質の結晶であるか否かは疑問である。このことを検証するために、結晶をループですくい、SDS-PAGE を行った。しかし、*TtGuaB* の分子量付近にバンドを確認することはできなかった（データ未提示）。この原因としては、チップやサンプルチューブなどの実験器具に結晶が付着してしまった可能性や、タンパク質の濃度が薄いという可能性なども考えられるが、いずれにせよ、再結晶化に向けて、より高濃度のタンパク質を再精製するという結論に至った。

また、得られた結晶が目的タンパク質の結晶か否かを確認するために、実際に X 線を照射してみることも考えられるが、今回は機会に恵まれず行うことができなかった。

・ 3.1.4 再精製

再度、大量発現を行った。以下に、そのデータを示す(表 12)。

<i>TtGuaB</i> (TTHA0432)	
<i>E. coli</i> cells	11.7 g
Volume	8 L

表 12. 再大量発現データ

精製に関しては、前回と同じ手順で行った(表 8 参照)。精製後は、通常、結晶化に向けて濃縮を行う。前回よりも高濃度のタンパク質を得るために、濃縮時間をより長くした。

ところが、濃縮の途中段階でアグリゲーション(凝集)を起こしてしまった。一

度アグリゲーションを起こしてしまうと、結晶化の際に結晶が非常に析出しにくいというのが先行研究より分かっている。それ故、アグリゲーションを引き起こさないよう気を配りながら、再度、精製を行うことにした。

また、結晶化はより純度の高いタンパク質を用いる方が成功しやすいということを、研究グループの教授の方々からアドバイスして頂いた。それ故、濃度を高めるだけでなく、より純度の高いタンパク質を得るために、新たな精製手順も検討することにした。

・ 3.1.5 再々精製

先行研究のデータをもとに、新たな精製手順を検討した。以下に、その手順を示す(表 13)。

Column & treatment
Resource PHE 6 mL (疎水性相互作用)
HiPrep 26/10 Desalting 53 mL (脱塩)
Resource Q 6 mL (イオン交換)
HiPrep 26/10 Desalting 53 mL
Hydroxyapatite CHT5 (ヒドロキシアパタイト)
Resource ISO 6 mL (疎水性相互作用)
HiPrep 26/10 Desalting 53 mL
Hydroxyapatite CHT5
HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (ゲルろ過)

表 13. 新たな精製の手順

しかし、HPLC に機械の不具合が生じてしまい、今年度中は精製をすることが不可能になってしまった。それ故、来年度以降、検討した手順で精製を行い、より純度の高いタンパク質が得られることを期待している。

3.2 *StPurC*

・ 3.2.1 タンパク質の大量発現と精製

StPurC は，理化学研究所播磨研究所の倉光先生の研究グループとの共同研究で，大量発現と精製を行って頂いた。

<i>StGuaB</i> (ST1493)	
M.W.	27,412
pI (等電点)	6.2

表 14. *StPurC* の分子量，等電点

・ 3.2.2 結晶化

結晶化は，蒸気拡散法を用いて行って頂いた。結晶が得られた結晶化条件を，以下に示す。

沈殿剤組成
0.1M Tris-HCl (pH 8.5)
45% PEG4000

表 15. 結晶化条件

・ 3.2.3 回折データの収集，処理

X 線回折実験および回折データ収集は，SPring-8 にて行って頂いた。HKL2000 を用いて測定したデータから sca ファイルを作成して頂いた。空間群は，C121 であった。C121 (単斜晶系)には，ブラベ格子による消滅則 $H + K = 2N$ がある。

また、格子定数は以下の通りである。

$StPurC$: $a = 73.776$, $b = 46.466$, $c = 221.081$, $\alpha = 90.000^\circ$, $\beta = 91.162^\circ$, $\gamma = 90.000^\circ$

表 16. $StPurC$ の格子定数

・ 3.2.4 MAD 法による位相決定およびモデル構築

重原子セレンの異常分散効果を用いた、MAD 法による位相決定をして頂いた。
 その後のモデル構築により、 $StPurC$ は二量体を形成していることが分かった。
 以下に、 $StPurC$ の二量体構造を示す(図 29)。

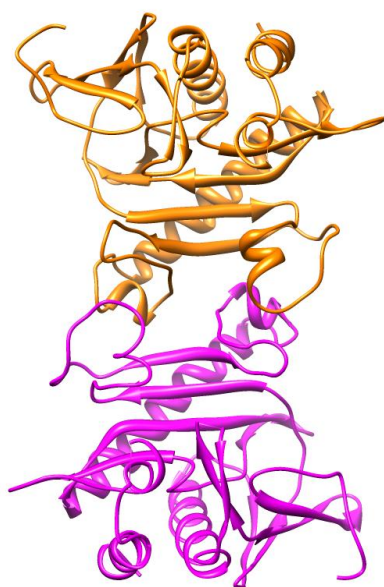


図 29. $StPurC$ の二量体構造

空間群	$C121$
格子定数	$a = 73.776$ $b = 46.466$ $c = 221.081$ $\alpha = 90.000^\circ$ $\beta = 91.162^\circ$ $\gamma = 90.000^\circ$
最大分解能 (\AA)	2.74
R 値 (%)	24.9
free R 値 (%)	30.6

表 17. 回折データと精密化状況

・ 3.2.5 構造精密化

現在、モデリングソフト Coot と REFMAC, CNS の計算を繰り返すことで、精密化を進めている。

・ 3.2.6 構造解析

・ 3.2.6.1 他生物種由来 PurC との構造比較

我々の研究グループで構造決定した *GkPurC*, *MjPurC* など、様々な生物種由来 PurC の立体構造が既に決定されていることが分かっている(表 4)。そこで、これらの構造と現時点での *StPurC* の構造とを比較した。以下に、いくつかの生物種由来 PurC の構造を示す(図 30)。尚、我々の研究グループで構造決定したものについては、赤字で示した。また、アデニンヌクレオチドを緑色、CAIR をシアン色で示した。

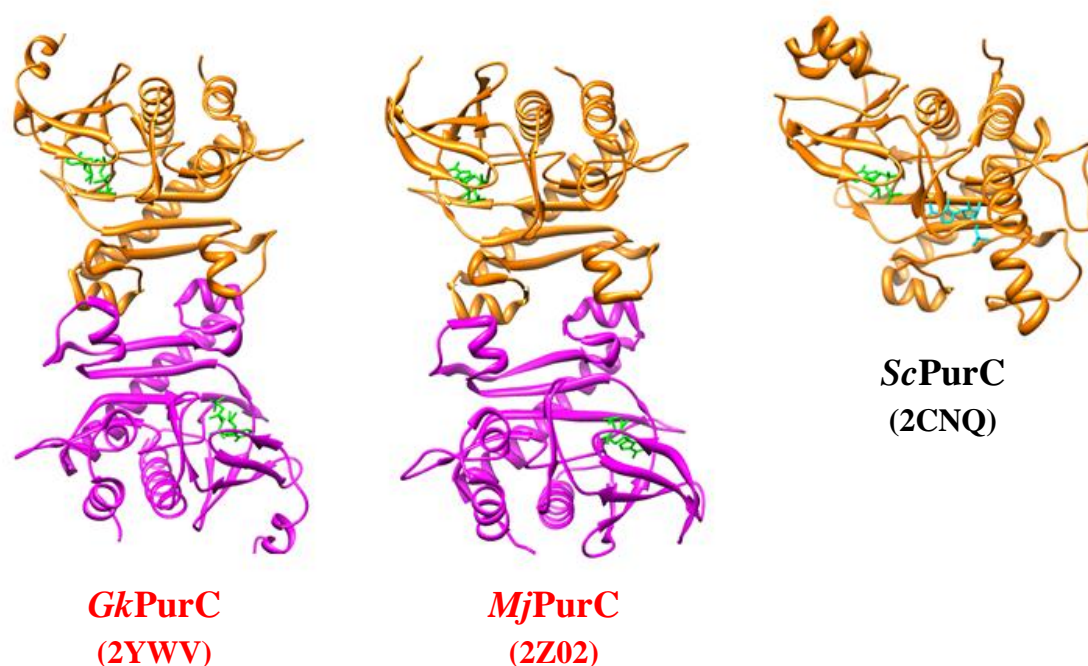


図 30. 他生物種由来 PurC の構造

Mycobacterium abscessus 由来 PurC (以下, *MaPurC*)を除いた原核生物由来の PurC は, いずれも二量体構造を形成していた。一方, *MaPurC* と真核生物である *Saccharomyces cerevisiae* 由来 PurC (以下, *ScPurC*)は, 単量体構造を形成していた。

・ 3.2.6.2 アミノ酸配列比較

立体構造と対応させて作成した ClustalW によるアミノ酸配列のマルチプルアライメントを以下に示す(図 31)。基質と結合するアミノ酸残基について, ATP と結合する残基を黄色, CAIR と結合する残基を赤色で示した。

全体的に, 基質結合部位におけるアミノ酸残基の保存性は高い。また, アミノ酸残基の挿入が単量体にのみ存在した。各々の挿入を青色, 灰色, 紫色の囲いで示した。さらに, フレキシブルループを構成する残基を黒色の囲いで示した。

StPurC	-----MEFLKLEGGKTKEVYAYDDS-HVLLKFKLSITAGDGA	36
TmPurC	-----MNY---EGTKIVKVTGD--YALLEFKDITAGDGL	31
GkPurC	-----MPTKQQLLYEGKAKKIYATDEPDVLWVEYKDSATAFNGE	41
CpPurC	-----SNAMVNQLEMLYEGKAKKIYATDKEDMVIHYKIDATAFNGE	42
EhPurC	MAHHHHHHMGTLEAQTQPGSMENK-EKIYEGKAKIIFATINPLEVIQHFKDEITAFNNK	59
MiPurC	-----MEIKLEIILKKQPLYSGKAKSIYEIDD-DKVLIEFRDITAGNGA	44
EcPurC	-----MQKQAELYRGKAKTVYSTENPDLLVLEFRNIT SAGDGA	38
ScPurC	-----XSITKTELDGILPLVARGKVRDIYEVDAGTLLFVAT-IRISAYDVI	45
MaPurC	-----GPGSMRPSLSD--YQHVASGKVRRLYRVDDHLLFVAT-IRISAFDFV	45
	**.: : : : *	
StPurC	RKDTLEGGKILNAQTS AFLFRLLSEKGIETHYIGMFD-----ER	75
TmPurC	KHDVLTGKSGICAEITTAIMKYLSEKGIKTHLVEYIP-----PR	70
GkPurC	KKATLAKGRLNNEISLLFLKLEAGIANHFIEKLS-----PT	80
CpPurC	KKAQIESKGVNNEITSLIFEMLNKEGIKTFVEKLN-----DR	81
EhPurC	KAATLHEKGLNNYISSFLMKKLIDKGIKTHFISLIN-----QR	98
MiPurC	KHDVQKQKGYLNALISKLFEALEENGVKTHYIKYTE-----PR	83
EcPurC	RIEQFDRKGMVNNKFNFFIMSKLAEAGIPTQMERLLS-----DT	77
ScPurC	MENSIPKGLILTKLSEFWFKFLSNDVRNHLDIAPGKTI FDYLPKLS EPKYKTQLDR	105
MaPurC	LDTEIPDKGRILTAMSVFFGILLT--VPNHLAGPP-----DDPRIPEEVLGR	90
	** : . : *	
StPurC	TMIKKKLMIPVEVVLNRIATGSIVKRLPIKE-----GEVFEPPIIEFFIKD	122
TmPurC	TLKVIPLKMFPLEVVRLLKAGSFVRRYGGAE-----GEDLPVPLVEFFIKD	117
GkPurC	EQLVRRVTIIPLEVVRNVVAGSFVRRYGGAE-----GTPLEAPLVEFYKKN	127
CpPurC	DQLCKKVEIPVLEVIVRNVAAGSMARLGLLE-----GYELKITVFELS YKD	128
EhPurC	EQLVKKITIIPIEVVIRNLAAGNSKRFQIAD-----GTPFKSPIIEFYKKN	145
MiPurC	YMIKKVEIPIEVIVRNIAAGSLCRRYPFEE-----GKELPPFIVQFDYKN	130
EcPurC	ECLVKKLDMVPVECVVRNRAAGSLVKRLGIEE-----GIELNPPLFDLFLKN	124
ScPurC	SLLVHKKHIIPIEVIVRGYITGSANKEYVKTGTIVHGLKQPGGLKESQEFPEPIFTPSKA	165
MaPurC	ALLVRRILDLPVECVARGYLTSGLLDYQRTGAVCGHVLPQGLGEASRLDPPLFTPATKA	150
	.:*:* : * : *	
StPurC	DERHDPMLNYHMEYLKLMTRKEAEKIEIIMLKVNEILYPFRSKKLLLYDFKLEFGRVN	182
TmPurC	DERHDPMVCVDHLEILGIATKKQAEKMKEA AVKITLALKEFFERANFELWDIKYEFGLDK	177
GkPurC	DDLGDPLILLEDHI FILKLASREEVAALKQAALAVNDVRLHLFAERNVRLIDFKLEFGRTA	187
CpPurC	DSLGDPLINDYHAVGIGATTFFELNKIYEITAKVNEILKEAFKKQINILIDFKLEFGRY	187
EhPurC	DELSDPMVSEGHILSFQWLINQELKIKILSLKINNILSELFNVGIKLVDFKLEFGKLH	205
MiPurC	DEYGDPMINEDIAVALGLATREE LNKIKEIALKVNEVLKLLFDEKGIILVDFKIEIGKDR	190
EcPurC	DAMHDPMVNESYCETFGWVSKENLARMKELTYKANDVLKLLFDDAGLILVDFKLEFGLYK	184
ScPurC	-EQGEHDENISPAQAAELVGEDLSRRVAELAVKLYSKCKDYAKEKGI IIAADTKFEGFIDE	224
MaPurC	D-IGEHIMNVDFAAVVGLVGAVRANQLRDETIKIYTRAAAHALHKGI ILADTKFEGVDI	209
	: : : : *	
StPurC	D---KLIIGDELTLDSMRREE-----GSGRILDKDLYRKDL-----E	213
TmPurC	DG---NVVLGEIISPDTRLRKK-----GE--IFDKDVYRRDL-----	207
GkPurC	DG---AILLADEISPDTCRLWDA-----KTNEKLDKDVFRDL-----	219
CpPurC	NG---EILLADEISPDTCRFWDA-----TTGEKMDKDRFRRLM-----	219
EhPurC	NDEQSDFLADEISPDTCRLWDI-----STNKRLDKDRYRLNL-----	240
MiPurC	EG---NLLVADDEISPDTRMLWDK-----ETRDVLDKDVFRDL-----	222
EcPurC	G---EVVLGEIISPDGSRRLWDK-----ETLEKMDKDRFRQSL-----	215
ScPurC	KTN-EIILVDVLTDPDSSRFWNCASYKVGESQDSYDKQFLRDWLTAN-KINGVNGVKMPQ	278
MaPurC	EG---NLVLADVFTPDSSRYWDNAHYQPGVQDSFQKQFVRNWLTPGESGWDRASTPP	267
	: . : : : * * : ** : * :	
StPurC	TVKKAYEEFFKRISE-----	232
TmPurC	-GDPLKKYREVLELCRSLNSQ-----	230
GkPurC	-GSLTDAYEVILQRLGGSACTK-----	244
CpPurC	-GNVINGYREVILNRLRN-----	238
EhPurC	-GNVIEGYREVAHKINAI PNL-----	263
MiPurC	-GDVIKAYRIVAERLGLL-----	242
EcPurC	-GGLIEAYEAVARRIGVQLD-----	237
ScPurC	DIVDRTRAKYIEAYETLTGSKWSH-----	306
MaPurC	PLPDEVAVATRERYIEAYERISGLSFSDWIGPSA	301

図 31. アミノ酸配列比較

・ 3.2.6.3 基質結合部位の特定

今回、我々が構造精密化および構造解析を行っている *StPurC* の構造は、アポ体(基質が結合していないもの)である。それ故、基質がどの位置でどのように結合するかは分からない。そこで、基質と結合している他生物由来 *PurC* の構造との構造比較を行い、*StPurC* の基質結合部位を特定することを試みた。

・ 3.2.6.3.1 ATP 結合部位

図 31 で、黄色で示した保存残基のコホメーションを各々示し比較した。

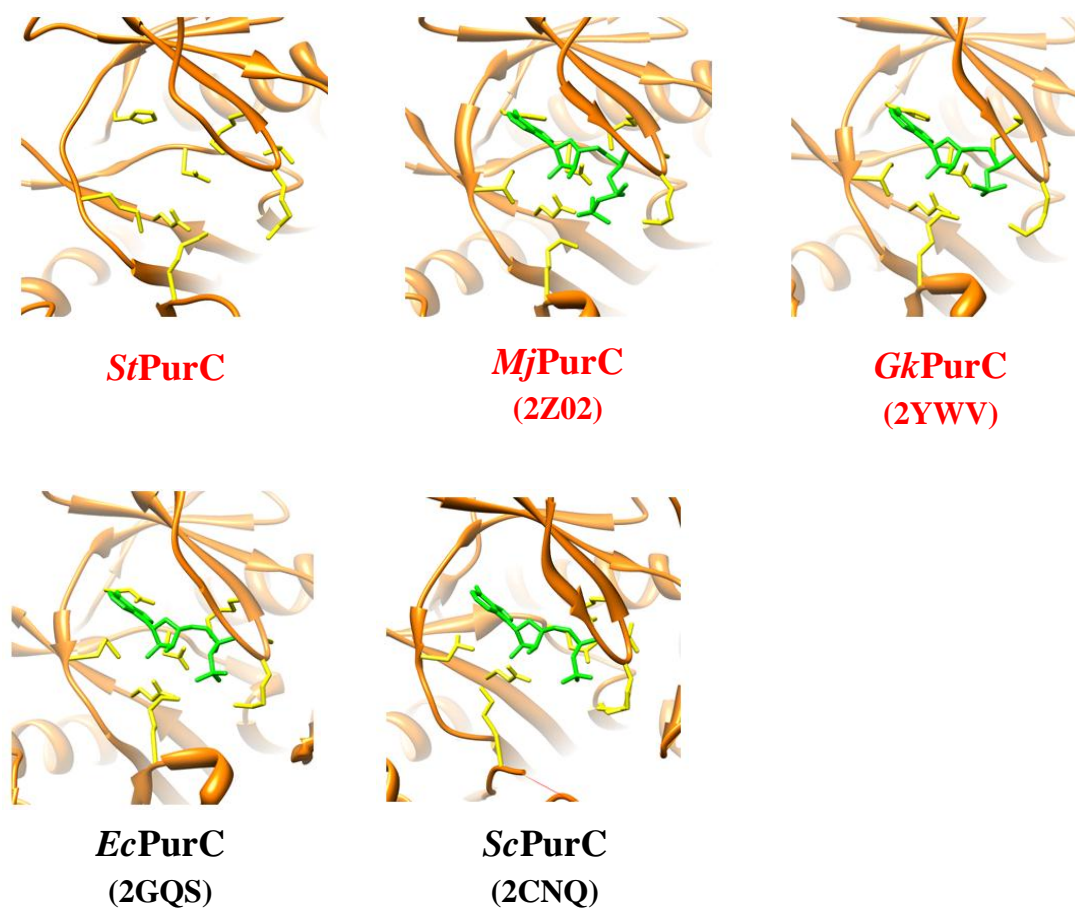


図 32. アデニンヌクレオチドと結合する保存残基のコホメーション比較

・ 3.2.6.3.3 単量体との差異

アミノ酸残基の挿入部分の構造を、図 31 で示した色で表現した(図 34)。挿入残基数が完全に一致している箇所は、灰色と紫色の 2 ヶ所であった。

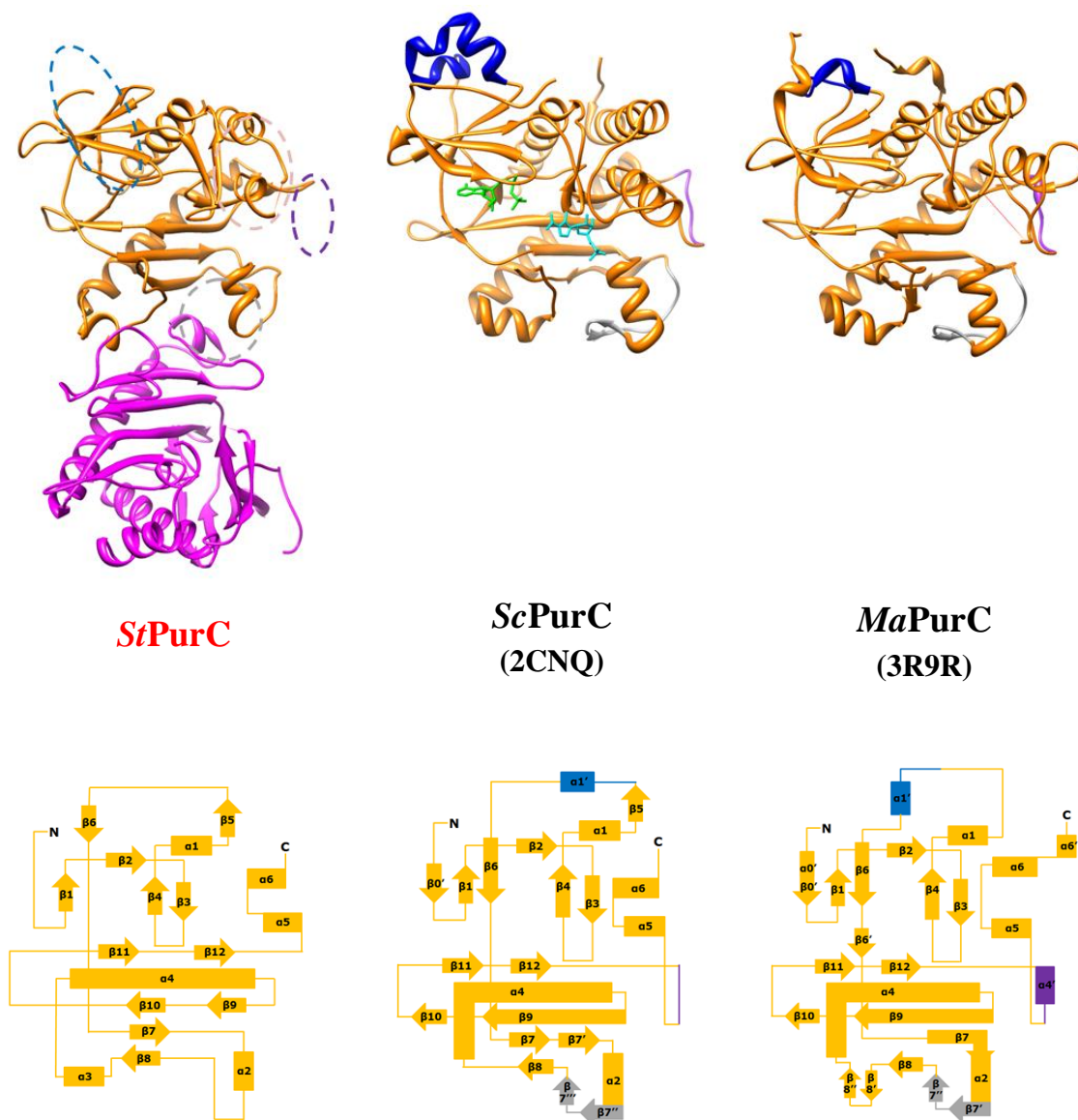


図 34. 単量体との構造比較

第四章 考察

4.1 *TtGuaB*

・ 4.1.1 活性測定

・ 4.1.1.1 KCl 濃度依存性

図 24 より, KCl の濃度が 40 mM 付近のときに最大活性を示すことが分かった。ここで, 生体内における KCl 濃度は 100~150 mM である。この約 25% の差は, 以下のことを示しているのではないかと考えている。それは, *TtGuaB* の触媒反応では, 生理的な濃度以上は KCl を要求しないということである。

KCl は, 生体内における様々な生体反応で利用されている。それ故, 不足してしまうと反応が進まなくなってしまう, 生命活動にまで支障をきたしてしまう。このことを防ぐために, 生理的な濃度以上は要求しないのではないかと考えている。

・ 4.1.1.2 pH 依存性

図 25 より, pH 9.0 付近のときに最大活性を示すことが分かった。一般的に, 生体内の pH は 6.5~8.0 程度といわれている。生体内の pH と違いが生じる要因として, 以下のことを候補に挙げている。それは, 活性中心の状態が pH 9.0 付近ということである。

ここで, *GuaB* の触媒残基はシステインであると予想されている (4)。システインの電離の仕方は次の通りである(図 35)。

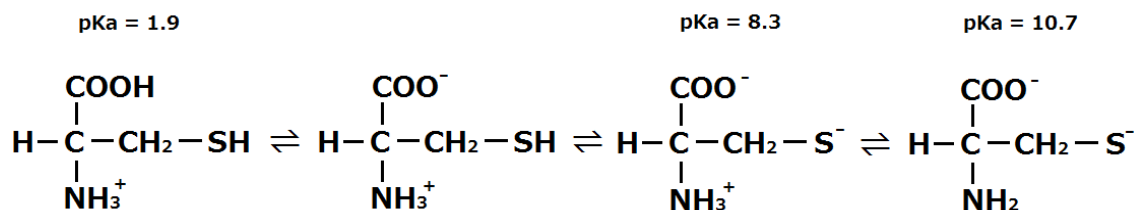


図 35. システインの電離

システインのチオール基の pKa は 8.37 であるため、pH 9.0 付近では S^- が優位となる。 S^- は反応性に富むため、IMP の C2 位置に求核攻撃するという可能性があると考えている(図 36) (4)。それ故、pH 9.0 付近のときに GuaB は最大活性を示すと予測している。

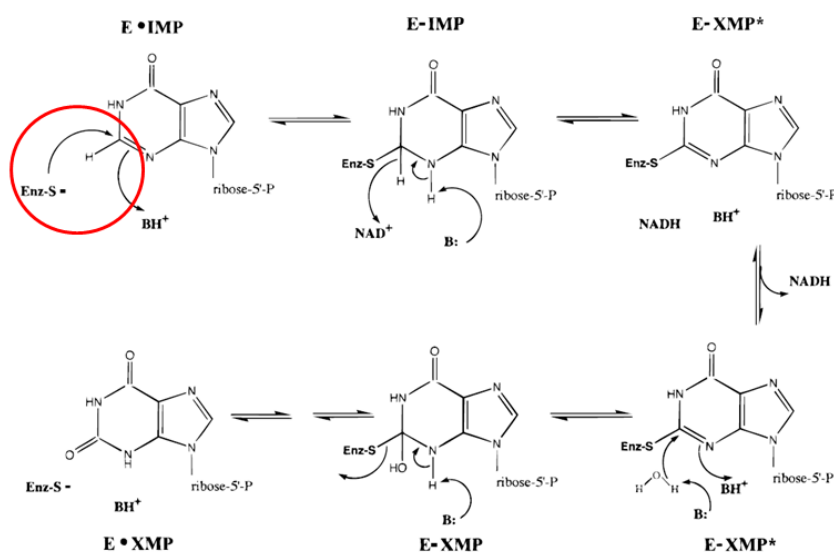


図 36. GuaB の反応メカニズム

・ 4.1.1.3 フィードバック阻害

図 27 より、高濃度の AMP でも阻害効果はあるものの、GMPの方がより強い阻害効果があることが分かった。ここで、生体内における GMP および AMP の

濃度は、約 0.1~0.2 mM である。それ故、GMP が GuaB に対し阻害剤として働くことが示唆される。

・ 4.1.2 結晶化(ファーストスクリーニング)

いくつかの結晶化条件にて結晶が得られた。しかし、析出までに約 6~12 ヶ月もかかってしまった。この要因として、以下のことを候補に挙げている。それは、ドロップ中のタンパク質濃度が低いということである。これは、結晶が、ドロップやリザーバーが枯渇した頃に現れたという結果から推測できるだろう。このことを解決するためには、より高濃度のタンパク質を用いることが必須であると考えている。あるいは、結晶を保護・観察する作業の際により高温の下で保管するなどの改善を加えて、蒸気拡散の速度を上げることも行う必要があると考えている。

また、結晶化はより高純度のタンパク質を用いる方が成功しやすいということを、研究グループの教授の方々からアドバイスして頂いた。それ故、濃度を高めるだけでなく、より純度の高いタンパク質を得るために、新たな精製手順も検討することにした。

・ 4.1.3 再精製

再結晶化のために再精製を行ったが、その後の濃縮作業の途中段階でアグリゲーションを起こしてしまった。この要因として、以下のことを候補に挙げている。それは、超遠心を一度に長時間行ったことである。濃縮は、超遠心機を用いて行う作業である。遠心中は、多少ではあるが溶液中の濃度にムラが生じると考えている。それ故、部分的に高濃度になってしまい、アグリゲーション

が起こったと考えている。今後は、「短時間での超遠心」を繰り返して濃縮作業を進めていきたい。

4.2 *StPurC*

・ 4.2.1 単量体との差異

単量体との構造比較から、灰色の挿入部分は二量体形成を妨げているということが示唆された。また、紫色の挿入部分は、溶媒による触媒反応の影響を防ぐ働きがあると考えている。

・ 4.2.2 反応メカニズム

PurC は、adenylosuccinate synthetase (PurA) と触媒反応が似ている(図 37)。そのため、現在、PurA との反応類似性についても調査を進めている。

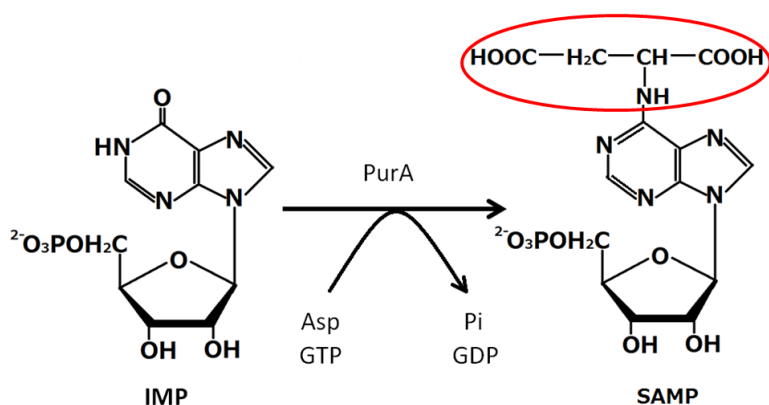


図 37. PurA の反応

参考文献

- (1) Vladimir M Levdikov *et al.*, *Structure*, **6**, 363-376 (1998)

- (2) Rongguang Zhang *et al.*, *Acta Cryst.*, F, **62**, 335-339 (2006)

- (3) Nathaniel D. Ginder *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 20680-20688 (2006)

- (4) Fiona M. McMillan *et al.*, *Biochemistry*, **39**, 4533-4542 (2000)

- (5) 構造生物学-ポストゲノム時代のタンパク質研究
倉光成紀・杉山政則 編

- (6) タンパク質の X 線結晶構造解析法
J.ドレント 著
竹中章朗・勝部幸輝・笹田義夫 訳

- (7) これならわかる X 線結晶構造解析
安岡則武 著

謝辞

本研究を行うにあたって、X 線結晶構造解析の知識および技術を詳しく享受して下さいました千葉工業大学の河合剛太教授，高輝度光化学研究センター (JASRI) の馬場清喜博士に厚く御礼申し上げます。研究を行うにあたって，お世話になりました鷺尾浩伸氏および千葉工業大学河合研究室のみなさまに大変感謝しております。また，実験や輪講などでお世話になった三瓶研究室のみなさまにも感謝しております。

最後に，三年間にわたり研究のご指導から論文の執筆のご指導頂き，お世話になりました三瓶厳一講師には心から感謝しております。