

LLIP 法による磁場中結晶化リゾチームの X 線構造解析

X-ray Structural Analysis of Crystallized Lysozyme under Magnetic Field by LLIP Method

横国大院工 岡部 俊也, 〇山本 勲

Yokohama Nat'l Univ., T. Okabe and I. Yamamoto

E-mail: okabe-toshiya-kp@ynu.jp

LLIP 法は互いに可溶な良溶媒および貧溶媒で界面を形成し、これら二液の相互拡散によって過飽和を創り出すことで結晶を得る結晶化手法である。我々はこれまでに、結晶化剤に常磁性の  $\text{CoCl}_2$  を使用し、勾配磁場中で鶏卵白リゾチームの結晶化を行うと、磁気力の効果により結晶のサイズが増大することを報告した[1]。本稿ではこの巨大化したリゾチーム結晶、さらに異なる結晶化剤  $\text{NiCl}_2$  を用いて作製したリゾチーム結晶の X 線構造解析を行い、結晶品質の評価を行った。

反応容器に結晶化剤溶液（40 wt.% PEG4000 水溶液と 1.2 M の  $\text{CoCl}_2$  あるいは  $\text{NiCl}_2$  水溶液、TAE 緩衝液の混合物）100  $\mu\text{L}$  の上に、タンパク質溶液（リゾチーム水溶液（100 mg/mL）と TAE 緩衝液の混合物）を 50  $\mu\text{L}$  静かに重層し、パラフィルムで密閉した。反応容器を無磁場、水平均一磁場（ $B = 13.0 \text{ T}$ ,  $BdB/dz = 0$ ）、水平勾配磁場（ $B = 9.1 \text{ T}$ ,  $BdB/dz = -588 \text{ T}^2/\text{m}$ ）に静置した。作製した結晶を XtaLAB PRO、CrysAlisPro（共にリガク製）あるいは CCP4 を用いて、X 線回折実験および構造解析を行った。

$\text{CoCl}_2$  または  $\text{NiCl}_2$  を結晶化剤として無／勾配磁場で作製した結晶の X 線回折データを表 1 に示した。 $\text{CoCl}_2$  を使用した場合は正方晶系、 $\text{NiCl}_2$  を使用した場合は斜方晶系の結晶が析出し、全ての結晶化条件において 2.00 Å の分解能を得ることができた。R-merge や Mosaicity、Completeness についても低下なく、結晶のサイズが増大した。結晶体積と R-merge の関係を図 1 に示した。結晶化剤に  $\text{CoCl}_2$  を使用して勾配磁場中で作製した結晶（◆）は、無磁場（+）と同程度の値を持ち、なおかつ、結晶の体積が 10 倍以上の結晶を得ることができた。しかし、体積の大きな結晶では無磁場に比べて大きな R-merge を持つ劣化結晶が多かった。一方で  $\text{NiCl}_2$  を結晶化剤として使用した場合は  $\text{CoCl}_2$  に比べて大きな R-merge を持つ劣化結晶は少なかった。結論として適切な常磁性塩を結晶化剤として使用することで、品質の劣化なく結晶の 10 倍以上の巨大化を実現した。

表 1. X 線回折データ (CuK $\alpha$ )

| Precipitation agent<br>(magnetic condition) | Co<br>(non)     | Co<br>(mag) | Ni<br>(non)  | Ni<br>(mag)  |
|---------------------------------------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|
| Crystal volume [ $\text{mm}^3$ ]            | 0.002           | 0.041       | 0.004        | 0.015        |
| Space group                                 | $P4_32_12$      | $P4_32_12$  | $P2_12_12_1$ | $P2_12_12_1$ |
| a [Å]                                       | 77.24           | 77.38       | 36.86        | 36.90        |
| b [Å]                                       | 77.24           | 77.38       | 77.68        | 77.85        |
| c [Å]                                       | 37.22           | 37.45       | 80.15        | 80.29        |
| V [Å <sup>3</sup> ]                         | 222,000         | 224,200     | 229,500      | 230,600      |
| Resolution range [Å]                        | infinity ~ 2.00 |             |              |              |
| R-merge [%]                                 | 5.5             | 5.5         | 5.2          | 5.7          |
| Mosaicity [deg]                             | 0.75            | 0.86        | 0.66         | 0.67         |
| Completeness [%]                            | 99.2            | 95.5        | 98.7         | 98.7         |

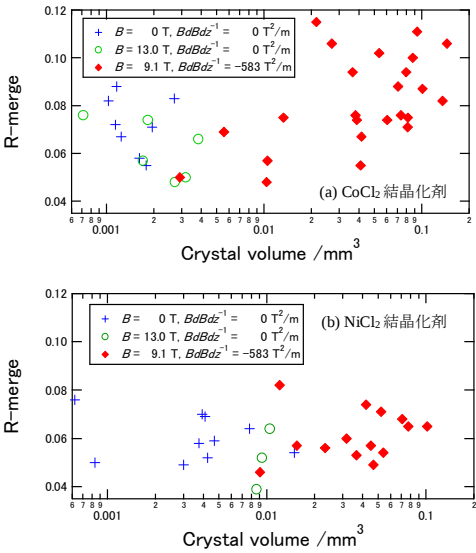


図 1. 結晶体積と R-merge の関係

謝辞：本研究は JPSJ 科研費（16K04946）助成を受けて行った。  
また、横浜国立大学機器分析評価センターの機器を使用した。

参考文献： [1] T. Okabe *et al.*, The 79th JSAP Autumn Meeting, 20a-431b-4 (2018).