

 MLF Experimental Report	提出日 Date of Report
課題番号 Project No. 2010AX0004 実験課題名 Title of experiment ナガガジ由来の高活性型不凍タンパク質の中性子構造解析 実験責任者名 Name of principal investigator 大原 高志 所属 Affiliation 原子力機構 量子ビーム応用研究部門	装置責任者 Name of responsible person 田中 伊知朗 装置名 Name of Instrument/(BL No.) BL03 iBIX 実施日 Date of Experiment 2010.6.8 – 2010.6.26

試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、結論等を、記述して下さい。(適宜、図表添付のこと)
 Please report your samples, experimental method and results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

<p>1. 試料 Name of sample(s) and chemical formula, or compositions including physical form.</p> <p>不凍タンパク質(AFP)は生体内で氷の表面に結合することで氷結晶の成長を抑制し、体液の凝固点を下げる働きを持つタンパク質であり、冷凍技術向上という視点での産業応用が期待されている。北海道沿岸に生息するナガガジの体内では多数の3型AFP(nfeAFP)のアイソフォームが発現しており、これらはSP型およびQAE型に分類される。どちらも氷表面に結合する機能は有するが、氷結晶の成長を抑制する能力はQAE型の方がはるかに高い。本実験ではnfeAFPの氷結晶成長抑制機能に対する水和水の役割を明らかにするため、既に大型結晶が得られているSP型のnfeAFPの中性子構造解析をiBIXにて試みた。</p>
--

<p>2. 実験方法及び結果 (実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。)</p> <p>Experimental method and results. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.</p> <p>本研究では110Kという低温条件下でのnfeAFP結晶の中性子回折測定を試みた。そこで、測定に先立って結晶の低温測定条件の検討を行った。一般的にタンパク質の低温X線回折測定では、結晶を抗凍結剤に浸漬した後、液体窒素や低温窒素気流で急冷することで試料結晶を冷却する。中性子回折測定で用いる結晶はX線に比べて大きいので、抗凍結剤への浸漬時間を長くする必要がある。しかし、nfeAFPの結晶ではX線回折測定で抗凍結剤として用いていた30%グリセロール溶液に結晶を数時間浸漬したところ、明らかな結晶の劣化が目視で確認された。そこで、nfeAFP6の大型結晶を量産した上で、結晶の劣化を引き起こさない抗凍結剤の探索を行うと共に、抗凍結剤の濃度や浸漬時間の調整を行った。その結果、グリセロールとは異なる抗凍結剤Aの濃度を5%から15%まで段階的に上げた溶液に、nfeAFP6結晶を数時間ずつ浸漬することで、回折能を保ったまま試料結晶を低温にできることが明らかとなった。なお、これらの条件検討は、様々な条件で抗凍結剤溶液に浸漬させたnfeAFP6の大型結晶を液体窒素で急冷し、実験室系のX線回折計で回折能を測定することで行った。</p>
--

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)

上述の通り低温測定条件を調整したnfeAFPの単結晶について、iBIXにて110Kで中性子回折測定を行った。抗凍結剤溶液に浸漬させた試料結晶をナイロンループ付きピンですくい取り、液体窒素で急冷した後、低温X線回折測定用マウントツールを用いて結晶をiBIX上にマウントした。その際の試料結晶の写真を図1に示す。測定は1stフレーム(1.5~5.5Å)と2ndフレーム(4.0~8.0Å)に分けて行い、1stフレームでは11時間露光の測定を20セット、2ndフレームでは1.5時間露光の測定を32セット行った。合計の全測定時間は15日間であった。回折測定の結果、1stフレームにおいては低角~中角の検出器で図2(a)に示すようなはっきりしたブラッグ反射を観察できたが、高角の検出器でははっきりしたブラッグ反射を観察することは出来なかった。また、2ndフレームにおいては低角~高角の検出器で図2(b)に示すようなはっきりしたブラッグ反射を観察できた。

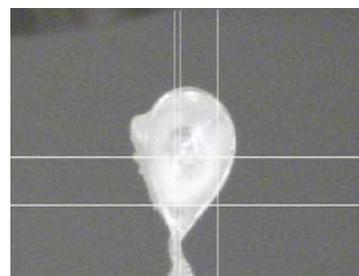


図1 iBIXにマウントしたnfeAFP単結晶

上述のiBIXでの低温測定で得られたnfeAFPの回折データに対し、iBIX用データ処理ソフトSTARGazerを用いた処理を行った。その結果、結晶格子については空間群C222₁、格子定数a=71.65Å、b=108.25Å、c=38.04Åという値が得られた。また、d-spacingで100~2.5Åの範囲のブラッグ反射に対して積分強度を抽出したところ、全反射数16690個、独立反射数5048個、completeness=93%、Rmerge=0.297(I>σ(I))となった。

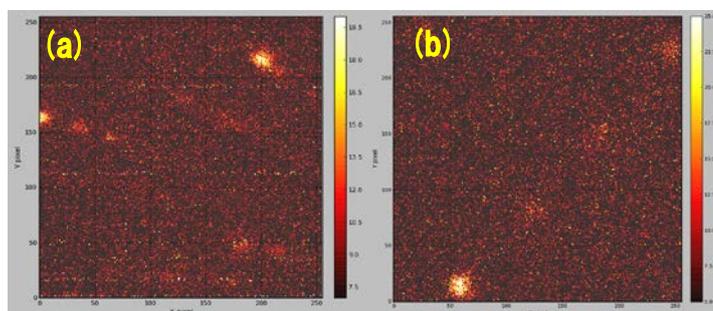


図2 iBIXで観察したnfeAFP6単結晶の中性子回折パターン (a)2θ=72°に設置した検出器で、1stフレームでの測定によって得られた回折パターンの一部 (b)2θ=120°に設置した検出器で、2ndフレームでの測定によって得られた回折パターンの一部

STARGazerによって得られた積分強度データとX線による構造データを用いて原子核散乱長密度分布を計算したところ、これまでに図3で示すような密度分布図が得られている。nfeAFP6分子の主鎖についてはほぼトレースできているが、側鎖については観察できていない部分もあり、積分強度データの精度を向上させる必要があると思われる。

本研究ではナガガジ由来の不凍タンパク質nfeAFPのSP型について、iBIXを用いて大型単結晶での低温中性子回折測定を行い、フルデータを測定することに成功した。ただ、UB行列の決定や積分強度データの精度についてはまだまだ向上の余地があり、装置グループの早急な対応を期待するとともに、中性子源の早期の高強度化を期待したい。また、今後は氷結晶成長阻害活性の高いQAE型に属するnfeAFPの中性子回折測定を行うことで、不凍タンパク質の氷結晶成長阻害活性に対する水と水の役割を解明したい。

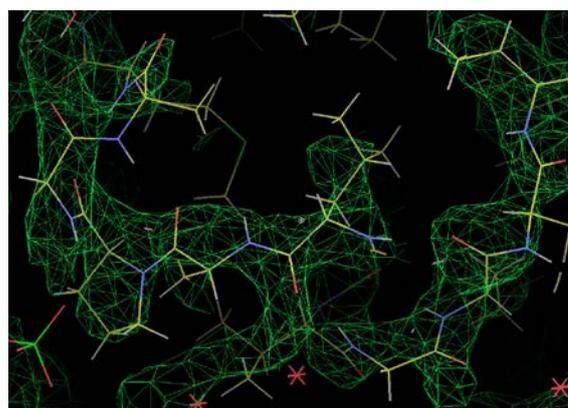


図3 iBIXでの中性子回折データから得られたnfeAFP6の原子核散乱長密度分布