

 MLF Experimental Report	提出日 Date of Report 2013.6.7
課題番号 Project No. 2012PX0002 実験課題名 Title of experiment タンパク質と基質／阻害剤復剛体の中性子結晶構造解析 実験責任者名 Name of principal investigator 山田太郎 所属 Affiliation 茨城大学	装置責任者 Name of responsible person 田中伊知朗 装置名 Name of Instrument/(BL No.) iBIX BL03 実施日 Date of Experiment 2012.12.23 2013.02.18

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.

1. 試料 Name of sample(s) and chemical formula, or compositions including physical form.
ヒト α -トロンピン-ビバリルジン複合体結晶 pD7.9

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。)
Experimental method and results. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.
<p>初期タンパク質濃度 20mg/mL, 初期濃度 8%w/v PEG4,000, 100mM HEPES pH7.5, 0.5M NaCl, 6mM Ca(CH₃COO)₂の400uLのドロップ溶液に対し16%w/v PEG4,000, 100mM HEPES pH7.5, 0.5M NaClのリザーバー溶液 50mL を使用して 20°Cで結晶化を行った。1ヶ月後結晶の成長を促進するため、50%w/v PEG4,000 溶液 2mL をリザーバー溶液に加えてさらに2ヶ月放置した。最終的に 3.0 mm x 2.8 mm x 0.5 mm の透明性の高い良好な結晶を得ることができた。次にこの結晶について重水ソーキングを行った。結晶を損傷しないようあらかじめ別の結晶でソーキングのテストしたところ 50%の重水溶液に一度ソークしてから 100%の重水溶液に移すと損傷が少なかったため、この手順でソーキングを行った。しかし 50%の重水溶液にソーキングした時点で結晶に亀裂が入り 100%重水溶液にソークしたことでさらに亀裂が広がった。この結晶の品質を加速器出力 300kW の中性子ビームを BL03 iBIX により確認した。パルス中性子の波長帯は 3~7Åを選択し6時間照射した。図1に示すようにすくなくとも3つの結晶ドメインからの反射が同じ時間に別々の場所で観測されたため、指数付けや強度積分が不可能と判断した。しかし個々のピークは明瞭であることから、それぞれのドメインの結晶性は良好であると考えられる。今後は重水ソーキングを中止して初めから重水中での結晶化を行うことも検討する必要がある。</p>

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

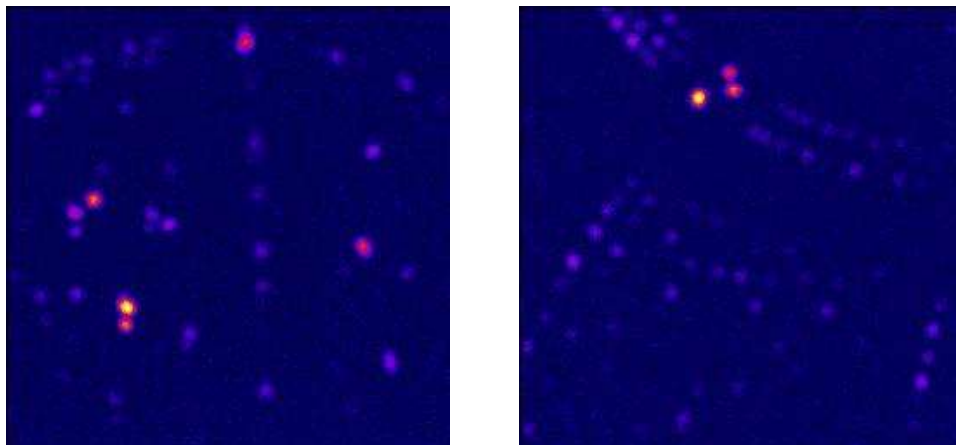


図1 iBIXにより得られた重水ソーキング後の α -トロニン-ビバリルジン複合体結晶の TOF ラウエ回折像 (左: 検出器#8 $2\theta=20.3^\circ$, 右: 検出器#24 $2\theta=31.0^\circ$)

次に、上記と同様の結晶化条件で得られた結晶を繰り返し新しい結晶化溶液に移し、結晶を成長させた(マクロシーディング法)。新しい結晶化溶液に移す際にやはり結晶に損傷が起こり、最終的に得られた結晶は上記のものとは比べると透明度が低い。しかし、この結晶を100%の重水溶液にソーキングしてもほとんど外観は変化しなかった。この結晶についても加速器出力300kW運転時にiBIXによる回折実験を行った。パルス中性子の波長帯は3~7Åである。図2に8時間の中性子ビーム照射を行って得られたTOF回折像を示す。回折斑点は空間的に広がっておらず、多数の反射が観測されている。目視での分解能はおおよそ2.2Åであり、指数付けおよび強度積分が可能であった。今後はこの結晶を用いて全中性子回折強度測定を収集して結晶構造解析を行い、活性部位などのプロトン化状態や基質結合部位の水和構造の様子を観測する予定である。

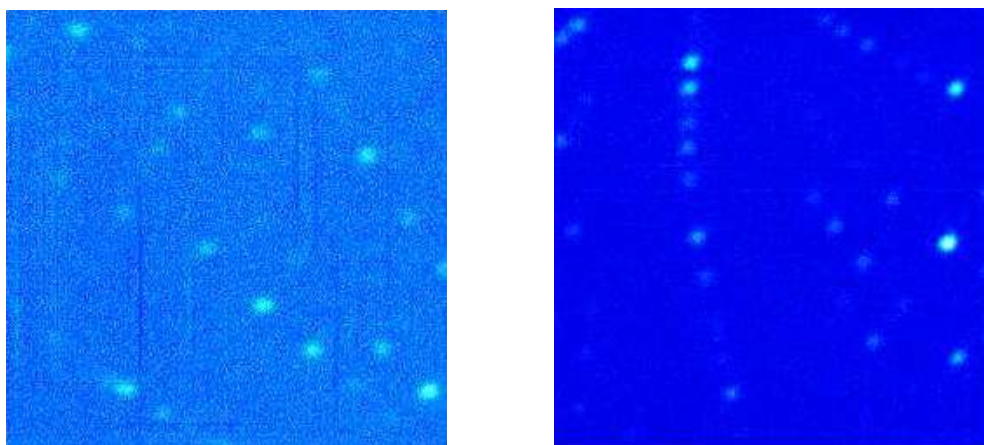


図2 iBIXにより得られた重水ソーキング後の α -トロニン-ビバリルジン複合体結晶の TOF ラウエ回折像 (左: 検出器#15 $2\theta=76.6^\circ$, 右: 検出器#18 $2\theta=50.7^\circ$)