

1B3b

パーキンソン病原因蛋白質シンフィリン - 1 の結晶化

(広島大院理¹、広島大院医歯薬²、広島大 QuLiS³)

石田圭佑¹、中野祥吾¹、堤大輔¹、

山下拓史²、高橋哲也²、松本昌泰²、片柳克夫^{1,3}

【序】パーキンソン病は、中脳の黒質にある神経細胞が変性脱落する神経変性疾患で、Lewy 小体と呼ばれる細胞質内封入体が生ずるのが特徴である。この症状はドーパミンの欠乏により起こるため、ドーパミンを補うことで改善するが、神経変性そのものを抑制する効果はなく、変性細胞を正常に分解するための系にもっていくことによる根治的な新しい治療法の開発が切望されている。最近発見された synphilin-1 は Lewy 小体の主要構成成分でありパーキンソン病において、神経細胞の変性機構に深く関わっているタンパク質である。本研究では、大腸菌を用いてこの synphilin-1 組換え体タンパク質を培養、精製し、さらに結晶化、X 線構造解析を行うことにより、その立体構造を原子レベルで解析し、神経凝集の分子論的な機構を解明することを目的としている。

【実験・結果】synphilin-1 は大腸菌では全長のまま発現できなかったため、遺伝子を七つのフラグメントに分割し pGEX-4T や pGEX-6P のベクターに組み込んだものをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として発現させ、それぞれトロンピンやブレジジョンプロテアーゼを用いて GST を切り離した。現在は、それらの中でも重要性が高い 349-617 のフラグメントを対象を絞っており、これは α -synuclein や parkin などの他のパーキンソン病関連タンパク質と相互作用する部分を含んでいる。培養は LB 培地を用いて行ったが当初は目的タンパク質を可溶画分に得られず様々な条件を検討した結果、培養温度を 25 付近の低温にし、培養時間を 30 時間と長くするのが良いことがわかった。

また、結晶作成には純度が必要なため、雑タンパク質を除去する目的で、数種類のクロマトグラフィーを試した。この中で最も効果が認められたゲルろ過クロマトグラフィーを現在は採用している。また、得られたサンプルが変性していないか否かを確認するため、円二色性スペクトルを測定したところ、このタンパク質は α -ヘリックスリッチな二次構造をもち、二次構造を保ったまま結晶化用に精製、濃縮ができたことを確認した。

以上のようにして得られたサンプルを用いて結晶化条件の探索を行った結果、まず 20 μ m 四方の小さい結晶を得ることに成功した。さらに結晶化条件の精密化を行い、大型放射光施設 SPring-8 において、X 線回折実験を行い、分解能 3.2 の回折データを得た。空間群は C2 で、格子定数は a=192.41、b=162.20、c=160.00 であった。しかし、この結晶は超格子構造を持つと思われる、単位格子当たりの分子数が 10 以上と多く解析が困難なため、より最適な格子定数を持つ結晶を得る条件を探索した。最近、斜方晶系で、格子定数は a=118.17、b=119.04、c=138.24 の新たな単結晶を得た。この結晶では単位格子当たりの分子数が 5~8 個となるため構造解析が可能な単結晶を得ることができた。