

実習：タンパク質分子の電子密度の観察 BL44B2

理化学研究所播磨研究所 内藤 久志

はじめに

Thaumatococcusは分子量約2万2千の植物タンパク質である。

実習ではあらかじめ作成しておいたThaumatococcus結晶をクライオループで掬い上げて、冷却窒素気流下で凍結する。この凍結結晶を用いて回折データ収集を行う。

回折データから F_0 データを作成し、構造解析はThaumatococcusの類縁タンパク質をモデルとして分子置換法で行う。電子密度図の計算後、各自、ミニマップを作成しタンパク質分子の電子密度を観察する。

Thaumatococcus結晶の回折データ収集

- 1 上記のクライオプロテクタント溶液をサンプルプレート上に2～3 ml採る。
- 2 結晶化ドロップからクライオループでThaumatococcus結晶を掬い上げる。
- 3 掬い上げた結晶は1.のクライオプロテクタント溶液に移す。
- 4 しばらくして3.の結晶を再びクライオループで掬い上げる。
- 5 4.で結晶を掬い上げたクライオループを44B2のゴニオメータヘッドにセットするが、その時、クライオヘッドから流れる冷却気流をテレホンカード等により逸らせておくこと。
- 6 ゴニオメータヘッドへのクライオループのセットが完了したら、一気に逸らせていた冷却気流を元に戻して、結晶をフラッシュクールする。
- 7 最初にテストとしてThaumatococcus結晶の回折像を1枚撮影する。
アイスリングが出ていなければ、回折データ収集をスタートする。

回折データの処理と構造決定

- 1 結晶から得られた回折像をビームライン設置のワークステーションで処理を行う。
- 2 1.の処理で得られた F_0 データとThaumatococcusの類縁構造を用いて構造決定を行う。
- 3 構造決定は分子置換法を用い、結晶格子内でのThaumatococcus分子の数、位置、配向（方位）を計算する。
- 4 3.のパラメータが決定できたら、Thaumatococcus分子の電子密度図を計算する。

ミニマップ作成

- 1 得られた電子密度図をプリンターで印刷する。
- 2 コピー機を使い1.の電子密度図をOHPシートにコピーする。
- 3 2.のOHPシートをアクリル板に貼付け、順番に重ね合わせる。
- 4 重ね合わせた電子密度図を観察する。

観察のポイント

- 1 蛋白質の α ヘリックス、 β シートがどのように見えるか？