

ニワトリ卵白リゾチーム結晶の高品質化

財) 日本宇宙フォーラム 田仲 広明

京都大学大学院農学研究科 相原 茂夫

独) 宇宙航空研究開発機構 佐藤 勝、小林 智之

Higher Quality Crystallization of Hen Egg White Lysozyme by Space Experiment

Hiroaki Tanaka

Japan Space Forum, Ohtemachi, Chiyodaku, Tokyo 100-0004

Shigeo Aibara

Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011

Sato Masaru, Tomoyuki Kobayashi

Office of Space Flight and Operations, Japan Aerospace Exploration Agency, Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-8505

E-Mail: PXW01674@nifty.com

Abstract: It was found in JAXA-GCF project that the improvement of the maximum resolution of the protein crystal in microgravity environment would be enhanced if the solution was viscous. This effect was observed in the case of Hen Egg White Lysozyme. The main reason of this is related to the enhancement of the depletion zone formation of the impurity around the growing crystal.

Key words; Space Utilization, Space Station, High Quality Protein Crystal Growth, Ultra High Resolution Protein Crystallography

JAXA では、宇宙実験による高品質タンパク質結晶生成実験の技術開発と実験実施体制の整備、ならびに構造生物学や創薬開発等への成果の貢献を目指して、JAXA-GCF プロジェクトを 2002 年から実施している。本プロジェクトでは、宇宙実験だけでなく地上における実験技術も開発、整備してきている。この結果、結晶化条件が事前に十分に最適化されたタンパク質試料の場合には、かなりの確率で確実に回折分解能の改善が見込めるようになってきている。

微小重力環境で生成したタンパク質結晶の品質向上のメカニズムには、密度差対流抑制による、1)タンパク質欠乏層(protein depletion zone: PDZ)形成による低過飽和度成長、2)不純物欠乏層(impurity depletion zone: IDZ)形成による結晶への不純物取り込み抑制、3)ステップパッチングの抑制、等が知られている¹⁾²⁾³⁾。どのメカニズムがどの程度結晶品質の向上に寄与しているかの議論はこれまで十分なされていないが、X 線結晶構造解析向けに生成しているタンパク質結晶の大きさや、置かれている環境を考えると、1)と 2)が主な向上の要因である可能性が高い。

一方、1)と 2)の効果は、成長中の結晶を球と仮定した単純化した系で、以下のように数値的に検討することが出来る⁴⁾。

まず、PDZ 形成を考慮すると、対流がない環境で成長中の結晶表面のタンパク質濃度は次式で表

すことが出来る。

$$C(R) = \frac{R \cdot \beta \cdot C_e}{D} + C(\infty) \cdot \dots \cdot \dots \cdot (1)$$

$$1 + \frac{R \cdot \beta}{D}$$

ここで、 R は結晶を球と見なしたときの半径、 β はタンパク質取り込み係数、 D はタンパク質の拡散係数、 C_e はタンパク質溶解度、 $C(R)$ は結晶半径 R のときの結晶表面タンパク質濃度、 $C(\infty)$ はタンパク質溶液の容積が結晶に比べて限りなく大きいと仮定した場合の結晶から遠く離れた位置でのタンパク質溶液濃度であり、タンパク質溶液の初期濃度と等しいものとする。

一方、対流がある環境で成長する地上生成結晶では、結晶表面タンパク質濃度は $C(\infty)$ に等しいと考える。これらを考慮して、地上生成結晶と宇宙生成結晶の結晶成長に関わる駆動力を比 (Driving force ratio: DFR) の形で表すと、

$$DFR = \frac{C(R) - C_e}{C(\infty) - C_e} = \frac{1}{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}} \cdot \dots \cdot \dots \cdot (2)$$

となる。 DFR は D が小さいほど小さな値となり、より緩和な状態での結晶成長が実現する。すなわち溶液の粘性が高く拡散が遅いほど、微小重力環境での PDZ 効果が期待できることが分かる。

次にタンパク質分子と不純物分子の結晶への取り込み比 (ここでは簡単のため結晶に取り込まれる過程のみを考え、逆反応は無視している) を用

いて、IDZ 効果を考える。ここでこの比を Impurity Ratio (IR)とすると次式が導かれる⁴⁾。

$$IR = \frac{IUR_{0G}}{IUR_{1G}} = \frac{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}}{1 + \frac{R \cdot \beta_i}{D_i}} = \frac{DFR_i}{DFR} \dots (3)$$

ここで IUR_{1G} と IUR_{0G} は地上と微小重力環境での不純物の取り込み比 (Impurity Uptake Ratio: IUR)、 β_i 、 D_i 、 DFR_i はそれぞれ不純物の取り込み係数、拡散係数、駆動力の比である。ここで簡単のため、

$$A = \frac{\beta_i \cdot D}{\beta \cdot D_i}$$

とおき上式に代入すると

$$IR = \frac{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}}{1 + A \cdot \frac{R \cdot \beta}{D}} \dots (4)$$

が得られる。結晶への不純物取り込み係数 (β_i) が充分大きい値、あるいは不純物拡散係数 (D_i) が充分小さい値の場合には A 値は大きくなり、より大きな不純物取り込み抑制効果が期待できる。ちなみにリゾチーム結晶化実験における不純物の場合に、Thomas ら⁵⁾によって β_i は より数十倍大きな例が報告されており、 A が 50~100 という値 (図 1) は決して非現実的な値ではない。

これらの計算を実際のリゾチームの結晶化に適用してみる。リゾチームは通常 NaCl を沈殿化剤として使用するが、その際の拡散係数とタンパク質取り込み係数の実測値は、 $D=1.04 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ 、 $=0.04 \text{mmh}^{-1}$ である。すると通常の X 線構造解析に利用するような大きさの結晶 (数百 μm 程度) の場合には、PDZ の効果は殆ど期待できないことが分かる。これは溶液の粘性が低く、 D の値が に対し大きいことに原因がある。一方、IDZ の効果は図 1 の上図にあるようにある程度期待できることが分かる。

単純に考えると、PDZ ならびに IDZ の効果は溶液の粘性を上げて拡散係数を小さくすることにより促進されるように思われる。すなわち結晶化実験に際して、粘性の高い溶液を使用すれば微小重力環境での拡散場形成が促進され、拡散場の効果をより高められることが示唆される。そこで、リゾチームの結晶化溶液に PEG 8000 を 25% 添加し結晶化を試みた。幸い、PEG 8000 を添加した溶液でもリゾチームの結晶は問題なく生成し、回折像に対して悪影響がないことも確認できた。また、 D

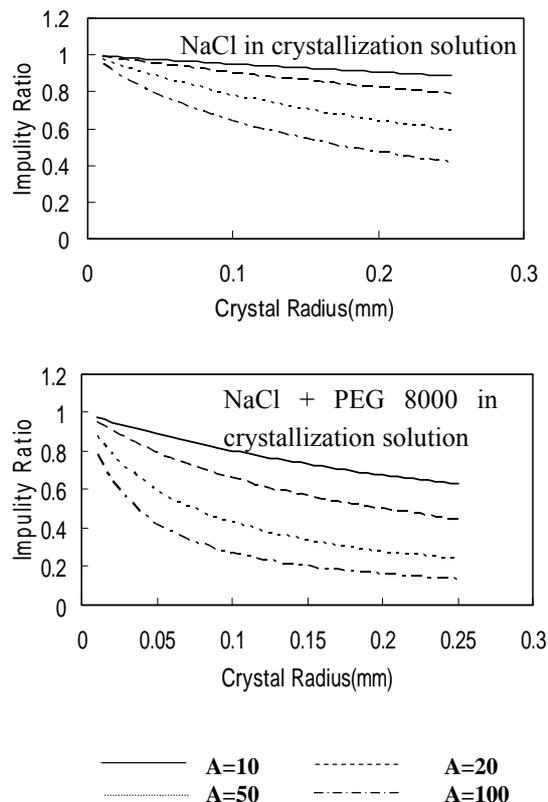


図 1 リゾチーム結晶の半径と不純物取り込み比の関係。上図：通常の結晶化溶液。下図：25%の PEG 8000 を添加し、粘性を上げた溶液

は $2.15 \times 10^{-11} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ になることもわかった。

この値を(2)ならびに(4)に代入してみると、PDZ の効果に関してはやはりあまり期待できないが、IDZ の効果に関しては、図 1 下図にあるようになり促進されることが分かった。

これらの結果を踏まえ、JAXA-GCF プロジェクトの技術開発として、実際に宇宙実験によりリゾチームの最高品質の回折データの取得を目標に実験を組み立てた (これまでの最良値は宇宙実験で得た 0.94⁶⁾)。リゾチーム試料は精製過程を改良し、分子量も表面電荷も均一な、非常に純度の高い試料を調製した。

この結果、PEG 8000 を加えて溶液粘度を上げた場合には、宇宙実験で 0.88 というこれまでの最良値を上回る結晶を得ることに成功した (同条件での地上結晶は 1.1、いずれも SPring-8 BL12B2 で取得)。

一方、PEG 8000 を加えなかった低粘度溶液では、宇宙実験において分解能の改善は認められたものの、その改善度は小さかった (宇宙 1.3、地上

1.4)。

これらの結果は、上記の予測どおりであり、宇宙実験の効果をより促進させるためには溶液の粘性を高めることが重要であることが分かった。

一方、上述のようにリゾチームの場合には、PEG 8000 を 25%添加してもタンパク質の拡散は PDZ の効果を促進できるほどは遅くはならない。したがって、ここで見られた分解能の改善は不純物の取り込み抑制に由来すると考えざるを得ない。この実験で用いた試料は通常結晶化実験に用いているものよりはるかに高純度であることから考えると、(1)不純物の回折分解能に与える悪影響は特に高回折分解能領域では大きく、(2)試料に残留するわずかな不純物の取り込みが IDZ の効果で抑制されたことにより、結晶の品質が改善された、と推測するのが妥当ではないかと考えている。われわれはこの点を更に検討するため、現在、精製度の異なるリゾチーム試料を用いた結晶の品質比較実験を実施中である。

実際の構造解析現場で扱われている試料では、不純物が多いことは否めない。我々はこれまで JAXA-GCF プロジェクト等を通じて非常に多くの種類のタンパク質試料を扱ってきた。その経験から、比較的良好に調製・精製された試料で、分子量がほぼ均一であるものでも、タンパク質分子の表面電荷が不均一であることが多く、これらの回折分解能はせいぜい 1.5 ~ 2.0 程度までの改善で終わるケースが多い。

宇宙実験の最大のメリットは、微小重力環境を生かして比較的簡単に回折分解能を向上させることができる点であると考えている。その特長をより活かすには、表面電荷的にも均一な高純度試料を調製することが重要である。この結果、地上で限界まで改善した回折分解能を更に改善することができる。

超高分解能 X 線構造解析は近年急速に進展している分野であるが⁷⁾、このサブオングストロームレベル(1 Å 以下)の構造解析に供用できる結晶を生成することは依然として容易でない。宇宙実験は、そのために非常に有効な手段であり、実用的なレベルになってきている。

参考文献

- 1) McPherson A., Crystallization of Biological Macromolecules, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1999
- 2) Otolara F, Novella ML, Gavira JA, Thomas BR and Garcia-Ruiz JM. *Acta Cryst.* **D57** 412 (2001)
- 3) Thomas BR, Chernov AA, Vekilov PG & Carter DC. *J. Cryst. Growth*, **211** 149 (2000)
- 4) Tanaka H, Inaka K, Sugiyama S, Takahashi S, Sano S, Sato M & Yoshitomi S. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **10** 1027 (2004)
- 5) Thomas BR & Chernov AA. *J. Cryst. Growth*, **232** 237 (2001)
- 6) Sauter C, Otolara F, Gavira JA, Vidal O, Giege R & Garcia-Ruiz JM. *Acta Cryst.* **D57** 1119 (2001)
- 7) Petrova T & Podjarny A. *Rep. Prog. Phys.* **67** 1565 (2004)

謝辞

本成果は(独)宇宙航空研究開発機構の JAXA-GCF プロジェクトの技術開発成果です。本技術の開発にあたり、以下の方々の協力をいただき、感謝いたします。

Prof. J.M. Garcia-Ruiz and the members of his laboratory

European Space Agency (ESA)

Belgium government

Federal Space Agency (FSA) in Russia

RSC Energia in Russia

National Aeronautics and Space Administration (NASA) in the United States

Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI)

株)丸和栄養食品

タンパク質試料を提供いただいた、タンパク 3000 プロジェクト(理化学研究所、各大学 k 所点)、農業生物資源研究所、蛋白質構造解析コンソーシアムの参加企業、等の利用機関