

タンパク質結晶品質の評価と制御

茨城大学大学院理工学研究科 新村信雄, 研究グループ*

Characterization and Control of the Quality of Protein Crystals

*Nobuo Niimura and Group Member**

Graduate School of Science and Engineering, Naka-narusawa 4-12-1, Hitachi, 316-8511

E-Mail: niimura@mx.ibaraki.ac.jp

Abstract: High quality protein crystals are essential to high resolution X-ray and neutron protein crystallography. To understand the mechanism of protein crystallization contributes to obtain such crystals, and we discussed how the orientation of protein molecules in a unit cell correlates to the quality of crystals and several trials and results have been reported.

Key words; Protein Crystallization, Quality of crystals, Mosaicity

現時点でのタンパク質単結晶育成の目的は X 線や中性子回折法による結晶構造解析のための試料作製である。最近の X 線結晶構造解析の方向の一つに高分解能精密構造解析があり、そこでは良質結晶が求められている。また、水素や水和構造解析に有力な中性子回折実験では大型結晶が必須である。ここで言う良質大型結晶を育成するための指針が結晶成長の機構解明により得られるなら、それを進める必要は高い。

良質大型結晶と言われた時、先ず思い出す一番ナイーブなものはシリコン完全結晶であろうか。完全結晶は格子欠陥が無く、原子が一糸乱れず 3 次元に並んでいるとされており、単位体積あたり何個の格子欠陥があるかでその完全度が定義される。しかし、タンパク質の X 線結晶構造解析での良質結晶の定義は、高分解能構造解析ができる X 線回折データを提供できる結晶とされている。両方で、結晶品質を定義する空間が異なることに気付く。前者は実空間であるのに対し、後者は逆格子空間である。

一方、結晶育成は現実には実空間で行われるので、何とか逆空間で定義されるタンパク質結晶の品質評価を実空間での結晶品質評価に翻訳されない限り、何をどうすれば良質大型結晶が得られるかの指針がたたない。

我々はタンパク質結晶品質の評価と制御をこのような観点から平成 16 年度にこれに関心ある方々でグループを形成して検討を行ってきた。今年度これ

に関係して以下のような研究成果が報告された。

1. 広い範囲に亘る pH 変化による結晶品質評価 (岩井、大西、田中、新村)

タンパク質を構成するアミノ酸のうち極性およびイオン性のアミノ酸は水溶液の pH に依存してプロトン化あるいは脱プロトン化してそれぞれ正あるいは負に帯電する。プロトン化、脱プロトン化が半数起きる pH を pK 値と呼ぶ。しかしこれらがタンパク質を構成する時、ある pH 状態でのタンパク質中でそれらアミノ酸残基がプロトン化あるいは脱プロトン化するかは一般にタンパク質溶液の pH とそのアミノ酸残基の pK 値からは決定できない。しかし、タンパク質中でそれぞれのアミノ酸残基がプロトン化あるいは脱プロトン化するかは、そのタンパク質の活性機構解明、タンパク質の安定性等非常に重要な情報である。一般に X 線結晶構造解析でこれらを決定するのは殆ど不可能であり、将に中性子回折法がこのために最適な実験手法である。そのためには広い pH 範囲で大型結晶育成を行う必要がある。

今回、我々はニワトリ卵白リゾチーム単結晶を pH2.5-8.0 まで 0.5 刻みの pH で育成することが出来た。また、それらすべての結晶品質を Wilson Plot 法で評価した結果ほぼすねての pH での結晶品質が同等であることが判明した。(図 1)

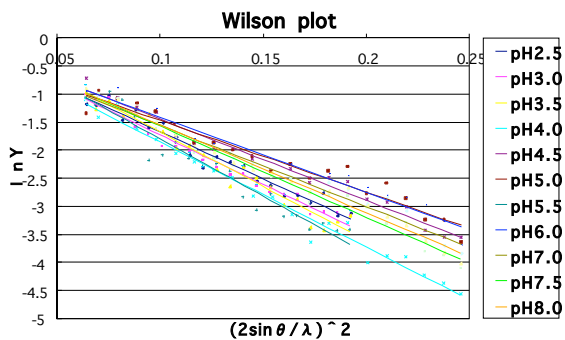


図1 種々の pH で育成された結晶の Wilson Plot

2. 格子欠陥に起因する散漫散乱の観察 (川村、田中、吉崎、新村)

乱れのある結晶からの回折強度式は一般に平均構造からの寄与と平均構造からのゆらぎ（格子の乱れ）の構造からの寄与から成る。前者は所謂 Bragg 反射であり、後者はそのピーク位置は Bragg 反射と同じ場所であるが、Bragg 反射の下に裾を引くもので、散漫散乱と呼ばれるものである。格子の乱れの原因には大きく分けて格子欠陥と分子の熱振動がある。この2つは現象としての散漫散乱への寄与の仕方に差は無いので、これの分離は別の方法に依らねばならない。一番確実な方法は分子の熱振動は温度に依存するので、散漫散乱の温度変化を測定することである。

高エネルギー研究所 PF 施設でインスリンのいくつかの散漫散乱を測定した。測定結果を図2に示す。

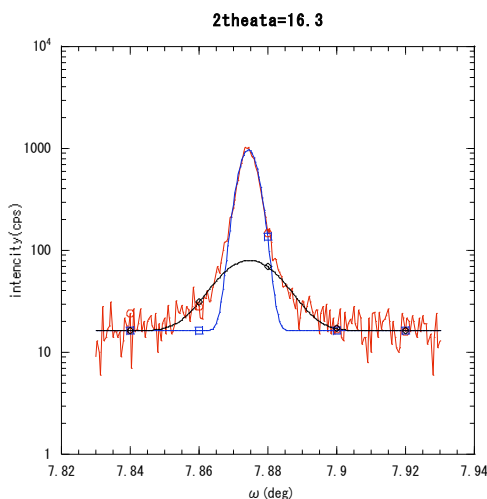


図2 インスリンの散漫散乱

それらを Bragg 反射と散漫散乱に分離し、それぞれの半値幅を回折角でプロットすると Bragg 反射の半値幅は殆ど変化ないが、散漫散乱には大きな変化が見られた。(図3)

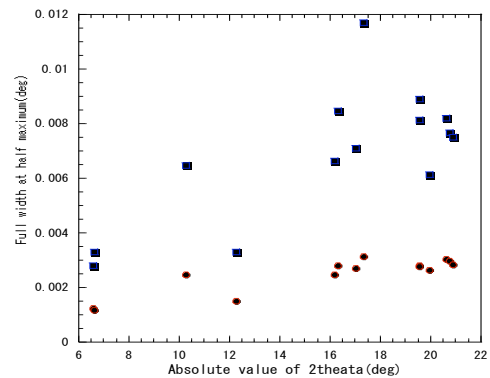


図3 Bragg 反射と散漫散乱の半値幅の回折角依存性 (●Bragg 反射、■散漫散乱)

3. 結晶成長相図に基づいた結晶育成 (八木、大西、田中、新村)

生命現象に深く関るタンパク質の機能を探るには、その立体構造を調べる事が重要であり、その方法として、X線回折・中性子回折による結晶構造解析および NMR などで行われている。この中で、中性子構造解析は、他の方法では特定が困難な水素や水分子を直接見ることができる唯一の方法である。しかしながら、現時点においてこれを行うためには、結晶の体積として1ミリ角以上の大型なタンパク質結晶が必要であり、これがひとつの大きなボトルネックとなっていた。そこで、タンパク質の状態を表す結晶化相図に着目し、合理的な大型結晶化を考案した。タンパク質の結晶化相図を見積もり、これらを基に、大型結晶化を行ったところ、いくつかのタンパク質で大型結晶を得ることに成功した。

4. 最近の新しい結晶化技術 (遺伝子組換えや抗体を利用したタンパク質結晶育成) (玉田太郎)

日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究

部門)

結晶回折法によるタンパク質の構造決定において解決しなければならない最大の技術的なハードルとして結晶化が挙げられる。我々はタンパク質の構造解析におけるボトルネックとなっているこの問題を解決する手法として、「抗体(Fab)と複合体化することによる結晶化促進」および「結晶中の分子接触面へのパッキング促進変異導入」に取り組んでおり、これまでにこれらの手法を用いていくつかの構造未知タンパク質の結晶化および構造解析に成功している。(図4)

トロンボポエチン(TPO)はその受容体に結合し血小板を増殖させるサイトカインである。我々はそれまで困難であったヒトTPOの活性ドメイン(TPO163)の結晶化をその中和抗体由来のFabと複合体化させることにより成功した。TPOは新規タンパク質であったため試行錯誤を伴う重原子法により位相決定を実施する必要があったが、Fab既知構造をモデルとした分子置換法および分子平均化法による位相改良により、分子置換法のみでその立体構造決定に成功した。

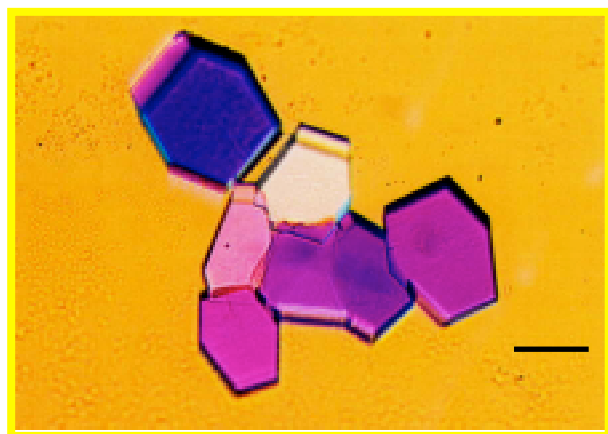


図4 TPO/Fab 複合体の結晶

5. 寄生虫蛋白質の結晶化とX線解析 (原田繁春)

南米でシャーガス病という病気を引き起こす寄生虫、トリパノソーマ・クルージー (Trypanosoma cruzi) の蛋白質、ジヒドロオロト酸脱水素酵素の

結晶化。N末端にHisタグを付けて大腸菌で発現させたジヒドロオロト酸脱水素酵素からは結晶らしきものが得られたが、単結晶を得ることができなかった。そこで、タグをはずしてもとの蛋白質と同じアミノ酸配列をもつジヒドロオロト酸脱水素酵素の発現系を作り直し、結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、図のような結晶が得られた。しかしながら、結晶化条件の最適化を行っても構造解析が可能な結晶は得られなかった。

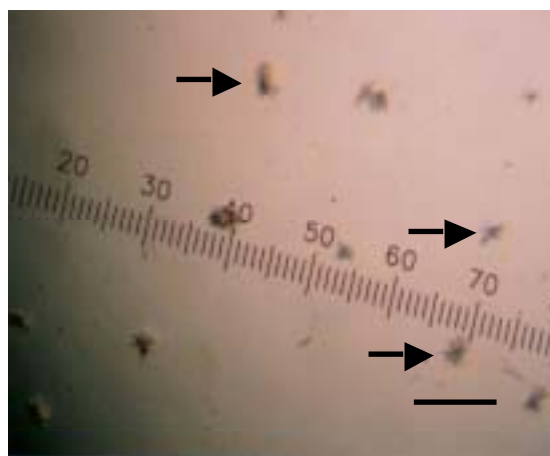


図5 ジヒドロオロト酸脱水素酵素の結晶化

6. 放射光トポグラフィによるタンパク質結晶中の転位の観察 (小島)

タンパク質結晶の結晶欠陥のキャラクターゼーションは、タンパク質の構造解析の精密化だけでなく結晶成長のメカニズムの解明においても重要である。このため、バーガス・ベクトルの方向や大きさなどの転位の詳細な構造を評価することのできるX線トポグラフィはタンパク質結晶の転位を評価する上で非常に有用な手法の一つである。タンパク質結晶のX線トポグラフィへの応用は、国外のいくつかのグループにより行われており、そのほとんどの研究は、単色X線を用いて行われている。しかしながら、タンパク質結晶のX線トポグラフィ像のコントラストは不明瞭であり、タンパク質結晶の転位構造や転位像のコントラストの解釈は依然不明瞭

なままである。

小島研究室では、転位のバーガース・ベクトルを迅速に決定することのできる白色X線トポグラフィを用いて正方晶リゾチーム結晶中の転位の観察を行ってきた。その結果、タンパク質結晶中の転位を明瞭に観察することのできる条件を明らかにすることにより、正方晶リゾチーム結晶及び斜方晶リゾチーム結晶の明瞭な転位像を観察し、転位のバーガース・ベクトルを決定することに成功した。

(図6) しかしながら、白色X線を用いたX線トポグラフィでは高次の反射によるトポグラフィ像の重なりが起こるため、分解能が悪く、これ以上の詳細な解析は望めない。そこで、タンパク質結晶中の転位の更なる詳細な研究を進めていくために、単色光トポグラフィにより斜方晶リゾチーム結晶の転位の観察を行った。結果として、非常に明瞭なトポグラフィ像の撮影に成功し、白色放射光トポグラフィでは観察できなかった転位像の評価を行うことができた。

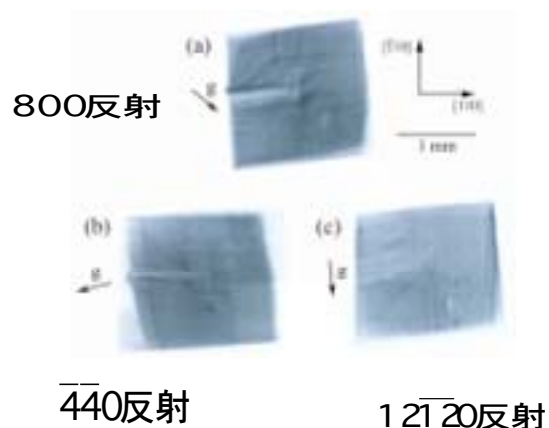


図6. 正方晶リゾチーム結晶のトポグラフィ像

*平成18年度研究会参加者 (順不同)

- 吉崎 泉 (JAXA)
- 栗原和男 (原子力機構)
- 大西裕季 (化研)
- 田中伊知朗 (茨城大学)
- 原田繁春 (京都工繊)
- 新村信雄 (茨城大学)
- 小島謙一 (横浜市大)
- 玉田太郎 (原子力機構)
- 岩井和香里 (茨城大学)
- 原田一明 (産総研)