

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 for high resolution X-ray and neutron protein crystallography. To obtain such crystals, we had discussions on how the orientation of protein molecules in a unit cell correlates to the quality of crystals and how space utilization may contribute to it.

Key words: Protein Crystallization, Quality of crystals, Mosaicity, Space Utilization

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、それを進める意義は高い。

良質大型結晶の代表として、シリコン完全結晶がある。完全結晶は格子欠陥が無く、原子が一糸乱れず三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 線結晶構造解析における良質結晶の定義は、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しない限り、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。

我々は昨年度、タンパク質結晶品質の評価と制御について、このような観点から検討を行ってきた。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. 結晶の品質に関する実用構造解析からの経験 (田仲)

我々は JAXA-GCF プロジェクト等を通じて約 400 種のタンパク質試料を扱ってきたが、その経験からすると結晶の品質改善にはいくつかのフェーズがある。回折分解能が概ね 3 Å よりも悪いケースでは、試料の安定性や純度が悪い場合が多く、試料調製方法の改良で容易に分解能は向上する。

分子量的にほぼ均一となった試料では回折分解能はかなり改善するが、概ね 1.5~2.0 Å 程度までの改善でとどまるようなケースが多い。このような試料では、表面チャージが不均一な試料が混在しているケースが多い。

JAXA-GCF プロジェクトの技術開発では、さらに表面チャージの均一度を高めるような精製を行うことにより、2 種のタンパク質試料で 1 Å 台前半の回折分解能を得ることに成功している(アルファアミラーゼ: 1.12 Å、リゾチーム: 1.08 Å)。ここでの分解能改善はかなり劇的であることから、不純物に関しては、対象タンパク質と異なる分子種による悪影響だけでなく、むしろ対象タンパク質と類似の分子種による影響が大きいのではないかと考えている。

ちなみにこれらの試料を微小重力環境で結晶生成させることにより、アルファアミラーゼの場合で 0.89 Å、リゾチームの場合で 0.88 Å の回折分解能

を得ている。この際の微小重力の効果では、我々はそれでも残留する不純物の取り込みが、微小重力環境での不純物欠乏層の形成により、抑制される効果が主要なものではないかと考えている。

一方、以上のような経験をもとに考えると、不純物の結晶品質に与える影響を検討する際には、分子量的に均一なだけでは試料的には不十分である。表面チャージも完全に均一になっている試料をコントロールとして用いる必要があると思われる。

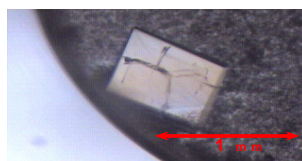
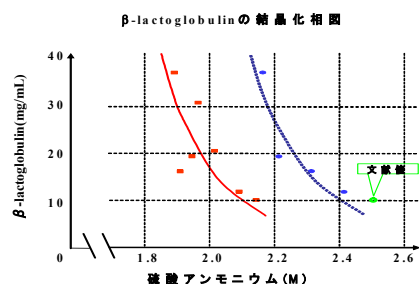
本項は(独)宇宙航空研究開発機構のJAXA-GCFプロジェクトの技術開発成果であり、(株)丸和栄養食品ならびにその他、試料提供いただいた皆様のご協力に感謝いたします。

2. ポストクリスタリゼーション・トリートメントと結晶性 (渡邊)

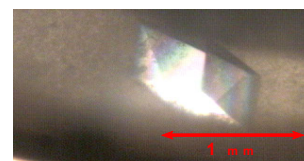
結晶が得られたが分解能が低いということは多々ある。タンパク 3000 プロジェクトによって、多数の結晶を扱うことになり、その例にことかなくなかった。タンパク質濃度、結晶化剤の種類、バッファーの pH 等を見直して結晶化をやり直すことはもちろん重要であるが、一旦得られた結晶に何らかの操作を施すことによって結晶性を改善することが出来れば、非常に魅力的である。そうした操作が「ポストクリスタリゼーション・トリートメント」として、例えば、

B. Heras & JL. Martin、Acta Cryst. D61, 1173-80 (2005)

にまとめられている。彼らがまとめた手法分類は、「アニーリング」「脱水」「ソーキング(脱水しない)」「架橋」である。



1.0 x 0.7 x 1.0 mm
C p 12 mg/ml C c 2.65 M



1.0 x 0.5 x 0.7 mm
C p 3.9 mg/ml C c 2.65 M

Fig. 2 Crystallization based on the phase diagram

特に、高湿度雰囲気を利用する直接の脱水法では、Kiefersauer Device (http://www.rigakumsc.com/journal/Vol22.1.2005/22_46.pdf) も商品化されており興味深い。我々も、タンパク 3000 プロジェクトで得られているいくつかの低分解能結晶についてこれらの手法を試み、結晶性の改善を目指している。結晶成長そのものと、これらの結晶に対する操作を合わせて研究を進めることに、意味があるのではないかと考えている。下の写真(図 1)のような、比較的大きい結晶になるが分解能の低いものを扱っているが、残念ながら、今のところ結晶性改善には成功していない。

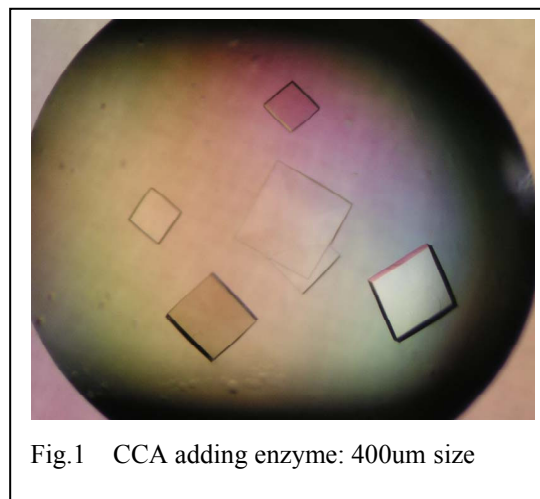


Fig.1 CCA adding enzyme: 400um size

3. 結晶成長相図に基づいた結晶育成 (大西)

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のが重要であり、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(図 2)。

3. ニワトリ卵白リゾチーム斜方晶の結晶化(相原)

近年、ニワトリ卵白リゾチームの斜方晶について結晶内の分子配列の異なる Form I と Form II の 2 種類の単結晶が存在し、互いに格子定数が異なっていることが明らかとなった。Form I 斜方晶については 1982 年に Artymiuk らが発表して以来、報告が見あらず、2002 年に相原らにより、高温で得られる斜方晶と区別するため、この結晶を Form I そして高温で得られる結晶を Form II として発表された。Form I も Form II も 2 分子からなる共通の繰り返し単位 (Molecular Unit) を有するが、その配列が全く異なっている。現在、結晶成長機構に関する研究や宇宙の微小重力や高磁場中の疑似微小重力環境を利用した高品質単結晶の調製に関する実験が進められている。

4. リゾチーム結晶中の欠陥発生に対する不純物の影響 (吉崎、小泉、橘、小島、小松)

タンパク質結晶への不純物の混入は結晶品質を劣化させると考えられているが、品質劣化の具体的なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、まず放射光を用いたロックンクカーブ幅計測を行い、不純物を含む結晶では半値幅が広がることを明らかにした。不純物を含まない結晶では、代表的なロックンクカーブ半値幅 (FWHM) は $0.004 - 0.006^\circ$ で、不純物を含む結晶では $0.006 - 0.010^\circ$ で

あった。この原因を明らかにするために、白色 X 線トポグラフィ実験を行ったところ、不純物を含まない結晶では、コントラストが見られなかったが、不純物を含む結晶では、転位とみられるコントラストが観察された(図 3)。また、エッチング実験においても、不純物を含む結晶では多数の Deep Pit が観察される一方で、不純物を含まない結晶では Deep Pit はほとんど観察されなかった。このことから、不純物の取り込みと転位の発生には密接な関係があり、不純物が結晶品質劣化の一因であることを明らかにした。

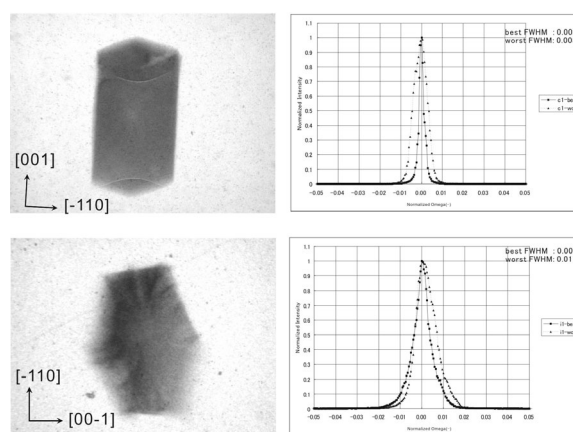


Fig.3 Upper figure: Topograph and the Rocking curve of pure crystal, Lower figure: Topograph and the Rocking curve of contaminated crystal

5. 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 (小泉、橘、小島)

タンパク質結晶の結晶欠陥、特に、転位のキャラクタリゼーションは、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、バーガース・ベクトル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、その 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。

我々の研究室では、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放射光白色 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。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、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、放射光単色 X 線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、放射光白色 X 線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。

6. 格子欠陥に起因する散漫散乱の観察 (新村、吉崎、八木、澤、田中)

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なる。前者はいわゆる Bragg 反射であり、後者はその位置は Bragg 反射と同じ場所であるが、Bragg 反射の下に裾を引く

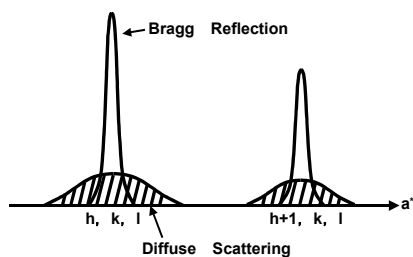


Fig. 4 Diffuse Scattering

もので、散漫散乱と呼ばれるものである (図 4)。

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。この二つは現象としての散漫散乱への寄与の仕方に差はないので、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。

さて、結晶性の悪い結晶からの回折写真には散漫散乱が観測されている。放射光 X 線を用いてリゾチームの Bragg 反射の裾を測定したところ散漫散乱の存在が観測された (図 5)。これが格子欠陥に起因するものであるかを確認することが今後の課題である。

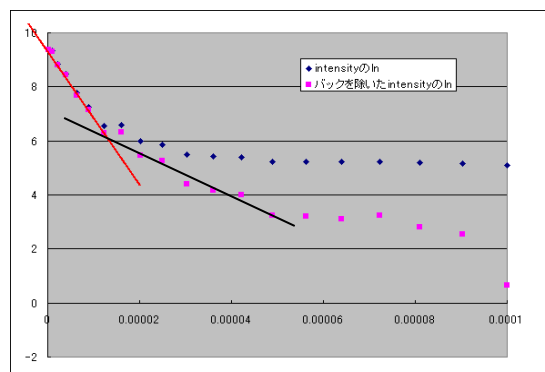


Fig. 5

*平成 17 年度メンバー (順不同)

- 新村信雄 (茨大)
- 原田繁春 (京都工繊大)
- 小松 啓 (東北大名誉教授)
- 佐崎 元 (東北大)
- 小島謙一 (横浜市立大)
- 橘 勝 (横浜市立大)
- 小泉晴比古 (横浜市立大)
- 渡邊信久 (北大)
- 森 勇介 (大阪大)
- 相原茂夫 (京都大)
- 原田一明 (AIST)
- 吉崎 泉 (JAXA)
- 栄 龍 (JAXA)
- 佐藤 勝 (JAXA)
- 大西裕季 (化研)
- 田中伊知朗 (茨大)
- 田仲広明 (JSF)
- 栗原和男 (原研)