

タンパク質結晶の X 線トポグラフィにおける転位像の解析

横浜市大院国総科 小泉晴比古、橘 勝、小島謙一*

宇宙研 吉崎 泉

Analysis of dislocation images in X-ray topography of protein crystals

Haruhiko Koizumi, Masaru Tachibana, I. Yoshizaki[§] and Kenichi Kojima*

International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan

[§]Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), 2-1-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki, 305-8505, Japan

*E-Mail: kojima@yokohama-cu.ac.jp

Abstract: Dislocation images in X-ray topography of protein crystals such as tetragonal hen egg-white lysozyme crystals were analyzed. Not only extinction but also double contrast of dislocation images is observed on the X-ray topographs.

Key words; X-ray topography, Lysozyme crystals, dislocations

1. はじめに

X 線トポグラフィは結晶内の転位のキャラクターゼーションを行う上で非常に強力な手法の一つである。タンパク質結晶への X 線トポグラフィの応用は様々なグループによって行われている。しかしながら、そのほとんどのタンパク質結晶のトポグラフィ像は低分子有機結晶に比べ不明瞭であった。

最近、単色 X 線を用いた位相敏感トポグラフィにより、正方晶リゾチームと立方晶フェリチンの干渉縞が得られた^{1),2)}。さらに、大型正方晶リゾチームにおいて、放射光白色 X 線トポグラフィにより線状のコントラストも得られている^{3),4)}。後者の研究では、回折ベクトルに依存した線状コントラストの消滅が観察された。線状コントラストの消滅は、それらが転位像であるという証明でもある。しかしながら、タンパク質結晶内の転位像の解釈はまだ不十分である。本稿では、以前報告した正方晶リゾチームの X 線トポグラフィにおける転位像の更に詳細な解析を報告する⁵⁾。

2. 実験方法

正方晶リゾチームの育成方法には塩濃度勾配法が用いられ、室温で 2 週間静置することにより 4 mm 程度の結晶が育成された。育成された結晶は{110}と{101}の晶癖面をもっている。X 線トポグラフィによって明瞭な転位像を観察するために、厚さ 1.5 mm 以上の大型結晶が実験に使われた⁴⁾。

X 線トポグラフィは KEK・PF の BL15B1 と SPring-8 の BL28B2 における白色 X 線を用いて行われた⁶⁾。X 線トポグラフィ実験についての詳細は以前報告した論文に書かれている⁴⁾。また、入射 X 線は正方晶リゾチームの[001]方向にほとんど平行に入射された。

X 線トポグラフィ上の転位像の解析のために、正方

晶リゾチームにおいてロッキング・カーブの測定も KEK・PF の BL10A において行われた。測定に用いた波長は 1.542 Å である。ロッキング・カーブの測定方法は、以前報告された佐藤らと同様である⁷⁾。また、測定されたロッキング・カーブの半値幅 (FWHM) は Gaussian 関数によりフィッティングされた。

3. 結果と考察

Fig. 1 に放射光白色 X 線により撮影された正方晶リゾチームのトポグラフィ像を示す。Fig. 1a, b および c のトポグラフィ像はそれぞれ 080, 440 および 12120 反射である。Fig. 1a に見られるように、結晶の中心から線状のコントラストがはっきりと観察される。それらは[110]方向と[110]方向にほとんど平行である。Fig. 1a の[110]方向に平行な線状のコントラストは、Fig. 1b の 440 反射において消滅している。一方、Fig. 1a の[110]方向に平行な線状のコントラストは Fig. 1c の 12120 反射において消滅している。そのような線状コントラストの消滅は、それらが転位像であることの一つの証拠である。また、転位の消滅則である $g \cdot b = 0$ に従うと、Fig. 1 の[110]方向と[110]方向に平行な転位のバーガス・ベクトルはそれぞれ[110]方向と[110]方向であると決定される。ゆえに、正方晶リゾチームにおいて支配的な転位は $\langle 110 \rangle$ 方向のバーガス・ベクトルをもたせぬ転位である。

正方晶リゾチームの転位密度が得られたトポグラフィ像の転位線の数から見積もられた。結果として、転位密度はおおよそ $10^2 / \text{cm}^2$ のオーダーであることがわかった。この値は、良質な低分子有機結晶において報告されている転位密度と同じぐらい低い値である^{8),9)}。このため、育成された正方晶リゾチームは比較的低い転位密度である。

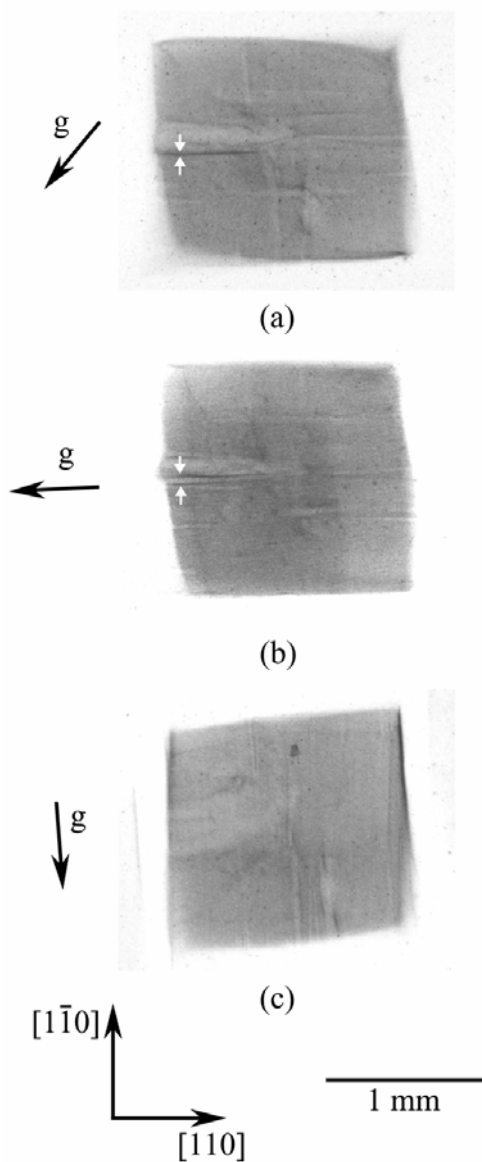


Fig. 1 Laue topographs of (a) 080, (b) 440, (c) 12120 reflections of tetragonal HEW lysozyme crystal.⁵⁾

トポグラフ像を詳しく見ていくと、各々の転位像がダブルコントラストを形成していることがわかる。ダブルコントラストは時々転位像の重なりを導き、個々の像の分解能を落とす。Fig. 1の矢印によって示されている転位像において、ダブルコントラストがはっきりと観察されている。Fig. 2に拡大したトポグラフ像を示す。

Fig. 2に示すように、転位像は080反射においてシングルコントラストを示し、440反射においてダブルコントラストを示している。転位像の幅は080反射において $<18 \mu\text{m}$ であり、440反射において $50 \mu\text{m}$ である。転位のイメージ幅は反射面に強く依存しており、これはX線トポグラフ上の一本の転位線における主な特徴の一つである。このため、観察

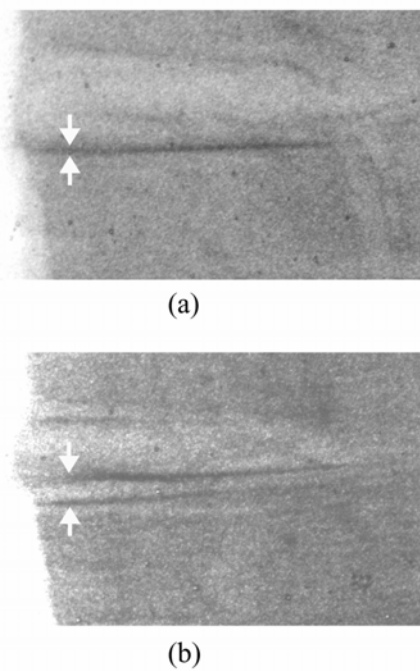


Fig. 2 Enlarged topographs showing (a) single contrast and (b) double contrast of the dislocation image, respectively, observed in (a) 080 and (b) 440 reflections in Fig. 1.⁵⁾

されたダブルコントラストはバンドル状の転位ではなく、一本の転位に由来する。

X線トポグラフィにおける転位のダブルコントラストはAuthierによって直接像として説明されている^{10),11)}。直接像は、実効的な方位ずれ $|\delta|$ を超えた $q\omega$ の領域において生じる。 q は1から2の間の定数であり、 ω は完全結晶の半値幅(FWHM)である。対称ラウエケースにおいて、 ω は以下のように表わされる。

$$\omega = \frac{2r_e \lambda^2 |F|}{\sin 2\theta \pi V} \quad (1)$$

ここで、 θ はブラッグ角で、 r_e は古典的な電子の半径、 λ はX線の波長、 F は構造因子、 V はユニットセルの体積である。よって、直接像を形成する領域は以下のような式において定義された領域によって制限される。

$$|\delta| = q\omega \quad (2)$$

このため、らせん転位のダブルコントラストのイメージ幅である D は次のような式によって表わされる。

$$D = \frac{b_g}{2\pi} \frac{1}{q\omega} \quad (3)$$

ここで、 b_g はバーガス・ベクトル b における回折ベクトル g に平行な成分である⁸⁾。

バーガス・ベクトル $b = [110]$ をもたらせん転位のダブルコントラストのイメージ幅 D が、 $q = 1$ として式(1)、(3)から計算された。080 反射と440 反射における計算値が、観察値と共に Table 1 に示されている。計算されたイメージ幅はそれぞれ 080 反射において $2.68 \times 10^3 \mu\text{m}$ であり、440 反射において $3.54 \times 10^3 \mu\text{m}$ である。一方、観察されたイメージ幅はそれぞれ 080 反射において $<18 \mu\text{m}$ であり、440 反射において $50 \mu\text{m}$ である。計算値および観察値の両方において、440 反射のイメージ幅は 080 反射のイメージ幅よりも大きい、計算値が、観察値よりも非常に大きいことに注目すべきである。計算値はミリメートルのオーダーであるのに対し、観察値はマイクロメートルのオーダーである。つまり、イメージ幅の計算値は観察値のオーダーよりも二桁大きいのである。

ここで、正方晶リゾチームの X 線トポグラフ上の転位コントラストのイメージ幅の計算値と観察値との大きな矛盾の起源について考えよう。以前報告された無機結晶¹¹⁾や低分子有機結晶⁸⁾のダブルコントラストの解析に従うと、トポグラフ上で観察されたイメージ幅は計算値と非常によく一致する。それらの場合、測定されたロッキング・カーブの半値幅は、式(1)を用いて計算された完全結晶の値と非常によく一致する¹²⁾。一方、タンパク質結晶においては、ユニットセルの体積が非常に大きいため、式(1)を用いて計算された完全結晶のロッキング・カーブの半値幅は、無機結晶や低分子有機結晶のそれよりも非常に小さい¹²⁾。この研究で育成された正方晶リゾチームにおいて、測定されたロッキング・カーブの半値幅は、Fig. 3 に示してあるように、それぞれ 080 反射において $4.09 \times 10^{-3} \text{ }^\circ$ であ

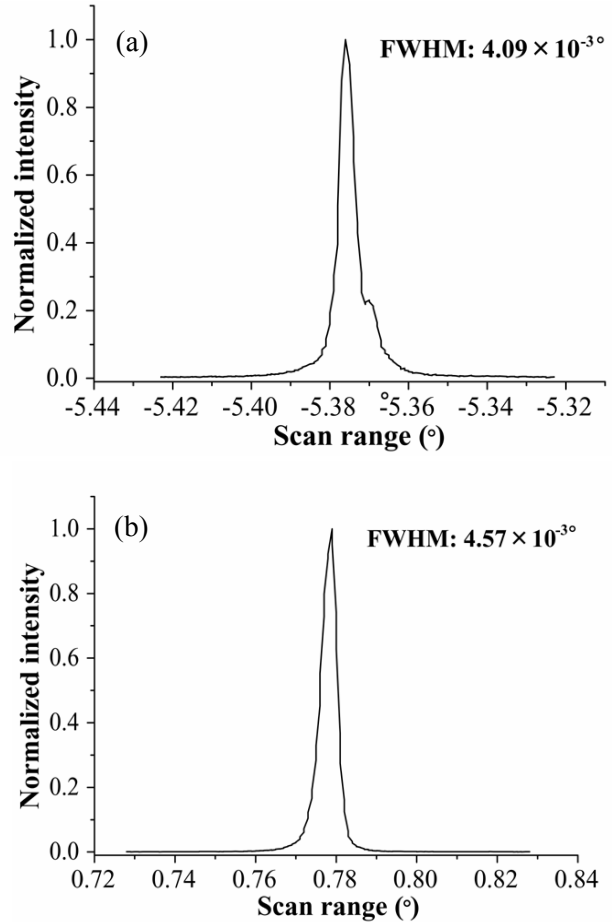


Fig. 3 Rocking curve profiles of (a) 080 and (b) 440 reflections in tetragonal HEW lysozyme crystal.⁵⁾

り、440 反射において $4.57 \times 10^{-3} \text{ }^\circ$ である。これらの値は、これまで報告されていた非常に結晶性の良い正方晶リゾチームの値と同等である^{2),13),14)}。しかしながら、これらの値でさえ式(1)を用いて計算された完全結晶の値と比較すると非常に大きい。これは、育成された正方晶リゾチームが完全性の良い低分子有機結晶と同程度の転位密度しかもっていないにもかかわらず、結晶性が悪いということを意味している。これは、タンパク質結晶の興味深い特性である。タンパク質結晶のこの結晶性の悪さは、タンパク質結晶内に含まれる多量の水分子が関与する、

Table 1 Comparison of calculated and observed values of the image width D of a screw dislocation with Burgers vector $b = [110]$ (111.9 \AA) in X-ray topographs with 080 and 440 reflections of tetragonal HEW lysozyme crystals as shown in Fig. 2. Here, b_g is the component parallel to the diffraction vector g in the Burgers vector b , θ is the Bragg angle, λ is the wavelength employed, F is the structure factor, V is the volume of unit cell, and ω is the FWHM of the rocking curve of the perfect crystal.

Reflection	b_g (\AA)	θ ($^\circ$)	λ (\AA)	$ F $	V (\AA^3)	ω ($^\circ$)	D (μm)	
							Calculation	Observation
080	79.1	5.20	1.79	695	2.37×10^5	5.37×10^{-5}	2.68×10^3	<18
440	111.9	1.54	0.75	1259	2.37×10^5	5.76×10^{-5}	3.54×10^3	50

転位以外の他の結晶欠陥に由来するものと考えられる。このため、高いモザイシティーをもつタンパク質結晶のイメージ幅の解析において、式(1)を用いて計算された完全結晶のロッキング・カーブの半値幅を用いることは疑問である。

上で述べたように、正方晶リゾチームにおける式(1)を用いて計算された完全結晶の半値幅は測定値よりも二桁小さい。この矛盾は Table 1 に示してあるように、転位コントラストのイメージ幅の矛盾と同じオーダーである。もし、式(3)の ω に測定された半値幅を代入すれば、計算されたイメージ幅は観察値と一致する。これは、転位コントラストの観察されたイメージ幅は、主に、タンパク質結晶の完全性の悪さによるということを示している。つまり、タンパク質結晶の完全性が悪くなればなるほど、観察される転位コントラストのイメージ幅は小さくなるのである。このため、タンパク質結晶のモザイシティーの度合いは X 線トポグラフ上で観察される転位コントラストのイメージ幅から見積もることができることを示唆している。

4. 結論

我々は、X 線トポグラフィにおいて一本の転位のダブルコントラストが正方晶リゾチームのようなタンパク質結晶においても明瞭に観察されることを示した。そして、観察された転位コントラストのイメージ幅は運動学的回折理論をもとに計算された値よりも非常に小さいことがわかった。さらに、運動学的回折理論により見積もられた完全結晶のロッキング・カーブの半値幅は、測定された値よりも二桁小さいこともわかった。この矛盾は転位コントラストのイメージ幅の矛盾と一致する。この相関から、半値幅の広がり、つまり、完全性の悪さが、育成された結晶において観察されるイメージ幅に影響を与えるということを示唆している。

参考文献

- 1) Z.E. Hu, B. Lai, Y.S. Chu, Z. Cai, D.C. Mancini, B.R. Thomas and A.A. Chernov, *Phys. Rev. Lett.* **87** 148101-1 (2001).
- 2) Z.W. Hu, Y.S. Chu, B. Lai, B.R. Tomas and A.A. Chernov, *Acta Cryst.* **D60** 621 (2004).
- 3) K. Izumi, K. Taguchi, Y. Kobayashi, M. Tachibana, K. Kojima and M. Ataka, *J. Cryst. Growth* **206** 155 (1999).
- 4) M. Tachibana, H. Koizumi and K. Kojima, *J. Synchrotron Rad.* **10** 416 (2003).
- 5) H. Koizumi, M. Tachibana and K. Kojima *Phil. Mag.* **85**, 3709 (2005).
- 6) M. Tachibana and K. Kojima, *Curr. Top. Cryst. Growth Res.* **6** 35 (2002).
- 7) T. Sato, Y. Yamada, S. Saijo, T. Hori, R. Hirose, N. Tanaka, G. Sazaki, K. Nakajima, N. Igarashi, M. Tanaka and Y. Matsuura, *Acta Cryst.* **D56** 1079 (2000).
- 8) H. Klapper, *Crystals*, **Vol. 13**, edited by H. C. Freyhardt (Springer, Berlin, 1991), pp. 109.
- 9) J.N. Sherwood, *Defect Control in Semiconductors*, edited by K. Sumino (North-Holland, Amsterdam, 1990), pp. 1611.
- 10) A. Authier, *Dynamical Theory of X-Ray Diffraction* (Oxford, Oxford, 2004).
- 11) A. Authier, *Adv. X-ray Anal.* **10** 9 (1967).
- 12) J.R. Helliwell, *J. Cryst. Growth* **90** 259 (1988).
- 13) E.H. Snell, S. Weisgerber, J.R. Helliwell, E. Weckert, K. Holzer and K. Schroer, *Acta Cryst.* **D51** 1099 (1995).
- 14) D. Lübbert, A. Meents and E. Weckert, *Acta Cryst.* **D60** 987 (2004).