

タンパク質結晶成長メカニズムに関する欧州との共同研究

東北大学 塚本勝男

Collaboration with European Topical Team on Protein Crystal Growth Tohoku University, Katsuo Tsukamoto

Abstract: Crystal growth rate of lysozyme has been measured in space for the first time collaborating with an European topical team in 2007. The result was beyond our expectation. Though the growth rate in space has been assumed to be late, the measured growth rate was equal or more than the rate under gravity by 40%. The international team has been trying to understand this result based on both theoretical and experimental studies. Our recent results using in-situ observation system during parabolic flight also showed the increase of growth rate in space. We qualitatively understand that this is due to the reduced transport of dimer impurity molecules to the crystal surface under microgravity. However the quantitative analysis cannot explain such a larger increase of growth rate because the reduction of dimer impurity molecules on the surface under microgravity is quite small. This international collaboration has been strengthened by inviting Belgium team to our team. So, Japan, Spanish and Belgium teams will collaborate for the analysis of NanoStep experiment in 2012 and hope to continue the experiment as a post NanoStep project.

Key words; Crystal growth, Protein, Lysozyme, Growth rate, Microgravity

1. はじめに

欧州の結晶成長トピカルチームとの具体的な共同研究は2007年のFoton M3回収型衛星を利用したリゾチーム結晶成長速度の測定実験から開始したといえる。これはスペインの Garcia Ruiz から提供を受けたスペース内で行った世界初のタンパク質結晶成長速度の測定実験であった。その結果は従来の考えを覆す驚くべきことであった。これまで微小重力では対流や流れが抑制されるために、結晶の成長速度は数倍から数十倍遅れると考えられてきた。しかし、リゾチームを使った実験では、両環境での結晶成長速度の差はほとんどないか、むしろ、微小重力での結晶成長速度が50%程度増加することも分かった。

International Collaboration for Protein Crystal Growth Mechanism Analysis



Fig. 1 International collaborarion.

この新しい発見に対して、日本のタンパク質結晶成長 WG と欧州の研究グループは (fig.1)、結晶成長速度、結晶表面パターン、結晶欠陥、数値シミュレーションの観点から、実験室や航空機での微小重力実験を繰り返し、なぜ、結晶成長速度が増加する

かの初期的な研究成果をあげることができた。これらの詳細は論文として順次発表する予定である。

ここでは、これらの研究歴を WG 活動としてとらえた場合、どんな特徴があるかを述べよう。そして、これまでの溶液からの結晶成長メカニズムの研究をまず振り返ってみる。



Fig. 2 history of space experimtns.

2 日本の結晶成長

結晶成長の宇宙利用に関して世界と日本の研究を、我々の研究を中心にまとめたのが fig.2 である。日本の宇宙利用は欧米からは10年近く遅れてスタートしたが、他国にない結晶成長研究テーマを選ぶ事で他をリードしている分野もある。結晶成長のその場観察を利用した研究もその一つとしてあげたい。もともとは、GET AWAY スペシャルを利用した結晶成長のその場観察実験計画として1985年にスタートした。この計画はチャレンジャー事故などにより実施されることはなかったが、実験方法は、TR-1A ロケット実験や Kibo 内の SCOF (溶液結晶成長その場観察装置)の原型にもなっている。この基本的な考えは、成長メカニズムを反映

する結晶表面の成長パターンを分子レベルで観察し、同時に、溶液環境濃度の分布をも測定するという方法である。これらの測定を通して、溶液からの結晶成長メカニズムが地上と宇宙ではどう違うかを明らかにしようとした。

3. タンパク質結晶成長 WG

この完全性の定義もあいまいである。構造解析では、最終的な分子構造の解析をしたときに解像度がどれだけ上がるかが問題である。解像度が上がらない結晶はモザイク構造のためとされるが、誰もこのモザイク構造は見えてない。

結晶成長分野での完全性は違う。分子構造の完全性ではなく、結晶の完全性、つまり、転位や面欠陥が問題の焦点である。この関係を示したのが図2である。したがって、完全性の向上と言っても意味が大きく異なっている。もっとも、両者には広い意味の因果関係があることも事実であろう。そのために、この因果関係を明らかにするのも本 WG の研究の大きなテーマである。

もう一つの問題がある。分子構造の測定のためには、一般に、大きな成長速度が使われる。一方、結晶成長メカニズムの研究では、低過飽和度で結晶を成長させる。この関係を示したのが図3である。これらも分かるように、同じ結晶であっても成長条件には雲泥の差がある。このギャップをうめるために、本 WG での研究では高速に“その場”観察できる光学的な観察装置を開発して利用する。これで初めて構造解析用につくる結晶成長条件での結晶成長メカニズム研究ができるようになった。

4. Foton M3回収型衛星をつかった結晶成長速度測定



Fig. 3 Foton-M3 satellite after fall.

これまで多数のタンパク質結晶がスペースシャトル内で得られている。それにも関わらず、結晶成長速度の測定は皆無である。結晶成長メカニズムの研究において、成長速度と過飽和度との関係の研究

は不可欠である。

Growth Rate from Foton-M3 Experiment (リゾチウム)

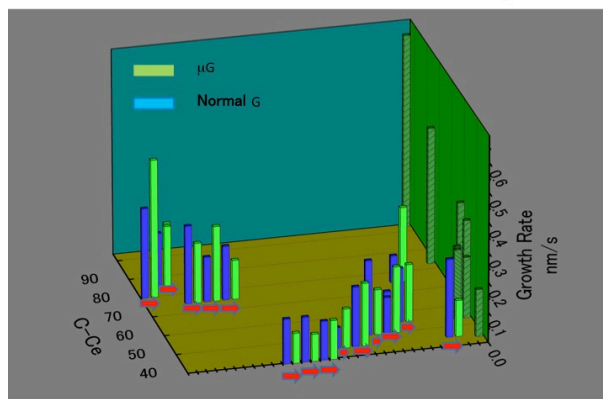


Fig. 4 growth rate vs supersaturation.

もっとも成長速度の測定は“その場”でおこないたい。しかし、簡便な方法として種結晶をつかって、一定時間に成長した量を測るのも良い方法である。種結晶をつかうのは技術的に多くの問題を抱えていたが、FOTON M3 実験 (fig.3) では問題を克服して 12 日間の宇宙実験が実施された。

その結果は別に報告するが、宇宙では対流が抑制されるために結晶成長速度が遅くなると考えられていたが、実際は速度が早くなっている事も初めて明らかになった(fig.4)。これらの事実はこれまでの宇宙実験の予想を覆す。航空機実験で分子ステップの動きを測定した結果が fig.5 である。

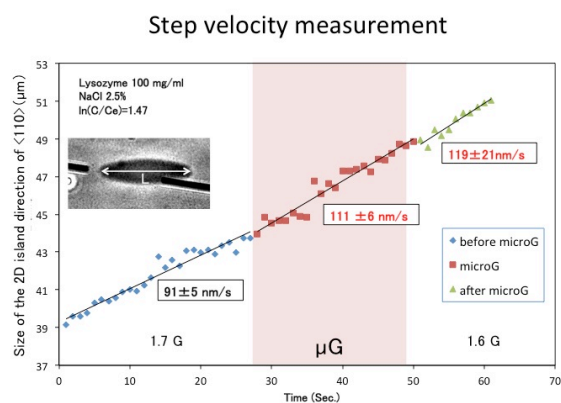


Fig. 5 step velocity vs gravity

航空機実験(Fig.6)では20秒足らずの実験しかできないが、位相差顕微鏡を利用した高精度“その場”測定でステップ速度を測定することができた。ここでも、微小重力では結晶成長速度が速くなることが確かめられた。

この原因について、理論的にも実験的に研究が進められている。定性的には次のように解析が進んでいる。

微小重力では成長速度を低下させるダイマー分子の Parabolic flight

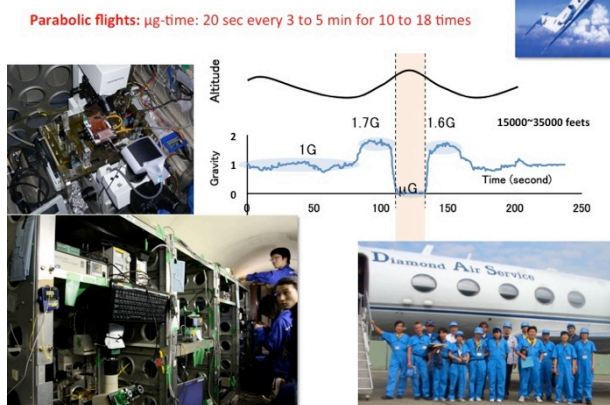


Fig. 6 parabolic flight for protein crystal growth.

拡散がモノマーよりも遅いために、結晶表面のダイマー分子濃度が低下する。その効果がモノマー濃度の低下よりも大きいために、結果的に成長速度が増加する。この定性的な説明は、観察された二次元テラスの形状など、多くの点を説明する。しかし、数値計算をもとにした定量てきな研究では、ダイマー濃度の結晶表面での低下は、さほど大きくないことも分かっており、従来の結晶成長モデルでは十分な説明はついていない。

5. “NanoStep” JEM 実験

2012年初頭に宇宙基地を使ったタンパク質結晶成長実験を予定している。この装置は現在製作中であるが、タンパク質の単分子より大きな分子の結晶成長速度や完全性に与える影響を調べる。そのために、結晶表面をマイケルソン干渉計で観察し、面成長速度の過飽和度依存性を正確に測定する。同時に、直行する横方向から、濃度分布をマッハゼンダー干渉計で測定し、成長速度の界面濃度依存性を測定する。

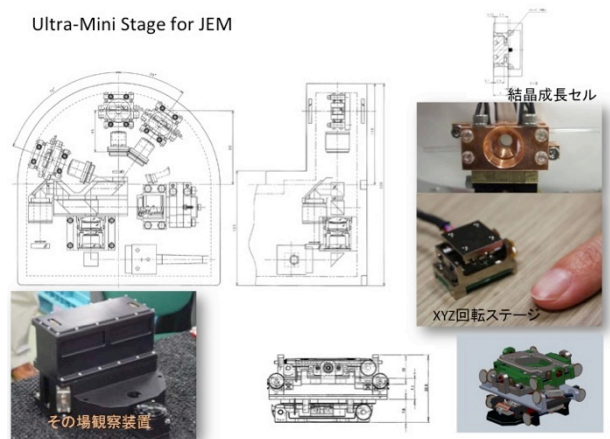


Fig. 7 ultra-mini crystal growth cell and the 3D stage.

本 WG では、この実験のための予備実験、あるいは、解析方法の検討を行っている。特に、このような精密な成長速度測定は初めてである。これまでは透過干渉計を使用していた。しかし、今回は結晶表面からの反射像をとらえる。そのために、結晶表面は正確に光軸に垂直である必要がある。そのために新規に作成したのが、超音波モーターを使用した、超小型 XYZ 回転ステージである。モーターを含めて、24 ミリ角高さが 18mm と超小型ステージが完成した(Fig.7)。これは NanoStep プロジェクトでの技術的な革新の一つである。

この上にセットされる結晶成長セルでリゾチーム結晶の成長速度の過飽和度、ダイマー濃度依存性測定をする。その際の成長速度は、 10^{-2}nm/s と僅かであり、熱膨張などによる結晶表面位置の変位のほうが遥かに大きい。そのために、TR-1A ロケット実験で培った結晶成長速度測定方法を採用する。そこでは、結晶表面の観察視野内に成長しない参照面を置き、それとの差をとることで結晶成長面の変位量を精密に測定することにする。TR-1A ロケット実験で採用したこの方法は、その後、 10^{-5}nm/s という遅い成長・溶解速度まで測定できるようになり、空気中の炭酸ガス固定化、核廃棄物処理などの分野にも応用が進んでいる。

Regrowth of chemically fixed crystal

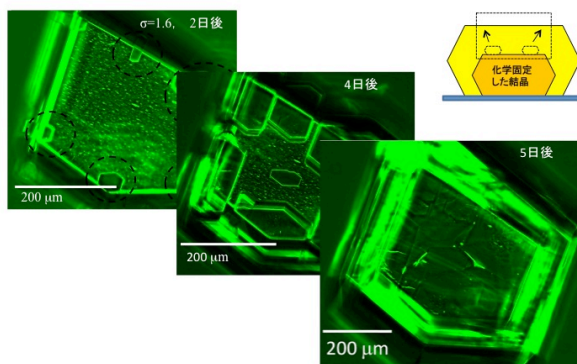


Fig. 8 recovery process of chemically coated seed surface.

実験に際してもう一つの重大な問題がある。それは、実験開始までの温度制御である。タンパク質の結晶は温度により溶解度が違う。したがって、正確な温度制御をしていないと、種結晶が溶けたり、逆に、多数の不要な結晶が発生して成長速度実験ができない。高度な宇宙実験施設であるにも関わらず、打ち上げ前から実験開始まで溶液の温度制御は全くできない。その解決方法として採用したのが、結晶表面だけを化学的に処理する方法である。これにより、溶液を飽和温度以上にあげても種結晶が溶けない。はたして、化学処理した結晶表面がもとの綺麗な結晶表面に再生するかを試したのが Fig.8 の連続写真である。位相に敏感な位相差顕

微鏡で観察すると、処理後は荒れた結晶表面であるが、時間とともに薄い分子ステップが結晶表面を覆うようになり、この重大な問題は解決された。

6. Post NanoStep

欧州の溶液結晶成長トピカルチームの主力はスペインとベルギーである。2008年にはベルギーチームが中心となって宇宙基地でのタンパク質結晶成長実験を行った。しかし、その実験は必ずしも成功しなかった。これは溶液からの結晶成長実験の難しさを示している一方で、ESA側の装置開発がうまくいっていないことも示している。

1990年代にTR-1Aで初めて干渉計を使った実験を我々が開始してから、NASAとESAは干渉計の開発を行って、日本の開発に追いつこうとしてきた。しかし、これらの開発が成功していないのは、彼らの、この分野での技術力の不足である。今後、これらの実験を成功に導くには、日本との共同開発が不可欠といえる。さもないと、タンパク質を含む溶液結晶成長実験そのものが危うくなる。

2012年に予定されているNanoStep計画の装置開発は、いくつかの壁を乗り越えて順調に進んでいる。このように時計のようにコンパクトで、かつ、多機能な結晶成長装置は世界中見渡してもどこにもない。したがって、欧州のトピカルチームでは、この装置をそのまま使用してPost NanoStep実験を実施したい意向も強く示している。これらの研究者側からの調整は現在も進められている。