

“成長メカニズムに依存するタンパク質結晶の完全性”研究ワーキンググループ報告

塚本勝男(東北大・院・理)、松浦良樹(阪大・タンパク質研)、橘勝(横浜市大・総合理学)、入澤寿美(学習院大・計算機セ)、森勇介(阪大・工)、奥津哲夫(群馬大・工)、和泉研二(山口大・教育)、西村良浩(レーザーテック)、吉崎泉(JAXA)、佐崎元(東北大・金研)、小沼一雄(産総研)、横山悦郎(学習院大・計算機セ)、小島謙一(横浜市大・総合理学)

Report from the WG of “Dependence of Growth Condition on The Perfection of Protein Crystals”

K. Tsukamoto¹, Y. Matsuura², M. Tachibana³, T. Irisawa⁴, Y. Mori⁵, T. Okutsu⁶, K. Waizumi⁷, Y. Nishimura⁸, I. Yosizaki⁹, G. Sasaki¹⁰, K. Onuma¹¹, E. Yokoyama⁴, K. Kojima³

¹Grad. Science, Tohoku University, ²Institute for Protein Research, Osaka University, ³Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, ⁴Computer Center, Gakushuin University, ⁵Department of Electrical Engineering, Osaka University, ⁶Department of Engineering, Gunma University, ⁷Department of Chemistry, Faculty of Education, Yamaguchi University, ⁸LaserTech Co. Ltd, ⁹JAXA, ¹⁰Institute of Material Science, Tohoku University, ¹¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

ktsuka@mail.tains.tohoku.ac.jp

Abstract: Correlation between the surface topography of lysozyme crystals which were grown in well controlled condition and X-ray topography of the crystals using monochromatic synchrotron beams were for the first time performed. It was found that the difference of growth step propagation will show up different contrast in the topography, which means that some of the inhomogeneity in the crystals are caused by the difference of step propagation. A new method to use a seed crystal for the X-ray topography is also proposed together with a new space experiment using Photon M3 for the mission in September 2007.

はじめに

本研究会は、タンパク質結晶の完全性が成長メカニズムにどう依存するかを多角的に調べることを目的とする。タンパク質結晶構造解析のために、結晶成長の知識が求められて久しい。結晶成長の分野におけるこの10年ほどの研究で、タンパク質結晶においても、他の無機結晶と成長の基本原理は同じであることが明らかにされてきた。そのため、タンパク質結晶の核形成・成長過程も、無機結晶と同様に、過飽和度の関数として同じ結晶成長理論で理解することができる。また、従来の結晶成長の研究手法、例えば、表面観察、拡散場の測定、等がタンパク質結晶においても重要な研究手段となる。

しかしながら、やはり、無機結晶とタンパク質結晶の成長の仕方は多くの点で異なることも同時に明らかにされてきた。タンパク質結晶での過飽和度の定義、成長速度、欠陥の導入のされ方、欠陥の階層性などを無機結晶と同じ指標で比較すると、大きく異なる。巨大な分子性結晶の成長は、コロイド結晶、フォトニック結晶などと共通のサイエンスがあることが明らかとなったのも、この10年間のタンパク質結晶成長研究の研究成果であろう。マクロ分子からなる結晶の成長に広がる新たなサイエンスを開拓することが、このワーキンググループが目指す次のステップである。

構造生物学の分野からは、タンパク質結晶を結晶成長

学に基づき理解しようとする我々の研究に対して、“このような研究をしても構造が未知である新規タンパクを結晶化させるためには役には立たない”、という批判も聞かれる。タンパク質が有する結晶化パラメータがあまりに多いことがその原因である。確かに現状では、新規タンパク質の結晶化条件を結晶成長学に基づき予測することはまだ不可能であるが、いったん晶出した結晶核を高品質な結晶に成長させるためのサイエンスは十分に熟成されてきた。また、放射光を利用したX線トポグラフ法を用いて、タンパク質結晶内部の欠陥や完全性を可視化する研究も格段の進展を遂げている。我が国で開発されてきたこれらの手法は国際的にも高く評価されており、本分野で世界をリードする状況にある。

本ワーキンググループでは、我が国でこれまで別個に研究されてきた、分子レベルで成長表面を“その場”観察する方法と、放射光を使用したX線トポグラフ法で結晶内欠陥や完全性を可視化する方法を総合し、タンパク質結晶の成長条件と発生する格子欠陥との相関の解明を目指す。そのために、まずこれらの研究方法の有効性を吟味することから共同研究を開始してきた。そして、不純物分子などによる表面モルフォロジーの変化やステップ成長速度の変動、欠陥発生などをとらえ、完全性との相関を明らかにしつつある。擾乱のない環境での光学観察が望ま

しいことから、回収衛星等を用いた宇宙実験を目指した研究を進めている。

経緯

タンパク質結晶の完全性評価研究を遂行するためには、従来のエックス線回折法だけでなく、他の方法を併用して総合的に行う必要がある。このために我々は、位相差顕微鏡、干渉法、光散乱法や欠陥のひずみを結像する偏光顕微鏡などの光学的方法も併用する。さらに、不純物分子を混入させたときの結晶成長のその場観察を同時に行うことで、結晶成長の素過程と完全性との相関を解明する。本研究班では、この研究を総合的に実施する体制を構築し、研究を実施する。

これまでの2年間の活動で、

- ・ 結晶欠陥の偏光顕微鏡法、位相差顕微鏡法による可視化
- ・ シングルレイヤーエッチング法などによる品質評価
- ・ 放射光を利用したトポグラフ法／ロッキングカーブ幅計測による結晶の欠陥の評価
- ・ リアルタイム位相シフト法などの光学的手法による成長表面の解析と成長速度測定－流れによりもたらされる不純物分布の影響評価
- ・ 蛍光ラベリング法による単分子不純物の結晶表面でのその場観察

に関してメンバー同士の共同研究による大きな成果があり、研究チームとして具体的に微小重力実験を計画する段階にいたっている。

研究成果

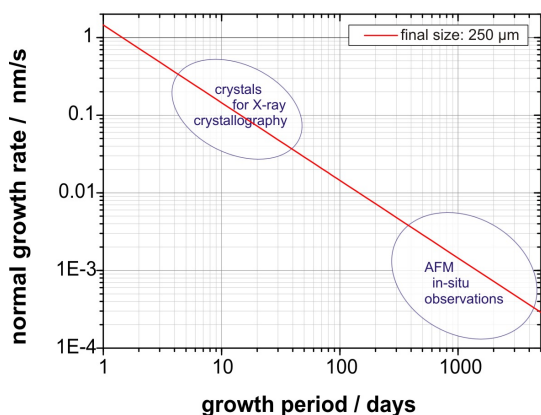


fig.1 Comparison of growth rates for X-ray crystallography and for surface observation to investigate growth mechanism. Both are two-order of magnitude different. Lysozyme.

結晶構造解析やX線回折からの完全性評価の研究の問題点は、使用された結晶の成長条件が分からない

ことである。多くの文献や研究者からのデータを総合すると、X線回折用につくられる結晶の成長速度は、結晶成長メカニズム研究のときに使用される場合に比べて2桁ほど大きいことがわかる、図1。これでは両者が歩み寄って結晶の評価をしても、全く別の結晶について議論しているに等しい。

これまでAFMで結晶表面の観察を行われてきたが、結晶成長速度が速いとAFMの撮影が追いつかないという時間分解能の問題がある。この問題を、光学的な高分解“その場”観察装置で解決した¹。最新の装置で撮影した、高純度リゾチーム結晶の表面パターンを図2に示す。共焦点位相シフト干渉計を新たに開発してタンパク質結晶の“その場”観察に使用した。

光学的な測定では、AFMでは測定できない高過飽和度下(X線回折用結晶を作るときの過飽和度)でも成

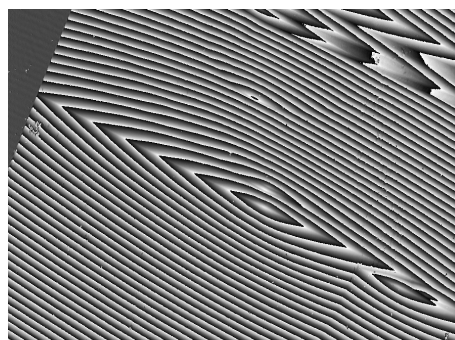


fig.2 Phase-shift interferogram from a lysozyme crystal, (110) by Laser-confocal phase-shift interferometry (LCPSI), which was developed for the present project. Spiral hillocks are present. Growth from 99.99% purity solution.

長表面を観察することができるため、成長速度の過飽和度依存性などのデータが2以上の高過飽和状態でも取得できる。その領域では、これまでのステップ成長ではなく、セル構造のような分域に分かれる。このような構造はモザイク構造との関連で重要となろう、未発表。

結晶の完全性の評価方法としてX線トポグラフが知られている。最近はかなり解像度が上がってきたが詳細な研究は光学的な方法が得意である。小野らは成長している単分子ステップに含まれる微細な欠陥を調べる

¹ ① P. Dold, E. Ono, K. Tsukamoto, G. Sazaki, Step velocity in tetragonal lysozyme growth as a function of impurity concentration and mass transport conditions. J. Crystal Growth 293, 102-109, 2006.

② G. Sazaki, K. Tsukamoto, S. Yai, M. Okada, K. Nakajima, In situ observation of dislocations in protein crystals during growth by advanced optical microscopy, Crystal Growth & Design 5 No.5, 1729-1735, 2005.

ために新たな単分子エッチング法を開発した。図3に一例を示したが、右の平坦面は2次元核のひろがり

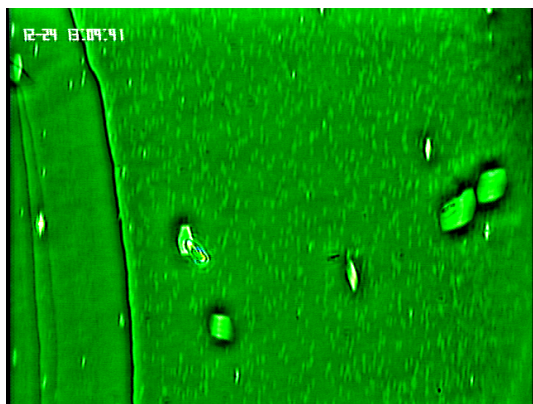


fig.3 Phase-contrast micrograph, showing spiral steps on the left and steps formed by 2D nucleation growth on the right. Note the development of many shallow etch pits (white dots) only on the right side.

出来た表面、左の曲線で囲まれている一部がラセンステップでできた領域である。写真で明らかなように、2次元核で覆われた表面には多数の小さなエッチピット(深さは数 nm、白く現れている)が出現する。このことは、ラセンステップには微細な欠陥が含まれにくいことを示しており、同じ成長条件であっても、ステップの成長メカニズム(発生のメカニズム)によっても欠陥の入り方が違うことを示している。

このように、結晶表面に成長のメカニズムや欠陥の情報が色濃く残されている。したがって、結晶表面とX線トポグラフィとの対応ができれば研究が飛躍的に向上することが期待できる。これまで、この研究がなかったのは、①高過飽和度での成長表面を観察する手法を持たなかった、②高解像のX線トポグラフィの技術がなかった、③X線トポグラフィ用の大きく、かつ、成長条件(特に過飽和度)を制御した環境で成長させた結晶の育成、などの条件が整わなかったためである。この①は東北大での研究、②は横浜市大での研究、③はこのWGでの研究活動によって、結晶表面と内部との対応に成功した。

図4に一例を示す。上の図はX線トポ撮影後の結晶表面、下の図はX線トポグラフィである。結晶面の上部と下部(写真上)から中央部に向かってラセンステップが半月状(①~③)に広がっているのが明らかである。つまり、この結晶表面は中央部が $2\mu\text{m}$ 程度凹んだ状態であり、このマクロステップの形状はX線トポグラフィでも明瞭に観察される。

このマクロステップのコントラスト(①~③)が、なぜX線トポグラフィで現れるかについては次の2つの解釈が

ある。(1)マクロステップ自身に歪みをもつ。例えば、図3で調べられたような微細欠陥がマクロステップ、特に、その先端部に含まれる。(2)この結晶は約 $500\mu\text{m}$ の大きさの種結晶を利用し約 $50\mu\text{m}$ の結晶を高純度溶液から overgrowth させたものである。よって、overgrowth した薄い結晶の完全性が良ければ、完全性の指標になるペンデレフリンジ(Pendelloesung fringe)²が現れても良い。実際、この結晶の断面は両端からのラセン成長ステップが中央部で衝突する状態で、断面をとると2つのくさび形が向かい合うようになり、干渉縞

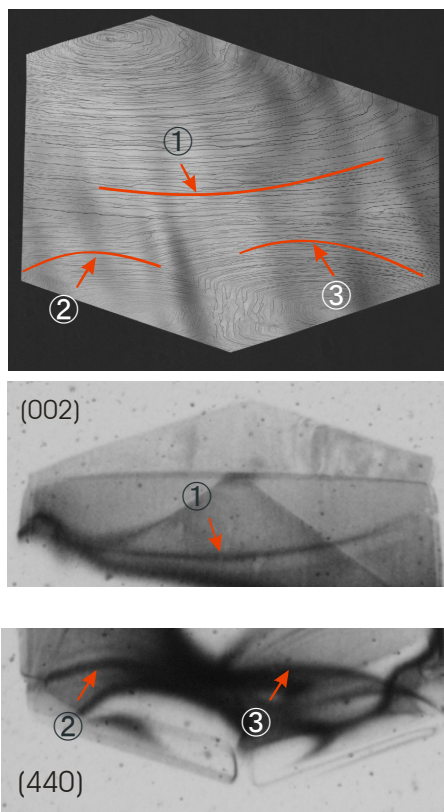


fig.4 Confocal surface image, up and X-ray topographic image, down. Note that the spiral steps ①-③ on the surface topography appear in the contrast of the X-ray topography. Monochromatic beam, unpublished.

に相当するペンデフリンジ(Pendelloesung fringe)が現れても良い。

これまでのデータ解析では、(2)の考え方が有力であり、タンパク質結晶の完全性の評価に Pendelloesung

² 例えば、B.K. Tanner, in “X-ray Diffraction Topography”, Pergamon 1976.

fringe が使用できるという最初の例となる。この考えを検証するために、今年度に再度、放射光によるX線トポグラフの測定を行う。

このような Pendelloesung fringe を結晶の完全性の評価に利用することができるならば、X線トポグラフ取得のために 1mm もの大型結晶を作製する必要もない。つまり、大型の種結晶を下地として準備できれば、宇宙実験のように短時間の実験でも、X線トポグラフと結晶表面の観察を対応させた研究を行うことができる訳である。

宇宙実験計画



fig.5 Scheduled crystal growth experiment using Russian satellite in 2007.

このようなWGの活動は活発に進展しており、その、一つのアウトプットとしてロシアの回収型衛星、Photon M3（図5）を利用したタンパク質結晶の成長実験を2007年9月行う予定である。これは、スペインの Garcia

Collaboration with European Groups in Space Utilization

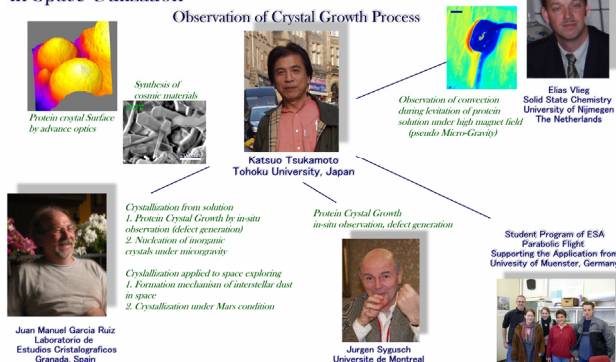


fig.6 International collaboration for the continuation of the present WG. Japan-Spain-The Netherlands-Canada-Germany.

Ruitzとの共同研究であり、ESA-JAXAの共同研究の一環 (Topical Team on Crystal Growth)として公式的にも

認められている。

これらの実験準備や結果の解析には、図6に示した欧州、カナダの研究グループとの協力体制ができている。