

# 宇宙航空研究開発機構研究開発報告

JAXA Research and Development Report

---

## タンパク質結晶成長研究における化学固定法の利用

吉崎 泉・栄 龍・足立 聡・依田 眞一

飯村 好和・福山 誠二郎・小松 啓

2006年3月

宇宙航空研究開発機構

Japan Aerospace Exploration Agency

# タンパク質結晶成長研究における化学固定法の利用

吉崎 泉\*<sup>1</sup> 栄 龍\*<sup>1</sup> 足立 聡\*<sup>1</sup> 依田 眞一\*<sup>1</sup>  
飯村 好和\*<sup>2</sup> 福山 誠二郎\*<sup>2</sup> 小松 啓\*<sup>1</sup>

## Utilization of chemical fixation in the field of protein crystal growth studies

By

Izumi YOSHIZAKI\*<sup>1</sup>, Long RONG\*<sup>1</sup>, Satoshi ADACHI\*<sup>1</sup>, Shinichi YODA\*<sup>1</sup>,  
Yoshikazu IIMURA\*<sup>2</sup>, Seijiro FUKUYAMA\*<sup>2</sup>, and Hiroshi KOMATSU\*<sup>1</sup>

**Abstract:** Two experimental techniques which can be applied to protein crystal growth studies in space are introduced. Chemical fixation of protein crystals enabled the visualization of fluorescence distribution in the protein crystal and the production of reusable seed crystals.

**Keywords:** Protein, Lysozyme, Chemical Fixation, Seed Crystal, Glutaraldehyde

### 概 要

タンパク質結晶はもろいために種結晶の利用が難しい。また、水分を多く含んでおり、切片作成などによる結晶内部の観察が困難である。本研究では、グルタルアルデヒドによる結晶の化学固定を行うことでこれらの問題を克服し、種結晶の作製及び結晶内部の蛍光観察に成功した。これらの技術は宇宙実験において有効活用できる。

### 1. は じ め に

高品質タンパク質結晶を得るために、結晶成長メカニズムの研究が精力的になされている。我々は、高品質タンパク質結晶育成に重力が及ぼす影響を研究しているが、実験上、二つの問題点があった。一番目の問題点は、実験を正確な過飽和度で再現性よく行うために、系の中に種結晶を一つだけ設置することが必要であるが、タンパク質結晶はもろく、種結晶のハンドリングによって結晶の一部が崩れて周辺に散らばり、多結晶になってしまうことである。二番目の問題は、結晶への不純物の取り込みと結晶品質との関連を調べる上で、結晶内部の不純物分布を調べる必要があるが、結晶は水分を50%程度含んでおり、切断・切削等の加工による内部観察が不可能であることである。

本研究では、それらの問題点を克服するために、モデルタンパク質リゾチームの系で、グルタルアルデヒドを用いた結晶の化学固定を行うことを検討した。その結果、再利用可能な種結晶の作製及び結晶内部の蛍光観察に成功したので報告する[1,2]。

---

\* 1 Japan Aerospace Exploration Agency, The Institute of Space and Astronautical Science (JAXA/ISAS), ISS Science Project Office  
\* 2 Advanced Engineering Services Co., Ltd. (AES)

## 2. 再利用可能な種結晶の作製

### 2.1. 背景

結晶成長実験において種結晶が広く利用されている。種結晶の方位を引き継いで大きな結晶を成長させるという本来の目的のほかに、核形成しにくい溶液中で、確実に結晶を成長させるための核として用いる。特に宇宙実験においては、結晶成長実験を所定の時間に所定の位置で開始するために、種結晶の利用は有効である。しかし、タンパク質結晶の場合、結晶がもろいために、容器内への設置が困難であること、温度変化によって種結晶が溶けたり、結晶成長溶液中に凝集が発生するなど様々な問題があり、種結晶はあまり利用されていない。そのため、種結晶としての機能を保持し、ハンドリングによって崩れず、なおかつ温度変化や濃度変化によっても溶解しにくいタンパク質種結晶が切望されている。

グルタルアルデヒド等を用いてタンパク質結晶を化学的に固定（タンパク質分子同士を架橋）することにより、結晶を硬化できることが知られている[3-7]。ところが、このような化学的な処理を行うことにより、結晶の格子定数が変化することが考えられることから、この結晶を用いてエピタキシャルな成長あるいは単結晶成長を行うことは困難と考えられてきた。しかし、化学固定条件を最適化することにより、結晶を硬化させ、溶解耐性を確保し、かつ最小限の格子定数の変化にとどめることができる条件があると考えられる。本研究では、物性が良く知られているリゾチームをモデル結晶として用い、化学固定条件の最適化を行った。次に、化学固定結晶上での結晶成長のその場観察を行い、種結晶としての機能、耐久性、格子定数などを調べた[1]。

### 2.2. 実験

#### 2.2.1. 試料準備

リゾチームは生化学工業から購入し、精製せずに使用した。種結晶用結晶の結晶化条件は、リゾチーム濃度 60-100 mg/ml, 2.5 % NaCl, 50 mM 酢酸バッファー (pH 4.5), 20°C であり、バッチ法で結晶化した。

結晶を化学固定するためのグルタルアルデヒドとして、和光純薬の電子顕微鏡用グルタルアルデヒドを用いた。結晶化溶液と同じ結晶化剤と緩衝剤を含む水溶液にグルタルアルデヒドを終濃度 2.5 % 添加し、化学固定液とした。濃度は、研究報告[3,4]に基づいて決定した。グルタルアルデヒドのオリゴマー化を最小限に抑えるために、使用直前に化学固定液を調製した。

#### 2.2.2. 化学固定条件の最適化

化学固定液を調製後、種結晶とする結晶の入ったタンパク質溶液に化学固定液を添加し、化学固定を行った。反応温度は室温である。グルタルアルデヒド溶液は、タンパク質溶液中のタンパク質分子同士を凝集させる。凝集したタンパク質が種結晶に付着し、種結晶機能を阻害することを防ぐために、化学固定液はタンパク質溶液に対して大容量加えた。

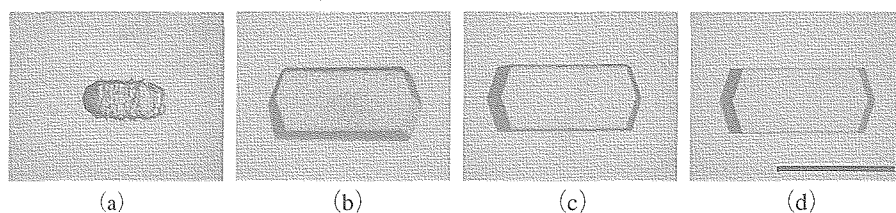


図1 溶解実験。化学固定時間を可変にし、溶解液につけた。(a) 20分固定, (b) 50分固定, (c) 80分固定, (d) 90分固定。スケールバーは500  $\mu\text{m}$ 。

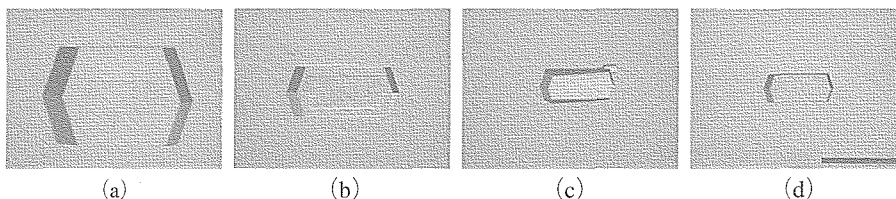


図2 成長実験の結果。化学固定時間を可変にし、成長溶液につけた。(a) 90分固定, (b) 6時間固定, (c) 1日固定, (d) 4日固定。スケールバーは500  $\mu\text{m}$ 。

化学固定反応時間の詳細な最適化のため、化学固定反応時間を10分から4日間まで変化させた化学固定結晶を作製し、耐溶解性を調べた。溶解実験は、50 mM 酢酸バッファー (pH 4.5) を用い、化学固定結晶がこの溶液中で1時間の間に溶解するかどうかを観察した。耐溶解性を調べた結果、40分以下の反応時間では、化学固定結晶が完全に溶解してしまうこと、70分から80分では結晶表面がわずかに溶解したが、90分間以上では全く溶解しなかったことが明らかになった (図1)。従って、耐溶解性の観点からは、少なくとも70分以上、用途によっては90分以上の反応時間が必要であることが分かる。

次に、90分から4日間の範囲で化学固定した結晶を用いて成長実験を行った。結晶成長条件は、リゾチーム濃度 40 mg/ml, 2.5 % NaCl, 50 mM 酢酸バッファー (pH 4.5), 20°C である (この条件は準安定領域であり、結晶は長時間生成しない)。この結果、90分の固定では、種結晶の上に結晶が成長することが分かった。一方、6時間固定した結晶では、成長量が減り、1日以上固定したものでは、種結晶の上に結晶が成長しないことが明らかになった (図2)。

溶解実験と成長実験の結果から、化学固定法の利用により、溶解耐性を持つ種結晶の作製が可能であることが明らかになった。また、リゾチーム結晶における最適な化学固定反応時間は70～90分間であることが分かった。

### 2.2.3. 格子定数の決定

70～90分化学固定した結晶は、種結晶として機能することが分かったが、実際に格子定数が同等かどうかを調べた。また、化学固定した結晶上に成長した結晶の格子定数も計測した。

結晶をキャピラリに封入し、高エネルギー加速器研究機構のBL-18 B で X 線回折実験を行った (課題番号 2003P005, 2004G173)。なお、化学固定結晶上に成長させた結晶の X 線回折像を得る際には、成長領域にのみ X 線が照射されるよう、結晶の位置を調整した。解析には、HKL 2000 を用いた [8]。結果を表 1 に示す。化学固定した結晶が ccl-1～4, 固定していない結晶が ag-1～3 で、種結晶の上に成長させた部分が gl というサンプルである。

化学固定によって、a 軸、b 軸方向に対してはほとんど変化が見られないが、c 軸方向に対しては、0.16Å (0.42%) 小さくなっていることが分かる。一方、種結晶上に成長した部分の格子定数は、化学固定していない結晶の格子定数と一致することが明らかになった。また、X 線回折の結果、種結晶上の成長部分は単結晶であることが分かった。化学固定により c 軸の格子定数が変わっているにも関わらず、種結晶上に成長した部分の格子定数が、化学固定前の格子定数と一致したことから、成長時に欠陥などが導入されたことにより、格子不整合が緩和または解消され、エピタキシャルな成長とその後の単結晶成長を可能にしたと考えられる。

表 1 X 線回折実験結果

Sample ID	Condition	Space Group	Unit-cell parameter (Å)	
			a,b	c
ccl-1	Chemically cross-linked	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	79.21	37.83
ccl-2	Chemically cross-linked	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	79.20	37.81
ccl-3	Chemically cross-linked	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	79.21	37.82
ccl-4	Chemically cross-linked	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	79.23	37.80
Average			79.21	37.82
Standard deviation			0.01	0.01
ag-1	As-grown	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	79.17	37.97
ag-2	As-grown	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	79.17	37.97
ag-3	As-grown	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	79.17	37.99
Average			79.17	37.98
Standard deviation			0.00	0.01
gl	Crystalline layer on the cross-linked crystal	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	79.17	37.98

### 2.2.4. 種結晶上の成長の様子

種結晶上の成長がどのように行われているかを、光学顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡 (キーエンス社, VK-9500) などで調べた。図 3 は、光学顕微鏡を用いて成長の様子をとらえたものである。(a) で何もなかったところに (b) で表面に結晶

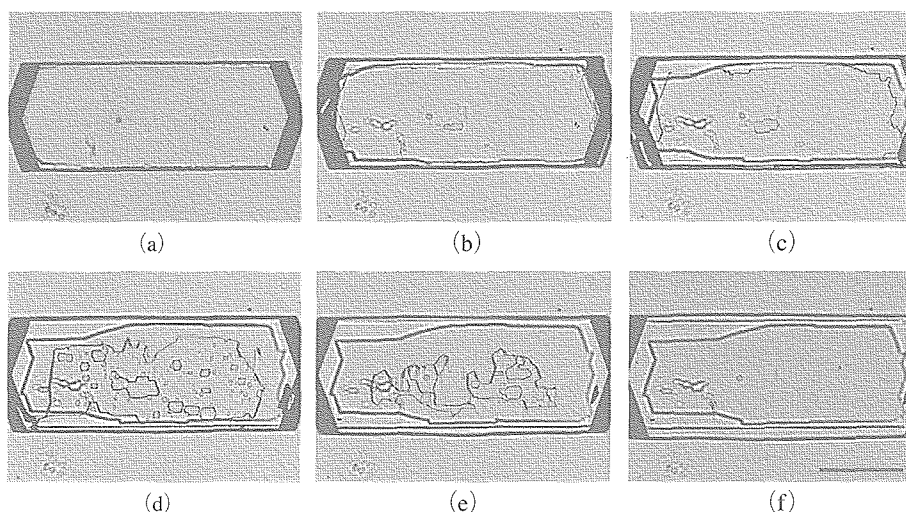


図3 固定した結晶を結晶成長溶液に入れたときの時間変化. (a) 0時間後, (b) 2時間後, (c) 3時間後, (d) 4時間後, (e) 5時間後, (f) 6時間後. スケールバーは100  $\mu\text{m}$ .

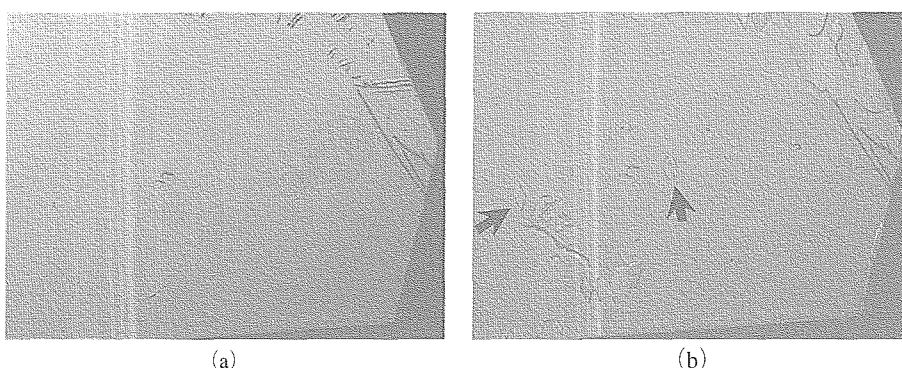


図4 種結晶表面での成長の様子. (a) 結晶成長開始から1分後. (b) 結晶成長開始から3時間後. 矢印のところに成長島が見られる.

島が現れ, (c), (d) で結晶島が大きくなるとともにその数を増やし, (e) で合体し, 最後には, (f) のように表面すべてを覆っていく様子が観察された.

図4は共焦点レーザー顕微鏡を用いて表面を詳細に観察したものである. (a) は種結晶の成長を開始して1分後の表面である. 成長前にも観察されていたステップが見える. (b) は成長開始3時間後の表面である. ステップが成長しているのではなく, 表面上で新たな結晶島が形成されているのがわかる. 顕微鏡観察で判断する限り, 方位は種結晶と合致している. このあと結晶島が広がり, 表面上を覆っていった. 新たな結晶島の形成により種結晶上の成長が進行することから, 種結晶とその後の成長領域の格子不整合は結晶島形成の際に解消しているものと考えられる.

### 2.2.5. まとめ

タンパク質結晶をグルタルアルデヒドで化学固定することにより, 種結晶として使用できることを明らかにした. 低過飽和度で長時間成長させれば, 図5に示すような4 mmを越す大型結晶も育成可能である. また, 成長した部分は, 緩衝液に入れば溶解し, 種結晶のみに戻る. この種結晶は再利用も可能であるため, 同じ種結晶を利用した再現実験なども容易である. 2.5% NaCl, 50 mM 酢酸バッファー (pH 4.5) 溶液中では長期にわたり保管が可能であるため, 宇宙実験時の利用なども期待できる.

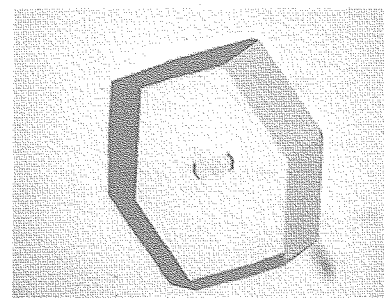


図5 種結晶を使って育成した大型結晶の例.

### 3. 蛍光ラベルを用いた結晶内部の観察

#### 3.1. 背景

高品質タンパク質結晶成長における微小重力効果のひとつとして、不純物拡散層効果が挙げられる[9]。我々は、対流強度と不純物の結晶内への取り込みの分布、結晶品質との関係を検証するために、結晶内部の不純物分布観察を試みている。不純物を蛍光ラベルすることにより、蛍光顕微鏡やレーザー共焦点顕微鏡などを利用すれば結晶内部が全体的に光っている様子はとらえることができるが、結晶が観察用セルのガラス面から成長するなど特殊な条件を満たさない限り、内部分布を詳細に調べることは困難である。実際の宇宙実験でよく用いられる蒸気拡散法やゲル法などを用いても、不純物の取り込みを可視化できる方法が必要である。

そこで、グルタルアルデヒドによる結晶の化学固定を行うことにより、結晶を硬化させ、樹脂で包埋し、機械的に結晶をスライスして内部を連続的に観察することを試みた[2]。また、この手法を包埋法と呼ぶことにする。

#### 3.2. 実験

##### 3.2.1. 試料準備

モデルタンパク質として、リゾチームを用いた。リゾチームは再結晶・イオン交換クロマトグラフィー法により高純度(99.99%以上)に精製するとともに、結晶品質に影響を与えられとされる不可逆ダイマーを不純物として用いることとし、ゲルろ過クロマトグラフィー法により精製単離した。また、結晶内部の不純物分布可視化のために、Alexaキット(Molecular Probes Inc.)を用いて不可逆ダイマーを蛍光ラベルした。結晶化条件は、リゾチーム 15 mg/ml, 6% NaCl, 50 mM 酢酸バッファー (pH 4.5), 20°Cであった。不純物を加えた結晶化条件は、上記の条件に0.075 mg/mlの終濃度で蛍光ダイマーを加えた。

固定に用いるグルタルアルデヒドは、不純物を含む「化学用」(CMG)をキシダ化学、精製度の高い「電子顕微鏡用」(EMG)を和光純薬より調達した。包埋樹脂としてはヒストレジン(LKB Leica)、封入剤にはMerckのエンテラン・ニューを用いた。その他の試薬は、和光純薬の試薬特級を用いた。

##### 3.2.2. 化学固定方法の検討

2項で述べた種結晶とは異なり、化学固定後の結晶をスライスするため、固定条件の最適化を行った。まず、電子顕微鏡用のグルタルアルデヒドを2.5%、6% NaCl, 50 mM 酢酸バッファー (pH 4.5)に調製し、3時間から8日間、室温でリゾチーム結晶を固定した。樹脂に包埋後、マイクロームでスライスしたところ、図6(a)–(d)に示すようにいずれも表面に大きなクラックがみられた。そこで、化学用のグルタルアルデヒドで同様の実験を行ったところ、固定時間12時間以下で

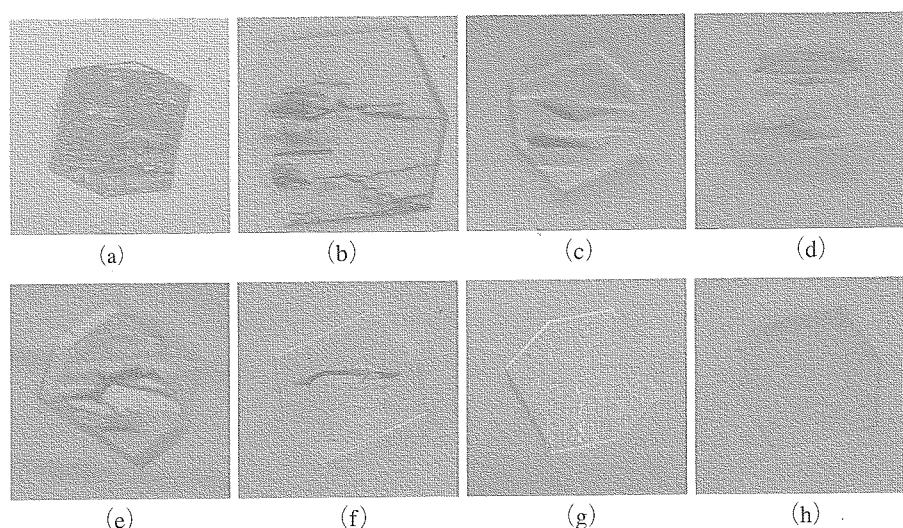


図6 固定した結晶の切断面。電子顕微鏡用グルタルアルデヒド (EMG) で (a) 3時間, (b) 12時間, (c) 2日, (d) 8日固定したもの。下段は化学用グルタルアルデヒド (CRG) で (e) 3時間, (f) 12時間, (g) 2日, (h) 8日固定したもの。

はやはりクラックが見られたものの (図 6 e, f), 2 日以上固定ではクラックのないスライスを得ることができた (図 6 g, h).

不純物を含む化学用グルタルアルデヒドは, 重合したグルタルアルデヒドを多く含んでいる. この重合グルタルアルデヒドは広範囲にわたる架橋を行うには有効であることが報告されていることから[10–12], 結晶内の空間的に離れた位置にあるタンパク質分子同士を架橋したために弾力性を持ち, 機械的スライスによって碎けにくくなったのではないかと推測している. 以上から, 化学固定には化学用グルタルアルデヒドを用いることとした.

### 3.2.3. 包埋法プロトコール

最終的に決定したりゾチーム包埋法プロトコールを以下にまとめる.

#### ① 固定

化学用グルタルアルデヒドで, 2 日間以上固定する. 固定溶液は結晶育成条件の結晶化剤濃度とグルタルアルデヒド 2.5% を含む酢酸バッファーとする. 固定後は, 結晶化剤を含むバッファーで 3 回液交換する.

#### ② 脱水

エタノール 50, 70, 80, 90, 95% 溶液を調製し, 50% から順に結晶に添加する. 各々の添加時間は 30 分間とし, エタノール高濃度溶液側へ移行していく.

#### ③ 包埋

ヒストレジン浸透液と 95% エタノールを等量ずつ混ぜた溶液を結晶に添加し 1 時間浸透させた後, ヒストレジン浸透液 100% に移し一晩浸透する. その後, 結晶の向きを調節した状態で重合させ, 結晶を包埋する.

#### ④ スライス

包埋した結晶を, ミクロトームを用いてスライスする. 切り出した切片は, 水中で伸展させ, スライドガラス上に貼り付け, 切片の水分を乾燥させた後, 封入剤 (エンテラン・ニュー) で封入する. 切片の厚みは,  $0.5 \mu\text{m}$  から数十  $\mu\text{m}$  まで可変である.

### 3.2.4. 観察

次に, 3.2.3 項で示した方法で, 蛍光不純物を含む結晶の固定, 包埋, スライスを行い, 結晶内部の蛍光不純物分布を実際に確認した. 結晶はゲル中で結晶化した. 観察にはライカ社の共焦点レーザー顕微鏡を用い, 蛍光色素の励起波長 488 nm で励起した.

予想される結晶のセクター構造を図 7 に示す. 結晶の端から, 110 面に垂直にスライスしたものを図 8 に, 110 面に平行にスライスしたものを図 9 に示す. 色が明るい方が (黄色), 蛍光強度が強い.

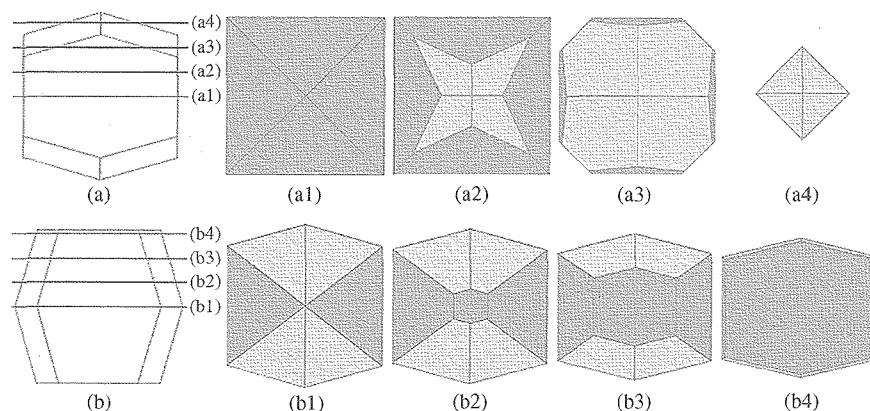


図 7 結晶を切断したときに現れるセクター構造

図 8, 9 の連続画像から, セクター構造が図 7 で予想したとおりに可視化されているのがわかる. また, 図 8 (n), 図 9 (n) が結晶中心にあたるが, これらの図から, 結晶成長に伴って取り込みが減少している様子が分かる. この結晶化条件では分配係数は 1 以上であるため[13], 対流が少なければ結晶成長に伴って不純物の取り込みは減少する. すなわち, 本実験結

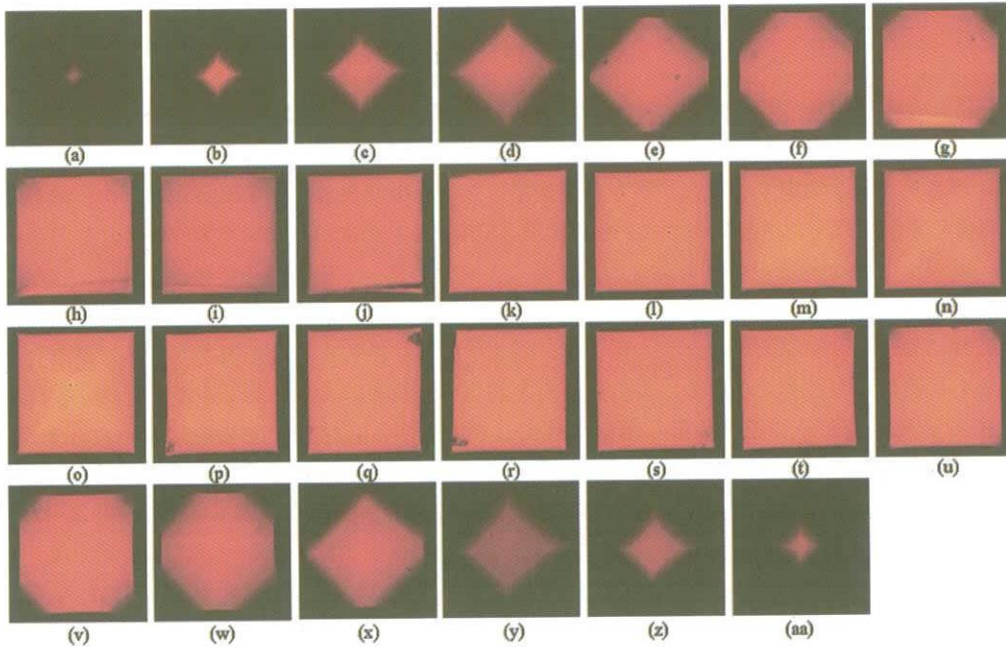


図8 蛍光ダイマーを結晶に取り込ませ、c軸に垂直な方向で結晶をスライスし、共焦点レーザー顕微鏡で観察したもの。図のサイズは  $(300 \mu\text{m})^2$ 。

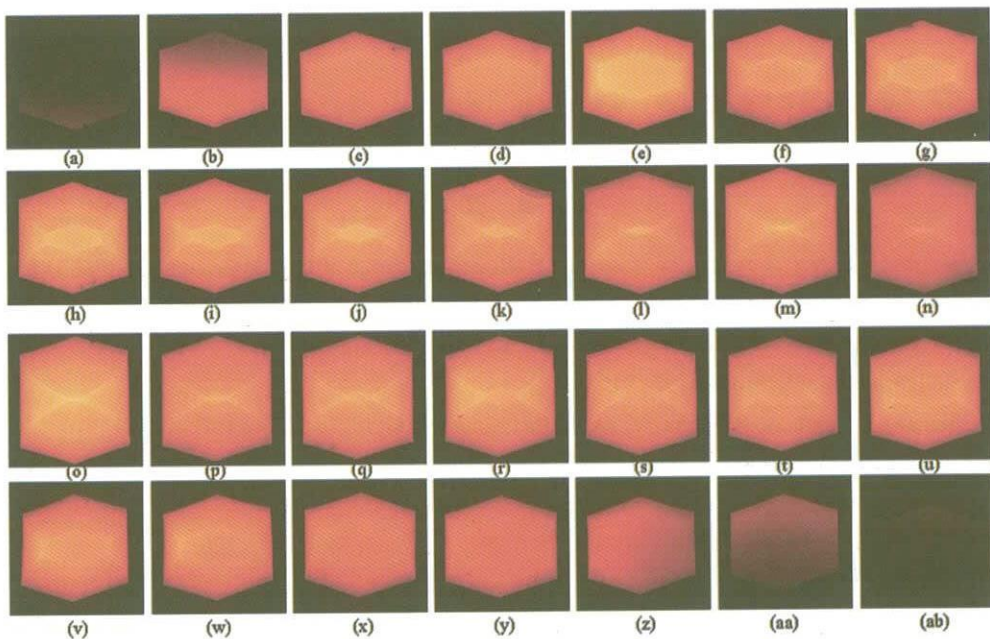


図9 蛍光ダイマーを結晶に取り込ませ、c軸に平行な方向で結晶をスライスし、共焦点レーザー顕微鏡で観察したもの。図のサイズは  $(350 \mu\text{m})^2$ 。

果は予想通りの不純物分布を可視化できており、不純物分布が化学固定後にもそのまま維持されていることが分かる。また、取り込みは101面より110面に多いことが明確に示されている。

### 3.2.5. まとめ

包埋法の利用により、蒸気拡散法やゲル法、バッチ法などで育成した結晶の連続切片を作製し、内部の不純物分布やセクター構造を調べることが可能であることが分かった。この手法を利用して、対流強度の違い、分配係数の大小による不純物分布の変化などを調べることができる。



#### 4. 終わりに

化学固定法の利用によって、再利用可能なタンパク質種結晶の作製、および結晶内部の蛍光不純物分布観察に成功した。

第一に、タンパク質結晶はもろく、種結晶を用いた結晶成長実験が困難であったが、モデルタンパク質リゾチームの結晶をグルタルアルデヒドで化学固定することにより、種結晶として使用できることを明らかにした。結晶化溶液と同じ結晶化剤と緩衝剤を含む水溶液にグルタルアルデヒドを終濃度 2.5 % 添加したものを化学固定液とし、この溶液中に結晶を 70 ~ 90 分静置することで、溶解耐性を持つ種結晶を作製することができた。この種結晶の格子定数は、化学固定しないものと比較して若干の変化が見られたが、種結晶上で成長した部分の格子定数は、化学固定しない結晶と同じであった。このことから、再成長時に欠陥などが導入されたことにより、格子不整合が緩和または解消され、エピタキシャルな成長とその後の単結晶成長を可能にしたと考えられる。この種結晶を利用することにより、同じ結晶を使用して成長・溶解を繰り返す実験や、系の中に種結晶を一つだけ設置し溶質濃度変化を計測する実験などが可能になった。また、2.5 % NaCl, 50 mM 酢酸バッファー (pH 4.5) 溶液中では長期にわたり保管が可能であるため、宇宙実験時の利用なども期待できる。

第二に、結晶への不純物の取り込みと結晶品質との関連を調べる上で、結晶内部の不純物分布を調べる必要があるが、結晶は水分を 50 % 程度含んでおり、切断・切削等の加工による内部観察が不可能であった。本研究では、グルタルアルデヒドを用いて結晶を化学固定し、結晶を硬化させ、樹脂で包埋し、機械的に結晶をスライスして内部を連続的に観察することに成功した。蛍光ラベルした不純物 (リゾチームダイマー) を加えて結晶化した結晶を化学固定・包埋・スライスして共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、蛍光ダイマーの結晶内部分布を明確に示すことができた。この「包埋法」の利用により、蒸気拡散法やゲル法、バッチ法などで育成した結晶の連続切片を作製し、内部の不純物分布やセクター構造を調べることが可能であることが分かった。この手法を利用して、対流強度の違い、分配係数の大小による不純物分布の変化などを調べることができる。

なお、タンパク質結晶成長研究についてはホームページにもまとめているため、こちらも参照されたい[14]。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Y. Iimura, I. Yoshizaki, L. Rong, S. Adachi, S. Yoda, and H. Komatsu, *Journal of Crystal Growth* 275 (2005) 554–560.
- [ 2 ] Y. Iimura, I. Yoshizaki, S. Yoda, and H. Komatsu, *Crystal Growth and Design* 5 (2005) 295–300.
- [ 3 ] F. A. Quiocho, Frederic M. Richards: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 52 (1964) 833–839.
- [ 4 ] F. A. Quiocho: *In Insolubilized Enzymes* (1974) 113–122.
- [ 5 ] A. Yonath, A. Sielecki, J. Moulton, A. Podjarny, W. Traub: *Biochemistry* 16 (1977) 1413–1417.
- [ 6 ] V. N. Morozov, T. Y. Morozova: *Biopolymers* 20 (1981) 451–467.
- [ 7 ] D. Häring, P. Schreier: *Current Opinion in Chemical Biology* 3 (1999) 35–38.
- [ 8 ] Z. Otwinowski, W. Minor: *In Methods in Enzymology* 276 (1997) Academic Press. 307–326.
- [ 9 ] A.A. Chernov, J.M. Garcia-Ruiz, B.R. Thomas, *J. Crystal Growth* 232 (2001) 184–187.
- [10] P. Monsan, G. Puzo, H. Mazarguil: *Biochimie* 57 (1975) 1281–1292.
- [11] K. Peters, F. M. Richards: *Ann. Rev. Biochem.* 46 (1977) 523–551.
- [12] C. J. Lusty: *J. Appl. Cryst.* 32 (1999) 106–112.
- [13] Y. Iimura, I. Yoshizaki, H. Nakamura, S. Yoda, H. Komatsu, *Crystal Growth and Design* 5 (2005) 301–305.
- [14] <http://www.isas.jaxa.jp/home/iss/Crystalgrowth/protein/index.html>

宇宙航空研究開発機構研究開発報告 JAXA-RR-05-035

---

発行 平成 18 年 3 月 31 日

編集・発行 宇宙航空研究開発機構

〒182-8522 東京都調布市深大寺東町 7-44-1

URL : <http://www.jaxa.jp/>

印刷・製本 (株) 東京プレス

---

本書及び内容についてのお問い合わせは、下記にお願いいたします。

宇宙航空研究開発機構 情報システム部 研究開発情報センター

〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1

TEL : 029-868-2079 FAX : 029-868-2956

---

© 2006 宇宙航空研究開発機構

※ 本書の一部または全部を無断複写・転載・電子媒体等に加工することを禁じます。

