



ISSN 1349-1113  
JAXA-RR-04-051

# 宇宙航空研究開発機構研究開発報告

## JAXA Research and Development Report

---

高品質タンパク質結晶成長に及ぼす  
不純物の影響に関する研究

吉崎 泉・栄 龍・足立 聡・依田眞一・小松 啓  
飯村好和・福山誠二郎・門脇昭夫

2005年 3 月

宇宙航空研究開発機構  
Japan Aerospace Exploration Agency

# 高品質タンパク質結晶成長に及ぼす 不純物の影響に関する研究

吉崎 泉<sup>1</sup>・栄 龍<sup>1</sup>・足立 聡<sup>1</sup>・依田 眞一<sup>1,2</sup>・小松 啓<sup>1,3</sup>  
飯村 好和<sup>4</sup>・福山 誠二郎<sup>4</sup>・門脇 昭夫<sup>2</sup>

## Impurity effects on the protein crystal growth and perfection

By

Izumi Yoshizaki<sup>1</sup>・Long Rong<sup>1</sup>・Satoshi Adachi<sup>1</sup>・Shinichi Yoda<sup>1,2</sup>・  
Hiroshi Komatsu<sup>1,3</sup>・Yoshikazu Iimura<sup>4</sup>・Seijiro Fukuyama<sup>4</sup>・Akio Kadowaki<sup>2</sup>

**Abstract** : The impurity effects on crystal growth and perfection was systematically studied with lysozyme and lysozyme dimer. X-ray diffraction experiment, rocking width measurement, X-ray topography, etching, AFM observation and fluorescence experiments revealed that impurities actually degrade the crystal perfection, and dislocations are the main cause.

**Key words** : Protein, Lysozyme, Perfection, Impurity, Defect

### 概 要

タンパク質結晶の成長と完全性に及ぼす不純物の影響を、ニワトリ卵白リゾチーム結晶を用いて明らかにした。

### 1 はじめに

タンパク質立体構造解明には高品質なタンパク質単結晶が必要であり、不純物が結晶品質に及ぼす影響の評価、及び品質を劣化させるメカニズムの解明が急務となっている。不純物が結果として結晶品質を劣化させることはこれまでに明らかにされているが、不純物が転位の発生源となるのかといった基本的な課題でさえも未解明である。一方、分配係数が1以上の系であれば、微小重力実験による不純物拡散層の形成による品質向上が見込めるため、微小重力効果の大きい実験の選抜のために、分配係数の計測や、どのような不純物が結晶品質に悪影響を及ぼすかの研究が重要である。

本研究では、モデル実験系として特性のよく知られているニワトリ卵白リゾチームを対象とし、リゾチーム2量体（ダイマー）を不純物として混入させた正方晶結晶を用いて、分配係数を計測するとともに、不純物が温度因子、ロッキングカーブ幅、表面モルフォロジー、結晶成長速度、結晶内部構造に及ぼす影響を明らかにした。

<sup>1</sup> 宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究本部 ISAS/JAXA

<sup>2</sup> 東京工業大学 総合理工学研究科

<sup>3</sup> 岩手県立大学 総合政策学部

<sup>4</sup> 株式会社 エイ・イー・エス

## 2 実験結果

### 2.1 試料準備

まず、リゾチーム市販試薬中に存在する不純物を電気泳動により特定した(図1)。リゾチームを再結晶・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[1], 結晶品質に影響を与えると考えられる不可逆ダイマーをゲルろ過クロマトグラフィー法により精製した[2]。また、不純物の分配係数計測及び結晶内部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。

結晶化は主として2.5%NaCl, 50mM 酢酸バッファー(pH4.5)を用い、20度で行った。

### 2.2 分配係数の計測

ダイマーの分配係数を電気泳動及び蛍光法で解析した。実効分配係数は、育成後の結晶を溶解させて電気泳動し、結晶中のモノマー/ダイマー比を、母液中のモノマー/ダイマー比で割ることで得られる。この結果、ダイマーの実効分配係数は塩濃度によって変化することが明らかになった(図2)[2]。

一方、ダイマーを蛍光ラベルし、結晶中の蛍光強度の変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することにより、分配係数が1以上であるか1以下であるかの違いを明確に可視化することができる。図3は塩濃度2.5%(分配係数1以下)と5%(分配係数1以上)における蛍光強度分布を示したものである。分配係数が1以下であれば、不純物が結晶から相対的に排除されるため、結晶周囲に不純物が滞留し、時間経過に伴って不純物の取り込みが増加する様子が明確に示されている[2]。すなわち、

対流のない微小重力環境で不純物取り込みが減少するのは分配係数が1以上のときである。

この手法の開発により、これまで知ることのできなかった結晶の内部についての情報を得ることが可能となった。

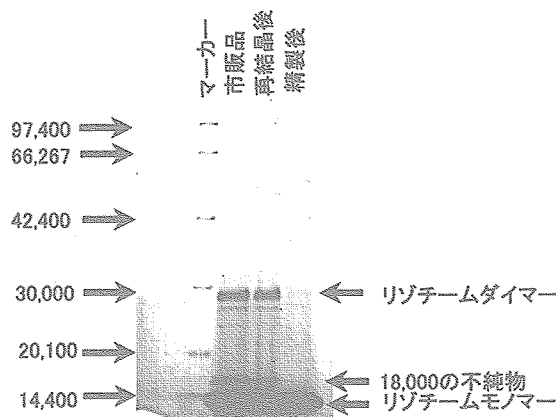


図1 電気泳動図

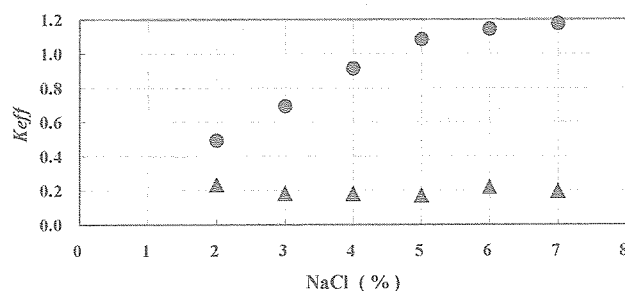


図2 塩濃度による実効分配係数の変化

●はダイマー、▲は18kDaの不純物

### 2.3 温度因子への影響

次に、高エネルギー加速器研究機構（PF）との共同研究により、結晶中へのダイマー取り込み量と結晶品質との関係を X 線的に評価した。この結果、ダイマーの取り込み量の増加に伴って、Wilson plot から求められる温度因子の値が増加すること（品質が劣化する傾向）が明らかになった（図 4）[3]。

### 2.4 ロッキングカーブ半値幅への影響

より物理的な品質評価手法として、PF の BL10 A にてロッキングカーブ幅計測を行った（課題番号 2003P005, 2004G173）。タンパク質結晶のロッキングカーブ幅計測は過去にも行われているが[4]、以下の 2 つの問題があった。

（1）放射光の平行性がよいために、回折線の検出が非常に困難であり、結晶の軸たてに時間がかかりすぎる。

（2）荒い軸たてに用いている実験室系 X 線回折装置で強い反射の出ない結晶は軸たてを行うことができず、実験に供することができない。

そこで、（1）の問題については、最初に回折線を探す間だけ X 線の平行性を下げる工夫を行った。具体的には、アモルファス硼素の粉末を薄い板状にし（ディフューザー）、試料の上流側に差し込むことで X 線の平行性を下げた。これにより回折線の幅が広がるため、X 線検出を行うためのカウンターを細かいステップで動かさなくてすむようになり、大幅な時間短縮を行うことができた[5]。

また、（2）の問題については、PF 18B, 6A などの CCD を備えたビームラインを利用し、角度を変えて数枚の回折画像を取得し、その回折パターンから結晶方位（UB マトリクス）を計算した（ソフトウェア開発はリガク東様による）。これにより、実験室系の X 線回折装置で強い反射が出ない結晶であっても、ロッキングカーブ幅計測を行うことができるようになった。

上述の工夫に基づき、精製したモノマーで育成した結晶とダイマーを 5 % 含む溶液から育成した結晶のロッキングカーブ幅計測を行った[6]。結果を図 5 に示す。ダイマーを含む結晶のほうがロッキングカーブ半値幅が広いことがわかる。

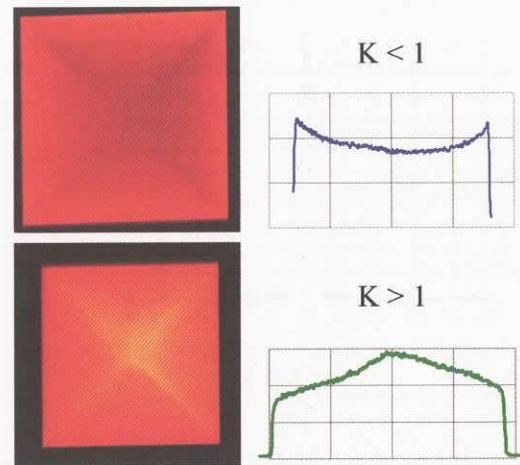


図 3 分配係数の違いによる結晶内部の不純物分布

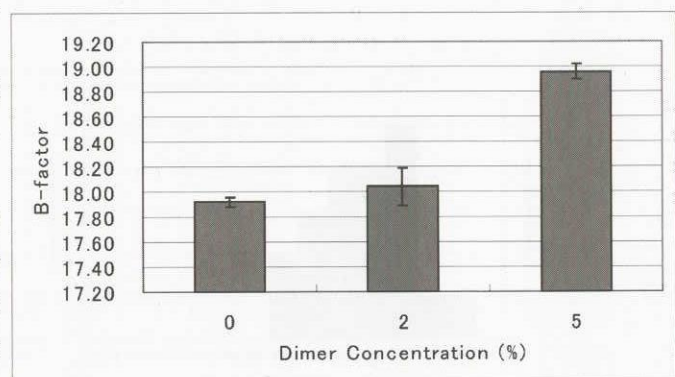


図 4 不純物濃度と温度因子の相関



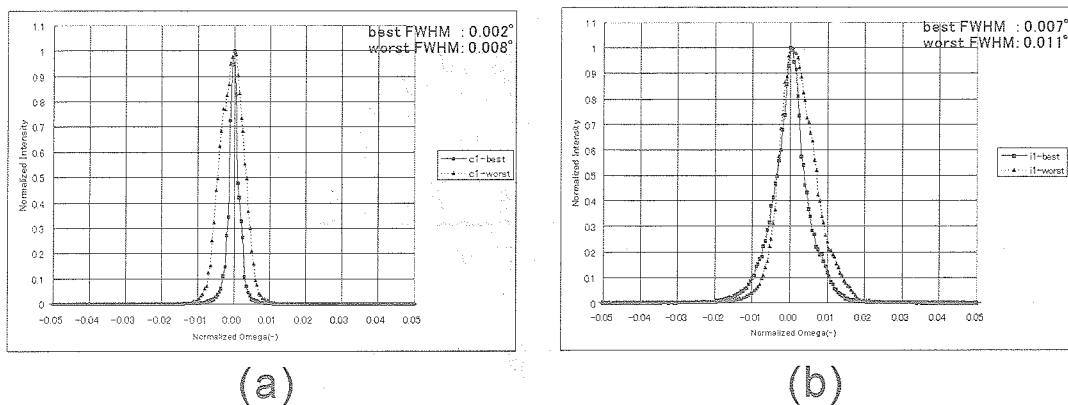


図5 ロッキングカーブ計測結果

- (a) ダイマーを含まない結晶のロッキングカーブ  
 (b) ダイマーを5%含む溶液からできた結晶のロッキングカーブ

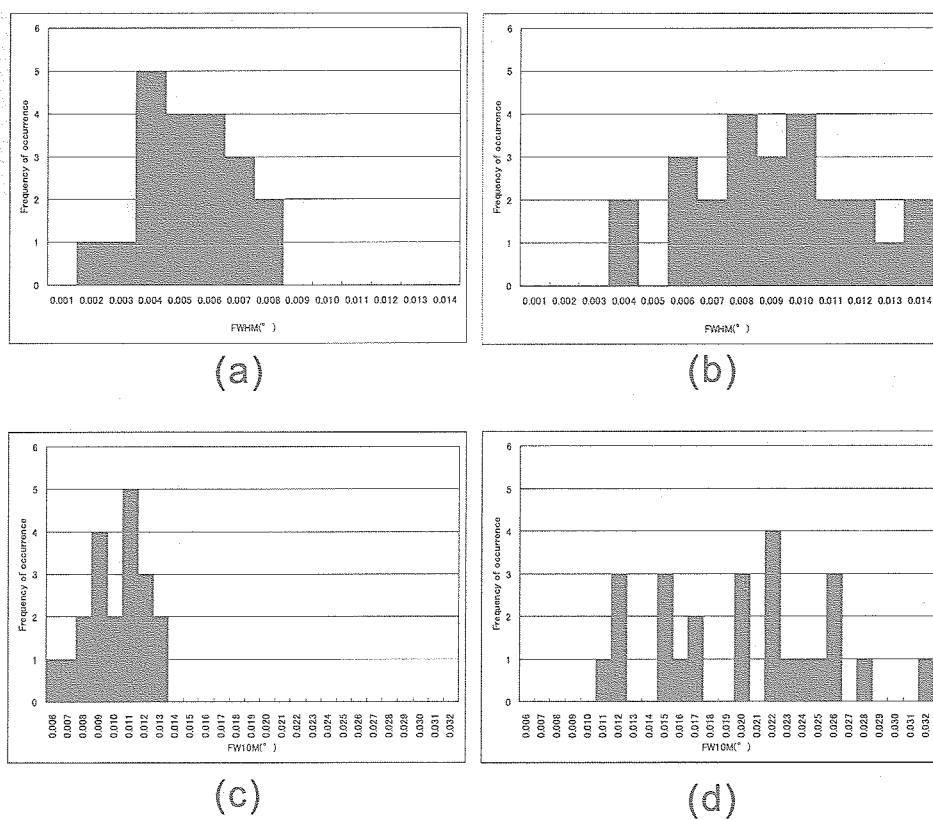


図6 ロッキングカーブのFWHMとFM10M

- (a) ダイマーを含まない結晶のFWHM  
 (b) ダイマーを5%含む溶液からできた結晶のFWHM  
 (c) ダイマーを含まない結晶のFM10M  
 (d) ダイマーを5%含む溶液からできた結晶のFM10M

取得した全データは図6に整理した。半値幅 FWHM (the rocking curve full-width at half-maximum) の生データとしては、ダイマーを含まない結晶が $0.002\text{--}0.008^\circ$ ，ダイマーを含む結晶では $0.004\text{--}0.014^\circ$ であった。Lübbertらの提案[7]に基づき，FWHMに加えて，複数のピークがあるときや結晶が歪んでいるときの評価に適した FM 10M (the full width at 10% of the maximum intensity) での評価も行った。ダイマーを含む結晶の方が結晶内部が不均一であり，品質が悪いことが図6(c)(d)から明白である。

このように，ダイマーの混入によって結晶の完全性が低下することを定量的に明らかにした。

## 2.5 X線トポグラフィーによる欠陥の検出

ダイマーの混入により結晶品質が劣化する原因を探るために，PFのBL-15B1にて白色X線を用い，X線トポグラフィー実験を行った(課題番号2003G022)。実験手法は橘らによる手法と同一である[8]。結果を図7に示す[6]。ダイマーを含まない結晶を4つ調べたが，いずれも転位線が観察されなかった(図7(a)(b))。一方，ダイマーを含む結晶では転位線が見られた(図7(c)(d))。図7(a)と図5(a)，及び図7(c)と図5(b)は同一の結晶である。このことから，ロッキングカーブ幅を増加させ結晶品質を劣化させているのは転位であること

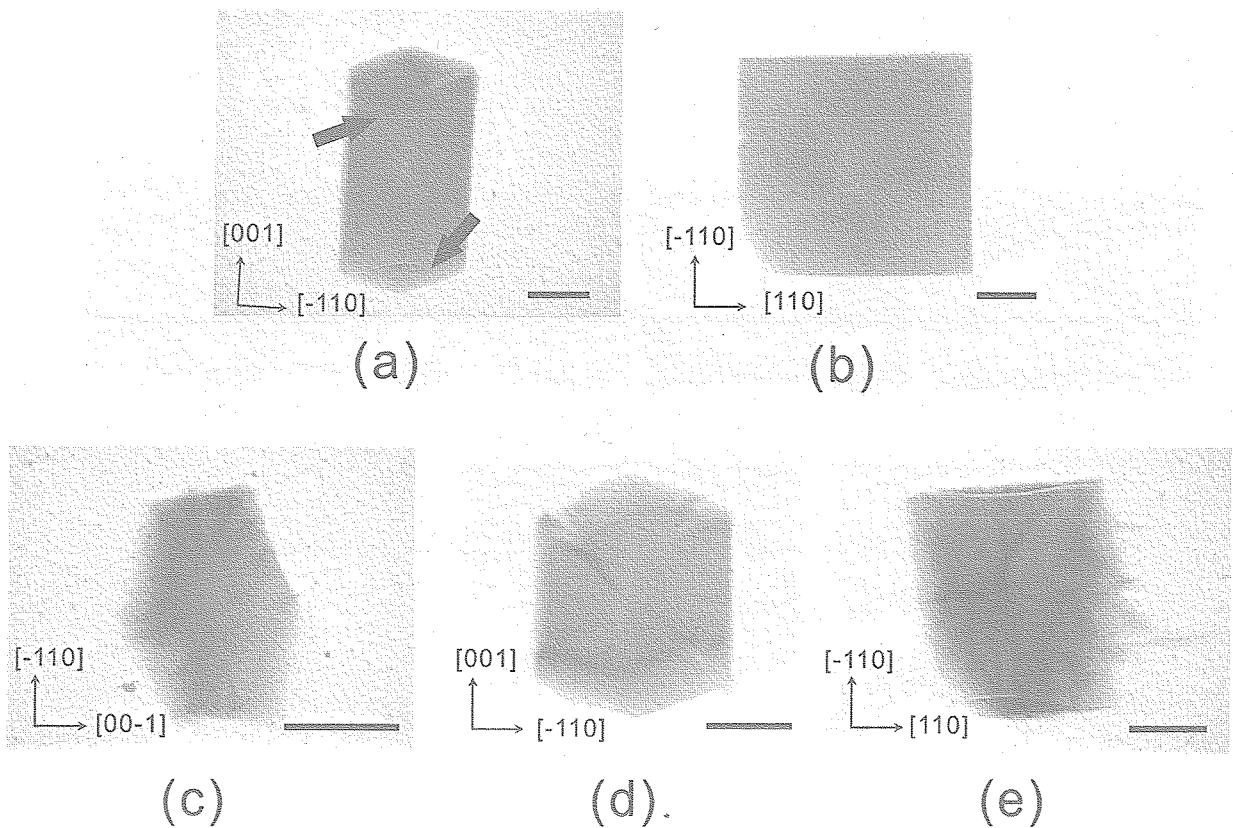


図7 X線トポグラフィー像。スケールバーは $500\text{ }\mu\text{m}$

- (a) ダイマーを含まない結晶のトポグラフィー像。矢印は結晶とキャピラリーの間に存在する溶液による影。
- (b) ダイマーを含まない別の結晶のトポグラフィー像。転位線は見られない。
- (c) ダイマーを5%含む溶液からできた結晶のトポグラフィー像。転位線とみられるコントラストがある。
- (d) ダイマーを2%含む溶液からできた結晶のトポグラフィー像。(c)より転位線の数が少ない。
- (e) ダイマーを含む結晶で観察される典型的な像。白黒のコントラストは結晶の歪みを示している。

が強く示唆される。図7(e)は、ダイマーを含む結晶で観察される典型的な像である。白黒のコントラストは結晶の歪みを示している。ダイマーを含む多くの結晶は、成長途中にひび割れたり多結晶化したりしたため、実験に供することのできた結晶は少なかったが、単結晶であっても、内部に図7(e)のような大規模な歪みがあるものが多いということを示している。転位線が見られたものは、ダイマーを含む結晶の中では相対的には歪みが少なかったものであるといえよう。

## 2.6 エッチングによる転位の確認

X線トポグラフィーで観察されたコントラストが転位であることを確認するために、エッチングを行った。2.5% NaCl, 50mM 酢酸バッファー (pH4.5) 溶液中 (タンパク質濃度はゼロ) で結晶を溶解させ、顕微鏡観察を行った。結果を図8に示す [6]。

ダイマーを含まない結晶では Point bottomed deep etch pit は観察されないが、ダイマーを含む結晶では多数観察された。Point bottomed deep etch pit は一般的に転位に由来するため、ダイマーの混入によって転位が誘起されたと推測される。

X線トポグラフィー及びエッチングの結果から、リゾチームの系では、ダイマー混入により転位や大きな歪みが形成され、結晶内の均一性を低下させ、品質を劣化させることが明らかになった。

なお、Flat bottomed pit はダイマーの有無に関わらず観察された。このピットは点欠陥に由来するものであると考えられる。

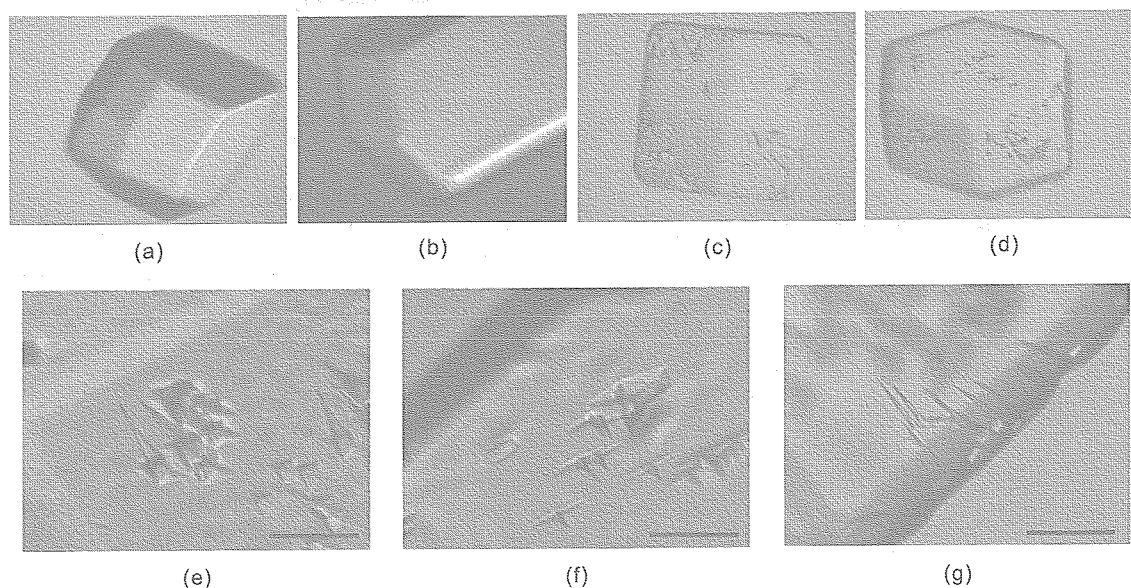


図8 エッチング後の結晶の写真。スケールバーは100 $\mu$ m。

(a) エッチング開始1時間後の結晶 (ダイマーなし)

Flat bottomed pit はみられるが、Point bottomed deep etch pit はみられない。

(b) エッチング開始1時間後の別の結晶 (ダイマーなし)。(a)と同じ傾向。

(c) エッチング開始30分後の結晶 (5%ダイマー)。

Point bottomed deep etch pit がみられる。

(d) エッチング開始30分後の別の結晶 (5%ダイマー)。

(e) {101}面のPoint bottomed deep etch pitの拡大写真。

(f) {110}面のPoint bottomed deep etch pitの拡大写真。

(g) 稜部分のPoint bottomed deep etch pitの拡大写真。Hollow tubeがみられる。

2.7 ダイマーによるステップの阻害

ダイマー混入により転位等が形成され品質を劣化させることが明らかとなったが、結晶成長への影響はどうだろうか。

ここでは、ダイマーが結晶成長時に及ぼすステップへの影響について述べる。リゾチーム種結晶をダイマーを含む溶液に入れ、原子間力顕微鏡（AFM）で  $\{101\}$  面の結晶表面観察を行った結果を図9に示す [3]。

5%ではステップがラフニングし、10%ではステップが消失しているのがわかる。一方、 $\{110\}$  面では10%でもほとんどラフニングしなかった。これは以前の報告と同じ傾向である [9]。

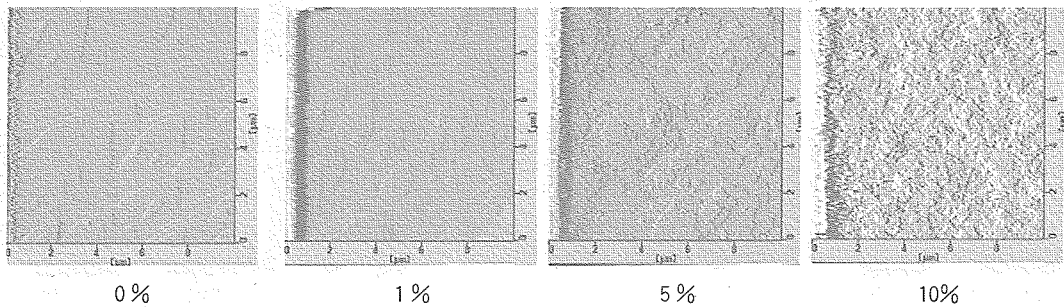


図9 ダイマー濃度の増加に伴って結晶表面が荒れていく様子

2.8 面成長速度への影響

ダイマーが  $\{101\}$  面のステップに影響を及ぼしていることが明らかになったが、これは当然ながら面成長速度にも影響し、 $\{101\}$  面の成長は阻害されるが、 $\{110\}$  面の成長は阻害されない。この結果、結晶の外形も変化する。ダイマー濃度と結晶外形との関係を図10に示す [3]。

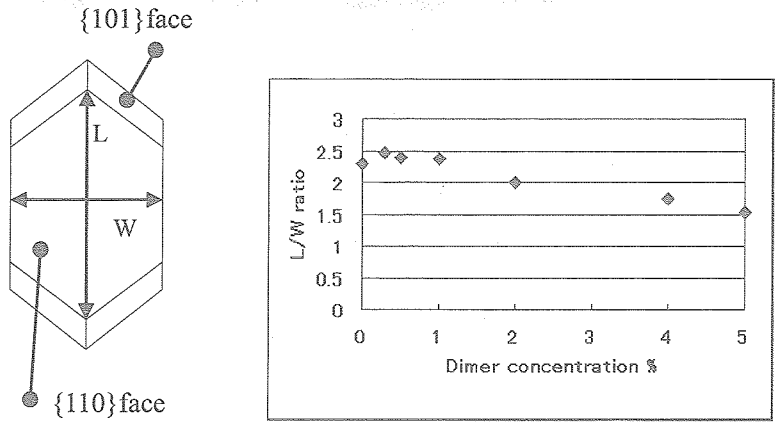


図10 結晶のアスペクト比とダイマー濃度の相関



## 2.9 結晶内部への取り込みの可視化

2.7, 2.8項から、ダイマーは  $\{101\}$  面にしか影響を及ぼしていないように見える。そこで実際に結晶内部にどのように取り込まれているかを、蛍光ラベルしたダイマーを用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。結晶内部全体像を示すために、結晶をグルタルアルデヒドで化学固定し、ミクロトームで切片にして観察した画像を図11に示す [10]。

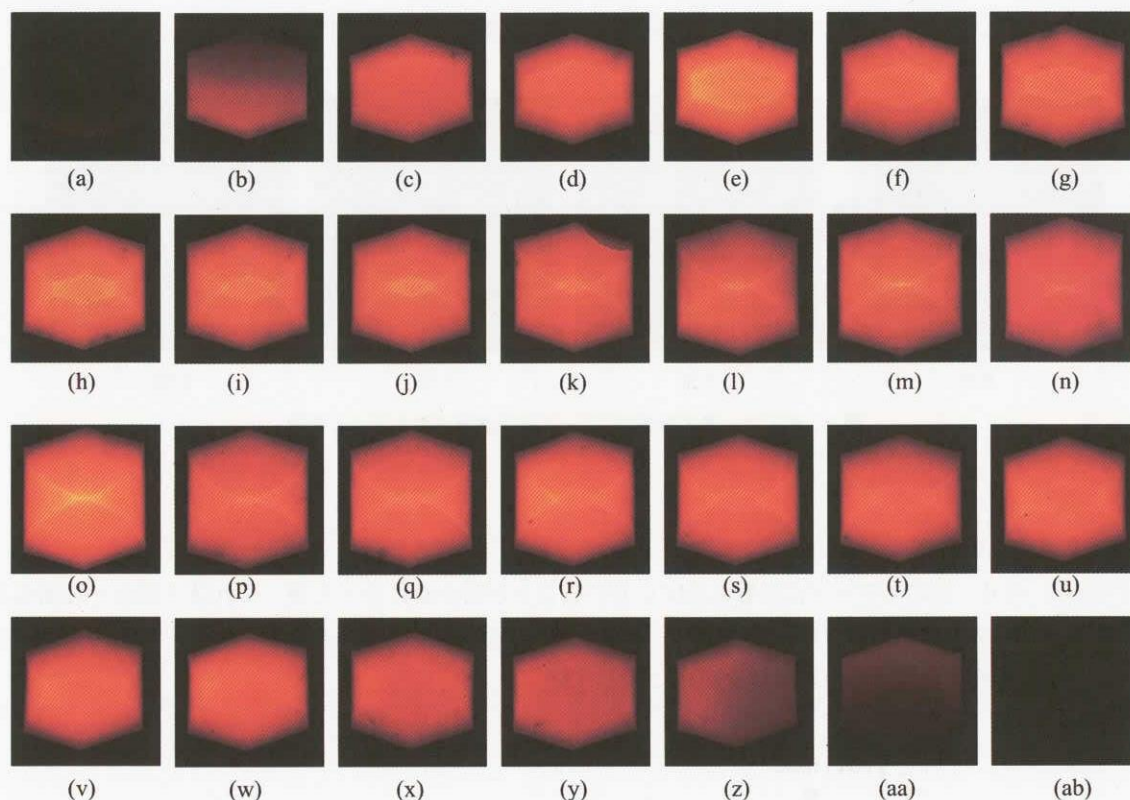


図 11 結晶に蛍光ラベルしたダイマーを取り込ませたあと、化学固定し、切片して共焦点レーザー顕微鏡で観察した画像。結晶の端から端までの画像を並べた。

図11から、 $\{101\}$  面、 $\{110\}$  面ともに蛍光ダイマーを取り込んでいるが、むしろ  $\{110\}$  面のほうが取り込み量が多いことがわかる（色が明るい方が量が多い）。すなわち、ダイマーは両方の面に取り込まれるが、 $\{110\}$  面では結晶成長への影響がほとんどなく、主として  $\{101\}$  面で成長を阻害する。2.5項, 2.6項のトポグラフィー実験やエッチングでは両方の面に転位が見られたことから、ステップ前進の阻害と転位の発生が直接リンクしているわけではないことがわかる。

また、図11からは、ダイマーが結晶中心部やセクター境界などに特に多いわけではなく、面内に平均的に取り込まれていることもわかる。これは、オボトランスフェリンや七面鳥卵白リゾチームを不純物としてニワトリ卵白リゾチーム正方晶に取り込ませたときの挙動とは異なるものである [11]。

### 3 まとめ

本研究では、ニワトリ卵白リゾチームを対象とし、リゾチーム2量体（ダイマー）を不純物として混入させた正方晶結晶を用いて、不純物がタンパク質結晶の成長と完全性に及ぼす影響を多角的に明らかにした。

まず、ダイマーの分配係数を電気泳動と蛍光法により求め、ダイマーの分配係数は塩濃度によって変化することを明らかにした。分配係数が1以上であれば不純物拡散層の形成により、微小重力効果が期待できる。

ダイマーが品質に及ぼす影響は温度因子とロッキングカーブ計測により評価した。5%ダイマーを含む溶液からできた結晶は両方の指標で品質の劣化を示した。この原因を明らかにするために、X線トポグラフィー及びエッチングを行ったところ、転位の存在が明らかになった。転位以外にも大きな歪みが形成されていることも示唆された。品質劣化の原因は、転位及びこの大きな歪みによると考えられる。

ダイマーはリゾチーム正方晶を構成する両方の面に取り込まれるが、ステップラフニングや面成長速度の阻害などの影響は $\{101\}$ 面に現れる。トポグラフィー実験やエッチングでは両方の面に転位が見られたことから、ステップ前進の阻害と転位の発生が直接リンクしているわけではないことが明らかになった。

今後は、ダイマーの結晶表面への取り込みのその場観察を行うことにより、ダイマーによる転位発生メカニズムの解明を行う。

### 謝 辞

共同研究者の高エネルギー加速器研究機構 田中雅彦助手、五十嵐教之助手、大阪大学 松浦良樹助教授、横浜市立大学 小島謙一教授、橘勝助教授、小泉晴比古氏に感謝します。ロッキングカーブ計測に関して多大なご協力をいただきました東京工業大学 佐藤孝雄助手、東北大学 佐崎元講師、リガク 東常行氏に感謝します。

### 文 献

- [1] B. R. Thomas, P. G. Vekilov, F. Rosenberger, *Acta Crysta D52* (1996) 776.
- [2] Y. Iimura, I. Yoshizaki, H. Nakamura, S. Yoda, H. Komatsu, *Crystal Growth and Design* 5 (2005) 301.
- [3] I. Yoshizaki, A. Kadowaki, Y. Iimura, N. Igarashi, S. Yoda, H. Komatsu, *J. Synchrotron Radiation* 11 (2004) 30.
- [4] 例えば T. Sato, Y. Yamada, S. Saijo, T. Hori, R. Hirose, N. Tanaka, G. Sazaki, K. Nakajima, N. Igarashi, M. Tanaka, Y. Matsuura, *Acta Crysta D56* (2000) 1079.
- [5] Y. Matsuura, I. Yoshizaki, M. Tanaka, *J. Appl. Cryst.* 37 (2004) 841.
- [6] I. Yoshizaki, S. Fukuyama, H. Koizumi, M. Tachibana, K. Kojima, Y. Matsuura, M. Tanaka, N. Igarashi, A. Kadowaki, L. Rong, S. Adachi, S. Yoda, H. Komatsu, submitted to *J. Crystal Growth*.
- [7] D. Lübbert, A. Meents, E. Weckert, *Acta Crysta D60* (2004) 987.
- [8] M. Tachibana, H. Koizumi, K. Izumi, K. Kajiware, K. Kojima, *J. Synchrotron Radiation* 10 (2003) 416.
- [9] T. Nakada, G. Sazaki, S. Miyashita, S. D. Durbin, H. Komatsu, *J. Crystal Growth* 196 (1999) 503.
- [10] Y. Iimura, I. Yoshizaki, S. Yoda, and H. Komatsu, *Crystal Growth and Design* 5 (2005) 295.
- [11] C. L. Caylor, I. Dobrianov, S. G. Lemay, C. Kimmer, S. Kriminski, K. D. Finkelstein, W. Zipfel, W. W. Webb, B. R. Thomas, A. A. Chernov, R. E. Thorne, *PROTEINS : Structure, Function, and Genetics* 36 (1999) 270.



宇宙航空研究開発機構研究開発報告 JAXA-RR-04-051

---

発 行 日        2005 年 3 月 31 日  
編集・発行       独立行政法人 宇宙航空研究開発機構  
                    〒182-8522  
                    東京都調布市深大寺東町七丁目 44 番地 1  
                    TEL 0422-40-3000（代表）  
印 刷 所        藤原印刷株式会社  
                    長野県松本市新橋 7-21

---

©2005 JAXA

※本書（誌）の一部または全部を著作権法の定める範囲を超え、無断で複写、  
製本、転載、テープ化及びファイル化することを禁じます。

※本書（誌）からの複写、転載等を希望される場合は、下記にご連絡ください。

※本書（誌）中、本文については再生紙を使用しております。

<本資料に関するお問い合わせ先>

独立行政法人 宇宙航空研究開発機構 情報化推進部 宇宙航空文献資料センター



