

宇宙航空研究開発機構特別資料

JAXA Research and Development

アポフェリチンを用いた結晶成長研究

吉崎 泉

2007年5月

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

宇宙航空研究開発機構特別資料

JAXA Research and Development

アポフェリチンを用いた結晶成長研究

Crystal Growth Studies on Apoferritin

吉崎 泉
Izumi YOSHIZAKI

2007年5月

May 2007

宇宙航空研究開発機構

Japan Aerospace Exploration Agency

アポフェリチンを用いた結晶成長研究

吉崎 泉

Crystal Growth Studies on Apoferritin

By

Izumi YOSHIZAKI

Abstract: Crystal growth studies using apoferritin was carried out. The rocking curve width of facet and skeletal crystals were measured.

Key words: Protein, Apoferritin, Crystal Growth

概 要

アポフェリチンタンパク質を材料とし、相図の作成、結晶品質評価などを行った。結晶化駆動力を変動させ、ファセット結晶、骸晶などを育成し、ロッキングカーブ幅計測を行った。

1. はじめに

アポフェリチンは馬脾臓から精製されるタンパク質で、24量体を単位として結晶成長する。駆動力の変化により、ファセット結晶、骸晶、樹枝状結晶とモルフォロジーが変化する。本研究では、駆動力と結晶品質との関係を明らかにするために、モルフォロジーの異なる結晶を準備し、ロッキングカーブ幅計測を行った。過去にリゾチームを使って行った実験では、駆動力を増加させると結晶品質が劣化したことから、異方性の少ない分子であるアポフェリチンを用いた場合でも同様の結果が得られるかどうかを調べた。

2. 実験

2.1. 相図の作成

基礎データとして、溶解度測定及び相図の作成を行った。また、市販の試料の純度が低いため、事前に精製を行った。

2.1.1. 試料精製

試料はSIGMA社より購入した。購入時の純度は90%程度であるため、ゲルろ過カラムを用いて高純度化した。この結果、純度は98%以上となった。アポフェリチン24量体(monomer)以外の混入物は、アポフェリチン dimer 及び trimer である。

2.1.2. 溶解度計測

結晶化剤としては硫酸カドミウムを用いる [1, 2]。硫酸カドミウムを0.5%~3% W/Vで準備し、この溶液中で結晶を20℃で数日間溶解させ、タンパク質濃度を計測した。この結果を20度における溶解度の値とした。溶解度値を図1に示す。一方、結晶化溶液を電気泳動で確認したところ、結晶化溶液の数週間の放置により、アポフェリチンのdimerが形成されることもわかった。

2.1.3. 相図作成

硫酸カドミウムとアポフェリチン濃度を変動させ、20℃における相図を作成した。図1に結果を示す。図中でoctohedralとあるものは、正8面体のファセット結晶、dendrite/skeletalとあるものは樹枝状結晶あるいは骸晶を意味する。結晶の写真を図2に示す。

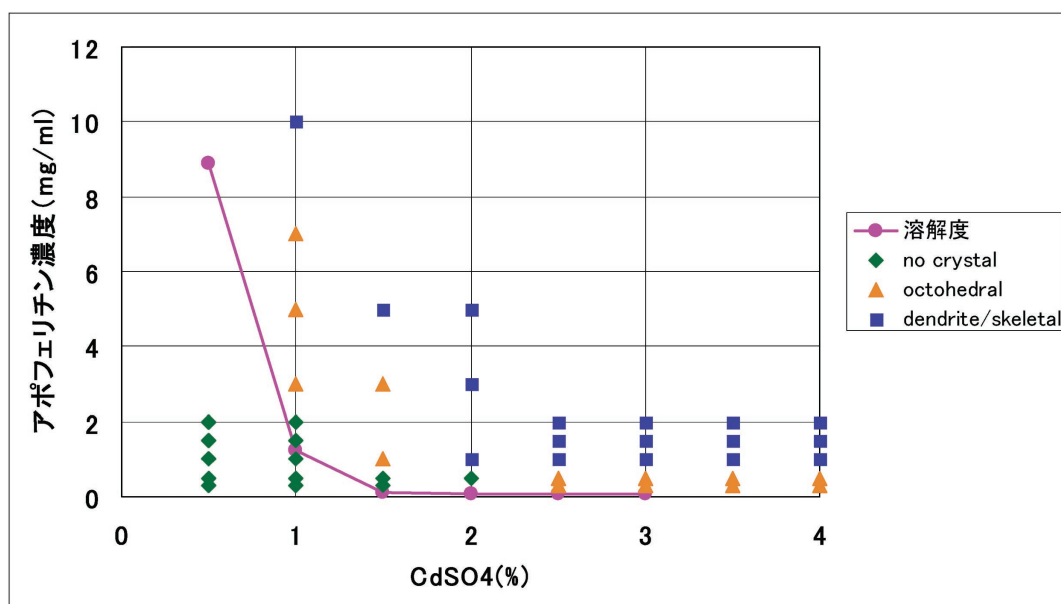


図1 アポフェリチン相図

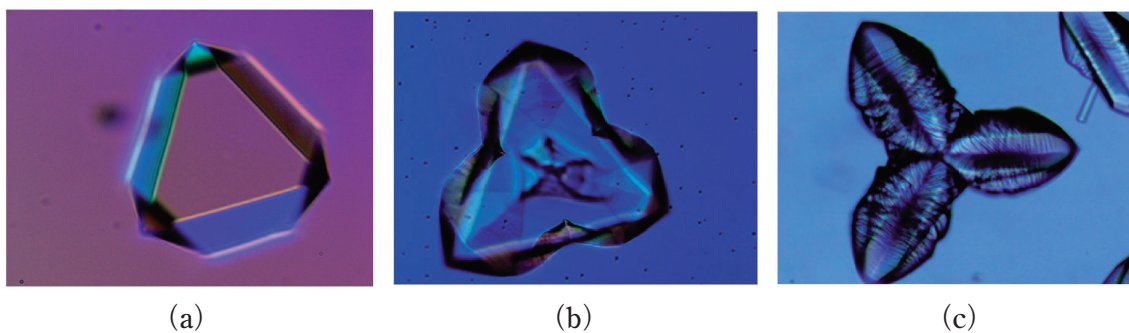


図2 アポフェリチン結晶

- (a) octohedral
- (b) skeletal
- (c) dendrite

2.2. 単結晶性の確認

アポフェリチンの骸晶や樹枝状結晶が単結晶であるかどうかや空間群がファセット結晶と同じであるかについては現在までに確かめられていないため、回折実験を実施して確認することとした。

2.2.1. 試料準備

相図に基づき、ファセット結晶は1%硫酸カドミウム、5mg/mlアポフェリチン、骸晶は3%硫酸カドミウム、1mg/mlアポフェリチン、樹枝状結晶は2%硫酸カドミウム、6mg/mlアポフェリチンで結晶化した。得られた結晶をキャピラリーに封入し、高エネルギー加速器研究機構（PF）に輸送した。

2.2.2. 回折実験

回折実験はPF BL18Bにて実施した（課題番号2004G173）。骸晶、樹枝状結晶から得られた回折を解析した結果、これらはファセット結晶と同じF432の空間群（ $a=b=c=184\text{\AA}$ ， $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ）を持つ単結晶であり、モルフォロジー変化により形態が変化しているだけであることが明らかとなった（図3）。

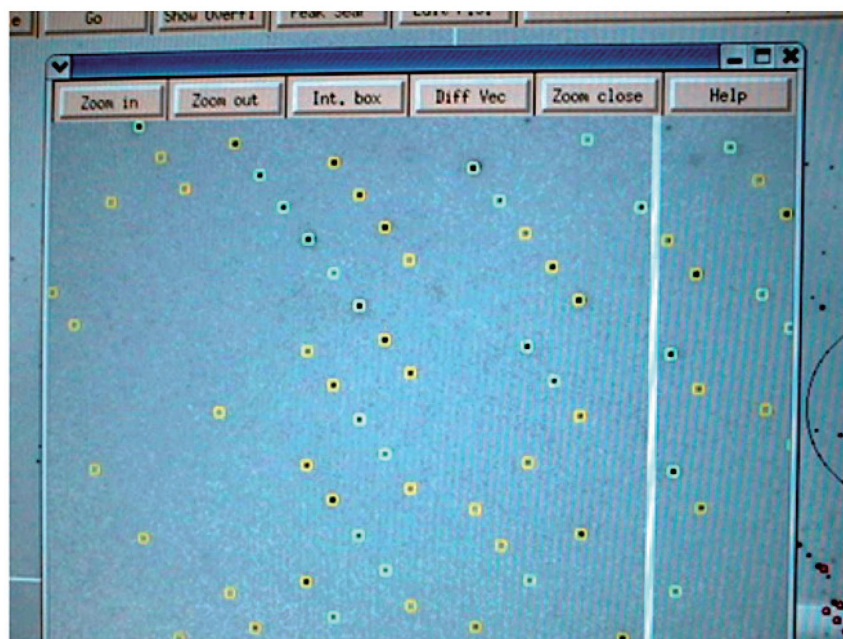


図3 解析画面の例

2.3. ロッキングカーブ計測

本研究では、駆動力と結晶品質との関係を明らかにするために、過飽和度1.4で育成したファセット結晶と過飽和度3.9で育成した骸晶をそれぞれキャピラリーに封入し、ロッキングカーブ幅計測を行った。(過飽和度： $\ln \frac{C}{C_e}$, Cはタンパク質濃度, C_e は同じ結晶化剤濃度におけるタンパク質溶解度)

2.3.1. 軸たて

ロッキングカーブ幅計測を行う前に、荒い軸たてを行う必要がある。しかし通常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。アポフェリチンは反射が弱く、実験室系装置で軸たてを行うことが出来なかったため、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。

2.3.2. 計測結果

軸たてを行った結晶をPF BL10Aに移動してUBマトリクスを入力し、回折線を探してそのロッキングカーブを取得した。主な結果を図4に示す。1つの図に複数のロッキングカーブが示されているが、これは同じ結晶を用いて異なる指数のデータを取得したものである。

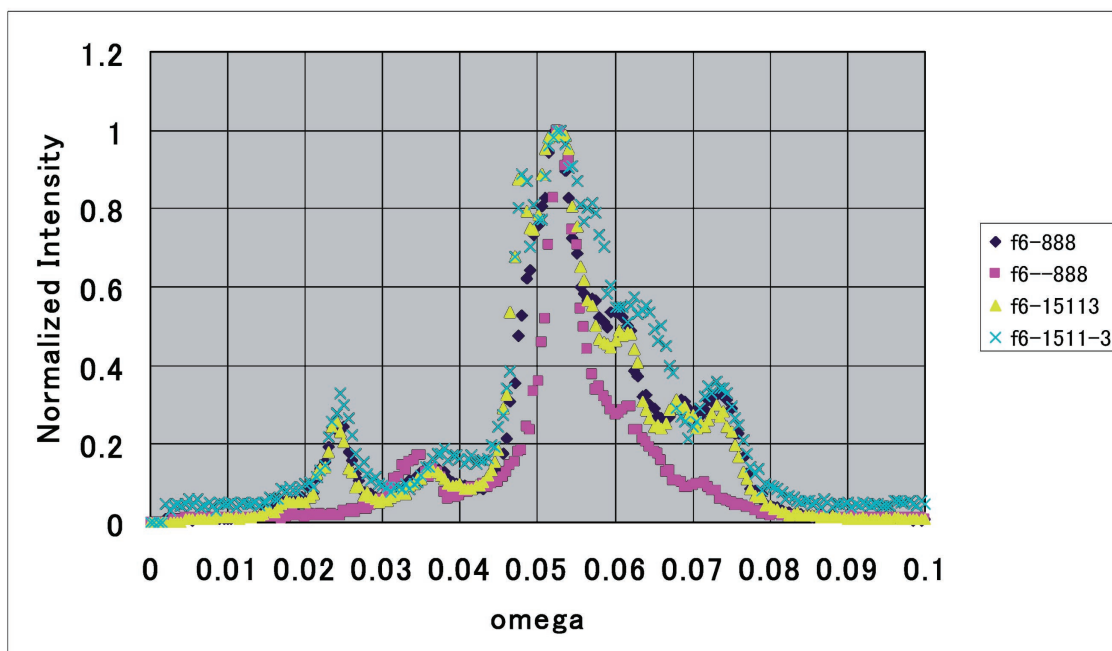


図4-1 ファセット結晶 (1) のロッキングカーブ

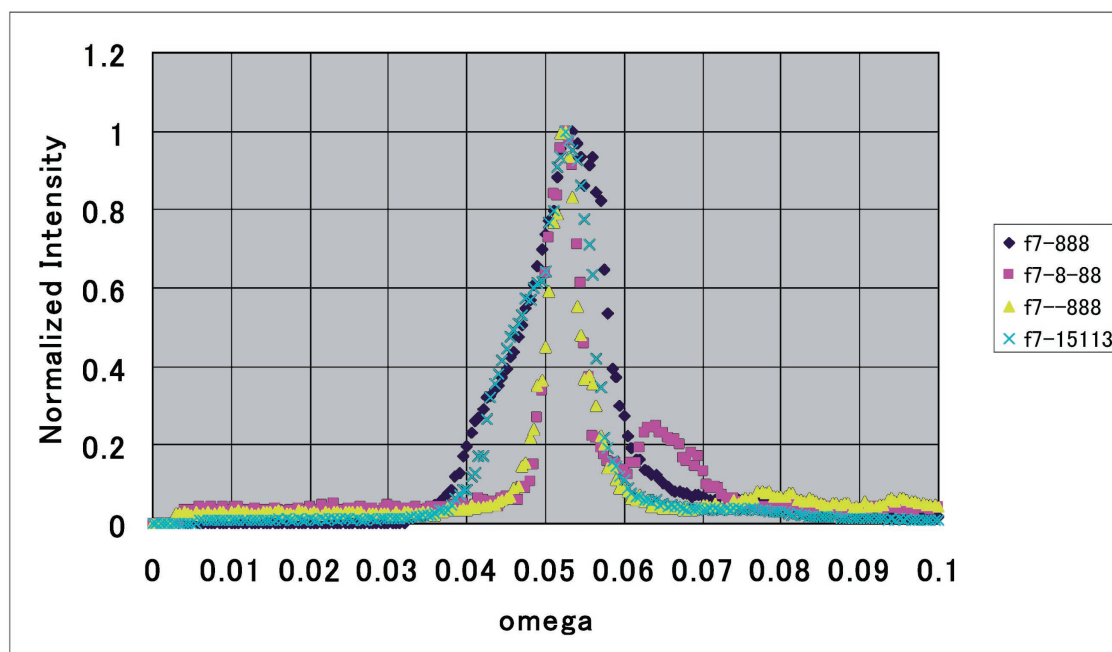


図4-2 ファセット結晶 (2) のロッキングカーブ

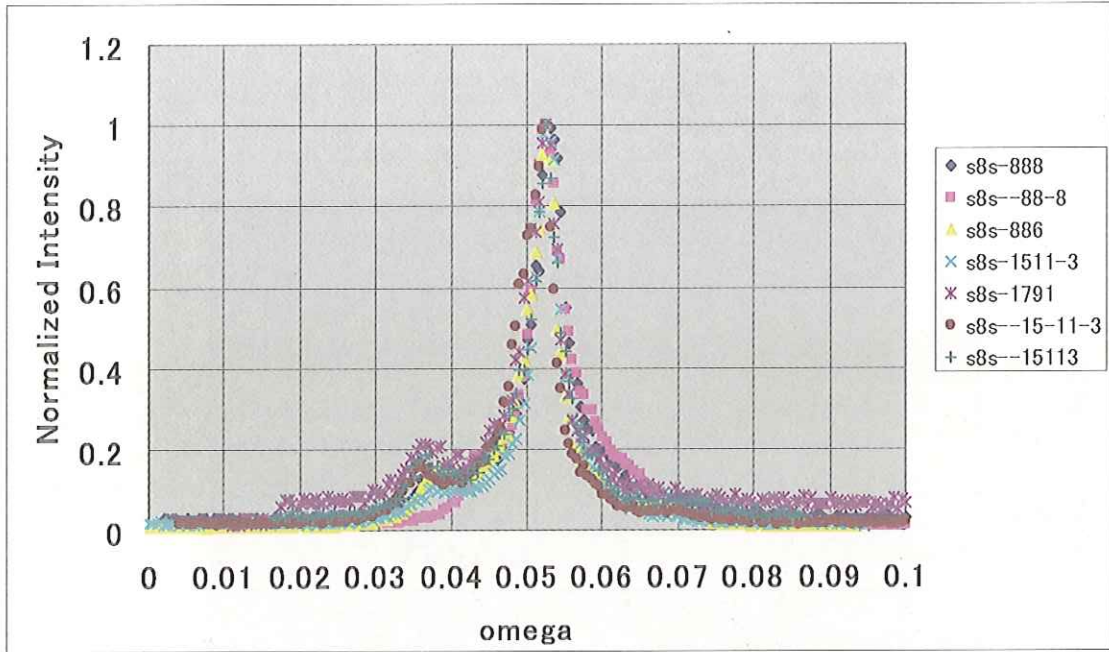


図4-3 骸晶 (1) のロッキングカーブ

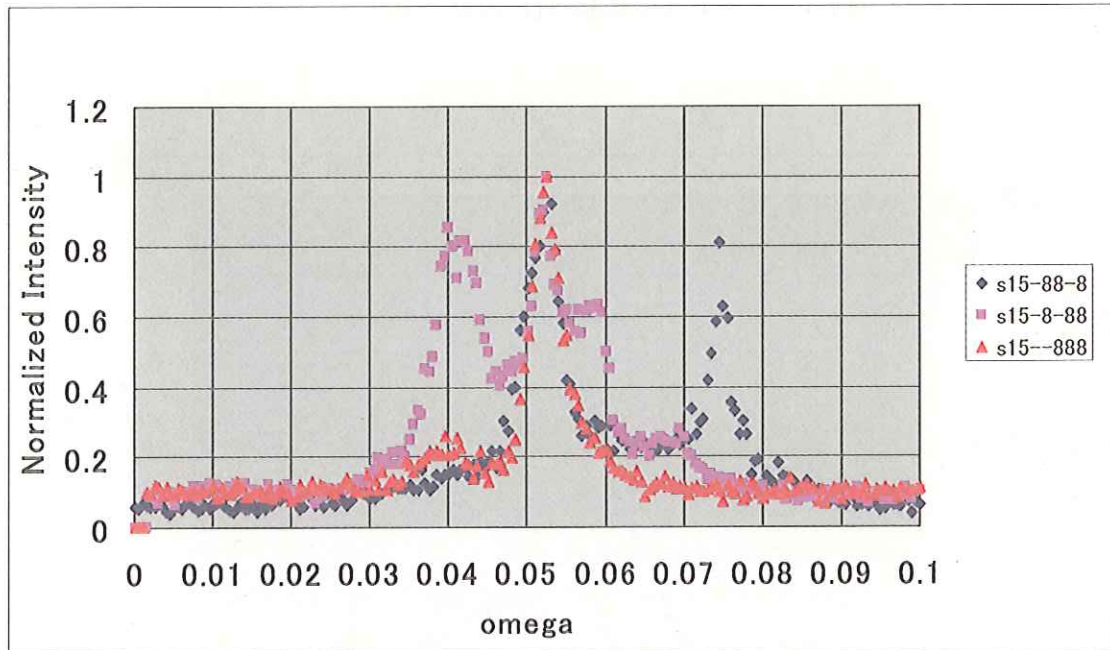


図4-4 骸晶 (2) のロッキングカーブ

ファセット結晶も骸晶も複数のピークをもつことがわかる。角度のずれは最大で3/100度程度であるため、サブグレインと考えられる。本来ロッキングカーブ幅とは、ひとつのピーク値の半値の横幅をいうが、今回の結晶は角度のずれの小さいピークを複数もつため、最も値の大きなピーク値を1にノーマライズし、相対強度0.5において複数のピークの情報が含

まれる場合はそれを含めてロッキングカーブ半値幅とした。

評価の結果、結晶によるばらつきが非常に大きいですが、ファセット結晶も骸晶もロッキングカーブ半値幅は0.005度～0.025度程度であり、同等であるとみなせることがわかった。

2.3.3. 考察

リゾチームを用いて行った実験 [3] では、駆動力（過飽和度）を増加させた結果、結晶品質が劣化した。しかし、高過飽和度条件においても、面欠陥・線状欠陥などが見られなかったことから、駆動力の増加によって、キンクサイトで分子の取り込みミス（配向欠陥）が発生し、これが連続したために品質劣化につながったと考察した。

アポフェリチンは球状の24量体を形成しており、分子の対称性が非常に高い（図5）。結晶成長の際はこの24量体がmonomerとして取り込まれる。一般的なタンパク質は形の異方性が大きいため、界面に到着する分子の数に対し、実際に取り込まれる分子の数が極めて小さい(kinetics係数が小さい)が、アポフェリチンの場合は、分子の対称性が高いことから、kinetics係数が比較的大きいと考えられる。実際、Yauらの計測によれば、アポフェリチンのステップkinetics係数は 6×10^4 cm/secであり [4]、Rongらによるリゾチームの値 $1 \sim 5 \times 10^5$ cm/sec [5] よりも大きい。(Kinetics係数が大きいからこそ、無機結晶でみられるように、駆動力（過飽和度）を上げると骸晶、樹枝状結晶になる)。すなわち、アポフェリチンでは、結晶成長単位の分子の対称性が高いことから、たとえ駆動力が増加しても、キンクサイトにおける取り込みミス（配向欠陥）の頻度にほとんど変化が見られなかったのではないかと考えられる。

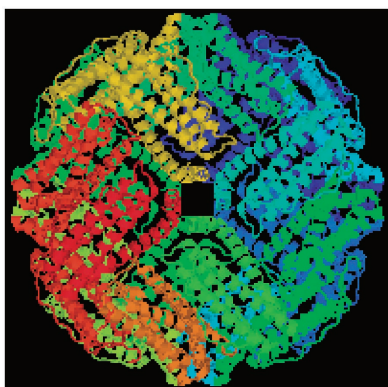


図5 アポフェリチン24量体の模式図

3. まとめ

アポフェリチン骸晶、樹枝状結晶はファセット結晶と同じ空間群をもつ単結晶であり、過飽和度が高いにも関わらずロッキングカーブ幅はファセット結晶と同等であった。この原因は調査中であるが、アポフェリチン分子の対称性の高さが関係していると推測される。今後、

結晶界面の実際のアポフェリチン濃度計測，界面のモルフォロジー観察（ステップ成長かカイネティックラフニングに近い状態か）などを行うことにより，より詳細な議論が可能となる。

アポフェリチンは拡散律速性の強い成長をすることから，微小重力実験において品質向上効果が大きいと期待される。分子サイズも直径13nmと大きく，1分子観察も可能な例が報告されていることから，新たなモデルタンパク質として研究を進めていく価値がある。

謝辞

品質評価実験を手伝ってくださった株式会社エイ・イー・エス 福山誠二郎氏，試料精製を担当してくださった飯村好和氏，指数付けプログラムを開発してくださった東常行氏に感謝します。

参考文献

- [1] McPherson, Crystallization of Biological Macromolecules: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)
- [2] 吉田絵里子，平成8年 東北大学大学院理学研究科修士論文
- [3] Yoshizaki, Sato, Igarashi, Natsuisaka, Tanaka, Komatsu, Yoda, Acta Crystallographica section D57 (2001) 1621.
- [4] Yau, Thomas, Vekilov, Phys. Rev. Lett. 85 (2000) 356.
- [5] Rong, Yamane, Niimura, J. Cryst. Growth 217 (2000) 161.

宇宙航空研究開発機構特別資料 JAXA-SP-06-028

発行 平成19年5月1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 株式会社 実業公報社

本書及び内容についてのお問い合わせは、下記をお願いいたします。

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

©2007 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。

