

蛋白質の結晶成長と微小重力の影響

京都大学大学院農学研究科 相原茂夫

近年、酵素反応メカニズムの解明や新薬の開発にタンパク質の三次構造に関する情報が必須の条件となり、構造生物学は急速な発展を遂げ、この分野の研究者に限らず多くの研究者が結晶性の優れたタンパク質単結晶を得るため、タンパク質結晶成長に強い関心を寄せている。特に、シンクロトロン の普及と結晶化法の微量化・時間短縮によってクライオクリスタログラフィーの進展に拍車がかかり、最近では時間分割結晶構造解析が現実の研究法となり、X線回折法はタンパク質の静的平均構造だけでなく動的構造の解析にも利用できる研究手段となりつつある。一方、生体高分子用中性子回折装置開発の進展も目覚ましく、最大の難関であった単結晶の許容サイズも1mm 角まで小さくなり、水素原子の位置を確定することで、より詳細な反応メカニズムの解析が期待できるようになった。現実には多くの問題点を抱えながらも、回折構造生物学研究は目的にあわせて研究方法を選択することが可能な段階にはいった。そして、タンパク質構造の高分解能化、高精度化が要求されるなか、結晶成長の研究は以前にも増してタンパク質単結晶のクオリティを重視する必要に迫られているだけでなく、新たに研究目的に合わせた単結晶を調製する必要がでてきた。

宇宙の微小重力場は地上の高磁場と共に、X線結晶学的に良質のタンパク質単結晶が育成できる環境として衆目を集めている。微小重力場におけるタンパク質結晶化とは、高度185〜 535m の軌道を周回するフリーフライヤー、スペースシャトル、宇宙ステーションなどを利用して行われるタンパク質結晶化のことで、タンパク質結晶成長の新しい環境の1つとして宇宙科学研究でも重点実験項目として取り挙げられている。

1. タンパク質結晶成長

タンパク質単結晶はタンパク質分子間の相互作用によって分子がある一定の規則に従って配列し3次元的に成長したもので、溶液から固体への相変化をとる。したがって、結晶成長は相平衡の理論から一定温度、一定圧力のもとでは熱力学的に(1)式で表現される。すなわち、単結晶生成に必要な自由エネルギー ΔG は単結晶(固体)の化学ポテンシャル μ_c から溶液の化学ポテンシャル μ_s を減じたものと変化量 Δn との積で表すことができる。

$$\Delta G = \Delta n (\mu_c - \mu_s) \quad (1)$$

また、系のタンパク質分子のアフィニティ ϕ と濃度の関係についてつぎのような式が成立する。

$$\phi = - \Delta G / \Delta n = kT \ln (c/s) \quad (2)$$

ここで、 c はタンパク質濃度、 s はタンパク質飽和濃度、 T は絶対温度(°K)、 k はボルツマ

ン定数で、結晶化が進行するためには(1)、(2)両式において $\Delta G < 0$ 、すなわち、 $\phi > 0$ が成立する必要がある。このことは次の二つの関係が同時に成立することを意味している。

$$c > s, \quad \mu_s > \mu_c \quad (3)$$

すなわち、(3)式はタンパク質濃度が飽和濃度より高い状態(過飽和)で、かつ、結晶中のタンパク質分子の化学ポテンシャルを溶液の化学ポテンシャルよりも低い状態にする必要があることを指摘している。(1)～(3)式によりタンパク質結晶が晶出する条件は概念的に規定することができる。しかし、実際にはタンパク質の結晶化は一般に添加物(沈殿剤または結晶化剤ともいう)を加えてタンパク質の溶解度を低下させ、過飽和にすることによって結晶を晶出させるため、タンパク質分子が不規則に会合してしまうと結晶にはならず非結晶質の沈殿となる。すなわち、結晶が晶出するためにはタンパク質濃度が過飽和になったとき、タンパク質分子間に選択的相互作用が生じる必要がある。この意味においてタンパク質の結晶化ではタンパク質分子表面の物理的特性(分子表面の電荷及び疎水性の度合い及びその分布)が重要で、タンパク質分子表面の状態が違えば、当然、選択的相互作用の状況も異なる。したがって、単純な理論式でタンパク質の結晶化条件を規定することはできても、実際にはタンパク質ごとにその分子表面の物理的特性を考慮し、溶媒環境を設定しなければならないので個々のタンパク質の結晶化に応用するのは非常に困難である。実際にはトライアル・アンド・エラー方式の大量条件検索が採用されて成果を上げているのが現状である。

タンパク質分子間の選択的相互作用に関する理論は既に提出されているが、基本的に熱力学の概念に基づいたものが多い。熱力学は反応の進行する方向を示すが、その速さは規定せず、実用性に欠ける面がある。タンパク質の結晶化は通常の化学反応に比較して非常に緩慢であることが多く、一定期間内に結晶が生成するか否かはタンパク質分子が溶液状態から固体状態(結晶)に変化する時の速度、すなわち、タンパク質分子の輸送過程を速度論的に解析する必要がある。

2. 微小重力場でのタンパク質結晶成長

スペースシャトルや宇宙ステーションを利用した宇宙の微小重力場でのタンパク質結晶成長実験では、重力が地上の重力の 10^{-3} ～ 10^{-6} に低下することが知られており、このような環境下では生成したタンパク質結晶核が結晶成長中には沈降しないこと、溶液の熱対流が抑制されるため結晶核は溶液中であまり移動することなく成長することなどの特徴が挙げられる。しかし、ハンギングドロップ法による結晶化では溶液表面では蒸発等による溶液の対流が観察されており、対流が全く生じないということではない。微小重力下でフリーフロー電気泳動による生体高分子の分離を地上実験と比較した結果によると(図1)、明らかに微小重力下の方が熱対流が抑制されて、生体高分子の分離がシャープになっていることが判る。いずれにしても、地上の重力場に比較してタンパク質分子の電荷や疎水性領域などの分子表面の物理的性質が結晶核生成過程およびその後の結晶成長過程においてタンパク質の結晶成長に大きく影響することが予測される。

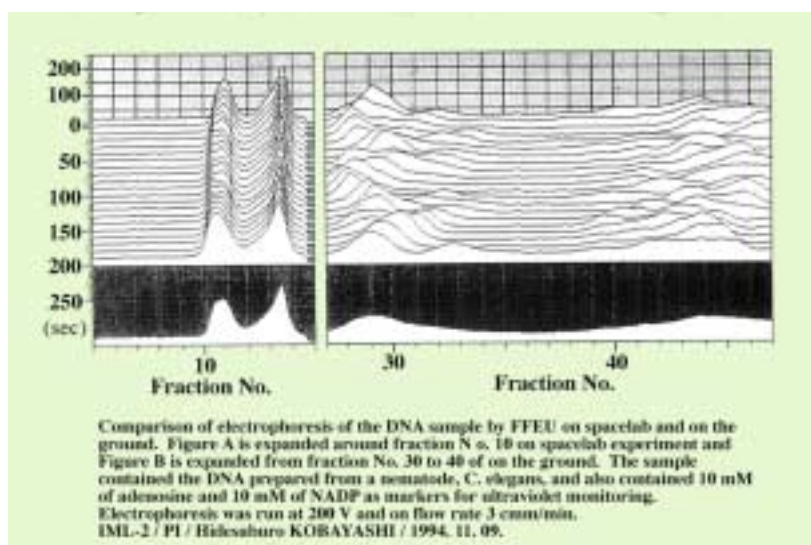


図1 微小重力場でのフリーフロー電気泳動

微小重力場での結晶成長に関する分子メカニズムの詳細は明らかにされていないが、X線結晶学的に良質のタンパク質単結晶が得られた多くの事例がある(図2)。また、相対的にモザイクの少ない単結晶が成長することも報告されている。この意味で宇宙の微小重力環境はタンパク質結晶成長場として優れた環境であるといえる。しかし、宇宙で成長した単結晶はX線照射に対して脆弱であることが多く、高分解能のデータ収集には結晶のダメージを低減する方策を講じることが肝要である。現在、建設中の国際宇宙ステーションでは結晶成長からX線回折実験によるデータ収集まで自動化した装置が開発されている。微小重力場で成長した単結晶の方がX線結晶学的に良質のデータが得られたということは地上結晶より宇宙結晶の方が分子配列の程度が高いことを示唆している。しかし、宇宙の微小重力環境を利用すると、どんなタンパク質でも常に結晶性の良い単結晶が得られるのではなく、タンパク質の種類、結晶化の条件、方法などによって結晶成長の速度や結晶性の程度は異なる。

微小重力場のもう一つの特徴としてタンパク質分子の結晶核への輸送過程が拡散律速で進行することが挙げられる。結晶核が極めて小さいとき、これを1個の粒子

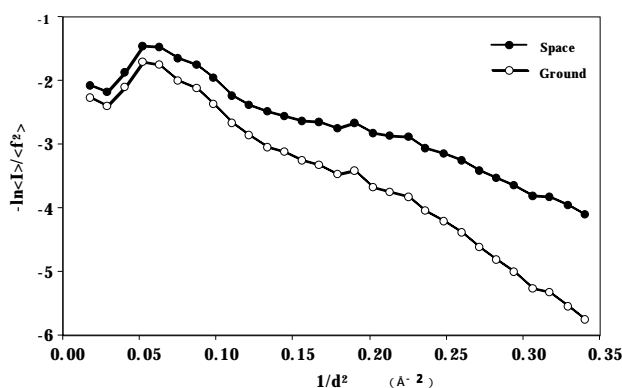


図2 ニワトリ卵白リゾチーム正方晶の回折データの比較

と考えると、結晶核の成長速度は結晶核の半径 r 、時間 t 、結晶核の体積 v を用いて次式で表すことができる。

$$dr / dt = Dv (c - s) \quad (4)$$

D は拡散定数である。(4)式はタンパク質濃度の過飽和度 ($c > s$) が結晶成長の駆動力となることを示している。宇宙の微小重力環境下ではタンパク質分子の挙動が地上と異なるために結晶成長過程での核生成や結晶成長の分子レベルでの挙動に差が生じると考えられる。これに関連して無機物の結晶であるが結晶核の周りの濃度分布や溶質分子の輸送速度と重力の関係に言及した理論式が提出されているので、この式について以下に吟味する。

$$dr / dt = FDv (c - s) / r \quad (5)$$

(5)式は(4)式の右辺に重力の補正項を加えたもので、 F はタンパク質結晶の成長速度に対する重力の影響を考慮した定数である。そこで、(5)式において結晶核に向かう分子の全流量を結晶核の周りから結晶核に向かって流れ込む分子の数として計算すると、次の2式が導かれる。

$$F = (1+A)^{0.285} \quad (0 < A < 100) \quad (6)$$

$$A = rU / D \quad (7)$$

(6)式の右辺のべき定数 0.285 は無機物に対する実験値で、タンパク質の場合これより小さい値になると考えられるが、タンパク質の種類や結晶化条件によっても多少数値が異なると考えられる。また、 A は(7)式に示すように結晶核の溶液中の移動速度 U に関係する状態を表す無次元数の物理パラメータで、溶液の対流に関する補正項を意味する。そして、この系で Stokes の法則が成立するとすると、 A は次式で与えられる。

$$A = 2r^3g | d-d_0 | / 9D \eta \quad (8)$$

(8)式で g は加速度 (単位質量の物体に作用する重力の大きさ)、 η は溶液の粘度、 d 、 d_0 はそれぞれ結晶及び溶液の密度を表す。微小重力場では(8)式の g が 10^{-1} から 10^{-9} の値をとるとき、すなわち、微小重力場では A がゼロに近づくため(6)式において F が近似的に最小値1に近づく。すなわち、微小重力場での結晶成長速度は重力場より遅くなり、(6)式の右辺のべき定数を 0.285とした場合、その速度は地上の約 1/4 に低下するが(図3)、タンパク質の場合にはもう少し小さな値となることが予測される。 F が近似的に1に近づくような系では結晶核生成過程やその後の結晶成長過程で結晶核の周りのタンパク質の濃度勾配が均一になり、対流が起こらない場合はタンパク質分子の運動が拡散律速によってのみ支配される。

そして、結晶核にあまり大きな移動がないとすれば、結晶が成長するにつれて結晶核の周りのタンパク質濃度が希薄になるため結晶成長速度はさらに遅くなると考えられる。

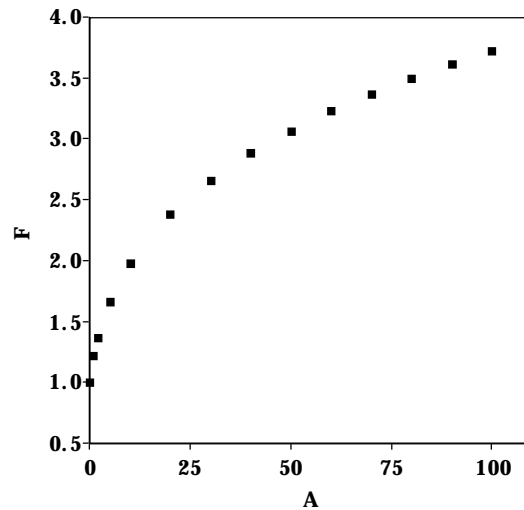


図3 補正項Aに対する重力項の関係

微小重力場でなぜ良質の単結晶が得られるかということについて考察してみると、以下は直接タンパク質分子についての結果ではないが、無機結晶の場合、結晶成長速度が遅いと不純物を排除しながら結晶成長が進むという説もある。また、分子間の相互作用について航空機を使った微小重力場における実験で、*p*-クレゾールにおける散乱強度 Γ の揺らぎの圧力依存性と異方性をもつドメインの大きさ(相関長) ξ^2 の間には(9)、(10)式に示すような関係が成立し、

$$\Gamma \sim (\xi^2) \propto A(P, T) \quad (9)$$

$$A(P, T) = a(P)(T - T^*) \quad (10)$$

$T^* =$ 結晶化温度

次のような実験結果が報告されている。

$$\Gamma \stackrel{\Delta}{=} 0.83 \times 10^{-3} \text{ P}^3 \quad (\text{微小重力}) \quad (11)$$

$$\Gamma \stackrel{\Delta}{=} 4.2 \times 10^{-3} \text{ P}^3 \quad (2g \text{ 実験}) \quad (12)$$

$$\xi_{\text{Low-g}} / \xi_{2g} = 2.3 \quad (13)$$

この結果が微小重力場におけるタンパク質の結晶成長においても適用できるとすると、タンパク質分子の選択的相互作用に関して分子間相互作用の距離が長くなると考えられる。すなわち、微小重力場では分子間相互作用距離がより遠くまで影響することが予想される。

3. 微小重力場におけるニワトリ卵白リゾチームの結晶化と評価

ニワトリ卵白リゾチームは結晶化しやすいタンパク質であるだけでなく、結晶化条件によって三斜晶、単斜晶、斜方晶、正方晶、六方晶など数種類の空間群の異なる単結晶が得られるので、タンパク質結晶成長における宇宙の微小重力の影響を評価するのに好適なタンパク質である。正方晶は最もよく研究されている結晶形で、以下、宇宙実験の試料として単斜晶、斜方晶と正方晶の3種類を選定して実施した実験結果について解説する。

宇宙と地上の両環境で得られた単結晶についてX線結晶解析の結果を比較した。単斜晶は宇宙と地上の結晶で形状が異なっても格子定数や結晶内の分子パッキングに有意の差異は認められなかった。そして、格子定数や結晶内の分子パッキングについては、宇宙と地上という環境の差よりも結晶化条件の違いの方が大きな影響を与えることが明らかになった。たとえば、正方晶の場合、酸性条件とアルカリ性条件で晶出する結晶間で格子定数に僅かな差異があること、結晶化の温度条件が異なることによって格子定数や分子パッキングまで変わってしまうことが判明した。

宇宙で晶出した斜方晶は 1.9Å 分解能で解析した。本結晶は地上では 1983 年にオックスフォード大学の Artymiuk らが報告している斜方晶の格子定数と一致していたが、彼らの報告したデータは分解能が 6Å、構造データは分子配列と主鎖の座標だけで側鎖の情報については発表されていなかった。最近、地上のデータで Sukumar らが 1.9Å 分解能、Carter らが 1.5Å 分解能のタンパク質構造を発表している。本研究では地上結晶については 1.5Å 分解能、宇宙結晶は 1.9Å 分解能であるが、1.7Å 分解能まで反射データがえられており微小重力環境で結晶化したデータという点では初めての成果である。

3.1 分子パッキング

宇宙結晶と地上結晶の分子パッキングを比較した。単斜晶と2種の正方晶については全く同一の結晶化条件で結晶化しており宇宙、地上の両結晶間の分子パッキングに有意の差異は認められなかった。しかし、斜方晶については、地上では温度条件によって結晶内の分子パッキングの異なる2種の斜方晶が得られている。1つは常温で Artymiuk らによって得られたものであり (I 型結晶)、もう一つは正方晶の結晶化条件で温度を 37°C に設定したときに得られたものである (II 型結晶)。そして、宇宙で結晶化した斜方晶 (20°C) は I 型結晶と同じ分子配列を持つ単結晶であった。ニワトリ卵白リゾチーム斜方晶の I 型結晶 (宇宙結晶、常温型地上結晶) と II 型結晶 (高温型地上結晶) は興味深いことに共に結晶内に同じ分子配列を持つ2分子からなる共通のユニットを有していることが判明した (図4)。そして、I 型結晶と II 型結晶はこのユニットの配列が異なっていた。すなわち、結晶化条件、特に、温度条件が異なることによってユニットが全く異なる配列をとっていたのである。

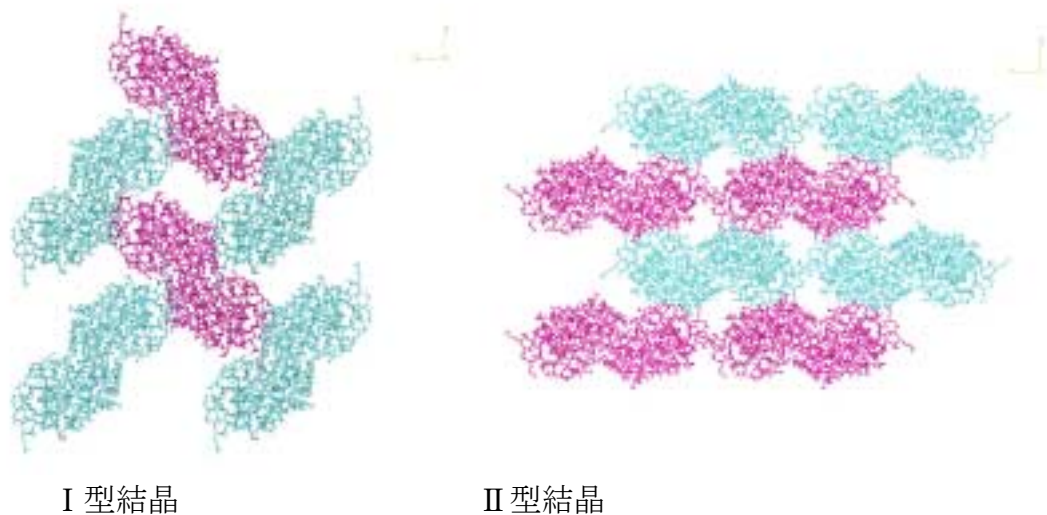


図4 ニワトリ卵白斜方晶の分子パッキング

3. 2 分子構造

タンパク質構造について結晶化条件の異なる単斜晶(宇宙)、斜方晶(地上高温型)、斜方晶(宇宙)、正方晶(宇宙酸性型)及び正方晶(宇宙アルカリ型)の5つのタンパク質構造の主鎖の構造を重ね合わせて比較した。これら5つの構造は誤差の範囲ではほぼ同一の構造をとっていたが、構造的に誤差の大きい領域が2カ所(45-49 と 100 -109)あって、いずれも活性中心の近傍にあり、この付近の構造の揺らぎが大きいことを示唆している。そこで、 α -炭素の RMSD を比較すると、同じ晶系に属する宇宙と地上の結晶の構造間の差は小さく、結晶化条件の異なる違った晶系の構造間の方が RMSD 値が大きいことが判明した。また、ニワトリ卵白リゾチームの単斜晶は非対称単位に2分子(A、B)含まれているが、この2分子の間の誤差が大きく、特に、B分子は他の分子に比較して相対的に RMSD 値が大きく、逆に、A分子は正方晶の分子との RMSD 値が小さく構造的に類似していることが判明した。

結晶内の分子間水素結合はタンパク質分子がある一定の規則に従って分子が会合することによって安定な結晶核を生成し、結晶核が成長する過程において形成されるが、結晶内部における静電結合、疎水性相互作用そして分子間水素結合の自由エネルギーの中では水素結合による寄与は他のエネルギーに比較して小さく、分子間水素結合は分子が会合した後に分子間の結合をエネルギー的に安定化させる効果をもつと考えられる。結晶内の 3.3\AA 以内の距離にある分子間相互作用に関するファンデルワールスエネルギーと水素結合エネルギーの計算結果を表1にまとめた。

斜方晶の I 型結晶と II 型結晶とでは分子パッキングの相違だけでなく II 型結晶の方が結晶格子が大きく、分子間水素結合の数も少ない。I 型結晶が7本に対して II 型結晶は4本で距離も長いことが判明した。斜方晶の分子間水素結合のうち1本は表1に示した3種類全ての斜方晶に共通で、結晶のc軸方向に形成されていた。II 型結晶の4本の水素結合のうち残りの3本はすべて II 型結晶に固有の分子間水素結合で、I 型結晶に共通の水素結合が2本存在することを確認した。また、宇宙結晶(I 型結晶)に固有の分子間水素結合が3本、そして地上の I 型結晶に固有の水素結合が1本確認できた。そして、地上結晶では

表1 結晶内の分子間相互作用に関するエネルギー

Orthorhombic Crystal Type I			Energy (Kcal/mol)	
			Van der Waals	Hydrogen Bond
X	Y	Z-1	-3.415	-0.013
X	Y	Z+1	-13.898	-1.077
- X+1/2	-Y+1	Z-1/2	-23.133	-1.557
- X+1	Y-1/2	-Z-1/2	-7.157	-0.413
- X+1	Y-1/2	-Z+1/2	-0.139	0.000
- X+1	Y+1/2	-Z-1/2	-3.003	-0.329
- X+1	Y+1/2	-Z+1/2	-16.394	-1.665
X-1/2	-Y+1/2	-Z	-6.659	-1.128
X+1/2	-Y+1/2	-Z	-6.911	-0.012

Orthorhombic Crystal Type II

X	Y	Z-1	-4.154	-0.016
X	Y	Z+1	-14.388	-0.529
- X+1/2	-Y-1	Z+1/2	-24.255	-0.673
- X+1/2	-Y+1	Z-1/2	-1.026	-0.001
- X+1	Y+1/2	-Z+1/2	-0.045	0.000
X+1/2	-Y+1/2	-Z	-26.630	-0.746
X+1/2	-Y+1/2	-Z+1	-0.073	0.000

座標(X,Y,Z)にある分子と各座標にある分子との分子間相互作用エネルギー。

分子間水素結合が形成されているにもかかわらず宇宙結晶では水分子の接近によって結合距離が遠くなり水分子を介した水素結合に変わっているものが少なくとも3本確認できた。以上のように、微小重力場では結晶の晶系や主鎖の構造にまでは影響を与えないが、水素結合の数や状態に変化が認められることから側鎖間の相互作用には影響が現れている。

4. タンパク質結晶成長メカニズムに関する考察

最近、ATMの観察結果に基づいてニワトリ卵白リゾチーム正方晶に関する結晶成長メカニズムが議論されている。それによると結晶核に対しタンパク質分子が2分子単位で結晶核表面に取り込まれるという説もあるが、結晶化中の溶液にダイマーの存在は確認されていないし、本研究室で行った超遠心分析でも正方晶の結晶化条件を満たしているタンパク質過飽和溶液中にダイマー以上の高分子量を持つ分子種の存在は確認できなかった。

タンパク質結晶核の成長面にタンパク質分子が取り込まれるとき、成長面のエネルギー分布に応じてエネルギー障壁の低い場所から順に分子が取り込まれるとすると、分子間相互

作用エネルギー、特に、接触領域(疎水性相互作用)のエネルギーが重要な役割を果たすと考えられる。そこで、疎水性相互作用エネルギーを計算してみると、ニワトリ卵白リゾチームの2種の斜方晶はいずれの場合も、上述の2分子からなる共通ユニット間の分子間相互作用が強く、*c* 軸方向の成長に対しては共通ユニットを構成するサイトに優先的にタンパク質分子が取り込まれることを強く示唆する結果が得られた。

5. おわりに

X線回折法によってタンパク質の結晶構造解析を実施する場合、これからは、タンパク質構造の高度な正確さが要求されることは明らかで、そのため結晶成長の観点から言及すれば、いかに結晶性の優れたタンパク質単結晶を調製し、タンパク質構造解析の高精度化、高分解能化を計ることが重要課題となるであろう。X線源の高輝度化に伴い、トライアル・アンド・エラー方式の結晶化法や結晶の凍結技術が進歩したことによって結晶のサイズが小さくても結晶性の優れた単結晶であれば、高分解能の構造解析が可能になった。また、時間分割X線結晶構造解析を実施するためには結晶成長に新しい技術(結晶加工: **Engineering of Biocrystals**)を導入することも必要であろう。一方、酵素反応機構の詳細を正確に把握するためには中性子回折を利用して水素原子の位置を特定しようとする大きな単結晶を調製する技術も重要である。

このように、タンパク質を中心とする生体高分子の結晶成長も、今や、情報と技術を駆使して研究目的に合わせた単結晶を調製しなければならない時期が到来した。宇宙の微小重力場や地上で得られる高磁場は結晶性の優れた単結晶が成長する環境として注目していきたい。