

放射光トポグラフィーによるタンパク質結晶の完全性の評価

横浜市立大学客員教授

横浜創英短期大学教授

小島謙一

タンパク質結晶の結晶成長の研究は、世界中で1980年代から精力的に行われ、その成長機構は無機結晶や低分子結晶と同じように、2次元核成長機構とスパイラル成長機構の2種類があることがわかった。しかしながら、成長機構がわかっても必ずしもすべての結晶の完全性が高いとは限らず、十萬種ともいわれるタンパク質の中で、数十%しか結晶解析が行われていないといわれている。これは、現在、タンパク質結晶の結晶解析の分野で残っている大きな問題で、タンパク質の単結晶を育成しても十分な回折データが取れないため、高い精度で結晶解析が出来ないことを意味している。

一方、タンパク質結晶の不完全性の研究はモザイク構造から始まる。しかしながら、その不完全性の評価はいろいろな方法で行われているが、評価法はまだ確立されていない。それは、この不完全性が何に起因するかが明らかでないからである。われわれはタンパク質結晶中の不完全性の原因の一つと考えられている、格子欠陥の中で、主に転位について放射光トポグラフィーによって研究してきた。その結果、転位像を得るための最適な条件を見つけ、単色放射光X線によって明瞭な転位像を得ることに成功した。[1, 2]

一般的にタンパク質結晶の単位格子は数 nm から数十 nm と、通常金属結晶や半導体結晶にくらべると格子定数が二桁も大きく、転位の弾性エネルギーはバーガスベクトル、 \mathbf{b} の二乗に比例するので非常に大きくなり、タンパク質結晶中では転位など存在できないものと考えられていた。しかしながら、これも最近のわれわれの研究からバーガスベクトルは大きい、タンパク質結晶の弾性定数が金属や半導体結晶に比べて二桁も小さいので、転位の弾性エネルギーも予想されていたほど大きくならないことがわかった。

タンパク質結晶の不完全性の評価の方法は巨視的にはX線回折曲線の半値幅、結晶表面の観察としては、光学顕微鏡によるエッチピット観察、AFMによる分子配列の観察や表面ステップ観察などがあるが、これらの観察では不完全性の特定、すなわち格子欠陥の特定できない。そこでわれわれは格子欠陥を特定するためにX線トポグラフの実験を行ってきた。タンパク質結晶のX線トポグラフの実験は1990年代から世界中で行われてきたが、明白な転位像を得ることができなかった。このために、結晶中の転位の消滅則（散乱ベクトル \mathbf{g} とバーガスベクトル \mathbf{b} の内積が0で消滅）により、回折像が転位であることをも特定できなかった。この主な原因はX線トポグラフの運動学的転位像を得るため

の条件として、試料の厚さに上限と下限があることがあり、タンパク質結晶の場合、下限で厚さが約1mm 以上も必要であることが、われわれによって明らかにされた。2003年に、放射光トポグラフの実験で線状像の消滅が、結晶中の転位の消滅則を満たし、はじめてリゾチウム結晶中にも転位が存在することが確認された。[1-3]

放射光トポグラフの実験は主にリゾチウム結晶によって行われた。リゾチウム結晶は多形を持つので正方晶系、斜方晶系、単斜晶系の三種類の結晶を二液界面法によって育成した。詳しい結晶成長に関するデータは文献[1]を参照されたい。

図1 立方晶

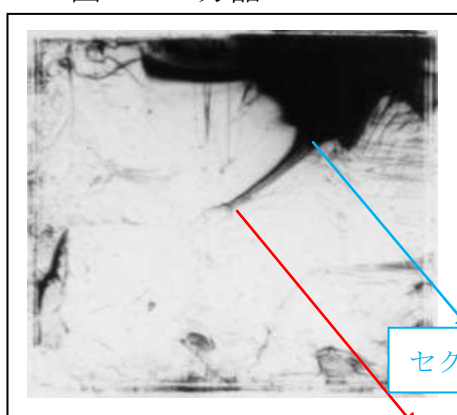


図2 斜方晶

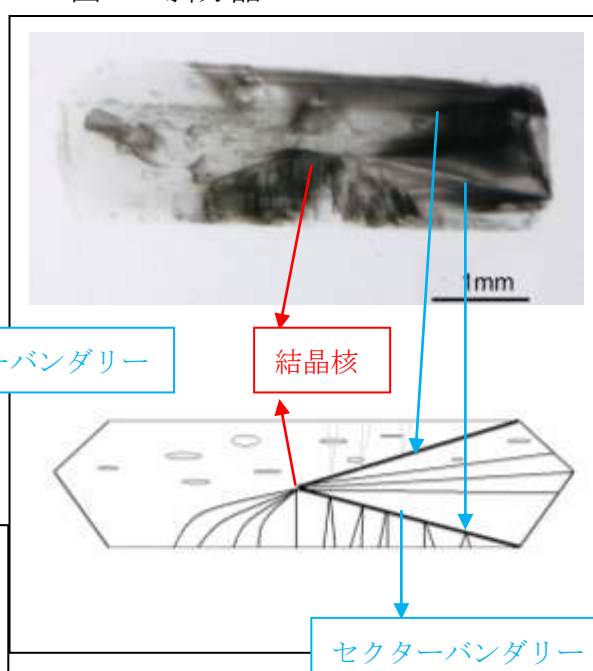


図3 単斜晶

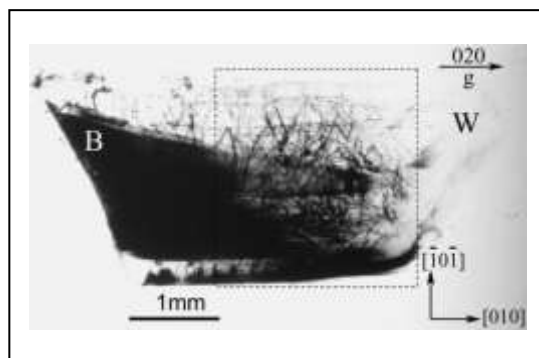


図1から図3は立方晶、斜方晶、単斜晶リゾチウム結晶の単色放射光トポグラフによる転位像である。図2の下図は転位線を分かりやすいように図式化してある。立方晶、斜方晶結晶では結晶核から転位が導入されていることと、セクターバンダリーから転位が発生していることがわかる。また転位線の特徴としては結晶核やセクターバンダリーから発生している直線状の転位と、その他にループないしは曲線状の転位も観察された。一方、単斜晶では直線状の転位よりむしろ曲線状の転位が多く観察され、単斜晶特有な結晶成長のメカニズムとともに転位の発生の機構も異なることがわかった。

転位で最も特徴的なパラメーターであるバーガースベクトルも、正方晶と斜方晶で決定された。その結果を表1と2に示す。表1は正方晶であるが[001]らせん転位はスパイラル成長機構によって観察される結晶成長に参与している転位であることがわかる。[110]転位は曲線状の転位であることがわかった。

斜方晶結晶では3種類の転位が特定された。斜方晶の場合にはらせん転位はまだ観察されずに刃状転位が観察されている。

図1 正方晶リゾチウム結晶の転位

b	 b (Å)	転位の種類
[001]	37.9	らせん転位
[110]	111.8	混合転位

図2 斜方晶リゾチウム結晶の転位

b	 b (Å)	転位の種類
[001]	30.4	刃状転位
[1-10]	92.9	刃状転位
[011]	79.8	混合転位

われわれが観察した、正方晶、斜方晶、単斜晶中の転位密度は 10^3 cm^{-2} のオーダーであった。これは転位密度だけを考えると金属結晶や半導体結晶に比べてもタンパク質結晶は決して悪い結晶ではない。

また、転位の発生の機構が結晶系によって異なることが確認された。これら転位の発生源は結晶核、セクターバンドリー、不純物集合体などが考えられる。さらに、タンパク質結晶特有な結晶水、とくにいわゆる mobile water の集合体も転位の発生源の可能性もある。また、転位の持つ歪場は不純物や mobile water を引きつける作用をするものと考えられるので、半導体結晶で行われている、いわゆる転位による不純物のゲッターリングによって結晶の一部の完全性を高めることができるかも知れない。このように転位と水の関係は重要である。

タンパク質結晶中の格子欠陥の研究は始まったばかりであるが、結晶の完全性を評価するのに重要な役割を果たすものと考えられる。とくにその中で、格子欠陥の発生と結晶水の関係や、巨視的なロッキングカーブの半値幅と微視的な転位などの格子欠陥が引き起こす歪場との相関などを研究することによって結晶の完全性に対する定量的な評価ができるものと考えられる。

参考文献

- [1] M. Koishi, K. Kojima, M. Tachibana et al, J. Cryst Growth and Design: **7**, 2182-2186 (2007)
- [2] H. Koizumi, M. Tachibana, K. Kojima et al, Phys. Stat. Solid.: **(a)204**, 2688-2693 (2007)
- [3] M. Tachibana, K. Kojima et al, J. Synchrotron Rad.: **10**, 1-5 (2003)