

## タンパク質の結晶化: 結晶成長学からの提言

佐崎 元<sup>1,2)</sup>, 中嶋一雄<sup>1)</sup>

- 1) 東北大学金属材料研究所, 〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1
- 2) 東北大学学際科学研究センター, 〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉

### Abstract

In the field of the structural biology, crystal growth physics is not recognized as useful science, since it is still not capable to predict appropriate nucleation conditions for unknown proteins. However, once protein crystals are obtained, the crystal growth physics can contribute to the improvement of the crystal quality (diffraction power). In this article, first we give examples to show that principal mechanisms of the protein crystallization is just same as that of low molecular weight compounds. We also mention the reasons why still we can not predict the appropriate nucleation conditions for unknown proteins. Then, from the viewpoint of the crystal growth physics, we explain basic strategies to grow protein crystals of good quality. The basic strategies can be summarized in 1) purification of target proteins, 2) screenings of the crystallization conditions with high efficiency, 3) preparation of a solubility curve, 4) active control of a supersaturation based on the solubility data, and 5) appropriate crystallization techniques. Finally, we point out several problems those are necessary to be solved for the further development.

### 1. はじめに

結晶は、通常、光沢のある平らな結晶面で囲まれている。Fig. 1a に示した描像が多くの人が持つ結晶(0.1-1mm オーダー)のイメージであろう。しかし、1000 倍程度の倍率で結晶表面を拡大して観察すると光景は全く変わってくる( $\mu\text{m}$  オーダー)。結晶表面はもはや平らではなく、様々な山や谷が観察される(Fig. 1b)。しかも、これらの山や谷は静的ではなく、実にダイナミックに運動することで結晶は成長・溶解する。さらに 1000 倍程度拡大して観察すると、Fig. 1c のように、個々のタンパク質分子が見えてくる(nm オーダー)。X線(中性子)構造解析学では、Fig. 1a の結晶にX線(中性子)を照射し、Fig. 1d の分子構造を解析することを目的としている。しかしながら、結晶成長学では、その中間のスケール(Figs. 1b, c)を研究の対象としている。タンパク質分子同士がどのように相互作用しあい Fig. 1c の様な美しい規則構造をとるのか、また、そのような規則構造がどのようなメカニズムで成長するのか(Fig. 1d)、を取り扱うのが結晶成長という研究分野である。この様にして成長するタンパク質結晶(Fig. 1a)がどのくらい高分解能の回折データを示すかは、その結晶が

どの様にして成長してきたか (Figs. 1b, c) に極めて大きく左右されることは言うまでもない。

構造生物学における結晶成長学の貢献は、まだ高いとは言えない。未知のタンパク質に対して適切な結晶構造を持つ結晶核が晶出する結晶化条件を理論的に予測できないことがその原因である。しかしながら、いったん結晶が晶出すれば、良質化につながる結晶化操作を予測することは、以下に示す結晶成長学の知見をもとに可能となっている。本稿では、まず、これまでに何がわかっていてまだ何がわかっていないのかについて説明した後に、結晶成長学から見た良質なタンパク質結晶を得るための基本戦略を紹介する。なお、本稿の内容の一部は「溶液からの結晶成長」(共立出版)<sup>1)</sup>に、そしてさらに詳細が筆者のホームページ<sup>2)</sup>に記載されている。ご興味のある方は、これらを参照いただきたい。

## 2. これまでに何がわかっているか

タンパク質結晶化についての結晶成長学的観点からの研究は、1980 年代中頃からようやく始まった。タンパク質の結晶成長過程は、はじめは何かミステリアスなものと考えられていたが、これまで金属や半導体などの低分子化合物を題材にして発展してきた結晶成長に関する諸概念が、タンパク質の場合にも適用できることが、徐々に明らかになってきた。

低分子化合物の場合、バルク結晶は、過飽和(結晶化駆動力)の増大と共に「渦巻き成長」、「島状(2次元核)成長」、「付着成長」のメカニズムで成長することがわかっている。それでは、タンパク質結晶の場合はどうであろうか。実は全く同じであることが、原子間力顕微鏡 (AFM) などを用いた多くの研究により明らかになってきた。Fig. 2 に示したように、結晶は、過飽和が小さい場合にはらせん転位を中心とした「渦巻き成長様式」で成長し、過飽和の増加と共に、結晶表面上で2次元核が形成されては広がり「島状(2次元核)成長様式」で成長する。また、2次元核の臨界サイズがタンパク質1分子のサイズよりも小さくなってしまった高過飽和状態では、結晶は「付着成長様式」で成長する。ここで、過飽和度は  $\sigma = \Delta\mu/k_B T = \ln(C/C_e)$  で定義される。 $\Delta\mu$  は結晶相と環境相での化学ポテンシャル差、 $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は絶対温度、 $C$  は溶液中のタンパク質濃度、 $C_e$  は溶解度である。過飽和度が大きな状態とは、タンパク質濃度  $C$  が高い、もしくは溶解度  $C_e$  が低い(沈殿剤濃度が高い、結晶化温度が低いなど)、場合に相当する。

次に、結晶の形についてもふれる。結晶の外形は、結晶中の分子間相互作用の強さと向き、および結晶が成長する際のカインेटクスで決定される。前者で決まる形が結晶の「平衡形」、後者が結晶の「成長形」と呼ばれる。後者に注目すると、結晶の形は、結晶化の駆動力によって大きく変化することが、低分子化合物結晶の場合には一般に知られている。結晶化駆動力が小さな場合には、結晶はファセットと呼ばれる平らな低指数面に囲まれて成長するが、結晶化駆動力が大きくなると結晶の角の部分により速く成長し、辺の真中が凹んで角が出っ張った「骸晶」と呼ばれる形になる。さらに駆動力が増加すると角がさらに発達した「樹脂状」に成長し、非常な高過飽和下では

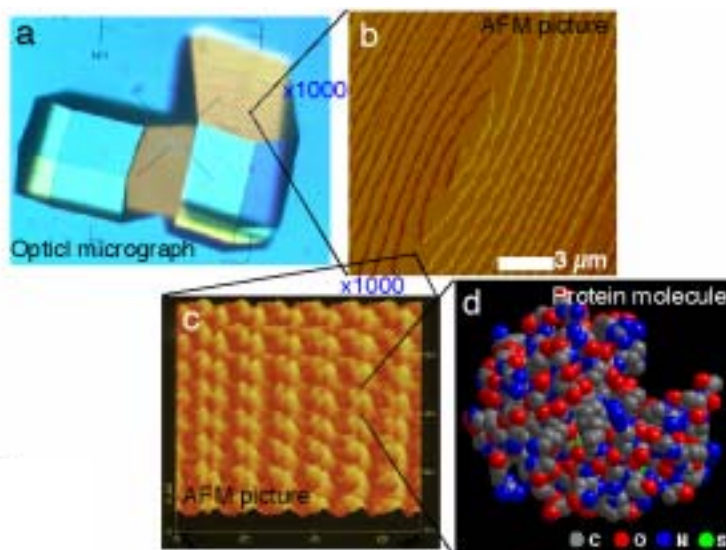


Fig. 1. Protein crystals and their surfaces observed in various size scales. (a) An optical micrograph of tetragonal lysozyme crystals in 0.1-1 mm size scale, (b) a spiral growth hillock observed by atomic force microscopy (AFM) in several  $\mu\text{m}$  size scale, (c) a (110) surface of the tetragonal lysozyme crystal observed by AFM in several 10 nm size scale, (d) 3D-structure of the lysozyme molecule determined by X-ray diffraction analysis. Atomic force micrographs: courtesy of Prof. T. Nakada of Ritsumeikan University.

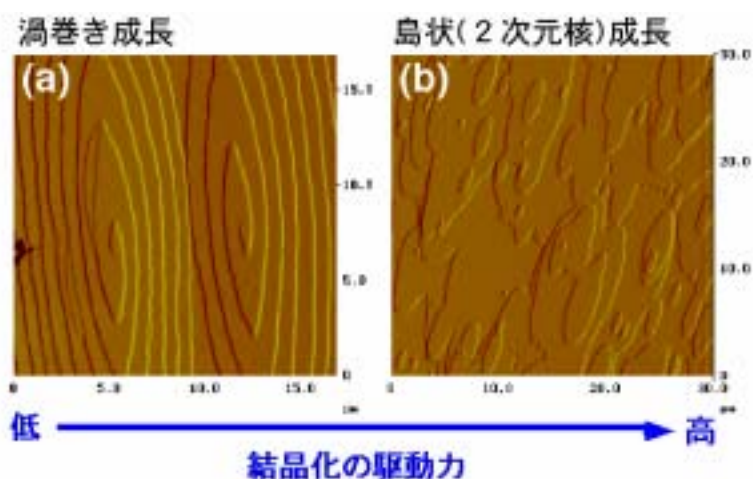


Fig. 2. Growth mechanisms of protein crystals. (a) Under low supersaturation range, protein crystals grow by spiral growth mechanism. (b) As a supersaturation increases, growth mechanism changes to two-dimensional nucleation growth. Atomic force micrographs: courtesy of Prof. T. Nakada of Ritsumeikan University.

多数の針状晶が集まった「球晶」となる。タンパク質結晶の場合にも、全く同じ形の変化が観察される。Fig. 3 は馬脾臓フェリチン結晶を示す<sup>3)</sup>。駆動力の増加にともない結晶の形は「正八面体結晶」から「骸晶」、「樹枝状結晶」へと変化することがわかる。

結晶の成長メカニズムや形に関するこれらの結果は、タンパク質結晶が成長する基本メカニズム自体は低分子化合物結晶と何ら変わらないことを示す。

### 3. まだ何がわかっていないのか

相互作用エネルギーを見積もることができれば、フェイズ・ダイアグラム(溶解度曲線)を計算だけで見積もることができる。つまり、どのような条件(温度, pH, 塩析剤の種類と濃度など)で結晶化すれば適切な結晶が晶出するかを予測することができる。実際に、金属(合金)結晶などの場合には、相互作用エネルギーを数パーセントの誤差で見積もることができるため、フェイズ・ダイアグラムを計算だけで予測する試みが多くなされている。しかしながら、タンパク質の場合には相互作用エネルギーの評価がはなはだ不十分な状況にある。結晶中や水溶液中での、タンパク質分子間および水分子-タンパク質分子間の結合(水和)エネルギー(エンタルピー)は、まだ 50%程度の誤差で見積もることができない。タンパク質分子直近の局所的な部位に働く力を見積もるには、溶媒の水分子を含めた環境がもはや連続体とは見なせず、さらには誘電率の値が正確に求められないことが主な原因である。近年、新しい解析方法として、松浦らが中心になって、結晶中の分子間接触部位(「マクロボンド」と呼ばれる)についてのエンタルピー解析が精力的に行われており、タンパク質結晶の平衡形などが予測できるようになってきた<sup>4, 5)</sup>。一方、相互作用エントロピーについては、水のエントロピーを含めるとほとんど手が着けられない状況にある。そのため、タンパク質分子の自由エネルギーがまだまだ計算できず、タンパク質の結晶化条件を計算で予測することができない。

タンパク質分子はその大きさのため、「核形成」や「クラスタリング」などの現象について、タンパク質をモデル物質とすることによって直接観察が可能になってきた。実際に、タンパク質分子の結晶表面上での2次元核形成などは AFM を用いて盛んに研究されている。タンパク質分子は、結晶成長の基礎的な素過程を実験的に明らかにするための格好のモデル物質となっている。現在、AFM のみならず、動的・静的光散乱法による観察や、X線や中性子線を用いた小角散乱実験などが精力的に行われている。これらの研究が進展すれば、核形成メカニズムが明らかになり、未知タンパク質の結晶化に大きく寄与するものと期待される。また、タンパク質分子が結晶相に取り込まれる際には、分子表面の特定の部位が脱水和して、タンパク質分子同士が相互作用しあう必要がある。この「脱水和」過程が、結晶表面でのタンパク質分子の取り込みを律速していると現在考えられている。しかしながら、この脱水和過程はまだほとんど明らかになっておらず、この過程を明らかにするための新しい方法論の創出が待たれる。

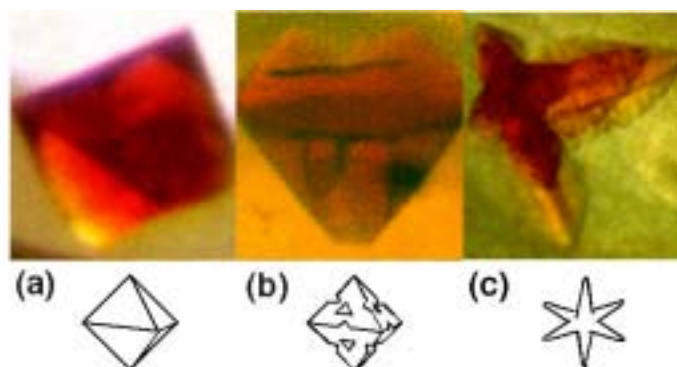


Fig. 3. Changes in the morphology of horse spleen ferritin crystals as a function of the supersaturation<sup>3)</sup>. With an increase in the supersaturation, morphology of the crystal changes from polyhedron (a) to skeletal shape (b) and to dendrite (c).

#### 4. 良質なタンパク質結晶を育成するための基本戦略

良質なタンパク質結晶を得るための、結晶成長学から見た基本戦略は、1) 試料タンパク質の高純度精製、2) 効率的な結晶化条件の探索、3) 溶解度曲線の作製、4) 溶解度データに基づいた計画的な結晶育成、5) 適切な結晶化方法の選択、に要約できる。未知タンパク質の場合には微量のタンパク質試料しか手に入らないために、中には現時点では現実的ではないと思われる箇所もあるが、ここではあくまでも戦略ということをご了解いただきたい。

##### 1) 試料タンパク質の高純度精製

まず、試料タンパク質を高純度に精製することが必要となる。通常、SDS-PAGE でシングルバンドであることが目安とされるが、当然、高純度であるほど望ましい。当たり前であると思われるかもしれないが、現実的にはこの過程が非常に難しい。リゾチームを例にとると、市販の純度 99% の標品(生化学工業製、6 回再結晶)と、さらに 99.9%まで精製した試料の結晶化過程を比較すると、前者では不純物効果が明瞭に認められる。純度 99.9%の試料の場合には平滑な(101)面上に二次元島が成長する様子が観察されるが(Fig. 4a)、純度が 99%の場合には(101)表面が不純物で覆われている様子が観察される(Fig. 4b)<sup>6)</sup>。粒状に見えるコントラストが、リゾチーム分子同士が共有結合してでき

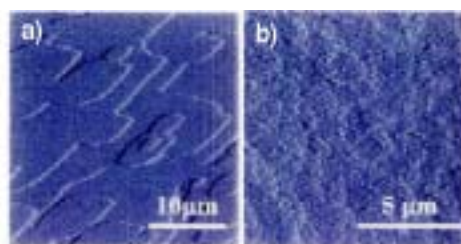


Fig. 4. Effect of impurity on the crystallization of tetragonal lysozyme crystals<sup>6)</sup>. (101) surfaces of the tetragonal lysozyme crystals of 99.9% purity (a) and 99% purity (b). Granular contrasts observed in (b) present covalently bonded dimers of the lysozyme molecules.

たりゾチーム・ダイマーである。これらのダイマーは、ステップの進行を妨げ、結晶の成長を阻害することがわかっている<sup>6, 7)</sup>。通常、結晶の成長停止(cessation of growth)と呼ばれる現象も、不純物によると考えられる。

未知タンパク質試料の場合には、上記のような高純度の精製は、通常非常に困難である。しかしながら、全ての不純物が結晶成長過程に悪影響を及ぼすのではない。結晶化を妨げる程度は、不純物の種類に大きく依存する。結晶化に対して特に悪影響を及ぼすと考えられる不純物は、「目的タンパク質とほぼ同じ構造を有しながら(結晶中によく取り込まれる)、それ以降の周期的な分子間結合を妨げる」種類のものである。すなわち、上記のような目的タンパク質のダイマーやトリマーなどの「オリゴマー」や、「目的タンパク質の一部が変性したもの」などが結晶化に最も悪影響を及ぼすので注意が必要である。また、糖タンパク質の場合には、不完全な分解を受けた糖鎖も大きな障害を引き起こす。発現後の巻き戻しが不完全なタンパク質も、同様に有害な不純物となる。しかしながら、これらの不純物は、通常、精製が非常に困難である場合が多い。半導体結晶の場合におけるゾーンメルティング法のような、精製技術に関するブレイク・スルーが強く求められる。

## 2) 効率的な結晶化条件の探索

3節で述べたように、相互作用エネルギーを定量的に評価できないため、適切な構造を持つ結晶核が晶出する結晶化条件を見つけるためには、市販のスクリーニング・キットなどを利用して、効率的かつ網羅的に探索するしか方法はない。5)でも後述するが、その際の結晶化手法としては、「蒸気拡散法」が最も適した手法といえる。

結晶化条件を見つけるための理論的な方策はないと述べたが、全く戦略がないわけではない。相互作用エネルギーを理論計算で求めることはまだまだ困難であるが、実測することは可能である。測定手法としては、動的・静的光散乱法<sup>8, 9)</sup>や浸透圧法<sup>10)</sup>などが簡便な方法として挙げられる。もし、研究室にダイナプロ社製のProtein Solution(動的光散乱光度計)などがあるのであれば、試料タンパク質の単分散性のみを測定するのではなく(それも重要であるが)、

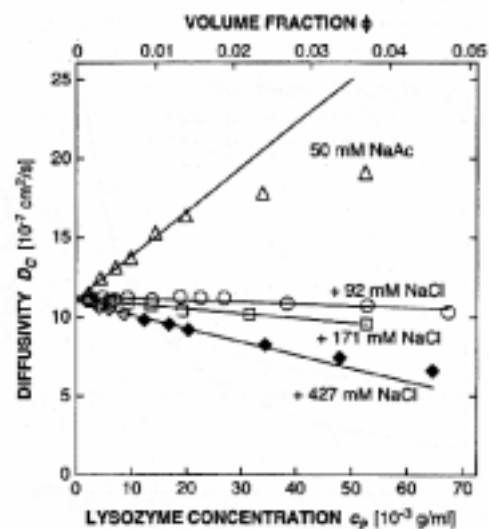


Fig. 5. Effect of intermolecular interactions on the diffusivity of the lysozyme molecule<sup>8)</sup>. At undersaturated condition, repulsive interaction works, and the diffusivity of protein molecules becomes larger with an increase in the protein concentration. On the contrary, at supersaturated condition, attractive interaction decreases the diffusivity.

相互作用にも注目していただきたい。タンパク質分子間に「引力」が働いている場合には、拡散係数は小さく(粒径は大きく)測定され、逆に「斥力」が働いている場合には、拡散係数は大きく(粒径は小さく)測定される(Fig. 5)。結晶が生成するには、まず、沈殿剤を加えていない状態で、タンパク質分子間に「斥力」が働く状況(言い換えると未飽和な状況)を作り出してやる必要がある。その後、注意深く沈殿剤を加え、分子間に「わずかに引力」が働く状況(言い換えると過飽和な状況)を作り出してやる操作が、適切な結晶化操作といえる。そのため、相互作用を測定しながら、緩衝液や沈殿剤の種類や濃度を变化させることで、やみくもにスクリーニングするのに比べて最適な結晶化条件を見つけだすまでの時間を飛躍的に短縮できるはずである。市販キットを用いて結晶化条件をスクリーニングする際に、タンパク質濃度を数点変えて試料を調製し、光散乱測定するだけで Fig. 5 に挙げた情報は簡単に得ることができる。それにより、セットするドロップの条件がどれくらい結晶化に適しているかを、事前に知ることができる。是非お試しいただきたい。今後、そうやって得られる結晶の品質(回折能)と測定される相互作用力との相関を明らかにするための研究が重要になると考えられる。

### 3) 溶解度曲線の作製

結晶化条件の探索で結晶らしきものが晶出する条件がだいたい求まれば、次は溶解度測定である。2 節で述べたように、結晶化の駆動力(過飽和)が変わると結晶の成長メカニズムも変わる。そこで、最も結晶の品質が良いと考えられる成長メカニズム(4)で後述)で結晶を育成するためには、溶解度曲線(相図)が必要不可欠となる。

タンパク質分子は低分子化合物と比べて並進・回転の拡散定数が1~2桁小さく、結晶の成長速度も非常に遅いため(数 nm/sec 以下)、過飽和溶液から結晶が成長してやがて溶液濃度が平衡濃度(溶解度)に達するまでに通常数ヶ月を要する(低分子化合物結晶の場合には通常数日程度)。また、溶液中のタンパク質濃度を経時的にモニターするには大量の試料が必要であった。そのため、タンパク質の溶解度測定は時間と試料を浪費する操作であると考えられてきた。

しかしながら、近年、光干渉法を使った方法<sup>11-13)</sup>、シンチレーション法<sup>14)</sup>、マイクロカラム法<sup>15-17)</sup>など、微小容量の溶液量・短時間で溶解度測定が可能な手法がいくつか開発されてきた。ここでは、我々が開発した光干渉法を用いた手法を紹介する<sup>11)</sup>。溶解度測定の原理は、次の通りである。結晶が成長すると周りの溶液中から溶質を結晶中に取り込むため、結晶の近傍では沖合いの溶液中に比べてタンパク質濃度が低下する。その結果、結晶近傍では屈折率が低下し、光学距離が短くなり、干渉縞が曲がる(Fig. 6a)。結晶と溶液が平衡の時には結晶近傍の濃度分布は一様なため、干渉縞はまっすぐ平行に見える(Fig. 6b)。また、結晶が溶解する時には、結晶近傍でタンパク質濃度が上昇するために、成長の場合とは逆の方向に干渉縞は曲がる(Fig. 6c)。すなわち、干渉縞を使って結晶周囲の濃度分布をその場観察することにより、結晶が成長・溶解しているのか平衡状

態にあるのが、一目で判別できる。そのため、タンパク質濃度が既知の溶液を用いると、結晶との平衡温度を1時間以内に決定することができ、これまで数ヶ月を要して得ていた溶解度に関する情報を、1時間以内に得ることができる。また、溶解度測定以外にも、結晶化の途中段階で結晶がまだ成長し続けているかどうかの確認など、光学顕微鏡で結晶サイズの変化を測定するよりも格段に敏感に判別することができる。また、結晶周囲の溶液相ではなく、結晶表面上に干渉縞を調整しても、結晶面の厚み方向の移動に伴う干渉縞の動きから、結晶が成長・溶解しているかについて高精度で情報を得ることができる<sup>18)</sup>。測定に使用する装置は、Fig. 7のようになっており、マイケルソン型干渉計ユニットは15~25万円程度で購入できるため(ニコン製)、光学顕微鏡さえ現有していれば、非常に安価に実験できる。セルの容量も約20-30 $\mu$ lと少量で、タンパク質濃度数十mg/mlの溶液が数十 $\mu$ l、すなわち約1mgの試料タンパク質があれば溶解度曲線を全て測定できる、十分に実用的な手法である。

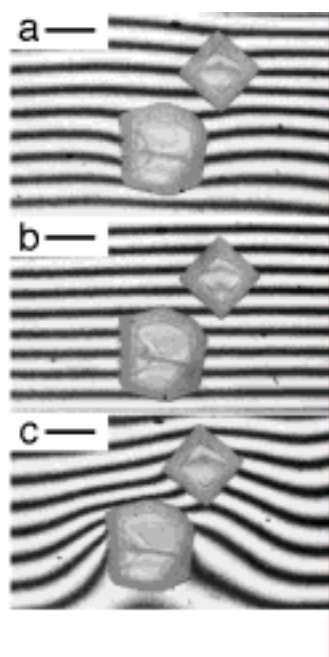


Fig. 6. Interferograms around the tetragonal lysozyme crystals<sup>11)</sup>. (a) Growth (20°C), (b) equilibrium (23°C), (c) dissolution (30°C). The scale bar represents 500  $\mu$ m.

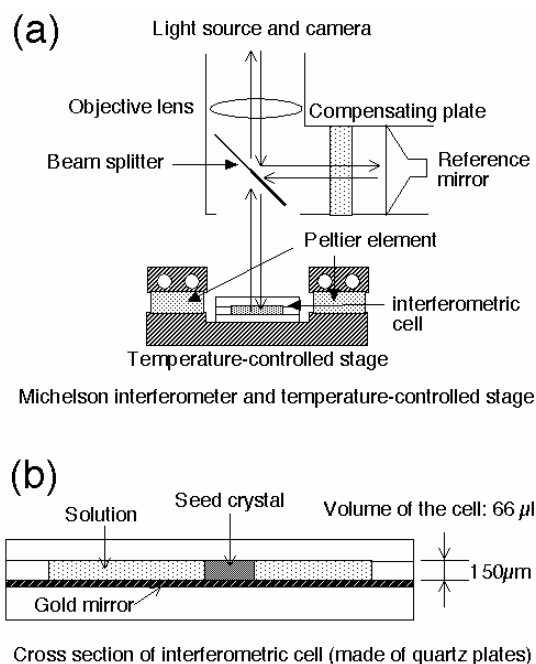


Fig. 7. Schematic drawing of the experimental setup for the solubility measurement<sup>11)</sup>. (a) A Michelson interferometer and the sample cell on the temperature-controlled stage. (b) A cross-sectional view of the sample cell.



#### 4) 溶解度データに基づいた計画的な結晶育成

溶解度曲線が 3) によって得られたならば、溶解度データに基づき能動的な結晶化操作が可能となる。例えば、温度を操作パラメータとした場合の一例を Fig. 8 に示す(溶解度の温度依存性が大きなタンパク質結晶の場合に有利となる)。もちろん、操作パラメータは温度だけではなく、タンパク質濃度、沈殿剤濃度、pH などあらゆるパラメータが利用可能である。Fig. 8 の(A)のカーブは、上記 3) で測定した溶解度曲線である。また、結晶化の際の過飽和が増加すると共に、渦巻き成長、島状(二次元核)成長、付着成長と成長メカニズムが変わって行く領域が異なる色で示されている。生成する結晶の品質は、どの様なメカニズムで結晶が成長したかに大きく依存する。例えば、高過飽和状態でみられる付着成長のようなラフな成長様式では、良い品質の結晶は当然得られない。また、島状(二次元核)成長では、成長して広がって行く島が互いにぶつかり、レイヤーを埋めてゆく。この島がぶつかる際に、うまく互いのステップが合致せず、格子欠陥が生成される場合が多くある。そのため、最も低下飽和状態で成長する渦巻き成長が、良質な結晶を育成するのに最も適した成長メカニズムであるといえる。

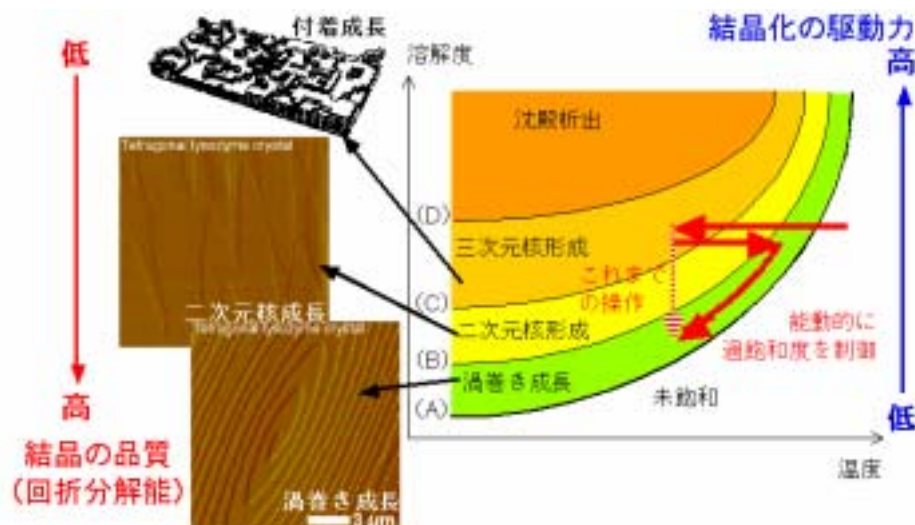


Fig. 8. Active control of the supersaturation based on the phase diagram. The curve (A) presents the solubility curve. In the supersaturation ranges of (A)-(B), (B)-(C), and (C)-(D), protein crystals grow by spiral growth, two-dimensional nucleation growth, and adhesive growth mechanisms, respectively.

温度を操作パラメータとした場合、これまでの結晶化操作の多くは、図に示されているとおり、何らかの方法で(例えば温度を下げる、沈殿剤を添加するなど)過飽和溶液を調製した後は、そのまま核形成が起こり結晶が成長するに任せる、という受動的なものであった。そのため、結晶は、あま

り品質が良くない成長メカニズムであると考えられる付着成長や、二次元核成長様式で成長せざるを得なかった。しかし、溶解度曲線さへわかっていれば、例えば、過飽和溶液を調製後、微結晶の晶出を確認するやいなや、高品質な結晶をもたらす渦巻き成長の領域へ結晶化条件をシフトすればよい(図では温度を上げる)。この様にして結晶の成長メカニズムをきちんと制御することによってどのくらい結晶の品質が向上するかについては、吉崎らが興味ある結果を見出している<sup>19)</sup>。彼らは99.9%に精製したリゾチームを用い、バッチ法で結晶化する際の過飽和を低下させることで、結晶の品質が明らかに向上することを報告している(Fig. 9)。

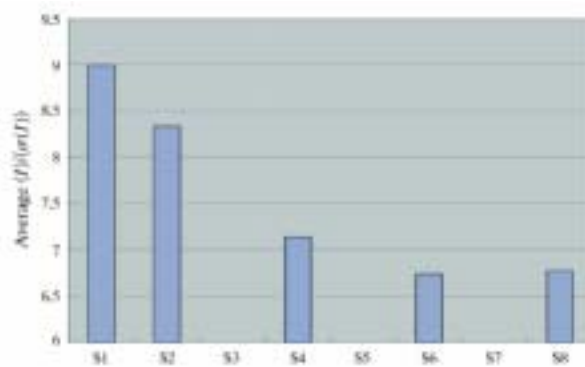


Fig. 9. Effect of the supersaturation on the diffraction intensity of the tetragonal lysozyme crystals<sup>19)</sup>. In this figure, supersaturation is defined as  $S=(C-C_e)/C_e$ , here  $C$  and  $C_e$  are the initial protein concentration and the solubility. S1, S2, etc. in the horizontal axis correspond to the supersaturations  $S=1, 2$ , etc., respectively.

#### 5) 適切な結晶化方法の選択

タンパク質を結晶化させるために、これまで様々な手法が開発されてきた。その中で、代表的なものとして、蒸気拡散法、バッチ法、液液拡散法、透析法の4つを取りあげ、結晶成長の観点からその特徴を Fig. 10 にまとめた。縦軸はタンパク質濃度、横軸は沈殿剤濃度である。図中(A)のカーブが溶解度曲線にあたる。タンパク質濃度および沈殿剤濃度が増加するほど、渦巻き成長、二次元核成長、付着成長へと結晶の成長メカニズムは変化してゆく。図中の矢印は、各結晶化手法を用いた際に、タンパク質および沈殿剤の濃度がどの様に変化して行くかを示す。

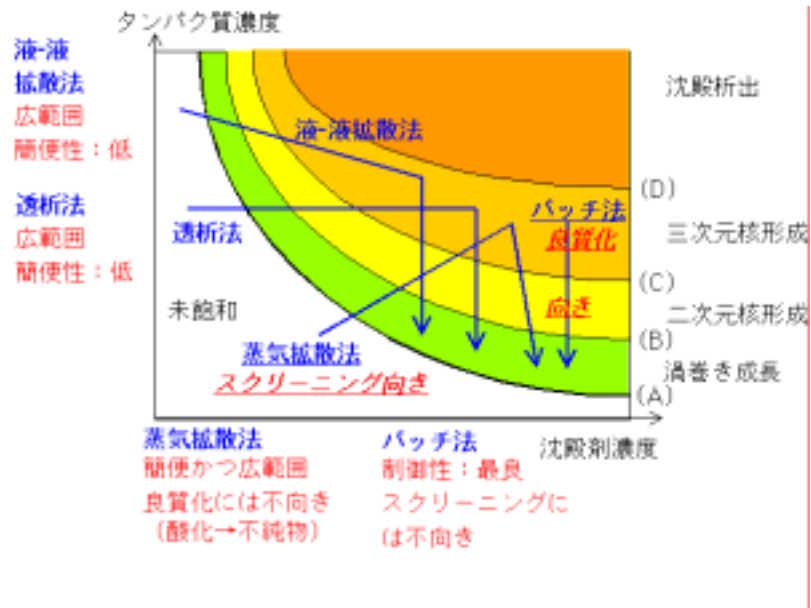


Fig. 10. Time-courses of the protein and precipitant concentrations during the crystallizations done by vapor diffusion, batch, liquid-liquid diffusion, and dialysis techniques.

(1) 蒸気拡散法: タンパク質の結晶化に最も多用されている。本手法の場合には、蒸気の拡散と共にタンパク質溶液が濃縮され、タンパク質濃度と沈殿剤濃度の両方が上昇して行くことが特徴である。やがて、三次元核形成が起こり結晶が成長し始めるが、その後も時間の経過と共に濃縮され続ける。そのため、図よりわかるとおり、結晶化条件はかなり大きな領域を移り変わってゆく(Fig. 10)。時間と共に幅広い結晶化条件をトレースするため、結晶が晶出しやすい。2節で、蒸気拡散法が結晶化条件のスクリーニングに適した手法であると述べたのは、その理由による。ただし、タンパク質水溶液は空気相と常に接触しているため、その表面では常に酸化反応が進行する。経験のある方はよくご存じの通り、タンパク質水溶液の表面に変性したタンパク質の膜が張った状態になる。そのため、せっかくタンパク質試料を高純度に精製しても、結晶化の最中にどんどん不純物が生成してゆくことになる。また、タンパク質濃度と沈殿剤濃度の両方が時間と共に変化するため、過飽和も複雑に変化し、4)で述べたように過飽和を能動的に制御することが極めて困難である。そのため、蒸気拡散法は、結晶化条件をラフにスクリーニングするためには非常に有効でも、良質な結晶を得るためには不向きな手法である。

(2) バッチ法: 構造解析の分野では、蒸気拡散法に比べて用いられる機会はずっと少ない。本手法の場合には、タンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合した後、そのまま密封状態で静置するため、時間と共に結晶化条件がたどるプロフィールは最も単純で(Fig. 10)、結晶の成長と共にタンパク質濃度が減少するだけである。そのため、時間と共に結晶化条件がトレースする領域は最も小さく、

結晶化条件をスクリーニングするには、最も効率が悪い手法である。しかしながら、空気相が存在しないために試料タンパク質の酸化・変性が防げるのみならず、結晶化条件の経時変化を予測することが容易いため、4)で述べた過飽和の能動的な制御には最も適した手法である。おおよその結晶化条件がわかった後に、結晶の品質を向上させたい場合には、バッチ法を用いて過飽和を能動的に制御することが最も望ましい。

(3)液液拡散法, 透析法: これら二つの手法の特徴としては、蒸気拡散法とバッチ法の両方の利点を併せ持つことが挙げられる。すなわち Fig. 10 に示したように、結晶化条件がたどる経時プロフィールが蒸気拡散法と同様に幅広いため、結晶化条件のスクリーニングに適している。また、結晶化条件の経時変化は拡散係数などの物性値がわかっているならば計算によって予測できるため、結晶の良質化のための能動的な操作も可能である。ただ、試料のセットアップがかなり面倒で、時間とある程度の慣れを必要とすることが欠点である。

以上をまとめると、「初めに蒸気拡散法を用いて効率良くだいたいの結晶化条件をスクリーニングし、いったん結晶が得られたならば、溶解度を測定した後に、バッチ法を用いて溶解度に基づき過飽和を能動的に制御する事で結晶の良質化を目指す」というのが結晶成長の観点から考えた最適なアプローチであると考えられる。

## 5. 今後必要とされる研究

最後に、タンパク質の良質な単結晶を成長させるために、今後是非とも研究が必要な課題について述べる。3節で述べたまだ明らかにされていない事柄以外にも、下記の項目についての研究が必要不可欠である。

### 1) タンパク質結晶の「品質」の定量的な評価

本稿でこれまで述べてきたように、「こうすれば良い結晶ができる」という結晶成長学的パラダイムは数多くある。しかし、それぞれの考えがどれくらい実際にタンパク質結晶の品質(回折能)向上に有効であるかについてはまだ不明で、そのためにこれらの結晶成長学的パラダイムが構造解析学分野の研究者に受け入れられていない。半導体の分野においても当初は、同じ状況であった。シリコン結晶は、人類がこれまでに成長させ得た最も高品質な単結晶であるが、様々な精製や成長の方法が試され、育成された結晶の品質が徹底的に評価される中で、結晶品質が向上してきた。結晶品質を定量的に評価することなくしては品質向上のための正のフィードバックが働かないため、本項目は特に重要な研究課題である。

現在のところ、タンパク質結晶の品質を定量的に評価するための手法に関する研究は極めて不十分である。また、結晶成長学および構造解析学の両分野でのコンセンサスも十分に得られてはいない。この問題を解決するためには、両分野の協力が必要不可欠である。構造解析学分野で研

究されている皆様には、単に偶然良い結晶が得られればよいというのではなく、様々な結晶化条件を試行錯誤した中で何が良くて何がそうでなかったかを結晶成長学にフィードバックしていただけるよう、この紙面を借りて強く御願いたい。

## 2) 不純物効果

4. 1) 節でも述べたが、不純物の及ぼす影響は、現状では避けて通ることのできない深刻な問題である。シリコンの場合には、その純度をイレブン・ナインにまで上げることで問題が解決された。もちろん、タンパク質の場合にはそのような高純度は原理上望むべくもないが、ブレイクスルーとなるべき新規な精製手法の開発が強く望まれる。また、結晶成長学の観点からは、たとえ不純物が共存する状態でも結晶品質をなるべく低下させない結晶化操作が提案されねばならない。前者については本稿の枠を越えるが、後者を実現するためには、不純物がタンパク質結晶に取り込まれる過程を詳細にその場観察する研究、および取り込まれた不純物がどのように結晶品質を低下させるかについての系統的な研究が必要である。

## 3) 極微小容量流体操作システムの開発

4. 3) で数十  $\mu\text{l}$  の容量で溶解度が測定できることを紹介したが、溶解度測定にとどまらず結晶化の様々な過程で、貴重なタンパク質試料をハンドリングするためには、極微小容量のタンパク質溶液を取り扱うためのポンプやミキサー等の流体操作系の開発が重要である。現在、数  $\mu\text{l}$  の溶液を定量的にハンドリングできるポンプは多数存在するが、それらの多くは数  $\text{ml}$  程度のデッドボリュームを必要とし、実用的ではない。特に、プロテオーム分野で用いられる結晶化のための分注ロボットなどは、デッドボリュームなしに微小容量のタンパク質溶液を取り扱える必要がある。そのような要請に答えるシステムとしては、現在、応用物理学の中のメディカル応用分野で多くの研究がなされている「電気浸透流ポンプ」などが最も有望である。近い将来、これらのポンプと溶解度測定システム、結晶育成システムなどがあわさった「タンパク質良質結晶育成デバイス」を開発する必要がある。

## 4) タンパク質の結晶化過程における未知の現象の解明

「タンパク質の結晶成長過程は低分子化合物のそれと基本的には全く同じである」と、本稿では強調して来たが、それはタンパク質の結晶成長過程を「これまで低分子化合物を元に発展してきた結晶成長学のパラダイム」で整理してきたからに他ならない。このような観点では整理しきれない部分にこそ、本当にフルーツフルなサイエンスが眠っている。3 節で説明した、核形成やクラスタリングなどの現象もその一つであるといえる。また、タンパク質という巨大サイズのモデル分子を用いて初めて実験的に見えてくる現象といえるかもしれない。さらに、「磁場」や「微小重力」などの外場の利

用もタンパク質結晶の品質を向上させるのに有効であることが近年わかってきた。これらの詳細については、引用文献<sup>1, 20)</sup>の中の、それぞれの章を参考にされたい。

## 6. おわりに

本稿では、タンパク質の結晶化について、基本的なメカニズムは低分子化合物のものと変わらないことや、良質な結晶を育成するための基本戦略、まだ未解決の事柄、などを結晶成長学の観点から解説した。プロテオーム研究が国家プロジェクトとして始まった今、結晶成長学分野の研究者はこのタイミングで構造解析学の役に立ちたいと本心から願っている。本稿では、著者が、タンパク質の結晶化について普段考えている私見を述べさせていただいた。構造解析の立場からタンパク質の結晶化に取り組んでいる皆様からぜひご批判いただきたい。

## 謝辞

本稿で紹介した事例の多くは、東北大学金属材料研究所の小松啓研究室および中嶋一雄研究室を中心に行われた共同研究の成果である。また、広島大学生物生産学部の佐藤清隆教授には原稿を査読いただいた。関係者の皆様にお礼申し上げる。

## 引用文献

- 1) 佐崎元、タンパク質結晶の成長原理と戦略設定、溶液からの結晶成長：構造と形のデザイン、佐藤清隆編集、共立出版 (2002) pp.141-155.
- 2) [http://www.cir.tohoku.ac.jp/sazaki-p/%20Web\\_pages/Protein\\_crystallization.html](http://www.cir.tohoku.ac.jp/sazaki-p/%20Web_pages/Protein_crystallization.html)
- 3) 吉田絵里子、東北大学大学院理学研究科修士論文 (1996) .
- 4) H. Oki, Y. Matsuura, H. Komatsu, A. A. Chernov, Acta Cryst. D55, 114 (1999).
- 5) H. Hondoh, G. Sazaki, S. Miyashita, S.D. Durbin, K. Nakajima, and Y. Matsuura, Crystal Growth and Design, 1, 327-332 (2001).
- 6) T. Nakada, G. Sazaki, S. Miyashita, S.D. Durbin and H. Komatsu, J. Crystal Growth, 196, 503 (1999).
- 7) B.R. Thomas, P.G. Vekilov, and F. Rosenberger, Acta Cryst. D52 (1996) 776.
- 8) M. Muschol and F. Rosenberger, J. Chem. Phys. 103 (1995) 10424.
- 9) W. Eberstein, Y. Georgalis, W. Saenger, J. Crystal Growth 143, 71 (1994).
- 10) D.F. Rosenbaum and C.F. Zukoski, J. Crystal. Growth 169, 752 (1996).
- 11) G. Sazaki, K. Kurihara, T. Nakada, S. Miyashita and H. Komatsu, J. Crystal Growth, 169, 355 (1996).
- 12) G. Sazaki, E. Nagatoshi, Y. Suzuki, S.D. Durbin, S. Miyashita, T. Nakada and H. Komatsu, J.

Crystal Growth, 196, 204 (1999).

13) K.Ninomiya, T. Yamamoto, T. Oheda, K. Sato, G. Sazaki, T. Matsuura, J. Crystal Growth, 222, 311 (2001).

14) F. Rosenberger, S. B. Howard, J. W. Sowers and T. A. Nyce, J. Crystal Growth 129, 1 (1993).

15) M.L. Pusey and K. Gernert, J. Crystal Growth 88, 419 (1988).

16) E. Cacioppo, et al., J. Crystal Growth 110, 66 (1991).

17) M.L. Pusey and S. Munson, J. Crystal Growth 113, 385 (1991).

18) R.J. Gray, W.B. Hou, A.B. Kudryavtsev, L.J. DeLucas, J. Crystal Growth, 232 (2001) 10.

19) I. Yoshizaki, T. Sato, N. Igarashi, M. Natsuisaka, N. Tanaka, H. Komatsu, S. Yoda, Acta Cryst., D57, 1621 (2001).

20) 佐崎 元, "第5章 2.2 節 タンパク質(結晶成長)", 北澤宏一 (ed.), 磁気科学の新展開, (アイピーシー, 東京, 2002) pp.166-184.