



タンパク質結晶化への新たなアプローチ： 磁場および高圧力の利用

東北大学金属材料研究所*, 東北大学学際科学国際高等研究センター**,
徳島大学大学院工学研究科***, 富山医科薬科大学物理****,
東京工業大学大学院生命理工学研究科*****, 大阪大学蛋白質研究所*****

佐崎 元***, 柳谷伸一郎***, 鈴木良尚***, 宮下 哲****, 佐藤孝雄*****, 松浦良樹*****,
松井拓郎***, 中嶋一雄*

A magnetic field and high-pressure are effective parameters to control protein crystallization. A magnetic field significantly affects the number, orientation and growth rate (morphology) of protein crystals and damps the buoyancy convection in protein solutions. Quality of protein crystals can be also improved by a magnetic field. The improvement in the crystal quality is due to a magnetic orientation effect. High-pressure can also give large effects on the solubility and growth kinetics of protein crystals. Changes in the solubility with pressure results from a difference in the volume between bulk water and the water hydrating the contact regions of protein molecules inside the crystal.

magnetic field / high-pressure / protein / crystallization

1. はじめに

タンパク質の優れた機能は、その複雑な立体構造と密接に関連しており、生命科学を分子論的に解明するためには、機能と構造の相関の理解が必須である。現在、分子量が数万以上のタンパク質の立体構造を解析するためにはX線（中性子線）構造解析法が唯一の方法であるが、そのためにはまずタンパク質の良質な（そして中性子線回折の場合には大きな）単結晶を得る必要がある。近年の大量発現系の確立や、放射光光源の利用、検出器やコンピュータの発展に伴い、Protein Data Bankに構造が登録されているタンパク質分子の数は指数関数的に増加しているが、良質のタンパク質結晶の育成は依

然困難で、この過程がボトルネックとなっている。良質な単結晶を育成するための一般的な手法の開発が急務とされている。

このような困難を克服するための手段として、近年、磁場¹⁾⁶⁾、高圧力⁷⁾⁸⁾、微小重力⁹⁾¹⁰⁾などの「外場」の効果が注目されてきた。その特徴をTable 1にまとめる。磁場の効果は、タンパク質結晶の溶解度には影響を及ぼさないほどエネルギー的には小さいが、結晶の品質を顕著に向上させることがその特徴である。また、高圧力は、状態図および核形成・成長速度に大きな影響を与えるため、結晶化条件を能動的に制御するには有効な方法であるが、結晶品質に及ぼす影響についてはまだ明らかにされていない。また、微小重力も磁場と同様

A Novel Approach to Protein Crystallization : Use of a Magnetic Field and High-Pressure

Gen SAZAKI*, **, Shin-ichiro YANAGIYA****, Yoshihisa SUZUKI***, Satoru MIYASHITA*****, Takao SATO*****, Yoshiki MATSUURA*****, Takuro MATSUI*, **, Kazuo NAKAJIMA*

* Institute for Materials Research, Tohoku University

** Center for Interdisciplinary Research, Tohoku University

*** Graduate School of Engineering, The University of Tokushima

**** Physics, Liberal Arts and Science, Toyama Medical and Pharmaceutical University

***** Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

***** Institute for Protein Research, Osaka University

Table 1 Effects of external factors on protein crystallization

	External factors		
	Magnetic field	High pressure	Microgravity
Thermodynamic effects : Effects on phase-diagram	Negligibly small	Depending on proteins and polymorph of protein crystals	Negligibly small
Kinetic effects : Effects on nucleation and growth rates	(mechanism is still unclear)	(caused by changes in surface energy and activation energy)	(caused by damping of convection)
Effects on quality of protein crystals	(caused by magnetic orientation effect)	Unclear	(success rate:20-30%)
Others	Quasi-microgravity effects (magnetic levitation)	Denaturation of protein (> 150 MPa)	Expensive

に、エネルギー的な寄与はないが、結晶品質を向上させることが報告されている。

本稿では、これらの外場のうち、磁場と高圧力がタンパク質の結晶化に影響を及ぼす基本メカニズムについて紹介する。微小重力の効果^{9), 10)}および良質なタンパク質結晶を得るための結晶成長学的指針¹¹⁾については文献を参照されたい。

2. 磁場効果

タンパク質の結晶化に及ぼす磁場効果については、筆者ら¹²⁾および安宅・若山らのグループ¹³⁾を中心に、1997年より系統的な報告がなされてきた。はじめに磁場中でタンパク質を結晶化するとどのような現象が起こるのかを示した後、詳しい説明を試みる。

Fig.1に、円形平底のウェル中に析出した鶏卵白リゾチームの正方晶系結晶を上方より観察した結果を示す¹²⁾。Fig.1aは無磁場下で、そしてFig.1bは10 Tの均一磁場下での結果である。まず、図より磁場下で結晶化すると、タンパク質結晶の個数が明らかに減少することがわかる。鉄を含むウマ脾臓フェリチンの場合には、結晶個数の減少はリゾチームに比べてより顕著であった¹²⁾。また、Fig.1bにおいて析出した多くのリゾチーム結晶が「田」の字型に見えることより、リゾチーム結晶のc軸が磁場と平行になる向きに磁場配向することがわかる。さらに、リゾチーム結晶の形(晶癖)にも磁場は影響を及ぼす。リゾチーム結晶の場合には、磁場中で成長するとc軸方向に扁平な結晶が得られた。形の変化は結晶各面の成長速度の比が磁場によって変化することを意味する。また、以上述べた結晶の1) 個数, 2) 配向, 3) 成長速度(形)の変化以外にも、4) 電気伝導度が十分に高い水溶液中では均一磁場を用いると、そして電気伝導度が低くても不均一磁場を用いれば対流を抑制でき

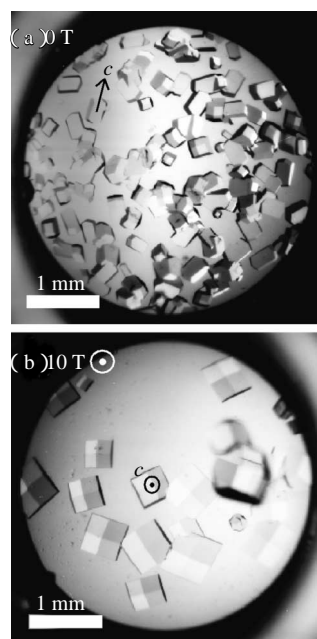


Fig.1 Effects of a magnetic field on the crystallization of hen egg-white lysozyme¹²⁾. (a) at 0 T, and (b) 10 T. The direction of the magnetic field was normal to the figure (optical microphotograph of a transmission type). The directions of the crystallographic c-axes of the crystals were also shown in the figure. Initial lysozyme concentration was 100 mg/ml. The crystallization period was 3 days.

ることや^{1), 3), 6)}, 5) 磁場によってタンパク質結晶の品質が向上すること^{4), 6)}などが明らかにされてきた。これらの磁場効果のうち、2) および 4) については定量的な解析がすでになされている^{1), 3), 6)}。以下、いまだに原因が明らかにされていない³⁾, および実用的価値の高い

5)について説明する。

強磁場中でリゾチーム正方晶結晶の成長過程をその場観察した結果をFig.2aに示す¹⁴⁾。図中の直線の傾きは結晶の成長速度に相当する。図より、11 Tの磁場下では無磁場下と比べて、両結晶面とも成長が顕著に遅くなることがわかる。種々のリゾチーム濃度において同様の観察を行ったところ、11 T下での成長速度は0 T下での値を10-60%下回っており、磁場による成長速度の減少は十分に有意な現象である。強磁場下でのタン

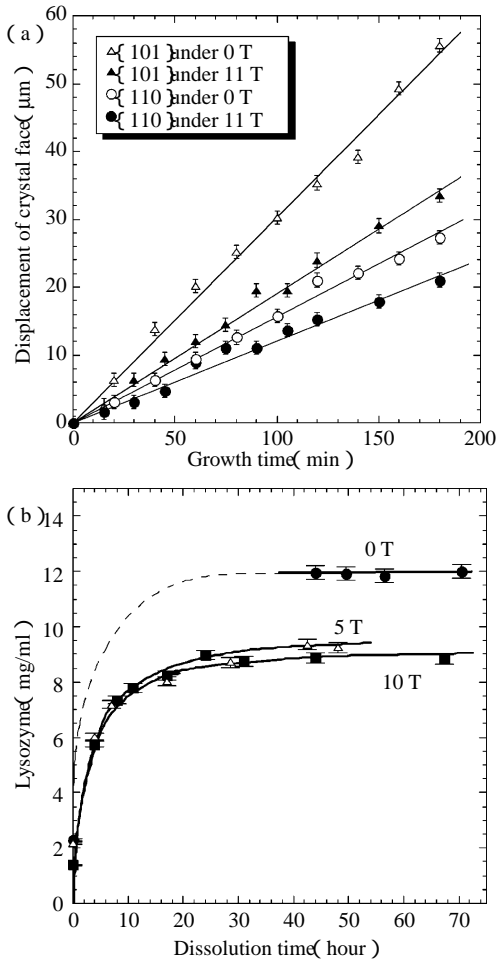


Fig.2 Effects of a magnetic field on the growth rate (a) and dissolution rate (b) of tetragonal lysozyme crystals¹⁴⁾. (a) The time-courses of the displacement of the {110} and {101} faces of the tetragonal crystal under 0 and 11 T. For {110} face : under 0 T (○), and 11 T (●). For {101} face : under 0 T (△), and 11 T (▲). (b) Changes in the lysozyme concentration under 0 T (○), 5 T (△), and 10 T (■) as a function of the dissolution time.

パク質結晶の成長速度の低下は、その後Yinらによっても実験的に確認されている¹⁵⁾。また、結晶の溶解速度に及ぼす磁場効果についても測定を行った。まず、多量のリゾチーム正方晶結晶をサンプル管中に析出させた後、サンプル管中の溶液をリゾチームを含まない溶液で置換し、結晶の溶解に伴うリゾチーム濃度の増加を強磁場下で追跡した。その結果、磁場の有無にかかわらず、溶液中のリゾチーム濃度は約2週間後に本条件での溶解度14.4 mg/mlとなった。しかしながら、リゾチーム結晶の溶解初期過程においては、Fig.2bに示すように溶解速度は磁場下では著しく減少した。タンパク質結晶の成長・溶解速度が顕著に減少した原因としては、1) 浮力対流の抑制、2) 結晶表面での取り込み・分解カインキクスの減少、の2つの可能性が当初予想された。しかし、リゾチーム結晶化溶液程度の電気伝導度では均一磁場によって対流が抑制されないことより¹⁵⁾、1)の可能性は否定される。2)の要因としては、タンパク質水溶液の磁場による変化⁶⁾や、溶液中の電荷をもつ分子・イオン種のローレンツ力による拡散挙動の変化¹⁶⁾などが考えられるが、いまだ明らかではない。

次に、タンパク質結晶の「品質」に及ぼす磁場の効果を明らかにするために、10 Tの均一磁場下でリゾチーム斜方晶系結晶を育成し、結晶のロッピングカーブをPhoton Factoryのビームライン10Aで測定した。磁場下で育成した結晶7個、および無磁場下での結晶7個についての測定結果をFig.3に示す¹⁷⁾。縦軸はロッピングカ

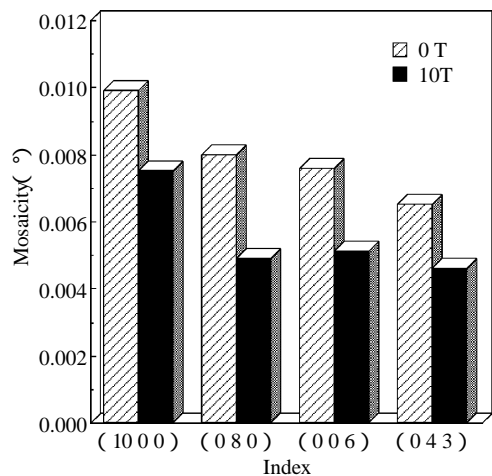


Fig.3 Effects of a magnetic field on the mosaicity of the orthorhombic crystals of lysozyme¹⁷⁾. Mosaicity was determined from the full-width at half-maximum of the ω -scan profiles of 14 crystals : 7 crystals grown under 0 T and 7 crystals grown under a homogeneous magnetic field of 10 T.

ープの半値幅より入射光源の発散角を差し引いた、結晶のモザイク幅を示す。結晶格子にまったく乱れがない完全結晶であれば、特定の回折角においてピーク幅が無限小の回折が生じるが、結晶格子に乱れがあり回折面間隔に分布が生じると、回折ピークは幅広くなる。そのため、モザイク幅が小さいほど、結晶格子に乱れが少ない良質な結晶であることを示す。Fig.3には、例として4つの回折ピークのモザイク幅を示したが、測定した10の回折ピークすべてについて、磁場下で育成した結晶のほうが無磁場下で得られた結晶に比べて顕著にモザイク幅が減少していた（平均で約31%減少）。このように、磁場下で育成した結晶のほうが無磁場下で得られた結晶に比べて結晶格子の乱れが少ない高品質な結晶であることがわかる。合計14個の結晶から得られたデータの統計検定を行ったところ、磁場による結晶のモザイク幅の減少は、99.99%以上の統計的有意性を示した。

また、10 Tの磁場下で育成した結晶では、無磁場下での結晶に比べて分解能が1.3 Åから1.13 Åへと格段に向上し、約1.7倍の数の回折点が得られた。以上の結果に加えて、結晶からの回折強度が初期の80%に減少するまでのX線照射時間を比較したところ、強磁場下での結晶のほうが無磁場下でのものに比べて20%以上長かった。このことより、X線に対する結晶の損傷も、強磁場下での結晶のほうが小さいと考えられる。磁場による結晶品質の向上については、その後、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼを題材に、安宅らのグループによっても報告されている¹⁸⁾。磁場によりタンパク質結晶の品質が向上した原因としては、磁場配向効果の寄与が最も大きい。結晶中のモザイク構造が磁場配向することによってモザイク幅が減少すると考えられる⁴⁾。また、結晶化溶液中に浮遊する微結晶が磁場配向することで、これらの微結晶が付着し取り込まれる母結晶のモザイク幅が低減すると考えられる^{5), 6)}。

磁場はタンパク質結晶の1) 個数、2) 配向、3) 成長速度(形)、4) 対流、5) 品質に顕著な影響を及ぼすが、これらのうち、2)、4)は低分子化合物や無機塩類の結晶化にも応用できる磁場効果である。一方、1)、3)、5)はひょっとするとタンパク質などの生体巨大分子の結晶化に特有の現象であるのかもしれない。いずれにせよ、磁場がタンパク質の結晶化を制御するきわめて有効なパラメーターであることは確かであり、今後の研究の発展が待たれる。

3. 高圧力効果

タンパク質の結晶化に及ぼす高圧力の効果は、1990

年にVisuriら¹⁹⁾がグルコースイソメラーゼ結晶の析出量が加圧によって大きく増加することを報告して以来注目され、系統的な研究が行われてきた^{7), 8)}。これまでに明らかにされたタンパク質の結晶化に対する高圧力の効果をTable 2にまとめた。タンパク質結晶の溶解度はタンパク質の種類および結晶多形に応じて圧力の増加とともに増減する。このことより、圧力は磁場とは異なり系の熱力学的状態に顕著な影響を及ぼすパラメーターであることがわかる。それに対し、結晶成長のカイネティクスは圧力の増加とともに一様に減少することが報告されている。次に、高圧力によってタンパク質結晶の溶解度が変化するメカニズムについて紹介する。

Fig.4にリゾチームの正方晶系・斜方晶系結晶の温度-溶解度曲線の圧力による変化を示す²⁰⁾。正方晶系結晶の場合には圧力の増加とともに溶解度が增大するが、斜方晶系結晶の溶解度は圧力とともに減少した。同じタンパク質でも結晶構造が異なると溶解度の圧力依存性が異なることがわかる。タンパク質結晶の溶解度に及ぼす圧力の効果はル・シャトリエの法則で説明す

Table 2 Effects of high-pressure on protein crystallization

Protein	Solubility	Kinetics
Lysozyme (tetragonal crystal)		
Lysozyme (orthorhombic crystal)		
Subtilisin		
Glucose isomerase		Not studied yet

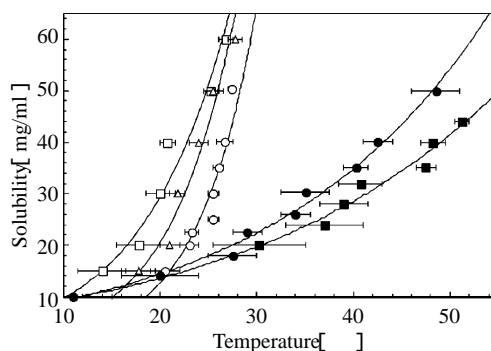


Fig.4 Solubility curves of the tetragonal and orthorhombic lysozyme crystals measured by interferometry²⁰⁾. Open symbols present the solubility of tetragonal crystals. Pressure : 0.1 MPa (○), 50 MPa (□) and 100 MPa (△). Solid symbols present the solubility of orthorhombic crystals. Pressure : 0.1 MPa (●) and 100 MPa (■).

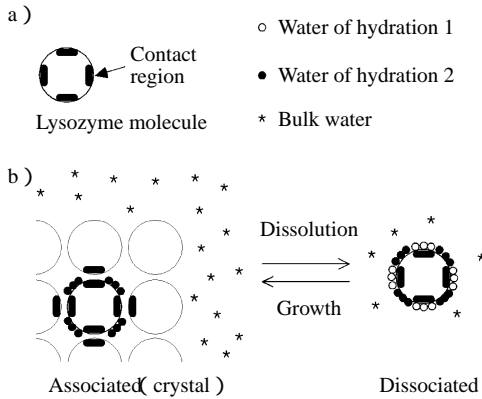


Fig.5 Schematic diagrams of lysozyme molecules in the crystal and solution²⁹⁾. In the crystal, the molecules are in contact with each other at the regions indicated in black. Water of hydration 1 and 2 represent water molecules hydrating the contact and non-contact regions of the protein, respectively.

ることができる。圧力を印加すると系全体の体積が減少する方向に平衡が移動する。圧力とともに溶解度が増加するリゾチーム正方晶系結晶の場合には、結晶が溶解するほうが系全体の体積が減少することになる。Fig.5に結晶中および溶液中のタンパク質分子の水和状態のモデルを示す。溶液中では結晶中に比べてタンパク質分子の体積は大きくなるがその変化はわずかであるため、溶解時の系の体積変化は、水和に伴う水の体積変化に帰着することができる。Fig.5より、結晶の溶解に伴う系の正味の体積変化は、

$$\Delta V_{\text{dissolv.}} = V(\text{水和水1}) - V(\text{バルクの自由水}) \quad (1)$$

で表すことができる。したがって、正方晶系結晶の場合には $\Delta V_{\text{dissolv.}}$ が負であり、斜方晶系結晶では正であることがわかる。この違いは、結晶中でのリゾチーム分子の接触部位の面積や、性質（親水性・疎水性）の違いによると思われる。実際、両結晶での分子間接触部位の露出表面積を計算しその親水性・疎水性を評価したところ、正方晶系結晶の接触部位のほうが、斜方晶系結晶よりも親水的であることがわかった⁷⁾。正方晶系結晶の場合には、親水的な分子間接触部位が水和されるために水和水1の体積は小さく、斜方晶系結晶の場合にはより疎水的な分子間接触部位が水和されるために水和水1の体積が大きいことが、両者の溶解度の圧力依存性の違いをもたらす。そのため、圧力の増大に伴う溶解度の変化を測定することで、タンパク質の特定の分子表面が水和される際の水和水の体積を評価することがで

きる。

高圧力はタンパク質結晶の溶解度を制御できる優れたパラメーターであり、圧力に伴う溶解度の変化より結晶中の分子間接触部位の水和状態についての知見が得られることを紹介してきた。実際のタンパク質の結晶化に高圧力を有効に活用するためには、今後、高圧力下で育成したタンパク質結晶を高圧力下で構造解析し、加圧に伴う分子構造や水和状態の変化について明らかにするとともに、タンパク質結晶の品質に及ぼす高圧力の効果を明らかにする必要がある。

4. おわりに

タンパク質結晶化に対する結晶成長学の貢献はまだ高いとはいえない。構造が未知のタンパク質についてどのような条件で結晶化すれば適切な結晶構造を有する結晶核が生成するかを理論的に予測できないためである。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可能になってきた。本稿で紹介した磁場や高圧力などの外場の利用も、何とか良質なタンパク質結晶を成長させようとする試みの1つである。特に磁場中での結晶化は実用段階に入っていると考えられる。磁場配向効果が結晶品質向上の鍵であるため、 α ヘリックス構造が特定の向きに配向した膜タンパク質などの結晶化に特に有効であると予想される。

文 献

- 1) 佐崎 元, 柳谷伸一郎, S. D. Durbin, 宮下 哲, 中田俊隆, 小松 啓, 中嶋一雄, 本河光博 (1999) 表面科学 **20**, 770-776.
- 2) 安宅光雄 (1999) 固体物理 **34**, 263-269.
- 3) 佐崎 元 (2002) 磁気科学の新展開 (北澤宏一編) 166-184, アイビーシー, 東京.
- 4) 佐崎 元, 佐藤孝雄, 松浦良樹, 中嶋一雄 (2002) マテリアル **41**, 481-488.
- 5) Ataka, M. and Wakayama, N. I. (2002) *Acta Cryst.* **D58**, 1708-1710.
- 6) Wakayama, N. I. (2003) *Cryst. Growth Des.* **3**, 17-24.
- 7) 宮下 哲, 佐崎 元, 永利由紀子, 鈴木良尚, 沢田 勉, 中田利隆, 小松 啓, 中嶋一雄 (1999) 日本結晶成長学会誌 **26**, 192-202.
- 8) 鈴木良尚, 佐崎 元, 澤田 勉, 宮下 哲, 小松 啓, 田村勝弘, (2003) 日本高圧力学会誌 **13**, 149-156.
- 9) 田仲広明, 佐藤 勝, 桑原啓一 (2001) 日本マイクログラフィティ応用学会誌 **18**, 233-237.
- 10) 田仲広明 (2003) 日本マイクログラフィティ応用学会誌 **20**, 105-110.
- 11) 佐崎 元, 中嶋一雄 (2003) 構造生物 **8**, 34-48.
- 12) Sazaki, G., Yoshida, E., Komatsu, H., Nakada, T.,

タンパク質結晶化への新たなアプローチ：磁場および高圧力の利用

- Miyashita, S. and Watanabe, K. (1997) *J. Cryst. Growth* **173**, 231-234.
- 13) Ataka, M., Katoh, E. and Wakayama, N. I. (1997) *J. Cryst. Growth* **173**, 592-596.
- 14) Yanagiya, S., Sazaki, G., Durbin, S. D., Miyashita, S., Nakajima, K., Komatsu, H., Watanabe, K. and Motokawa, M. (2000) *J. Cryst. Growth* **208**, 645-650.
- 15) Yin, D., Inatomi, Y. and Kuribayashi, K. (2001) *J. Cryst. Growth* **226**, 534-542.
- 16) Mogi, I. (2001) *Rev. Polarography* **47**, 3-16.
- 17) Sato, T., Yamada, Y., Saijo, S., Hori, T., Hirose, R., Tanaka, N., Sazaki, G., Nakajima, K., Igarashi, N., Tanaka, M. and Matsuura, Y. (2000) *Acta Cryst.* **D56**, 1079-1083.
- 18) Lin, S. -X., Zhou, M., Azzi, A., Xu, G. -J., Wakayama, N. I. and Ataka, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 274-278.
- 19) Visuri, K., Kaipainen, E., Kivimäki, J., Niemi, H., Leisola, M. and Palosaari, S. (1990) *Bio/technol.* **8**, 547-549.
- 20) Sazaki, G., Nagatoshi, Y., Suzuki, Y., Durbin, S. D., Miyashita, S., Nakada, T. and Komatsu, H. (1999) *J. Cryst. Growth* **196**, 204-209.



佐崎 元

佐崎 元(さざき げん)

東北大学金属材料研究所結晶物理学研究部門 講師, 東北大学学際科学国際高等研究センター プロジェクトリーダー

1994年大阪市立大学大学院工学研究科後期博士課程修了。博士(工学)。94年より東北大学金属材料研究所助手, 01年東北大学学際科学国際高等研究センター・プロジェクトリーダーを兼務, 01年東北大学金属材料研究所講師。現在に至る。

研究内容: タンパク質結晶の成長メカニズム, 磁場・高圧力の利用, 有機半導体薄膜結晶のエピタキシャル成長

連絡先: 〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

E-mail: sazaki@imr.tohoku.ac.jp

URL: <http://www.cir.tohoku.ac.jp/sazaki-p/>

柳谷伸一郎(やなぎや しんいちろう)

徳島大学大学院工学研究科光応用工学専攻 助手

連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1

E-mail: giya@opt.tokushima-u.ac.jp

鈴木良尚(すずき よしひさ)

徳島大学大学院工学研究科化学応用工学専攻 助手

連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1

E-mail: suzuki@chem.tokushima-u.ac.jp

宮下 哲(みやした さとる)

富山医科薬科大学物理 助教授

連絡先: 〒930-0194 富山市杉谷2630

E-mail: satoru3@ms.toyama-mpu.ac.jp

佐藤孝雄(さとう たかお)

東京工業大学大学院生命理工学研究科 助手

連絡先: 〒226-8501 横浜市緑区長津田町4259

E-mail: tsatoh@bio.titech.ac.jp

松浦良樹(まつうら よしき)

大阪大学蛋白質研究所蛋白質物理構造研究部門 助教授

連絡先: 〒565-0871 吹田市山田丘3-2

E-mail: matsura@protein.osaka-u.ac.jp

松井拓郎(まつい たくろう)

東北大学金属材料研究所結晶物理学研究部門 中核的研究機関研究員

連絡先: 〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

E-mail: tmatsui@cir.tohoku.ac.jp

中嶋一雄(なかじま かずお)

東北大学金属材料研究所結晶物理学研究部門 教授

連絡先: 〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

E-mail: nakajimk@imr.tohoku.ac.jp