

■ タンパク質・DNA等結晶成長相図作成とそれに基づいた合理的な結晶育成技術

中性子構造生物学研究グループ ■大西 裕季、新井 栄揮、新村 信雄

A Rational Single Crystal Growth Method of Proteins Based on the Crystallization Map

Yuki OHNISHI, Shigeki ARAI, Nobuo NIIMURA
Research Group for Neutron Structural Biology

Neutron protein crystallography necessitates the use of large protein crystals, the volume of which is larger than 1mm^3 in volume currently. We have found that one rational and simple way to find the proper condition to grow a large single crystal is to determine the crystallization map (pseudo-phase diagram) including solubility curve. As a matter of fact, the large single crystals of insulin, DNA oligomer and human lysozyme are grown in this method. We propose a new method to determine the pseudo-phase diagram for getting a large single crystal, and to estimate crystal quality based on Wilson plot.

はじめに

ヒトゲノム解読に引き続き、すべてのタンパク質の構造ファミリーの立体構造(約1万種類)を5年間で決める国際プロジェクトが始まり、日本はそのうちの3,000種類を主としてX線、NMRにより決める、いわゆるタンパク質3000プロジェクトがスタートした。X線では単結晶が必須であり、これがこの分野のボトルネックであった。我々は、以前より単結晶を用いた中性子回折法による構造生物学を行ってきたが、そこでは 1mm^3 相当の大きな単結晶が必要であり、そのような結晶育成に力を注いできた。しかし、蒸気拡散法では多くの場合このような大きな単結晶を得るのは液滴の大きさから考えて無理である。結晶成長機構を探りながら専用の結晶育成技術を開発するのが遠回りのように見えるが近道ではないかと考え、その方向での研究を続けてきた。具体的には、溶解度曲線を含む相図を書き、それに基づいて目的結晶育成の最適条件を探索し結晶育成する方法であり、これは合理的な結

晶育成技術といえる。あわせて、結晶品質を定量化する簡便な手法を開発し、結晶品質と結晶育成条件との相関を求めることが可能になってきたのでここに紹介する。

1. 相図と結晶育成

X線結晶解析分野では経験的な手法でタンパク質結晶が出来れば充分という考えが支配的であり、結晶育成条件を探すためのスクリーニングに重きがおかれ、蒸気拡散法や透析法が用いられ、結晶成長相図を決定することは余りされてこなかった。しかし、結晶成長相図作成が全く行われなかった訳ではない。従来のタンパク質結晶成長相図の作成法はバッチ法と呼ばれるものである。これは、相図 C_p 、 C_c 空間 (C_p : タンパク質濃度、 C_c : NaCl などの結晶化剤濃度) をメッシュに分割し、それぞれのメッシュの状態にタンパク質溶液を保持し、結晶が得られた点と得られなかった点を分類して相図を作成する方式である。これの最大の

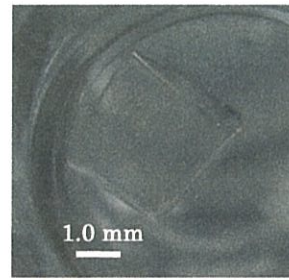
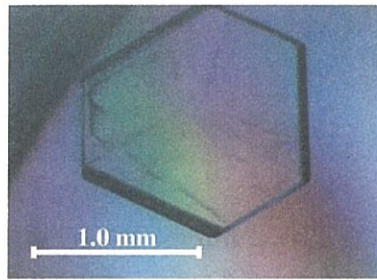


図1 DNAの結晶(左)とインスリンの結晶(右)

欠点は、メッシュの点だけタンパク質が必要であるので、大量のタンパク質が必要なことと、メッシュ毎にタンパク質濃度、結晶化剤濃度を決めていくので各メッシュ毎に測定誤差が入ってくることである。但し、厳密な溶解度曲線は得るには、それに加えて、出来た結晶を、先程のメッシュ毎のタンパク質濃度、結晶化剤濃度の溶液に入れて溶解させ、結晶が析出するメッシュ点と溶解するメッシュ点の平均位置で真の溶解度曲線が得られるので更に時間はかかる。

すでに我々は従来の方式でヒトリゾチーム、ニワトリ卵白リゾチーム、DNA、インスリン、異化型亜硫酸還元酵素(DsrD)などの相図を決定し、これに基づいて結晶育成を試み、それぞれある特定の領域で、世界最大のDNA結晶[1]やインスリン結晶[2]を得ている。(図1)つまり、相図があれば大きい結晶を育成する条件が見出され、同時にこの条件以外では大きい結晶は得られないということも言える。また、結晶評価の節で述べるが高品質の結晶育成条件も同様に探すことが可能となる。

相図は結晶育成における地図であり、相図無しでの結晶育成法は地図を持たずに未知の国を探検するようなもので、従来の結晶育成はまさに個人の経験が大きいものを言っていた職人芸的なものであった。

2. 新しい相図作成法

ここに、従来の欠点を改良した新しい手法による結晶成長相図作成法を提案する。[3]この手法は世界のどこでも行ってない新しい方法である。基本は透析法の応用である。この手法の最大の特徴は相図の(Cp, Cc)空間の任意の位置にタンパク質溶液を移行できることである。その原理及び装置構成を図2、3に示す。タンパク質溶液を透析膜で隔離された部分(内液部)に入れ、結晶化剤溶液の入った部分(外液部)中にセットしておく、透析膜の原理から結晶化剤濃度は内液部、外液部ともに同じになる。そして、外液の結晶化剤濃度を変化させると、内液部の結晶化剤濃度はそ

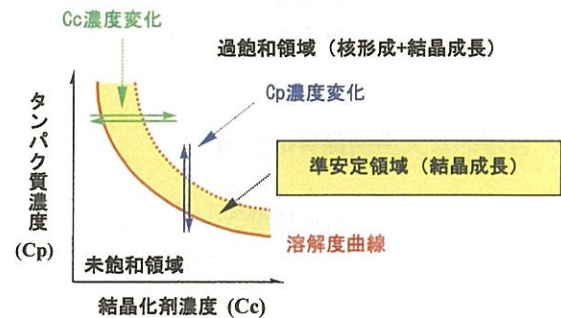


図2 結晶成長相図内の(Cp, Cc)空間の任意の点に辿る原理図

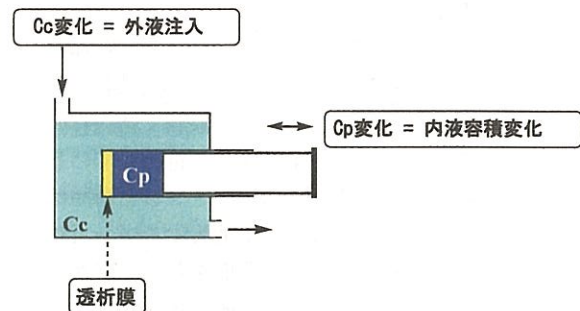


図3 結晶成長相図を作成する新しい手法を実現する装置の概念図

れにしたがって変化する。但し、内液部のタンパク質濃度は不変である。つまり、この操作は(Cp, Cc)空間をCp一定でCcを任意に変化させることである。次に、内液部の容積を変化させるとタンパク質濃度が変化する。但し、内液部の結晶化剤濃度は外液に追従するので不変である。つまり、この操作は(Cp, Cc)空間をCc一定でCpを任意に変化させることである。この二つの操作を組み合わせることで、(Cp, Cc)空間の任意の位置にタンパク質溶液を移行できる。つまりタンパク質は最初にセットした量以外に使うことなく、任意の(Cp, Cc)空間に結晶成長条件をセット出来ることを意味する。なお、光学顕微鏡で、(Cp, Cc)空間で結晶成長の様子を観測しデータ保存できるようにしておく。従来は(Cp, Cc)空間に相当する条件の

系を測定点数だけ用意しなければならなかったので、タンパク質量は測定点数分だけ必要であったが、当該手法によれば1点分のタンパク質分量で (C_p 、 C_c) 全空間をスキャンできる画期的なものである。また、出来た結晶を溶解する実験も容易に行えるので厳密な相図作成法でもある。

3. 合理的な大型結晶育成技術

この手法は大型結晶育成技術としても最適である。従来の蒸気拡散法では液滴の大きさに限界があり大型結晶育成は不可能であった。大型結晶育成の一つの可能性としてバッチ法があったが、結晶育成につれ溶液中のタンパク質濃度が減少してしまうこと、複数の結晶が析出するので個々の結晶については得られる結晶サイズに限度があった。

ここで、大型結晶を育成する手法を紹介する。(図4) 但し、この手法で相図が出来ていることが前提である。まず、タンパク質濃度の高い過飽和領域で結晶育成させる。そこでは大小さまざまな結晶が析出している。外液の濃度を下げ未飽和領域に移行させると結晶は溶解し始める。小さい結晶は溶けて消失するが、大きな結晶1個が消失する手前で外液濃度を若干上げ準安定状態に移行させる。そこでは核形成は起きないので残った一つの結晶だけが成長する。それに伴い、内液のタンパク質濃度は下がり、溶解度曲線にまで達すると、これ以上結晶成長しなくなる。再び、若干外液の濃度

を上げると準安定状態にもどり結晶成長が始まる。これを繰り返すことで、結晶を準安定領域を図に示す方法で移動させれば溶液中のタンパク質濃度が薄くなくても結晶成長するし、且つ準安定領域であるため、これ以上の核形成はないのでそこに存在する結晶だけが大きくなる最善の方法である。

同時に、相図に基づいた結晶育成技術を開発している間に見出したのであるが、一般的に溶解度曲線に近く、ある程度タンパク質濃度の低い領域で結晶成長をさせると光学顕微鏡で見る限り良質の単結晶が得られるようである。

4. 結晶評価法

良い結晶とは、一般的に、結晶構造解析で高分解能データが得られる結晶である。確かにその通りであるが、これでは最終的には結晶構造解析しなければ判定不可能であるし、得られるデータはX線源、回折計、実験者によって大きく異なるので、もう少し簡便で且つ精度の高い評価法はないだろうか。度々 I/σ [(ブラッグ反射強度)/(ブラッグ反射強度の測定精度)] が使われている場合があるが、これらはそもそも実験精度の指標であり、結晶品質評価の尺度として使うのは誤りである。また、結晶の品質をモザイシティで評価する機会が多いが、慎重な取り扱いが必要である。データ処理プログラムでブラッグ反射が結晶の回転角のどの範囲に渡って現れるか(一種のロッキングカーブ)でモザイシティを定義している場合がある。しかし、これはビームの広がり等が主要因であり結晶の完全な品質を表現したものでない。

ここで、一つの有効な方法としてウィルソンプロットによる見かけの温度因子を結晶品質評価の尺度に用いることを提案する。但し、通常のウィルソンプロットでは3 Å附近にコブが現れるので、面間隔の小さい反射が多くとれない場合は一般に使えない。そこで若干の工夫が必要である。我々は任意の結晶のウィルソンプロットデータで規格化することでこの困難を解決するを見出した。(図5、[4]) すなわち、ある任意の結晶からの反射強度を基準にとり、各 $(\sin \theta/\lambda)^2$ 毎に品質を求めようとする結晶からの反射強度を規格化すると、2つの結晶構造は同じであるため、3 Å附近のコブが無くなり、ウィルソンプロットが $(\sin \theta/\lambda)^2$

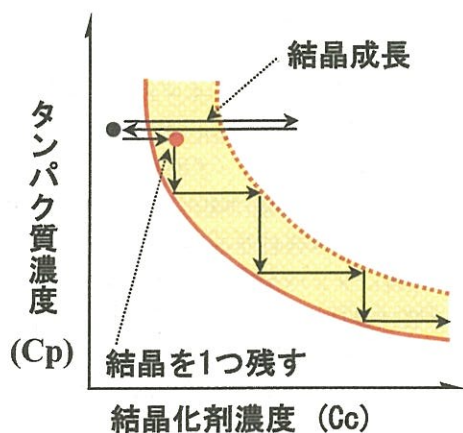


図4 新しい手法で大きい結晶を育成する手法

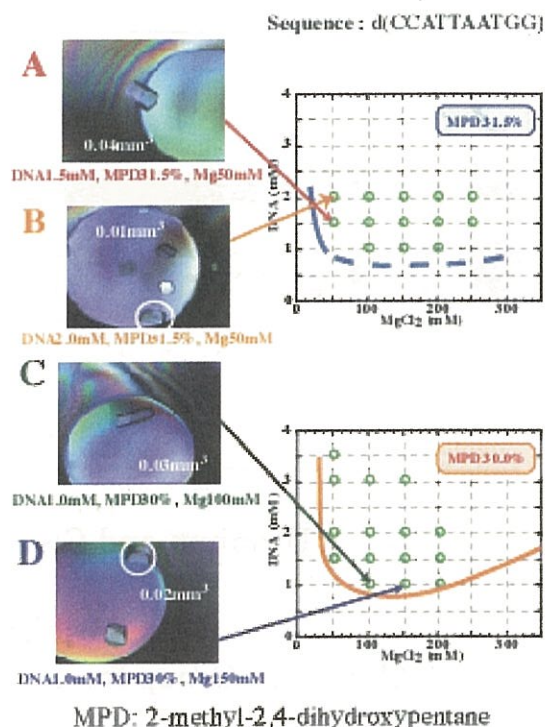
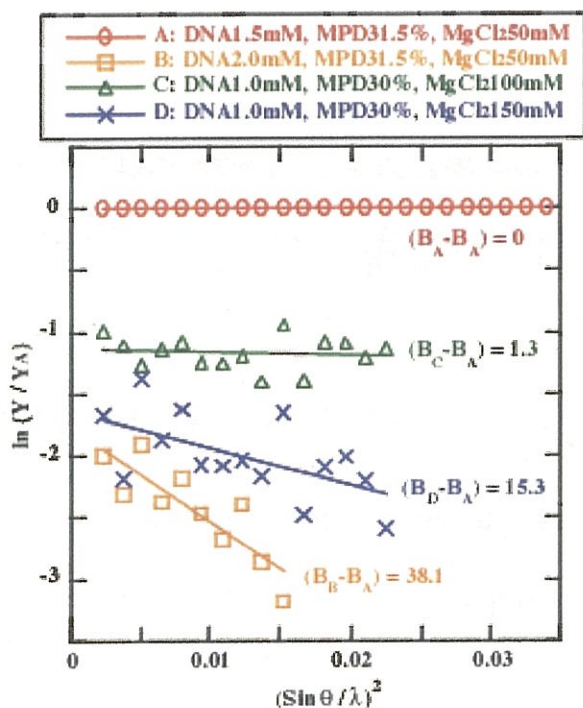


図5 DNA結晶のウィルソンプロット (右) と評価に用いた結晶の結晶化条件 (左)

全領域で直線に近似される。ここで、この直線の傾きが正の結晶は基準にとった結晶より良品質であり、また負のものは悪品質ということになる。図5では、結晶Aを基準に規格化したものであるが、ここでは結晶Aが最も良品質ということになる。

この手法の特徴は次のようにまとめられる。(1)回折実験の実験条件 (使用した結晶サイズ、線源、回折装置、露光時間、実験者等) (2)全部のデータを採る必要はない。但しウィルソンプロットは結晶の異方性に依存するので例えば結晶回転45度おきなど適当にいろいろな角度のデータを取り込んだウィルソンプロットの方が正確さが増す。

当該研究は中小企業粋地域新生コンソーシアム事業として採択された課題 (総括代表者: 新村信雄) である。これは株式会社ひたちなかテクノセンターが管理

母体となり、原研、株式会社化研及び茨城大学で共同研究する。また、当該結晶成長相図育成手法等は平成14年6月21日 参考文献3) ですでに特許出願済みである。また、この研究の一部は宇宙フォーラム「地上公募研究」によるものである。関係者一同に感謝する。

参考文献

- 1) S. Arai, T. Chatake, Y. Minezaki and N. Niimura, Acta Cryst. D58 (2002) 151-153.
- 2) M. Maeda, N. Niimura to be submitted
- 3) 新村信雄、大西裕季、新井栄揮、前田満、茶竹俊行、栗原和男、特願2002-181988
- 4) 新村信雄、新井栄揮、茶竹俊行、特許出願中