

# ■ 生体物質結晶成長メカニズム

生体物質中性子回折研究グループ ■ 新 村 信 雄 ■

## Crystallization Mechanism of Bio-macromolecule

Nobuo NIIMURA

Research Group for Neutron Crystallography in Biology

Based on the importance of protein crystallization, small angle neutron and X-ray scattering methods were used to study the crystallization process of lysozyme from the microscopic molecular level. In the unsaturated state, lysozyme molecules start to aggregate by adding NaCl and in the supersaturated state, two types (Type I & Type II) of aggregates are formed. The radius of Type II aggregates increases, but at a certain moment, it stops increasing and starts decreasing. The nucleation occurs here. The volume of the Type II aggregates was found to be scalable in reference to a specific protein concentration, which seems to be the boundary between a metastable zone and a nucleation zone in the phase diagram.

タンパク質単結晶に馴染みのない方にとっては、「タンパク質が結晶になるのですか?」と驚かれる。タンパク質を水に溶かし、塩を添加すると、条件が整えばキラキラ輝く結晶が析出してくる。結晶である証拠は、水溶液から取り出して、X線を照射するとブラッグ反射を起こすので明確である。

しかし、タンパク質単結晶が通常の結晶（銅、シリコン、ナフタレン等）と全く異なる点がある。それはタンパク質分子が整列して並び単位格子を形成するのは通常の結晶と変わらないが、タンパク質分子の周囲のすき間は、すべて結晶成長に用いられた母液（ほとんどが水）が占めていることである。すき間の水の量はタンパク質結晶にも依るが、20%から多いときは80%近くを占める場合もある。この水が蒸発してしまうと結晶は壊れてしまう。そうならないように、母液を含んだ水蒸気雰囲気中で結晶は保存される。

### 1. 何故、タンパク質結晶成長メカニズムか

生体内では種々の物質が機能し、生命活動を維持している。この中、最も種類が豊富で重要な働きをしている一つにタンパク質があり、その機能はタンパク質特有で3次元立体構造からきている。そこでタンパク質の原子レベルでの構造決定は、生命現象を理解するための基礎といわれる。タンパク質等の生体物質の3次元立体構造決定は、X線や中性子回折法で行われているが、それには単結晶試料が必須である。生体物質結晶化のため種々の手法が工夫されているが、ほとんどがケース・バイ・ケースである。しかも構造決定に適した単結晶が常に得られるとは限らない。そのため結晶化が構造解析の一連のプロセスの中でのボトルネックになっている。これの最大の理由は、生体物質結晶成長メカニズムの解明ができていないことである。最近、テーマの重要性から、主に光散乱の手法でそのための多くの研究がなされてきているが、この分野で

最も基本的なタンパク質のニワトリ卵白リゾチームについてさえ、得られた結果は著者毎に異なり明確な結論が得られていないのが現状である。

生物物質の結晶成長メカニズムの解明の基本は分子凝集プロセスを分子レベルで観察することである。中性子小角散乱（ないしはテーマによってはX線小角散乱）が最適であるという立場から研究にとりかかった。つまり、水溶液中に平均直径が1~100 nm程度の粒子が存在すると、これらの粒子により中性子（X線）は散乱する。その散乱強度は小角部分では散乱角に対してガウス関数となり、粒子の大きさと分子量がガウス関数の幅とピーク値に対応して求められる。

## 2. リゾチーム分子凝集メカニズム

図1に、ニワトリ卵白リゾチーム水溶液の相図を示す。縦軸はリゾチームの濃度、横軸はNaCl濃度である。溶解度曲線の下側は未飽和状態で、ここからは結晶は生じない。溶解度曲線の上側は過飽和状態で、いくつかの相に経験的に分けられている。準安定相では核形成は起こらないが、核を外から入れると結晶成長する領域で、核形成相では核形成及び結晶成長共に起こる相である。

我々は図1に示す次の実験を行った。

- (A) 未飽和状態でリゾチーム濃度一定で、塩濃度を变化させる。
- (B) 過飽和状態の核形成相で分子凝集の時間変化を追跡する。
- (C) 未飽和状態から過飽和状態（準安定相を経由して核形成相を含める）まで塩濃度一定で、リゾチーム濃度を变化させる。

実験及び解析方法の詳細は原論文<sup>1,2)</sup>にゆずり、ここでは得られた結果（図2）及びこれの意義について述べる。

### (a) 未飽和状態

未飽和状態では結晶成長は決して起きないが、NaCl添加でリゾチーム・タンパク質は会合を始め、飽和曲線に近づくにつれ会合体は大きくなる<sup>1,2)</sup>。また会合体中での分子の配向は結晶構造中で実現している配向と同じになっている。これは、未飽和状態で、結晶の前駆体が形成されていることを意味し、この実験で初めて確認されたことで、生物物質結晶成長メカニズム

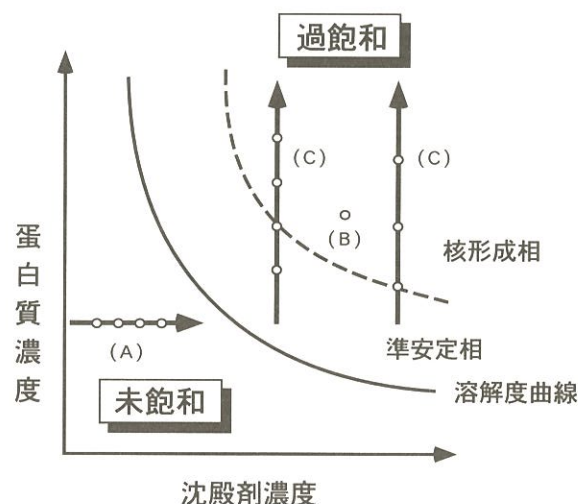


図1 ニワトリ卵白リゾチーム水溶液の相図と実験観測領域

解明に重要な知見となる。

### (b) 過飽和状態（時間変化）

過飽和状態には2種類の会合体（Type I, Type II）が出来ている<sup>3)</sup>。Type Iは半径が約20 nm以上で連続的に分布した大きい会合体である。一方Type IIは、大きさの分布の少ない平均半径が約3 nmの会合体である。Type Iの会合体は測定時間内で殆ど大きさに変化は見られなかったが、Type IIは非常に興味ある時間変化をする。すなわち、時間と共にType II間で分子の再配分をし、全会合体数を減少させることで会合体の半径が大きくなる。そして過飽和状態実現（実験開始）の約13~14時間後に会合体の半径の増加は停止し、減少に転ずる。全会合体数を変化させず会合体構成分子を放出することで会合体半径を小さくしている。この時間が丁度、結晶成長観察実験で結晶が見えだす時間に対応していることが判明しているので、Type IIの会合体からの分子の放出が核形成及び結晶成長初期過程に強く関連していることが考えられるが、結論は、今後の課題である。

### (c) スケーリング

図1に示した相図で、未飽和状態から過飽和状態までの広い範囲で、会合体の大きさ（体積V）とリゾチームの濃度（C）の関係を、それぞれ自然対数でプロットすると図3のようにNaClの濃度毎にグループ化され、且つ、それぞれの塩濃度で2本の直線上にデータが乗ることが判明した。この2直線の交点  $C_c$ ,  $V_c$  を用い換算リゾチーム濃度  $C_R = (C - C_c) / C_c$ , 及び換算会合体体積  $V_R = (V - V_c) / V_c$  を定義すると

$$V_R = C_R^v \quad (1)$$

というNaCl濃度に依らない簡単な式で規格化される

## リゾチーム結晶成長過程

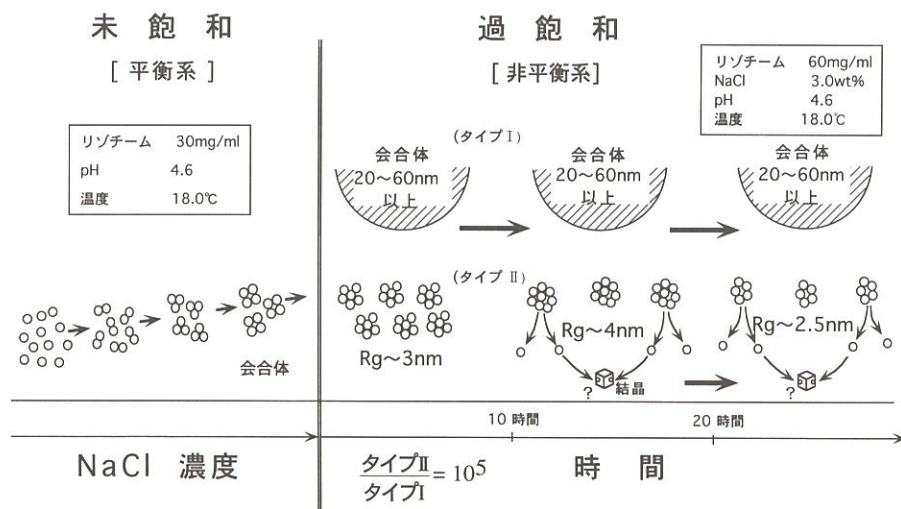


図2 ニワトリ卵白リゾチームの分子凝集プロセスのモデル

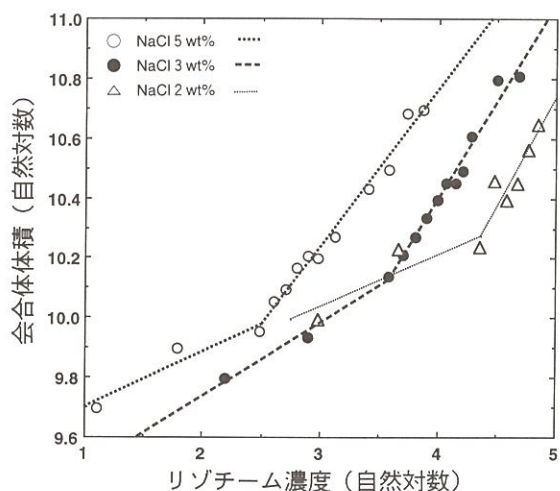


図3 ニワトリ卵白リゾチーム分子凝集体の会合体体積 (自然対数) のリゾチーム濃度 (自然対数) 依存性

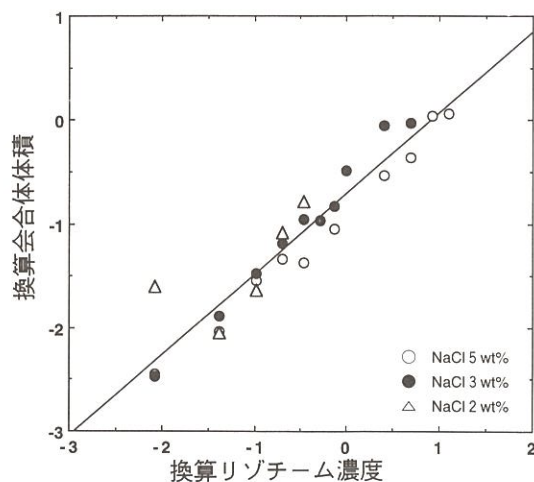


図4 図3の結果の換算体積, 換算濃度でのスケーリング

ことが判明した (図4)。また, 各 NaCl 濃度での  $C_c$  は丁度, 図1の相図の準安定相と核形成相の境界を示す濃度に対応することが結晶成長観察実験の結果から判明した。(1)式のスケール指数  $\nu$  は0.77と実測されたが, これの物理的意味は現在検討中である。規格化が飽和濃度でなく, 核形成濃度で行われたことは, 自発的核形成解明に大きな指針を与えるだろう。

### 参考文献

- 1) N. Niimura, Y. Minezaki, M. Ataka and T. Katsura, *J. Cryst. Growth*, 137 (1994) 671.
- 2) Y. Minezaki, N. Niimura, M. Ataka, and T. Katsura, *Biophys. Chem*, 58 (1996) 355.
- 3) N. Niimura, Y. Minezaki, M. Ataka and T. Katsura, *J. Cryst. Growth*, 154 (1995) 136.