

■■■■ 原著論文 ■■■■

古典核形成理論に基づくタンパク質結晶化境界の
時間変化の推定吉崎 泉^A・中村 裕彦^A・福山 誠二郎^B小松 啓^{A,C}・依田 真一^AEstimation of Crystallization Boundary of a Model Protein
as a Function of Solute Concentration and Experiment TimeIzumi YOSHIZAKI^A, Hirohiko NAKAMURA^A, Seijiro FUKUYAMA^B,
Hiroshi KOMATSU^{A,C} and Shinichi YODA^A

Abstract

It is crucial to evaluate the induction time of nucleation for obtaining high quality protein crystals in space. A new method is proposed based on the classical nucleation theory to define the time dependent character of the protein crystallization region in the phase diagram. Various concentrations of Hen Egg White lysozyme was crystallized with NaCl, and the time when the crystals appeared was studied. The experimental data fitted fairly well with the estimation supporting the validity of the proposed method.

1. はじめに

近年、タンパク質立体構造解明の重要性がますます増加しているが、X線結晶構造解析によって高精度にタンパク質立体構造を決定するためには、良質なタンパク質結晶を育成することが不可欠である。このため、タンパク質結晶成長メカニズムの研究が必要とされ、精力的に進められている。

タンパク質結晶は、無機塩等の溶液からの結晶成長と同様に、熱力学的駆動力によって「核形成」及び「核の成長」という2段階を経て育成される。一般に核形成に必要な駆動力は、成長に必要な駆動力よりもはるかに大きい¹⁾ため、平衡濃度（溶解度）に近いタンパク質濃度領域では核形成が生じない。相図（平衡状態図）におけるこの領域は、準安定領域と呼ばれている。準安定領域と結晶化領域との境界（以降、結晶化境界という）は、溶解度曲線のように固定した曲線とみなされることが多い。しかしながら、準安定領域が核形成に起因するものである以上、結晶化境界は時間経過に伴って動的に変化するものでなければならない。

これまでの核形成研究の興味の中心は、分子のクラスターリング過程を観察、計測することにあつた。タンパク質の分子サイズは大きいので、クラスターリング過程を直接計測しやすいためである。例えば Malkin らは動的光散乱法を適用することにより、サテライトタバコモザイクウイルス（STMV）がモノマーから核形成を経て、結晶成長していく様子を観測した²⁾。この実験においては、種々の過飽和度条件下での計測により、過飽和度の増加に伴って核形成速度が上昇することを実験的に明らかにした。また、原子間力顕微鏡を用いて、臨界核と思われるサイズの核を観測したという報告もある³⁾。

一方、実験的に核が形成される領域を測定するという研究も行われている。Ataka らはニワトリ卵白リゾチームを用い、複数のタンパク質濃度と結晶化剤濃度で結晶化を行い、結晶が出現した時間を顕微鏡で確認した⁴⁾。この実験から彼らは、結晶化境界が時間とともに変化することを実験的に示した。他にも同様の報告がなされているが⁵⁻⁷⁾、これまでに結晶化境界の時間変化を予測するモデルは提案されていなかった。

本研究では、オーソドックスな実験手法を用いて、モデ

- A 宇宙開発事業団宇宙環境利用研究センター 〒305-8505 つくば市千現 2-1-1
National Space Development Agency of Japan (NASDA), Space Utilization Research Center, 2-1-1 Sengen, Tsukuba 305-8505, Japan
(E-mail: yoshizaki.izumi@nasda.go.jp)
- B 株式会社エイ・イー・エス 〒305-0032 つくば市竹園 1-6-1 つくば三井ビル7階
Advanced Engineering Services Co., Ltd., Tsukuba Mitsui Bldg., 1-6-1 Takezono, Tsukuba 305-0032, Japan
- C 岩手県立大学総合政策学部 〒020-0193 岩手県滝沢村
Iwate Prefectural University; Takizawa-mura, Iwate 020-0193, Japan

ルタンパク質系の結晶化境界の時間変化を決定した。また、この結晶化境界の動的な変化を整理する手法を考案した。

2. 実験方法

試料としては、タンパク質結晶成長研究におけるモデルタンパク質、ニワトリ卵白リゾチームを用いた。結晶育成温度は20℃とし、緩衝液と塩は、多くの実験で用いられている50 mM 酢酸バッファー (pH 4.5) 及び NaCl を用いることとした。不純物による不均一核形成を抑制するため、試料は99.99%まで精製した。精製方法は以前記載したとおりである⁸⁾。

タンパク質結晶成長法には様々あるが、基本的には「塩析」によって熱力学的駆動力が与えられる。そのため、相図は塩濃度—タンパク質濃度図として表されることが多

い。そこで、**Fig. 1**のような塩濃度—タンパク質濃度図のマトリックスを作成した。このマトリックスに従って結晶成長溶液を50 μ l ずつ調製し、96穴細胞培養用プラスチックプレートの穴に封入した。データの信頼性を高めるために、1条件につき3例ずつ結晶化実験を行った。また、蒸発による濃度変化を抑制するため、溶液はパラフィンオイルで密封した。この状態で1ヶ月間20℃のインキュベータ内に保管し、結晶の有無、結晶の形態を経時的に観察した。また、6ヶ月後の上澄み濃度を紫外吸収法で計測し、溶解度とした。

3. 実験結果

実験結果を**Fig. 2**に示す。塩濃度1.0 M以上の領域では、針状の結晶が析出した。面 (facet) 構造を持った結晶はすべて tetragonal (正方晶) であり、他の結晶系は見られなかった。

結晶化条件と結晶析出時間との関係は**Fig. 2**中に記号で示した通りである (結晶化条件の左上の記号: A は1日以内、B は2日以内、C は3日以内、D は7日以内、E は2週間以内、F は1ヶ月以内に結晶が観察されたことを示す。G は1ヶ月後にも結晶が観察されなかったことを示す)。多少のばらつきはあるものの、同じ塩濃度であればリゾチーム濃度が高い条件の方が結晶が析出するまでの時間が短かった。リゾチーム濃度が、溶解度に近くなるほど、結晶析出時間が大幅に長くなる。これは Ataka らの結果⁴⁾ともよく一致する。

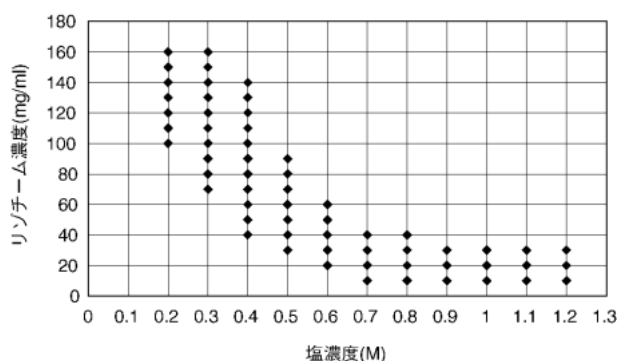


Fig. 1 Crystallization matrix

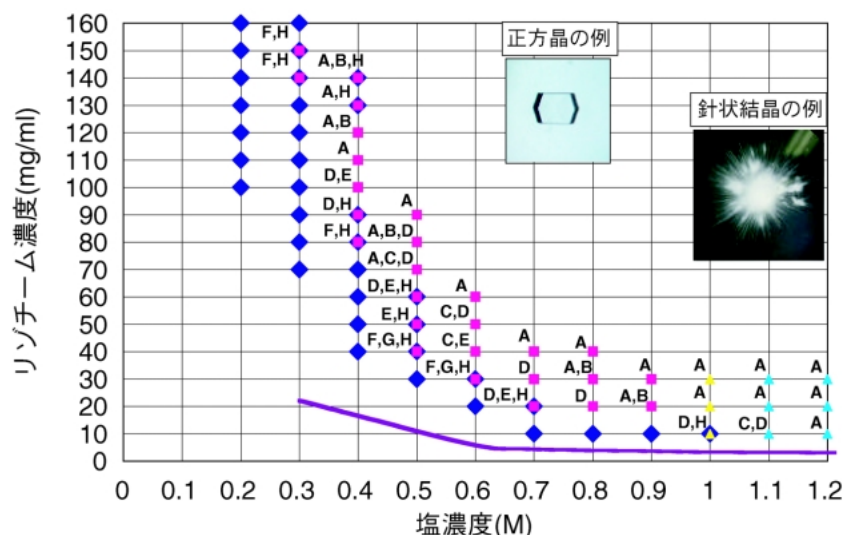


Fig. 2 Result of crystallization experiment. The blue \diamond shows that lysozyme did not crystallize after 2 months. The pink \square shows that tetragonal lysozyme crystals appeared. The yellow \triangle shows that both tetragonal and needle like crystals appeared. The light blue \triangle shows that needle-like crystals appeared. The alphabet at the upper left of each symbol represents the crystallization time. A: Crystal observed in 1 day. B: Crystal observed in 2 days. C: Crystal observed in 3 days. D: Crystal observed in 7 days. E: Crystal observed in 14 days. F: Crystal observed in 30 days. G: No crystals observed in 30 days.

4. 古典核形成理論に基づく結晶化境界の整理

取り扱いを簡単にするために、ここでは均一核形成を考える。

古典核形成理論によれば、核形成頻度 I (単位体積・単位時間にできる核の数) は、以下のように表せる⁹⁻¹¹⁾。

$$I = \frac{const}{\eta} \times C \times \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{kT}\right) \quad (1)$$

ただし、

$$\Delta G^* = \frac{16}{3} \times \frac{\pi \gamma^3}{(\Delta \mu)^2} = const \times \frac{\gamma^3}{(\Delta \mu)^2} \quad (2)$$

ここで、 η は溶液の粘性、 C は溶液中の溶質濃度、 γ は表面張力、 $\Delta \mu = (\Delta \mu/v)$ は単位体積あたりの結晶-溶液間の化学ポテンシャル差である。

系の中に少なくとも 1 個の結晶が存在するためには、

$$核形成頻度 I \times 溶液体積 V \times 経過時間(t) = 1 \quad (3)$$

が満足されなければならない。ここでは溶液体積 V は一定であるため、定数である。また、溶液の粘性 η も今回の系 (リゾチーム-NaCl 系) では一定とみなしてよいため、定数として扱うことができる。よって、(3)式は以下のように整理できる。

$$Ct = \exp\left(\frac{\Delta G^*}{kT}\right) \times const \quad (4)$$

(4)式の両辺の対数をとると

$$\ln(Ct) = \frac{\Delta G^*}{kT} \times const$$

この式に、(2)式の ΔG^* の値を代入する。

$$\ln(Ct) = \frac{1}{kT} \times \frac{\gamma^3}{(\Delta \mu)^2} \times const \quad (5)$$

結晶化の駆動力 $\Delta \mu$ は以下のように表せる。ここで C_e は、ある溶液中の溶質の平衡濃度 (溶解度) である。

$$\Delta \mu = kT \ln\left(\frac{C}{C_e}\right)$$

また、 $\Delta \mu = v \times \overline{\Delta \mu}$ である。これらを(5)式に代入する。

なお、本実験では温度 T は一定であったため、定数である。表面張力 γ については、実際には組成により変化すると考えられるが、具体的な値が不明であるため、ここでは定数とみなす。以上により、結晶化までの待ち時間とタンパク質濃度、平衡濃度 (溶解度) との間に以下の関係が成立することが分かる。

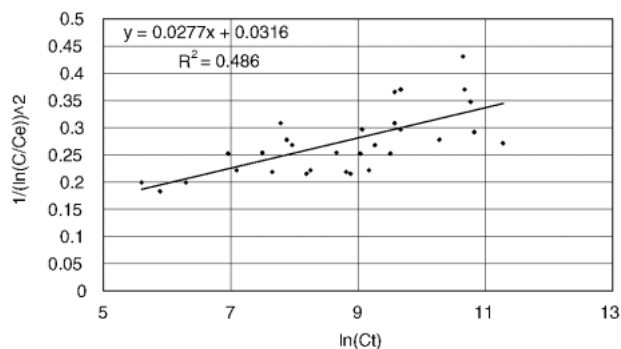


Fig. 3 $\ln(Ct)$ and $1/[\ln(C/C_e)]^2$ plot.

$$\frac{1}{\left[\ln\left(\frac{C}{C_e}\right)\right]^2} = A \ln(Ct) + B \quad (6)$$

ここで A, B は定数である。

この式を用い、実験的に得られた結晶化までの待ち時間を整理した。

Fig. 2 に示した結晶化した実験条件のうち、通常正方晶の結晶化に用いる塩濃度 0.3–0.6 M の実験条件を解析に用いた。3 例のうち 1 例だけ結晶化時間が異常に早いなどの特異なデータは除いた。実験データから、各塩濃度におけるリゾチームの溶解度が既知であり、また、時間 t において結晶の出現したリゾチーム濃度 C も分かる。これらを用い、横軸を $\ln(Ct)$ 、縦軸を

$$\frac{1}{\left[\ln\left(\frac{C}{C_e}\right)\right]^2}$$

としてプロットした結果を Fig. 3 に示す。データは多少ばらつくものの、直線で近似できることが分かる。この直線の傾きと切片は、それぞれ定数 A, B に相当する。

今回の実験からは、定数 $A = 0.0277$ 、 $B = 0.0316$ が得られた。ここで(6)式を

$$(\ln(C) - \ln(C_e))^2 [A(\ln(C) + \ln(t)) + B] = 1$$

と書き直し、 $\ln(t) = D$ 、 $\ln(C_e) = E$ 、 $\ln(C) = X$ として X について整理すると、核形成領域 X を以下の 3 次式の解として求めることができる。

$$X^3 + \left(D - 2E + \frac{B}{A}\right)X^2 + \left(E - 2D - 2\frac{B}{A}\right)EX + \left(D + \frac{B}{A}\right)E^2 - \frac{1}{A} = 0 \quad (7)$$

Fig. 4 に、代表的な経過時間について算出した結晶化領域を示す。単純化した仮定に基づいたモデルであるにも関わらず、計算した結晶化境界線は、実験的に得られた結晶化待ち時間を比較的良く再現しているといえる。

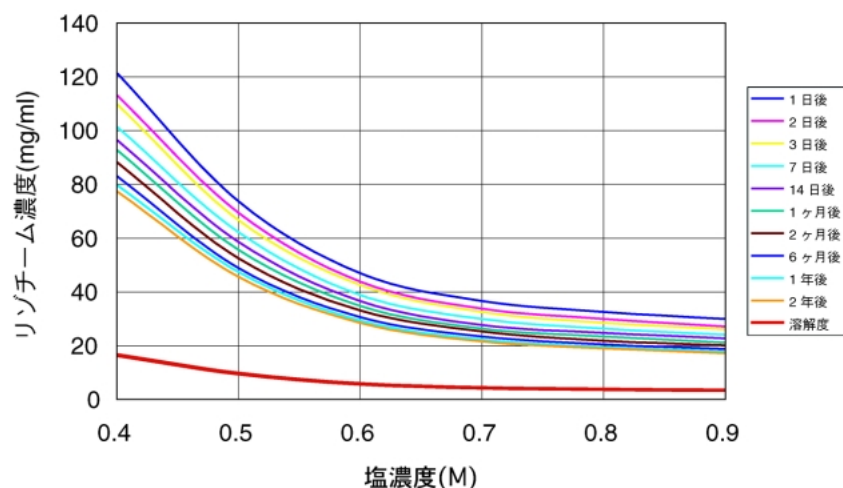


Fig. 4 Estimation of the time dependent change of crystallization zone.

5. ま と め

本研究では、タンパク質の結晶化境界の動的変化を明確化するため、古典核形成理論に基づくデータ整理方法を考案した。比較的単純な仮定に基づく整理であるが、実験的に観察された結晶化までの待ち時間の变化傾向を良好に再現することができた。この手法を用いてタンパク質の結晶化過程を整理することにより、核形成までの待ち時間をある程度予測することが可能である。溶解度ならびに動的な結晶化境界を把握することで、最適実験条件の選択が可能になるのみならず、宇宙実験のように、一定期間内に結晶化させる必要がある場合の条件設定の有力なツールになると期待される。

なお、本方法は原理的には一般のタンパク質系にも適用可能であるが、粘性の組成依存性が大きい場合や、不純物や容器壁との相互作用の大きい系によっては、均一核形成が仮定できない場合があると考えられる。

参考文献

- 1) G. Tamman: *Kristallisieren und Schmelzen*, Leopold Voss, Leipzig (1903).
- 2) A. J. Malkin, J. Cheung and A. McPherson: *J. Crystal Growth*, **126** (1993) 544.
- 3) S. T. Yau and P. G. Vekilov: *Nature*, **406** (2000) 494.
- 4) M. Ataka and S. Tanaka: *Biopolymers*, **25** (1986) 337.
- 5) A. J. Malkin and A. McPherson: *J. Crystal Growth*, **128** (1993) 1232.
- 6) A. J. Malkin and A. McPherson: *Acta Cryst.*, **D 50** (1994) 385.
- 7) C. Haas and J. Drenth: *J. Crystal Growth*, **196** (1999) 388.
- 8) I. Yoshizaki and S. Yoda: *J. of the Japan Society of Microgravity Application*, **18**(3) (2001) 211.
- 9) M. Volmer and A. Weber: *Z. Phys. Chem.*, **119** (1926) 277.
- 10) R. Becker and W. Doring: *Ann. Physik*, **24** (1935) 719.
- 11) D. Turnbull and J. C. Fisher: *J. Chem. Phys.*, **17** (1949) 71.

(2001年7月13日受理, 2001年12月10日採録)