

タンパク質結晶の核形成と分子集合体形成

広島大学総合科学研究科・准教授 田中晋平

1. はじめに

タンパク質の単結晶は、X線結晶構造解析法によって分子の3次元構造を決定するために用いられるが、一般にその作成は容易ではない。その理由の一つに、タンパク質溶液が多くの準安定状態をもつ複雑な相挙動を示す点を挙げることができる。例えば、過飽和状態に置かれたタンパク質溶液中で、準安定な相分離挙動として液体-液体相分離が進行する場合が存在することはよく知られている [1, 2]。このとき溶液中では結晶化と相分離が競合し、さまざまなパターンを形成する [3]。さらに、タンパク質の結晶成長過程の安定性の問題をよく示す例として、結晶多形がある。タンパク質結晶化過程において、同一条件下に置かれたタンパク質溶液中から、晶系や晶癖の異なる複数種の結晶が出現することは、それほど珍しいことではない。この現象は、タンパク質溶液が極端な過飽和度（飽和濃度の100倍）におかれた場合によく観察される。本発表では、この結晶多形の問題に対して、核形成過程（結晶化初期過程）における分子集合体形成の観察によって得られた知見を報告する。

2. 結果と考察

試料はタンパク質卵白リゾチーム、結晶化剤NaClを用い、一定温度（20°C）での結晶化挙動を光学顕微鏡、動的光散乱法を用いて観察した。図1は試料調整から1週間後に得られた非平衡相図である。図中で熱力学的な相の境界を表すのは、溶解度曲線（H）のみで、その他の境界線は非平衡挙動を表している。特にN+Sで表された領域では、正方晶（図2a）と針状晶（図2b）が共存する。針状晶は針状の結晶が球晶を形成するもので、X線結晶構造解析には適さない。一方の正方晶は欠陥の少ない単結晶である。図1に示されているように、針状晶は主に過飽和度の高い領域で出現する。このことから、真に安定な結晶相は正方晶で、針状晶は準安定な結晶相であることが考えられる。実際、結晶融点は針状晶の方が低い。しかし、これら2種の結晶は長期（1か月以上）にわたって共存可能で、針状晶から正方晶への転移は事実上不可能である。これらのことは、結晶形の分岐は、結晶成長の初期、核形成過程において決定されることを強く示唆している。

さらに、光学顕微鏡による観察の結果、針状晶と正方晶では針状晶の方が核形成に長い時間を要する傾向があることも明らかになった。この結果は、「相転移において中間体が存在する場合、より安定性の低いものから順に出現する」といういわゆるオストワルドのステップルールに従っておらず、タンパク質結晶化過程における結晶核にいたるパスは、より複雑であることを示唆している。

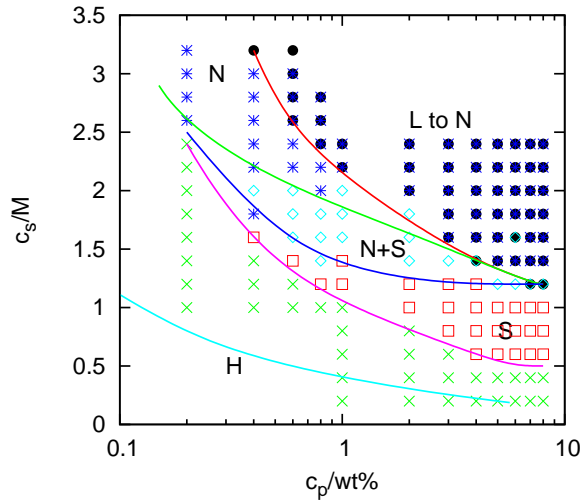


図1. リゾチーム結晶の非平衡相図。縦軸はNaCl濃度 (c_s)、横軸はリゾチーム濃度 (c_p)。N: 針状晶, L to N: 液体-液体相分離から針状晶, N+S: 針状晶と正方晶, S: 正方晶, H: 溶解度曲線。

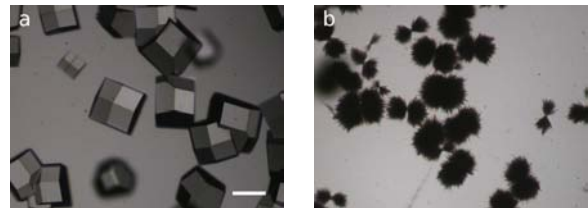


図2. (a) 正方晶結晶。(b) 針状晶。図中の直線は0.2mmを表す。

図3に、動的光散乱法を用いて結晶化初期過程における溶液内の分子集合挙動を測定した結果を示す。動的光散乱測定では、タンパク質溶液は結晶化剤 NaCl を含んだアガロースゲル上に静かに置かれ、NaCl の拡散によりゆっくりと過飽和度が上昇するようにした。タンパク質濃度は 0.5wt% に固定した。図3に示すように、数時間程度の待ち時間の後に分子が集合を開始し、サブミクロンからミクロン程度のクラスターを形成する。図3aの低 NaCl 濃度の溶液からは、測定時間内に結晶は析出しなかった。ただし、おおよそ 1.5M 以上の NaCl 濃度の溶液では最終的には結晶が析出する。図3bの高 NaCl 濃度 ($c_s = 2.4\text{M}$ 以上) のとき、針状晶と正方晶の両方が析出した。さらに、NaCl 濃度が高くなるほど、針状晶の割合が上昇した。

図3からわかるように、結晶が析出しない低 NaCl 濃度の溶液中でむしろ大きなクラスターが形成され、結晶が形成される NaCl 濃度が高い場合にはクラスターは小さく、安定な成長をみせている。以上の結果から、結晶核形成過程に対して以下のようなモデルを考察した。

まず、結晶の析出とクラスターの形成との間に強い相関がないことから、クラスターは結晶核そのものではないことがわかる [4]。一方、結晶が短時間で析出する条件下で、クラスターの構造、成長様式に顕著な変化が見られる。特に、クラスターの構造が低 NaCl 濃度の場合と比べてコンパクトであることが特徴で、結晶が析出しやすい条件ではクラスターは比較的密につまった構造をとることがわかる。また、NaCl 濃度が上昇するにつれて正方晶の数の割合は著しく減少するが、クラスターの成長には目立った変化はない。このことから、少なくとも正方晶とクラスターとの間の相関は低いことが予想される。残る可能性は (A) クラスター形成と結晶核形成には相関がない、(B) 針状晶はクラスターの一部から形成される、の2つであるが、現在のところこの2つの可能性をはっきり区別する実験結果は得られていない。しかし、正方晶と針状晶という結晶多形の存在の理由を結晶化初期過程におけるクラスター形成に求めるアイディアは魅力的である。今後は、液体-液体相分離が同時進行するような溶液条件に対しても動的光散乱法を適用し、針状晶のみが析出する場合、正方晶のみが析出する場合のデータから結晶核形成過程とクラスター形成との関係を探っていく予定である。

参考文献

- [1] M. Muschol and F. Rosenberger, J. Chem. Phys. 107 (1997) 1953–1962.
- [2] S. Tanaka, M. Yamamoto, K. Ito, R. Hayakawa, and M. Ataka, Phys. Rev. E 56 (1997) R67–R69.
- [3] S. Tanaka, M. Ataka, and K. Ito, Phys. Rev. E 65 (2002) 051804.
- [4] S. Tanaka, K. Ito, R. Hayakawa, and M. Ataka, J. Chem. Phys. 111 (1999) 10330–10337.

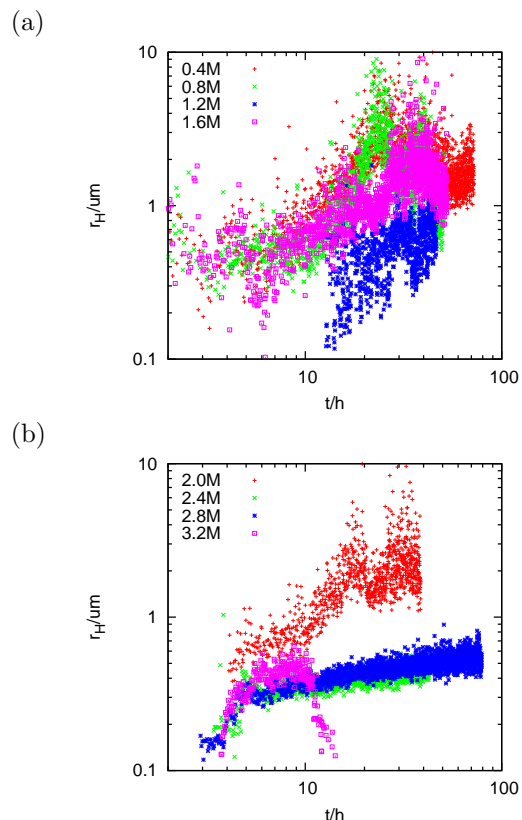


図3. 動的光散乱法で測定されたクラスターの流体力学的半径。(a) 低 NaCl 濃度 ($c_s = 0.4 - 1.6\text{M}$)。 (b) 高 NaCl 濃度 ($c_s = 2.0 - 3.2\text{M}$)。