

平成18年度「WG 名」活動報告書

代表者所属 氏名 京都大学大学院農学研究科 相原茂夫

1. 構成メンバー

氏 名	所属
相原茂夫	京大院・農学研究科
水谷公彦	京大院・農学研究科
鈴木淳巨	名大院・工学研究科
谷本能文	広大院・理学研究科

2. 本年度 WG 会合開催実績

(1) 第1回：平成19年1月16日

3. 活動目的

タンパク質結晶成長に関わる微小重力場の影響は種々の観点から多くの研究者によって研究が進められており、最近ではその成果が認められつつある。宇宙で調製した単結晶が、全てではないが、地上で調製される単結晶よりX線結晶学的に良質の結晶であることは結晶内の分子パッキングが優れていることを示すものである。しかし、その原因が何によって起こっているのかについては諸説があり、未だ明解な結論を得ていないのが現状である。

本研究はこの問題に焦点をあて、ニワトリ卵白リゾチームを用いて、結晶学的データを詳細に分析することによりタンパク質結晶学の観点から解明しようと企図した。

4. 活動内容

宇宙実験による微小重力場の他に、磁場を利用した擬似微小重力場での実験を行った。

まず、宇宙実験については、宇宙の微

小重力環境で調製した単結晶（正方晶）について格子定数が小さくなる傾向があることを認めている。しかし、この性質は結晶化条件が異なると同じ晶系でも格子定数の伸縮が認められることから、他の晶系についても一般的に認められる性質であるのか検証する必要がある。そこで、JAXA-GCF 主催の高品質タンパク質結晶生成プロジェクトに参加し、第6回宇宙実験を実施し、ニワトリ卵白の結晶化実験を行った。

斜方晶の結晶化には失敗したが、正方晶の結晶化は成功し、放射光 X 線を利用して正方晶の X 線回折実験を行い、正方晶の格子定数を測定した。

Table I

Comparison of the Lattice in the Space- and Earth-grown Tetragonal Crystals and the Effects of PEG

50mg/ml NaCl			
	$a = b$ (Å)	Lattice c (Å)	V (Å ³)
Earth			
	77.45±0.12	37.31±0.07	223804±1040
	78.64	36.92	228322
Space			
	77.34	37.28	222989
	78.25±0.19	37.07±0.00	226981±1072
50mg/ml NaCl with 25% PEG			
Earth			
	77.13±0.07	37.17±0.11	221125±1026
Space			
	77.11±0.62	37.76±0.10	224519±705

宇宙実験における正方晶の格子定数について結晶化剤が 5%NaCl だけのときと 5%NaCl に 25%PEG8000 を含むときとは事情が異なっていた。すなわち、正方晶の格子定数を厳密に調べてみると、正方晶の a, b 軸に相当する格子定数が 77Å 台のものと、78Å 台のものの 2 種類あることが判明した。しかし、 c 軸の関係で、単位胞としては a, b 軸の短い前者の方がわずかに小さく、 c 軸方向に伸びた形状をしているのに対し、後者は相対的に扁平な形状をして

いることが明らかになった。そして、結晶化剤が 5%NaCl だけの場合は、宇宙実験においても、地上対照実験においても両方の単結晶が現れるのに対し、25%PEG8000 を含む場合は宇宙実験、地上対照実験いずれにおいても 77Å 台の格子定数のもの 1 種類だけしか現れなかった。このことは 25%PEG8000 を結晶化剤に加えることによって 5%NaCl の時と比較して結晶成長メカニズムに変化が起きたと考えられる。また、単結晶の格子定数が統一され、品質が向上したといえる。次に、宇宙実験と地上対照実験を比較すると、宇宙実験の結晶の数が少ないということはあるが、宇宙実験の方が両条件とも単位胞が小さくなるという傾向が認められた。しかし、小さくなる傾向を示したのは a, b 軸で、 c 軸は 5%NaCl だけの時と 25%PEG8000 を含む場合で異なる挙動を示した。25%PEG8000 が加わることによって逆に c 軸方向への顕著な伸長効果が現れた。

宇宙実験に関しては、もう少しデータを追加しないと明解な結果は出せないが、微小重力場で結晶内の分子間相互作用が強くなり分子間距離が短縮されたことによって格子定数が短くなったと考えられる。そして、宇宙実験における c 軸方向の伸長は結晶成長メカニズムに対して PEG8000 の寄与が推測される。

次に、超伝導磁石を利用して磁場中における結晶化実験を行い、磁場中でのタンパク質結晶の浮遊現象に基づく擬似微小重力環境での結晶化と宇宙の微小重力環境との差異を解明する目的で実験を行った。超伝導磁石内の 3 つの場所、(1)11 T ($-1400\text{T}^2/\text{m}$)、(2)15 T ($0\text{T}^2/\text{m}$)、(3)12 T ($+1200\text{T}^2/\text{m}$) の場所に試料溶液の入った容器を置き、垂直磁場を印加した。(1)では重力と磁気力が打消しあい水がほぼ微小重力となっている条件(0G)、(2)では水に磁気力が作用しない条件(1G)、(3)では水に対して約 1.8G の過重力が加わる条件となるように設定した。

タンパク質など生体高分子の磁場配向については、古くから多くの研究がなされている。従って、タンパク質が磁場配向すること自体は不思議ではないが、通常の球

状タンパク質のような磁気的な異方性が極めて小さな分子については十分な磁場配向は起こらないため、磁場の効果は長らく忘れられていた。しかし、たんぱく質単結晶が磁場配向する例はこれまでに知られており、単結晶のように分子がある一定の法則に従って配列すると磁場配向が起こるのであろう。

宇宙実験では格子定数の異なる正方晶が現れることを確認したが、磁場における実験では正方晶も斜方晶も、非磁場中では 2 種類の単結晶が晶出したが、磁場中では 1 種類の格子定数をもつ単結晶しか現れなかった。しかし、格子定数の小さい方とか、大きい方というわけではなく、磁場中で成長した単結晶は単位胞の体積こそ小さくなっていたが、誤差の範囲であって、格子定数が小さくなるという顕著な結果も現れなかった。

ただ、磁場中で成長したタンパク質単結晶はある方位をもって晶出していることを確認した。すなわち、磁場中では正方晶であっても斜方晶であっても磁場の方向と c 軸が平行になるように配置していた (写真)。

Table II

Contraction of the lattice length in a magnetic field

正方晶 <u>$P4_32_12$</u>			
非磁場			
$a=b$	c	V	
77.617±0.071	37.166±0.076	223908.16±872.53	
78.523±0.250	36.944±0.030	227794.61±1483.50	
磁場 (擬似微小重力場)			
77.509±0.0	78.37.227±0.053	223649.52±660.00	
斜方晶 <u>$P2_12_12_1$</u>			
非磁場			
a	b	c	V
57.89±0.07	67.616±0.21	30.332±0.11	118647.58±125.68
58.55±0.12	68.327±0.04	30.300±0.05	121231.15±564.73
磁場 (擬似微小重力場)			
58.10±0.02	68.067±0.03	30.581±0.02	120938.9±184.9



非磁場



磁場中

Fog. 1 卵白リゾチーム斜方晶

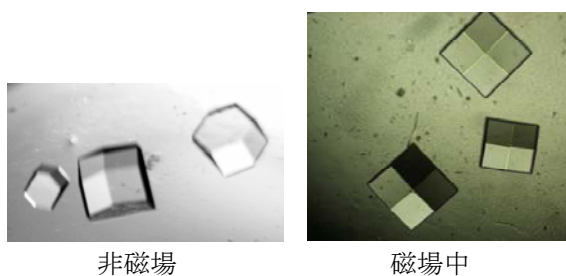


Fig. 2 卵白リゾチーム正方晶

格子中の分子の方位を、斜方晶の基本となる分子が c 軸に垂直方向にあると仮定して、この分子に対する正方晶の格子中の 8 分子の方位をフェリカルポーラーアングルで比較してみると、次の表のようになった。

Table III

Comparison of the orientation angle of molecules in tetragonal crystal against orthorhombic crystal of hen egg-white lysozyme

正方晶	$P4_32_12$	ϕ	ϕ	χ	
1		56.89	-171.64	82.32	-
2		35.02	-126.64	147.70	32.30
3		143.78	98.35	137.85	42.15
4		116.76	143.35	76.26	-
5		95.48	-25.52	113.88	66.12
6		68.47	19.47	127.49	52.51
7		56.82	64.47	170.81	9.19
8		117.93	-70.52	141.57	38.43

ただし、この表で 4 カラム目 χ に示すように分子の本来の分子の方位は大きく異なるが、リゾチームの磁氣的異方性が極めて小さいこと、単結晶であることなどを考慮し、5 カラム目に示すような方位を取っていると考えると、最も方位の合っている分子で 9.19° の角度を示している。それでも、多くの分子が異なる方位をとるにも拘わらず、結晶としては写真に示すように 2 種の単結晶共に一定の配向性 (c 軸に平行) を示した。このことは分子自体の方位とは異なる別の主因があることを示唆している。

5. 成果

学会発表

1. 相原茂夫¹、堀内勇人¹、水谷公彦¹、鈴木淳巨²、田仲広明³、佐藤勝⁴、小林智之⁴ (京大院・農¹、名大院・工²、日本宇宙フォーラム³、JAXA⁴) ニワトリ卵白リゾチーム斜方晶の結晶化. 第 22 回宇宙利用シンポジウム. 2006 (日本学術会議 会議室)

2. 堀内 勇人¹、水谷 公彦¹、鈴木 淳巨²、山根 隆²、谷本能文³、相原 茂夫¹ (京大院¹・農、名大院・工²、広大院・理³) ニワトリ卵白リゾチーム結晶の格子定数と結晶成長分子メカニズム. 2006 日本農芸化学会大会 (京都女子大)

3. 相原茂夫、水谷公彦、堀内勇人、田仲広明*、三上文三 (京大院・農、コンフォーカルサイエンス*) 微小重力場におけるタンパク質結晶化 -ニワトリ卵白正方晶に対する PEG の効果-. 2006 日本農芸化学会関西支部大会 (京都工芸繊維大)

原著論文

1. Shigeo Aibara, Kimihiko Mizutani, Atsuo Suzuki, Hayato Horiuchi, Kazuhiko Hashimoto, Takashi Yamane: Comparison of molecular packing between two kinds of hen egg-white lysozyme orthorhombic crystals. J. Jpn. Soc. Microgravity Appl. (2007). in contribution.