

平成 19 年 4 月 16 日

平成 18 年度「たんぱく質結晶品質の評価と制御」活動報告書

代表者所属 茨城大学大学院 理工学研究科
氏名 新村信雄

1. 構成メンバ

氏 名	所属
渡 辺 信 久	北 海 道 大 学
小 松 啓	
佐 藤 元	東 北 大 学
田中伊知朗	茨 城 大 学
大 西 裕 季	化 研
栄 龍	J A X A
吉 崎 泉	J A X A
佐 藤 勝	J A X A
田 仲 広 明	J S U P
小 島 謙 一	横 浜 市 立 大 学
橘 勝	横 浜 市 立 大 学
原 田 繁 春	京 都 工 繊 大 学
相 原 茂 夫	京 都 大 学
森 勇 介	大 阪 大 学

2. 本年度 WG 会合開催実績

(1) 第 1 回：平成 18 年 12 月 26 日

3. 活動目的

現時点でのタンパク質単結晶育成の目的は X 線や中性子回折法による結晶構造解析のために単結晶試料が必要であるか

らである。最近の X 線結晶構造解析の方向の一つに高分解能精密構造解析があり、そこでは良質結晶が求められている。また、水素や水和構造解析に有力な中性子回折実験では大型結晶が必須である。そのためには、試行錯誤に頼った結晶育成ではなく、理に適った結晶品質評価と結晶品質に及ぼす因子の解明が必須である。

良質結晶と言われた時、思い出す一番ナイーブなものはシリコン完全結晶であろうか。そこでの完全結晶とは格子欠陥が無く、原子が一糸乱れず 3 次元に並んでいるとされており、単位体積あたり何個の格子欠陥があるかで完全度が定義される。しかし、タンパク質の X 線結晶構造解析での良質結晶の定義はそれとは異なり、高分解能構造解析ができる X 線回折データを提供できる結晶とされている。両方で、結晶品質を定義する空間が異なることに気付く。前者は実空間であるのに対し、後者は逆格子空間である。空間が異なるので両者の議論には相当の慎重さが必要である。

当該 WG の目的は光学顕微鏡や AFM 等を用い実空間で結晶を観察することで得られる情報と回折実験法により逆空間で結晶を観察することにより得られる結晶品質評価の指標の相違を検討し、それらを制御する因子を探ることにより、良質結晶育成の指針を得ることである。この成果は、宇宙環境を利用した実験の効率化に役立てられる。

4. 活動内容

1. 広い範囲に亘る pH 変化による結晶品質評価 (岩井、大西、田中、新村)

タンパク質を構成するアミノ酸のうち極性およびイオン性のアミノ酸は水溶液の pH に依存してプロトン化あるいは脱プロトン化してそれぞれ正あるいは負に帯電する。プロトン化、脱プロトン化が半数起きる pH を pK 値と呼ぶ。しかしこれらがタンパク質を構成する時、ある pH 状態でのタンパク質中でそれらアミノ酸残基がプロトン化あるいは脱プロトン化するかは一般にタンパク質溶液の pH とそのアミノ酸残基の pK 値からは決定できない。しかし、タンパク質中でそれぞれのアミノ酸残基がプロトン化あるいは脱プロトン化するかは、そのタンパク質の活性機構解明、タンパク質の安定性等非常に重要な情報である。一般に X 線結晶構造解析でこれらを決定するのは殆ど不可能であり、将に中性子回折法がこのために最適な実験手法である。そのためには広い pH 範囲で大型結晶育成を行う必要がある。

今回、我々はニワトリ卵白リゾチーム単結晶を pH2.5-8.0 まで 0.5 刻みの pH で育成することが出来た。また、それらすべての結晶品質を Wilson Plot 法で評価した結果ほぼすべての pH での結晶品質が同等であることが判明した。

2. 格子欠陥に起因する散漫散乱の観察 (川村、田中、吉崎、新村)

乱れのある結晶からの回折強度式は一般に平均構造からの寄与と平均構造からのゆらぎ（格子の乱れ）の構造からの寄与から成る。前者は所謂 Bragg 反射であり、後者はそのピーク位置は Bragg 反射と同じ場所であるが、Bragg 反射の下に裾を引くもので、散漫散乱と呼ばれるものである。格子の乱れの原因には大きく分けて格子欠陥と分子の熱振動がある。この 2 つは現象としての散漫散乱への寄与の仕方に差は無いので、これの分離は別の方法に依らねばならない。一番確実な方法は分子の熱

振動は温度に依存するので、散漫散乱の温度変化を測定することである。

高エネルギー研究所 PF 施設でインスリンのいくつかの散漫散乱を測定した。

6. 放射光トポグラフィによるタンパク質結晶中の転位の観察 (小島)

タンパク質結晶の結晶欠陥のキャラクター化は、タンパク質の構造解析の精密化だけでなく結晶成長のメカニズムの解明においても重要である。このため、バーガース・ベクトルの方向や大きさなどの転位の詳細な構造を評価することのできる X 線トポグラフィはタンパク質結晶の転位を評価する上で非常に有用な手法の一つである。タンパク質結晶の X 線トポグラフィへの応用は、国外のいくつかのグループにより行われており、そのほとんどの研究は、単色 X 線を用いて行われている。しかしながら、タンパク質結晶の X 線トポグラフィ像のコントラストは不明瞭であり、タンパク質結晶の転位構造や転位像のコントラストの解釈は依然不明瞭なままである。

小島研究室では、転位のバーガース・ベクトルを迅速に決定することのできる白色 X 線トポグラフィを用いて正方晶リゾチーム結晶中の転位の観察を行ってきた。その結果、タンパク質結晶中の転位を明瞭に観察することのできる条件を明らかにすることにより、正方晶リゾチーム結晶及び斜方晶リゾチーム結晶の明瞭な転位像を観察し、転位のバーガース・ベクトルを決定することに成功した。しかしながら、白色 X 線を用いた X 線トポグラフィでは高次の反射によるトポグラフィ像の重なりが起るため、分解能が悪く、これ以上の詳細な解析は望めない。そこで、タンパク質結晶中の転位の更なる詳細な研究を進めていくために、単色光トポグラフィにより斜方晶リゾチーム結晶の転位の観察を行った。結果として、非常に明瞭なトポグラフィ像の撮影に成功し、白色放射光トポグラフィでは観察できなかった転位像の評価を行うことができた。

5. 成果

このグループとしての学術誌等への発表はない。ただし、第 23 回宇宙利用シンポジウムでグループの会合での発表成果を代表者がまとめて発表した。