

微小重力環境タンパク質結晶生成技術の改良

田中 広明(コンフォーカルサイエンス), 伊中 浩治, 古林 直樹(丸和栄養食品), 高橋 幸子, 巖 斌(コンフォーカルサイエンス), 佐野 智, 正木 美佳, 太田 和敬, 小林 智之, 吉村 善範(JAXA)

Improved protein crystallization technology in microgravity

Hiroaki Tanaka*, Koji Inaka, Naoki Furubayashi, Sachiko Takahashi, Bin Yan, Satoshi Sano, Mika Masaki, Kazunori Ohta, Tomoyuki Kobayashi, Yoshinori Yoshimura

*Confocal Science Inc., Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032

E-Mail: tanakah@confsci.co.jp

Abstract: It is said that there are positive effects of microgravity on higher quality protein crystal growth. The formation of a protein depletion zone (PDZ) and an impurity depletion zone (IDZ) due to the suppression of a convection flow were thought to be the major reasons. In microgravity, the incorporation of the molecules into the crystal highly depends on the diffusive transport, so that the incorporated molecules may be allocated in order and the impurity uptake may be suppressed, resulting in highly ordered crystals. We studied those effects numerically using a simplified model, and found out that the combination of the diffusion coefficient of the protein molecule (D) and the kinetic coefficient for the protein molecule (β) could be an index of the extent of these depletion zones. We applied the results of the numerical analysis for the optimization of the crystallization conditions and estimated microgravity effects on protein crystal growth before performing microgravity experiments. There are still some more details to be elucidated, but when our technology is more established and can be applied to more variety of protein samples, the crystallization in microgravity will be more useful method and will contribute to the X-ray structural analysis more practically.

Key words; Microgravity, Protein crystal growth, Protein depletion zone, Impurity depletion zone, numerical analysis

1. はじめに

良質なタンパク質結晶の生成は、X線回折構造解析実験においてボトルネックであるといわれている。

宇宙実験によるタンパク質結晶の生成は、密度差対流や生成結晶の沈降などが抑制されることにより結晶化に関わる問題の解消が期待されて¹⁾、約30年前から取り組まれている。Littke²⁾らの先駆的な実験で、リゾチーム等の結晶の大型化や品質向上が認められたことから、NASAでは90年代に宇宙で多くのタンパク質結晶化実験が実施されたが、有用結晶の生成率は2~3割といわれ³⁾、現在では実施されていない。

一方、宇宙実験でのタンパク質結晶成長過程に関する研究も進められた。Chayen⁴⁾らはその場観察により、蒸気拡散(VD)法で成長中の結晶が微小重力環境でも移動することを発見し、一般に使用されるVD法は宇宙実験では利用すべきでないことを明らかにした。その結果、以後のESAの宇宙実験では液体の拡散を利用した、カウンターディフュージョン(CD)法が使われることとなった。

Otarola⁵⁾らは微小重力環境で成長中のリゾチーム結晶の周辺では密度差対流が抑制され、タンパク質欠乏層(PDZ: Protein Depletion Zone)が形成されることを光干渉法で観察した。PDZの形成により成長中結晶の表面のタンパク質濃度が低下すれば、低過飽和度により成長

速度は低下し、結晶に取り込まれた分子の配向の乱れ(ディスオーダー)は減少する。Thomas⁶⁾らは結晶周辺に不純物欠乏層(IDZ: Impurity Depletion Zone)が形成されることにより、リゾチーム結晶への不純物の取り込みが微小重力環境で大幅に抑制されることを明らかにした。結晶に取り込まれる不純物が減少すればディスオーダーは減少する。またVekilov⁷⁾らは、密度差対流と結晶の成長過程との相互作用により、結晶成長速度に揺らぎが生じることを見つけており、結果としてステップバンチングによるディスオーダーを引き起こすことが示唆されているが、密度差対流の抑制はこの問題も抑えることができる。

一方García-Ruiz⁸⁾らは、アガロースで結晶化溶液をゲル化することで密度差対流を抑制して疑似微小重力環境を実現し、宇宙実験での生成結晶と品質に差がない例を報告している。また密度差対流が抑制できる、結晶化容器の特性長の見積についても触れている。

NASDA/JAXAでは宇宙環境の応用利用の一環として、タンパク質結晶成長分野に取り組んできたが、特にPDZ、IDZ形成の促進により、微小重力環境の効果を促進することで、有用結晶の生成率を大幅に向上させることを目指した。また実用構造解析を目指して、比較的単純な構造の容器、実験手順を確立し、実用的な試料量で、実際の先端構造解析でターゲットとされる試料を広く対象とできることを目指した。また十分な事前の実験条

件最適化等により、確実に宇宙実験での結晶の生成、回折データ取得を目指した。2002 年に開始した JAXA(NASDA)-GCF 以降の継続的な実験機会の利用により、これらの技術は逐次改善され、現在では事前に結晶化条件が最適化できた試料に関しては、7~8 割の確率で有用結晶の生成が期待できるようになっている。

2. タンパク質結晶成長と微小重力環境

このように、微小重力環境下では密度差対流の抑制により、結晶中の分子のディスオーダーを減らすと考えられている。また、表面流の揺らぎに伴うステップバンチングも抑制されることが期待される。

一方、地上では、塩類等、粘性が低い結晶化試薬の場合、必然的に密度差対流が発生する。また、ポリエチレングリコール(PEG)類等、粘性が高い結晶化試薬の場合、原理的には密度差対流は発生しないはずであるが、バッチ法以外の結晶化方法では、結晶化試薬の濃度上昇に由来する密度差が必然的に容器内で発生することや、容器を立方体にすることができない等、密度差流を抑止することは実現していない。

成長中の結晶周辺に形成される拡散場については、結晶を球と仮定したモデル系で数値的に解析可能である。PDZ の形成による効果は DFR(Driving Force Ratio)として、IDZ の形成による不純物取り込み抑制の効果は IR(Impurity Ratio)として、以下のようなモデル式で推測できる⁹⁾。

$$DFR = \frac{DFR_{0G}}{DFR_{1G}} = \frac{1}{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}} \cdots (1)$$

$$IR = \frac{IUR_{0G}}{IUR_{1G}} = \frac{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}}{1 + A \cdot \frac{R \cdot \beta}{D}} \quad \text{ただし、} A = \frac{\beta_i \cdot D}{\beta \cdot Di} \cdots (2)$$

C(∞), C(R) and Ce: 結晶から離れた位置、結晶表面、および飽和溶液でのタンパク質濃度

Ci(∞) and Ci(R): 結晶から離れた位置、および結晶表面での不純物濃度

β , β_i : タンパク質分子および不純物分子の結晶成長のキネティック定数

D, Di: タンパク質分子および不純物分子の拡散定数

R: 結晶半径

IUR: Impurity Uptake Ratio

(1)および(2)式をグラフに表すと Fig. 1 のようになる。

両グラフから分かるように、欠乏層形成の効果は $R\beta/D$ 値(4 項参照)が大きくなるほど大きくなる。すなわち、結晶の大きさが大きくなるほど、また β が大きいほど、あるいは D が小さいほど、より小さな結晶でも欠乏層形成効果が期待できる。

3. 宇宙実験効果の促進策

従って、積極的に宇宙実験効果を促進するためには、まずタンパク質分子の拡散係数(D)を小さくし、タンパク質分子の結晶成長のカイネティック係数(β)を大きくすることが重要である。D は溶液の粘性に依存するため、PEG 等の高粘度の試薬の利用が考えられる。しかし D を小さくするために、タンパク質結晶化に用いる結晶化溶液を異なる成分に替えることは、一般的な結晶化の研究者は想定しないことである。JAXA 応用利用研究拠点の技術開発では、溶液中の塩濃度を最適化することで、

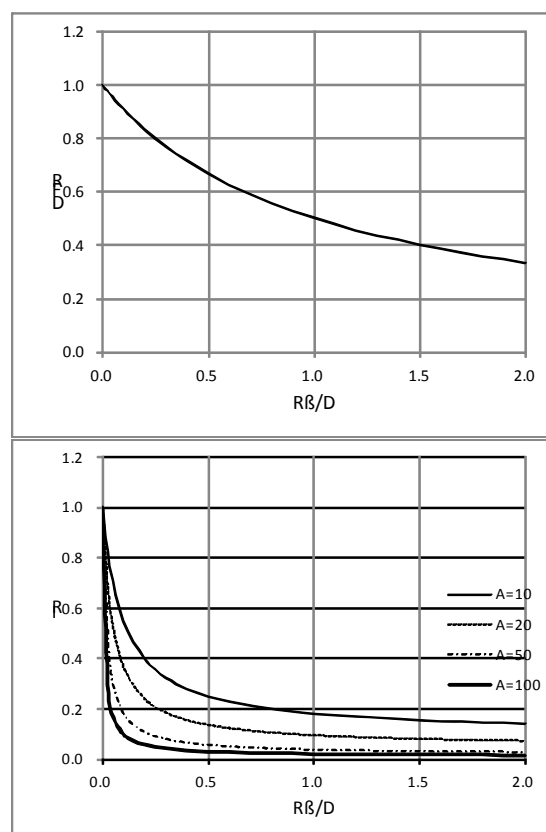


Fig. 1 タンパク質欠乏層(PDZ、上)および不純物欠乏層 (IDZ、下) の形成

横軸 ($R\beta/D$) については第 4 項参照。

IDZ の A 値は実際に即した値 10~100 を適用

PEG の結晶化条件を広く様々なタンパク質試料に適用できることを見つけた。実際、複数のタンパク質についてこの問題を検討したところ、タンパク質分子が持つ荷電密度と、結晶生成に必要な塩濃度の間には一定の関係が見いだされることが明らかになった¹⁰⁾。この結果、従来よりも様々なタンパク質試料に対して、PEG 系の結晶化試薬が適用可能となった。JAXA では、タンパク質のアミノ酸組成から、この塩濃度を推定するプログラムを作成し、結晶化実験に供用している。

一方、 β はタンパク質試料を極限まで精製し、均一性を高めることで大きくなる。JAXA 応用利用研究拠点の技術開発では、リゾチームをイオン交換クロマトで非常に高純度に精製し均一性を高めると、 β が数倍大きくなることが明らかになった (Table 1)。

Table 1 リゾチームの結晶化と D/β 値

タンパク質試料精製度 ／結晶化試薬	β (mm/hr)	D (mm ² /hr)	D/ β (mm)
高精製／塩	0.34	0.36	1.06
低精製／塩	0.17	0.36	2.12
高精製／PEG 4000	0.41	0.094	0.23
低精製／PEG 4000	0.14	0.094	0.67

結晶化に供されるタンパク質試料を SDS/ Native-PAGE ならびに、分析用高分解能イオン交換クロマトグラフィーで分析すると、しばしば目的タンパク質と同じ分子量ながら、荷電の異なる、イオン交換で分離可

能な複数の成分が含まれ、そのうちのいくつかの成分では良好な結晶を生成しない。おそらく、このような成分は単に結晶生成の確率や外形に影響を与えるだけでなく、結晶成長の過程にも影響を与え、 β 値を低めているのではないかと想像された。このため、 β を大きくするために、多くのタンパク質試料で夾雑成分を除く精製を実施したところ、良好な結果を得られることが明らかとなった。そこで JAXA PCG では、諸条件が整った試料に関しては、このような精製を追加適用している。

なお、含まれる不均一成分の量と β との関係については、実験事実の蓄積が不十分であり、さらなる検討が必要であるが、事前に D と β の値から宇宙実験の効果が期待できるかどうかを判断し、これら促進策により不適な試料/結晶化条件を改善することで、宇宙実験の有用性を高める道筋はつけられたと考えている。

4. 宇宙実験結果との比較

JAXA 技術開発では、 D を簡便に推定する近似式、ならびに β を簡便に推定する実験方法を考案した。この結果、 D と β 値を見積もることができるようになった。JAXA PCG で得られた宇宙生成結晶の結果より、 D/β 値（ここでは結晶の大きさ(単位 mm)と比較しやすい比で表した)と宇宙実験での品質向上との相関を検討した (Table 2)。その結果、 D/β が 3mm 以下で、75%以上の試料において微小重力の効果が大きいことが観察された。生成された結晶の大きさの平均値 R と D 、 β の値から $R\beta/D$ を計算すると 0.035 以上である。この結果と Fig. 1 を比較すると、主に IDZ の効果(不純物取込抑制)が優位と考えられる。一方、中性子線回折実験向けの結晶のように R が大きい(1mm 程度以上)場合には、PDZ と IDZ 両方の効果が期待できる。

Table 2 宇宙実験結果と D/β 値

D/β (mm)	<1.0	1.0~3.0	3.0~10.0	10.0<
$R\beta/D$	0.097<	0.035 ~ 0.097	0.006 ~ 0.035	<0.006
試料数	6	13	13	13
有効試料数 (%)	83.3	76.9	46.2	30.8
宇宙生成結晶の半径の平均 (mm)	0.097	0.105	0.063	0.062

なおこれまで NASDA-GCF から JAXA PCG の間に、特に、宇宙実験の効果が高かった例としては、H-PGDS¹¹⁾、L-PGDS¹²⁾、 α -Amylase、Lysozyme 等が挙げられる。

5. 宇宙実験の実際

このような技術開発成果を踏まえて、現在 JAXA PCG では、Table 3 のような標準搭載プロトコールで対象試料の宇宙実験向け結晶化条件最適化を実施している。

試料の搭載にあたっては、地上での結晶生成に難がある試料の結晶生成状況が宇宙環境で改善する合理的な理由がないこと、またこのような試料は性状に問題があることが多いことから、目標を結晶の高品質化に絞るこ

ととした。また、地上での結晶生成条件の最適化を重視し、JAXA Crystallization Box (JCB)を用いた適合性試験をすべての試料で搭載前に実施することとし、結晶生成の確認ができたものを搭載することとした。

これまで、確実に結晶が生成すると期待された試料でも、適合性試験で結晶が生成しないケースはかなりの頻度で発生している。初めは、CD 法固有の問題として、タンパク質ならびに結晶化試薬の拡散に伴うそれぞれの濃度の低下で、いわゆる相図上の結晶生成エリアをキャピラリー中溶液組成がスキャンできない(あるいはできても、それまでに時間がかかる)問題に由来するのではないかと考え、高濃度の溶液の提供を利用者にお願いしたが、決定的な解決策にはならなかった。また、持ち込まれた試料の結晶生成の再現性を利用者と同一溶液で実施したところ、多くの試料で結晶化の再現性が取れないことを経験した。そこでこれら試料について、試料の均一性を検討する目的で、SDS-PAGE ならびに Native-PAGE 電気泳動で性状を確認(以下、試料性状と略する)したところ、多くの試料で均一性に原因があることが分かった。このため、性状確認の結果に問題がある試料については更なる精製を適用することとした。また、結晶化条件検討の過程で核形成が起こりにくい試料については、核形成促進策を適用している。

Table 3 JAXA PCG 標準搭載プロトコール

	項目	説明		
1	利用者調整	受入タンパク質の条件検討進捗状況に基づき、適宜調整		
2	試料性状	SDS-, Native-PAGE、DLS、HPLC 等。VD/CD 法での再現性。		
	評価	良好	不良	
3	追加精製	適用不要	イオン交換クロマトでの精製適用	
	実施の有無	なし	あり	なし
	VD法での検討	結晶生成確認		なし
	評価	結晶生成 ⇒ 継続		結晶生成不良 ⇒ 中止もしくは試料の再送付依頼
4	CD 法条件最適化と核形成促進策	CD 法で結晶生成を検討。結晶生成しない場合には、核形成促進策を適用		
	JCB 適合性試験	上記で結晶生成した試料に適用		
	結果	標準	核形成促進策	結晶生成不良
5	搭載判断	搭載		搭載見送り

これまでの JAXA PCG の 3 回の宇宙実験の結果から以下の点が明らかになった。(1)試料性状が良好であった試料あるいは性状が良好でない場合でも追加の精製を適用しかつ CD 法向け最適化がうまくいった場合は、搭載率および有用成果率は高い傾向にある。(2)試料性状が良好でなく、追加精製を適用しなかった場合、搭載条件での結晶生成は認められても有用成果は低い。このため宇宙実験の有用性を高めるためには試料の均一性を如何に向上させるかが重要であることが分かった。

6. 結晶成長メカニズムに係る残された課題

以上のように、宇宙実験での X 線回折実験向け高品

質結晶の生成は、密度差対流の抑制により期待できる PDZ/IDZ 効果に由来し、その効果を促進することで、より良好な結晶の生成が期待できるとしたスキームで技術開発を進めてきた。しかし、実験事実が未だ不十分で、いわゆる研究という観点からは、検討すべき点が多々残されている。例えば以下のような点は今後の課題である

一点目は、IDZ の効果についてである。一般に試料の純度が高まると β が大きくなり、宇宙実験効果は促進される。塚本ら¹³⁾は、リゾチームの宇宙環境での成長過程を解析したところ、結晶表面の不純物濃度の減少に伴い β が上昇し、さらに不純物の取り込みが減少することを示している。したがって、2 項でモデル化したような結晶成長過程は、この点を考慮して検討する必要がある(あわせて 2 項のモデルは定常状態のモデルであるが、実際の結晶化は非定常過程であるので、それを考慮したモデルにする必要がある)。さらに β と不純物量との関係については、タンパク質結晶成長の場合に関しては、定量的な検討がなされていない。いくつかのタンパク質で実測のうえ、モデルと対比させることにより、宇宙実験で効果をより引き出すためには、元の試料に含まれる不純物濃度をある閾値以下にしなければならないといった事が明らかになるかもしれない。

二点目は、結晶成長時の過飽和度や取り込み不純物量と結晶の品質についての相関である。この問題については多くの研究者がすでに取り組んでいるが、宇宙実験で実現されるような、低過飽和度、低不純物環境での生成結晶についての解析は是非進める必要がある。

三点目は、García-Ruiz らが提唱する、アガロースで高粘度化した結晶化溶液による疑似微小重力環境との優劣である。われわれは、いくつかのタンパク質についてアガロース添加での結晶化を試みたが、結晶生成でなくなるケースがかなりあることを経験している。さらに、アガロースの添加は一種の不純物であることから、 β を低下させ、PDZ/IDZ 形成を抑制するのではないかと予想しているが、まだ実験的には検討していない。もしこの点を実験的に確かめられれば、宇宙実験は現時点では、タンパク質結晶成長環境として最良のものであることを実証できると考えている。

四点目は、微小重力効果の予測、促進についてである。これらは一定の成果を収めつつあるが、予測精度を高める更なる工夫は必要である。また、PEG 系試薬では結晶生成が困難な試料も依然として存在するため、宇宙実験の汎用性を高めるためにも、このような試料に対する最適な方法の考案も必要である。

7. まとめ

NASDA-GCF から始まった JAXA PCG では、従来の NASA/ESA 等の宇宙実験とは異なり、微小重力の効果を積極的に高めるような結晶化条件を、数値解析に基づいて検討し、高品質結晶の生成を目指してきた。様々な課題はあるものの、これらの技術が確立し、適用可能対象の試料広がることにより、宇宙実験は、間違いなく

実用 X 線構造解析に実質的に貢献すると見込まれる。

参考文献

- 1) McPherson, A. *Crystallization of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1999).
- 2) Littke, W., and John, C.; Protein single crystal growth under microgravity, *J. Cryst. Growth*, 76, pp663 (1986).
- 3) <http://www.nap.edu/books/0309069750/html>
- 4) Chayen N.E. and Helliwell, J.R.; Space-grown crystals may prove their worth, *Nature*, 398, pp20 (1999).
- 5) Otálora, F., Novella, M. L., Gavira, J. A., Thomas, B. R. and García-Ruiz, J. M.; Experimental evidence for the stability of the depletion zone around a growing protein crystal under microgravity, *Acta Cryst. D57*, pp412 (2001).
- 6) Thomas, B.R. and Chernov, A.A.; Acetylated lysozyme as impurity in lysozyme crystals: constant distribution coefficient, *J. Cryst. Growth*, 232, pp237 (2001).
- 7) Vekilov, P.G., Lin, H. and Rosenberger, F.; Unsteady crystal growth due to step-bunch cascading. *Phys. Rev.*, E55, pp3202 (1997).
- 8) García-Ruiz, J.M., Novella, M.L., Moreno, R. and Gavira, J.A.; Agarose as crystallization media for proteins I: Transport processes, *J. Cryst. Growth* 232, pp165 (2001).
- 9) Tanaka, H., Inaka, K., Sugiyama, S., Takahashi, S., Sano, S., Sato, M. and Yoshitomi, S.; Numerical Analysis of the Depletion Zone Formation Around a Growing Protein Crystal, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1027, pp10 (2004).
- 10) Yamanaka, M., Inaka, K., Furubayashi, N., Matsushima, M., Takahashi, S., Tanaka, H., Sano, S., Sato, M., Kobayashi, T. and Tanaka, T.; Optimization of salt concentration in PEG-based crystallization solutions, *J. Synchrotron Rad.*, 18, pp84 (2011).
- 11) Takahashi, S., Tsurumura, T., Aritake, K., Furubayashi, N., Sato, M., Yamanaka, M., Hirota, E., Sano, S., Kobayashi, T., Tanaka, T., Inaka, K., Tanaka, H. and Urade, Y.; High-quality crystals of human haematopoietic prostaglandin D synthase with novel inhibitors, *Acta Cryst.*, F66, pp846 (2010).
- 12) Inaka, K., Takahashi, S., Aritake, K., Tsurumura, T., Furubayashi, N., Yan, B., Hirota, E., Sano, S., Sato, M., Kobayashi, T., Yoshimura, Y., Tanaka, H., and Urade, Y.; High-Quality Protein Crystal Growth of Mouse Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in Microgravity, *Cryst. Growth Des.* 11, pp2107 (2011)
- 13) 塚本勝男、佐崎元、小島謙一、橘勝、吉崎泉; フォトン M3 衛星を使ったタンパク質結晶成長速度測定, *Space Utiliz Res.* 25, pp205 (2009).