液体-液体界面における蛋白質の2次元結晶化

青山 一 弘

新技術事業団 外村位相情報プロジェクト ㊟350-03 埼玉県比企郡鳩山町赤沼 2520 日立基礎研究所内

(1991年10月28日受理)

Two-Dimensional Crystallization of Proteins
at a Liquid-Liquid Interface

Kazuhiro AOYAMA

Electron Wavefront Project ERATO JRDC c/o Advanced Research
Laboratory HITACHI LTD
Hatoyama, Saitama 350-03

(Received October 28, 1991)

水面膜に蛋白質分子を吸着させ結晶化したとき、その結晶性は膜の性質に大きく依存する。理想的な水面膜の条件は、均一であること、膜自体が柔らかく2次元方向の運動が自由であること、蛋白質を吸着する力が強いこと、蛋白質を変性させないことの4点である。単分子膜は、膜厚の薄さにおいて理想的であるが、以上の条件をすべて満足するような成膜物質は発見されていない。このような単分子膜は、電荷をもった2次元の液体と見ることができ、それを薄い3次元の液体層で代用することも可能であることが明らかになった。このとき、つぎの二つの点で不利である。第一に、膜厚を薄く制御することが困難であるために、電子顕微鏡観察時にノイズレベルが高くなってしまうこと。第二に、界面へ吸着する分子が界面にとどまらず有機液層にまで混入するおそれがあることである。反対に単分子膜を作製するのに比べて格段に簡易な方法で均一な膜ができるという利点もある。電荷をもった有機液体としては、デヒドロアビエチルアミンを用いた。これを蛋白質溶液上に薄く展開すると、溶液中の蛋白質分子はアミノ基の正電荷に吸着され水との界面に2次元結晶を形成する。得られた2次元結晶は単分子膜を用いたときに比べて、結晶の大きさにおいても結晶性においても優れていることが確認された。

1. はじめに

電子顕微鏡で生体高分子の高分解能構造解析を行うとき、最大の問題は電子線による試料の損傷である。分解能は試料を破壊せずに照射できる電子線の量によって決定されてしまうので、高分解能解析のためには試料損傷を桁違いに軽減する必要がある。それには生体高分子の2次元結晶化は必要不可欠な技術である。ほかに適当な方法はない。

蛋白質を2次元結晶化するためには、まず分子の動きを2次元に制限する必要があるが、それは、蛋白質溶液(液層)とそれに接する他の層(気層、液層、固層のどれでもよい)との界面に蛋白質分子を吸着させることで達成される。その後、吸着した分子が再配列すれば2次元結晶が得られる。1983年 Kornberg らは、水面上に作製

した脂質単分子膜(ラングミュア膜)に蛋白質分子を抗原-抗体結合によって特異的に吸着させることによって、“気体-液体”界面での2次元結晶作製に成功している¹⁾。2次元結晶作製法をさらに一般化するためには、非特異的な結合によって分子を吸着することが望ましいが、Kornberg らは 1988 年には単分子膜上の正電荷に蛋白質分子を吸着させ、それを2次元結晶化することにも成功した²⁾。このように水面上の単分子膜に蛋白質分子を吸着させ、2次元結晶化させることはすでになされており、現在のところ主流となっているが、われわれは単分子膜の代わりに、水面上に展開した有機液体の薄層を用いての2次元結晶の作製に成功した。蛋白質分子は水層と有機層からなる液-液界面に吸着し、そこで2次元結晶を形成する。現在、デヒドロアビエチルアミンを有機層に用いて、フェリチン、カタラーゼ、サザンビンモ

ザイクウィルス (SBMV), 高度好熱菌の 50 S リボソームの4種類の蛋白質または核酸蛋白複合体について2次元結晶化に成功している。この方法は簡便で特別な装置を要求しないという特徴をもつ。また, まったく同様な系を用いて複数のサンプルについて結晶化に成功したということは, この方法がさらに一般的な2次元結晶作製法として発展する可能性があることを示している。

2. 2次元結晶化の条件

水面膜に蛋白質分子を吸着させ結晶化したとき, その結晶性は膜の性質に大きく依存することがこれまでの実験から明らかになっている。理想的な水面膜の条件はつぎの4点である。

- 1) 均一であること。
- 2) 膜自体が柔らかく2次元方向の運動が自由であること。
- 3) 蛋白質を吸着する力が強いこと。
- 4) 蛋白質を変性させないこと。

大きな2次元結晶を作るためには膜が均一である必要があるし, 結晶性を上げるためには, 吸着された分子が面内において自由に運動できることが望ましい。そのために膜自体の流動性を確保する必要がある。また, 非特異的に水面膜上の電荷によって蛋白質分子を吸着するためには, 第三の条件は「強い有効電荷をもつこと」と書き換えられる(ここで「有効電荷」としたが電荷の有効性については後で述べる)。もちろん蛋白質を変性させることは論外である。

しかし, 残念なことに単一の成膜分子からなる単分子膜において, これらの条件をすべて満足するような成膜物質を発見することはできなかった。そのため, 化学的もしくは生化学的な合成によって, 成膜物質を開発することも試みたが成功しなかった。Kornberg らは, フォスファチジルコリンとステアリアルアミン(混合比 9:1 w/w)の二種類の成膜物質からなる混合膜を用いて, RNA ポリメラーゼのホロ酵素の2次元結晶を作製した。フォスファチジルコリンは膜の流動性を保持し, ステアリアルアミンは正電荷によって蛋白質を吸着させることができる。しかし混合膜を用いた場合, 膜の均一性において不利であることは明らかである。われわれの実験では, 残念ながら混合膜を用いた系においては, Kornberg らのようなクオリティーの高い2次元結晶は得られていない。

すべての条件を満たすような単分子膜は, 電荷をもった2次元の液体であるといえる。2次元結晶を作製するうえで, 蛋白質を吸着させる水面膜は2次元の液体状態であることが理想的ではあるが, 近似的には薄い3次元

図1 デヒドロアビエチルアミンの構造式
液体有機物である DHAA はアミノ基の電荷によって蛋白質分子を吸着する。

の液体層をその代用とすることも可能であると考えられる。実際にわれわれは, 液体-液体界面における生体高分子の2次元結晶化に成功した。薄い3次元液体層を2次元液体の代わりに用いたとき, つぎの二つの点で不利である。第一に, たとえ表面エネルギーの小さい液体を使ったとしても, 膜厚を2次元液体(厚さ約 3~4 nm)よりも薄く制御することは困難であるために, 電子顕微鏡観察時にノイズレベルが高くなってしまうこと。第二に, 界面がある程度幅をもったルーズなものになりやすいことである。そのために2次元結晶と共に薄い板状の3次元結晶ができることもある。反対に単分子膜を作製するのに比べて, 格段に簡易な方法で比較的広い範囲で均一な膜ができるという利点もある。LB 膜は一般に考えられているほど均一な膜ではない³⁾。

水面膜を作製するための電荷をもった有機液体としては, デヒドロアビエチルアミン ($C_{20}H_{31}N$; 以下 DHAA と略す)を用いた(図1)。これは室温において非常に粘性の高い液体であり, ヘキサン溶液として蛋白質溶液上に展開する。溶液中の蛋白質分子は, DHAA 分子中のアミノ基のもつ正電荷に吸着され, 再配列して水との界面に2次元結晶を形成する。また, DHAA は吸着した生体高分子に対して非常に穏やかな物質であり, 変性を誘起するようなことはなかった。吉村らの水銀表面上を用いる結晶化法⁴⁾も, 基本的な思想は本法と同一であると思われるが, DHAA を用いた場合と比較して蛋白質分子はきびしい環境におかれることになる。しかしそれと引き替えに, 大きな結晶化のドライビングフォースが得られるために, 結晶化の速度が格段に早く, また結晶性も上がりやすいようである。

3. 実験

本法において結晶化に用いる蛋白質溶液の濃度は, 10^{14} 個/ml 程度で十分であった。蛋白質分子の DHAA に対する親和性が高い場合にはさらにうすくてもよいと思われる。蛋白質の種類, 緩衝液の pH, 塩濃度, 結晶化の温度, 吸着に用いる膜の種類などによって蛋白質分子の膜への吸着されやすさは変わるので, 溶液中の蛋白

質濃度はあまり重要ではない。重要なのは2次元の面内での蛋白質分子濃度である。一方、蛋白質溶液の純度は非常に大切である。変性した分子があると、界面に吸着するときにその分子が優先されるおそれがある。また蛋白質分子の運動が2次元に制限されるので、3次元の結晶を形成する場合と比較して、変性した分子を結晶中から追い出すことが難しいと思われる。つまり、条件によっては変性した分子が2次元の面内に濃縮される可能性がある。

用いる緩衝液は、蛋白質分子が最も安定に存在できるpHに設定することが望ましい。通常は等電点付近を選ぶ。本法での2次元結晶化には時間がかかることが多いので、その間蛋白質分子を変性させないことが最も重要である。そのため、結晶化条件を探すときpHを動かす余地は少ない。グリセロールなどの蛋白質安定化剤は、結晶化すること自体には有害であると思われるが、蛋白質が要求するものであれば入れる必要があった。緩衝液には通常0.1~0.2 MのNaClを加えているが、塩濃度はつぎの二つの点である程度必要であると思われる。第一に蛋白質分子を安定化することが多いこと。第二に、塩には蛋白質分子自体の電荷をシールドする効果があるため、分子分子間の相互作用が小さくなり、2次元結晶が大きくなりやすいことである。2次元結晶の場合、分子間の相互作用が大きすぎると再配列が円滑にできず結晶が大きく成長できないようである。

極微量の試料での構造解析が可能であることが、電子顕微鏡の大きな利点の一つであるので、2次元結晶作製の実験はなるべく少量の蛋白質で行いたい。われわれの用いている2次元結晶作製用トラフは、直径4mm、深さ1mmのテフロン製である(図2)。このテフロントラフを注意深くきれいに洗い、緩衝液を入れた密閉容器中に置く。実験系の湿度をコントロールするために、容器は必ず密閉できなければならない。また外液となる緩衝液は蛋白質溶液よりも若干塩濃度を低くした。これは結

図2 2次元結晶作製用トラフ
直径4mm、深さ1mmの穴がいくつか開けてあり、複数のサンプルを同時に作るができる。

晶化中に試料溶液の量が増減しないように蒸気圧を調節するためである。トラフに蛋白質溶液を張り、その溶液上にDHAAの1mg/mlヘキサン溶液を、有機液層の平均の厚さで100~150nm程度とわりと厚めになるように計算して展開する。容器を密閉して静置し数日間から数週間インキュベートし結晶を成長させた後、水平付着法によってカーボン膜上に2次元結晶を写し取り、ネガティブ染色によって電顕サンプルとした。

4. 結 果

4.1 フェリチン

DHAAを用いて作製した2次元結晶の例として、フェリチンの2次元結晶を示す(図3)。比較としてアラキシン酸単分子膜に吸着させたフェリチン、ステアリン酸単分子膜に吸着させたフェリチン、コレステロール混合単分子膜に吸着させたフェリチン

(a) 高倍率像

(b) 低倍率像

図3 DHAAを用いて作製したフェリチンの2次元結晶

DHAAは蛋白質分子を吸着する電荷と高い流動性を合わせもつ。そのため2次元結晶作製のための水面膜として理想的である。(a)は(b)の四角く囲った部分の拡大像である。

ンの2次元膜を示す (図 4, 5)。単分子膜に蛋白質分子を吸着させて2次元結晶化させる場合は、あらかじめ水面上に単分子膜を作製しておき、その後水槽の溶液 (通常は純水) を蛋白質溶液に置換するか、または単分子膜を蛋白質溶液上に移動させるという方法をとった。

アラキシン酸単分子膜を用いて2次元結晶の作製を行っ

図 4 アラキシン酸単分子膜に吸着したフェリチンの2次元膜

アラキシン酸のもつ負電荷によってフェリチンは単分子膜に吸着されるが、アラキシン酸単分子膜には流動性があまりないために、吸着した蛋白質分子は再配列ができない。

図 5 ステアリルアミン、コレステロール混合単分子膜を用いて作製したフェリチンの2次元微結晶

ステアリルアミン+コレステロール (1:4) 単分子膜に吸着されたフェリチンの電子顕微鏡像。コレステロールには硬い膜に流動性をもたせる作用があるため、ステアリルアミンの正電荷によって吸着されたフェリチン分子は2次元の微結晶をつくる。しかし、コレステロールには分子を吸着させる電荷がないため、この混合膜ではこれ以上大きな2次元結晶を得ることはできなかった。

た場合、アラキシン酸のもつ負電荷によってフェリチンは単分子膜に吸着はされたが、この膜には流動性があまりないために、吸着した蛋白質分子は再配列ができず2次元結晶とはならない。直鎖脂肪酸を用いても注意深く単分子膜を作製すれば2次元結晶を作製できることが報告されているが⁹⁾、結晶性、結晶の大きさとも DHAA を用いたもののほうが優れている。直鎖脂肪酸単分子膜にコレステロールを混合すると、硬い膜に流動性をもたせることができるため、吸着したフェリチン分子は2次元の微結晶をつくった。しかし、コレステロールには蛋白質分子を吸着させる電荷がないため、この混合膜ではこれ以上大きな2次元結晶を得ることはできなかった。蛋白質の2次元結晶の形状は、吸着している混合単分子膜のモザイク構造に由来するものである。このことはコレステロール+ステアリルアミン単分子膜の暗視野電子顕微鏡像より明らかである (図 6)。

水面上の DHAA の薄層は、蛋白質を吸着する正電荷と、吸着した分子を面内で拡散、再配列させるための高

図 6 ステアリルアミン、コレステロール混合単分子膜の暗視野電子顕微鏡像

ステアリルアミンとコレステロールは均一には混じりあわずそれぞれがドメインを作るため、混合膜は不均一なモザイク構造になる。暗視野法では、回折を起こす結晶性の部分のコントラストが高くなるので、白く光っている部分がステアリルアミンのドメインである。

(a)

(b)

図 7 DHAA を用いて作製したカタラーゼの 2 次元結晶とそのデジタル画像処理像

DHAA に吸着させて作製したカタラーゼの 2 次元結晶と、それから得られた電子密度分布。カタラーゼは等価なサブユニット 4 個からなる平面四量体である。このような分子では、分子が界面に吸着する面のちがいによって二種類の 2 次元結晶が考えられるが(b)、この 2 次元結晶は分子が縦方向をむいたタイプである。電子密度分布から、カラム内の隣あった分子は多少ずれて重なりあっていることがわかる。

い流動性を単一の物質で合わせもっている理想的な水面膜である。そのため、単分子膜に吸着させて作った 2 次元結晶のどれよりも結晶性がよく、かつ大きい。

4.2 カタラーゼ

DHAA に吸着させて作製したカタラーゼの 2 次元結

晶とそれから得られた電子密度分布を示す(図 7)。カタラーゼは等価なサブユニット 4 個からなる平面四量体である。このような分子では分子が界面に吸着する面のちがいによって二種類の 2 次元結晶が考えられるが、この 2 次元結晶は分子が縦方向をむいたタイプであることが

(a) 高倍率像

(b) 低倍率像

図 8 SBMV の2次元結晶

SBMV (キャップシット) は非常に高い対象性を持ち結晶性がよいので、他のサンプルに比べて大きくクオリティーの高い2次元結晶が得られた。

わかる。分子の側面で吸着したカタラーゼは、まず1次元に伸びてカラムを作り、それが集まって2次元結晶を形成する。電子密度分布から、カラム内の隣あった分子は、一枚おきに多少ずれて重なりあっていることがわかる。染色のため分解能が高くないので、このずれが回転によるのか平行移動によるものなのかの区別は難しい。

4.3 SBMV

SBMV は同様な系での2次元結晶化を行ったところ、フェリチン、カタラーゼに比べて一段と大きく結晶性も高い2次元結晶を形成した(図8)。これはSBMV分子自体の(キャップシットの)結晶性の高さに依存したものである。電子線回折像は約3nmまで得られているが、これはネガティブ染色による制限を受けたものである可能性があり、結晶自体の結晶性はさらに高いかもし

れない。なお、この結晶の傾斜像撮影および3次元再構成は行っていない。

SBMVのキャップシットは二十面体の対称性をもっているが、その中にあるウイルス遺伝子RNAには対称性はない。SBMV 2次元結晶はキャップシット対称性によって結晶化していると思われるので、今後氷包埋法などを用いて高分解能での3次元再構成を試みても、残念ながらRNAの構造は平均化してしまい見ることができない可能性が高い。X線結晶解析においてもキャップシットの構造はすでに解かれているが⁶⁾、RNAの構造は見えていない。

4.4 リボソーム

DHAAを用いて高度好熱菌(thermus thermophilus HB 27)の50Sリボソームの2次元結晶作製にも成功し

(a) 2次元結晶像

(b) 立体再構成像

図 9 高度好熱菌 50S リボソームの2次元結晶

リボソームは複雑で壊れやすい分子であるが、DHAA の特質の一つである“生体高分子に対する穏やかさ”のために2次元結晶化が可能となった。

た(図9)。周知のごとくリボソームは核酸と蛋白質の複雑な複合体であり非常に壊れやすい。結晶を成長させるためには、4~30℃ の温度で6日から3週間の時間を要したが、ここで本法の利点の一つである「生体高分子を変性させない」という特徴が大きな意味をもっている。

室温で6日以上インキュベートした場合に微細な結晶が得られたが、その構成粒子は結晶化していない粒子と比べて一般に小さかった。そこで、この結晶が50S リボソームの結晶であることを確認するために、EELS によるスペクトル分析を行った。その結果、結晶、非結晶部位ともにリン原子の存在が確認された。よってこの結晶は確実に核酸を含む分子から構成されており、一部構成ユニットが外れているという可能性はあるが、間違いなく50S リボソームの結晶であると思われる。この結晶の光変換像からは、2.7 nm 分解能に対応する回折点の確認できた。このことより、この結晶はサイズは大きくないが結晶性は割合によいことがわかる。結晶性の高さと結晶の大きさは比例すること多いが、本来別の問題である。

立体構造解析の結果から、50S リボソーム分子には中央部を貫通する穴が確認され、合成ポリペプチド鎖の通路と考えられている。Yonath と Wittmann⁷⁾らは、3次元結晶作製法と同様な方法で作製された2次元結晶を用いて、3 nm 分解能で50S リボソームの構造解析を行っ

ており、50S 分子を貫通する穴についても報告している。われわれの結晶は彼らのものと異なり、穴がC軸と平行な向きにあるためより詳細に解析ができた。この結晶の像から立体再構成した3次元像を共に示す。

5. 考 察

蛋白質を吸着する電荷については、目的となる蛋白質の等電点、用いる緩衝液の pH によって正または負の選択をすればよいが、構造上電荷をもつものであっても蛋白質を吸着しないこともあるので、成膜物質の選択には注意を要する。たとえばフォスファチジルイノシトール単分子膜では、負の電荷をもつにもかかわらず蛋白質分子を吸着することができなかった。おそらく、リン酸の負電荷の先に大きな親水基であるイノシトールがあるために電荷がシールドされるためか、または一つの負電荷が大きく非極在して薄まってしまうためであるとおもわれる。また膜に窒素原子によって正電荷をもたせる場合、それは一級アミンつまりアミノ基の形でなければならない。理由は明らかではないが、アンモニウム塩のような高級アミンには蛋白質分子を吸着する力がなかった。

2次元結晶化のための有機液層として、現在 DHAA 以外の物質は見つかっていないので、負電荷をもった有機液層を作ることができない。新たな物質を探す場合、水に対する溶解度が極端に小さいということが重要な条

件であると思われる。有機物がわずかでも水層にとけ込むと、蛋白質分子の周りに吸着し結晶化の妨げになる。また蛋白質を変性させるおそれもあるため好ましくない。

本法によって作る2次元結晶は、大きく見ると非常に不均一であることが多いが(図3(b)), これはDHAAが非常に粘性の高い液体であるために、水面上に展開したときに均一に広がりにくいことを反映するものであると思われる。しかし、正電荷で蛋白質分子を吸着する力を持ち、粘性が低い別の有機液体も実験を試みたが、それは蛋白質分子を2次元結晶化させることはできなかった。またデカンなどを用いて疎水相互作用で蛋白質を吸着できることもあるが、結晶化には成功していない。

有機物は、水に対する溶解度を下げるために分子量を大きくすると一般に粘性も高くなるので、水面上に均一に広がり、かつ水に対する溶解度がほとんどゼロであるような、理想的な電荷をもった有機液体を探すことはなかなか難しいことである。

6. ま と め

DHAAを有機層に用いてフェリチン、カタラーゼ、SBMV、50Sリボソームの4種類の蛋白質について2次元結晶化に成功した。一つの物質を吸着層として、これはほとんどシンプルな系で複数のサンプルについて結晶化に成功したという例はあまりない。現在までのところ、吸着した蛋白質分子に質の良い2次元結晶を作らせる有機層は正電荷をもつDHAAのみしか発見されていないので、正電荷に吸着しない蛋白質の2次元結晶化には成功していない。負電荷をもつ有機液体での2次元結晶化に

成功すれば、有機層-水層の液体-液体界面での2次元結晶化は、さらに一般的な2次元結晶作製法として発展すると思われる。DHAAと同様な分子骨格に負電荷をもった物質が有機合成で得られれば、よい2次元結晶を得ることができる可能性は高い。

なお、50Sリボソームの2次元結晶化は、筆者と共同研究者である岩手大学農学部 小川和重博士によるものである。小川博士はそのほかにも本研究に数多くの貢献をなされている。EELSによる分析は京大化研 倉田博基博士にご協力によるものである。構造解析を行うにあたっては、新技術事業団永山プロジェクトの吉村英恭、猿渡茂両博士にご協力をいただいた。また、本研究の全体にわたって蛋白工学研究所 藤吉好則博士にご指導いただいている。

文 献

- 1) E. E. Uzgiris and R. D. Kornberg : *Nature (London)* **301**, 125 (1983).
- 2) S. A. Darst, H. O. Ribi, D. W. Pierce and R. D. Kornberg : *J. Mol. Biol.* **203**, 269 (1988).
- 3) N. Uyeda, T. Takenaka, K. Aoyama, M. Matsumoto and Y. Fujiyoshi : *Nature* **327**, 319 (1987).
- 4) H. Yoshimura, M. Matsumoto, S. Endo and K. Nagayama : *Ultramicroscopy* **32**, 265 (1990).
- 5) P. Fromhelts : *Nature* **231**, 267 (1971).
- 6) C. Abad-Zapatero, S. S. Abdel-Meguid, J. E. Johnson, A. G. W. Leslie, I. Rayment, M. G. Rossmann, D. Suck and T. Tsukihara : *Nature* **286**, 33 (1980).
- 7) Z. Berkovitch-Yellin, H. G. Wittmann, A. Yonath : *Acta Cryst* **B 46**, 637 (1990).