水銀表面上での蛋白質の2次元結晶化

吉村英恭

新技術事業団永山たん白集積プロジェクト 300-26 つくば市東光台 5-9-4

(1991年11月11日受理)

Crystallization of Proteins on Mercury Surface

Hideyuki YOSHIMURA

NAGAYAMA Protein Array Project, ERATO, JRDC
5-9-4 Tokodai, Tsukuba Research Consortium Tsukuba, 300-26

(Received November 11, 1991)

清浄な水銀表面の平坦さと大きな表面張力を利用して蛋白質の2次元結晶を作る方法を紹介する。蛋白質は高純度酸素ガスと水銀との界面に結晶化させる。水銀-酸素ガスの界面は親水性が高く、特に水溶性蛋白質を配向させ2次元結晶を作る基板として都合がよい。この方法によれば、少量の試料で短時間に2次元結晶を作ることができる。ここではフェリチンとシャペロニンの例を中心に、結晶化法を紹介する。

1. はじめに

X線構造解析に使われる蛋白質の3次元結晶は、溶液の蛋白質の溶解度を低下させることにより自然に形成される。しかし、2次元結晶を形成させるには形状的、または構造的な制限を加えて結晶成長を2次元に抑える必要がある。蛋白質自身が構造的な制限をもっている例として膜蛋白質がある。膜蛋白質は存在が生体膜(脂質2重膜)中に限られるので、脂質2重膜の板状構造やリポソームを作ることにより、膜中で2次元結晶化する例がある¹⁻¹¹⁾。しかし、水溶性蛋白質の場合は、人工的な結晶成長基板を作ってやる必要がある。水と空気界面に作った脂質の単分子膜は2次元結晶を作る基板としてしばしば使われる。単分子膜に蛋白質を吸着または結合させ脂質の流動性を利用して結晶化する方法で、水溶性蛋白質の2次元結晶を得る方法として最も一般的となっている¹²⁻²⁶⁾。この方法は簡単な装置(直径5mmぐらいのテフロン製の水槽)があれば結晶化実験できるが、脂質を目的の蛋白質に合わせて選ばなければいけないので、化学的知識と経験が必要である。脂質単分子膜の代わりにポリペプチドや有機液体を使う方法が開発されているが、本特集の他の解説を参照されたい。基板にはマイカ

板や金属などの固体表面も利用される。この場合、空气中で清浄な平面を作ることが難しいこと、吸着、結晶過程を制御することが困難なことなどから、再現性に難があるようである²⁷⁻³²⁾。

水銀はよく知られているように、常温で液体であるので、清浄な雰囲気中で表面を吸引することにより汚れを除くことができる。したがって、原子レベルで平らな面を比較的容易に作ることができる。また、表面張力が非常に大きい(485 mN/m, 20°C)のでほとんどの液体を表面に展開できる性質がある^{33,40)}。これらの特長を使えば水銀面を基板として、表面に蛋白質の単分子膜を形成させ、2次元結晶を作ることができる³⁴⁻³⁷⁾。ここでは水銀表面を使った蛋白質の2次元結晶化法を紹介する。

2. 水銀を使った蛋白質の2次元結晶化

2.1 概要

水銀は大きな表面張力をもっているので多くの液体を展開できる反面、大気中のあらゆる分子を吸着して表面が汚染されやすく、また、その蒸気は人体に有害であるので水銀槽は空气中に開放できない。したがって、水銀槽はステンレス製のチャンパー中に入れ、外気にふれることのない構造になっている(図1)。チャンパーの中の

図 1 2次元結晶化装置

A: 装置全体の写真，中央にあるのがステンレス製のチャンバー(a)。膜厚を測るためのエリプソメータ(b)や表面張力を測るための電子天秤(c)がのっている。電子天秤にアマルガム化した白金板を釣り下げ水銀につけて表面張力を測る。装置全体は除振台の上にのせてある。

B: ステンレスチャンバーの内部。円形の水銀槽(d) (直径 27 cm) が見える。時計の針状のもの(e)が仕切棒で，水銀の表面を清浄化した後，溶液を展開する面積を調整する際に使用する。

雰囲気は，水銀が汚染されることのないように，高純度(99.99%以上)のガスを使用する。圧力は大気圧より多少高くして(10^4 Pa)，外部から空気が混入しないようになっている。水銀表面の汚れは，真空ポンプにつないだテフロン製のキャピラリーで吸引することにより除く。表面の清浄度の評価は，表面張力および複素屈折率($N = n - ik$)を測定することにより行う。表面張力はアマルガム化した白金板を使いウィルヘルミー法で測定する(図 1. A. c)⁴⁰⁾。複素屈折率の測定はエリプソメーターで行う(図 1. A. b)^{38, 40~43)}。また，水銀面上に形成した膜の厚さもエリプソメーターにより 0.2 nm の精度で測定することができる。装置の基本的な設計は，油溶性の炭化水素化合物の界面化学的な実験を行った Smith^{40, 41)}のものを参考にしたが，ガスの制御系(減圧，加湿装置および配管)をすべてステンレス製にすることや，ガスの純度の高いものを使うなど水銀の汚染に対する対策に注意している。

2.2 結晶化の手順

1) 真空(10^{-4} Pa)に排気したチャンパー内水銀槽(図 1. B. d)に水銀を満たす。

水銀は純度の高いもの(99.99%)を希硝酸で洗った後⁴⁵⁾，減圧蒸留して使用する。水銀槽に入れた水銀は 1~2 週間の実験期間中補給しながら繰返し使用する。

2) 純酸素ガスを 10^4 Pa になるように満たす。

窒素やヘリウムのような不活性ガスでは水溶性蛋白質溶液は十分よく広がらず，単分子膜にならない。なぜ酸素ガスがあると均一に広がるかわかっていないが，水銀表面の一部が酸化されたためか，もしくは酸素が吸着して表面が親水的になるからだろうと考えている³⁹⁾。空気中でもある程度広がるが，汚染と湿度のためにきれいな結晶にならない。酸素以外に不活性ガスが入っていても結晶化にあまり影響がないと考えている。湿度が高くなった場合は，非晶質の単分子膜を形成する。このことは，水の蒸発過程と結晶化が深く関係していることを示唆している。

3) 水銀面をきれいにする。

仕切り板(図 1. B. e)を使って水銀表面の汚れを集め，真空ポンプにつないだテフロンキャピラリーで汚れた表面を吸引する。清浄な水銀の表面張力は，20℃で 485 ± 5 mN/m になる。また，複素屈折率は $n = 2.10 \pm 0.05$ ， $k = 5.44 \pm 0.05$ (632.8 nm, 20℃) となる。汚れがある場合は表面張力， n ， k とも，値が上記より小さくなる。酸素雰囲気中での水銀の表面張力や複素屈折率は不活性ガス中と変わらないので，表面をおおうような酸化膜はできていないと考えている。

4) 仕切り板を使って水銀の表面積を適当に調整する。

通常 430 cm^2 となるようにしている。蛋白質を展開した後で仕切板を使って膜を押しても蛋白質の膜は固体的なため，仕切板の近傍で膜が壊れるだけで蛋白質の密度はあがらない。

5) 蛋白質溶液を水銀表面上に展開する。

蛋白質の総量は展開する面積に対して単分子膜を形成したときに最密充填となるぐらいの量にする。蛋白濃度を高くして展開する容量を少なくしたほうが大きな単結晶が得られるので，10 mg/ml 以上の濃度のものを 2~5 μl 使用する。マイクロディスペンサーを使って水銀面上に溶液を展開すると溶液は 1~2 秒で水銀表面全体に広がり，蛋白質の単分子膜を形成する。水溶性蛋白質の大きな 2次元結晶を作る条件は，1 価の塩(NaCl など)が 0.1~0.2 M 含まれていること，蛋白質の純度が高いこと，蛋白質の濃度が高く展開する液量が少ないことがあげられる。水溶液の水は，ほとんどが(分子に結合して

いるものを除いて) 蒸発してしまうので変性防止にグルコースなどの糖類, またはグリセロールなどのポリオール類をいれなければいけない。また, 前に述べたようにチャンバー内の湿度は低いほうが好ましく, 雰囲気の水蒸気を含まない条件で展開したほうが大きな結晶が得られる。

6) 蛋白質の転写

展開したあと約2分後に, グロー放電で親水化したカーボン膜を張った電子顕微鏡用グリッド(400メッシュ)に転写する。転写は水平付着法(グリッドを水銀面に平行に上から押しつける)により行う。必要であれば転写した蛋白質の膜を, 酢酸ウラニル(1~2%)または燐タングステン酸(2%)で負染色する。

7) 繰返し蛋白質溶液を展開する場合は3)に戻る。一週間程度繰返して使用していると表面を吸引しても

きれいにならなくなる。この場合はチャンバーをあけて水銀槽を掃除した後, 1) から繰返す。

この一連の操作で一番時間のかかるのは表面をきれいにする過程3)で, 水銀面の汚れがひどい場合30分ほどかかる。4)~6)は5分ほどで完了する。

3. 結晶化の例

3.1 フェリチンの結晶

上記の手順にしたがって作られた馬脾臓のフェリチン2次元結晶の透過型電子顕微鏡(電顕)像を図2, 3に示す。フェリチンは分子量18,500のサブユニット24個からなる鉄の貯蔵蛋白質で, 中心に鉄のコアをもっており電顕で容易に分子を観察できる。フェリチン結晶は, 一辺が1ミクロン以上の6方格子($a=b=12.1\pm0.2\text{nm}$, $\gamma=120^\circ\pm2^\circ$)の単結晶を形成する。図2は低倍率で撮った電顕像である。蛋白質量が展開面積に比べて小さいとき図2.Aのような網目構造をとる。図2.Bは蛋白質量が適当で一様な単分子膜を形成した場合である。膜の部分は2次元結晶になっているが, 結晶軸が湾曲していたりドメイン構造をとったりで, 全面が単結晶にはなってい

図2 フェリチンの2次元結晶
酢酸ウラニル(1%, 2分)により負染色したフェリチン結晶の低倍率(3000倍)の電子顕微鏡像。
A: 蛋白質の総量が展開面積に比べて小さい場合, 網目構造を作る。網目(濃い部分)は2次元結晶となっている。約100mg/mlのフェリチン溶液2 μ l(0.15 M NaCl)を430cm²の水銀面に展開して作った。B: 蛋白質の総量より考えられる占有面積がほぼ展開面積となるように展開した場合。Aの網目の部分が太くなり, 矢印で示した穴の部分を残して2次元結晶となっている。160 mg/mlのフェリチン溶液2 μ l(0.15 M NaCl, 10% glucose)を430cm²の水銀面に展開して作った。

図3 フェリチンの2次元結晶
高倍(30,000倍)での電顕像。MDS(minimum dose system)を使い, 電子線照射量は2,000 e/nm²以下で撮影。右上は計算による回折パターン。S/Nが2以上の回折点をとると分解能は1.8 nmとなる。

図 4 フェリチンの構造

A : X線構造解析により得られた構造⁴⁴⁾。上部に示した軸が3回対称軸である。**B** : **A** の3回対称軸より投影したサブユニット構造。**C** : 2次元結晶より得られた構造 (分解能 1.8 nm)。

ない。高倍率での電顕像(図3)では、 $1\mu\text{m}^2$ 以上の単結晶を形成していることがわかる。この結晶を使って2.0 nmの分解能でフーリエ変換による画像処理を行った結果を図4. Cに示す。得られた2次元結晶はP3ml(3回対称と鏡面对称性)の対称性をもっていることがわかった。この対称性はX線構造解析により得られていた低分解能での構造⁴⁴⁾(図4. A)の3回対称軸方向からの投影と一致する。すなわち水銀面に垂直に3回対称軸を向けて結晶していると考えられる。X線により解かれた3回対称軸からの投影像は、図4. Aのサブユニット配列から考えて図4. Bのようになると予想される。これは2次元結晶から得られた構造(図4. C)とよく一致する。このことはフェリチンが大きな変性をうけていないことを示している。また、好熱菌の $\text{F}_1\text{-ATPase}$ も水銀法を使って結晶化しているが^{34, 35)}、水銀面から回収した蛋白質は活性を失わないことから、この方法で蛋白質が変性をうけないことを示している。

3.2 シャペロニンの結晶化

好熱菌(*Thermus thermophilus* HB 8)から単離した

図 5 シャペロニンの2次元結晶³⁷⁾

A : 図3と同じ条件で撮影した電子顕微鏡像。22.8 mg/ml のシャペロニン溶液 5 μl (0.1 M Na_2SO_4 , 5 mM MgCl_2 , 10 mM ATP, 7.3% glucose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を 430cm^2 の水銀面に展開して作った。右上は計算による回折パターン。S/Nが2以上の点をとると分解能は3.1 nmになる。**B** : フーリエ変換を使った画像処理により得られた再構成像 (分解能 3.1 nm)。

シャペロニンも図5. Aに示すように水銀面上で2次元結晶化することができる³⁷⁾。シャペロニンは、他の蛋白質の巻き戻りや集合過程を補助していると考えられている蛋白質である。図5. Bは3.1 nmの分解能で再構成したシャペロニンの投影図である。この結晶とは別に得られたシャペロニンの横方向からの電顕像から、7個のサブユニットが重なり合って2層のリング状構造を作っていると考えている³⁷⁾。水銀法で結晶化すると6方格子を形成する場合が多く、結晶化に成功した例は3回対称かそれに近い対称性をもった場合がほとんどである。シャペロニンはそれ以外の対称性で結晶化した数少ない例の一つである。しかし、結晶形は6方格子($a=b=12.2\pm 0.2\text{nm}$, $\gamma=120^\circ\pm 2^\circ$)となる。6方格子となるのは結晶化過程で最密充填構造をとろうとする力がかかるからだと思われている。

4. おわりに

水銀法は脂質などを含まない蛋白質だけの膜を作れる

点, 結晶化の過程に要する時間が短い点, 膜蛋白, 水溶性蛋白など, 蛋白質の種類を問わない点など優れているが, まだ研究が始まったばかりで解決しなければならない問題が多く残っている。たとえば, 良い2次元結晶を得るには高い蛋白質濃度が要求されること, また, 蛋白質の対称性が問題になることなどがある。湿度が結晶化の良否を左右することはふれたが, 水の蒸発過程が結晶化と関係していると思われるので, これをうまく制御することで濃度の問題を解決できるかもしれない。また, 対称性の問題は蛋白質の表面の性質を制御することなどで解決できるかもしれない。さらに結晶化の問題だけではなく, 2次元結晶の転写用の基板の問題もある。水銀の面は平らであるが転写用の基板はカーボン膜を使っているので平坦とはいえず, カーボン膜に替わる基板を探すか, 水銀面上で直接構造解析をする方法を開発しなければならない。

これらの問題の解決は決して簡単ではないが, 生化学から物理学まで総合的な攻略をすれば, 必ず突破口が開けると信じている。

文 献

- 1) S. B. Hayward and R. M. Stroud : J. Mol. Biol. **151**, 491 (1981).
- 2) A. Tsuboi, H. Engelhardt, U. Santarius, N. Tsukagoshi, S. Uda and W. Baumeister : J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. **102**, 178 (1989).
- 3) J. W. Austin, A. Engel, R. G. E. Murray and U. Aebi : J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. **102**, 255 (1989).
- 4) R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K. H. Downing : J. Mol. Biol. **213**, 899 (1990).
- 5) J. M. Valpuesta, R. Henderson and T. G. Frey : J. Mol. Biol. **214**, 237 (1990).
- 6) A. Olofsson, U. Kaveus, I. Hacksell, M. Thelestam and H. Herbert : J. Mol. Biol. **214**, 299 (1990).
- 7) A. N. Barnakov, V. V. Demin, A. P. Kuzin, A. A. Zargarov, A. S. Zolotarev and N. G. Abdulaev : FEBS Lett. **265**, 126 (1990).
- 8) D. L. Stokes and N. M. Green : J. Mol. Biol. **213**, 529 (1990).
- 9) D. N. Wang and W. Kuhlbrandt : J. Mol. Biol. **217**, 691 (1991).
- 10) B. K. Jap, P. J. Walian and K. Gehring : Nature **350**, 167 (1991).
- 11) T. Akiba, H. Yoshimura and K. Namba : Science **252**, 1544 (1991).
- 12) P. Fromherz : Nature **231**, 267 (1971).
- 13) P. Fromherz : Biochim. Biophys. Acta. **225**, 382 (1975).
- 14) P. Fromherz : Res. Sci. Instrum. **46**, 1380 (1975).
- 15) E. E. Uzgiris and R. D. Kornberg : Nature **301**, 125 (1983).
- 16) R. M. Weis, K. Balakrishnan, B. A. Smith and H. M. McConnell : J. Biol. Chem. **257**, 6440 (1982).
- 17) D. S. Ludwig, H. O. Ribi, G. K. Schoolnik and R. D. Kornberg : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**, 8585 (1986).
- 18) H. O. Ribi, P. Reichard and R. D. Kornberg : Biochemistry **26**, 7974 (1987).
- 19) R. A. Reed, J. Mattai and G. G. Shipley : Biochemistry **26**, 824 (1987).
- 20) H. O. Ribi, D. S. Ludwig, K. L. Mercer, G. K. Schoolnik and R. D. Kornberg : Science **239**, 1272 (1988).
- 21) J. P. Robinson, M. F. Schmid, D. G. Morgan and W. Chiu : J. Mol. Biol. **200**, 367 (1988).
- 22) R. Blankenburg, P. Meller, H. Ringsdorf and C. Salesse : Biochemistry **28**, 8214 (1989).
- 23) R. Newman, A. Tucker, C. Ferguson, D. Tsernoglou, K. Leonard and M. J. Crumpton : J. Mol. Biol. **206**, 213 (1989).
- 24) S. A. Darst, H. O. Ribi, D. W. Pierce and R. D. Kornberg : J. Mol. Biol. **203**, 269 (1988).
- 25) S. A. Darst, E. W. Kubalek and R. D. Kornberg : Nature **340**, 730 (1989).
- 26) S. A. Darst, E. W. Kubalek, A. M. Edwards and R. D. Kornberg : J. Mol. Biol. **221**, 347 (1991).
- 27) E. F. J. van Bruggen, J. F. L. van Breemen, W. Keegstra, E. J. Boekema and M. G. van Heel : J. Microscopy **141**, 11 (1986).
- 28) E. P. Gogol, U. Lucken, T. Bork and R. A. Capaldi : Biochemistry **28**, 4709 (1989).
- 29) Z. Cejka, A. G. Magaldi, G. Tognon, G. Zanotti and W. Baumeister : J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res. **102**, 71 (1989).
- 30) J. Vonck and E. F. J. van Bruggen : Biochim. Biophys. Acta **1038**, 74 (1990).
- 31) T. Gotoh and T. Suzuki : Zoological Sci. **7**, 1 (1990).
- 32) J. Brink, J. F. L. van Breemen, W. Keegstra and E. F. J. van Bruggen : Ultramicroscopy **27**, 79 (1989).
- 33) T. Smith : Adv. J. Coll. Interface Sci. **3**, 161 (1972).
- 34) H. Yoshimura, S. Endo, M. Matsumoto, K. Nagayama and Y. Kagawa : J. Biochem. **106**, 958 (1989).
- 35) H. Yoshimura, M. Matsumoto, S. Endo and K. Nagayama : Ultramicroscopy **32**, 265 (1990).
- 36) 吉村英恭, 猿渡 茂, 永山国昭, 松本睦郎 : 生物物理, **30**, 55 (1990).
- 37) N. Ishii, H. Taguchi, M. Yoshida, H. Yoshimura and K. Nagayama : J. Biochem. **110**, 905 (1991).

- 38) M. Matsumoto, H. Yoshimura, V. S. Kulkarni and K. Nagayama: Colloid and Polymer Sci. **268**, 1174 (1990).
- 39) V. S. Kulkarni, H. Yoshimura, K. Nagayama and M. Matsumoto: J. Colloid and Interface Sci. **144**, 586 (1990).
- 40) T. Smith: J. Coll. Interface Sci. **26**, 509 (1968).
- 41) T. Smith: Adv. Coll. Interface Sci. **3**, 161 (1972).
- 42) F. L. McCrackin, E. Passaglia, R. Stromberg and H. L. Steinberg: J. Res. Natl. Bur. Std. (USA), **67 A**, 363 (1963).
- 43) 木下是雄, 横田英嗣: 応用物理 **34**, 782 (1965).
- 44) S. H. Banyard, D. K. Stammers and P. M. Harrison: Nature **271**, 282 (1978).
- 45) 化学大辞典, 化学大辞典編集委員会編, 第5巻, p. 61, 共立出版 (1984).

Bookstand

分子間力と表面力

J. N. Israelachvili 著 近藤 保, 大島広行 訳

マグロウヒル出版 A5判 312 ページ 4,500 円

本書は、1985年 Academic Press 社より出版された J. N. Israelachvili 著, “Intermolecular and Surface Forces” の全訳である。著者は、表面力研究の第一人者として世界的に知られており、自ら確立した表面間力測定法により、この分野において数多くの業績を残してきた。このことは、現在最も多く使用されている表面間力測定装置に彼の名が冠されていることから容易に理解できる。彼は本書で、物理学、化学、生物学の非常に広い学問領域の現象に関係している分子間力と表面力を包括的に解説している。全体はつぎの3部よりなっている。第Ⅰ部では原子間と分子間の相互作用、第Ⅱ部では堅い粒子間と表面間の相互作用、第Ⅲ部では柔らかい分子集合体と生体膜間の相互作用が論じられている。全体に、数式の利用を極力抑えつつ、多くの図や表を用いて非常にわかりやすく記述、構成されており、読者が内容を十分楽しむことができるよう配慮されている。

分子間力、表面力はわれわれの身の回りのあらゆる物体で働いているにもかかわらず、本書のように、それらを包括的でしかも統一的に解説した手引き書はきわめて希である。コロイドと界面科学の分野で活躍している研究者、技術者はもとよりこの分野の勉強を始めた学生諸君にとっても非常に有用な指針を与える恰好の書である。

(井上貴仁)