展

望

宇宙環境を利用した生体高分子の 高品質単結晶育成

夏井坂 誠・吉崎 泉

宇宙開発事業団

宇宙環境では、結晶の品質を低下させる対流や沈降が抑制されるため、生体高分子の X 線結晶構造解析に使用される高品質単結晶の育成が可能となる。本展望では、高品質単結晶の育成を可能とする宇宙における生体高分子結晶成長実験のこれまでの振り返るとともに、交際宇宙ステーション利用に向けた新たな取組みを紹介する。

1. はじめに

国際宇宙ステーション計画は 1984 年、米国のレーガン大統領の提唱によって開始され、その後日本、欧州各国、カナダ、ロシアを加え、国際協力プロジェクトとして進められている。1998 年 11 月には最初のモジュールとなる FGB (愛称「ザーリャ」) が打ち上げられ、以後国際宇宙ステーションは現在も着々と建設が進められている。高度約 400 km に浮かぶ国際宇宙ステーションは、約 10 年間にわたって 10^{-6} G の微小重力環境を提供し続ける。

日本は軌道上研究所として日本実験棟 JEM¹⁾ (Japan Experiment Module: 愛称「きぼう」) を、2004 年の完成を目指して国際宇宙ステーションに付設する予定である。この日本実験棟では、搭載されるさまざまな実験装置を利用して、化合物半導体や生体高分子の高品質単結晶育成、これら高品質材料の作製に不可欠な流体現象の解明、拡散係数など基礎物性値の取得を行うとともに、浮遊溶融/凝固など宇宙空間の特性を活かした実験手法を用いて、過冷却液体の研究、新規物質の創製を試みる予定である。なかでも、生体高分子の高品質単結晶育成は、化合物半導体の高品質単結晶育成と並んで、科学的な意義、宇宙環境利用の意義が明確であることに加え、商業利用の可能性が高く、日本の宇宙環境利用における重要課題に位置づけられている²⁾。

本稿では、宇宙環境を利用した生体高分子の高品質単結

晶育成について概説し、国際宇宙ステーション利用に向けた取組みを紹介する。

2. 生体高分子の高品質単結晶育成の意義

2.1 生体高分子の立体構造解析の意義

a) 生命現象の解明を目指して

タンパク質、核酸などの生体高分子は、生体内において生化学反応を高選択/高効率に実現し、発生、増殖、分化、代謝、免疫、情報伝達など生命を維持していくうえで重要な機能を支えている。生体高分子のもつ選択性や反応効率の高さは、生体高分子に固有の立体構造に支えられており、反応物質と特異的な結合を形成することにより達成される。よって、生体高分子の機能性を解明し、生命現象を明らかにすることは、生体高分子の立体構造を求めることにほかならない。

b. 「Structure Based Drug Design」の登場

各種疾病の治療は、病理反応に関与する生体高分子の活性部位を塞ぎ、機能を阻害する物質 (「阻害剤」) を投与することによって行われる。これまでの阻害剤探索は、偶然見つかったリード化合物に、化学修飾を繰り返すことによって行われてきた。このため本作業はまさに「トライアル & エラー」で、多くの人手と年単位の時間を要し、薬剤開発のボトルネックとなっていた。

これに対し近年、活性部位の立体構造をもとに阻害剤を

Makoto NATSUIZAKA 宇宙開発事業団宇宙開発利用システム本部宇宙環境利用研究センター (305-8505 つくば市千現 2-1-1)・開発部員、工博 (写真左)

1995 年東京工業大学大学院理工学研究科博士課程修了。専門は有機材料工学。〈趣味〉水泳

Izumi YOSHIZAKI 同上・開発部員、修士 (理学)

1994 年筑波大学大学院生物科学研究科博士課程前期修了。専門は生物学。〈趣味〉旅行

Processing of High Quality Crystals of Biological Macromolecules by Using Space Environment

図1 HIVの増殖に関与するタンパク質分解酵素⁴⁾
中心の空洞部にタンパク質を取り込み、分子鎖を切断する。
Desjarlaisらは活性部位の構造データをもとに、活性部位を塞ぐプロ
モベリドールを発見した³⁾。

合理的に設計する試み「Structure Based Drug Design」が提案され、薬剤開発期間の大幅な短縮が期待されている³⁾ (図1参照)。

2.2 高品質単結晶の必要性

生体高分子の立体構造解析は、X線結晶解析、NMR、電子線回折により行われるが、これまでに(1999年11月)決定された11,000の立体構造のうち、約80%のものがX線結晶解析による⁴⁾。活性部位を明らかにする原子分解能データを得るためには、一般に大きさが0.3 mm角以上の高品質(欠陥が少なく、配向性が高い)単結晶が必要といわれている。1997年には、西播磨に世界最強の8 GeVという高出力をもつ第三世代放射光施設「SPring8」が誕生し、解析能力が格段に進歩した。このため大きな結晶はもはや必要ないものの(0.2~0.5 mm角の結晶で十分)、原子分解能データを得るためには、やはり高品質な単結晶が必要となる。(ただし、生体高分子の機能発現に重要な役割を担う水と水の研究では、水素の位置検出能に優れる中性子線結晶解析が用いられ、弱い散乱強度を補うために、X線結晶解析よりさらに大きな1 mm角以上の高品質単結晶を必要とする。)

また、新たな薬物叙放の一つとして、薬を結晶の形で投与することが提案されている。本手法の有効性は α インターフェロンで確認されており⁵⁾、実用化されるならば大型の単結晶が大量に必要となる。

以上のように、種々の目的で生体高分子の高品質単結晶が必要とされる一方、一般に高品質単結晶の育成は困難であり、生体高分子の機能を原子レベルで解明するうえでボトルネックとなっていた。

3. 高品質単結晶育成への取組み —微小重力環境の利用—

3.1 微小重力環境の利用

生体高分子の単結晶育成では、バッチ法、蒸気拡散法、

透析法などの手法⁶⁾が用いられるが、これらの手法では、水溶液相、蒸気相などの流体相を含むため、地上では重力に由来する自然対流や沈降が発生、品質の良い結晶がなかなか得られなかった。(対流を抑制するためにゲル中で結晶成長を行うと、結晶品質の向上が認められる⁷⁾。このことから地上における自然対流が結晶品質を低下させていることがわかる。)

これに対し、微小重力環境では自然対流や沈降の発生が抑制されるため、拡散支配による高品質単結晶の育成が期待された。このため微小重力環境を利用して、早くから生体高分子の結晶成長実験が行われてきた⁸⁾。1980年のTEXUS ロケット実験に始まり、スペースシャトル、ロシアの宇宙ステーション「ミール」を用いたほとんどの長時間ミッションにおいて実験が行われ、結晶サイズ、結晶品質の向上(上述のゲル法よりも向上)が認められている^{5,7)}。こうした中で、宇宙環境の特徴を活かした液-液拡散法などの新規育成手法が開発されるに至った⁹⁾。

しかし、その成功率(地上より高分解能データが得られたかどうか)は一般に20%程度といわれており、当初期待されたほどの成果が得られなかった。

3.2 微小重力環境のメリット・デメリット

では、なぜ20%の成功率で結晶品質が向上する一方で、残り80%のものでは結晶品質の向上が認められなかったのだろうか。

McPhersonらは、微小重力環境のメリットを次のように説明している^{10,11)}。結晶品質が低下するのは溶液中に含まれる不純物が結晶に取り込まれるためであり、もしこれらの不純物が成長ユニットより大きく拡散速度が遅いのであれば、対流および沈降の影響を無視できる宇宙環境では成長界面における不純物濃度が低下し、品質の向上が図られるというのである。最近地上において、不純物が対流とカップリングして不純物縞を生じる様子^{12,13)}、微結晶が結晶成長界面に格子不整合を起こした状態で沈降すると欠陥を生じる様子¹⁴⁾などが報告されており、McPhersonの仮説を支持しているようである。

一方、80%のもので有効性が認められなかったのは、宇宙環境に合わせた条件設定が行われなかったことが大きな原因の一つであろう。宇宙における実験条件は地上実験によって設定されるが、宇宙環境では生体高分子などの拡散係数、蒸気拡散法における水の蒸発速度が地上と異なる値をとるため、このズレを見込んだ補正を行わなければならないのである。

また、微小重力環境において顕在化する対流によって結晶の移動が起こり、品質の向上が認められなかったとする報告もなされている。1994年ChayenはCCDカメラを用いて蒸気拡散法における結晶成長の様子を観察し、結晶が液滴内を周期的に運動している様子を確認¹⁵⁾、これを微

小重力環境において顕在化するマランゴニ対流の影響であると結論づけている¹⁶⁾。

4. 生体高分子高品質単結晶育成のための課題

4.1 育成条件制御の重要性

では単に、試料の純度を上げ、重力差の補正をすれば、高品質単結晶の育成が可能になるのでしょうか。答えはノーである。

通常の結晶育成では、実験開始時の条件（生体高分子濃度、沈殿剤の種類と濃度、pH、温度など）については注意が払われるものの、結晶成長中の条件についてはほとんど考慮されることがない。しかし、溶液からの結晶成長はわれわれが思っている以上に結晶育成条件（通常は「過飽和度」で与えられる）に敏感で、AFM (Atomic Force Microscope) などで観察すると結晶育成条件の変化に伴って結晶成長の様子が大きく変化することがわかる。溶液結晶成長理論は、過飽和度が大きくなり結晶成長の駆動力が大きくなると、結晶成長機構が層成長から付着成長へと変化し、結晶の品質が低下することを示唆している。よって、平滑面をもった良質単結晶を得るためには、単に過飽和度（凝集力）を大きくするだけではダメで、「ほどほどの過飽和度」を与えなければならないのである。George らがいくつかのタンパク質について見いだした「Crystallization Slot」¹⁷⁾（結晶成長に適したタンパク質分子間の相互作用範囲）は、まさにこの「ほどほどの過飽和度」に対応するものと考えられる。しかし、通常の結晶育成ではこのような配慮がなされず、核形成に必要な大きな過飽和度を与えたまま結晶成長を行うため、結晶表面に大きな段差や凸凹が発生して結晶品質が低下するのである。

これを受けて、核形成後、過飽和度を小さくして結晶が層成長する「準安定領域」（図2参照）で結晶育成を行うことの重要性が指摘されている¹⁸⁾。このような考え方にに基づき、核形成時と結晶成長時で沈殿剤濃度を変えて結晶化を行う Step Gradient 法¹⁹⁾、核形成を検知しその後蒸気圧²⁰⁾、または温度⁵⁾を変化させて結晶化を行う方法などが提案されている。

4.2 生体高分子結晶成長機構解明の重要性

以上のように、宇宙環境で高品質単結晶を育成するためには、流体シミュレーションなどを用いて重力差の補正をすることに加えて、相図を作成し、結晶成長過程をモニター、結晶育成条件を適切に制御することが重要となる。このような一連の技術、とくに流体シミュレーションや結晶育成条件の制御シーケンス、を開発するうえでは、核形成、層成長条件、界面安定性などについて多くの知見を与える溶液結晶成長理論^{21~23)}が重要な役割を担うが、これら溶液結晶成長理論は無機塩をもとに構築されたもので、

図2 結晶成長における準安定領域

生体高分子の特性（高分子量、形状異方性、表面電荷とその異方性、分子の柔軟性など）を反映していないため、これをそのまま生体高分子の結晶育成に適用することはできない。

よって、核形成から結晶成長に及ぶ一連の結晶成長過程を詳細に観察して、生体高分子の結晶成長機構を理解することが求められている。

5. 生体高分子高品質単結晶育成に向けた今後の取組み

以上のような課題解決に向けて、宇宙開発事業団では溶液タンパク質結晶成長実験装置 SPCF (Solution/Protein Crystal Growth Facility)²⁴⁾の開発を進めており、2002年に国際宇宙ステーションへ搭載する予定である。SPCFは溶液結晶成長機構の観察を主目的とした SCOF (Solution Crystallization Observation Facility) と、タンパク質の結晶育成を目的とした PCRF (Protein Crystallization Research Facility) から構成される。SCOF はリアルタイム位相シフト形式の二波長マイケルソン干渉顕微鏡と、これに光軸が直交する二波長マッハチェンダ干渉計から構成され、原子・分子オーダーで結晶成長界面を観察、同時に成長界面における濃度場、温度場の計測が可能となっている。これにより、結晶成長機構解明に必要な結晶成長速度と界面過飽和度の関係、結晶成長機構と界面過飽和度の関係を調べることが可能となる。また、動的光散乱計も搭載しており、核形成挙動の観察も可能となっている。PCRF はペルチェ素子により任意の温度プロファイルを設定することが可能なタンパク質結晶育成装置であり、過飽和度の適切な制御、CCDカメラによる育成状況の判断が可能である。PCRFは通常6式のカートリッジを搭載し、ユーザはカートリッジ単位で蒸気拡散法、液液拡散法、透析法、バッチ法の中から適切な実験手法を選択できる。

また、宇宙開発事業団では、生体高分子の結晶育成手法の最適化を目指して自ら研究に取り組む一方、「公募型地上研究」²⁵⁾として、本分野に貢献する提案を広く募集している。さらに、「先導的応用化研究」²⁵⁾では新薬開発など商

業利用を目指した提案を広く募集している。

6. ま と め

ヒトをはじめとするいくつかの生物について、全塩基配列の解明を目指すゲノム解析。ゲノムにより発現するタンパク質の動態解析を行うプロテオーム解析。21世紀の生物学は分子レベルで生命を解き明かそうとしている。タンパク質をはじめとする生体高分子は、まさに分子レベルでの生命の担い手であり、その構造と機能の関係を明らかにすることは、今後よりいっそう重要となるであろう。

筆者らは、その際、国際宇宙ステーションが、SPRING8や日々進化を遂げる高性能コンピュータとともに、大きな役割を担うものと期待している。しかし、そのためには生体高分子の結晶成長について理解を深め、宇宙における「合理的な」結晶育成手法を確立しなければならないのである。

文 献

- 1) http://jem.tksc.nasda.go.jp/iss_jem/index.html
- 2) http://jem.tksc.nasda.go.jp/utliz/mgv_scen.html
- 3) M. Perutz: タンパク質, 東京化学同人 (1995), 5 章
- 4) <http://www.rcsb.org/pdb/>
- 5) M. M. Long, J. B. Bishop, T. L. Nagabhushan, P. Reichert, G. D. Smith, L. J. DeLucas: *J. Cryst. Growth*, **168**, 233 (1996)
- 6) たとえば, A. McPherson: "Handbook of Crystal Growth", Vol. 2 (D. T. Hurler, ed.), Elsevier (1994), Chap. 8
- 7) L. J. DeLucas, *et al.*: *J. Cryst. Growth*, **135**, 183 (1994)
- 8) MICREX, <http://mgravity.itsc.uah.edu/microgravity/micrex/micrex.stm>
MGDB, <http://www.esrin.esa.it/htdocs/mgdb/mgdb-home.html>
- 9) J. Drenth, J. R. Helliwell, W. Littke: "Fluid Science and Materials Science in Space" (H. U. Walter, ed.), Springer-Verlag (1987), Chap. XIII
- 10) A. McPherson: *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **26**, 104 (1993)
- 11) A. McPherson: Proc. 8th Eur. Symp. Materials and Fluids Sciences in Microgravity, ESA SP-333, 619 (1992)
- 12) P. G. Vekilov, L. A. Monaco, F. Rosenberger: *J. Cryst. Growth*, **148**, 289 (1995)
- 13) F. Rosenberger, P. G. Vekilov, H. Lin, J. I. Alexander: *Microgravity Sci. Technol.* X/1, 29 (1997)
- 14) A. J. Malkin, Y. G. Kuznetsov, A. McPherson: *Surface Sci.*, **393**, 95 (1997)
- 15) N. E. Chayen, E. H. Senll, J. R. Helliwell, P. F. Zagalsky: *J. Cryst. Growth*, **171**, 219 (1997)
- 16) N. E. Chayen, J. R. Helliwell: *Nature*, **398**, 20 (1999)
- 17) A. George, W. W. Wilson: *Acta Cryst. D*, **50**, 361 (1994)
- 18) たとえば, N. E. Chayen *et al.*: *Quarterly Rev. Biophys.*, **29**(3), 227 (1996)
- 19) J. Sygusch, R. Coulombe, J. M. Cassanto, M. G. Sportiello, P. Todd: *J. Cryst. Growth*, **162**, 167 (1996)
- 20) T. L. Bray, L. J. Kim, R. P. Askew, M. D. Harrington, W. M. Rosenblum, W. W. Wilson, L. J. DeLucas: *J. Appl. Cryst.*, **31**, 515 (1998)
- 21) W. K. Burton, N. Cabrera, F. C. Frank: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, **A243**, 299 (1951)
- 22) W. W. Mullins, R. F. Sekerka: *J. Appl. Phys.*, **34**, 323 (1963)
- 23) T. Kuroda, T. Irisawa, A. Ookawa: *J. Cryst. Growth*, **42**, 41 (1977)
- 24) <http://jem.tksc.nasda.go.jp/JEM/jemimefc/japanese/index.html>
- 25) <http://jem.tksc.nasda.go.jp/utliz/collect/index.html>

交流の場「ポリマーネットワーク」にあなたのご意見、ご提案をお寄せください

「高分子」をより広く会員にご利用いただくため、会員からの意見、提案を紹介する交流の場「ポリマーネットワーク」欄を設けています

この欄は、高分子科学・技術の今後のあり方、重要な課題、人材の育成、研究・開発の動向などについての会員の方のさまざまなご意見を交換することにより、これから何をすべきかを考える上での示唆を得ていただくとするものです。皆様のご意見、ご感想、ご提案など、気軽に原稿をお寄せください。

応募要領

1. 原稿の長さ 原則として1,000字以内
2. 原稿の提出 会員番号、氏名、勤務先、連絡先、専門分野等を明記してご送付ください
3. 原稿の採否 編集委員会にご一任ください。著者のご相談のうえ、加除・訂正等の変更をさせていただきます。
4. 送付先: 高分子学会「高分子」ポリマーネットワーク
☎03-5540-3772 Fax 03-5540-3737