タンパク質の結晶化： 磁場による高品質結晶の育成

佐崎 元* 佐藤孝雄** 松浦良樹*** 中嶋一雄****

1. はじめに

タンパク質は約20種類のアミノ酸がつながってできた分子数数千～数十万、大きさ数 nm～数十 nm の巨大分子である。図1にその分子構造の一例を示すように、完全に異方的で複雑な形をしている。そして、タンパク質は、生体内のほぼ全ての生化学反応を触媒したり、毛や筋肉、皮膚を形作るなど様々な働きをしている。免疫や生体内での物質の輸送、生体機能の調節もタンパク質の重要な役割である。しかしながら、このようなタンパク質の持つ高機能性が“材料科学”に現在どのように生かされているかと考えると、医療用センサー等へのごく一部の応用を除くと、皆無である。その原因としては、タンパク質自体が高価であることや安定性に問題があることの他に、“タンパク質分子を基板上に任意に集合化させるための技術”がまだないことが挙げられる。目的のタンパク質分子を無機基板上に所定の向きで集合化させることができれば、タンパク質の持つ生化学的な高機能性と、無機基板材料の持つ高度な実用性を併せ持つデバイスの創成が可能となる。そのための鍵を握る“無機基板材料上にタンパク質分子をヘテロエピタキシャル成長させる技術”を開発するためには、まずタンパク質分子の天然の規則・集合化過程である結晶成長過程を研究することが重要である。

本稿では、まずタンパク質の結晶がどのようなものであるのかその概要について、また結晶成長過程についてどこまでわかっていて何がわかっていないのか現状について解説する。さらに、近年、著者らが取り組んでいる「強磁場を用い

たタンパク質結晶の高品質化」について、その方法や現在考えられるメカニズムなどを紹介する。

2. タンパク質の結晶成長とは

冒頭で述べたようなタンパク質分子の優れた機能は、その複雑な立体構造(図1)と密接に関連している。そのため、生命科学を分子論的に解き明かすには、タンパク質の優れた機能と立体構造との相関を理解することが必要不可欠である。現在、分子量が数万以上のタンパク質の立体構造を解析するための手法としては、X線(および中性子線)回折法が唯一の方法である。しかしながら、そのためにはまず高分解の解析に耐える良質な(そして中性子線の場合には1 mm以上の大きな)単結晶が必要となる。放射光などの非常に強力なX線源が利用できるようになったこと、およびコンピュータの計算速度が飛躍的に向上したことによって、回折データの収集およびその解析に要する時間は飛躍的に減少した。そのため、Protein Data Bank (PDB)に登録された、三次元構造が決定されたタンパク質の数は近年指数関数的に増加している。しかしながら、タンパク質の良質単結晶の育成は依然困難で、現在この過程が全体のボトルネックとなっている。そのため、良質な単結晶を育成するための一般的手法を確立するための結晶成長学的研究が急務とされている。

タンパク質の結晶成長についての研究が始まったのはようやく1980年代に入ってからである。当初は“タンパク質の結晶化には生体高分子に特有のメカニズムが存在するのではないか”，と考えられてきた。しかしながら研究が進むにつ

* 東北大学講師；金属材料研究所，東北大学学際科学研究センター(〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉)

** 東京工業大学助手；大学院生命理工学研究科

*** 大阪大学助教授；蛋白質研究所

**** 東北大学教授；金属材料研究所

Protein Crystallization: Increase in the Crystal Perfection by Applying a Magnetic Field; Gen Sasaki*, Takao Sato**, Yoshiki Matsuura***, Kazuo Nakajima**** (*Institute for Materials Research, Tohoku University, Sendai. Center for Interdisciplinary Research, Tohoku University, Sendai. **Faculty of Bioscience & Biotechnology Tokyo Institute of Technology, Tokyo. ***Institute for Protein Research, Osaka University, Suita. ****Institute for Materials Research, Tohoku University, Sendai)

Keywords: *protein, crystal growth, magnetic field, crystal perfection*

2002年4月24日受理

図1 酵素タンパク質 BphC の立体構造(上面図)⁽¹⁾. 本タンパク質は、有毒物質であるポリ塩化ビフェニール(polychlorinated biphenyl: PCB)の分解過程で重要な役割を果たす. 図中の赤丸は鉄原子を示す.

図2 原子間力顕微鏡でその場観察した、ニワトリ卵白リゾチーム正方晶系結晶の表面モルフォロジー. (a) 渦巻き成長, (b) 縞状成長. (図は立命館大学理工学部の中田俊隆博士のご厚意による).

れて、タンパク質結晶の成長過程も、低分子化合物を題材として発展してきた結晶成長理論で基本的には理解できることがわかってきた⁽²⁾⁻⁽⁴⁾. 例えば、低分子化合物のバルク結晶が溶液中から成長する際には、結晶化駆動力(化学ポテンシャル)が小さな場合にはらせん転移を利用した“渦巻き成長”機構で結晶は成長し、駆動力が増加するにつれて二次元核をステップ源とした“縞状成長”機構で、そしてさらに高駆動力下では“付着(一様)成長”機構で成長することが知られている⁽⁵⁾. 図2にニワトリ卵白リゾチーム(高純度標品が低価格で市販されているためモデルタンパク質として広く利用されている)の正方晶系結晶の表面を原子間力顕微鏡(AFM)でその場観察した一例を挙げる. 図に示したように、タンパク質の場合にも、駆動力が小さな場合には結晶は渦巻き成長し(a), 駆動力の増加にともない縞状成長(b)に移行すること

図3 馬脾臓フェリチン結晶の形の変化⁽⁹⁾. (a) 八面体結晶, (b) 骸晶, (c) 樹枝状結晶.

がわかる。馬脾臓フェリチンの場合には駆動力が高い場合には付着成長することが報告されている⁽⁶⁾。また、結晶の外形も、低分子化合物の場合には駆動力が増加するにつれて複数の平坦な面に囲まれた“多面体”結晶から、面の中央部分がくぼんだ“骸晶”，さらには“樹脂状結晶”へと変化することが良く知られている⁽⁷⁾⁽⁸⁾。図3に馬脾臓フェリチンの立方晶系結晶の光学顕微鏡写真を示す⁽⁹⁾。タンパク質の場合にも、結晶化駆動力の増加にともない、外形が多面体結晶(a)，骸晶(b)，樹脂状結晶(c)へと変化することがわかる。これらの結果は、タンパク質の場合にも、結晶が成長する基本メカニズムは低分子化合物と何ら変わらないことを示している。

しかしながら、タンパク質の分子を“結晶成長”という観点から眺めてみると、低分子化合物とは明らかに異なる次のような特徴が挙げられる。

(1) 結晶中でタンパク質分子同士は、水素結合や塩結合(クーロン相互作用)、ファン・デル・ワールス結合等でお互いに相互作用しあっている。そのため、結合一つあたりの強さは低分子化合物の結晶と同じであるが、タンパク質は巨大分子であるため分子一つあたりの結合力は低分子化合物と比べてずっと小さい(図4(a))。そのため、タンパク質結晶はピンセットなどで取り扱うことができないぐらい非常にもろい。

(2) タンパク質分子は図1で示したように完全に異方的な形をしている。そのため、タンパク質の結晶成長過程は無機イオンの場合のような等方的な球が集まる過程とは異なり、適切な向きを向いた分子が適切な方向から結合サイトにアプローチして来ねばならず、許容される立体角が小さい(図4(b))。

(3) (2)のような状況にも関わらず、タンパク質分子は数nm以上とサイズが大きいため、並進・回転の拡散定数が低分子化合物に比べて一桁以上小さい。

(4) また、水溶性のタンパク質分子の表面には多数の水分子が強く結合しており、このような水も含めてタンパク質分子と認識する方が現状にあう。したがって、結晶格子中にタンパク質分子が取り込まれる際には、タンパク質分子表面の水が脱水とされる必要がある。また、タンパク質分子は大きいため、結晶中の分子間の空隙は自由水で満たされており(結晶の20~90 wt%は水)、結晶内を水やイオンが自由に拡散している(図4(c))。

これらの特徴のため、タンパク質の結晶成長過程にはいくつかの顕著な特徴が見られる。まず、タンパク質結晶の成長過程は極めて遅い。結晶の成長が早いことで知られるニワトリ卵白リゾチーム結晶の場合でも成長速度は数nm/sのオーダーである。上記の(2)(3)の理由により、キنگ・サイトへタンパク質分子が取り込まれる速度が遅いことが要因であると考えられる。また、タンパク質結晶を成長させる際には、低分子化合物の場合とは異なり、極端に大きな結晶化駆動力が必要とされる。タンパク質の場合には、結晶化のための駆動力は次式で表される。

図4 タンパク質結晶の特徴。(a) 一分子あたりの結合力が小さい。(b) 分子間で結合を形成する際に許容される立体角が小さい。(c) タンパク質分子表面の結合水と、タンパク質分子間の自由水。

$$\Delta\mu/k_B T = \ln(C/C_e) \quad (1)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 C は溶質(タンパク質)濃度、 C_e は溶解度を示す。低分子化合物の結晶化の場合には、 $C/C_e = 1.01\sim 1.05$ 程度で十分に核形成・成長が起こるが、タンパク質の場合には $C/C_e = 2\sim 30$ 程度と極端に大きな駆動力をかけなければ核形成・成長などのイベントが起こらない。にもかかわらず、タンパク質結晶では低分子化合物に比べて1-2桁表面エネルギーが小さいために、少しでも駆動力をかけすぎると、すぐにアモルファス状の沈殿が生成してしまう(水溶液中に溶解している状態と結晶状態とのエネルギー差が小さいために、アモルファス状態と結晶状態とのエネルギー差も極めて小さい；また、結晶の成長が極めて遅いことも原因)。上記の(2)(3)に加えてタンパク質分子が結晶層に取り込まれる際の“脱水”過程なども律速過程になるものと考えられるが、その詳細についてはまだわかっていない。

一方、タンパク質分子の大きなサイズを活かした研究も盛

図5 原子間力顕微鏡でその場観察した、ニワトリ卵白リゾチーム正方晶系結晶表面の分子配列。結晶表面の盛り上がり1つが1分子に相当する。(図は立命館大学理工学部の中田俊隆博士のご厚意による)。

んになされている。タンパク質分子の大きさは一般に数 nm ～数 10 nm と極めて大きいので、AFM を用いると成長している結晶表面を容易に分子レベルで“その場観察”することができる(図5)。近年、AFM を用いてタンパク質結晶表面での二次元核の生成過程を直接その場観察するなどの試みが報告されている⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。また、光散乱法や X 線・中性子小角散乱法によって溶液中でタンパク質 1 分子が溶解している過程やその凝集・核形成過程を捕まえようとする試みも多くなされている⁽¹²⁾⁽¹³⁾。すなわち、これまで低分子化合物を基に発展してきた結晶成長理論を、直接観察によってさらに発展させるための題材としても、タンパク質結晶は非常に優れた系であるといえる。

以上、タンパク質の結晶成長に関する特徴などについて紹介してきたが、まだ未知のことももちろん多い。なかでも、その重要性にもかかわらずまだ全く手がつかないのが相互作用自由エネルギーの評価である。結晶中のタンパク質分子間や水分子-タンパク質分子間の結合エンタルピーは、まだ 50% 程度の誤差でしか見積もることができない。クーロン力、水素結合、ファン・デル・ワールス力などがその主な相互作用である。しかしながら、タンパク質分子直近の局所的な部位に働く力を見積もるには、溶媒の水分子を含めた環境がもはや連続体としてみなすことができないために“誘電率”がわからないことが要因の一つである。近年、タンパク質分子間結合力のラフな解析方法として、結晶中の分子間接触部位(“マクロボンド”と呼ばれる)についてのエンタルピー解析が精力的に行われており、タンパク質結晶の平衡形などの予測がようやくできるようになってきた⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。しかしながら、水和水をも含めたエントロピーとなるとほとんど手がつけられない状況で、相互作用自由エネルギーからフェイズ・

ダイアグラム(溶解度曲線)を見積もったり、どのような条件(温度、pH、沈殿剤の種類と濃度)で結晶化を行えば適切な結晶が晶出するかを予測することはまだ全くできない。しかしながら、いったん晶出した結晶核を良質な単結晶に育て上げることは現在十分可能である。なお、タンパク質結晶化の原理⁽¹⁶⁾⁻⁽¹⁸⁾や手法⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾については他の成書を参照いただきたい。

3. 磁場を用いた単結晶の高品質化

近年、タンパク質の結晶化を微小重力、高圧力、電場などの外場を用いて制御しようとする試みが多くなされている⁽¹⁸⁾。磁場の利用もそれらの一つで、1981年に Rothgeb と Oldfield によってタンパク質結晶が磁場配向することが初めて見出された⁽²⁰⁾。当時はタンパク質に配位している金属イオンのせいで結晶が磁場配向したと考えられたためにそれほど注目を集めるには至らなかった。しかしその後、1997年に著者らのグループ⁽²¹⁾および安宅氏・若山氏らのグループ⁽²²⁾が報告して以来、タンパク質一般に磁場効果が見られることが明らかになり、これまでに多くの研究がなされてきた。その結果、磁場がタンパク質結晶の配向、晶癖(結晶外形)、生成個数、成長速度、水溶液中の対流などに顕著な影響を及ぼすことが見出されてきた。これらの磁場効果については、いくつかの総説にまとめられているので参照いただきたい⁽²³⁾⁻⁽²⁵⁾。

また、上記の磁場効果以外にも、強磁場下でタンパク質結晶を育成すると結晶の「品質」が向上することが近年明らかになった。著者らのグループは 10 T の均一磁場下でリゾチーム斜方晶系結晶を育成すると結晶のモザイシティが顕著に低下することを見出した⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾。また、安宅氏・若山氏らのグループは均一磁場以外に、磁気力が作用する不均一磁場下においても実験を行っており、ヘビ筋肉フルクトース 1,6 ビスフォスファターゼ結晶の回折分解能が磁場下で向上することを報告している⁽²⁸⁾。本節では、著者らの結果⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾を例に取り、主に均一強磁場を用いたタンパク質結晶の高品質化について、その結果や現在考えられるメカニズムなどを紹介する。

図6 10 T の均一磁場中で成長させたニワトリ卵白リゾチーム斜方晶系結晶⁽²⁶⁾。斜方晶系結晶は *c* 軸が磁場方向と平行になるように磁場配向している。結晶化条件：リゾチーム 250 mg/mL、NaCl 25 mg/mL、50 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)、温度 40.0 ± 0.1 °C、結晶化時間 11 日。

10 Tの均一磁場下で育成したニワトリ卵白リゾチームの斜方晶系結晶を図6に示す(側面図)。結晶は外径6 mmのガラスチューブ中、 $40.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で11日間育成した。磁場の方向は鉛直下向きで、ガラスチューブを納めてある温調試料コンテナ中の磁場の不均一度は0.5%以下であった。図に示したように、ほぼ全てのリゾチーム斜方晶系結晶が、 c 軸が磁場の方向と平行になるように磁場配向した。X線回折実験には、磁場配向した結晶のみを用いた。無磁場下では、結晶はガラスチューブ中にランダムに晶出した。また、データは示さないが、10 T下で晶出したリゾチーム斜方晶系結晶の個数は、無磁場下で晶出した結晶個数に比べて顕著に少なかった。この結果は、均一磁場下で晶出するリゾチーム正方晶系結晶および馬脾臓フェリチン結晶の個数が無磁場下での値に比べて顕著に減少するというこれまでの結果⁽²¹⁾と一致する。このことより、原因はまだ不明であるが、均一磁場下で晶出するタンパク質結晶の個数が無磁場下に比べて減少するのは一般的な現象であると考えられる。

図6に示したような10 Tの均一磁場下で育成したリゾチーム斜方晶系結晶を7個、そして無磁場下で育成した結晶を7個、合計14個の結晶を直径2.0 mmのガラスキャピラリー中に封入し、X線回折実験を行った。10 T下および無磁場下で得られた結晶の体積は、それぞれ0.45~0.75 mm³

および0.2~0.5 mm³とほぼ同じであった。放射光施設フォトン・ファクトリーのBL10Aにおいて、四軸回折計を用いてこれらの結晶のロッキングカーブを測定した。その結果の一例を図7に示す。縦軸は回折強度(count/s)を、そして横軸は ω 軸の角度を示す。図より、10 Tの均一磁場下で育成した結晶の半値幅は、無磁場下でのものに比べて格段に小さいことがわかる。ロッキングカーブを測定した10個の反射全てで、磁場の引加にともない半値幅の顕著な減少が観測された。測定を行った光学系のX線の発散は 0.0023° であった。そのため、ロッキングカーブの半値幅からX線の発散値をデコンボリューションすることで、結晶のモザイシティを見積もった。その値を表1に示す。X線の発散値(0.0023°)はモザイシティの値には、あまり大きな影響を及ぼさなかった。なお、詳細については文献⁽²⁶⁾を参照いただきたい。表より、磁場下でタンパク質結晶を育成すると無磁場下に比べて結晶のモザイシティが顕著に減少することがわかる。磁場による結晶性向上の信頼度を確認するために、スチューデントtテストを行ったところ、信頼性は99.99%以上であった。このことから、磁場によるモザイシティの減少は、統計的にも十分に有意な現象であることがわかる。これまでに微小重力下で得られたリゾチーム正方晶系結晶(IML2 シャトル・ミッション)のモザイシティ0.0017~

図7 10 Tの均一磁場下(実線)および無磁場下(破線)で成長させたニワトリ卵白リゾチーム斜方晶系結晶のロッキングカーブ⁽²⁶⁾。縦軸は回折強度(count/s)を、そして横軸は ω 軸の角度を示す。測定はフォトン・ファクトリーBL10Aで行った。全ての測定は、シングル・パンチ・モード運転時に行った。光学系のX線の発散は 0.0023° であった。反射ピークの半値幅(Full-width at half-maximum: FWHM)は、 0.005° おきに測定したプロファイルをガウス分布でフィッティングすることによって求めた。得られた半値幅の値は図中に示してある。(a) (10 0 0)反射, (b) (0 8 0)反射, (c) (0 0 6)反射, (d) (2 13 -3)反射。

表1 10 Tの均一磁場下および無磁場下で成長させたニワトリ卵白リゾチーム斜方晶系結晶のロッキングカーブの半値幅(Full-width at half-maximum: FWHM)および結晶のモザイシティ⁽²⁶⁾.

反 射	半値幅(°)		モザイシティ(°)		モザイシティの差 (°)	モザイシティの変化 (%)
	10 T	0 T	10 T	0 T		
(10 0 0)	0.0078(0)	0.0102(9)	0.0075	0.0099	0.0024	24.2
(0 8 0)	0.0054(1)	0.0083(7)	0.0049	0.0080	0.0031	38.8
(0 0 6)	0.0056(1)	0.0079(3)	0.0051	0.0076	0.0025	32.9
(0 4 3)	0.0051(3)	0.0069(1)	0.0046	0.0065	0.0019	29.2
(6 -3 -1)	0.0071(1)	0.0085(3)	0.0067	0.0082	0.0015	18.3
(-3 2 3)	0.0055(0)	0.0059(1)	0.0050	0.0054	0.0004	7.4
(-3 -2 3)	0.0056(1)	0.0090(1)	0.0051	0.0087	0.0036	41.4
(5 1 -2)	0.0051(0)	0.0069(0)	0.0046	0.0065	0.0019	29.2
(-2 13 -3)	0.0015(5)	0.0088(0)	0.0046	0.0085	0.0039	45.9
(2 13 -3)	0.0061(5)	0.0088(0)	0.0057	0.0085	0.0028	32.9
平均	0.0058	0.0081	0.0054	0.0078	0.0024	30.8

表2 10 Tの均一磁場下および無磁場下で成長させたニワトリ卵白リゾチーム斜方晶系結晶のデータ, および収集した回折強度データの統計結果⁽²⁷⁾.

磁場強度	10 T		0 T	
空間群			$P2_12_12_1$	
格子定数(nm)			変化(%)	
<i>a</i>	5.654(3)	+0.18	5.644(4)	
<i>b</i>	7.383(6)	+0.14	7.373(7)	
<i>c</i>	3.050(2)	+0.23	3.043(2)	
X線光源	PFBL18B	回転対陰極	PFBL18B	回転対陰極
解析プログラム	DENZO	DPS	DENZO	DPS
カメラ距離(mm)	430	100	430	100
波長(nm)	0.1000	0.15418	0.1000	0.15418
リング電流(mA)	165-195		150-203	
振動角度(°)	1.2	2	1.5	2
露出時間(s)	64	600	80	600
撮影枚数	73	50	48	50
振動範囲(°)	87.6	100.0	72.0	100.0
最大分解能(nm)	1.6-0.113	2.3-0.17	1.6-0.133	2.3-0.20
コンプリートネス(%)*	71.9	99.5	62.4	93.6
R_{merge} (%)	2.6	5.4	2.9	10.2
反射数	34449	14601	20095	8477

* コンプリートネス: (実際に観察された反射数)/(最大分解能の範囲内で理論上観察されるべき反射数).

0.0100°(平均0.0047°)⁽²⁹⁾に比べて, 10 Tの磁場下で育成したリゾチーム斜方晶系結晶のモザイシティ(0.0054°)はわずかに大きい, このモザイシティの値は斜方晶系結晶としては我々の知る限りチャンピオンデータである.

次に, フォトン・ファクトリーのBL18Bにおいて, イメージング・プレートを備えたワイゼンベルグ・カメラを用いて, リゾチーム斜方晶系結晶の回折強度データを収集した. 結晶の*c*軸に対してX線が直角に当たるように結晶をセットした. 収集した回折強度データの統計結果を表2にまとめた. 表より, 観測される回折点の数が, 磁場を引加する

図8 回折強度とバックグラウンド・ノイズとの比(S/N比)と分解能の関係⁽²⁶⁾. 横軸の*d*は結晶の面間隔を示す. 10 Tの均一磁場下(●, ▲)および無磁場下(○, △)で成長させたニワトリ卵白リゾチーム斜方晶系結晶の反射強度を比較した. 回折データの収集は放射光光源(●, ○)および回転対陰極光源(▲, △)を用いて行った.

ことによって約2万から約3.4万へと格段に増加することがわかる. これは, 磁場によって結晶のモザイシティが減少し, 結晶品質が顕著に向上したことを示す. それにともなって, 最大分解能も, 0.133 nm から0.113 nm へと大きく向上した. 回折強度とバックグラウンド・ノイズとの比(S/N比)および $1/d^2$ (*d*は結晶の面間隔で, 横軸は分解能に相当する)の関係を図8に示す. 図中の右下がりの曲線は, 回折点の次数がより高次になるほど(面間隔がより小さな結晶面からの回折ほど), 回折強度が減少する様子を示す. 実験室光源(回転対陰極)および放射光光源での結果の両方とも, 無磁場下での結晶に比べて10 T下で得られる結晶の方が, 回折強度が格段に増大していることが図よりわかる. 回折強度の増大は, 特に高次(高分解能)の反射において顕著であった(前述の最大分解能は, S/N比が3の時の面間隔である). また, 表2に示したように, 最大分解能が向上したにもか

かわらず、コンプリートネス(実際に観察された反射数/最大分解能の範囲内で理論上観察されるべき反射数)の値も62%から72%へと向上した。このことは、磁場の引加にともないタンパク質結晶のモザイシティが減少し、回折ピークが鋭くなったため、より高次の反射においても回折点が観測にかかるようになったことを意味する。放射光での結果では、磁場の引加にともない平均の温度因子も $9 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ から $6 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ に向上した。また、 R_{merge} (結晶学的に等価な回折点の回折強度のばらつき: 結晶の完全性が高いほどこの値は小さくなる)の値も磁場によって向上した。さらに、放射光の照射による結晶の照射損傷も、磁場下で育成した結晶の方が少なかった。

ではなぜ、均一磁場下でタンパク質結晶を育成することで、結晶品質が大幅に向上するのであろうか。その理由の候補として、現在のところ次の4つの可能性について検討せねばならない: (1)磁場による水溶液中の対流の抑制、(2)磁場による結晶成長速度の減少、(3)磁場によるタンパク質分子の立体構造の変化、(4)結晶中のモザイク構造の磁場配向。これらのうち、(1)および(2)については結晶品質向上の主要因にはなり得ないと考えられる⁽³⁰⁾。まず、(1)のケースについて説明する。水溶液であっても電気伝導度が非常に高い場合には、均一磁場によって溶液中の浮力対流を抑制することができる。筆者らはこれまでに、25 mass% NaCl 水溶液中の浮力対流の流速が、10 Tの均一磁場下では約50%に減少することを報告している⁽³¹⁾。しかしながら、実際にタンパク質の結晶化に用いられる水溶液中では、電気伝導度がずっと低いために磁場は浮力対流に影響を及ぼさないことをYinらは明らかにした⁽³²⁾。そのため、リゾチーム斜方晶系結晶の育成時にも、磁場による浮力対流の抑制は期待できず、結晶品質の向上に(1)の項目が及ぼす寄与は非常に小さいものと考えられる。

また、(2)均一磁場下では、リゾチーム正方晶系結晶の成長速度が無磁場下に比べて明らかに減少することが見出されている⁽³²⁾⁽³³⁾。結晶の成長メカニズムから考察すると、過飽和度が小さく結晶の成長速度が遅いほど結晶の品質は向上するものと考えられる⁽⁵⁾。実際に、吉崎らは99.99%純度のリゾチームを用いて、結晶を成長させる過飽和度が小さいほどリゾチーム正方晶系結晶の品質が向上することを証明している⁽³⁴⁾。しかしながら、筆者らが実験を行っている99%純度のリゾチーム試料では、過飽和度が小さいほどリゾチーム正方晶系結晶の品質が逆に悪くなることを松井らは見出した⁽³⁵⁾。結晶のステップ前進速度が低下するほどより多量の不純物が結晶表面に吸着し結晶中に取り込まれるため、品質が低下したのと考えられる⁽⁵⁾⁽³⁶⁾。上述のロッキングカーブ測定等を行ったリゾチーム斜方晶系結晶の育成にも、99%純度のリゾチームが用いられている。そのため、正方晶系結晶と同様の不純物効果が斜方晶系結晶においても見込まれ、磁場による成長速度の減少が結晶品質の向上をもたらすとは考えられない。

(3)磁場によるタンパク質分子の立体構造の変化について

も、まだ完全には否定できないが可能性は低いものと考えられる⁽³⁰⁾。1960年代に、いくつかの酵素タンパク質について、酵素活性に顕著な磁場効果が認められることが報告されている(これらの報告では、磁場中に静置した試料を磁場より取り出して酵素活性を測定していた)⁽³⁷⁾。しかしながら、それらの酵素タンパク質についても、酵素活性を強磁場で測定したところ、全く磁場効果は認められなかった。結晶品質の向上には現在のところ、(4)結晶中のモザイク構造の磁場配向の寄与がもっとも大きいと考えられる予備的データが得られている⁽³⁰⁾。もし、この結晶の品質向上メカニズムが正しいとすると、磁場による単結晶の品質向上は、タンパク質結晶のような一分子あたりの結合力が非常に弱い結晶に特有の現象であるのかもしれない。一方、多結晶材料の場合には、結晶化の際に、個々の結晶粒を磁場配向させることで材料特性を向上させようとする研究が非常に多くなされている⁽³⁸⁾。

ここまで、本稿では均一磁場の効果のみについて説明してきたが、最後に不均一磁場の効果についてもふれたい。不均一磁場下では、磁場勾配に沿って働く「磁気力」が重要な役割を果たす。Linらは、不均一磁場もタンパク質結晶の品質を向上させることを報告している⁽²⁸⁾。彼らは、磁気力が鉛直方向に作用する縦型磁石中で、ヘビ筋肉フルクトース1,6ビスフォスファターゼを結晶化した。磁場中心ではほぼ均一な磁場が得られるが、磁場中心より上部の不均一磁場中ではタンパク質や水などの反磁性体には上向きの磁気力が作用する。そのため、磁場中心より上部ではともに体積力である重力と磁気力が逆方向に働き、見た目の重力が擬似的に減少する⁽³⁹⁾。逆に、磁場中心より下部の不均一磁場中では、反磁性体には下向きの磁気力が作用し、見た目の重力が擬似的に増加する。Linらは、下部・中心・上部と、重力が擬似的に小さくなって行く順番で、結晶の最大分解能が向上することを報告している。これらの効果は、磁場を用いて重力レベルを擬似的に連続変化させようとする点で興味深い。不均一磁場中では、上記(4)のモザイク構造の磁場配向効果に加えて、磁気力による疑似微小(もしくは巨大)重力環境での対流抑制(もしくは促進)効果が合わさって作用しているものと考えられる。微小重力環境が結晶成長に及ぼす効果については他の成書を参照いただきたい⁽¹⁸⁾⁽⁴⁰⁾。ただし、磁場による疑似微小重力効果は、厳密には、試料内の磁化率が均一である場合にしか得られないので注意が必要である。結晶が溶液中で成長(溶解)する際には、結晶近傍ではバルク溶液中に比べて溶質濃度が減少(増大)するため、必ず磁化率に不均一が生じる。磁化率に不均一が生じると、磁気力に不均一が生じ磁気対流が発生する。そのため、溶質分子の磁化率の絶対値が大きければ大きいほど、磁場による疑似微小重力効果は得にくくなる。

4. お わ り に

タンパク質の結晶化については、1980年代中頃より結晶

成長学的観点からの研究が始められた。タンパク質の結晶成長過程は、はじめは何かミステリアスなものと考えられていたが、これまで金属や半導体などの低分子化合物を題材にして発展してきた結晶成長に関する諸概念が、タンパク質の場合にも適応できることが、徐々に明らかになってきた。現在のところ、こういった溶液条件にすると適切な結晶構造を持つ核が晶出するかについてはまだ歯が立たないが、いったん晶出した結晶核を良質な単結晶に育て上げることは現在十分可能である。タンパク質などの生体巨大分子を材料科学に応用するための機は熟していると筆者は考える。

磁場を結晶成長に応用しようとする研究は、クライオクーラー冷却式の超伝導磁石の開発にとともに、タンパク質を題材に近年急速に発展してきた。そのような状況の中、磁場によってタンパク質単結晶の品質が顕著に向上することが見出された。タンパク質結晶を均一磁場下で育成すると、無磁場下に比べて結晶のモザイシティが顕著に減少し、X線の回折強度が特に高分解能領域で格段に増大することがわかった。また、それにとともに、観測されるX線回折点の個数が増大し、最大分解能や温度因子も向上した。その原因としては、現在のところ、結晶中のモザイク構造の磁場配向がもっとも有力であると考えられる。また、不均一磁場中でもタンパク質結晶の品質向上が報告されており、磁気力を利用した疑似微小重力効果が均一磁場下での効果と合わさって作用しているものと考えられる。いずれにせよ、磁場がタンパク質などの反磁性体材料の結晶化を制御するための極めて有効なパラメータであることは確かであり、本分野の研究の今後の発展が期待される。

本研究は、文部省科学研究費(Nos. 10555001, 12750006), 宇宙開発事業団財団日本宇宙フォーラムが推進している宇宙環境利用に関する地上研究公募プロジェクト, 日本原子力研究所黎明研究助成, および東北大学金属材料研究所附属強磁場超伝導材料研究センターから研究助成をいただき行いました。感謝申し上げます。

文 献

- (1) T. Senda, K. Sugiyama, H. Narita, T. Yamamoto, K. Kimbara, M. Fukuda, M. Sato, K. Yano and Y. Mitsui: *J. Mol. Biol.*, **255**(1996), 735.
- (2) S. D. Durbin and G. Feher: *J. Mol. Biol.*, **212**(1990), 763.
- (3) S. D. Durbin and W. E. Carlson: *J. Cryst. Growth*, **122**(1992), 71.
- (4) P. G. Vekilov, M. Ataka and T. Katsura: *J. Cryst. Growth*, **130**(1993), 317.
- (5) A. A. Chernov: *Modern Crystallography III*, (Springer-Verlag, Berlin, 1984).
- (6) A. J. Malkin, Yu. G. Kuznetsov, T. A. Land, J. J. DeYoreo and A. McPherson: *Nature Struct. Biol.*, **2**(1995), 956.
- (7) I. Sunagawa: *Morphology of Crystals, Part B*, Ed. I. Sunagawa, (Terra, Tokyo, 1987), p. 509.
- (8) T. Kobayashi and T. Kuroda: *Morphology of Crystals, Part B*, Ed. I. Sunagawa, (Terra, Tokyo, 1987), p. 649.
- (9) 吉田絵里子: 東北大学大学院理学研究科修士論文, (1997).
- (10) S.-T. Yau and P. G. Vekilov: *Nature*, **406**(2000), 494.
- (11) S.-T. Yau, B. R. Thomas and P. G. Vekilov: *Phys. Rev. Lett.*, **85**(2000), 353.
- (12) A. J. Malkin, J. Cheung and A. McPherson: *J. Cryst. Growth*, **126**(1993), 544.
- (13) N. Niimura, Y. Minezaki, M. Ataka and T. Katsura: *J. Cryst. Growth*, **154**(1995), 136.
- (14) H. Oki, Y. Matsuura, H. Komatsu and A. A. Chernov: *Acta Cryst.*, **D55**(1999), 114.
- (15) H. Hondoh, G. Sazaki, S. Miyashita, S. D. Durbin, K. Nakajima and Y. Matsuura: *Crystal Growth and Design*, **1**(2001), 327.
- (16) 佐藤 衛: タンパク質のX線解析, 共立出版, (1998).
- (17) 平山令明: 有機結晶作製ハンドブック, 丸善, (2000).
- (18) 佐藤清隆: 溶液からの結晶成長: 構造と形のデザイン, 共立出版, (2002年8月出版予定).
- (19) 平山令明: 生命科学のための結晶解析入門, 丸善, (1996).
- (20) T. M. Rothgeb and E. Oldfield: *J. Biol. Chem.*, **256**(1981), 1432.
- (21) G. Sazaki, E. Yoshida, H. Komatsu, T. Nakada, S. Miyashita and K. Watanabe: *J. Cryst. Growth*, **173**(1997), 231.
- (22) M. Ataka, E. Katoh and N. I. Wakayama: *J. Cryst. Growth*, **173**(1997), 592.
- (23) 佐崎 元, 柳谷伸一郎, S. D. Durbin, 宮下 哲, 中田俊隆, 小松 啓, 中嶋一雄, 本河光博: 表面科学, **20**(1999), 770.
- (24) 安宅光雄: 固体物理, **34**(1999), 263.
- (25) G. Sazaki, S. Yanagiya, S. D. Durbin, S. Miyashita, T. Nakada, H. Komatsu, T. Ujihara, K. Nakajima, K. Watanabe and M. Motokawa: in *Materials Science in Static High Magnetic Fields*, K. Watanabe and M. Motokawa(Eds.), (Springer, Berlin, 2002), pp. 283-300.
- (26) T. Sato, Y. Yamada, S. Saijo, T. Hori, R. Hirose, N. Tanaka, G. Sazaki, K. Nakajima, N. Igarashi, M. Tanaka and Y. Matsuura: *Acta Cryst.*, **D56**(2000), 1079.
- (27) T. Sato, Y. Yamada, S. Saijo, T. Hori, R. Hirose, N. Tanaka, G. Sazaki, K. Nakajima, N. Igarashi, M. Tanaka and Y. Matsuura: *J. Cryst. Growth*, **232**(2001), 229.
- (28) S.-X. Lin, M. Zhou, A. Azzi, G.-J. Xu, N. I. Wakayama and M. Ataka: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**(2000), 274.
- (29) E. H. Snell, S. Weisgerber, J. R. Helliwell, E. Weckert, K. Hölzer and K. Schroer: *Acta Cryst.*, **D51**(1995), 1099.
- (30) G. Sazaki, T. Matsui, T. Senda, T. Sato, Y. Matsuura, E. Kubota, T. Kazuoka, T. Ohshima, T. Ujihara, K. Fujiwara, N. Usami, K. Nakajima and M. Motokawa: in the 9th International Conference on Crystallization of Biological Macromolecules, Jena, Germany, March 23-28, 2002.
- (31) G. Sazaki, S. D. Durbin, S. Miyashita, T. Ujihara, K. Nakajima and M. Motokawa: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **38**(1999), L842-L844.
- (32) D. Yin, Y. Inatomi and K. Kuribayashi: *J. Cryst. Growth*, **226**(2001), 534.
- (33) S. Yanagiya, G. Sazaki, S. D. Durbin, S. Miyashita, K. Nakajima, H. Komatsu, K. Watanabe and M. Motokawa: *J. Cryst. Growth*, **208**(2000), 645.
- (34) I. Yoshizaki, T. Sato, N. Igarashi, M. Natsuisaka, N. Tanaka, H. Komatsu and S. Yoda: *Acta Cryst.*, **D57**(2001), 1621.
- (35) T. Matsui, G. Sazaki, T. Sato, T. Ujihara, K. Fujiwara, N. Usami and K. Nakajima: to be submitted to *J. Cryst. Growth*.
- (36) B. R. Thomas and A. A. Chernov: *J. Cryst. Growth*, **232**(2001), 237.
- (37) 高橋不二雄: 磁気と生物: 分子レベルからのアプローチ, 学会出版センター, (1984).
- (38) 浅井滋生: 入門材料電磁プロセッシング, 内田老鶴圃, (2000).
- (39) N. I. Wakayama, M. Ataka and H. Abe: *J. Cryst. Growth*, **178**(1997), 653.
- (40) 小田原 修: 軌道上実験概論: 宇宙・流れ・生命, 海文堂, (2000).