

## 何でもアリ？のタンパク質の結晶化方法

高野 和文

「タンパク質の結晶」は、ご存知の通り、X線回折を利用してそのタンパク質の立体構造を決定するために作製されている。20数年前では、タンパク質の結晶育成は研究室にX線回折装置を有する物理化学の研究者が主に行っていた。今日、放射光施設の拡充・計算機の進展などによりタンパク質のX線構造解析が普及し、タンパク質を取り扱う生化学や分子生物学の研究者も自ら結晶化に取り組む時代となった。その中には、精製したタンパク質を高速微量結晶化ロボットで多条件の結晶化スクリーニングを行い、さっさと結晶を作製して特に結晶化に労力をかけないという方もおられるが、初めて結晶化を行いたい方や今一度結晶化というものを考えたい方のために、結晶化方法について他の専門書とは違う視点から述べてみたい。

### タンパク質の結晶を作る研究？科学？

「International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM)」という主にタンパク質の結晶化に特化した国際会議が2年に一度開催されている。2016年7月に、その第16回目がプラハ（チェコ）で行われた。しかしその参加者の顔ぶれは大体いつも同じである。つまりタンパク質の結晶育成の専門家は多くない。そもそもタンパク質の構造解析において、主役は構造決定である。結晶化はあくまで脇役であり、構造決定までの道のりの一つの操作に過ぎない。結晶が得られ、構造が決定されれば、もうその結晶に用はない。古典的なタンパク質の結晶化の手法は、構造を決定したい研究者の試行錯誤による経験と結晶成長の研究者による理論的概念が合わされ確立されてきたが、タンパク質の結晶化の科学はまだ未確立の領域である。こうすれば絶対に結晶が得られるという原理の確立には至っていない。

では、タンパク質の結晶化の現状はどうなっているのか？大きく分けて二つの方向性になっている。一般には先に触れたように、結晶化の絶対的な原理が解明されていない状況では、ロボットを使って多くの条件を探索し結晶ができる条件を見つけることである。それでも結晶が得られない場合は、タンパク質に変異を加え結晶化ス

クリーニングを行う。タンパク質は少しの変異でその結晶化条件が変わることが多々ある。それではどういった変異体を設計するのか？よく行われるのはC末端を欠損させていたり、不規則な構造を取ると予想される領域を削除させたり、保存性の低い部位をアラニンなどに変えていく。真偽は確証できないが、200を超える変異体を作製してようやく構造決定に至る結晶を得たという話を聞いたことがある。また、スクリーニングで得られた結晶で構造が決定できたが、さらに高分解能を目指して同じように結晶化を試みても、二度と同じ結晶を作製できないこともある。再現性が問われる科学において異質な領域であり、神頼みの宝くじの世界かもしれない。

一方、新しい発想・技術を用いたタンパク質結晶化の取り組みも行われている。原理が解明されていないということは、まだ絶対というものはない。つまり何でもアリの状況である。また、タンパク質の分子は大きく柔軟かつ不安定で、その結晶自身ももろく崩れやすい。一見難物のようなものであるが、逆にその性質が意外と適応する場合もある。

### タンパク質結晶の基礎

まず結晶化に必要なことは、過飽和状態にすることである。溶液中の結晶は、溶けていない分子が整列したものであり、未飽和溶液ではいくら頑張ってもできない。タンパク質の種類、pHや溶媒条件によるが、大体数十mg/ml以上の濃度が必要になる。ではどの程度のタンパク質量が必要になるか？一つの結晶化実験でのタンパク質溶液は1  $\mu$ l以下、必要な結晶も一辺0.1 mm以下で十分な時代になってきており、うまくいけば以前ほどタンパク質の量を必要としなくなってきている。一方で結晶化がより困難な試料に挑戦する場合が増えている。結局のところ、少なくとも1 mg、できれば10 mg程度は準備しておきたい。

次に考慮すべきは、溶液中のタンパク質分子の状態である。結晶中では、一つずつの分子あるいはいくらかの分子の集合体が規則正しく整列している。分子や集合体ごとに多様な構造を形成していると結晶化はきわめて困難になる。ただしそれらの分子/集合体が限定された、

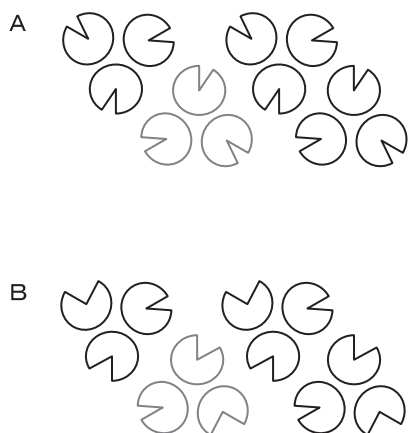


図1. タンパク質結晶中の分子の並びの模式図. A) 同じ構造を形成する三つの分子が一つの集合体となって整列した場合. B) 異なる構造を形成する三つの分子が一つの集合体となって整列した場合.

いくつかの構造だけで構成されていれば、均一なヘテロ集合体を一つの単位として結晶ができればよい(図1). 以前は一つの単位が大きくなると構造解析が困難になるため避けられてきたが、最近では、タンパク質の機能発現における構造変化を捉えるためにあえて構造の異なる分子が混在した結晶を用いて構造を決定する研究者もいる<sup>1)</sup>.

試料が準備できたら、過飽和にする方法を考える. いきなり過飽和にすることは困難で、次の三つの方法が考えられる. ①溶媒を蒸発させる. ②溶解度曲線の温度依存性を利用して、よく溶ける温度から溶けにくい温度に変化させる. ③溶解度を下げる他の物質を添加する. タンパク質の構造は温度に敏感なため、②はあまり適しておらず、タンパク質の結晶化には主に①と③を合わせた手法-④蒸気拡散法-が用いられる. タンパク質溶液に塩類や有機溶媒(沈殿剤)を加えタンパク質の溶解度を下げ、さらに蒸気拡散を利用して少しずつ溶媒を蒸発させ、過飽和の状態にして結晶を析出させる(図2). ここで過飽和といっても初めに結晶を析出させるためには高過飽和にする必要がある. 結晶ができる過程には、二つの物理現象-核形成と成長-があると考えられている. 溶液中の分子が集合し、その集合体(クラスター)がある一定の大きさ(臨界半径を越える大きさ)に達するまでが核形成で、以降成長となり、それぞれで必要とされる相互作用やエネルギーが異なっている. ただし結晶核や核形成と成長過程の境を分子レベルで実際に見た例はない. 図3の相図に示すように、核形成が高過飽和でのみ起こり、成長は過飽和であれば進むことが提唱されている. 図3には、上記①~④の過飽和状態へと結晶析出

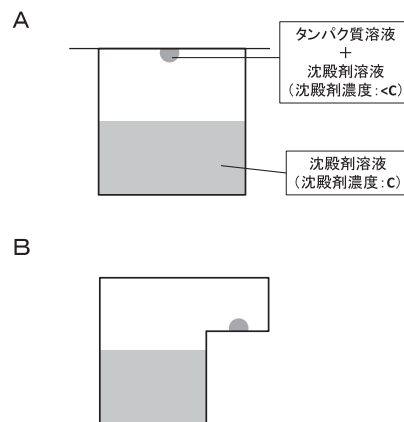


図2. 蒸気拡散法. タンパク質ドロップ(タンパク質溶液+沈殿剤溶液)内の沈殿剤濃度が沈殿剤溶液と比べ低いため、タンパク質ドロップでは同じ沈殿剤濃度になるまで溶媒が蒸発する. A)ハンギングドロップ法. B)シッティングドロップ法.

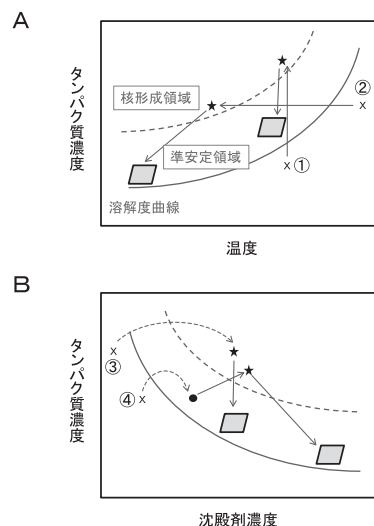


図3. タンパク質の溶解度曲線と結晶核形成/成長の相図. ①~④は本文中に記載の高過飽和にする方法. 溶液調製点(x)から結晶核形成点(★)を經由して結晶が成長(□)する. A) 温度との関係. B) 沈殿剤濃度との関係.

後の過程も示す. しかし、タンパク質が結晶化するかどうかは、タンパク質の性質、用いた溶媒、添加剤などの条件に左右される. 結晶中で分子が整列するためには、隣接する分子とのいくつかの特異的な相互作用がバランスよく適度に保たなければならないが、それらは溶液条件により大きく変化する. そのため多様な溶媒・添加剤を用いて結晶化条件を探索し、結晶ができる条件について、条件を少しずつ変えて、最適の結晶化条件を見つけ出す必要がある. このためには現在、市販の結晶化溶液キットや結晶化ロボットの使用が最善といえる.

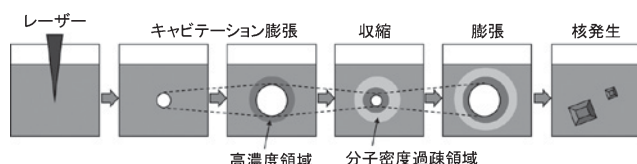


図4. フェムト秒レーザーを用いたタンパク質結晶核発生法. レーザー照射により生じるキャビテーションバブルの拡張・収縮によりタンパク質分子の高濃度領域が形成され結晶核が発生する.

### 結晶を出す方法

通常のスクリーニングでなかなか良い結晶が得られない場合は、何らかの対応を行わなければならない。まずは先に述べた変異体の利用を含むが、タンパク質に手を加えることである。変異や欠損の他に、結晶性の良いタンパク質やペプチドタグとの融合などがある<sup>2,3)</sup>。生物系の研究者には技術的には難しいものではないが、いずれもやってみないとわからない。つぎに結晶化環境に手を加えることである。たとえば、高過飽和におけるタンパク質の非特異的凝集を避けるために、凝集抑制能を持つ小分子を添加する<sup>4)</sup>。タンパク質分子が規則正しく整列するための足場として細孔を有する合成ゼオライトを用いる<sup>5)</sup>。不純物が結晶の核形成の起点になる場合があることから、馬の毛などの不純物を利用する<sup>6)</sup>。局所的に高過飽和状態を形成するためにフェムト秒レーザーを照射する<sup>7)</sup> (図4)。溶液の流れを抑制して結晶核の崩壊を防ぐためにゲル中で結晶化する<sup>8)</sup>などさまざまな取り組みが報告されている。今後も新たな発想による結晶化手法の開発が期待されるが、なかなか万能といえるものはない。いろいろトライして、目的のタンパク質に適した手法を見つけるしかない。

### 良い結晶にする

結晶が得られる条件を見つけた後は、その結晶をX線回折実験に適した大きさにする必要がある。まずは結晶化溶液の条件を少しずつ変化させる。他には古くから行われてきた種結晶を利用したマイクロシーディングやマクロシーディングがある。さらには微小重力環境中での結晶育成手法もあるが、なかなか一般的に利用することは難しい。筆者がお勧めするのは、溶液攪拌法というもので、結晶化プレートをロータリーシェーカーで緩やかに回転させ、結晶化溶液を攪拌させるもので簡便である<sup>9)</sup> (図5)。なぜ溶液の流れが結晶に良いのかはまだよくわかっていないが、結晶への分子の取り込み増加や不純物の取り込み減少による成長速度の増加や高品質化の効果が見受けられる。



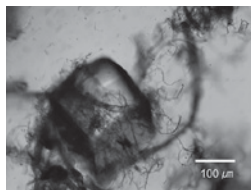
図5. 溶液攪拌法

つぎに結晶の品質や強度を高める必要がある。今日の回折実験では、結晶のX線によるダメージを回避するために、低温窒素ガス (100 K) の吹付による結晶の凍結が一般的である。結晶を凍結させるためには、結晶を抗凍結剤といわれる溶液に浸漬しなければならない。これらの抗凍結剤への浸漬や凍結において、結晶の品質や強度が不十分であると結晶は損傷する。もちろん結晶の品質が悪いと回折実験において高分解能のデータ収集は困難になる。結晶の品質改善には溶液攪拌法が簡便であるが、強度を高める手法として最近注目されているのがゲル中結晶化法である<sup>10)</sup>。先に結晶核生成でのゲルの効果述べたが、ゲル中で成長した結晶はゲルの繊維を結晶中に取り込んでいるので、その強度が増している。抗凍結剤への浸漬や凍結に対して強い耐性を示す。この特性は、薬剤候補分子との共結晶化にも適している。薬剤はタンパク質と結合してそのタンパク質の機能を阻害するので、その開発にはタンパク質-薬剤複合体の構造が必要である。薬剤は一般に難水溶性のものが多く、タンパク質結晶を薬剤が溶けた有機溶媒に浸漬して複合体を作製しなければならない。ゲル中で育成された結晶は、このような有機溶媒にも耐性を持つ場合が多い。

ゲル中で育成した結晶は強度に関してメリットがあるが、ゲルが固化しているので溶液攪拌は利用できない。また、結晶化操作において、ゲルとタンパク質溶液をあらかじめ混合させる場合は試料を高温にする必要があり、凝固したゲルにタンパク質溶液を添加する場合はゲルの乾燥に注意する必要がある。さらに、ゲル中にできた結晶の取り出しには、ゲルの切断操作が不可欠となるため、取り扱いに注意が必要である。そこで、ゲルに代えてタンパク質結晶にナノ/マイクロファイバーや不織布といった繊維状の素材を取り込ませて結晶の強度を上げる手法が開発された<sup>11,12)</sup> (図6)。この手法では、ファイバーや不織布の断片を結晶化溶液に混合するだけで良い。ゲルほどの強度の増加効果はないが、抗凍結剤や有



A



B

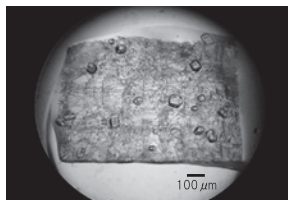


図6. 繊維入りタンパク質結晶. A) マイクロファイバー. B) 不織布.

機溶媒への浸漬にもある程度の耐性を有している.

ここまでゲルや繊維含有タンパク質結晶について、その効果の観点からその利点を少し詳しく述べてきたが、結晶の品質という視点では、繊維は不純物であり結晶品質には適さないと思われる。しかしこれらの結晶は、X線回折実験でも問題はなく、一連の操作において利点を有する。これは、タンパク質の分子が柔軟で、その結晶も脆く崩れやすい性質のため、繊維が結晶性に影響を与えずに結晶中に入り込むことができたと考えられる。

#### 結晶の取扱い

作製した結晶を回折実験に持って行くには、ナイロン製のループを用いて表面張力を利用して結晶を掬い取る方法が一般的である。この製品は市販されて以来今日に至るまで圧倒的優位なものとして君臨しているが、この間他の手法も報告されている。たとえば、レーザーを用いた結晶加工<sup>13)</sup>や粘着剤を用いた結晶取扱い技術<sup>14)</sup>などがある。ループを含め、レーザー加工や粘着剤なども最初の発表時は斬新なアイデアによる技術であった。

#### おわりに

紙面の都合上、タンパク質の結晶化に関するすべてのことを記載することはできなかった。特に最近では、膜タンパク質の結晶化が重要となっている。ここでは膜タンパク質結晶化については触れなかったが、そこでもさまざまな手法が開発されている。

最後に本稿をまとめると、タンパク質の結晶化では、タンパク質結晶の基礎的なところを理解していれば、あとは研究者の要求（結晶を出したい・大きくしたいなど）から、当初は非常識とも思える常法と異なる手法が次々と生まれている。読者の皆様も結晶化で行き詰れば、一か八か突拍子もない方法にトライしてみてもいいかだろうか？今もまだ万能と言えるものはない。手法の開発であれ、その利用であれ、まだまだ何でもやって良い結晶が得られれば勝ちという状況が続くだろう（か？）。

#### 文 献

- 1) Murakami, S. *et al.*: *Nature*, **443**, 173 (2006).
- 2) 玉田太郎ら：タンパク質結晶の新展開, p. 119, シーエムシー出版 (2008).
- 3) Fujiwara, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 802 (2013).
- 4) Ito, L. *et al.*: *J. Synchrotron Radiat.*, **15**, 316 (2008).
- 5) Sugahara, M. *et al.*: *Acta Crystallogr. D*, **64**, 686 (2008).
- 6) D'Arcy, A. *et al.*: *J. Synchrotron Radiat.*, **11**, 24 (2004).
- 7) Adachi, H. *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42**, L798 (2003).
- 8) Tanabe, K. *et al.*: *Appl. Phys. Express*, **2**, 125501 (2009).
- 9) Adachi, H. *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42**, L314 (2003).
- 10) Sugiyama, S. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5786 (2012).
- 11) Matsuoka, M. *et al.*: *Appl. Phys. Express*, **9**, 035503 (2016).
- 12) Matsuoka, M. *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **55**, 050302 (2016).
- 13) Kitano, H. *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, L73 (2004).
- 14) Kitatani, T. *et al.*: *Appl. Phys. Express*, **1**, 037002 (2008).