J. Fac. Appl. Biol. Sci.,
Hiroshima Univ. (1991), 30 : 129〜134

卵白リゾチームのガラス基板上への不均一核形成と単結晶育成

福場　芳則・佐藤　清隆

広島大学生物生産学部，東広島市 724

1991年10月31日 受付

要　旨　タンパク質の立体構造を解析する方法は，現在ではX線結晶構造解析が最も優れている。しかしながら，X線結晶解析における最も困難なプロセスは，良質なタンパク質の単結晶育成である。タンパク質の結晶成長機構にはまだ不明な点も多く，基礎的な立場からタンパク質結晶成長の要素解析が必要である。

そこで本研究では卵白リゾチームを用い，水溶液中に挿入したガラス基板上における不均一核形成現象を観察すると同時に，ガラス基板を用いた大きな単結晶育成を試みた。その結果，斜方晶多形の単結晶が成長し，析出剤濃度が高く，pH 8.0 近傍の条件で，不均一核形成が促進されることが判明した。さらに，ガラス基板上において，斜方晶結晶の凝集はまれにしか起こらないうえに，基板を傾斜させた方がより不均一核形成を制御しやすいことが明かになった。このような不均一核形成現象を利用して育成した大きな単結晶を用い，結晶のキャラクタリゼーションなどのタンパク質結晶化のメカニズムを解明することが可能となった。

緒　　言

タンパク質が生体内で担っている機能は，構造，運搬，免疫，調節，触媒作用など多種多様である。このように，タンパク質が生体内でな様々な機能を有するのは，個々のタンパク質分子の持つ立体構造（3次元構造）に起因している。したがって，生体内のメカニズムを理解する上で，タンパク質の機能と構造を分子レベルで解明することは非常に重要であり，立体構造の詳細な解析が必要である。タンパク質の立体構造を解析する主要な方法は，X線結晶解析法，核磁気共鳴 (NMR) 法，コンピューターシミュレーションによる立体構造予測，電子顕微鏡法である。現在，この中ではX線結晶解析法が，分解能，精度，信頼性のいずれにおいても優れている。タンパク質のX線結晶解析を行うには，0.5 mm 程度の大きさで，良質でバルキーな単結晶を再現性良く育成する必要がある。しかし，現実にはそのような理想的なタンパク質の単結晶育成は非常に困難であるというのが実情である。巨大分子であるタンパク質の結晶成長機構は低分子物質に比べて著しく複雑であり，まだ不明な点も多いので，基礎的な立場からタンパク質結晶成長の要素解析が必要である。

結晶化は，基本的に核形成と結晶成長の2つの段階に大きく分けることができる (Feigelson, 1988)。良質の単結晶を育成するためには，核形成段階では核発生の数をできる限り抑制し，結晶成長段階では，連続的な秩序だった成長を行わせる必要がある。この中で，核形成の制御が極めて重要である。一般に，タンパク質の核形成に要する時間が，静止溶液下では小分子と比べると極めて長いのは，分子体積が大きく，界面エネルギーが大きいために，核形成のための活性エネルギーが大きくなるためと考えられている (Feher and Kam, 1985)。その核形成を不均一核形成現象を用いて制御することは1つの工夫として興味が持たれる。タンパク質分子は表面帯電しており，過剰のイオンを含む水溶液中で成長する条件においては，何らかの媒体を介在した不均一核形成が可能と考えられる。McPherson ら（1988）は，50種の無機物試料を用いて，canavalin, concanavalin B, catalase, lysozyme の4種類の水溶性タンパク質の結晶化における不均一核形成，およびエピタキシャル成長を介した結晶化の制御を試みている。それによると，非常に短い時間における核形成と，続いて起こる結晶成長の段階を誘発する一連の無機化合物が存在し，無機物表面でタンパク質の結晶の不均一核形成およびエピタキシャル成長が起こると報告している。また，Givargizov ら（1991）は，アモルファス基板上でのタンパク質結晶の配向成長について報告している。

そこで本研究では，卵白リゾチームを結晶化のモデル分子として，結晶のモルフォロジーを観察すること

により，析出剤濃度，pH，基板の効果などの影響と相関させながら，大きくてバルキーな単結晶をガラス基板上に育成することを試みた。

実験方法

試料および試薬類 試料は生化学工業製卵白リゾチーム（6回再結晶，Code No.100940）を用いた。析出剤として塩化ナトリウム（ナカライ製），緩衝液であるトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（ナカライ製），塩酸（ナカライ製）は，すべて特級試薬のものを使用した。

結晶化条件 本実験では，結晶化方法としてバッチ法を用いた。容量 5 ml のサンプル管瓶に，4％（w/v）のリゾチーム溶液 2 ml と，これに最終濃度が2～4％となるように緩衝液に塩化ナトリウムを加えた溶液 2 ml を加えて系とした。緩衝液は，pH 7.5, 8.0 で，最終濃度が 50 mM となるように Tris-HCl 緩衝液を用いた。ガラス基板は，スライドガラスを約2.5×1.0cmに切り，これをエタノールで洗浄後，十分乾燥させた。成長温度は恒温槽を用いて35℃とし，この系にガラス基板を入れ，成長した結晶のモルフォロジーを観察した。このとき，成長した結晶の長軸をL，短軸をSとして，aspect ratio を S/L と定義し，結晶のモルフォロジーを比較した。

卵白リゾチームの結晶には，温度，pH により3つの多形，すなわち，正方晶 (Blake ら，1965)，斜方晶（Cervelle ら，1974)，三斜晶（Moult ら，1976）が存在することが報告されている。中でも，正方晶と斜方晶が代表的な多形である。溶解度測定から，正方晶と斜方晶の熱力学的安定性が決められている（Ataka and Asai, 1988)。また，動的光散乱法により，リゾチームの核形成とクラスター形成の関係が調べられている（Bishop ら，1991；Kadima ら，1991)。濱中・佐藤（1990）によると本研究で設定した成長条件では，斜方晶多形成長が確認されている。なお，斜方晶の格子定数は，Berthou ら（1983）により $P2_12_12_1$，z＝4，a＝5.64 nm，b＝7.38 nm，c＝3.04 nm であることが報告されている。

結果

Fig. 1 は，ガラス基板上で成長した卵白リゾチームの斜方晶単結晶を示している。この場合，矢印で示したように，長さが約 10 mm，幅約 2 mm の細長い結晶が成長している。モルフォロジー観察によれば，長軸はc軸である。この配向は，しばしば観察された。このように，結晶化溶液にガラス基板を入れることにより，基板の上側にリゾチーム結晶が成長するが，ほとんどの場合，1つあるいはせいぜい2～3個の結晶が発生するだけで，多数の結晶の凝集は見られなかった。

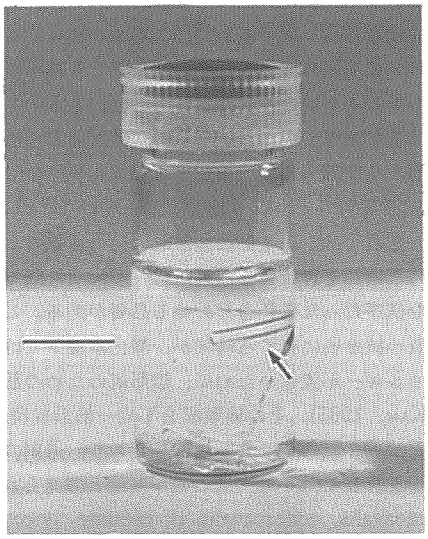

Fig. 1. An optical micrograph of an orthorhombic hen egg-white lysozyme crystal (arrow) grown on a glass plate in solution. Scale bar, 1cm.

Fig. 2 は，目視観察によって結晶が確認されるまでの時間（日数）に及ぼす，pH，析出剤濃度の影響を示している。明らかに，同じ pH であれば析出剤濃度が高いほど，また析出剤濃度が同じであれば pH 7.5 より 8.0 の方が，より短時間で結晶の核形成が起きていることがわかる。また，pH 7.5，塩化ナトリウム3.5％の条件では異常な値を示しているが，この場合，発生した結晶は一つだけで，最終的に非常に大きな結晶まで成長した。

横軸を経過時間（日数），縦軸を長軸と短軸の比，すなわち，aspect ratio (S/L) とした場合の pH 8.0 析出剤濃度2.5～4.0％におけるモルフォロジー変化を Fig. 3 に示す。これから，析出剤濃度によらず，結晶の発生が確認される直後には，軸の比が小さい，すなわち，非常に細長い針状の結晶が発生するが，時間の経過とともに徐々に横方向にも成長する傾向があることがわかる。

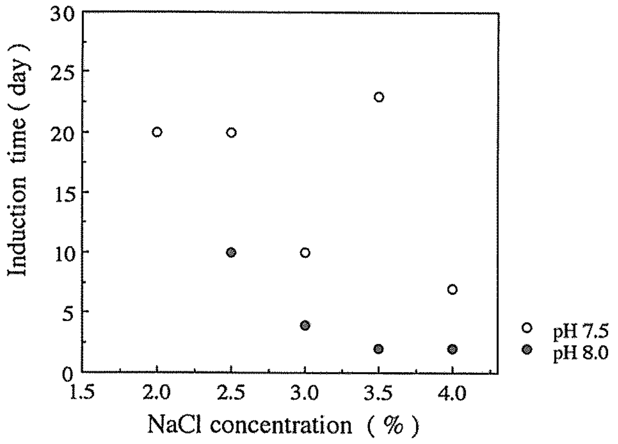

Fig. 2. Induction time for crystallization of orthorhombic crystals of hen egg-white lysozyme at different precipitant concentration and pH.

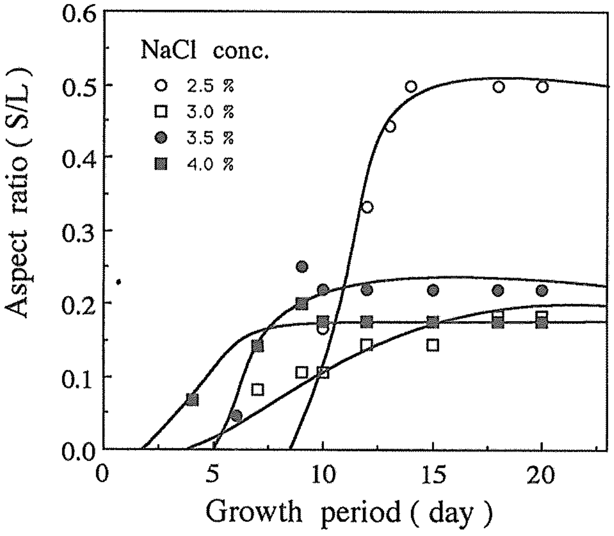

Fig. 3. Aspect ratio (S/L) and growth period (day) at different precipitant concentrations.

Table 1 は，経過時間とリゾチーム結晶の大きさの関係，および最終的な軸比を示した。数値は結晶の大きさを表し，単位は mm である。これから，大きな単結晶を育成するためには，十分な時間が必要であることがわかる。また軸比を見ると，pH 8.0 では析出剤濃度への著しい依存性はみられないが，pH 7.5 では析出剤濃度が高いほどよりバルキーな結晶が成長する傾向にあることがわかった。また Table 2 は，結晶化溶液に入れるガラス基板を，傾斜させた場合と水平にして容器の底に静置した場合の結晶のモルフォロジーの比較である。Table 1 同様，数値は結晶の大きさを表し，単位は mm である。成長条件は，pH 8.0，塩化ナトリウム濃度を3.5%，4.0%とした。これから最終的な軸比を比較すると，基板を水平にするよりも傾斜させた方が，よりバルキーな結晶が成長することがわかる。さらに，基板を水平にした場合にはそれぞれの結晶が重なりあって成長しやすく，一方基板を傾斜させた場合には，結晶１つ１つが区別しやすい傾向にあった。

Table 1. Relationship of growth time, crystal size and aspect ratio (S/L).

day	NaCl conc.	2.0		2.5		3.0		3.5		4.0	
	pH	7.5	8.0	7.5	8.0	7.5	8.0	7.5	8.0	7.5	8.0
5		—	—	—	—	—	—	—	2*)	—	2
10		—	—	—	—	—	2	—	4	1	3
15		—	—	—	1	2	2	—	4	3	3
20		1	—	1	1	3	2	—	4	4	3
25		1	—	2	1	4	2	2	4	4	3
30		3	—	5	2	5	2	5	4	4	4
	S/L	0.09	—	0.13	0.40	0.51	0.35	0.30	0.41	0.33	0.33

*) The dimension of crystal size, mm.

Table 2. Effects of inclination of glass plates on aspect ratio (S/L) of crystals.

day		holizontal		inclined	
	NaCl %(w/v)	3.5	4.0	3.5	4.0
5		—	6.0*)	2.5	1.8
10		—	7.5	4.0	2.2
15		—	7.5	4.0	2.2
20		6.0	7.5	4.0	2.2
	S/L	0.08	0.13	0.25	0.59

*) The dimension of crystal size, mm.

考 察

タンパク質を結晶化するためには，タンパク質の溶解度を下げ，溶液を過飽和状態にしなければならない。タンパク質の溶解性に影響を与える要因として pH がある。タンパク質を構成するアミノ酸の官能基はそれぞれ固有の pK 値を有し，溶液の pH に依存した解離状態を示すため，タンパク質の溶解度は溶液の pH に応じて変化する。一般に，タンパク質の溶解度はそのタンパク質の等電点付近の pH で極小となり，この現象を結晶化に用いることもある。また，タンパク質の水溶液に塩類を添加したとき，低イオン強度で溶解度が増加する現象を塩溶，高イオン強度で急激に溶解度が減少する現象を塩析というが，このうち塩析が最も頻繁にタンパク質の結晶化に用いられ，本研究に用いた結晶化法であるバッチ法もこの塩析を利用したものである。さて，Fig. 2 で示したように，同じ pH では析出剤濃度が高いほど核形成が早いのは塩析の効果から説明することができる。つまり析出剤濃度が高いほど過飽和度が大きく，したがって結晶化速度が大きくなる。また同じ析出剤濃度での pH 7.5 と 8.0 を比較した場合に，pH 8.0 の方が核形成が早いのは，卵白リゾチームの等電点が11であり，より等電点に近い pH 8.0 の方が過飽和度が大きいために結晶化速度が早くなるためと考えられる。さらに，aspect ratio に注目したモルフォロジー変化で，最初は非常に細長い針状晶が次第にバルキーな結晶に成長するのは，結晶の優先成長方向に関係があると考えられる。すなわち，析出剤を添加した直後の過飽和度があまり小さくない時には優先方向にしか成長しないが，十分に過飽和度が小さくなると横方向にも成長し，バルキーな結晶に成長するものと考えられる。また，最終 aspect ratio を pH 7.5 と 8.0 で比較して，pH 7.5 の方が比較的針状晶で成長が止まるのは，pH 7.5 の方が pH 8.0 に比べて過飽和度が低いため，優先方向に成長してからバルキーな結晶へと成長するのには過飽和度が十分でないからであろう。また，基板を水平にした場合と傾斜させた場合のモルフォロジーの比較では，傾斜させた基板の方が結晶を制御しやすいことがわかったが，それは対流の影響ではないかと考えられる。

謝辞 本研究の一部は，文部省科学研究費補助金（一般研究B，01490017）をうけて行われた。

引 用 文 献

ATAKA, M. and ASAI, M., 1988, Systematic studies on the crystallization of lysozyme. *J. Cryst. Growth*, 90:86-93.

BERTHOU, J., LIFCHITZ, A., ARTYMIUK, P. and JOLLES, P., 1983, An X-ray study of the physiological-temperature form of hen egg-white lysozyme at 2Å resolution. *Proc. R. Soc. Lond.*, B217:471-489.

BISHOP, J. B., MARTIN, J. C. and ROSENBLUM, W. M., 1991, A light scattering method for qualitatively monitoring aggregation rates in macromolecular system. *J. Cryst. Growth*, 110:164-170.

BLAKE, C. C. F., KOENIG, D. F., MAIR, G. A., NORTH, A. C. T., PHILIPS, D. C. and SARAMA, V. R., 1965, Structure of hen egg-white lysozyme. *Nature*, 206:757-761.

CERVELLE, P. B., CESBRON, F. and BERTHOU, J., 1974, Morphologie et proprietes optiques des cristaux de lysozyme de poule de type quadratique et orthorhombique. *Acta. Cryst.*, A30:645-648.

FEHER, G. and KAM, Z., 1985, Nucleation and growth of protein crystals. *Methods in Enzymology*, 114: 77-112.

FEIGELSON, R. S., 1988, The relevance of molecule crystal growth theories and techniques to the growth of biological macromolecules. *J. Cryst. Growth*, 90:1-13.

GIVARGIZOV, E. I., KLIYA, M. O., MELIK-ADAMYAN, V. R., GREBENKO, A. I., DEMATTEI, R. C. and FEIGELSON, R. S., 1991, Artifical epitaxy (graphoepitaxy) of proteins. *J. Cryst. Growth*, 112:758-772.

濱中宏範・佐藤清隆, 1990, 卵白リゾチーム結晶化の速度論的要素解析. 日本結晶成長学会誌, 17 : 254-259.

KADIMA, W., MCPHERSON, A., DUNN, M.F. and JURNAK, F., 1991, Precrystallization aggregation of insulin by dynamic light scattering and comparison with canavalin. *J. Cryst. Growth*, 110:188-194.

MCPHERSON, A. and SHLICHTA, P., 1988, Heterogeneous and epitaxial nucreation of protein crystals on mineral surfaces. *Science*, 239:385-387.

MOULT, J., YONATH, A., TRAUB, W. and SMILANSKY, A., 1976, The structure of triclinic lysozyme at 2.5Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 100:179-195.

Heterogeneous Nucleation and Single Crystal Growth of Hen Egg-White Lysozyme on Glass Plates

Yoshinori FUKUBA and Kiyotaka SATO

Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 724, Japan

X-ray structural analyses for molecular structures of proteins have been most convincing and informative. In the course of the X-ray analysis, growth of protein crystals of high quality is the most difficult process and the mechanisms of protein crystal growth have been less known in comparison to small molecule crystals. Hence, fundamental studies are highly needed to fully understand the protein crystallization processes. In this study, we tried to crystallize large-size single crystals on glass plates which were inserted in a growth solution, using hen egg-white lysozyme as model of protein. Heterogeneous nucleation process played an important role in this crystallization technique. The following results were obtain-

ed: (1) Orthorhombic form single crystals were grown under the present growth conditions (growth temperature of 35℃, and pH8.0), (2) heterogeneous nucleation was promoted at higher concentration of precipitant (NaCl), (3) crystals were grown on the glass plates, (4) it was easier to grow large crystals by inclining the glass plates in the solution, (5) single crystals having the maximum dimensions of 10 mm in length and 3 mm in width and 2 mm thickness could be crystallized. Using the large-size single crystals obtained with this method, one can characterize the protein crystals such as crystal perfection, surface microtopography, and crystal growth process etc.