

タンパク質の結晶成長に及ぼす圧力効果

著者	鈴木 良尚
号	40
学位授与番号	1507
URL	http://hdl.handle.net/10097/38419

氏名・（本籍）	すずき よし ひさ 鈴木 良 尚
学位の種類	博士（理 学）
学位記番号	理博第1507号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院理学研究科（博士課程）物理学専攻
学位論文題目	タンパク質の結晶成長に及ぼす圧力効果
論文審査委員	（主査）教授 大木 和 夫 教授 小松 啓，教授 都築 俊 夫

論 文 目 次

Chapter 0. 論文要旨
Chapter 1. 序論
Chapter 2. 結晶成長に及ぼす圧力効果（同一出発組成からの場合） （Diamond anvil cell (DAC)を用いた、その場観察による測定）
Chapter 3. 溶解度の圧力依存性（その場観察による測定）
Chapter 4. 結晶成長kineticsに及ぼす圧力効果（その場観察による測定）
Chapter 5. 結語
Chapter 6. 残された課題と今後の展望
Chapter 7. 謝辞

Appendix A. $\Delta\mu/kT$ に対する成長速度の極大

論 文 内 容 要 旨

Chapter 1. 序論

タンパク質は、生命現象をつかさどる最も重要な生体物質の一つである。多様なタンパク質の機能はその立体構造（タンパク質の三次，四次構造）によって支配されている。タンパク質分子の立体構造を精密に解析し、その機能を分子レベルで理解する手段としては、現在のところ X 線結晶構造解析が最も強力なものである。

X 線結晶構造解析には、良質の単結晶が不可欠である。しかし、結晶化は容易ではなく、ボトルネックとなっている。タンパク質の結晶化機構に未知の部分が多い現在、結晶成長の筋道を明らかにし、その結晶化の指導原理を確立することは、タンパク質分子の立体構造の精密解析を、飛躍的に進展させることにつながる。本研究では、結晶化の駆動力として圧力に注目した。タンパク質の結晶化に及ぼす熱力学的強度因子のうち、特に圧力効果の研究は、本研究を開始した時点ではほとんどなく、6年後の現在もまだ数例あるに過ぎない。

圧力（静水圧）は、系全体に音速で伝播し、系の状態を瞬時に均一に変化させる。従来の温度や濃度の变化による方法より、直ちに目的の条件に到達できる利点がある

また、圧力による実験には、以下のような発展が期待される。

水溶性のタンパク質分子の結晶化は脱水和により進行するので、結晶成長のメカニズムを理解する上で、水和の状態を知ることは重要である。常圧下では、水は自由水の状態よりも、水和水の方が密度が高いため、圧力で水和（溶解）平衡がずれることが予想される。逆に、結晶成長に与える圧力の効果を解析することによって、溶解時の溶質のモル体積変化が明らかになる。これを使って、水和、脱水和のメカニズムを明らかにできる可能性がある。

本研究では、全ての実験を『その場』観察によって行っている。

結晶成長機構を研究する上で、光学顕微鏡による『その場』観察は非常に有効である。特にタンパク質は、一般に微量の試料しか得られないため、顕微鏡による単結晶の『その場』観察は有用である。本研究では対象タンパク質に、基礎データの最も多い、水溶性タンパク質 hen egg white lysozyme (HEWL) を選び、以下の目的を達成する実験を行った。

- (1) 結晶の核生成頻度に及ぼす圧力効果を明らかにする。
- (2) 溶解度の圧力依存性を明らかにし、熱力学的解析を行う。
- (3) 成長速度の圧力依存性を明らかにし、(2)で得られる溶解度を基に、過飽和度に対する成長速度を測定する。そして、その成長速度から、HEWL 結晶の物性の圧力依存性を議論する。

以上で得られる結果は、圧力制御で実際に結晶化する際に必要な基礎データとなる。

Chapter 2. 結晶成長に及ぼす圧力効果（同一出発組成からの場合）

（Diamond anvil cell (DAC) を用いた、その場観察による測定）

形態、表面状態、流れなどの多くの情報を直接的に得るため、DAC を用いた光学顕微鏡による『その場』観察法を組み立てた。作製した DAC は、gasket（試料充填部）直径0.7mm、高さ0.3mm、圧力測定精度（ルビー蛍光シフト法） $\pm 13.7\text{MPa}$ 、発生圧力範囲0.1~1400MPa である。また、温度は $15.0 \pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$ で制御した。実験結果より、初期濃度が同じ場合、(1)核生成頻度や成長速度が圧力の増加にともない低下すること、(2)圧力を上げることによって結晶の晶癖がC軸方向に延びること（面の成長速度の異方性が圧力とともに変化したこと）を初めて明らかにした。また、(3)高圧力下で、溶解度（平衡濃度）が増加することを、結晶の edge の溶解、成長の『その場』観察により、初めて直接確認した。

Chapter 3. 溶解度の圧力依存性（その場観察による測定）

結晶成長の解析の出発点は溶解度（平衡濃度）の観測にある。M. Gross らは、HEWL の溶解度の圧力依存性を求めた。しかし、彼らは『その場』観察は行っていない。一度圧力を下げてから、常圧で溶液濃度を測定している。また、結晶が成長していく側のみから溶解度を求めている。これに対し、本実験では高圧力下での『その場』観察で、結晶の溶解と成長の両側から溶解度の圧力依存性を求めることとした。比較のために意図的に、Gross らと同じ温度 ($20.0 \pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$)、塩濃度、pH、タンパク質濃度とし、サファイヤ窓付きの高圧セル（圧力測定精度 $\pm 0.1\text{MPa}$ 、発生圧力範囲0.1~150MPa）と、Mach-Zehnder 干渉計を使い、溶液の屈折率変化を『その場』観察した。溶液の屈折率は、溶質の濃度と対応しているので、屈折率変化から濃度変化がわかる。実験の結果、圧力の増加とともに、溶解度の増加が見られた。成長と溶解では、与えられた時間で到達する濃度に gap があった。これは成長速度が溶解速度よりも著しく遅いためである。そこで、最終的な溶解度は平衡化の速度が速い溶解過程から便宜的に求めた。すなわち圧力0.1MPa、50MPa、100MPaで、溶解度は 4.7mg/ml 、 5.4mg/ml 、 5.9mg/ml であった。溶解度の絶

対値、相対変化量とも、Grossらの値に比べて低い値であった。このことは、Grossらの濃度がまだ平衡濃度に達していないことを示唆する。溶解度の圧力依存性から、Le Chatelierの原理に基づいて、HEWL分子が結晶から溶液中に溶解したときのモル体積変化 (ΔV) を見積もると、 $\Delta V_{0.1\text{MPa}} = -6.14 \sim -8.37 \text{ml/mol}$, $\Delta V_{100\text{MPa}} = -3.93 \sim -6.14 \text{ml/mol}$ となった。これより、HEWL分子のモル体積は、溶解によって減少し ($\Delta V < 0$)、 $|\Delta V|$ は圧力とともに減少する傾向があることがわかった。

Chapter 4. 結晶成長 kinetics に及ぼす圧力効果 (その場観察による測定)

溶解度が測定できたので、初期濃度を変えて、過飽和度 ($\sigma = (C - C_e) / C_e$, C_e : 平衡濃度) もしくは、 $\Delta \mu / kT (= \ln(C / C_e))$ の関数として成長速度を測定することが出来た。『その場』観察用のサファイヤ窓付高圧セル (圧力測定精度 $\pm 0.1 \text{MPa}$, 発生圧力範囲 $0.1 \sim 110 \text{MPa}$) を設計し、圧力 0.1MPa , 50MPa , 100MPa , 初期 HEWL 濃度 $5 \sim 70 \text{mg/ml}$ で、HEWL 結晶の (110), (101) 各面の成長速度を測定した。その結果、(1) $\sigma \leq 10$ では、成長速度は、過飽和度一定でも、圧力の増加とともに減少した。(2) σ とともに増加する成長速度に、二次元核成長モデルの一つである birth and spread model を適用して解析した。その結果、 $\sigma \leq 10$ では、圧力の増加とともに、表面自由エネルギーが増加した。(3) $\sigma \leq 10$ では、(110) 面の成長速度に対する (101) 面の成長速度の比は、圧力とともに増加するという結果を得た。

Chapter 5. 結語

- (1) ダイヤモンドアンビルセルを用いた、『その場』観察により、圧力の増加にともなう、核生成頻度と成長速度の低下、結晶のc軸方向への偏奇、溶解度 (平衡濃度) の増加を、初めて直接確認した。
- (2) 油圧式高圧セルに、二光束干渉法を組合せた、溶解度の『その場』測定法が有効であることを確立した。この方法で成長と溶解過程の双方から決定した溶解度は、圧力 0.1MPa , 50MPa , 100MPa で、それぞれ、 4.7mg/ml , 5.4mg/ml , 5.9mg/ml であった。圧力の増加により溶解度の増加が見られたことから、HEWL 結晶の溶解とともに HEWL 分子のモル体積の減少が起こることが明らかになった。また、溶解にともなう HEWL 分子のモル体積変化 (ΔV) は、溶質の結晶相への取り込み機構 (結晶化の活性化エネルギーなど) に影響を与えると推定される。 $|\Delta V|$ は、圧力上昇とともに減少する傾向が明らかになった。
- (3) (2) で求めた溶解度を基に、初期濃度を変えて、 0.1MPa , 50MPa , 100MPa での成長速度の『その場』測定を行った。その結果、 $\sigma \leq 10$ では、過飽和度が同じでも、圧力とともに、成長速度、成長速度比 [G_{101} / G_{110} ; G_{101} , G_{110} はそれぞれ、(101), (110) 面の成長速度] が増加した。また、成長速度を σ の関数として、二次元核成長の birth and spread model を適用して解析した結果、圧力とともに結晶の表面自由エネルギーが増加した。

本研究は、水溶性タンパク質の結晶成長に及ぼす圧力効果を『その場』観察によって、結晶のモルフォロジーと成長カインेटックスの両面から、定量的測定を行った最初のものである。この研究結果は、タンパク質の結晶化に先立つ臨界核生成と核の数の制御が、『その場』観察の下で圧力を用いることによって、容易、かつ有効に出来ることを明示している。また、成長速度や結晶形態の制御にも圧力が有効であることが実証された。以上の結果は、圧力により良質単結晶を得るための基礎となるものである。

論文審査の結果の要旨

タンパク質は、生命現象の本質とも言える生体物質である。その立体構造を精密に解析し、分子レベルで機能を解明するには、X線結晶構造解析が用いられている。それには、良質の単結晶が必要となるが、タンパク質の結晶化は容易ではない。本研究は、タンパク質の結晶化の指導原理を確立するために熱力学的強度因子として圧力に注目し、水溶性タンパク質 hen egg white lysozyme (HEWL) を対象にしてその結晶成長機構に及ぼす圧力効果を研究している。まず、diamond anvil cell (DAC) を作製し、それを用いた光学顕微鏡による『その場』観察法により実験した。その結果、初期濃度が同じ場合、圧力の増加に伴い(1)核生成頻度や成長速度が低下すること (2)結晶の晶癖がc軸方向に偏奇すること (3)溶解度が増加することの3点を直接観測した。以上の実験結果を基に、過飽和度 $[\sigma = (C - C_0) / C_0]$ 、 C : 仕込み濃度、 C_0 : 平衡濃度 (溶解度) の関数として成長速度を解析するために、DAC よりも圧力測定精度が2桁高い光干渉法による、『その場』観察用の光学窓付油圧セルで、溶解度の圧力依存性を高い精度で測定した。さらに、溶解度の圧力依存性を詳細に解析し、HEWL分子が結晶から溶液中に溶解したとき、(1)モル体積変化 (ΔV) が負の値になる ($\Delta V < 0$) こと、(2) $|\Delta V|$ が圧力の増加と共に減少する傾向があることを示した。さらに、成長速度測定用の光学窓付油圧セルを設計し、HEWL結晶の(110)、(101)面の成長速度を測定した。その結果、 $\sigma < 10$ の過飽和度では、(1)成長速度は圧力の増加とともに減少すること、(2)二次元核成長モデル (birth and spread model) で成長速度を解析し、圧力の増加とともに、表面自由エネルギーが増加すること、(3) (110)面の成長速度に対する(101)面の成長速度の比は、圧力とともに増加することを見出した。本研究は、タンパク質の結晶成長に及ぼす圧力の有効性を『その場』観察によって実証し、結晶のモルフォロジーと成長カイネティックスの両面に及ぼす圧力効果を、定量的に解析した最初の研究である。これらの結果は、論文提出者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、鈴木良尚提出の論文は、博士(理学)の学位論文として合格と認める。