

||||| 特集：国際宇宙ステーションの応用利用 |||||
(研究紹介)

宇宙実験による高分解能タンパク質構造解析の 応用に向けて

高橋 幸子¹・古林 直樹²・鶴村 俊治³・有竹 浩介³・佐藤 勝⁴
山中 麻里¹・広田 恵理華¹・佐野 智⁴・伊中 浩治²
田中 広明¹・小林 智之⁴・裏出 良博³・田中 哲夫⁴

High-quality Protein Crystal for Precise Structural Analysis Obtained by JAXA Crystallization Experiment in Space

Sachiko TAKAHASHI¹, Naoki FURUBAYASHI², Toshiharu TSURUMURA³,
Kosuke ARITAKE³, Masaru SATO⁴, Mari YAMANAKA¹, Erika HIROTA¹,
Satoshi SANO⁴, Koji INAKA², Hiroaki TANAKA¹,
Tomoyuki KOBAYASHI⁴, Yoshihiro URADE³ and Tetsuo TANAKA⁴

Abstract

Most of the protein crystallographers are making big efforts to improve the resolution of a crystal to resolve the protein structure as precise as possible. One of the bottle-neck of the three-dimensional structure determination is to grow high-quality crystal. In JAXA-GCF and JAXA-NewGCF crystallization experiments, we established a technique of obtaining crystals of high-quality in microgravity and grew several high-quality crystals of important proteins. Here, we describe some successful results of obtaining high-quality protein crystals in microgravity and introduce effective way of using the microgravity environment for growing high-quality protein crystals to contribute to the new drug design.

1. はじめに

1.1 タンパク質結晶と構造解析

タンパク質分子の3次元構造解析は、その反応機構の解析といった構造生物学的意義のほか、創薬上の意義も重要である。対象が疾病に関連するタンパク質の場合には、3次元構造座標データをもとに、それに結合して機能を阻害する薬物を考案できれば、治療薬の開発に貢献できる。3次元構造解析の方法としては、特に分子量が3万を超えるタンパク質が対象となる場合には、X線構造解析が主たる方法であるが、そのためには、対象タンパク質の良好な単結晶の生成が必須である。しかしながら未だに、良好な結晶生成の確実性は低く、この構造解析方法のボトルネッ

クとなっている¹⁾。

1.2 高品質結晶の重要性

タンパク質結晶に関しては、単に結晶が得られれば良いわけではなく、良好な回折像が得られるような良質な単結晶が求められている。一般論としては、より精細な回折像が得られれば、より精度の高い原子座標を得ることが可能である。回折像の質に関わる指標は種々あるが、ここでは回折分解能という指標で説明をする。この指標は、回折点を与える結晶中の最小のブラッグ反射面の間隔であり、結晶中の分子の配向性が良いほど小さな値となり、それを「高」分解能と表現する。

実際の構造解析では、原子座標は電子密度図から一意に決まるわけではなく、タンパク質分子の構造モデルを最小

-
- 1 株式会社コンフォーカルサイエンス 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3丁目3-6 ワカ末ビルディング7階
Confocal Science Inc., Wakamatsu Building 7F, 3-3-6 Nihonbashi Hon-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan
(E-mail: takahashis@confsci.co.jp)
- 2 株式会社丸和栄養食品 〒639-1123 奈良県大和郡山形市筒井町170
Maruwa Foods and Biosciences Inc., 170 Tsutsui-cho, Yamatokoriyama, Nara 639-1123, Japan
- 3 大阪バイオサイエンス研究所 〒565-0874 大阪府吹田市古江台6-2-4
Osaka Bioscience Institute, 6-2-4 Furuedai, Suita-shi, Osaka 565-0874, Japan
- 4 宇宙航空研究開発機構 〒305-8505 茨城県つくば市千現2-1-1
Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-8505, Japan

Theoretical number of the independent reflections

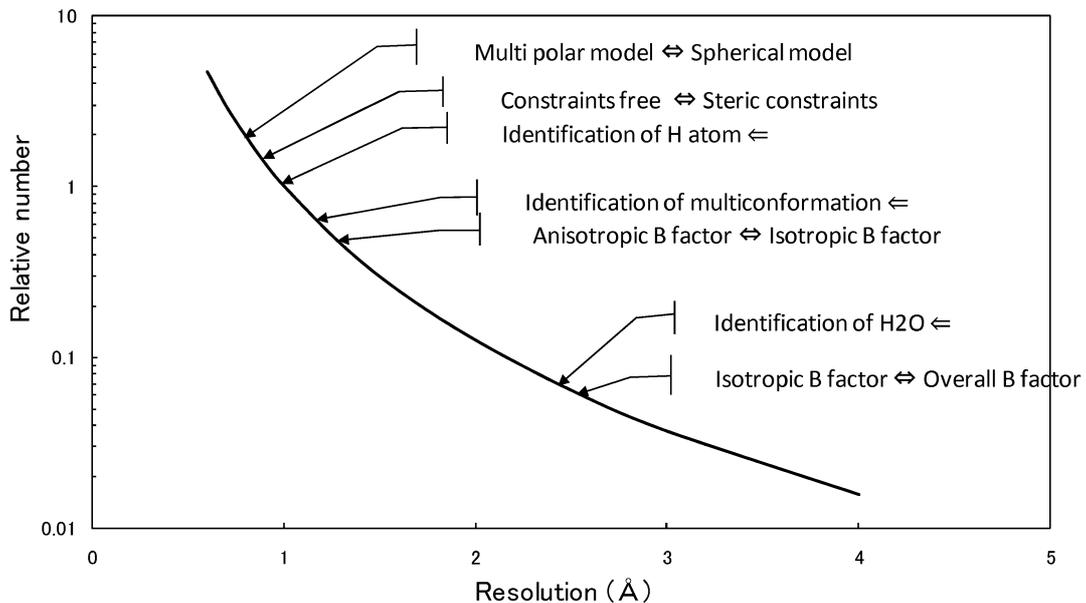


Fig. 1 Relationship between a diffraction resolution and independent reflections of diffraction pattern. Independent reflections increase in proportion to $1/\Delta^3$. The number of the independent reflections can contribute to the precise analysis of the three-dimensional protein structure.

二乗法でフィッティングして得る。このため低分解能の回折像では、多くの構造的な束縛を仮定し、自由度を減らしたモデルで構造解析せざるを得ない。しかし、より分解能の高い回折像が得られれば、束縛が少なく、自由度の高いモデルフィッティングが可能となり、より精度の高い原子座標を得ることができる²⁾。また、タンパク質の表面に配位する水分子やリガンドを同定可能となる。結晶の回折分解能と得られる構造解析の質との大まかな関係を **Fig. 1** に示す。

X線構造解析されたタンパク質の座標データは2008年3月現在、42,000件余りが Protein Data Bank (PDB) に登録されているが、その大半は2 Å前後である。このクラスの分解能の場合、タンパク質の主鎖構造、側鎖構造は同定できるが、配位水の同定には十分とは言えない。また医薬品分子の設計を目指した構造解析では、タンパク質にリガンド分子がどのように結合するかが重要であるが、リガンド分子に由来する電子密度の同定は難しく、その結合する方向が見極められないといったケースも多い。このため、2 Åより高分解能の結晶の生成が望ましいが、実際には高品質結晶を得るための明確な手法が確立していないのが現状である。

1.3 結晶の回折分解能を決める要因

結晶の回折分解能を決める要因は、大きく分けて、分子内の構造揺らぎに由来するものと、結晶中の分子配向の乱れに由来するものがある。前者は、対象分子に固有の性質であるが、その制御は本稿の対象とはしない。一方、後者

は(1)タンパク質分子間の相互作用、(2)結晶成長過程、(3)不純物の結晶への取り込み、等で影響を受ける³⁾。

結晶を構成するタンパク質分子間の相互作用に関しては、例えば結晶中の水分含量が極端に少ない晶系の結晶では隣接分子同士の相互作用が強くなり、分子の配向性が向上して、著しく高分解能の結晶が得られることが知られている⁴⁾。しかしながら、意図的にこのような結晶を生成することは容易でない。

一方、結晶成長過程において、一般に結晶生成時の溶液の過飽和度を低くし、成長速度を遅くすることで、分子の配向性が向上することが知られている。また結晶中の不純物に関しては、その量が少ないほど良いことが知られている。そして、微小重力環境で生成したタンパク質結晶の品質改善にはこれらが関連することが、近年明らかにされてきている^{5,6)}。

1.4 微小重力環境での結晶化実験

微小重力環境では、成長中結晶の周辺に重力の影響で発生する密度差対流が抑制されるため、結晶周辺にタンパク質ならびに不純物の拡散場が形成され、より低過飽和度で、かつより不純物が少ない環境で結晶を成長させることができる。また地上の結晶化では時折見受けられる、結晶表面での2次的な核成長による結晶のクラスター状成長も抑制される⁷⁾。

宇宙環境を利用したタンパク質の結晶化は、4半世紀以上の歴史があり、とくに1990年代には米国を中心に多数の実験が実施されてきた。しかしながら当時の宇宙実験で

は、有用な結晶が得られる確率は2割とも言われ、結果として構造生物学への貢献はあまり高いとは言えなかった。このため、宇宙実験は欧米を中心に厳しい評価を受けてきた⁸⁾。さらに実験機会が不定期でスケジュール変更が多い、実験実施までの準備に長期間かかる、更にはコストが高いといった問題点があり、地上での結晶生成実験と比較し、けっして優位性のある技術とはいえなかった。

しかしながら、上述したように微小重力環境で生成したタンパク質結晶の品質改善のメカニズムが明らかになるにつれ、我々は宇宙実験の成功率をもっと高められるのではないかと考えた。さらに、宇宙実験機会をタイムリーに、かつリーズナブルな価格で提供できるようになれば、実用的なタンパク質構造解析に宇宙実験機会を有効に利用でき、タンパク質分子の精細な3次元構造の解明につながるのではないかと考え、新しいプロジェクトを実施した。

1.5 JAXA 高品質タンパク質結晶生成プロジェクト

そこで 宇宙航空研究開発機構 (JAXA) では、2003年から2005年にかけて「タンパク質構造・機能解析のための高品質タンパク質結晶生成プロジェクト (JAXA (NAS-DA)-GCF プロジェクト)」を実施し⁷⁾、また引き続いて2006年から2008年にかけて、「ロシアサービスモジュール利用タンパク質結晶生成実験 (JAXA-NewGCF (NGCF))」を実施して、合計9回の宇宙実験を行った。このプロジェクトでは、ロシアの輸送手段を利用することによって、年2回の確実な実験機会を確保し、また、宇宙実験参加の手続き・準備などをできるだけ標準化して、従来よりも容易に宇宙実験を利用できることを目指した。また微小重力環境のメリットを生かせるようにさまざまな技術開発を行った。この結果、現時点では以下に示す点に留意すれば、宇宙実験で回折分解能の改善を期待できるようになった。

- (1) 注意深く精製を用い、電荷的均一度が非常に高いタンパク質試料を調製する。
- (2) 事前に結晶成長速度の実測を行い、宇宙実験で結晶周辺にタンパク質ならびに不純物の欠乏層が形成されるかどうかを、拡散モデルにより見積もる。
- (3) 結晶生成に際して、核形成確率が低い場合には、マイクロシーディング等を適用する。
- (4) 宇宙実験はカウンターディフュージョン (CD) 法の結晶化容器を使うため、この方法に合わせて結晶化条件を最適化する。
- (5) 結晶化容器からの確実な結晶の取り出しと、放射光実験施設でのX線回折実験での放射線損傷を防ぐための凍結処理に際しては、結晶のハーベスト溶液、クライオプロテクト溶液の最適化を行い、確実な結晶のハンドリングを行う。
- (6) 高分解能回折像に配慮したX線回折データの取得を行う。

特に、これまでの経験から、地上の一般的な結晶化実験

で2Å前後の回折分解能であったタンパク質試料に関しては、1Å台前半の回折分解能まで改善できる可能性が高い。

以下では、これまでに良好な高分解能回折データが得られた結晶生成例について紹介したい。

2. 高分解能回折データ取得例

2.1 α-アミラーゼの例

Aspergillus oryzae 由来 α-アミラーゼは、ポリエチレングリコール (PEG) を結晶化試薬として得た結晶を用いて、2.1 Å 分解能で構造が解かれ、PDBに登録されている⁹⁾。このタンパク質の結晶化試薬は、PEGのほかに硫酸が知られているが、JAXA-GCFでは結晶化温度は20°Cに設定されており、この温度では硫酸条件では結晶は生成しない。そこで、20°Cで結晶が生成する、PEGを結晶化試薬とした条件で宇宙実験を試みることにした。過去に報告されているこの温度での結晶化実験では、クラスター結晶になりやすく、単結晶を得ることは困難であった (Fig. 2)。しかしながら、微小重力環境でのタンパク質欠乏層形成の効果により、単結晶生成を期待できるかもしれないと想定した。当初は Granada Crystallization Box (GCB) を用い、Gel-Acupuncture 法での CD 法¹⁰⁾、後に Gel-Tube (GT) 法¹¹⁾による結晶化を行った。

また、α-アミラーゼには、通常、若干電荷の性質が異なるアイソザイムが含まれており、それが分解能の低下にもつながると考えられた。そこで、イオン交換クロマトグラフィーと疎水性クロマトグラフィーを組み合わせて精製し、アイソザイムを含まない試料に精製した。

この結果、宇宙実験ではクラスター化が解消され、空間群 P2₁2₁2₁ で0.89 Å 分解能 (SPring-8 BL12B2) を示す単結晶が得られた (Fig. 3)。同条件での地上生成結晶はクラスター化が激しく、X線回折実験には供用できなかった。



Fig. 2. Alpha-amylase crystal grown in terrestrial gravity by the vapour-diffusion method

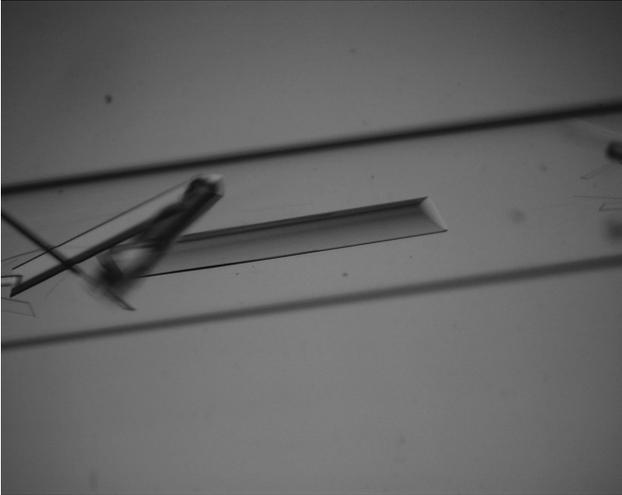


Fig. 3 Alpha-amylase crystal grown in microgravity by the counter-diffusion method

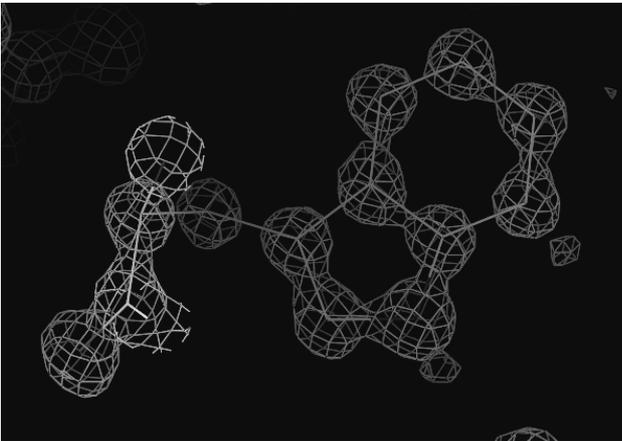


Fig. 4 Electron density map of alpha-amylase crystal grown in microgravity

た。後日、同一試料を用いて、蒸気拡散法で注意深くシーディングを適用し結晶化を行ったところ、最高で 1.12 \AA の回折分解能を示す単結晶を得た。この地上生成結晶での分解能の改善は主に、タンパク質試料に含まれるアイソザイムが除かれたことによると思われるが、宇宙実験で得た結晶ではさらに良好な回折分解能値を示している。

宇宙生成結晶で得たX線回折データより求めた電子密度図をFig. 4に示す。水素原子に由来する電子密度が同定されているほか、これまで生化学的には見知らなかった、糖鎖付加の可能性がある構造が見つかった。

宇宙実験における、この試料の回折分解能の改善、ならびにクラスター化の抑制は、別稿にあるように、成長中結晶の周囲にタンパク質ならびに不純物の欠乏層形成によると考えられる¹²⁾。

2.2 リゾチームの例

α -アミラーゼの微小重力環境での結晶化実験が有効で

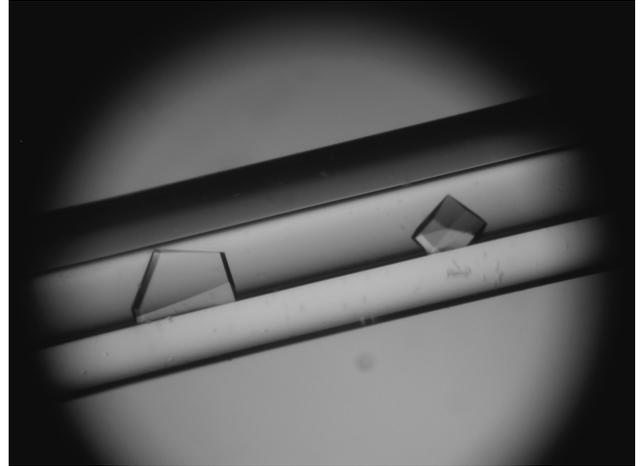


Fig. 5 Lysozyme crystal grown in microgravity by the counter-diffusion method

あった理由が溶液の粘性にあったのではないかと考え、意図的に粘性を高めることでリゾチームの微小重力環境での結晶化に与える影響を検討した。

リゾチームは世界でも頻繁に宇宙実験に供用されており、これまでの最高回折分解能はGCBを考案したGarcia-Ruizらのグループが宇宙実験により得た 0.94 \AA であった(空間群 $P4_32_12$)。この実験では、リゾチームの一般的な結晶化試薬である塩化ナトリウムを結晶化試薬として用いていたが、溶液の粘性は低い。そこでこの結晶化試薬にPEGを添加して溶液の粘性を高め、分解能を向上させることを期待して宇宙実験による結晶化を試みた。また、リゾチーム試料には一般に2量体等の不純物が含まれていることから、イオン交換クロマトグラフィーで試料を精製し、宇宙実験に供用した。

宇宙実験では、GCBを用い、GT法¹¹⁾によるCD法で結晶化を行ったところ、Fig. 5のような結晶を得ることができ、 0.88 \AA の回折分解能(SPring-8 BL12B2)を示した⁷⁾。得られた電子密度図からは、水素原子や、未知の配位分子に由来する電子密度、さらにマルチコンフォメーション(同一部位が複数の構造をとる)の様子などが明らかになった。このため、今後の宇宙実験ではPEG系の結晶化試薬を積極的に用いた結晶化条件を用いるように検討した。

2.3 プロスタグランジンD合成酵素の例

プロスタグランジンD合成酵素(Prostaglandin D Synthase (PGDS); EC5.3.99.2)は、造血器型(Hematopoietic) (H-PGDS)ならびにリポカリン型(Lipocalin-type) (L-PGDS)があり、前者はアレルギー反応等に、後者は睡眠の誘発等に関わっていることが知られている^{13,14,15)}。このため、これらの酵素の、それぞれに選択的な阻害剤の設計は、選択性の高い薬剤の創出に重要である。

これらPGDSの結晶化は、1997年打上げのSTS-84、な

らびに2003年打上げのSTS-107においても搭載され、蒸気拡散法による宇宙実験が試みられてきた。また、JAXA-GCFでも複数回、宇宙実験での結晶化を試みた。しかしながら、結晶生成の確実性や、回折分解能の向上には改善の余地があった。このため、我々は上述した技術成果を応用して、JAXA-NGCFで、再度結晶化実験を試みた。

2.3.1 H-PGDS

H-PGDSは、地上での結晶化では、細かな結晶が大量に生成するという性質があり、X線回折実験に供用可能な大きさの結晶はなかなか生成しないという問題点があった。そこでこの問題を回避するため、従来の結晶化実験では、マイクロシーディング法を適用していた。宇宙実験の実施に関しては、H-PGDSはPEGを結晶化試薬として結晶生成するため、溶液の粘性は高いことから、宇宙実験に適した試料であると考えられた。

JAXA-NGCF宇宙実験の場合、結晶化容器への試料の充填から微小重力環境に置かれるまでに、最低でも数日、標準的には10日程度の時間を要する。このため、シーディング法ではその間、シードが溶けず、成長もしない濃度のPEGを含むタンパク質試料溶液を準備しなければならない。幸いH-PGDS試料の場合、このような溶液条件を見つけることができたため、マイクロシーディング法をCD法に適用することが可能となった。

一方、H-PGDS試料に関しても、他のタンパク質試料でしばしば経験するのと同様に、複数のアイソザイムと思われる成分を含むことが明らかとなった。このため、イオン交換クロマトグラフィーでアイソザイムを単離精製した。さらに、この酵素に対して多種類の様々な構造の阻害剤を入手できたため、それらの複合体を10種以上、宇宙実験に供用した。結晶化はJAXA-NGCFの標準的な結晶化容器であるJAXA Crystallization Box (JCB)を用いたCD法で実施した。

この結果、生成結晶の回折分解能やその他の指標で表される品質は、いずれの複合体でも宇宙実験により改善した。地上生成結晶の回折分解能が阻害剤の種類に応じて1.5~2.0 Åであったのに対し、宇宙生成結晶では1.1~1.8 Å (SPring-8 BL41XU, SLS S06SA)であった。特に、H-PGDSに対する阻害活性が高い阻害剤が結合した複合体ほど、回折分解能の改善が著しかった。このことはH-PGDSの場合、宇宙実験による結晶中の分子の配向性は充分に高くなっており、結晶の回折分解能の改善には、さらにタンパク質分子自身の構造揺らぎを抑制できることが重要であることを示唆している。宇宙実験で得た最高分解能の結晶では、タンパク質に結合する阻害剤の電子密度が、原子レベルで識別できており、結合の様子を確認することができた。

2.3.2 L-PGDS

L-PGDSは、飽和濃度に近いクエン酸を結晶化試薬とする結晶化条件しか知られていなかった。また、結晶生成

の確率が低く、良好なシーディング条件を見つけることも困難であった。このため、過去に行った宇宙実験では、いずれも地上対照実験では結晶生成が認められたものの、宇宙実験で核形成が抑制され、結晶を得ることができなかった。この際の地上生成結晶の回折分解能は2.2 Å程度であった。もともとクエン酸溶液は粘性が低く、微小重力の効果は期待しにくい。このため、PEGを基本成分とする結晶化条件を最初から探索しなおしたところ、良好な結晶を生成する条件を見つけることができた。この条件でも、自発的な核形成の確率は高くなかったが、マイクロシーディング法を適用することができ、JCBを用いたCD法で結晶生成が可能となった。またL-PGDS試料に関しても、H-PGDS同様、イオン交換クロマトグラフィーで極限まで精製した。

この試料を、JAXA-NGCFにて宇宙実験に供したところ、最高で0.98 Åの回折分解能 (SPring-8 BL41XU)を示す結晶を得ることができ、現在、構造解析中である。この結果は、宇宙実験で有用な成果を確実に得るためには、地上での結晶化の経過を踏まえつつ、場合によっては宇宙実験に適した条件になるように大幅に見直すべきであることを示している。

ま と め

このように、JAXA-GCF, JAXA-NGCF宇宙実験では、様々な技術開発成果を応用することにより、高分解能結晶が得られるようになってきた。また、その構造データからは、地上生成結晶では分からなかった、詳細な構造情報を得ることができた。特に1 Å台前半の回折分解能のデータセットの取得が期待でき、結果として、目的タンパク質の詳細な立体構造や、どのようにリガンド分子がタンパク質分子と結合しているかという様態が、正確に分かるようになってきた。

宇宙実験機会の頻度は、現状、年2回程度であり、また、申し込みから結晶を手元に得るまでの期間は、早くても7~8ヶ月は要するので、一般に結晶構造解析分野で言われる、ハイスループットな構造解析には適さない。他者よりも早く最初の構造を取得することを目指す場合は、地上でそれなりの回折分解能の結晶を得ることを目指すほうが現実的である。宇宙実験機会の利用方法としては、むしろ、高分解能結晶を生成して詳細な立体構造を得ることを目指す方が良い。例えば、数種類~数十種類の阻害薬物を準備し、これらと対象タンパク質との複合体結晶の生成を目指した試料をまとめて打ち上げ、宇宙実験で高分解能の結晶が得られれば、複数の複合体構造の詳細が明らかとなりそれらを比較したことによりリード化合物の分子設計に役立つ有用な情報が得られる。一種の戦略的な利用方法であるが、実際の創薬プロセスでは有用性が高いのではないかと考えている。低および中分解能のあやふやな立体構造をもとに分子設計を実施して、その有効性に悩むよりは、

「百聞は一見にしかず」で、より高分解能のデータを用いた、高精度の立体構造情報に基づく設計を実施すべきである。

謝辞

JAXA-GCF プロジェクトにおいて、GCB を用いた結晶化実験への有用なアドバイス、ならびに射場作業を支援していただいた、スペイン/グラナダ大学の J.-M. Garcia-Ruiz 教授とその研究グループのメンバーに感謝いたします。また、欧州の宇宙実験機会を提供していただいた欧州宇宙機関、ならびにベルギー国政府と、宇宙実験のためにロシアサービスモジュールを提供いただいたロシア連邦宇宙局と RSC エネルギア社に感謝いたします。また、大型放射光施設 SPring-8 BL12B2 および BL41XU の使用に当たり財団法人高輝度光科学研究センターに、スイス放射光施設 SLS S06SA の使用に当り Paul Scherrer Institut (PSI) に感謝いたします。

参考文献

- 1) N. E. Chayen and E. Saridakis: *Nature Methods*, **5** (2008) 147.
- 2) R. E. Cachau and A. D. Podjarny: *J Mol. Recognit.*, **18** (2005) 196.
- 3) A. McPherson: *Crystallization of Biological Macromolecules*, Chap. 10, p435, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1999
- 4) J. Hakanpää, M. Linder, A. Popov, A. Schmidt and J. Rouvinen: *Acta Cryst.*, **D62** (2006) 356.
- 5) F. Otárola, M. L. Novella, J. A. Gavira, B. R. Thomas and J. M. García-Ruiz: *Acta Cryst.*, **D57** (2001) 412.
- 6) B. R. Thomas, A. A. Chernov, P. G. Vekilov and D. C. Carter: *J. Crystal Growth*, **211** (2000) 149.
- 7) M. Sato, H. Tanaka, K. Inaka, S. Shinozaki, A. Yamanaka, S. Takahashi, M. Yamanaka, E. Hirota, S. Sugiyama, M. Kato, C. Saito, S. Sano, M. Motohara, T. Nakamura, T. Kobayashi, S. Yoshitomi and T. Tanaka: *Microgravity sci. technol.*, **XVIII** -3/4 (2006) 5.
- 8) J. R. Helliwell and N. E. Chayen: *Nature*, **448** (7154) (2007) 658.
- 9) H. J. Swift, L. Brady, Z. S. Derewenda, E. J. Dodson, J. P. Turkenburg and A. J. Wilkinson: *Acta Cryst.*, **B47** (1991) 535.
- 10) J. M. Garcia-Ruiz and A. Moreno: *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 484.
- 11) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: *J. Synchrotron Rad.*, **11** (2004) 45.
- 12) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: *Ann. N.Y. Acad.Sci.*, **1027** (2004) 10.
- 13) 裏出良博: *蛋白質核酸酵素*, **53**(3) (2008) 217.
- 14) 裏出良博, 江口直美, 有竹浩介, 早石 修: *日薬理誌 (FoliaPharmacol. Jpn.)* **127** (2004) 5.
- 15) 裏出良博: *脳と精神の医学*, **18**(4) (2007) 265.

(2008年3月27日受理)