

塩類のタンパク質結晶化作用に関する研究

若松 孝

茨城工業高等専門学校電気電子システム工学科

概要 タンパク質の構造解析は、バイオ・生命科学の研究や医薬品への応用に不可欠であり、そのためには良質のタンパク質結晶が必要である。しかしながら、タンパク質の結晶化条件の探索は、現状では試行錯誤で行われており、結晶作製には多大な時間と労力を要している。タンパク質の結晶化は、一般に高純度・高濃度のタンパク質溶液に、NaCl 等の塩類を適宜添加して行われる。タンパク質の結晶作製で塩が結晶化剤として重要な役割を果たす一方、塩のタンパク質結晶化作用は、未だ詳しくは解明されてはおらず、タンパク質結晶作製の際に添加する塩の種類や濃度等の諸条件は、経験的に見出されたものである。

これまでに我々は、低角の前方光散乱がタンパク質の凝集・結晶化に極めて高感度であることを見出している。当研究では、前方光散乱法を用いて、結晶化のモデルタンパク質であるリゾチーム(ニワトリ卵白由来, HEWL)を対象に、塩素イオンを共通に含む各種正塩(NaCl, KCl, MgCl₂ 及び CaCl₂)による結晶化作用について調査した。

HEWL 溶液の前方静的光散乱(F-SLS)特性は、添加した各塩の濃度に大きく依存し、ある塩濃度以上では非整数のべき乗則を示すことが分かった。これは、結晶化前の溶液状態でリゾチームがフラクタル凝集を形成することを示唆する。さらに、各塩添加による HEWL の結晶化条件と HEWL 溶液の F-SLS 特性との関係を調べた結果、塩の添加によって結晶化に進行する HEWL 溶液では、比較的密なフラクタル凝集体を形成することが判明した。

1. 研究目的

タンパク質の構造解析は、バイオ・生命科学の研究や医薬品への応用に不可欠であり、そのためには良質のタンパク質結晶が必要である。しかしながら、タンパク質の結晶化条件の探索は、現状では試行錯誤で行われており、結晶作製には多大な時間と労力を要している。タンパク質の結晶化は、一般に高純度・高濃度のタンパク質溶液に、NaCl 等の塩類を適宜添加して行われる。塩がタンパク質の結晶作製で結晶化剤として重要な役割を果たす一方、塩のタンパク質結晶化作用が、未だ詳しくは解明されてはおらず、タンパク質結晶作製の際に添加する塩の種類や濃度等の諸条件は、経験的に見出されたものである。

これまでに我々は、タンパク質結晶化溶液の低角度における前方光散乱が、結晶化前の溶液状態、すなわち、タンパク質の凝集体や結晶核の形成に極めて高感度であることを見出している^[1,2]。さらに、高感度な前方光散乱計

測技術を活用して、タンパク質結晶化溶液の前方光散乱を高精度に測定できる、タンパク質結晶化分析装置を開発している^[3]。

本研究では、開発の分析装置を使用して、代表的なモデルタンパク質のリゾチームを対象に、結晶化剤としてよく用いられている、塩素イオンを共通に含む正塩 NaCl、KCl、MgCl₂、及び CaCl₂ の結晶化作用について調査した。

2. 研究方法

2.1 リゾチームの結晶化法と結晶化溶液の作製

リゾチームは、結晶化のモデルタンパク質として古くから研究され、詳細にその結晶化条件が調べられているタンパク質であるため、本研究でも研究対象として選択した。タンパク質の結晶化法には、一般に、タンパク質溶液に結晶化剤(塩)を混合させ、容器内に溶液を封止して結晶化

させるバッチ法、濃度差の大きなタンパク質溶液と結晶化剤溶液をキャピラリー中で拡散させて結晶化させる液体-液体拡散法、タンパク質溶液のドロップと結晶化剤溶液を同一の密閉した容器中に入れ、それらの蒸気平衡によって結晶化させる蒸気拡散法（ハンギングドロップ蒸気拡散法）などがある^[4]。本研究では、タンパク質と結晶化剤（塩）の各濃度を設定できるバッチ法により、リゾチームの結晶化実験を行った。

リゾチームタンパク質には、生化学バイオビジネス(株)から購入したニワトリ卵白リゾチーム (Hen Egg-White lysozyme: HEWL, 分子量 14,307, 等電点 10.5-11.0)を用いた。これは、六回結晶化・精製した高純度の原料であり、精製せずにタンパク質原料として使用した。これを 0.05 M 酢酸-酢酸 Na の緩衝液 (pH 4.5-4.6) に温度 20°C で溶かし、濃度 90 mg/mL (6.3 mM) の HEWL 溶液とした。結晶化剤には、塩素イオンを共通にもつ各種正塩 NaCl、KCl、MgCl₂、及び CaCl₂ を用いた。温度 20°C で酢酸-酢酸 Na 緩衝液に各塩を溶かし、それぞれ濃度 15%(w/v) の結晶化剤溶液を作製した。各作製溶液を 0.2 μm 径のフィルターに通過させ、溶液から結晶核となる埃などの異物を除去した。

作製した HEWL 溶液、結晶化剤溶液、及び緩衝液を適宜の割合で混合させて、HEWL 濃度 10~30 mg/mL、塩濃度 0~9%(w/v) の濃度条件下で HEWL 結晶化溶液を調合した。なお、これらの各種溶液を冷蔵庫内に保管し (4°C)、測定の際に溶液を室温 20°C まで戻してから、適宜濃度条件で混合して、結晶化実験や光散乱測定を行った。

2.2 溶液の塩濃度と導電率の測定

塩分計 (HORIBA C-121) を用いて、調合した各溶液の塩濃度 (Na⁺濃度) を測定した。塩分計の校正は、0.5%と 5.0%(w/w) の NaCl 水溶液により行った。また、溶液の電気導電率の測定には、導電率計 (HORIBA B-173、及び DS-71) を用いた。導電率の校正には、0.1 M の NaCl 標準水溶液 (YOKOGAWA、温度 25°C で 10.67 mS/cm) を用いて行った。

これら校正した塩分計と導電率計を用いて、室温 20°C で 0.1 M 濃度の NaCl 標準水溶液 (和光純薬工業) の塩濃度と導電率を測定したところ、その塩濃度は 0.54%(w/w)、導電率は 9.6 mS/cm であった。得られた塩濃度と導電率

の各測定データを参考にして、リゾチーム結晶化で使用する、作製した緩衝液や結晶化塩溶液の濃度や導電率を測定し、各溶液濃度の設定を確認した。なお、調合した酢酸-酢酸 Na 緩衝液 (0.05 M, pH 4.6) の各測定値は、Na イオン濃度 0.17%(w/w)、導電率 4.2 mS/cm であった。

2.3 静的光散乱法とフラクタル凝集

光散乱 (LS) 法は、測定対象に非接触で低ダメージの計測方法であり、サイズが数十 nm~数 μm 程度の微粒子に対して有効な分析方法である。LS 法には大きく分けて、測定対象からの光散乱の時間的応答を計測・解析する動的散乱 (DLS) 法、及び光散乱の放射パターンを計測・解析する静的散乱 (SLS) 法がある。ここでは、本研究で用いた SLS 法について述べ、次に、光散乱測定で評価される、代表的な凝集体形成であるフラクタル凝集について触れる。

サイズが光波長スケール程度の測定対象に光を照射して、対象物からの散乱光を時間平均化した静的散乱光の強度 $I_s(q)$ は、次のように表される^[5]。

$$I_s(q) \propto M \frac{|fE_m|^2}{R^2} S(q) \quad (1)$$

ここで、 M は散乱体の総数 (又は全質量)、 f は散乱振幅、 E_m は入射光の振幅、 R は散乱体から検出器までの距離、及び $S(q)$ は散乱体の構造因子である。また、散乱ベクトル q は、次式で表される。

$$q = 2nk_0 \sin\left(\frac{\theta_s}{2}\right) \quad (2)$$

ここで、 k_0 は真空 (空気) 中における入射光の波数 ($k_0=2\pi/\lambda$)、 n は測定対象の周囲媒質、例えば、試料溶液の屈折率、 θ_s は散乱角度である。さらに散乱体の構造因子 $S(q)$ は、散乱体の平均局所密度 (密度相関関数) $\langle \rho(r) \rangle_0$ のフーリエ変換で表される^[5]。

$$S(q) = \int d^3\mathbf{r} \langle \rho(r) \rangle_0 e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} \quad (3)$$

ここで、 r は散乱粒子間の距離である。従って、静的散乱光の測定から、散乱体の構造因子 $S(q)$ を介して散乱体の微細構造に関する情報を得ることができる。

金属や高分子などのコロイド微粒子は、ある条件下で自己相似フラクタルな凝集体 (フラクタル・クラスター) を形成することが知られている。3次元空間で次元 D のフラクタルは、フラクタルサイズ範囲で $\langle \rho(r) \rangle_0$ は、次のように表さ

れる^[5]。

$$\langle \rho(r) \rangle_0 = cr^{D-3} \quad (4)$$

ここで、 c は定数である。よって、式(4)と式(3)から、 $S(q) \propto q^{-D}$ の関係が得られる。

従って、フラクタル凝集体の静的光散乱特性 (I_s - q) は、次のようにべき関数型の放射パターンとなる。

$$I_s(q) = I_0 q^{-D} \quad (5)$$

金属や高分子のコロイド微粒子と同様に、結晶化前でタンパク質凝集がフラクタル凝集を形成するならば、SLS測定から、フラクタル凝集体のパッキング度を示すフラクタル次元 D を計測でき、タンパク質の凝集状態を評価できる。

2. 4 前方光散乱測定

これまでに我々は、低角度 ($< 8^\circ$) の前方光散乱を高精度に計測できる、タンパク質結晶化分析装置^[3]を独自に開発している (Fig. 1)。この分析装置は、小型固体レーザー ($\lambda=473$ nm, 出力 25 mW) を搭載し、タンパク質結晶化溶液へレーザー光を垂直に照射し、 2θ 自動回転ステージを駆動して散乱角 θ_s を微小角ステップ (通常 0.1°) で走査しながら、その 2θ 回転ステージ上に設置した小型光検出器により、試料からの散乱光の散乱角依存性を高精度に測定できる。また、測定試料に応じて散乱光測定が行えるように、入射側には光量フィルターを設置し、入射光強度の調整が可能である。

測定試料溶液セルは、直径約 7 mm の穴を開けた厚さ

約 1 mm のシリコンゴムシートを、2 枚の顕微鏡用カバーガラス (32×18 mm, $t=0.15$ mm) で挟んだものであって、この穴とカバーガラスで形成される容器内に試料溶液 (約 18 μ L) を注入し封止した。試料溶液セルは、 2θ 回転ステージと同軸連動する θ 回転ステージ上の試料ホルダーに固定された。散乱光の計測には、小型の固体光電子増倍管を使用した。試料溶液セルと検出器の間には、ある距離隔てて 2 枚の光学絞りを設置し、検出器への迷光や透過光の検出器への入射を防止した。光電子増倍管で検出された散乱光の強度信号を低ノイズ増幅器で増幅し、A/D コンバータを介して光散乱データをコンピュータへ取り込んだ。

3. 研究結果

3. 1 リゾチームの結晶化条件

調査した HEWL 溶液 (90 mg/mL)、各結晶化剤塩溶液 (15%w/v) 及び緩衝液を、適宜の割合でマイクロチューブ (1.5 mL)、またはマイクロウェルプレート (0.3 mL) 内で混合して、蒸発防止用にシールで封止し、溶液セルを室温 20°C で静置した。HEWL 結晶化溶液の調査混合した後、NaCl、KCl、及び MgCl_2 添加の場合 1~3 日後に、結晶成長の遅かった CaCl_2 添加では 5~10 日後に、ルーペ ($\times 10$) と光学顕微鏡 ($\times 20 \sim \times 80$) で溶液試料を観察し、HEWL 結晶化の判定を行った。Table 1 と Table 2 は、それぞれ NaCl と CaCl_2 添加による結晶化実験の結果である。これらは、NaCl 添加で 2 日後、 CaCl_2 添加で 5 日後における観察である。また、Fig. 2 は、NaCl 添加で 2 日後に撮影した

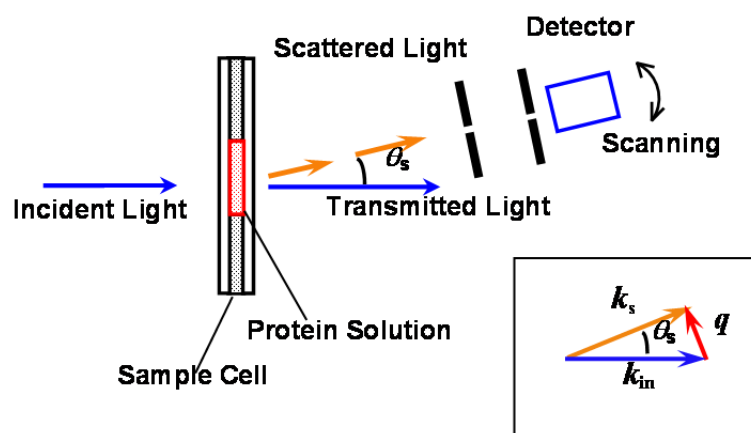


Fig. 1. Schematic of experimental setup

NaCl₂ 濃度 3.0%と 4.0%(w/v)の結晶化溶液(HEWL 濃度 30 mg/mL)の写真である[各 Figs. 2(a), (b)]. Tables 1, 2 から、HEWL 濃度が大きく、NaCl 濃度が高いほど HEWL が結晶化し易いことが分かる。一方、添加塩の濃度が高過ぎると、例えば、HEWL 濃度 30 mg/mL で NaCl 濃度 9%(w/v)以上では、一度に多くの微小な沈殿物が生成され、溶液が白濁化した(沈殿領域)^[6]。この領域では、大型のタンパク質結晶が得られ難く、沈殿領域は、一般に結晶作製には適さない。また、HEWL 濃度が大きいほど、一度に多数の微結晶(サイズ<0.1 mm, $N > 50 \sim 100$)が形成される傾向にあり、高過ぎる HEWL 濃度条件は、結晶作製には不向きであった^[6]。さらに、Tables 1, 2 と同様に KCl や MgCl₂ の添加でも、結晶生成されない溶解(未飽和)領域、及び沈殿領域、それらの領域の間に、タンパク

質の結晶生成に適する準安定領域が存在した。特に準安定領域の未飽和領域近くで、形成結晶数が少なく、大型のリゾチーム結晶が得られ易いことが分かった。

濃度 30 mg/mL(2.1 mM)の HEWL 溶液に対する、各塩の結晶化の境界濃度を Table 3 に示す。各塩とも共通の塩素イオンを含み、一価の正イオン(Na⁺, K⁺)の塩では、結晶化の境界濃度は同じであったが、二価の正イオン(Mg²⁺, Ca²⁺)では、境界濃度に若干の差が見られた。また、塩濃度が同じであれば、二価正イオンを含む MgCl₂ や CaCl₂ の塩は、溶液中で NaCl や KCl の 1.5 倍、全イオン濃度が高くなる。しかし、MgCl₂ や CaCl₂ の添加による結晶化境界の塩濃度は、予想値よりも大きい。このように結晶化では、単なるイオン濃度だけでなく、添加塩のイオン種の影響があると見られる。

Table 1. Crystallization condition of HEWL with NaCl at 20°C

NaCl (%w/v)	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
HEWL (mg/mL)								
30	—	—	—	—	○	○	○	○
20	—	—	—	—	△	○	○	○
10	—	—	—	—	—	△	○	○

○ Crystallization, — No Crystallization, △ Crystallization or not

Table 2. Crystallization condition of HEWL with CaCl₂ at 20°C

CaCl ₂ (%w/v)	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
HEWL (mg/mL)								
30	—	—	—	—	—	△	○	○
20	—	—	—	—	—	—	—	○
10	—	—	—	—	—	—	—	—

○ Crystallization, — No Crystallization, △ Crystallization or not

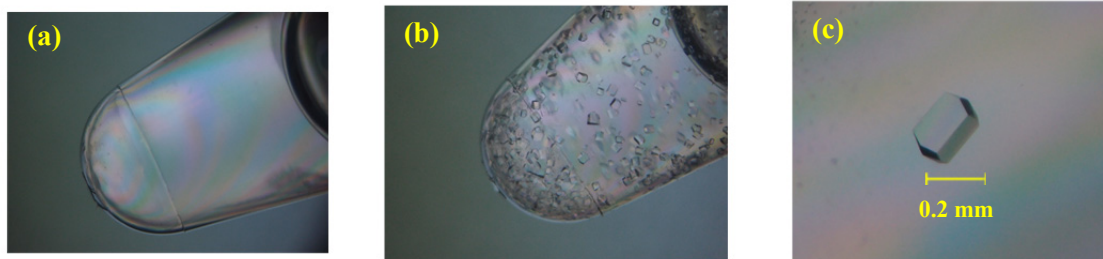


Fig. 2. Photographs of crystallizing lysozyme solutions at 30 mg/mL (2.1 mM) after two days: (a) with 3.0%(w/v) NaCl, (b) with 4.0%(w/v) NaCl, and (c) photograph of a typical of fabricated lysozyme crystal.

3. 2 リゾチーム結晶化溶液の前方静的光散乱特性

Fig. 3 に結晶化前におけるリゾチーム溶液の光散乱の様子を示す。Fig. 3(a)は、リゾチーム溶液にレーザー光を照射したときの試料セルの写真であり、Fig. 3(b)は、試料セルから前方(透過光の進む)方向に約 2 m 離れたスクリーン上に映した、透過光(中心の明部)と散乱光(その周囲に広がった明るい部分)の写真である。結晶化前の HEWL 溶液は、このように低角度で散乱光が顕著となる前方光散乱を示す。

NaCl を含む HEWL 溶液の静的光散乱特性を Fig. 4 に示す。NaCl を HEWL 溶液に添加して約 20 分経過後に溶液の光散乱測定を行った。Fig. 4(a)から分かるように、HEWL 溶液の散乱光は、散乱角 θ_s が約 6° 以下の低角度で大きくなる、前方光散乱が特徴的である。NaCl 濃度 3%(w/v)の HEWL 溶液の光散乱は、無添加の溶液の場合(0%)に比べてほとんど変化が見られないが、NaCl 濃度 4%と 5%(w/v)では、散乱光が顕著に増大している。これらの静的光散乱パターンを詳しく調べるために、散乱光強度 I_s - 散乱ベクトル q (ただし、入射光の波数 k_0 で規格化)の両対数のデータを Fig. 4(b)に示す。光散乱の小さ

い NaCl 濃度 0%及び 3%(w/v)の HEWL 溶液を比べて、NaCl 濃度 4%と 5%(w/v)では、両対数の光散乱特性が、負の傾きをもった直線となった。すなわち、ある塩濃度以上の NaCl を含む HEWL 溶液の光散乱パターンは、べき乗則 $I_s(q) \propto q^{-\alpha}$ を示す^[6,7]。ここで、 α は非整数のべき数であり、この場合、 $\alpha = 1.76 \pm 0.05$ である。このようにべき乗則の光散乱パターンが式(5)と同じであることから、NaCl 添加によってリゾチームが、フラクタル凝集体(フラクタル・クラスター)^[5]を形成したものと考えられる。

添加塩が NaCl 以外の塩、すなわち KCl、MgCl₂、及び CaCl₂ である場合の HEWL 溶液の前方光散乱特性(両対数表示)を Figs. 5(a)~(c)に示す。いずれの場合も F-SLS 特性は、添加した塩濃度に大きく依存している。塩濃度が高いと、NaCl 添加と同様に SLS 特性が直線になり、べき乗則を示すことが分かる。リゾチームの結晶化実験から、KCl や MgCl₂ 添加の方が CaCl₂ よりも HEWL の結晶化が進行し易いことが判明しており、KCl と MgCl₂ の添加では、べき数 α が比較的大きいが ($\alpha > 1.5$)、結晶成長が比較的遅い CaCl₂ では、 $\alpha < 1.2$ と小さい。CaCl₂ 添加の場合、HEWL 凝集のフラクタル次元が小さく、すなわち、凝集の

Table 3. Precipitant salt concentrations on crystallizing boundary conditions for HEWL of 30 mg/mL at 20°C

Precipitant salt	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	
Concentration	%(w/v)	3.5	4.5	3.0	5.0
	mol/L	0.60	0.60	0.50	0.45

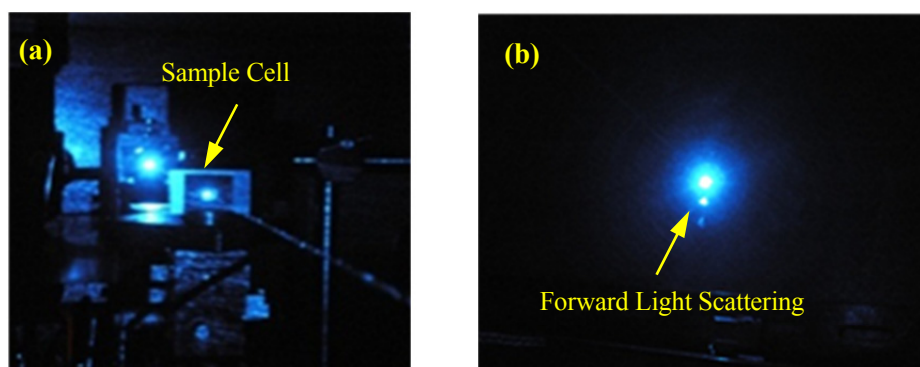


Fig. 3. Photographs of light scattering for crystallizing lysozyme solution: (a) for the solution cell, (b) on a screen far from the solution.

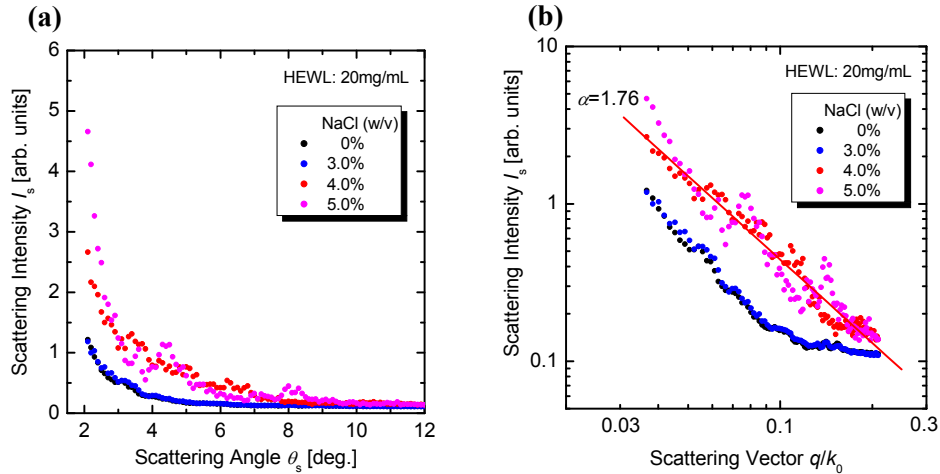


Fig. 4. Forward light scatterings for HEWL solutions at 20 mg/mL with the precipitant salt NaCl: **(a)** scattering light intensity I_s vs. scattering angle θ_s , **(b)** both-logarithmic plots of I_s as a function of scattering vector q (normalized by the wavenumber of incident light k_0)

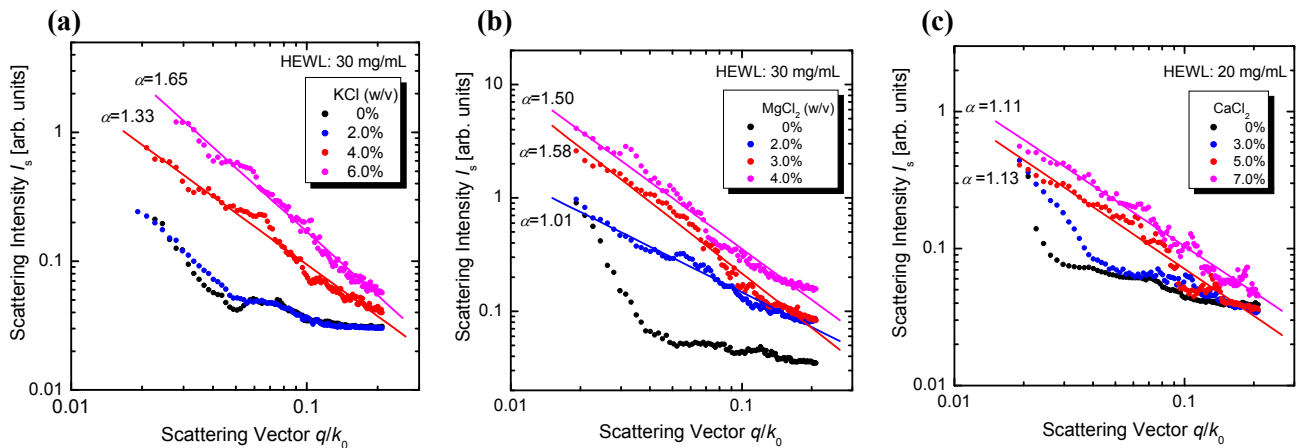


Fig. 5. Forward light scatterings for HEWL solutions at 30 or 20 mg/mL with the precipitant salts: **(a)** KCl, **(b)** MgCl₂, and **(c)** CaCl₂

充填度が低いことから、他の塩添加に比べてリゾチームの結晶成長も遅いことが分かる。F-SLS 特性から算出したべき数 α と各塩濃度との関係を **Fig. 6** に示す。添加塩の濃度が高いほど、べき数 α の値も大きくなり、HEWL 凝集のフラクタル次元 $D(=\alpha)$ が大きくなること分かる。これは、塩濃度が高いほど、溶液中でリゾチームがより密にフラクタル凝集体を形成することを示している。結晶化条件 (Tables 1, 3) と対比すると、NaCl の場合 (**Fig. 6(a)**)、 $\alpha \sim 1.5$ 付近が結晶化の境界条件に対応していることが分かる。**Fig. 6(b)** が示すように、NaCl と同様、他の塩についても添加塩の濃度が高いほど、べき数 α が大きくなり、塩の凝集

効果が大きく、リゾチームが結晶化しやすい傾向にある。

4. 考察

前方光散乱 (F-SLS) 法を用いて、塩素イオンを共通にもつ各種正塩 (NaCl, KCl, MgCl₂, 及び CaCl₂) によるリゾチームタンパク質の結晶化作用について調査した。それらの結果をまとめると、次のようになる。

- (1) 添加する塩がある濃度以上では、HEWL 溶液の光散乱パターンは、非整数のべき乗則を示す。これは、結晶化前状態の溶液では、リゾチームがフラクタル凝集体を形成することを示唆する。

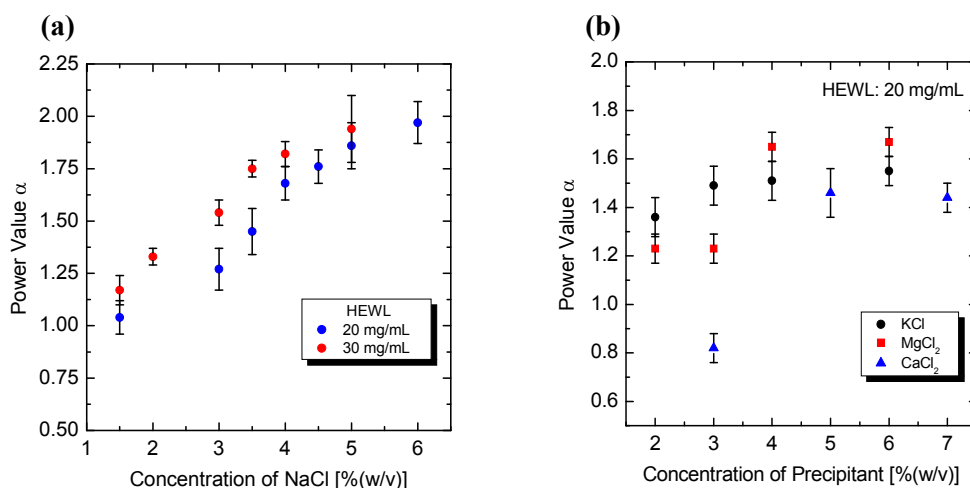


Fig. 6. Dependence of the power value α on the concentration of precipitant salts for HEWL solutions: (a) with NaCl, (b) with KCl, MgCl₂, and CaCl₂

(2) 前方光散乱測定による HEWL 凝集体のフラクタル次元の評価から、塩の添加によって結晶化に進行する HEWL 溶液では、比較的密な凝集体が形成される。

典型的なフラクタル凝集モデルには、拡散律速凝集 (diffusion-limited cluster aggregation, DLCA) と反応律速凝集 (reaction-limited cluster aggregation, RLCA) が知られている^[5]。計算シミュレーションによる DLCA 及び RLCA モデルのフラクタル次元は、それぞれ $D=1.8$ 、及び $D=2.1$ である^[5,8]。一方、結晶化前の金属コロイドは、 $D=1.75\sim 2.05$ のフラクタル凝集体を形成することが報告されている^[8]。これに対して、リゾチームの結晶化前の凝集は、 $1.5\sim 1.8$ とフラクタル次元が小さく、金属コロイドよりも疎な凝集体であり、フラクタル次元から判断すると拡散律速凝集 (DLCA) に近い。

次に、各塩の結晶化作用について考察する。Table 3 に示したように、結晶化境界の塩濃度 (結晶化させるのに必要な塩のモル濃度) は、一価正イオンを含む NaCl と KCl では同じであった。また、結晶化前の HEWL 溶液の F-SLS 特性 (Figs. 4-6) から、NaCl と KCl 添加塩の場合、結晶化した両者の溶液に対しては、べき数 α の値がほぼ一致した。従って、NaCl と KCl は、HEWL に対して同じような結晶化作用があると考えられる。一方、二価正イオンを含む MgCl₂ と CaCl₂ の結晶化境界の塩濃度には、若干の相違が見られた (Table 3)。また、MgCl₂ と CaCl₂ 添加では、一価正イオンの NaCl と KCl 添加に比べて、リゾチー

ムの結晶化に必要なイオン濃度 (モル濃度) が大きくなり、MgCl₂ と CaCl₂ は、NaCl と KCl よりも結晶化度 (結晶化作用) は低いと考えられる。さらに、CaCl₂ の添加では、べき数 α の値が最も小さく (Fig. 5)、リゾチームの凝集度 (密度) が低いために、他の塩添加よりも結晶成長が遅いことが理解できる。

塩のような電解質によるタンパク質の溶解度の低下は、古くから調べられており、イオンの塩析能力 (イオン強度) を経験的に列挙した Hofmeister 系列が知られている。本研究で使用した塩から生成されるイオンの Hofmeister 系列は、 $\text{Cl}^- > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ である。リゾチーム結晶化では、一価正イオン Na^+ 、 K^+ の方が、二価正イオン Mg^{2+} 、 Ca^{2+} よりも結晶化能力が大きいことは、この Hofmeister 系列と良く一致する。これは、親水コロイドのリゾチームの塩析効果が大きいほど、リゾチームの水和を弱める効果が高く、結晶化しやすい傾向にあるためと考えられる。しかしながら、NaCl と KCl の添加塩では結晶化に大きな相違が見られず、塩添加によるリゾチームタンパク質結晶化が Hofmeister 系列に必ずしも従っているとは言い難い。

さらにまた、当研究で用いた各塩のイオン半径の系列は、 $\text{Mg}^{2+} (0.086 \text{ nm}) < \text{Ca}^{2+} (0.114 \text{ nm}) < \text{Na}^+ (0.116 \text{ nm}) < \text{K}^+ (0.152 \text{ nm}) < \text{Cl}^- (0.167 \text{ nm})$ である。ここで () 内の数値はイオン半径である。一般に、イオン半径が小さいほど、価数が大きいほど、イオン強度が高く、タンパク質コロイド

の凝集効果が大きく結晶化させやすいと考えられる。しかし、イオン半径・価数による系列は、経験的に求めた Hofmeister 系列とは一致しない点もある上に、本研究で示したように、リゾチームの結晶化に対しても一致しない点がある。

5. 今後の課題

結晶化前のタンパク質溶液の前方光散乱(F-SLS)測定から、添加塩によってタンパク質がフラクタル凝集体を形成し、そのフラクタル次元が大きいくほど、結晶化し易いことが分かった。リゾチーム以外のタンパク質についても、このような特性があるかどうかを調べる必要がある。また、本研究では、負イオンの塩素イオンを共通とした各種正塩について、すなわち、主に正イオンのリゾチーム結晶化作用を調査した。今後は、負イオンに関するタンパク質結晶化作用を調べる必要がある。塩のイオン種とタンパク質結晶成長の関係を明らかにすることは、タンパク質の結晶作製では重要である。

謝 辞

フラクタル凝集に関して議論して頂いた、茨城工業高等専門学校・機械システム工学科の鯉渕 弘資教授に感謝します。本研究は、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団の平成24年度研究助成により実施した。関係者各位に感謝致します。

参考文献

- [1] T. Wakamatsu, “Forward light scattering for highly sensitive detection of aggregation in crystallizing protein solutions”, *Applied Physics Letters*, **98**, 263701, 2011.
- [2] T. Wakamatsu, S. Toyoshima, and H. Shimizu, “Observation of electric-field-induced aggregation in crystallizing protein solutions”, *Applied Physics Letters*, **99**, 153701, 2011.
- [3] 若松孝, 丸山智章, 大西裕季, 「タンパク質結晶化分析装置及びタンパク質結晶化分析方法」特願 2010-281562, 特開 2012-127904.
- [4] M. Sanderson and J. Skelly, eds., *Macromolecular Crystallography* (Oxford University Press, New York, 2007).
- [5] T. Witten and P. Pincus, *Structured Fluids (Polymers, Colloids, and Surfactants)*, (Oxford University Press, New York, 2004).
- [6] 若松孝, 「前方光散乱によるタンパク質凝集・結晶化の評価」, 第6回バイオ関連化学シンポジウム, 2P-104, 2012.
- [7] T. Wakamatsu and H. Koibuchi, “Characterization of Crystallizing Lysozyme Solutions by Forward Light Scattering”, *The First International Symposium on Biofunctional Chemistry*, P-57, 2012.
- [8] D. A. Weitz, J. S. Huang, M. Y. Lin and J. Sung, “Limits of the Fractal Dimension for Irreversible Kinetic Aggregation of Gold Colloids”, *Physical Review Letters*, **54**, 1416 (1985).

Study on an Effect of Salts on Protein Crystallization

Takashi Wakamatsu

Department of Electrical and Electronics Systems Engineering,
Ibaraki National College of Technology

Summary

A structure analysis of proteins provides fundamental and useful information for the research on biochemistry and life science and for the development of new medicines. The protein crystallography needs good crystals for suitable to x-ray or neutron diffraction. However, crystallization of proteins is a bottleneck because the crystallization is a try and error procedure and requires considerable experimental efforts.

We have found that a forward light scattering at small angles is highly sensitive to aggregations and crystal nucleus formation of proteins in crystallizing protein solutions. We here studied an effect of precipitant salts of NaCl, KCl, MgCl₂ and CaCl₂ with a chloride ion on the protein crystallization, using a forward light scattering technique. Hen egg white lysozyme (HEWL) was used for a model protein of crystallization in this study. The properties of forward static light scattering (F-SLS) depended on a concentration of precipitant salts added to the HEWL solutions. The HEWL solutions showed the F-SLS patterns to be non-integer power law at more than a certain concentration of salts. This indicates that the HEWL proteins form a fractal aggregate with added salts before crystallization. We evaluated relationships between the crystallization conditions with salts and the F-SLS of the solutions in pre-crystallization. The F-SLS characteristics of the HEWL solutions progressing to crystallization exhibited a formation of the protein aggregates of relatively high density.