

蛋白質の凝集・結晶化における塩の効果

若松 孝¹, 田中 大輔², 千葉 薫³, 城所 俊一⁴

¹茨城工業高等専門学校電気電子システム工学科, ²大分工業高等専門学校電気電子工学科,
³茨城工業高等専門学校自然科学科, ⁴長岡技術科学大学大学院

概要 蛋白質の構造解析は、バイオ・ライフサイエンス分野の研究、さらに診断薬や治療薬などの医薬品の開発、及び機能性食品への応用において重要であり、そのためには良質の蛋白質結晶が必要である。しかしながら、蛋白質の結晶化条件の探索は、試行錯誤で行われているのが現状である。蛋白質の結晶化は、一般に高純度・高濃度の蛋白質溶液に、NaCl 等の塩を適宜添加して行われる。結晶化剤として塩が蛋白質の結晶作製で重要な役割を果たす一方、塩の蛋白質結晶化作用は、未だ詳しく解明されてはおらず、蛋白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、経験的に見出されている。

これまでに、蛋白質結晶化溶液の低角度($< 8^\circ$)における前方散乱光が、結晶化前の溶液状態、すなわち、蛋白質の凝集体や結晶核の形成に対して極めて高感度であることを見出し、蛋白質の凝集・結晶化を高感度に分析できる装置を開発している。

今回の研究では、塩による蛋白質の凝集体形成過程を詳しく分析するために、新たに開発した前方散乱光瞬時計測装置を使用して、正塩の NaCl, KCl, MgCl₂, 及び CaCl₂ によるリゾチーム蛋白質(ニワトリ卵白由来, HEWL)の凝集・結晶化作用について調査した。また、塩素イオン以外の負イオンとして硫酸イオン SO₄²⁻を含む塩によるリゾチームの凝集・結晶化についても調べた。

開発の分析装置によって、塩の添加でリゾチーム凝集体が形成される過程(結晶化前段階過程)を分析することに初めて成功した。本研究から、次のことが明らかになった。(1)結晶化する HEWL 溶液では、正塩の添加直後に凝集化が始まるが、密な構造をもつ HEWL 凝集体(フラクタル凝集体, フラクタル次元 $D > 1.5$)が形成するまでには、ある時間(例えば 20 分以上)が必要である。(2)結晶成長が特に遅かった CaCl₂ 添加では、CaCl₂ による HEWL 凝集体の形成にも時間を要する。(3)疎な構造の HEWL 凝集体($D < 1.5$)が形成される溶液(塩添加)では、HEWL 結晶は成長せず、単に沈殿物が生成されることがある。

1. 研究目的

蛋白質の構造解析は、バイオ・ライフサイエンス分野の研究、さらに診断薬や治療薬などの医薬品の開発、及び機能性食品への応用において重要であり、そのためには良質の蛋白質結晶が必要である。しかしながら、蛋白質の結晶化条件の探索は、試行錯誤で行われているのが現状である。蛋白質の結晶化は、一般に高純度・高濃度の蛋白質溶液に、NaCl 等の塩を適宜添加して行われる。塩が結晶化剤として蛋白質の結晶作製

で重要な役割を果たす一方、塩の蛋白質結晶化作用は、未だ詳しく解明されてはおらず、蛋白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、経験的に見出されている⁽¹⁾。

これまでに我々は、蛋白質結晶化溶液の低角度($< 8^\circ$)における前方散乱光が、結晶化前の溶液状態、すなわち、蛋白質の凝集体や結晶核の形成に対して極めて高感度であることを見出し^(2,3)、蛋白質結晶化溶液の前方光散乱を高精度に測定できる、蛋白質凝集・結

晶化分析装置を開発している⁽⁴⁻⁶⁾。

開発した高感度分析装置を用いて、代表的なリゾチーム蛋白質の塩 (NaCl) による結晶化作用について調査し、結晶化前に形成される蛋白質の凝集体構造(フラクタル凝集体構造⁽⁷⁾)と結晶化との関係を明らかにしている⁽⁸⁾。その中で、塩のイオン種と蛋白質結晶化との関係が、塩による蛋白質結晶化作用を理解する上で重要であることが分かってきた。さらに最近、蛋白質凝集体の形成過程を詳しく分析するために、蛋白質結晶化溶液の前方散乱光を瞬時に計測できる分析装置を新たに開発した⁽⁹⁾。

本研究では、開発の瞬時計測装置⁽⁹⁾を使用して、正塩の NaCl, KCl, MgCl₂, 及び CaCl₂ による、リゾチーム蛋白質の凝集・結晶化作用について調査した。また、塩素イオン以外の負イオンとして硫酸イオン SO₄²⁻を含む塩のリゾチーム結晶化についても調べた。

2. 研究方法

2.1 リゾチーム結晶化溶液の作製

リゾチームは、結晶化のモデル蛋白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代表的な蛋白質の一つである。原料が安価であること、比較的安定な蛋白質であることから、本研究でも研究対象として選択した。蛋白質の結晶化法には、大きく分けて、蛋白質溶液に結晶化剤(塩)を混合させ、容器内で溶液を封止して結晶化させるバッチ法、濃度差の大きな蛋白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、蛋白質溶液の液滴(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⁽¹⁾。本研究では、蛋白質と結晶化剤の各濃度を任意で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。

リゾチーム蛋白質には、和光純薬工業(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)を精製せずに使用した。緩衝液(バッファー)には、pH4.5±0.1に調整した 0.05 M 酢酸-酢酸 Na 溶液、及び pH6.9±0.1の 0.05 M HEPES 溶液を用いた。リゾチーム原料を緩衝液に温度 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。また、塩素イオン Cl⁻以外の負イオンを含む塩として、硫酸イオン SO₄²⁻の塩 Na₂SO₄を使用した。なお、SO₄²⁻を含む塩として CaSO₄ や K₂SO₄も結晶化剤として検討したが、CaSO₄は水溶液として難溶であり、K₂SO₄は低温の冷蔵保存(4°C)で結晶として析出するなど、溶液試料の保存上に問題があるために、今回の実験対象から除外した。

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) (Na₂SO₄の場合、18% (w/v))の結晶化剤溶液を作製した。各作製溶液を 0.1 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、緩衝液、及び結晶化剤溶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) (Na₂SO₄の場合、11% (w/v) まで)の濃度条件下で HEWL 結晶化溶液を調合した。なお、通常、これらの各種溶液を冷蔵庫(4°C)で保管し、実験の際に各溶液を室温 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 静的光散乱法

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 程度のコロイドなどの微粒子に対して有力な分析方法の一つである。ここでは、フラクタル凝集体などの凝集体の構造評価によく利用されている、静的光散乱(SLS)法について簡単に述べる。

光波長程度サイズ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⁽⁷⁾。

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

ここで、 C は照射光源の性質(波長 λ 等)や検出器の感度など、測定装置に依存する量(定数)、 M は散乱体の総数(又はその全質量)、 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の屈折率、ここでは、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⁽⁷⁾。

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

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 のフラクタルの平均局所密度 (密度相関関数) は, 次のように表される⁽⁷⁾。

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

ここで, c は定数である。よって, 式(3)と式(4)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。ここで, I_0 は, $q=0$ のときの散乱光強度である。

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

このように, SLS の測定から, フラクタル凝集体の構造パラメータであるフラクタル次元 D の値を測定することができる。

2.3 前方静的光散乱の瞬時測定

低角度における前方散乱光は, 蛋白質の凝集体や結晶核形成に対して極めて高感度である^(2,3)。これまでに我々は, レーザ前方光散乱計測技術を駆使して, 蛋白質の結晶化を分析するための分析装置を独自に開発してい

る⁽⁴⁻⁶⁾。しかしながら, 開発の分析装置は, 散乱光検出器を移動 (走査) させるタイプであったために, 瞬時の散乱光測定には必ずしも適してはいなかった。従って開発装置では, 蛋白質凝集体の形成過程を分析するには困難であった。そこで, 蛋白質結晶化溶液の前方光散乱を瞬時に計測できる分析装置を新たに開発した⁽⁹⁾。

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, 蛋白質結晶化溶液にレーザー光を照射し, コリメートレンズと CCD 光検出器の組み合わせによって, 結晶化溶液からの前方散乱光 ($<8^\circ$) を一度に測定することができる (Fig. 1)。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) で挟んだものであり, 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。

細いビーム径 (直径約 1 mm) のレーザー光を平板状の試料溶液セルに対して垂直に入射させる。溶液セルからの低角度における散乱光を適宜のコリメートレンズに取り込み, コリメートレンズで平行化した散乱光を CCD 光検出器へ垂直に導入させて散乱光を検出する。検出された散乱光の強度信号をコンピュータへ取り込んだ。CCD 光検出器における光強度分布から, 散乱光強度 I_s - 散乱角 θ のデータを算出した。さらに, 散乱角 θ_s から, 式(2)により, 散乱光ベクトル q を求め, $I_s(q)$ の散乱光データを得た。

試料溶液セルからの強い透過光は, CCD 光検出器の計測オーバーや迷光の原因となるために, 透過光を遮断, あるいは光路変更を行った。また, 測定試料に応じて散乱光測定が行えるように, 適宜の光強度フィルターを用いて入射光強度の調整を行った。

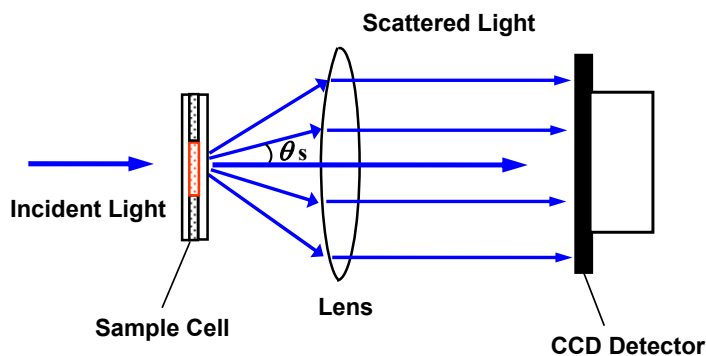


Fig. 1. Schematic of experimental setup

3. 研究結果

3.1 塩によるリゾチームの結晶化条件

調合した HEWL 溶液 (90 mg/ml, 6.3 mM), 各結晶化剤の塩溶液 (15% (w/v), ただし Na₂SO₄ の場合のみ 18% (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, 試料溶液を室温 20°C で静置した。HEWL 結晶化溶液の調合・混合した後, NaCl, KCl, 及び MgCl₂ 添加の場合では 2~4 日後に, 結晶成長が特に遅かった CaCl₂ 添加では 5-10 日後に, ルーペ (×

10) と光学顕微鏡 (×20-×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 KCl と MgCl₂ 添加による結晶化実験の結果である。なお, NaCl 添加による結晶化の実験結果については, 前回の助成研究報告書⁽¹⁰⁾, または文献⁽⁸⁾を, CaCl₂ 添加による結晶化条件については, 前回報告書⁽¹⁰⁾を参照されたい。また, Fig. 2 と Fig. 3 は, それぞれ KCl の添加 3 日後撮影した, KCl 濃度 6.0% (w/v) の結晶化溶液 (HEWL 濃度 20 mg/ml) の写真, および MgCl₂ 濃度 4.0% (w/v) の結晶化溶液 (HEWL 濃度 30 mg/ml) の写真 (添加 3 日後) で

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

KCl (% w/v)	(mol/l)	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
		0	0.13	0.27	0.40	0.54	0.67	0.81	0.94
HEWL (mg/ml)	30	-	-	-	-	-	+	+	+
	20	-	-	-	-	-	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Crystallization, - No Crystallization, +- Crystallization or not

Table 2. Crystallization condition of HEWL with MgCl₂ at 20°C

MgCl ₂ (% w/v)	(mol/l)	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
		0	0.11	0.21	0.32	0.42	0.53	0.63	0.74
HEWL (mg/ml)	30	-	-	-	+-	+	+	+	+
	20	-	-	-	-	+-	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	-	+-	+-

+ Crystallization, -No Crystallization, +- Crystallization or not

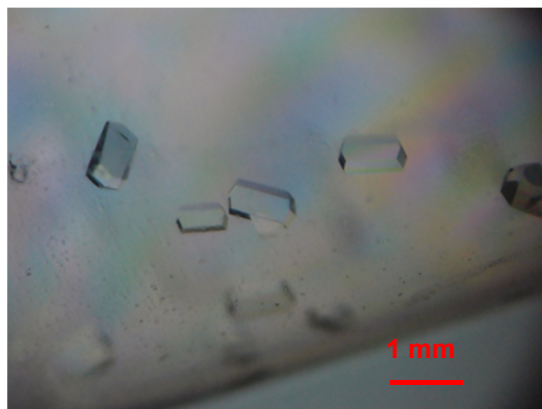


Fig. 2. Photograph of grown HEWL crystals in solution at 20 mg/ml (1.4 mM) HEWL with 6% (w/v) KCl after 3 days

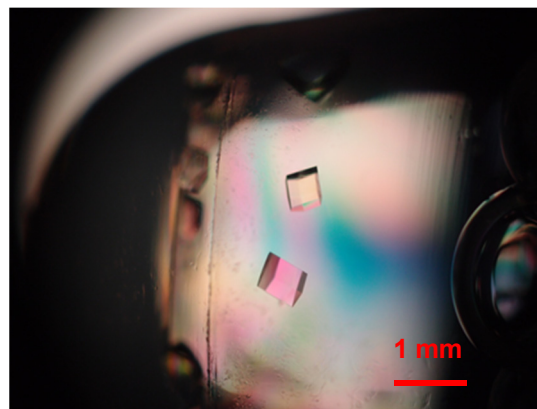


Fig. 3. Photograph of grown HEWL crystals in solution at 30 mg/ml (2.1 mM) HEWL with 4% (w/v) MgCl₂ after 3 days

ある。

Table 1 と Table 2 から分かるように、NaCl や CaCl₂ 添加の場合と同様、HEWL 濃度が大きく、NaCl 濃度が高いほど HEWL が結晶化し易い。一方、添加塩の濃度が高過ぎると、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)。この領域では、サイズの大きな蛋白質結晶 (>1 mm³) が得られ難く、この領域は、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 (<0.1 mm³, 個数 $N > 50 \sim 100$) が形成される傾向にあり、高過ぎる濃度条件は、結晶作製には不向きである。このように、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、蛋白質の結晶生成に適する準安定領域が存在する。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、比較的大型の蛋白質結晶が得られ易い。

リゾチーム蛋白質の結晶化剤として塩素イオンを含む正塩(NaCl, KCl, MgCl₂, 及び CaCl₂)を用いた場合、以上のように、結晶化条件を比較的容易に見出すことができた。これに対して、HEWL 溶液(pH4.5 酢酸-酢酸 Na 緩衝液)に Na₂SO₄ を添加すると(濃度 6~11% (w/v)), Fig. 4 に示すように、30 mg/ml HEWL に対し Na₂SO₄ 濃度 8% (w/v) 以上で溶液が白濁化し、その後、数週間経ても HEWL の結晶成長は見られなかった。また、HEWL 濃度を 10-30 mg/ml で変化させても、Na₂SO₄ 添加では結晶化には至らなかった。さらに、pH6.9 の HEPES バッファーで同様な濃度条件下で結晶化実験を行ったところ、Na₂SO₄

添加でも HEWL 溶液は白濁化しなかったものの、数週間経ても HEWL 結晶成長は観察されず、沈殿物が容器に付着しただけであった。なお、塩素イオンを含む正塩の結晶化作用と比較のために、Na₂SO₄ 添加でも白濁化した、pH6.9 の HEWL 溶液の F-SLS 測定結果については後述する。

3. 2 リゾチーム結晶化溶液の前方静的光散乱特性

開発した前方光散乱瞬時計測装置⁹⁾を使用して、各種塩の添加によるリゾチーム凝集体形成の時間的推移を観察した。ここでは、代表的な測定例を挙げる。Fig. 5 は、7% (w/v) の KCl を含む HEWL 溶液 (30 mg/ml) に対して、F-SLS を瞬時計測した結果(各測定時間 20 ms)であって、塩添加後の F-SLS 特性の時間的な変化を示したものである。この測定試料は、Table 1 から分かるように、リゾチーム

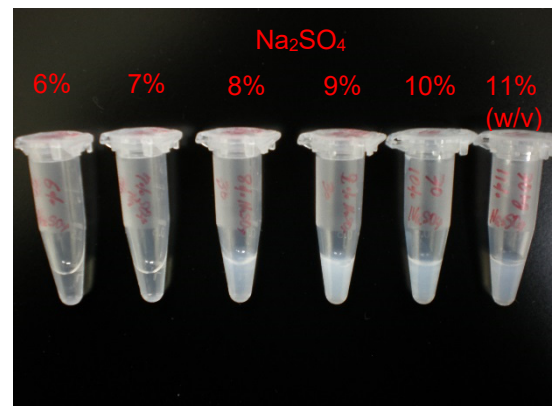


Fig. 4. Photograph of 30mg/ml HEWL solutions with Na₂SO₄ in 6%~11%(w/v)

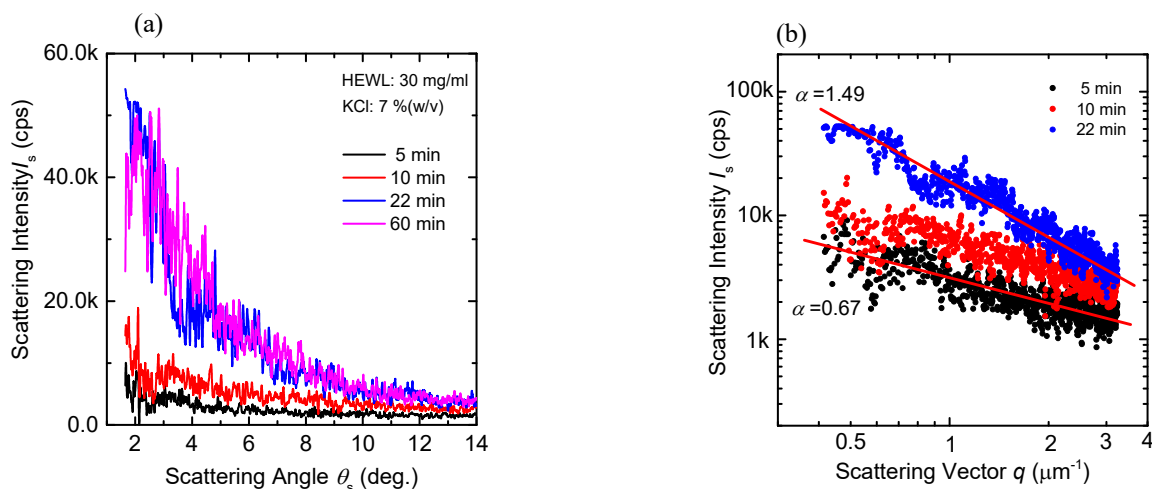


Fig. 5. *In-situ* measured SLS profiles for 30 mg/ml HEWL solution with 7% (w/v) KCl: (a) scattering intensity I_s vs. scattering angle θ_s and (b) log-log plots of I_s vs. scattering vector q

が結晶成長する溶液条件にあり、実際に 2 日後には多数の HEWL 結晶が観察された。Fig. 5 (a) に示すように、KCl 添加・混合してから 22 分後には、SLS が急激に増大しており、KCl の作用によって HEWL 凝集体の形成が進んでいることが分かる。これらの F-SLS プロファイル (Fig. 5 (b), 両対数表示) から、べき関数の特性 (式(5)) を示すことが分かる。時間経過でべき数 α の値 (ここで、 $I_s(q) = I_0 q^{-\alpha}$) が大きくなり、22 分後の特徴的な F-SLS では、 $\alpha = 1.49$ のべき関数を示す。F-SLS がべき関数であることから、HEWL がフラクタル凝集体 (フラクタル次元 $D = 1.49$) を形成していると推定される。結晶化前段階の HEWL 溶液で $D > 1.5$ のフラクタル凝集体が形成された場合、結晶化へ進行する傾向があることから⁽⁸⁾、比較的密なフラクタル構造の凝集体がさらに結晶核を形成し、HEWL 結晶が成長したものと推測できる。

KCl 以外の塩として、 $MgCl_2$ と $CaCl_2$ の F-SLS 特性の一例を、それぞれ Fig. 6 と Fig. 7 に示す。今回の研究で使用した塩の中で、 $CaCl_2$ 添加による HEWL 結晶成長が最も遅かった。測定したどちらの溶液の濃度条件も、HEWL の結晶化条件下であるが、 $MgCl_2$ 添加溶液よりも $CaCl_2$ 添加溶液の SLS (Fig. 7) が、明らかに F-SLS の時間的変化が小さく、 $CaCl_2$ の凝集・結晶化作用が小さいことが分かる。 $MgCl_2$ 添加溶液の SLS には、添加後 54 分後に、既に散乱ピーク (回折パターン) が多数見られ、単なる SLS の時間的揺らぎとは異なる特性が現れている。このような多数の散乱ピークの出現から、既に溶液中にフラクタル凝集体から成長した HEWL 結晶核が形成され始めている様子が分かる。これに対して、 $CaCl_2$ 添加の場合、溶液混合 98 分後でも SLS 強度は相対的に小さく、SLS の時間的変動が小さいことから、他の塩に比べてリゾチームに対する $CaCl_2$ の凝集作用は小さく、HEWL を結晶成長させる上で時間を要したことが容易に理解できる。このように、蛋白質溶液の瞬時前方散乱計測を行えば、顕微鏡等で蛋白質結晶が観察できるまでのサイズになるまでを待たずとも、蛋白質に対する添加塩の凝集・結晶化作用を評価することができる。

最後に、今回の調査では結晶化条件を見出せなかった、 Na_2SO_4 添加の F-SLS 特性を Fig. 8 に示す。測定した溶液 (20 mg/ml) は、 Na_2SO_4 添加でも HEWL 溶液が白濁化しなかった pH6.9 の試料である。Fig. 8 に示すように、

Na_2SO_4 添加溶液も SLS プロファイルは、べき乗を示した。しかしながら、それらのべき数の値は、HEWL が結晶化へ進行するフラクタル次元 ($D > 1.5$) よりも小さい状態 ($0.89 < \alpha < 1.11$) で推移していることが分かる。形成された HEWL 凝集体が比較的疎な構造状態であったと想定される。2 日後に溶液を観察した写真 (Fig. 9) に示すように、この条件下では、 Na_2SO_4 添加溶液中に HEWL 結晶は生成されず、多数の沈殿物が見られた。このことから、形成された HEWL 凝集体が疎な構造であった状態であったために、結晶核形成、及び結晶化には至らず、単に HEWL の沈殿物が生成されたものと推定できる。

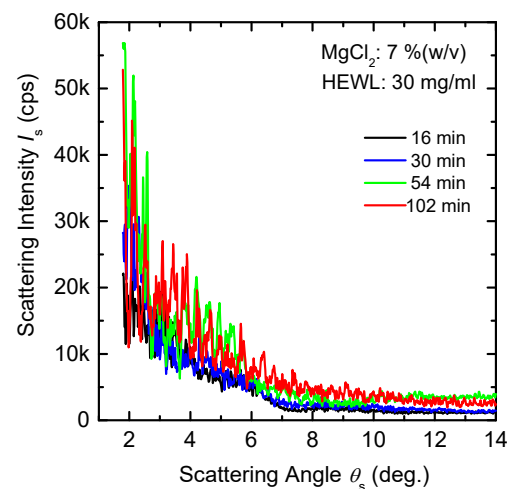


Fig. 6. SLS profiles for 30 mg/ml HEWL solution with 7% (w/v) $MgCl_2$

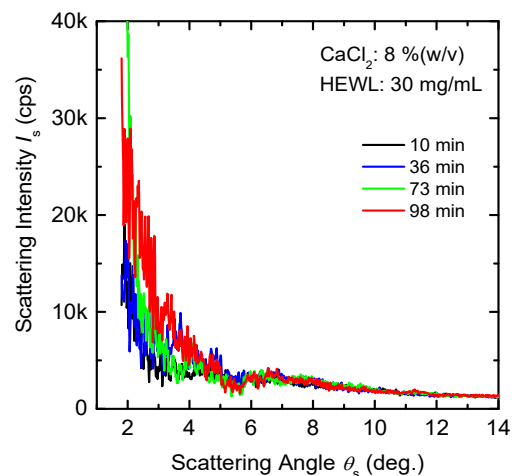


Fig. 7. SLS profiles for 30 mg/ml HEWL solution with 8% (w/v) $CaCl_2$

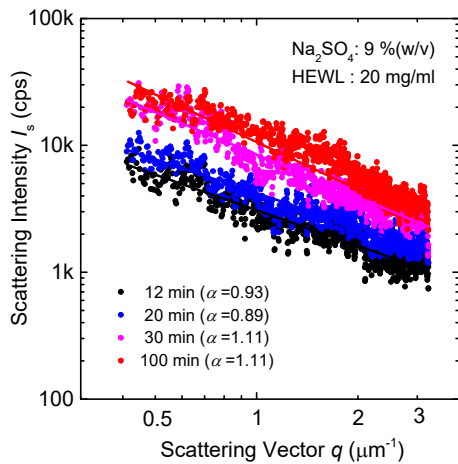


Fig. 8. SLS profiles (log-log plots of I_s vs. q) for 20 mg/ml HEWL with 9% (w/v) Na_2SO_4



Fig. 9. Photograph of HEWL crystals in solution at 20 mg/ml HEWL with 9% (w/v) Na_2SO_4

4. 考察

リゾチーム蛋白質の結晶化溶液の瞬時前方光散乱 (F-SLS) 測定により、塩素イオン Cl^- を共通にもつ各種正塩 (NaCl , KCl , MgCl_2 , 及び CaCl_2), 及び硫酸イオン SO_4^{2-} を含む塩 Na_2SO_4 によるリゾチームの結晶化作用について調査した。開発した前方光散乱瞬時計測装置⁽⁹⁾を用いて、塩によりリゾチーム凝集体の形成過程 (結晶化前段階過程) を分析することに初めて成功した。研究結果をまとめると、次のようになる。

- (1) 結晶化するリゾチーム溶液では、塩添加直後に HEWL の凝集化が始まるが、すぐに密な構造をもつフラクタル凝集体 ($D > 1.5$) が形成されるのではなく、比較的密なフラクタル凝集体の形成には、ある時間 (例えば 20 分以上) を要する。
- (2) CaCl_2 添加によるリゾチーム凝集体の形成が最も遅く、 CaCl_2 添加でリゾチームの結晶成長が最も遅い。
- (3) 比較的疎な構造の HEWL 凝集体 ($D < 1.5$) が形成される溶液では、結晶は成長せず、単に沈殿物が生成されることがある。

次に、各塩の結晶化作用について考察する。濃度 30 mg/ml (2.1 mM) の HEWL 溶液に対する、各塩による結晶化の境界塩濃度 (蛋白質を結晶化させるのに必要な最低限の塩濃度) を **Table 3** に示す。また、各塩には価数の異なるイオン種を含むために、電解質溶液中のイオン間相互作用の強さを示す指標としてよく用いられるイオン強度

の値も示した。ここで、溶液中の i 種イオンの質量モル濃度を m_i [mol/kg], イオンの価数を z_i とすると、イオン強度 I は、 $I = 1/2 \sum m_i z_i^2$ と表される。ここでは、質量モル濃度 m_i [mol/kg] の代わりに、溶液作製で計量した容量モル濃度 m_i [mol/l] を用いた。

各塩とも共通の塩素イオン Cl^- 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 (Mg^{2+} , Ca^{2+}) では、境界濃度に相違が見られた。このように蛋白質の結晶化では、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。

Table 3 に示すように、結晶化境界の塩濃度は、一価正イオンを含む NaCl と KCl では同じであった。二価正イオンを含む MgCl_2 と CaCl_2 の結晶化境界の塩濃度には相違が見られた。また、 MgCl_2 と CaCl_2 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が大きくなり、 MgCl_2 と CaCl_2 は、明らかに NaCl と KCl よりも結晶化作用が小さい。さらに、 CaCl_2 添加でべき数 α の値が最も小さく、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かったことが理解できる⁽¹⁰⁾。

電解質による蛋白質の溶解度の低下は、塩による蛋白質の結晶化と深く関係しており、古くから調べられている。これは、イオンの塩析能力を経験的に列挙した Hofmeister 系列としてよく知られている。本研究で使用した塩から生成されるイオンの Hofmeister 系列は、 $\text{SO}_4^{2-} >$

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

Precipitant salt		NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂
Concentration	% (w/v)	3.5	4.5	3.5	5.0
	mol/l	0.60	0.60	0.37	0.45
Ionic strength	mol/l	0.60	0.60	1.1	1.4

$\text{Cl}^- > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ である。リゾチーム蛋白質の結晶化効果(結晶化の境界塩濃度)を電解質のイオン強度としてみると、Table 3 に示すように、 $\text{CaCl}_2 > \text{MgCl}_2 > \text{KCl} \sim \text{NaCl}$ の順列となっている。すなわち、結晶化効果は、 $\text{Na}^+ \sim \text{K}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ と、 Na^+ と K^+ が同程度であることを除けば、Hofmeister 系列とほぼ一致する。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。

5. 今後の課題

今回の研究では、塩析作用が最も大きな SO_4^{2-} を含む Na_2SO_4 によるリゾチームの結晶化条件を見出すことができなかった。さらに、 Na_2SO_4 をはじめ、塩素イオン以外を含む塩による蛋白質の結晶化作用を調査する必要がある。また、結晶化前の蛋白質溶液に対する瞬時前方光散乱(F-SLS)測定から、蛋白質の凝集体形成過程のその場分析ができることが判明した⁽¹¹⁾ので、今後、リゾチーム以外のモデル蛋白質に対して塩の結晶化作用について調査する。塩のイオン種と蛋白質凝集・結晶化の関係を明らかにすることは、蛋白質の結晶作製では重要である。

謝辞

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27年度助成研究により実施した。関係者各位に感謝致します。

参考文献

- [1] M. Sanderson and J. Skelly, eds., *Macromolecular Crystallography* (Oxford University Press, New York, 2007).
 [2] T. Wakamatsu, “Forward light scattering for highly

sensitive detection of aggregation in crystallizing protein solutions,” *Applied Physics Letters*, **98**, 263701, 2011.

- [3] T. Wakamatsu, S. Toyoshima, and H. Shimizu, “Observation of electric-field-induced aggregation in crystallizing protein solutions,” *Applied Physics Letters*, **99**, 153701, 2011.
 [4] 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」, 特許第5821127号(2015).
 [5] 若松孝, 豊島晋, 「結晶化促進方法, 結晶化解析方法, 結晶の製造方法, 結晶化装置の制御プログラム, 記録媒体, 及び結晶化装置」, 特許第5858274号(2015).
 [6] T. Wakamatsu, “Method and apparatus for *in-situ* characterization of electric-field induced aggregation in pre-crystalline protein solutions,” *Review of Scientific Instruments*, Vol.86, No.1 (2015) pp.015112-1-8.
 [7] T. Witten and P. Pincus, *Structured Fluids (Polymers, Colloids, and Surfactants)*, (Oxford University Press, New York, 2004).
 [8] T. Wakamatsu, “Forward-Light-Scattering Characterization of Pre-crystalline Aggregates in Crystallizing Lysozyme Solutions,” *American Journal of Analytical Chemistry*, Vol.5, No.9 (2014) pp.581-588.
 [9] 若松孝, 「結晶化分析装置及び結晶化分析方法」, 特願2015-198366 (2015).
 [10] 若松孝, 「塩類のタンパク質結晶化作用に関する研究」, 公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団・平成24年度助成研究報告書, No.1213 (2014).
 [11] 若松孝, 「前方光散乱法による結晶化前段階形成のリゾチーム凝集体のキャラクタリゼーション」, 第25回日本MRS年次大会, F2-P9-001 (2015).

Effects of Salts on Protein Aggregation and Crystallization

Takashi Wakamatsu¹, Daisuke Tanaka², Kaori Chiba¹, and Shun-ichi Kidokoro³

¹National Institute of Technology, Ibaraki College, ²National Institute of Technology, Oita College

³Nagaoka University 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 and functional foods. The protein crystallography needs good crystals for suitable to x-ray or neutron diffraction. However, crystallization of proteins is a bottleneck because it is a try and error procedure and requires considerable experimental efforts.

We have found that a forward light scattering at small angles ($< 8^\circ$) is highly sensitive to aggregations and crystal nucleus formation of proteins in crystallizing protein solutions ^[1]. Previous work ^[2] has shown that crystallizing solutions of Hen-Egg-White Lysozyme (HEWL) with NaCl have a forward static light scattering (F-SLS) pattern of non-integer power law, which indicates a formation of fractal aggregates.

Here, we evaluated an effect of precipitant salts of NaCl, KCl, MgCl₂, and CaCl₂ with chlorine ion, and Na₂SO₄ salt with sulfate ion on the HEWL crystallization, using *in-situ* detection technique for F-SLS measurements. We succeeded observation of the changeable aggregation by the added salts in pre-crystalline HEWL solutions. A formation of the protein fractal aggregates with relatively high density requires some time, for example, over twenty minutes in the crystallizing solutions.

[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, "Forward-Light-Scattering Characterization of Pre-crystalline Aggregates in Crystallizing Lysozyme Solutions," *American Journal of Analytical Chemistry*, **5**, 581, 2014.