

磁気力を利用した仮想的可変重力場におけるタンパク質の結晶成長

研究代表者 安宅光雄（産総研人間系特別研究体 グループリーダー）

1. タンパク質結晶成長の研究をなぜ行うのか

ゲノムを全解読する試みのいくつかが成功し、その次に来るポスト・ゲノムが話題に上っている。DNAの二重らせん構造が、生物における情報の保持と世代間伝達を行うことが判明してから約50年経って、ある生物種のDNAに含まれている情報が総体として明らかになった（ゲノムの全解読）。その情報とは、具体的には種々のタンパク質を作るための、アミノ酸の配列である。すなわちゲノム情報は、タンパク質を仲介として、生命活動を支配している。

タンパク質の働きは、個々のタンパク質分子の形（3次元立体的構造）に基礎を置いている。その形を知る手段は、それぞれのタンパク質単結晶を用いるX線構造解析（X線結晶学）である（ただし、これまでにデータベース化された構造の約15%は、それ以外のNMRと電子線結晶学による）。ここに、タンパク質単結晶を作る必要と意義がある。タンパク質工学により、大腸菌などを用いて別種の生物のタンパク質を大量発現させることが可能となり、さらに人工的に改変したり設計したりしたタンパク質まで作れる時代が来るに及び、立体構造の解明が期待されるタンパク質の種類は飛躍的に増大しつつある。

2. タンパク質単結晶の質の向上はなぜ重要なのか

X線結晶学における単結晶の役割は、光学機器（カメラ）におけるレンズに比較できる。光源からのX線を単結晶が回折し、フィルムに相当する検出器で記録する。この際、レンズの良し悪しで、記録される像の分解能が決まる。光源をいくら強力化し（例えばSPring-8の利用）、フィルムを高感度化し、その処理を高度化しても、レンズが悪ければ近接した2点を分解することはできない。ここに、使用する単結晶の質を上げることの意義がある。良質の単結晶を用いれば、X線はすべての方向にわたり、大きなBragg角までX線を回折し、その結果から、精度良く高い信頼度で構造が分かる。この精密構造は、タンパク質機能の理解や医薬品設計の基本である。

なお、無機や金属の単結晶と異なり、タンパク質の単結晶は、タンパク質水溶液内で秩序が発生し、タンパク質分子が周期的に並んだ状態である。必然的に結晶は多量の水（重量比で30-70%）を含み、タンパク質分子は動きやすい。これに加え、タンパク質分子には機能を果たすための柔軟さが備わっている。これらの結果、タンパク質単結晶からのX線の回折は、2-6 Å相当よりも大きい角度にならないのが普通で、それさえ達成できないことも多い。

タンパク質単結晶の質を向上させること、すなわち、結晶サイズを大きくしたり、X線回折能を高めたりすることを狙う典型的な手段が

宇宙の微小重力環境の利用であり、1981年以来現在に至るまで、欧・米・ロシア・日本・中国が実施し続けている。その基礎となった判断は、地上でタンパク質単結晶の質を上げることのできる代替手段が乏しいことと、タンパク質分子の立体構造を精密に知ることのできる利益が極めて大きいことの2つである。

3. 磁気力利用の発想と実現

宇宙環境では、重力と遠心力の合力で微小重力ができる。地上でも、重力と反対方向に、浮力、電気力、超音波圧、ゲルの網目の及ぼす抗力などを印加するという試みがなされてきた。これらに比べ、磁気力は非接触性の体積力で化学変化をふつう起こさないという優れた特徴をもつが、他の力より注目されて来なかった。それに注目したのが本プロジェクトである。超伝導マグネット中で発生できる磁気力が、水などの反磁性体を浮遊させるのに必要な（すなわち重力を補償できる）値の3割程度になっていることも計算できた。

本プロジェクトの基本は、そのような磁気力 (F_M) を重力 (F_G) と重畳し、 $F_G \pm F_M$ という形で使うことである。そのためには、実験空間内で、均一な磁気力が上下方向にのみ作用していることが望ましい。そうすれば、合力の等ポテンシャル面は水平方向に等間隔で配置され、一定の力が鉛直方向にのみ発生する。 $F_G \pm F_M$ の値は、ソレノイドに流す電流を変えれば、 F_G のまわりに連続的に（すなわち $F_G - F_M$ から $F_G + F_M$ のあいだで）設定することができ、そのような力の発生している空間を実験に使用する。

本プロジェクトの大きな成果として、均一な磁気力という新しい概念を実際にマグネットとして工学的に実現したことが挙げられる。世界で初めて磁気力の均一性に着目した超伝導マグネットは、NbTi を超伝導線とし、電気的接続部にビスマス 2 2 1 2 超伝導体を用いて、液体ヘリウムの補給を必要としない無冷媒型の超伝導マグネットとして成功裏に作動している。

これに加え、重力の6割に相当する大きな均一磁気力まで水に加えることのできる無冷媒型の超伝導マグネットも開発の最終段階に来ている（ポスター要旨中、均一磁気力場発生用超伝導マグネット参照）。また、これら均一磁気力マグネットや市販の超伝導マグネットの発生する磁気力を、ある程度の均一性を保ちつつ簡便に増強する手法についても開発を進めている（ポスター要旨中、磁気力場ブースタ参照）。

4. タンパク質結晶成長の実験

$F_G \pm F_M$ として5つの異なる値の場所でフルクトース・ビス・ホスファターゼ結晶を作った場合、結晶のX線回折能は、 $F_G \pm F_M$ 値が小さくなるほど向上するという結果が得られた（図1）。図1の縦軸は、S/N 比 \geq

2の回折スポットが記録できた最大分解能（小さいほど望ましい）である。また、横軸は、マグネットで印加した磁気力の大きさを、マイナスは上向き磁気力の印加に対応している。上辺に目盛ったのは、重力と磁気力の合力の大きさである。結晶の示す分解能は、左下がりの傾向、すなわち、上向きに強い磁気力を印加するほど質が向上する傾向を示した。図1の磁気力=0のところには、磁場が存在して磁気力が0のところ（すなわちマグネットの中心）で成長した結晶(■)と、磁場も磁気力もないマグネット外で成長した結晶(●)の結果が共に記されている。また17βヒドロキシステロイド脱水素酵素の結晶は、磁場中で成長させた場合、従来にないほど大きいBragg角までX線を回折した。

これらに加え、リゾチームの過飽和溶液（10時間か、それ以上待つと結晶が現れてくる溶液）を磁場中に置いた場合、落球法で測定した粘度が増大しているように見える現象も見出した（ポスター要旨(2)参照）。過飽和溶液中では、最終的に現れる少数個の結晶が核形成・成長するだけでなく、それに先だって、あるいは同時に、大多数の分子を巻き込んだ変化が進行していることも（光散乱、中性子線小角散乱、透過型電子顕微鏡などで）並行して調べている。磁場の存在が、その変化に影響を及ぼしていると考えると、粘度変化の結果は説明がつく。

5. タンパク質試料の選択の背景

4. で実験に使用したタンパク質試料の選択の背景を述べておきたい。過飽和溶液中の変化を調べるのに使用したリゾチームは単なるモデルタンパク質であり、その結晶を使って精密な構造解析を行う必要に乏しい。しかし、過飽和溶液中で進行する結晶成長の時間経過は、本プロジェクト開始以前約20年がかりで、高度に制御可能にして来ている。そこで、異なる実験手段のあいだの比較が行いやすく、粘度変化の実験を行ったりする上では最適の試料であると言える。

一方、4. の前半に述べたフルクトース・ビス・ホスファターゼや17βヒドロキシステロイド脱水素酵素は、結晶成長研究のためのモデルではなく、生物学的・医学的興味から、その高分解能構造の決定が現に待望されているタンパク質試料である。すなわち、フルクトース・ビス・ホスファターゼは、血中の糖濃度の制御に直接関与している。血液により全身に供給されるグルコースは、解糖と呼ばれる生化学反応（一連の酵素による反応連鎖）で体内におけるエネルギー生産に参加する。一方、糖新生と呼ばれる、その逆反応経路が生物には備わっていて、飢餓・空腹などの際、血中グルコース濃度が過度に下がらないようになっている。解糖と糖新生は逆反応であるので同一の酵素が触媒する場合が多いが、3箇所だけ、正逆両反応を異なる酵素が担うステップがあり、フルクトース・ビス・ホスファターゼは、糖新生のみを担っている。従って、血中の糖を分解する必要な反応（解糖）に影

響を及ぼすことなく、その濃度を維持・上昇させる逆反応（糖新生）のみ制御するための好個のターゲットである。食事による炭水化物の摂取を控えても体内でグルコースが生産され、その血中濃度が下がらないような場合、糖新生の機能の理解や、その制御が医学的に重要であり、フルクトース・ビス・ホスファターゼ分子の精密構造や、その酵素反応の理解は、その問題への回答を与え得る。もう一つ使用したタンパク質である 17 β ヒドロキシステロイド脱水素酵素は、女性ホルモンであるエストロゲンの生産に関与しており、とくに性ホルモン感受性の悪性腫瘍の増殖に係わっている疑いがある。その酵素分子の精密構造、あるいはその酵素反応機構の解明は、エストロゲン濃度の選択的な制御を可能にする期待がある。

これらの結晶は既に高分解能の構造解析に使用された。20 年の歴史をもつ宇宙実験でさえ、得られたタンパク質結晶を用いた構造解析の報告はほとんどないことに比べると、手軽さや反復可能性を含めた磁場利用の将来性には大きなものがあると考えて差し支えないであろう。

6. 結語

本研究課題の目標は、超伝導マグネットに関する最近の長足の進歩を踏まえ、(1)磁気力を均一化したマグネット、すなわち重力+磁気力の等ポテンシャル面に設計を加えた新しい概念のマグネットを製作し、(2) そのような超伝導マグネットを実験および製造のために使用する可能性を確かめ、(3)ことにライフサイエンスの進展が要請する、高品質タンパク質単結晶の製造に、それを使用することにある。今後、内容と考察を豊富にすることにさらに努めたいと考えている。

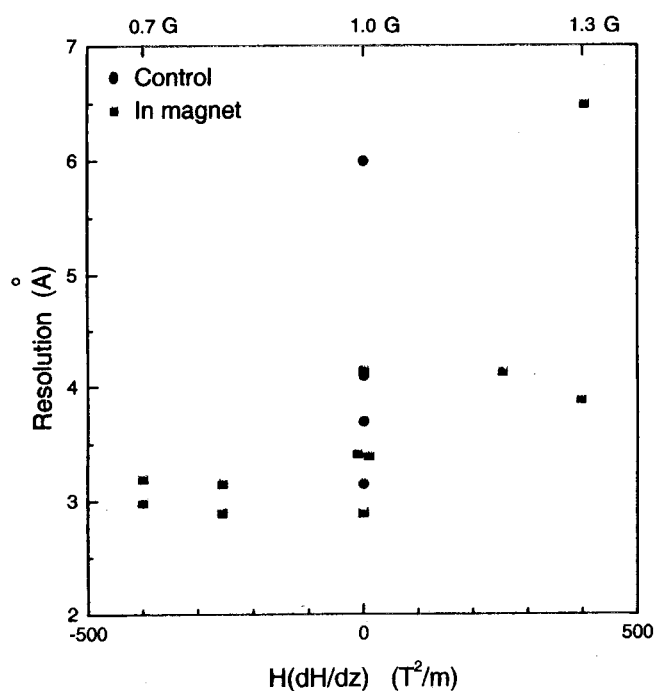


図1 磁気力存在下で成長させたフルクトース・ビス・ホスファターゼ結晶のX線分解能