

フルイド反応 TEM を用いたタンパク質結晶化過程 1 分子 “その場” 観察

北海道大学低温科学研究所 博士研究員 山崎智也

背景と目的

タンパク質の結晶は、その分子の立体構造解明に用いられることから、多くの結晶化の試みや研究がなされてきた。しかし、タンパク質を結晶化することは未だに困難である。これを解決するためには、タンパク質が結晶化に至るまでの過程を理解することが必要であると考えている。タンパク質の結晶化は、核生成という熱力学的に安定な結晶核が生成する過程を経る。核生成はナノの空間領域において非常に短時間（数秒以下）で完了する現象のため、その過程を直接観察することは非常に困難であった。近年、システムとして確立したフルイド反応透過型電子顕微鏡（FR-TEM）は、溶液中をナノ領域で動的に観察でき、核生成を観察できる可能性を秘めている。この手法を用いてリゾチームタンパク質の結晶化過程の“その場”観察を試みたところ、リゾチーム分子が集合して非結晶質粒子になり、これを母体として結晶が生成することを示唆する結果が得られた[1]（図1）。

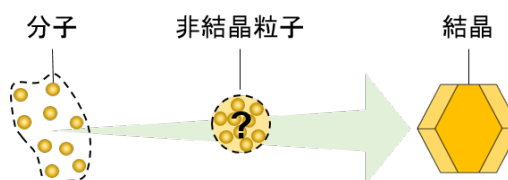


図1. リゾチームの結晶化過程の概念図。

タンパク質の結晶化に対する理解をさらに進展させるためには、リゾチーム以外のタンパク質の結晶化を調べ、その結晶化過程の一般性（非結晶粒子のような前駆物質を経由するのか等）を知る必要がある。そこで、リゾチームよりも分子サイズが大きく、電子顕微鏡での観察が容易な重元素を伴うフェリチンタンパク質に着目した。フェリチンの結晶化を FR-TEM で調べることで、核生成過程の一般性を調べるとともに、溶液中での結晶化を 1 分子単位で解析できると考えた。これを実現するためには、フェリチンの結晶化を FR-TEM で観察できる結晶化の条件を見出すことが必要である（図2）。そのため、フェリチンを結晶化するための結晶化剤の種類やその濃度を調べ、FR-TEM を用いて電子ビームがこれらの結晶化溶液に与える影響（結晶化剤の沈殿など）を、電子密度を変化させて調べた。

また、電子ビームの影響を受けにくく、タンパク質結晶の核生成を調べることができる手法としてクライオ TEM 法の応用を検討した。

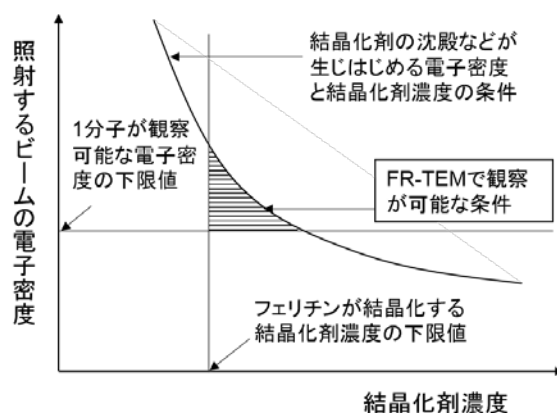


図2. フェリチンの結晶化を FR-TEM で観察が可能な条件。

研究結果

まず、FR-TEM でフェリチン分子を観察し (図3)、1分子が観察可能な電子密度を決定した。過去の研究のほとんどで、フェリチンは硫酸カドミウム (CdSO_4) を結晶化剤として結晶化させている。そのため、フェリチンを結晶化できる CdSO_4 濃度の溶液を FR-TEM で観察した。その結果、フェリチン1分子を観察できる電子密度では Cd が沈殿し、 CdSO_4 は FR-TEM での観察に適さないことが分かった。そこで、 CdSO_4 を用いずにフェリチンを結晶化する条件を見つけるため、様々な結晶化剤を用いてフェリチンの結晶化を試みた。その結果、ポリエチレングリコール (PEG)、もしくは、亜鉛イオン (Zn^{2+}) を用いるとフェリチンを結晶化できることが分かった (図4)。これらの結晶化剤を含む溶液を FR-TEM で観察したところ、PEG の場合、PEG に対応すると思われるコントラストが視野外 (電子ビームの照射されていない領域) へ移動した。そのため、FR-TEM での観察は困難であることが分かった。

一方、 Zn^{2+} を含む溶液に電子ビームを照射したところ、電子密度が大きいと Zn の沈殿が生じるが、電子密度を小さくすることで、フェリチンが結晶化する結晶化剤濃度で沈殿が生じないことが分かった。今後の課題は、 Zn^{2+} を含む結晶化溶液を用い、FR-TEM で観察が可能な条件を詳細に決定することである。

上記のように FR-TEM での観察は、溶液条件によっては電子ビームの影響を大きく受けることが分かった。電子ビームの影響を受けにくく、タンパク質結晶の結晶化過程を調べる他の手法として、サンプルを $-170\text{ }^\circ\text{C}$ に急速凍結して観察するクライオ TEM 法に着目し、FR-TEM での観察に成功しているリゾチームを用いて観察を行った。その結果、リゾチーム結晶、アモルファス粒子などが観察され、これは FR-TEM での観察結果と整合的であった[1]。このことから、クライオ TEM 法はフェリチンの結晶化過程を明らかにするためにも有効な手法であると考えられる。

参考文献

[1] Yamazaki T, et al. (2017) Two types of amorphous protein particles facilitate crystal nucleation. *Proc Natl Acad Sci* 114(9):2154–2159.

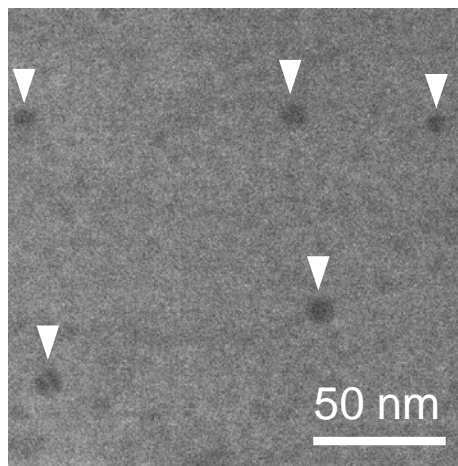


図3. FR-TEM で観察したフェリチン分子 (白三角)。

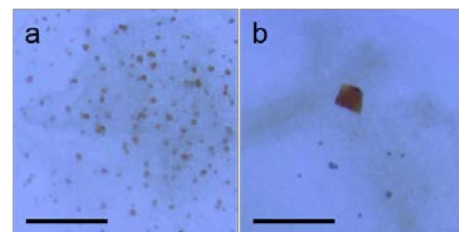


図4. フェリチン結晶の光学顕微鏡写真。用いた結晶化剤は、a: PEG、b: Zn^{2+} 、である。