

## 最近の研究から

### タンパク質単結晶の放射光白色 X 線トポグラフィ

橋 勝, 小泉晴比古, 小島謙一  
横浜市立大学大学院総合理学研究科

#### Synchrotron white-beam X-ray topography of protein single crystals

Masaru TACHIBANA, Haruhiko KOIZUMI, Kenichi KOJIMA  
Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University

#### 1. はじめに

タンパク質結晶は、ナノメートルサイズの巨大分子がパッキングすることによって構成されている結晶である。さらに、この結晶は、結晶内に多量の水分子を含んでおり、その水の含有量は体積比で 30-80%にも及ぶことが知られている。これらの特徴は、一般の無機結晶や分子量が比較的小さい有機物から構成されている低分子有機結晶とも、大きく異なる点である。したがって、このような特徴をもつタンパク質の結晶化や、その結晶欠陥や物性に関する研究は大変興味深い。これまでもタンパク質分子に関する研究は比較的多いが、その結晶に関する研究はほとんどない。これは物性研究に必要な大型のタンパク質結晶の育成が極めて難しいことによる。また、タンパク質の結晶化は、X線構造解析といったより現実的な問題としても重要である。最近のタンパク質のX線構造解析では、数十マイクロメートルサイズの良質な結晶さえ得られれば、放射光を利用することにより十分な回折斑点が得られ、構造解析が可能になってきた。しかし、タンパク質における水素原子の位置を決めるための最も有効な方法の一つである中性子構造解析実験では、依然としてミリメートルサイズの大型結晶が必要である。したがって、タンパク質の構造解析の精密化という観点からも、大型結晶の育成とともに結晶の完全性や結晶欠陥のキャラクタリゼーションは重要である。

最近、筆者のグループは、大型のタンパク質結晶を育成し、それを用いて、X線トポグラフィによるタンパク質結晶の結晶欠陥、特に転位の観察に成功した [1]。さらに、これらの大型結晶を用いて、これまでほとんど調べられていなかったタンパク質結晶の弾性や塑性といった力学物性の測定にも成功した [2-5]。本稿では、前者の PF の BL-15B1 で行われたタンパク質結晶の放射光白色 X 線トポグラフィについて、最近の研究成果について報告する。

#### 2. タンパク質結晶の X 線トポグラフィ

X線トポグラフィは、比較的完全性の高い結晶に対して、結晶全体における欠陥の場所的分布状態を知ることができ、さらに、その欠陥の種類、例えば、転位のバーガス・ベクトルまで同定することができる [6-8]。そのため、

X線トポグラフィは、結晶欠陥を観察するための最も有効な方法の一つとして広く利用されてきた。X線トポグラフィは大きく分けて 2 種類の方法がある。一つは、単色 X 線を用いる方法で、もう一つは白色 X 線を用いる方法である。単色 X 線を用いた場合には、高分解の欠陥像を得ることができるが、試料のセッティングに手間がかかり撮影時間も長くなる。一方、白色 X 線を用いた場合には、欠陥像の分解能は悪くなるが、試料のセッティングが容易で撮影時間は短くなる。さらに、一度の X 線照射で多数の反射に対応するトポグラフが一枚のフィルム上に記録されるので、一度の撮影で転位のバーガス・ベクトルの決定が可能になる。タンパク質結晶は、構造が複雑で、脆く壊れやすいので、試料のセッティングが容易で、試料のセッティングから撮影までが短時間で終わることが必要である。このことは、白色 X 線トポグラフィがタンパク質結晶に対してより実用的であることを意味している。また、角度分散が小さい高強度の放射光を利用すれば分解能や撮影時間が大幅に改善される。したがって、放射光白色 X 線トポグラフィはタンパク質結晶の欠陥の観察においてより有効な方法である。

X線トポグラフィによるタンパク質結晶の欠陥の研究は、国内では京大の泉と筆者のグループが PF の BL-15B を利用して世界に先駆け開始した [9,10]。一方、外国でもいくつかの精力的な研究が NSLS, ESRF, CHESS, APS などの放射光を利用して行われている [11-18]。しかしながら、これまでに欠陥像を明瞭に観察した例はほとんどなく、転位像の消滅条件から転位を観察したのは泉と筆者のグループの共同研究によるもののみである [10]。筆者のグループは、以前から PF の BL-15B の放射光を利用して低分子有機結晶の放射光白色 X 線トポグラフィに関する研究を行ってきた [19-23]。代表的な成果として、X線テレビカメラを用いた低分子有機結晶中の転位の動的挙動の観察などがあげられる [23]。これらの研究を通して、低分子有機結晶の放射光白色 X 線トポグラフィは照射損傷を受けやすいものの基本的には無機結晶で確立されてきた撮影方法や解析方法がそのまま使えることがわかった。しかし、タンパク質結晶では、必ずしもこれまでの方法がそのまま適

用できないことがわかってきた。

X線トポグラフィにおける結晶欠陥のコントラストは、主に、欠陥まわりの歪んだ領域からの運動学的X線回折による direct image (直接像) として観察される [6-8]。一般に、X線トポグラフィによって結晶内部を含む結晶全体における欠陥の場所的分布状態を観察するためには、反射法よりもむしろ透過法が用いられる。透過法によって直接像を観察するためには、よく知られているように試料の厚さ  $t$  は  $\mu t < 1$  の条件を満足しなければならない。ここで、 $\mu$  は試料における入射X線の線吸収係数である。さらに、重要な条件として、 $t > \alpha \zeta$  がある [24]。ここで、 $\zeta$  は消衰距離、 $\alpha = 0.15 - 0.4$  である。これらの条件をまとめると、直接像を得るための試料の厚さの範囲は

$$0.4\zeta < t < 1/\mu \quad (1)$$

となる。また、完全結晶の対称反射における消衰距離  $\zeta$  は、

$$\zeta = (\pi/r_e)V_c \cos\theta / |F_{hkl}| \lambda \quad (2)$$

で与えられる。ここで、 $r_e$  は電子の古典半径、 $V_c$  は単位格子の体積、 $\theta$  はブラッグ角、 $F_{hkl}$  は構造因子、 $\lambda$  は入射X線の波長である。Table 1 に、X線トポグラフィで直接像を得るための試料の厚さの範囲 (1) 式) が、代表的な無機結晶 (Si)、低分子有機結晶 (ベンジル)、タンパク質結晶 (正方晶ニワトリ卵白リゾチーム) に対して、それぞれ示されている。これらの値は、それぞれ典型的なX線トポグラフィの実験条件において計算されたものである。Table 1 に示されているように、Si やベンジルでは厚さの上限値は、それぞれ 0.732 mm、1.428 mm で、下限値は、それぞれ 0.024 mm、0.038 mm である。一方、正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶では、上限値が 5.02 mm で、下限値が 1.35 mm である。タンパク質結晶では、上限値も下限値もどちらも無機結晶や低分子有機結晶より大きくなり、特に、下限値は二桁も大きくなる。これは、(2) 式から明らかな

**Table 1** Critical conditions ( $0.4\zeta < t < 1/\mu$ ) for the thickness  $t$  of samples to obtain direct images on transmission X-ray topographs for typical inorganic crystal (Si), organic crystal of small molecule (benzil) and protein crystal (tetragonal hen egg-white (HEW) lysozyme). X-ray wavelengths and reflections employed in these calculations are usually used in X-ray topographic experiments. The X-ray wavelengths are 0.71, 1.54 and 1.41 Å for Si, benzil and tetragonal HEW lysozyme, respectively.  $V_c$  is the volume of unit cell,  $F_{hkl}$  is the structure factor for the reflection,  $\mu$  is the linear absorption coefficient and  $\zeta$  is the extinction distance.

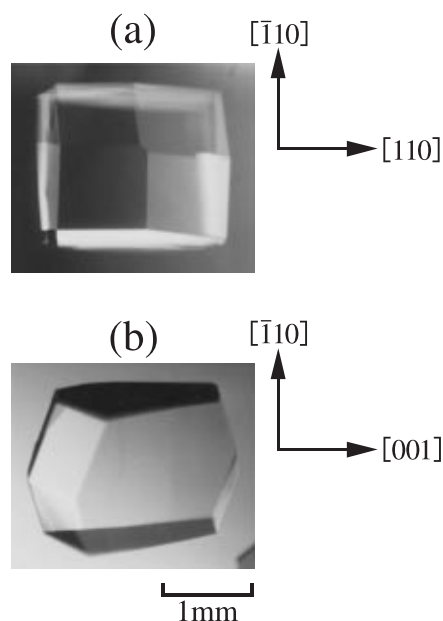
Crystal (Reflection)	$V_c$ (Å <sup>3</sup> )	$ F_{hkl} $	$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	$\zeta$ (mm)	$0.4\zeta < t < 1/\mu$ (mm)
Si (333)	160	37.9	1.365	0.062	$0.024 < t < 0.732$
Benzil (2200)	416	61.9	0.7	0.096	$0.038 < t < 1.428$
Tetragonal HEW lysozyme (800)	237133	695	0.199	3.383	$1.35 < t < 5.02$

ように、消衰距離が、主に、構造因子に対する単位格子の体積の比で決まることによる。すなわち、タンパク質結晶では単位格子の体積が大きいので、その消衰距離が極端に大きくなるからである。Table 1 から明らかなように、無機結晶や低分子有機結晶のトポグラフィ実験では、よく知られているように試料の厚さの上限値が重要であり、できるだけ薄い試料、ここでは、1 mm 以下のものが必要なことがわかる。一方、ミリメートルサイズの結晶が得難いタンパク質結晶では、下限値が大きな問題となり、ここでは、1.5 mm 以上の結晶が必要なことを示している。これまで行われてきたタンパク質結晶のX線トポグラフィ実験のほとんどは、0.5 mm 以下の結晶が用いられてきた [11-18]。したがって、このような結晶の小ささがX線トポグラフィによる直接像としての欠陥の観察を困難にしていたものと考えられる。本研究では、ニワトリ卵白リゾチームの大型結晶を育成して、X線トポグラフィによりタンパク質結晶の欠陥、特に転位の観察をおこなった。

### 3. 実験方法

#### 3-1. タンパク質結晶の育成

本研究では、タンパク質としては例外的に比較的容易にミリメートルサイズの結晶が育成できる正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶を研究対象とした。大型結晶を育成するために、産総研の安宅らによって考案された NiCl<sub>2</sub> 濃度勾配法 [25] を用いた。この方法によって約2週間で最大4 mm 程度の正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶が育成された [26]。育成された結晶は {110} と {101} の晶癖をもった。Fig. 1(a), (b) に、代表的な正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶の [001] および [110] 方向から撮影された結晶の写真をもそれぞれ示す。本研究では、約 1.5 mm 以上の厚さをも



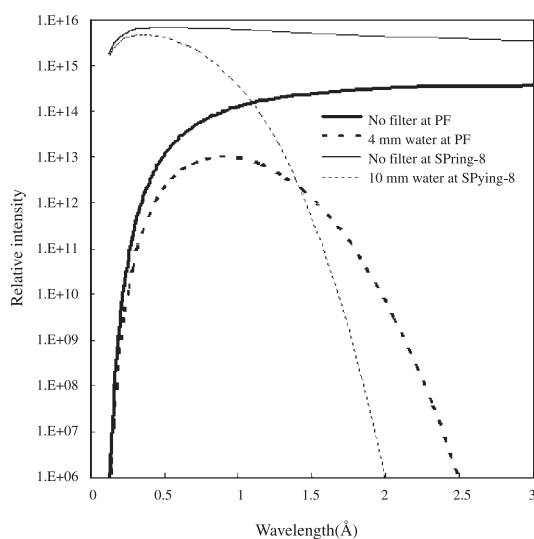
**Figure 1** Optical micrographs of tetragonal hen egg-white lysozyme crystals grown by the salt concentration gradient method, respectively viewed along (a) [001] direction and (b) [110] direction.

った正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶がトポグラフ観察に用いられた。

### 3-2. 放射光白色X線トポグラフィ

有機結晶の放射光白色X線トポグラフィにおいて実験上の最大の問題は放射光白色X線による試料の照射損傷である。これは放射光の長波長成分による試料の温度上昇が原因である。この長波長成分を取り除くためにAlなどの金属板が吸収板として用いられてきた[19-23]。しかし、タンパク質結晶では、金属吸収板を用いても照射損傷を十分抑えることができなかつた。そこで、我々はタンパク質結晶中に多量に含まれている水分子が放射光の吸収によって何らかの変化を受け、それによって結晶の劣化を引き起こしていると考えた。そこで水フィルターを用いることによって、長波長成分の除去と同時に結晶内の水分子による放射光の吸収を抑えることを試みた。結果として、格段に放射光によるタンパク質結晶の照射損傷を抑えることができた[9,10]。そこで本研究では、水フィルターを用いて放射光白色X線トポグラフの撮影を行った。

Fig. 2はPFのBL-15B1における放射光の強度分布を波長に対して示したものである。水フィルターを入れたときの強度分布も示されている。比較のためにSPring-8のBL28B2における放射光の強度分布も示してある。PFの放射光強度の極大値は4 Åであることがわかる。水フィルターを導入することによって、その極大値が高エネルギー側にシフトし、厚さ4 mmの水フィルターを導入すると極大値が0.9 Åになることがわかる。一方、SPring-8では放射光強度の極大値が、0.5 Åであり、当然ではあるがPFに比べてかなり高エネルギー側にある。水フィルターを入れたら、この極大値はさらに短波長側へシフトする。紙面の都合上、X線トポグラフにおける欠陥像の幅の詳細については述べないが、例えば、転位像の幅は近似的には消衰



**Figure 2** Synchrotron white-beam X-ray profile with wavelength arriving at the sample on BL-15B1 at PF and BL28B2 at SPring-8. The effect on the white-beam X-ray spectrum of the filtrations through 4 mm of water is shown. The intensity scale is logarithmic.

**Table 2** Calculated relative intensity  $I_h$  contributed by higher-order reflections in the Laue topograph labeled 200 in Fig. 3.  $P(\lambda)$  is the relative distribution of X-ray intensity of wavelength  $\lambda$  arriving at the sample after the 4 mm water filtration on BL-15B1 of PF (Fig. 2),  $F_{hkl}$  is the structure factor for the reflection,  $\theta$  is the Bragg angle,  $\mu$  is the linear absorption coefficient and  $t$  is the thickness of the crystal used. Here, the absorption has been described roughly by the factor  $\exp(-\mu t)$ . The values of  $|F_{hkl}|$  were taken from experimental data.

Reflection	$\theta$ (°)	$\lambda$ (Å)	$ F_{hkl} $	$P(\lambda)$	$\exp(-\mu t)$	$I_h$
200	3.25	4.48	575	$< 10^{-3}$	$1.03 \times 10^{-3}$	$< 10^3$
400	3.25	2.24	885	$2.30 \times 10^{-3}$	0.22	$1.5 \times 10^3$
600	3.25	1.49	41	13	0.62	$3.6 \times 10^5$
800	3.25	1.21	695	70	0.81	$1.7 \times 10^7$
10,0,0	3.25	0.89	649	90	0.90	$1.1 \times 10^7$
12,0,0	3.25	0.74	338	73	0.94	$3.0 \times 10^6$
14,0,0	3.25	0.64	186	49	0.96	$7.2 \times 10^5$

距離に比例する。Table 1に示したようにタンパク質結晶では消衰距離が大きいために、転位像の幅は、無機結晶や低分子有機結晶の場合に比べて、かなり広がる。この幅は、(2)式から明らかなように高エネルギーX線を用いるとさらに広がる。タンパク質結晶において、細くて明瞭な転位像を観察するためには、1 Å以上の長い波長のX線が必要となる。しかし、上述したように長波長側のX線はタンパク質結晶に照射損傷をもたらす。したがって、タンパク質結晶において、照射損傷を抑え、かつ細い転位像を観察するためには、1-2 Å程度の入射X線の波長が適当であると考えられる。もちろん、SPring-8の放射光は角度分散が小さいので結晶内の微小な歪にも敏感でありX線トポグラフィには有効である[27]が、Fig. 2から明らかなように高エネルギーX線が支配的であるため転位像の幅を広げてしまう。このことは、無機結晶や低分子有機結晶に比べて完全性の劣るタンパク質結晶では、転位像の重なりが起こり、個々の転位を識別して観察することが難しくなることを意味している。したがって、現時点では、タンパク質結晶の放射光白色X線トポグラフィに適した放射光の強度分布は、Fig. 2に示されているようなPFのBL-15B1における厚さ4 mmの水フィルターを通した0.9 Åのところの極大値をもつ放射光であると考えられる。

放射光白色X線は試験管に対し強く散乱する。このため、育成された正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶は試験管内から取り出し、X線に対し透過率の良いものに移さなければならない。一般に、X線構造解析では肉厚が0.01 mmと非常に薄いキャピラリーを用いているが、直径が最大で2 mmと小さいために大型結晶を入れることができない。そこで、キャピラリーの代わりにストローを用いた。また、結晶の乾燥を防ぐために両端をパラフィルムで封じた。正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶の[001]方向が入射X線の方向とほぼ平行になるように試料をゴニオメーター上にセットした。タンパク質結晶のように格子定数の大きな結晶では、主に低角側の回折が起こる。このため、カ



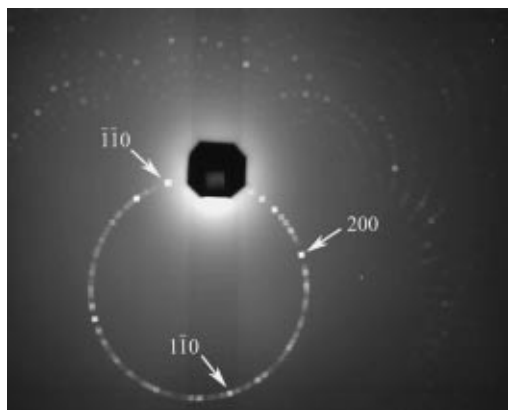
メラ長は、無機結晶や低分子有機結晶の場合に比べて長く、25 cm とした。近年、X線の記録装置として、イメージングプレートが多く用いられている。このイメージングプレートはX線に対して感度が良くX線フィルムの10倍から60倍であるため、測定時間が短く済み、コンピュータと併用することにより、データの収集を短時間で済ませることができる。さらに、フィルムのように暗室で現像をする手間が省ける。しかしながら、現在のイメージングプレートの実際の分解能はせいぜい20  $\mu\text{m}$  程度であるので、残念ながらX線トポグラフを記録するほど十分な分解能には至っていない。X線トポグラフィでは、悪くても5-10  $\mu\text{m}$  程度の分解能は必要である。したがって、現在でもX線トポグラフィ像の記録方法にはX線フィルムや原子核乾板が必要不可欠である。この一連の実験では、AGFA D2のX線フィルムを用いた。また、撮影のためのX線照射時間は数10秒であった。

## 4. 結果と考察

### 4-1. ラウエトポグラフィの解析

Fig. 3 に正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶のラウエパターンを示す。このラウエパターンをラウエ解析プログラムにより解析した。結果として、観察されたラウエパターンは正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶の[001]方向に対して、6°傾いた入射X線によって記録されたことが分かった。Fig. 3 に示されているように、3つの強いラウエスポットは、それぞれ、200,  $\bar{1}\bar{1}0$ ,  $1\bar{1}0$ の反射に対応することがわかった。白色X線を用いたこれらのラウエスポットには高次の反射の寄与が含まれている。Fig. 3 に示されている指数は、それぞれのラウエスポットに寄与している反射の中で最低次の指数が示されている。例えば、Fig. 3 の200に対応するスポットは400, 600, 800などの高次反射の寄与が含まれている。それぞれのラウエスポットに最も寄与している反射指数を決定するために、高次反射からの相対強度 $I_h$ を見積もった。高次反射の相対強度 $I_h$ は、

$$I_h = P(\lambda)|F_{hkl}|^2 \lambda^3 \text{cosec}^2 \theta \exp(-\mu t) \quad (3)$$



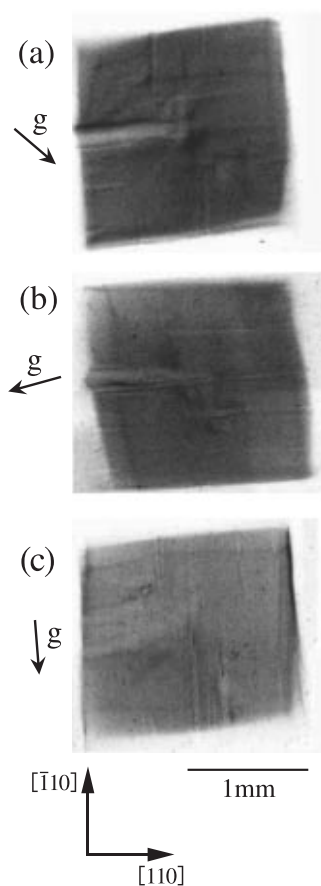
**Figure 3** Laue topographic pattern recorded with the synchrotron white-beam X-ray almost parallel to [001] of the tetragonal hen egg-white lysozyme crystal.

によって与えられる [28]。ここで、 $P(\lambda)$  は入射X線の波長 $\lambda$ に対する相対強度、 $F_{hkl}$  は構造因子、 $\theta$  はブラッグ角、 $\exp(-\mu t)$  は試料によるX線の吸収を示す。Fig. 3 に示されている200,  $\bar{1}\bar{1}0$ ,  $1\bar{1}0$ のスポットに寄与する高次反射の相対強度 $I_h$ が、それぞれ計算された。この計算では、 $P(\lambda)$ として、Fig. 2 に示されている実際の実験に用いられた厚さ4 mmの水フィルターを挿入した時の入射X線の相対強度を用いた。Table 2 に200のラウエスポットにおいて計算された高次反射の寄与を示す。Table 2 から明らかのように、200のスポットに最も寄与している反射は800であることがわかる。同様に、 $\bar{1}\bar{1}0$ に対しては $\bar{4}\bar{4}0$ ,  $1\bar{1}0$ に対しては $12, \bar{1}\bar{2}, 0$ の反射が最大の寄与を示すことがわかった。

次に、上記のように指数が同定された3つのラウエスポットに対して、(1)式で示した直接像を得ることのできる結晶の厚さの下限值である $0.4\xi$  [24]を計算した。800,  $\bar{4}\bar{4}0$ ,  $12, \bar{1}\bar{2}, 0$ の反射に対して計算された結晶の厚さの下限值 $0.4\xi$ は、それぞれ、1.35 mm, 1.11 mm, 1.42 mmとなった。一方、本研究で用いられた結晶の厚さは1.5 mm以上のものである。これらの結晶の厚さは、計算されたものの下限値よりも明らかに大きいことがわかる。つまり、本研究で用いられた結晶は、直接像を得るための条件を十分に満足していることがわかった。したがって、本研究で注目した3つのトポグラフィにおいて欠陥像、特に転位像が明瞭に観察されることが十分に期待される。

### 4-2. 転位のキャラクタリゼーション

Fig. 4 に Fig. 3 に示された200,  $\bar{1}\bar{1}0$ ,  $1\bar{1}0$ のラウエスポット(トポグラフィ)の拡大写真を示す。Fig. 4(a),(b),(c)は、4-1.から、それぞれ800,  $\bar{4}\bar{4}0$ ,  $12, \bar{1}\bar{2}, 0$ 反射によるX線トポグラフィとみなすことができる。Fig. 4(a)に見られるように、結晶の中心から外側に向かってほぼ真直ぐに伸びている線状コントラストははっきりと観察される。これらの線状コントラストは、 $[\bar{1}\bar{1}0]$ あるいは $[110]$ 方向にほぼ平行である。これらの線状コントラストの分布状態は、溶液成長によって育成される低分子有機結晶中でしばしば観察されてきた成長転位と非常に良く似ている [7,29]。さらに、 $[\bar{1}\bar{1}0]$ 方向に平行な線状コントラストは、Fig. 4(b)の $\bar{4}\bar{4}0$ 反射で消滅していることがわかる。また、 $[110]$ 方向に平行な線状コントラストは、Fig. 4(c)の $12, \bar{1}\bar{2}, 0$ 反射で消滅している。このような反射ベクトルの違いによる線状コントラストの消滅は、そのコントラストが転位像であることの一つの証拠でもある。したがって、これらの線状コントラストが転位線に対応することは明らかである。そこで、転位像の消滅則である $\mathbf{g} \cdot \mathbf{b} = 0$ に従って、転位のバーガス・ベクトルの決定を行った。 $\mathbf{g}$ は反射(回折)ベクトル、 $\mathbf{b}$ はバーガス・ベクトルである。 $[\bar{1}\bar{1}0]$ に平行な転位のバーガス・ベクトルは $[\bar{1}\bar{1}0]$ 方向であり、 $[110]$ に平行な転位のそれは $[110]$ 方向であることがわかった。したがって、正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶において支配的な転位は、 $\langle 110 \rangle$ 方向のバーガス・ベクトルをもつ、らせん転位であることがわかった。さらに、Fig. 4のトポグラフィ上



**Figure 4** Laue topographs of (a) 800, (b)  $\bar{4}40$  and (c)  $12, \bar{1}2, 0$  reflections, respectively, enlarged from the Laue intensities labeled 200,  $\bar{1}10$  and  $110$  in Fig. 3.

の転位線の数から、転位密度が約  $3 \times 10^2 / \text{cm}^2$  であることが見積もられた。この転位密度は、完全性の高い無機結晶や低分子有機結晶と同程度である。つまり、正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶では転位密度が比較的低いことがわかった。しかし、ロッキングカーブなどの測定から、正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶の完全性は無機結晶や低分子有機結晶のそれらに比べて低いようである。したがって、タンパク質結晶の不完全性は、主に、転位以外の欠陥によるものであると考えられる。

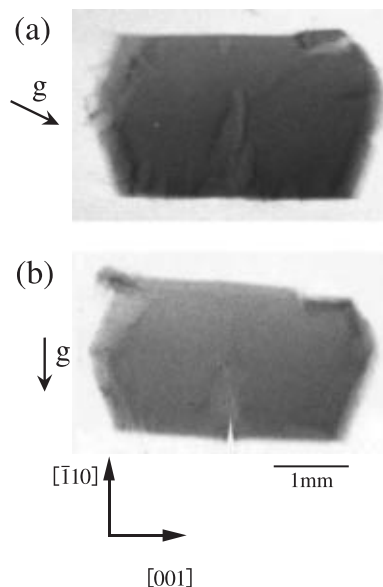
観察された  $\langle 110 \rangle$  方向のバーガス・ベクトルをもつ転位の起源を明らかにするために、正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶中で可能なバーガス・ベクトルを考えた。転位論 [30] によれば、転位の単位長さあたりの転位のエネルギー  $E$  は二つの項から成る。一つは転位まわりの歪み場による弾性エネルギー  $E_a$  であり、もう一つは転位芯のエネルギー  $E_c$  である。一般に、転位芯のエネルギー  $E_c$  は、転位まわりの歪み場による弾性エネルギー  $E_a$  に比べて一桁以上小さいため無視できる [31]。このため、転位のエネルギー  $E$  は、

$$E \approx E_a = (Gb^2/4\pi)\ln(R/r_0) \quad (4)$$

のように、転位の弾性エネルギー  $E_a$  として近似的に与えられる。ここで、 $G$  は剛性率、 $R/r_0$  は転位芯の半径に対す

**Table 3** Possible Burgers vectors  $b$  of dislocations in tetragonal hen egg-white lysozyme crystals.  $Gb^2$  is also given in this table, since the dislocation elastic energy is proportional to  $Gb^2$  as shown in equation (4), where  $G$  is the shear modulus estimated from the sound velocity measured previously [3].

$b$	$ b $ (Å)	$G$ (GPa)	$Gb^2$ ( $10^{-10} \text{Jm}^{-1}$ )
[001]	37.9	1.02	147
[100], [010]	79.1	1.02	638
[101]	87.7	1.02	785
[110]	111.8	1.02	1275



**Figure 5** Laue topographs of (a)  $1\bar{1}2$  and (b)  $\bar{1}2, \bar{1}2, 0$  reflections recorded with the synchrotron white-beam X-ray almost parallel to  $[110]$  in the tetragonal hen egg-white lysozyme crystal including cracks.

る転位線からの距離の比である。式 (4) から、転位のエネルギーがバーガス・ベクトルの二乗に比例することがわかる。これは、より短い格子並進ベクトルがバーガス・ベクトルとして可能性が高いことを示している。Table 3 に正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶中で可能なバーガス・ベクトルと、転位の弾性エネルギーすなわち  $Gb^2$  の値が示されている。ここで、計算に用いられた剛性率  $G$  は、以前、測定された正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶の音速の値から見積もられたものである [3]。今回の実験で観察された  $\langle 110 \rangle$  方向のバーガス・ベクトルは、Table 3 に示されているベクトルの中で最短のものではない。しかしながら、このような長いバーガス・ベクトルは、低分子有機結晶の成長転位でもしばしば観察されてきた。一般に、成長転位は弾性エネルギーが高くても、しばしば導入されることがある。実際、正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶において  $\langle 110 \rangle$  方向の渦巻き成長が原子間力顕微鏡 (AFM) によって観察されている [32-34]。このことから、観察された  $\langle 110 \rangle$  方向のらせん転位は、正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶の  $\langle 110 \rangle$  方向の渦巻き成長に対応する成長転位であると考えられる。

さらに、 $\langle 110 \rangle$  以外のバーガス・ベクトルが、クラックの入った正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶において

観察された。Fig. 5 に、[110] 方向にはほぼ平行に X 線を入射したときの X 線トポグラフィを示す。Fig. 5(a), (b) は、指数付けの結果、それぞれ  $1\bar{1}\bar{2}$ ,  $\bar{1}\bar{2}, \bar{1}\bar{2}, 0$  の反射によるトポグラフィに対応することがわかった。結晶内のクラックはすべての反射のトポグラフィにおいて観察された。クラックの方向は [001] 方向に垂直である。Fig. 5(a) に見られるように、クラックのまわりにループ状の線状コントラストが明瞭に観察される。このループ状のコントラストは Fig. 5(a) の  $1\bar{1}\bar{2}$  反射で見ることができ、 $\bar{1}\bar{2}, \bar{1}\bar{2}, 0$  反射においては消滅している。このコントラストの消滅もまた、その線状コントラストが転位線に対応していることを示している。また、転位像の消滅則から、バーガス・ベクトルが [001] であることが同定された。このベクトルは Table 3 の中の最短のバーガス・ベクトルに相当している。一般に、すべりによって導入されるすべり転位は最短のバーガス・ベクトルをもつ。正方晶ニワトリ卵白リゾチーム結晶におけるすべり現象、つまりすべり線は、以前行われたインデントーションによって導入された圧痕まわりに明瞭に観察されてきた [2]。このことは、すべりがクラック導入時の変形による応力集中によっても十分に引き起こされることを意味している。したがって、観察された転位ループが応力集中によって生じたすべり転位であることは明らかである。Table 3 に示されているように、タンパク質結晶の剛性率は比較的小さいもののバーガス・ベクトルがかなり大きいために、その転位の弾性エネルギーは非常に大きくなる。タンパク質結晶では、最短のバーガス・ベクトルでさえ、無機結晶や低分子有機結晶のそれらに比べてかなり大きい。このような大きな弾性エネルギーをもつタンパク質結晶の転位がすべりによって導入されることは大変興味深いことである。

## 5. まとめ

タンパク質結晶の X 線トポグラフィの実験条件は、良く知られているような無機結晶や低分子有機結晶とは大きく異なるが、基本的には、用いられる試料の厚さなどの実験条件が満足されればタンパク質結晶であっても明瞭なコントラストで欠陥像、特に転位像が観察されることがわかった。また、本稿では示さなかったが、転位像の詳細な解析から、タンパク質結晶中の転位の構造モデルや X 線回折像に対して、これまでの転位論や運動学的回折理論が単純には適応できない事実が現れている [35]。これが、まさにタンパク質分子自体および結晶内の水分子といったタンパク質結晶の特徴によるものであると考えられる。タンパク質結晶の物性に関する研究はまだ始まったばかりで、その性質はほとんど理解されていない。本研究における X 線トポグラフィのタンパク質結晶への応用は、これまでの Si を中心とする半導体産業の発展の歴史からも明らかのように、タンパク質結晶の物性研究の発展に向けた重要な一歩になるとと思われる。

結晶の完全性の評価は、いつの時代も比較的地味な研究であるが、固体物理、材料科学、あるいは最近のタン

パク質の構造解析においても必要不可欠である。X 線トポグラフィは結晶欠陥の観察のための最も有効な方法の一つである。外国では X 線トポグラフィの研究は依然として精力的に行われている。一方で、国内では X 線トポグラフィの研究者がかなり減少していることは大変残念なことである。PF の BL-15B1 の実験ステーションでは、これまでに単色 X 線と白色 X 線の切り替えシステムの導入や、最近では簡易型ではあるがロッキングカーブの同時測定装置を導入して頂いた。しかし、世界の主な放射光トポグラフィの実験施設からみるとかなり寂しい気がする。位相敏感トポグラフィ、逆空間マッピングシステムなどの導入といった世界トップレベルのビームラインへの改善を進めるためにもユーザー数の増加が望まれる。本稿を通して放射光トポグラフィに少しでも関心を持っていただければ幸いである。

## 謝辞

本研究は、主に KEK-PF の課題番号 2001G062, 2003G022 で実施されたもので、ビームライン担当者の物質構造科学研究所の杉山弘氏、河田洋氏に心から感謝いたします。また、共同研究を通してタンパク質結晶の X 線トポグラフィ研究のきっかけをつくって頂きました泉邦英氏（当時、京大）に心から感謝いたします。さらに、タンパク質結晶の育成方法や物性研究に関して様々なアドバイスや情報を提供して頂きました産業技術総合研究所関西センターの安宅光雄氏に心から感謝いたします。最後に、本研究は横浜市立大学大学院総合理学研究科の小島・橋研究室の多くの学生諸氏の協力があつて遂行することができました。改めて彼らの協力に心から感謝いたします。

## 引用文献

- [1] M. Tachibana, H. Koizumi, K. Izumi, K. Kajiwaru, and K. Kojima, *J. Synchrotron Rad.* **10**, 416 (2003).
- [2] M. Tachibana, Y. Kobayashi, T. Shimazu, M. Ataka, and K. Kojima, *J. Cryst. Growth* **198/199**, 661 (1999).
- [3] M. Tachibana, K. Kojima, R. Ikuyama, Y. Kobayashi, M. Ataka, *Chem. Phys. Lett.* **332**, 259 (2000).
- [4] M. Tachibana, K. Kojima, R. Ikuyama, Y. Kobayashi, and M. Ataka, *Chem. Phys. Lett.* **354**, 360 (2002).
- [5] M. Tachibana, H. Koizumi, and K. Kojima, *Phys. Rev. E* (in press).
- [6] B.K. Tanner, *X-ray Diffraction Topography* (Pergamon, Oxford, 1976).
- [7] H. Klapper, *Crystals*, vol. 13, edited by H.C. Freyhardt, pp. 109-162. (Springer, Berlin, 1991).
- [8] D.K. Bowen and B.K. Tanner, *High-Resolution X-ray Diffractometry and Topography* (Taylor & Francis, London, 1998).
- [9] K. Izumi, S. Sawamura, and M. Ataka, *J. Cryst. Growth* **168**, 106 (1996).
- [10] K. Izumi, K. Taguchi, Y. Kobayashi, M. Tachibana, K.



- Kojima, and M. Ataka, *J. Cryst. Growth* **206**, 155 (1999).
- [11] V. Stojanoff and D.P. Siddons, *Acta Cryst. A* **52**, 498 (1996).
- [12] V. Stojanoff, D.P. Siddons, L.A. Monaco, P. Vekilov, and F. Rosenberger, *Acta Cryst. D* **53**, 588 (1997).
- [13] F. Otalora, J.M. Garcia-Ruiz, J.A. Gavira, and B. Capelle, *J. Cryst. Growth* **196**, 546 (1999).
- [14] I. Dobrianov, C. Caylor, S.G. Lemay, K.D. Finkelstein, and R.E. Thorne, *J. Cryst. Growth* **196**, 511 (1999).
- [15] T.J. Boggon, J.R. Helliwell, R.A. Judge, A. Olczak, D.P. Siddons, E.H. Snell, and V. Stojanoff, *Acta Cryst. D* **56**, 868 (2000).
- [16] Z.W. Hu, B. Lai, Y.S. Chu, Z. Cai, D.C. Mancini, B.R. Thomas, and A.A. Chernov, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 148101 (2000).
- [17] I. Dobrianov, K. Kriminski, C.L. Caylor, S.G. Lemay, C. Kimmer, A. Kisseley, K.D. Finkelstein, and R.E. Thorne, *Acta Cryst. D* **57**, 61 (2001).
- [18] W.M. Vetter, D.T. Gallagher, and M. Dudley, *Acta Cryst. D* **58**, 579 (2002).
- [19] M. Tachibana, S. Motomura, A. Uedono, Q. Tang, and K. Kojima, *Jpn. J. Appl. Phys.* **31**, 2202 (1992).
- [20] M. Tachibana, S. Horiuchi, J.S. Wang, and K. Kojima, *J. Phys. D* **26**, B145 (1993).
- [21] M. Tachibana, Q. Tang, N. Ide, and K. Kojima, *Jpn. J. Appl. Phys.* **33**, 1995 (1994).
- [22] M. Shimizu, M. Tachibana, K. Inoue, and K. Kojima, *J. Cryst. Growth* **177**, 135 (1997).
- [23] M. Tachibana, K. Kono, M. Shimizu, and K. Kojima, *J. Cryst. Growth* **198/199**, 665 (1999).
- [24] B.K. Tanner, *Phys. Stat. Sol. (a)* **10**, 381 (1972).
- [25] M. Ataka and T. Katsura, *JAERI-M (Japan Atomic Energy Research Institute-Memos)* **61**, 92-213 (1992).
- [26] M. Tachibana and K. Kojima, *Current Topics in Crystal Growth Research* **6**, 35 (2002).
- [27] Y. Chikaura, S. Iida, S. Kawado, S. Kimura, J. Matsui, M. Umeno, T. Ozaki, T. Shimura, Y. Suzuki, K. Izumi, K. Kawasaki, and T. Ishikawa, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **34**, A158 (2001).
- [28] T. Tuomi, K. Naukkarinen, and P. Rabe, *Phys. Stat. Sol. (a)* **25**, 93 (1974).
- [29] J.N. Sherwood, *Defect Control in Semiconductors*, edited by K. Sumino, pp. 1611-1621 (North-Holland, Amsterdam, 1990).
- [30] J.P. Hirth and J. Lothe, *Theory of Dislocations*, 2nd ed. (Wiley, New York, 1982).
- [31] K. Kojima, *Progress in Crystal Growth and Characterization*, edited by N. Niizeki, pp. 369-420 (Pergamon, Oxford, 1991).
- [32] S.D. Durbin, W.E. Carlson, and M.T. Saros, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **26**, B128 (1993).
- [33] J.H. Konert, P. D'Antonio, and K.B. Ward, *Acta Cryst. D* **50**, 603 (1994).
- [34] A. McPherson, A.J. Malkin, Yu.G. Kuznetsov, and M. Plomp, *Acta Cryst. D* **57**, 1053 (2001).
- [35] H. Koizumi, M. Shimizu, M. Tachibana, and K. Kojima, (in preparation).

(2004年3月3日原稿受付)

## 著者紹介

橘 勝 Masaru TACHIBANA



横浜市立大学大学院総合理学研究科  
助教授

〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2

TEL&FAX: 045-787-2307

e-mail: tachiban@yokohama-cu.ac.jp

略歴：1991年早稲田大学大学院理工学  
研究科博士課程中退，1991年横浜市立

大学文理学部助手，1998年ケンタッキー大学博士研究員，  
1999年ペンシルバニア州立大学博士研究員を経て，2001  
年より現職。工学博士。

最近の研究：フラーレン・ナノチューブからタンパク質ま  
で様々な分子性結晶の育成と構造，力学，光学的性質に関  
する研究。

小泉晴比古 Haruhiko KOIZUMI

横浜市立大学大学院総合理学研究科  
博士後期課程在学 (D1)

〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2

TEL: 045-787-2162

FAX: 045-787-2172

小島謙一 Kenichi KOJIMA



横浜市立大学大学院総合理学研究科  
教授

〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2

TEL: 045-787-2171

FAX: 045-787-2172

e-mail: kojima@yokohama-cu.ac.jp

略歴：1971年東北大学大学院工学研究科  
博士課程修了，1972年横浜市立大学文理学部物理学課程  
助手，1975-1976 ノースウエスタン大学博士研究員，1983  
年横浜市立大学文理学部教授を経て，2000年より現職。  
工学博士。