

第2章 タンパク質結晶成長 (Crystallization map 活用の提案)

独立行政法人産業技術総合研究所人間系特別研究体

安宅 光雄

1. Crystallization map (別名モルフオドロム) の利用

1.1 Crystallization map とは

Crystallization map とは、結晶成長実験を系統的に行い、結晶ができたかできないか、結晶以外のもの(例えばアモルファス状の析出物や沈殿)ができたかどうか、あるいは、いかなる外形をもつ結晶が成長したか、成長した結晶は1種類であったか2種類以上か、などを観察記録し、さらに、その結果を図の上に表示したものを指す。場合によっては、それらの結果が何日目の観察で得られたものかという時間的な情報とも組み合わせ、何枚かのマップを作ったり、時間の情報も図上に記入したりすることもできる。図を構成する軸は、何らかの結晶成長条件を決めるもので、例えば温度や過飽和度など多様なものが考えられる。

1.2 Crystallization map は宇宙実験とどうして関係するのか

宇宙実験との関連を、まず先に、少し議論してしまうことにする。

以下の2つの関連があるので、Crystallization map は宇宙実験に積極的に取り入れる余地があり、また、将来的に、そうしてはどうかと筆者が考えることが今年度の本稿で Crystallization map のことを集中して取り上げる理由である。

第1の関わりとして、地上の実験と微小重力状態での実験とで Crystallization map を作成し、それを比較する、という可能性が考えられる。そうすれば、両実験の結果が同一であるのか、どこに違いが出たのかという情報が一目で分かる。

従来、宇宙実験と地上のコントロール実験とは、特定の、あるいは少数個の結晶化条件の下で結晶成長を行ったあと、結晶のX線回折能などの数字を、後で調べた上で異同を比較するという例が多かった。しかし、Crystallization map を用いれば、結晶があったか、なかったか、あるいはどのような形をしていたか、小さく多かったか、大きくて少数であったかなど、定性的な観察結果でも、そのまま表示することができる。これらの表示は、結晶回収直後の観察を使ったり、場合によっては宇宙での観察結果だけを使って、通常、行うことができる。また、単に2つの図を重ね合わせてみれば、違いの有無は一目瞭然である。そこで、結果の表示法、整理法として、もっと活用ができないかと考える次第である。宇宙で何か予想外のことが起きたり違いが出たりしたとき、見落とすことなく、それに気づくため好適な手段であると思われる。

第2の関わりとして、宇宙実験の設計や、その妥当性を示すために、Crystallization map を使うという可能性がある。Crystallization map を用いれば、結晶ができる条件、できない条件の区別や、結晶以外のものができる可能性、できる結晶の大きさ、数、できるまでの日数などを、一目で理解したり判断した

りすることが可能となるのが普通である。そこで、最も望ましい条件(確実に結晶が出るであろう条件、あるいは待ち時間のあいだには、できないことが確実であるような条件、構造解析に使えるような大きな結晶ができることが期待できる条件、あるいは不適切な形の結晶ができないような条件など) を決めるのに使用することができる。さらには、そのような条件が狭いのか、広いのかを判断することもできる。あるいは、そのような望ましい条件の近くとか、それに近づくための道筋の途中に、望ましくない条件があるのかどうか、知ることができる場合がある。そこで、宇宙実験の設計のために、Crystallization map を活用すればどうかとも考える。あるいは、設計が、いかに合理的に、合目的に行われたかを客観的に示すためにも、そのような Crystallization map があれば役立つであろう。

1.3 Crystallization map 作成という方法論の背景

Crystallization map を作ろうという発想は、結晶の有無や外形は、結晶化に使う条件によって大きく変わることが多いので、図の中に記入できるほど多くの変化が見られることの反映でもあり、図を使わなければ理解が難しかったり、図を使って整理することではじめて見通しよく観察結果が分類できたりすることを意味しているとも言える。

わが国の結晶成長の研究の育ての親の1人である砂川一郎氏(東北大学名誉教授、現在山梨県立宝石美術専門学校校長) は、鉱物結晶の外形を観察分類し、それを図的に表示して、「モルフオドロム」という名前を与えた。これは砂川ダイアグラムあるいはモルフオドロムの名前で、国際的にも通用する。これが、Crystallization map の一例である。

中谷宇吉郎が、雪の結晶の外形を観察し、中谷ダイアグラムと呼ばれるものを作製したことも知られている。彼は、雪の結晶の形は、それができたときの温度条件などで決まることに気づき、雪を観察すれば、上空の状態が推測できること、雪は上空の状態を地上に知らせるメッセージを運んでいることを明らかにした。その場合も、雪の形はダイアグラムという図的な表現で表されている。これらのことは、結晶の形と図的な理解とが、密接に結びついていることを示している。

Crystallization map という概念や方法については、我々も、かなりの時間をかけて有用性を示してきたつもりである。例えば、2. に述べるチトクロームcの実験結果は、平成11年秋に東京理科大学で開かれた日本マイクログラビティ応用学会で、宇宙実験へのモルフオドロム導入の可能性という視点から発表した。その後、この考えを発展させて、Importance of nitrate in the crystal growth of cytochrome c from four biological species judged by morphodrom analysis のタイトルで、Journal of Crystal Growth, Vol. 233 (2001) 813-822 に原著論文として発表した。そこで述べた内容の本筋は、宇宙実験と直接関連してはいない。しかし、日本マイクログラビティ応用学会の折りにも発表したとおり、Crystallization map を使うという発想や考え方自体には、従来以上に、宇宙実験との接点をもたせ得ると考える。

最近、三菱総合研究所から宇宙開発事業団に出向されていた中村裕彦氏(砂川一郎氏のお弟子さんでもあるが) は、Crystallization map の有用性について、宇宙の専門家の立場から、改めて活発に啓発を行っている。本稿は、そのような外的な条件も視野に入れながら、Crystallization map の決定や利用についてまとめ、中村氏などが宇宙開発事業団内部で行われた活動を応援することとしたい。

以下、タンパク質結晶の形について、図的な理解を行った例を述べることにする。

2. チトクローム c 結晶の Crystallization map

2.1 チトクローム c とは

チトクローム c は、比較的小さなタンパク質で、酸素呼吸に関与している。地上の動物、植物、微生物は、空気中から酸素を取り入れ、二酸化炭素を吐き出しているものが多い。酸素を取り入れるのは体内でエネルギーを取り出すためである。そのために呼吸鎖と呼ばれる反応経路が用意されており、分子レベルでは、いくつかの酵素類が順に働いて体内で使えるエネルギー物質であるアデノシン 3 リン酸 (ATP) を合成している。

この反応の中で、電子を運ぶ役割をしているのがチトクローム c である。従って、このタンパク質は、酸素呼吸を行う生物に広く分布し、いずれにおいても同じ役割を担っている。なお、チトクローム c には、電子を受け取ったり与えたりする 2 状態 (還元状態と酸化状態) の区別があるが、自らの状態を変えずに、他の反応を触媒するという酵素の定義には当てはまらない。従って、それはタンパク質であるが、酵素ではない。

タンパク質の 1 つである以上、チトクローム c も、それぞれの生物が保有するゲノムの情報に従って、タンパク質生合成の仕組みで体内で合成される。各生物はチトクローム c を有し、それは同一の役目を果たしているとは言え、それぞれの生物が有するチトクローム c のゲノムは、進化の過程で少しずつ変化してきている。その例を、図 1 に示す。

図 1 には、4 つの生物、ウマ、ウシ、マグロ、それに酵母の有するチトクローム c のゲノムが並べて比較してある。アルファベット 1 文字は、それぞれ 1 つのアミノ酸に対応している (図 2)。例えば、ウマとウシのチトクローム c は、共にアミノ酸 104 個からなるタンパク質で、3カ所だけにアミノ酸の違いがある (残りの 101 個は共通である)。これが、進化の過程で起きたウマとウシの相違であり、分子レベルにおいては、そのような違いの総体が、ウマとウシを区別していることになる。

マグロのチトクローム c は、アミノ酸 103 個から成っており、ウシとは 17 個、ウマとは 18 個に違いが及んでいる。すなわち、違いの程度は、ウマとウシの場合よりも拡大しているが、それでも全体の 2 割弱でしかない。ウマ、ウシ、マグロは、どれも脊椎動物であるが、一方酵母はそうではない。この場合、チトクローム c は長さの点でもかなりの違いがあり、N 末端側 (アミノ酸配列番号 1 番) よりも前に、5 個のアミノ酸残基が付加している。アミノ酸の種類にもさらに多くの違いがある。数え方にもよるが、39 個のアミノ酸が異なっている。進化の過程で起きた違いが、アミノ酸の置換数として、定量的に測れるわけである。にもかかわらず、一方で驚くべきことは、これら、4 種の生物が、ゲノムの情報をもとにして、タンパク質を作る基本的な仕組みは共通であり、ゲノムとアミノ酸との対応関係もまったく同一、ゲノム情報がタンパク質に翻訳される仕組みと装置も同一、呼吸鎖で電子伝達を担うタンパク質も共通、という事実である。この事実は、地球上の生命の起源は同じで、その同じ生命が、地球の歴史と共に進化し、現在見られるような生命の多様性を出現させていることを予想させる。ヒトの生命と言えど、それらと共通する部分を有している。

2.2 ウマのチトクローム c の Crystallization map

図3に、Crystallization map の例として、ウマ由来のチトクローム c の結晶成長において作成したものを挙げる。ウマ由来のタンパク質は、Sigma から売られているものをそのまま使用した。純度検定の結果、充分であることを確かめ、また、酸化状態になっていることが可視スペクトルから分かったので、製品をそのまま使ったものである。

結晶化は、20℃において、pH6.0の50mMリン酸アンモニウム緩衝液中において行った。横軸は添加した硫酸の濃度、縦軸は添加した硝酸ナトリウムの濃度である。タンパク質の1%溶液を、まず、作ってから、その0.5mlをガラス製容器にとり、別に、所定濃度（すなわち横軸、縦軸に表示されている濃度）に相当する硫酸、および硝酸ナトリウムを天秤で量りとり、タンパク質溶液に完全に溶解させたものを出発点とした。それを恒温槽に入れて、定期的に結晶の有無などの観察を行った。図に表示してあるのは、60日後の観察結果である。

なお、塩を溶解させた後で、タンパク質溶液の体積が増加していないとすれば、両軸の濃度はモル濃度に一致する。しかし、実際には多少の体積増加があり、モル濃度とは一致しない。硫酸を5モル以上（横軸の右端）も溶解させようとすれば、予め作り置きした硫酸高濃度溶液を単に混合するだけでは不可能であった。そこで、上で述べたように、固体状の塩の粉末を、タンパク質溶液に添加し、ガラス棒で丹念にかき回しながら時間をかけて溶かすという実験操作が不可避であった。その場合、両軸に目盛ったように、もとの溶液量と、それに対する添加重量とから添加量を定義することが最も正確である。

このようにして作製した溶液を20℃で静置し、溶液内で何が起きるかを観察した。図3には、図4に写真を示した結晶が析出した場合、ダイヤモンドの印をつけている。この印は、実際の結晶の形を真似て採用したものである。結晶ではなく、沈殿ができた場合、白丸をつけている。沈殿というのは、濁りを生じる不定形でモロモロの凝集で、光学顕微鏡で拡大しても結晶の形をもたず、偏光面も回転させないようなもののことである。さらに、結晶の沈殿もできなかった場合、ドットの印である。

この図によれば、結晶ができた条件は、ひとつの領域にかたまっている。その領域の中では、何度実験を行っても例外なく結晶ができた。一方、その領域の範囲外で結晶ができたことは一度もなかった。結晶ができる条件は、明瞭に定義できるし、再現性も良いことが分かる。その範囲は、硫酸も硝酸ナトリウムも共に、ある程度溶かしているようなところであった。沈殿ができたのは、結晶ができる領域よりはるかに広範囲で、かつ、結晶ができる塩濃度よりも低い塩濃度であっても、沈殿は生じることがあった。また、結晶ができた場合であっても、沈殿が共存するか、あるいは始め沈殿があったのに、そこから結晶成長が始まると沈殿は消えていくような現象が観察された。沈殿ができる範囲と、何も析出しない領域とのあいだにも、明瞭な境界線を引くことができた。そのような境界線も図には示している。さらに、図の右上方の境界は、タンパク質を加えない双方の塩だけの溶液を静置すると、透明な塩の結晶が出てきた領域と、それができなかった領域との境界である。塩が自然に析出すると、「塩濃度」は一定であると見なせない（図の縦軸、横軸に誤差が生じる）ため、そのような領域はタンパク質結晶成長に使用すべきでないと考えた。それが、右上の境界線よりもさらに右上の領域である。塩の結晶は透明で、チトクローム c 結晶には色が付いているため、両者は容易に区別できる。また、塩の結晶にも、硫酸の結晶らしきもの、硝酸ナトリウムの結晶らしきもの、双方の塩を含んだ混晶らしきものがあり、互

いに形にも違いがあった。左上の境界線が、3本の曲線から成っているのは、おそらく3種類の塩の結晶ができることに対応している。

さて、図3のCrystallization mapを見て気づく情報には、次のようなものが含まれている。

- (1) 硫酸だけを用いて、この濃度のウシ由来チトクロームcを結晶化することはできない。そこに、硝酸ナトリウムを添加することが必須である。このことは、横軸上の記号を辿れば分かる。
- (2) 一方、硝酸ナトリウムだけを加えて、結晶を作ることもできない。このことは、縦軸上の記号を辿れば分かる。
- (3) もしも塩添加によるイオン強度増大だけが結晶化に効果があるとすれば、最もイオン強度が大きいのは、飽和に近い硫酸を加えた場合であるが、その場合には結晶はできていない。従って、硝酸ナトリウムには、少なくとも何らかの化学的な、あるいは特異的な作用があるはずである。
- (4) 結晶ができる場合、硫酸と硝酸ナトリウムとのモル比率は2 : 1程度である。従って、主な作用(例えば物理的にイオン強度を高める働き)を硫酸が担い、従ではあるが大切な作用(例えば化学的に安定化する)を硝酸ナトリウムが担う、というような役割分担が行われていると考え、この結果は説明が付く。
- (5) 凝集体ができる範囲は、結晶化よりもはるかに広がった。従って、凝集体ができる条件の、さらに一部で結晶化が行われている、あるいは凝集体形成は、結晶成長の十分条件ではないが必要条件ではあると考え、説明が付く。
- (6) 結晶ができる条件は、かなり明確に定義できた。温度やpHが一定に保たれている限り、そのような条件を与えるとタンパク質結晶ができるだろう。塩濃度の制御に必要な精密さも、図から読みとることができる。
- (7) できる結晶は一種類であり、それ以外の結晶ができることはなかった。
- (8) この結晶化はバッチ法で行ったものであるが、仮に蒸気拡散法を行う必要ができた場合、例えば、硫酸を2.1 mmol/ml、硝酸ナトリウムを1.0 mmol/ml 含みタンパク質0.5%を含む溶液を調製し、その濃度を倍加させたとき(換言すれば溶媒である水の量を半減させたとき)結晶ができる可能性が高いものと思われる。さらに、その場合、出発点として採用した硫酸を2.1 mmol/ml、硝酸ナトリウムを1.0 mmol/ml 含む溶液を長期間放置しておいても、そこから結晶ができる可能性はない。

これらの情報を図3から読みとることは難しくないと思われる。

一方、もしも仮に、タンパク質濃度、2種類の塩濃度が与えられて、そこから、バッチ法あるいは蒸気拡散法で結晶ができた、という情報だけがあったとしたら、上で書いた8つの情報を読みとることは、たいへんに難しく洞察力や推測が必要であったものとする。図3のようなCrystallization mapを作っておくと、結晶成長の理解に進展が図れるというのは、こういうことを指している。

2.3 ウシのチトクロームcのCrystallization map

図5には、ウシ由来のチトクロームcのCrystallization mapを示す。作るための実験は、ウマの場合と同様である。

ウシの Crystallization map の特徴は、2つの異なる結晶の形があったことである(図6)。その内の1つは、ウマの場合と同じ、ダイヤモンド型であった。これ以外に、花びらのような形、あるいは六角形をした明らかに別の結晶もできた。また、両者が共存する場合もあった。

ウマの場合と同じダイヤモンド型の記号 がつく濃度は、ウマの場合より、やや下(硝酸ナトリウム濃度の低いところ)であった。その上方に、花びら型六角形の結晶だけができる白抜き四角の記号 のところがあり、中間に、両者の共存を示す の印の狭い領域が挟まっていた。結晶ができる範囲の面積は、ウマの場合より広がっていた。従って、とにかく結晶を作りたいという目的がある場合には、ウマよりもウシのチトクロームcを用いるのが良いことが分かる。ただ、その広い範囲から、2種類の結晶ができ得るので、いずれかだけを確実に作りたいような場合には、ウマを用いることにメリットがある。さらに、2種類の結晶ができたり、共存したりする境界が、ウシの場合にはあることを利用すれば、例えば、重力値の違いに応じて、その境界が動くのか動かないのかという設問を設けることも可能だろう。

ウシとウマからの結晶成長に関して現れたこれらの違いは、ゲノムの中の3つのアミノ酸の違いを反映し、分子の形が性質が少しだけ異なったせいである。すなわち、わずかなゲノムの違いが、Crystallization map によって見事に描き分けられたことになる。

ウマの場合に挙げた(1)-(8)の8つの情報に関しては、上で書いた(7)(できる結晶の種類の数)以外、(1)から(6)までと(8)は、そのまま成り立っていた。

2.4 マグロのチトクロームcの Crystallization map

魚類に属するマグロ由来のチトクロームcについても、同様の作業で Crystallization map を作製した。結果を図7に示す。

図7の Crystallization map の特徴は、ウマにもウシにも見られない、棒状の結晶(図8)ができたことであった。ただし、硫酸と硝酸ナトリウムの2つの塩が、モル数比で、ほぼ2:1ないし1:1の割合で共存する場合のみ、結晶ができるということは、前2つの場合と同じであった。2.2で挙げた8つの特徴は、すべて成り立っていると考えることができる。

歴史的には、マグロのチトクロームcの結晶が、硫酸と硝酸ナトリウムが共存する場合にできることがある、というのが、我々が、ここで述べている Crystallization map 作製を平成10年に始めたときに知られていることのすべてであった。既に知られていた条件は、図7で結晶ができるとされている領域の一部に入っている。そのまわりに広がっている、結晶ができる領域が図5から分かる。さらに、図3と図5は、由来する生物種を変えた場合にも、同じ2塩の組み合わせによって結晶ができることを示している。ウマとウシのチトクロームcが、硫酸と硝酸ナトリウム添加でできることは、新しい発見であった。さらに、この作業の副産物として、新たな条件で成長したウシとウマ、双方のチトクロームc結晶は、X線を高い分解能で回折することが分かった。チトクロームcというタンパク質の構造解析は、既に1970年代に日本とアメリカで行われている(実は、日本におけるタンパク質結晶学の幕開けの時代に、芦田玉一、月原富武、田中信夫各氏など、現在も結晶学の指導者として活躍されている研究者が選ばれたのがチトクロームcで、その構造は日本で成功した最初のタンパク質構造の決定であった)。

しかし、1. でも述べたように、チトクローム c は生物界に遍在するタンパク質である。その構造は、比較生化学的に興味がある。呼吸鎖における電子のキャリアーとしての機能は、各生物に共通であるという側面と、それにも係わらず、生物の種のあいだで、タンパク質としての基本であるアミノ酸の1次元的な配列は変化してきているという双方の側面がある。それが、タンパク質の立体構造に、いかに反映しているか、あるいは反映していないかという問題は、X線を高分解能まで回折する結晶を作って比較することによって回答が得られる。

このような興味から、名古屋大学大学院の山根隆教授は、我々の作った結晶化条件の下、ウマ、ウシ、マグロのチトクローム c 結晶を作製し、ご専門のX線結晶学で比較が行われた。その結果は、国際会議などで報告済みである。

宇宙実験の目的は、高分解能のX線回折を与える結晶を得ることにあると強調されることが多い。ここで述べた事実、すなわち、チトクローム c の新たな結晶化条件を見つけ、それを使用して成長した高い品質の結晶を用いて、新しい構造解析が行われたという事実は、高品質結晶の需要が確かに存在していること、既に構造が解かれているチトクローム c のようなタンパク質であったとしても、さらに(良い結晶さえ作れば)改めて構造決定を行う余地があることを示している。同時に、我々の Crystallization map 作製は、とくに宇宙実験とは無関係に進めたものであるが、地上実験レベルで Crystallization map 作製を行うことが、高品質結晶の作製条件発見やその利用につながり得ることをも示しているように思われる。

図7に示すマグロの Crystallization map のみもっていた別の特徴は、map 内の場所に応じて、結晶の枝分かれの仕方が系統的に変化したという事実である。その例を図8に示す。図7の中の場所に応じて、枝が少なく1本の棒であることが目立つような結晶から、順次、枝分かれの甚だしい結晶へと形態が変化していた。これは、このマグロ由来結晶の有する性質であると同時に、いかなる条件で結晶を作れば、枝分かれを多くしたり少なくしたりできるかが Crystallization map から判断・予測できることを示すものである。X線構造解析においては、一般的には、枝分かれの少ない結晶が好まれる。どのように塩濃度を変えれば、そういう結晶が作れるかという情報も、図5や図6には含まれている。仮に、その様子が宇宙の微小重力環境で変化したとすれば、その変化の様子や程度も、Crystallization map から容易に検出でき、見過ごすことがなくなるであろう。

2.5 酵母のチトクローム c の Crystallization map

酵母はパンの製造に使われる有用微生物で、生物学的には真核生物であるが、脊椎動物ではない。そのチトクローム c についても Crystallization map を作製した。結果が図9である。

この図の作製に当たってだけ、購入したチトクローム c を酸化状態に変えた。市販の製品は、酸化状態と還元状態との混合物であることが可視スペクトルから分かったからである。

ただ、そのようなチトクローム c を使用した結晶化実験によって、結晶ができることはなかった。構造が酵母のチトクローム c というところまで変化してしまうと、他の3つの生物種由来のチトクローム c について有効であった、硫酸と硝酸ナトリウムの共存という結晶化条件は、もはや有効性を失ったものと思われる。別の結晶化条件を使って、酵母のチトクローム c の構造は既に解かれている。図9の

Crystallization map は、酵母のチトクローム c が結晶になり得ないということを示すのではなく、我々の調べた条件の下では結晶にならなかったという事実を告げているものである。

2.6 4つの Crystallization map の比較

以上述べてきた、Crystallization map を重ねてみると、ウマ、ウシ、マグロのいずれのチトクローム c も結晶化する、ごく狭い共通領域があり、それから外に、それぞれのチトクローム c だけが結晶化する領域が広がっていることが分かる。これが、チトクローム c 結晶成長だけを基にして眺めた、3つの生物種の共通点と相違点である。

同一のタンパク質、すなわちチトクローム c の結晶化が、それを作った生物種によって、いかに異なるかという問題、それに、2種類の異なった結晶形がいかに作り分けられるかという問題(ウシの場合)、あるいは、同一の結晶の枝分かれが、条件によっていかに異なっていくかという問題(マグロの場合)が、Crystallization map を用いると、明瞭に表示も理解も設計・予言もできることが、これらの例によって分かると思う。

さらに、確実に結晶を作るため、すなわち、再現性良く結晶を作ったり、ある結晶形を選んだり、枝分かれを抑えたり、塩濃度のズレやブレの影響を評価したり、あるいは(蒸気拡散法を選ぶ場合に)待ち時間のあいだに結晶がでないかどうかを判断したりするために、Crystallization map が役立つことも分かることと思う。

1.2 で提出した問題、すなわち、Crystallization map を用いて、いかにして、微小重力のもたらす効果(が存在した場合に、それ)を見落とすことなく見つけるか、そして、微小重力実験を、いかに確実に設計し、また、第三者にそのことを納得させるかという問題に対し、以上の考察が役立つことを期待する。

3. まとめ

ここでは、ウシ、ウマ、マグロに由来するチトクローム c を、特定の濃度、温度、pH(それに常圧、1 G)において、特定の2塩の組み合わせで結晶化することを対象にした Crystallization map 作製例を示した。

その作業を通して、ウシとウマのチトクローム c を結晶化する新しい条件が見つかり、しかも、そうして得られた結晶は、従来の最高分解能に迫るほどX線を回折した。既にそれらの結晶はX線結晶学により、高分解能構造を新たに決めるために使われた。このような作業は、宇宙でタンパク質結晶を作る場合にも主要な目的と考えられている。高分解能結晶が得られた場合の道筋の1つのモデルと考えられる。

Crystallization map を用いれば、結晶化条件によって生じる違いを効果的に理解したり見つけたりできるので、重力の値の相違がもたらし得る違いの検出法として、それを使うことを広く考えると良いのではないかという可能性を示した。

さらに、Crystallization map は、結晶化実験の設計にも役立つので、そういう目的でも広汎に使用できるのではないかという可能性を示した。

図1 4種類の生物、ウマ (Horse)、ウシ (Bovine)、マグロ (Tuna)、酵母 (*S. cerevisiae*) の作るチトクロームcのゲノムの比較

四角で囲ったのは、電荷を有するアミノ酸の内、結晶化に硝酸ナトリウムの関与を要求する可能性のあるものを示す

A	アラニン
C	システイン
D	アスパラギン酸
E	グルタミン酸
F	フェニルアラニン
G	グリシン
H	ヒスチジン
I	イソロイシン
K	リジン
L	ロイシン
M	メチオニン
N	アスパラギン
P	プロリン
Q	グルタミン
R	アルギニン
S	セリン
T	トレオニン
V	バリン
W	トリプトファン
Y	チロシン

図2 20種類のアミノ酸の略号(図1で使用されている1文字表記)

図3 ウマのチトクローム c の Crystallization map

図4 ウマのチトクロームc結晶の写真

図5 ウシのチトクローム c の Crystallization map

図6 ウシのチトクロームc結晶の写真

図7 マグロのチトクローム c の Crystallization map

図8 マグロのチトクロームc結晶の写真

図8 マグロのチトクローム c 結晶の写真(続)

図9 酵母のチトクロームcの Crystallization map