

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14484

研究課題名(和文) 高品質タンパク質単結晶育成技術の確立～交流電場印加によるエントロピー変化の検出～

研究課題名(英文) Crystallization technique for high-quality protein crystals in light of the entropy change under application of an external electric field

研究代表者

小泉 晴比古 (Haruhiko, Koizumi)

東北大学・金属材料研究所・助教

研究者番号：10451626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会に対応するゲノム創薬やテーラーメイド医療を実現するためには、高品質タンパク質結晶の育成技術の確立が望まれている。このため、これまで我々は交流電場を利用し、タンパク質結晶の高品質化に成功してきた。本課題では、電場印加によるエントロピー変化に焦点を当て、タンパク質結晶の高品質化の機構解明を試みている。結果として、電場印加によるタンパク質結晶の高品質化を達成するためには、最適な周波数が存在することを示した。加えて、交流電場印加によるタンパク質結晶の高品質化は、ステップ自由エネルギーの増加によって生じることを示した。さらに、その増加が、固相のエントロピーの減少に起因することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The establishment of crystallization techniques to obtain high-quality single crystals of proteins is desired, because accurate 3D structures of molecules by XRD analysis are obtained by using high-quality single crystals. Therefore, we have succeeded in improving the crystal quality for protein crystals under application of an electric field. In this subject, we try to reveal the mechanism of the improvement in the crystal quality for protein crystals, focusing on the entropy change due to an electric field. As a result, we indicated that improvement of the protein crystal quality could be achieved by selection of an appropriate frequency for the applied electric field, which has a significant effect on the growth of the solid. Moreover, we also revealed that the control of the effective surface energy of the step end plays an important role to grow the high-quality protein crystals, which can be achieved by a decrease in the entropy related to a shape of the step.

研究分野：結晶成長物理学

キーワード：タンパク質結晶 電場印加 完全性 エントロピー

1. 研究開始当初の背景

19世紀中頃、DNAの二重らせん構造が発見され、それに伴い1990年からヒトのゲノムの全塩基配列を解読するプロジェクトであるヒトゲノム計画が国際的協力下で行われた。そして、2003年にはヒトの全遺伝子の情報が公開され、生命の起源を分子レベルで理解するための扉が開かれた。ただ、塩基配列の情報は重要なものではあるが、その情報だけでは生命の起源の理解には不十分である。最も重要なのは、その塩基配列がいつ使われ、そこからどのようなタンパク質分子が発現するのかを理解することにある。タンパク質は三次元的な構造が機能の発現に深く関与している。しかし、塩基配列の情報からはタンパク質のアミノ酸配列の情報しか引き出せない。このため、タンパク質分子の三次元的な構造をすべて明らかにしようという研究が現在も盛んに進められている。特に最近では、タンパク質分子の複雑で動的なシステムの機構を原子スケールのダイナミクスや電子状態に基づいて解明し、生命の本質に迫ることの重要性が説かれている。そして、近年、分解能0.48 Åの超高分解能構造解析による鉄硫黄タンパク質中のFe₄S₄クラスターの価電子状態がNature誌に報告され、化学的な視点から生命反応を理解する極めて重要なデータとして、大きなインパクトを世界に与えた(Y. Hirano et al., Nature (2016).)。しかし、このような超高分解能での構造解析はほとんど達成できておらず、未だ手付かずのままとなっている。これは、高品質なタンパク質結晶の育成が、極めて困難であることに大きく起因している。このため、高品質なタンパク質結晶育成技術の確立が強く望まれている。

2. 研究の目的

これまで申請者は、熱力学的な観点から交流電場が液相と固相の化学ポテンシャルに付加される静電エネルギーの効果を考察し、印加する交流電場の周波数を変えることにより、タンパク質結晶の核形成頻度を自在に制御できることを示してきた。しかし、このような静電エネルギーの効果は、液相と固相の化学ポテンシャルだけではなく、液相と固相のエントロピーや内部エネルギーにも付加されることが熱力学的に解析されている。そこで、申請者は、交流電場印加により液相と固相のエントロピーに付加される静電エネルギーの効果に着目し、交流電場印加による高品質タンパク質結晶育成技術の創出を目指してきた。そして、1 MHzの交流電場を印加しながら正方晶リゾチームを育成することにより、局所的なロッキング・カーブ曲線の半値幅の値が狭くなること、および、測定された半値幅の分布の標準偏差も小さくなることを明らかにした。これは、1 MHzの交流電場を印加することにより、正方晶リゾチームの完全性、および、均質性の向上が

達成されたことを意味している。

1 MHzの交流電場によって付加される静電エネルギーの効果によって、正方晶リゾチーム(固相)のエントロピーが大きく減少することが、熱力学的に解析される。しかし、タンパク質結晶の完全性を改善させるための固相のエントロピーの減少の重要性、及び、交流電場印加による完全性の改善機構の実体は、十分に明らかにできていない。そこで、本申請では、(1)液相のエントロピーが増加することが熱力学的に解析されている20 kHzの交流電場の効果を調べることにより、タンパク質結晶の完全性を改善させるためには、固相のエントロピーの減少が重要であることを示す。また、(2)その場観察を行うことにより、1 MHzの交流電場を印加した際のステップ自由エネルギーの増加も示す。

3. 研究の方法

(1) 20 kHz 印加による完全性への影響

タンパク質には卵白リゾチームが用いられ、正方晶リゾチームが育成された。ロッキング・カーブ測定には、高エネルギー加速器研究機構・フotonファクトリーのBL15B1が用いられた。そして、1.2 Åの波長を用いて、正方晶リゾチームの110系列の反射面を用いて結晶性の評価が行われた。また、得られたロッキング・カーブ曲線からガウス関数によってフィッティングすることにより、半値幅が見積もられた。

(2) 1 MHz 印加下でのその場観察

デジタルマイクロスコープ下で正方晶リゾチームにおける(110)面の面成長速度の観察が行われた。観察された正方晶リゾチームは種結晶から再成長させており、種結晶の表面処理の時間は15分間としたので、種結晶からは転位の発生がない条件で実験を行った。駆動力である過飽和度は温度によって制御し、過飽和度、 σ は、 $\ln(C/C_{eq})$ と定義した。ここで、 C はタンパク質溶液の濃度、 C_{eq} は、溶解度である。

4. 研究成果

(1) 20 kHz 印加による完全性への影響

図1に、電場印加なしとありで育成された正方晶リゾチームから得られた110系列のロッキング・カーブ曲線の半値幅の分布を示す。図1に示されているように、1 MHzの交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームでは、すべての反射面において半値幅の分布が左側へシフトしていること、および、半値幅の分布がシャープになっていることが分かる。これは、1 MHzの交流電場を印加することにより、正方晶リゾチームの完全性が改善、及び、均質になったことを意味している。これに対し、20 kHzの交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームでは、440反射よりも低角の回折波において得られた半値幅の分布は、電場印加なしの分布より

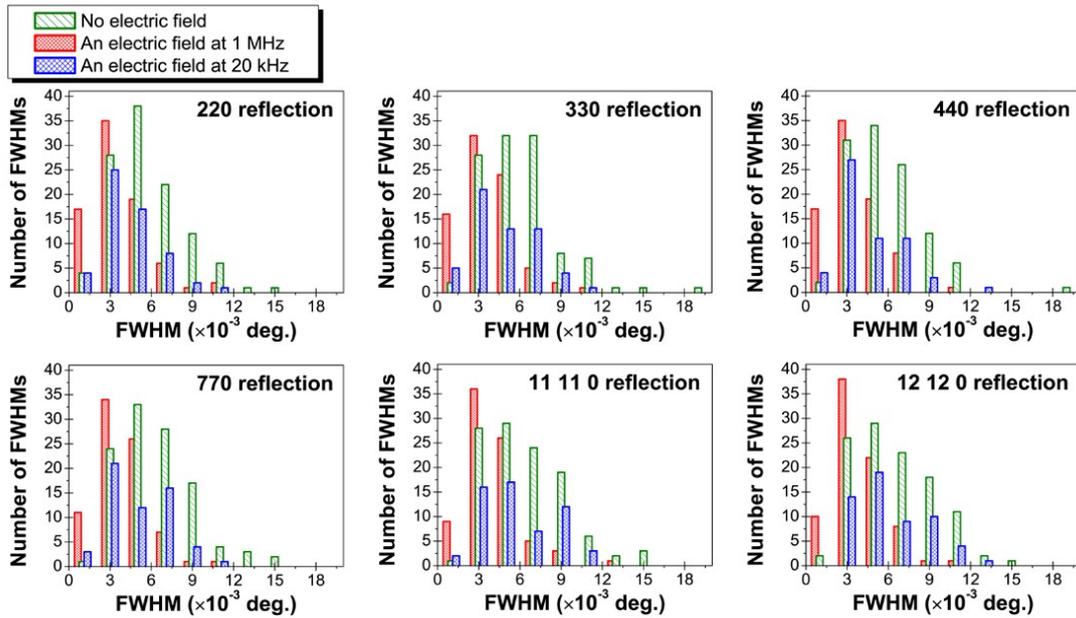


図 1 電場印加ありとなしでの正方晶リゾチームの 110 系列の反射面から得られたロッキング・カーブ曲線の半値幅の分布。

も左側にシフトし、かつ、半値幅の分布がシャープになっていることが観察されるが、770 反射よりも高角の回折波において得られる半値幅の分布は、徐々にブロードになっていることが分かる。そして遂には、20 kHz の交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームの半値幅の分布は、電場印加なしのものと同様になっていることが観察できる。このことは、20 kHz の交流電場を印加した場合は、正方晶リゾチームの完全性が、単純には改善できていないことを示唆している。

次に、20 kHz の交流電場の効果を詳しく調べるために、20 kHz の交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームにおいて、半値幅の支配的な広がり効果の同定を行った。図 2 に、ブラック角, θ , と半値幅, β_{adj} , の関係を示す。図 2 に示されているように、正の傾きをもった直線が得られており、この直線の傾きから結晶内の局所的な歪み、y 切片から結晶内のサブグレイン間の配向不整を見積もることができる。ここで、電場印加

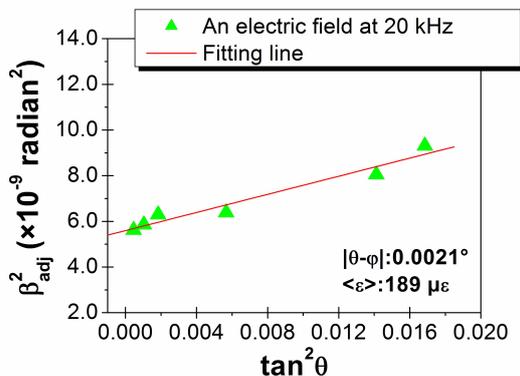


図 2 20 kHz の交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームのブラック角, θ , と半値幅, β_{adj} , の関係。

なしとありにおいて見積もられたサブグレイン間の配向不整と局所的な歪みを表 1 に示す。表 1 を見て分かるように、1 MHz の交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームでは、サブグレイン間の配向不整、及び、局所的な歪みは、電場印加なしの結晶と比較し減少していることが観察できる。しかし、20 kHz の交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームでは、電場印加なしの結果と比較すると、サブグレイン間の配向不整が僅かに減少しているものの、局所的な歪みが顕著に増加していることが観察できる。

外場として静電場印加を行うと、液相と固相のエントロピーに静電エネルギー項が付加されることが熱力学的に解析されている。そして、申請者によるこれまでの研究により、1 MHz の交流電場下では、固相に付加される静電エネルギーの効果が大きくなり、固相のエントロピーが顕著に減少すること、一方、20 kHz の交流電場下では、液相に付加される静電エネルギーの効果が大きくなり、液相のエントロピーが顕著に増加することが明らかにされている。このため、1 MHz の交流電場下において、タンパク質結晶内のサブグレイン間の配向不整、及び、局所的な歪みの減少が達成されたという事実を考慮すると、交流電場印加によりタンパク質結晶の完全性を改善させるためには、固相への静電エネ

表 1 電場印加ありとなしで育成した正方晶リゾチームの配向不整と局所的な歪み。

	Misorientation	Local strain
No electric field	0.0031°	137 μ
Applied field at 20 kHz	0.0021°	189 μ
Applied field at 1 MHz	0.0019°	107 μ

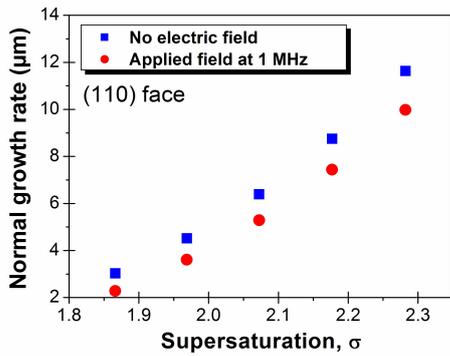


図3 様々な駆動力下での電場印加ありとなしにおいて育成した正方晶リゾチームの(110)面の面成長速度。

ルギーの効果を大きくすること、つまり、固相のエントロピーを減少させることが重要であることが示された。

(2) 1 MHz 印加下でのその場観察

次に、交流電場印加による固相のエントロピーの減少の起源を明らかにするために、その場観察を行った。図3に、様々な駆動力下での電場印加ありとなしにおいて育成した正方晶リゾチームの(110)面の面成長速度をプロットする。図3を見て分かるように、観察したすべての駆動力下において、1 MHzの交流電場を印加することにより、正方晶リゾチームの(110)面の面成長速度の低下が観察された。これは、1 MHz印加により、タンパク質結晶成長のカイネティックが変化した可能性があることを暗示している。

本実験では、転位の発生していない結晶で面成長速度の観察を行った。このため、面成長速度の解析には、多核成長モデルを仮定した。図4に、図3で得られた結果を多核成長モデルで再プロットした結果を示す。図4を見て分かるように、僅かに傾きが異なっていることが観察できる。この傾きからステップ自由エネルギーを見積もることができ、電場印加あり、なしにおけるステップ自由エネルギーは、それぞれ、 1.249 mJ/m^2 と 1.189 mJ/m^2 と見積もられ、1 MHzの交流電場を印加することにより、(110)面のステップ自由エネルギーは僅かに増加することが分かつ

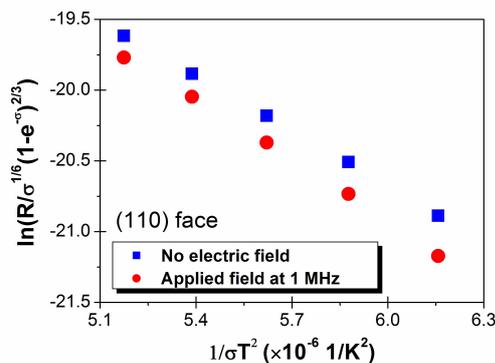


図4 図3で得られた結果を多核成長モデルで再プロットした結果。

た。このステップ自由エネルギーの増加は、表面上にステップを形成するのが難しくなることを意味しており、結晶表面が平らになることが期待できる。つまり、この効果により、結晶成長時に表面上のステップに不純物が取り込まれる頻度が減少し、サブグレイン間の配向不整の減少が引き起こされたと考えられる。ゆえに、1 MHz印加による正方晶リゾチームの完全性の改善は、主にステップ自由エネルギーの増加によって生じていると考えられる。

最後に、1 MHz印加によるステップ自由エネルギーの増加という現象を熱力学的な観点から考察する。結晶表面上の自由エネルギー、 F_s は以下のように表すことができる。

$$F_s = U_s - TS_s$$

ここで、 U_s はステップの形成に必要とされるエネルギー、 S_s はステップの形状に関するエントロピー、 T は絶対温度である。そして、静電場印加によりエンタルピーとエントロピーの項にそれぞれ以下のように静電エネルギーが付加される。

$$U_{s(E)} = U_{s(0)} + \frac{1}{2} V_c E^2 \left[\epsilon - T \frac{\partial \epsilon}{\partial T} \right]$$

$$S_{s(E)} = S_{s(0)} - \frac{1}{2} V_c E^2 \frac{\partial \epsilon}{\partial T}$$

それぞれ、 ϵ は誘電率、 E は外部電場強度、 V_c は電場が印加された体積である。ゆえに、交流電場印加によって、ステップの形成に必要とされるエネルギーが増加するか、もしくは、ステップの形状に関するエントロピーが減少すれば、結晶表面上の自由エネルギーが増加する。

ここで、各々の熱力学的な量への効果を考えると、タンパク質結晶の誘電率の温度依存性は負であることが分かっているため、電場印加によってステップの形状に関するエントロピーは減少することが期待される。これに対し、ステップの形成に必要とされるエネルギーが増加するのか、もしくは、減少するのかは、誘電率の値と誘電率の温度依存性の値の兼ね合いに依存する。タンパク質結晶の誘電率の温度依存性は、おおよそ $10^{-11} \text{ C}^2/\text{Nm}^2\text{K}$ と見積もられている。一方、タンパク質結晶の誘電率は、おおよそ $10^{-10} \text{ C}^2/\text{Nm}^2$ と測定されている。このため、 $\epsilon - T\partial\epsilon/\partial T$ は負となり、電場印加によって、ステップの形成に必要とされるエネルギーは減少することが予想される。したがって、1 MHz印加によるステップ自由エネルギーの増加は、ステップの形状に関するエントロピーの減少によって支配的に引き起こされていると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件) (すべて査読有)

① H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara, M. Tachibana, K. Kojima and J. Nozawa, Technique for High-Quality Protein Crystal Growth by Control of Subgrain Formation under an External Electric Field, *Crystals* **6**, 95-1-14 (2016).

② H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara, M. Tachibana, K. Kojima and J. Nozawa, Crystallization of High-Quality Protein Crystals Using an External Electric Field, *J. Appl. Crystallogr.* **48**, 1507-1513 (2015).

[学会発表] (計 7 件)

① 小泉晴比古、宇田聡、岡田純平、野澤純、“交流電場によるタンパク質結晶化過程の制御”、日本物理学会 第 72 回年次大会、2017 年 3 月 18 日、大阪大学 (大阪府豊中)

② 小泉晴比古、宇田聡、橘勝、小島謙一、岡田純平、野澤純、“交流電場によるタンパク質結晶のサブグレイン内に存在する歪み制御” 第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017 年 3 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜)

③ H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara, M. Tachibana, K. Kojima, J. Nozawa, “Crystallization of High-Quality Protein Crystals using an External Electric Field”, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, August, 9, 2016, 名古屋 (日本)

④ H. Koizumi, S. Uda, M. Tachibana, K. Tsukamoto, K. Kojima, J. Nozawa, “Relaxation of a large amount of Local Strain in Protein Crystals by using Seed Crystals”, 16th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, July 6, 2016, Prague (Czech Republic)

⑤ 小泉晴比古、宇田聡、橘勝、塚本勝男、小島謙一、野澤純、“種結晶を用いたタンパク質結晶内に存在する多量の局所的な歪みの解消”、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 19 日、東京工業大学 (東京都目黒区)

⑥ 小泉晴比古、宇田聡、橘勝、塚本勝男、小島謙一、野澤純、“回折能向上に向けたタンパク質結晶中のサブグレイン形成制御”、第 45 回結晶成長国内会議、2015 年 10 月 20 日、北海道大学 (札幌)

⑦ H. Koizumi, M. Tachibana, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, K. Tsukamoto, Y. Suzuki, S. Uda, and K. Kojima, “Dislocations in High-Quality Glucose Isomerase Crystals Grown from Seed Crystals”, 6th International Symposium on Physical

Science in Space, September 18, 2015, 京都 (日本)

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.uda-lab.imr.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 晴比古 (KOIZUMI, Haruhiko)

東北大学・金属材料研究所・助教

研究者番号：10451626