

令和元年6月24日現在

機関番号：32727

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06708

研究課題名(和文)無転位タンパク質結晶の塑性変形挙動

研究課題名(英文)Plastic deformation behaviours in dislocation free protein crystals

研究代表者

小島 謙一 (KOJIMA, Kenichi)

横浜創英大学・こども教育学部・教授

研究者番号：90046095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質結晶を工学的に利用するために、その力学的強度についての基礎研究を行った。本研究では完全性の高いタンパク質結晶を用いて、放射光X線トポグラフによって微視的な塑性変形機構を解析した。その結果タンパク質結晶の塑性変形は、他の工学的に利用されている金属結晶や半導体結晶と同じように、転位機構、(転位の増殖と運動)によって支配されていることが分かった。また、今までのタンパク質結晶はモザイク構造であると考えられていたので、X回折曲線は運動学的理論で解析されていたが、本研究で得られた完全性の高いタンパク質結晶では動力学的理論で説明する必要があることを初めて示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、タンパク質結晶の塑性変形が転位によって律速されていることを初めて明らかにしたことである。また、従来、タンパク質結晶は完全性が低く無転位結晶は得られないと考えられていたが、本研究により無転位かつ完全性の高いタンパク質結晶が得られ、転位の増殖の機構を解明するとともに、X線回折曲線を動力学回折理論によって説明できることを明らかにした。社会的意義としては、環境問題となっているプラスチックのような人工高分子の代替材料として、自然素材であるタンパク質結晶の工学的利用はこれからの社会にとって必要な事である。

研究成果の概要(英文)：In order to utilize protein crystals as engineering materials, the fundamental mechanical properties of protein crystals were studied. In general, the protein crystals are brittle. To investigate plastic deformation in protein crystals, the stress-induced dislocations in glucose isomerase (GI) crystals without dislocations are investigated by synchrotron X-ray topography. The stress is applied by simple indentation method. The clear dislocation images are observed after the indentation. Dislocations are nucleated from the indentation area and then they propagate to the inside. We confirmed that plastic deformation in protein crystals is controlled by dislocation motion and multiplication. Moreover, the observation of dynamical diffraction in GI crystals is carried out. The oscillation profiles of GI crystals are in agreement with those predicted by dynamical theory of diffraction.

研究分野：物質の力学性質と結晶欠陥

キーワード：転位 結晶の力学的性質 結晶塑性 放射光X線トポグラフ タンパク質結晶 微小硬さ 物質の強度
X線回折曲線

1. 研究開始当初の背景

結晶の塑性変形挙動についての研究は、ほとんどが金属結晶と半導体結晶について行われてきた。その理由は、金属はその高い強度と延性はいつの時代でも工学的材料として有用であり続けたからである。また、20世紀後半になってSiやGaAsなどの半導体結晶を半導体材料として利用するため、その強度や結晶欠陥の挙動が半導体素子の製造過程で重要になってきた。このような材料の強度、すなわち塑性変形挙動を微視的に説明するために、転位という結晶欠陥が導入され、その増殖と運動によって結晶の塑性変形が説明されるようになった。一方、新しい材料、例えば次世代のバイオセンサーやバイオ触媒などのデバイスや医薬品、またポーラス物質としてのバイオマテリアルの代表として、タンパク質結晶は最近話題となっている[1]。しかしながら、タンパク質結晶の強度は弱く、工学的材料としては脆く、その塑性変形挙動は明白ではない。そこで研究代表者は、タンパク質結晶を工学的材料として利用するために、タンパク質結晶の塑性変形挙動を原理的に理解しなければならないと考えた。

また、最近、結晶ではないがタンパク質分子から構成されている天然素材の「蜘蛛の糸」や「絹糸」の強度の研究が行われ、それらの強度が合成高分子材料(プラスチック材料)を越えるとの報告もなされている[2]。昨今、プラスチック材料の環境への影響が懸念されている中で、タンパク質分子や結晶のように自然と調和できる天然素材は、21世紀に研究すべき材料であると考えられる。このような背景のもとで本研究は行われた。

〔参考文献〕

[1] K. Malek; *Biotechnical Lett.* **29** (2007) 1865–1873. [2] S. Osaki; *Polymer Journal* **43** (2011) 194–199.

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに完全性の高い卵白リゾチウム結晶を育成し、その格子欠陥、特に転位について放射光 X 線トポグラフによって観察してきた[3]。また、力学特性について、弾性的性質は超音波パルスエコー法によって卵白リゾチウム結晶の弾性定数を、また、塑性的性質については微小硬さ測定を行ってきた[4]。しかしながら、塑性変形の微視的な機構は明確でなかった。そこで、(1)無転位ないしは低転位密度の高品質タンパク質結晶の育成と、放射光 X 線トポグラフによって得られたトポグラフ像と回折曲線の解析、(2)それら高品質で完全性の高いタンパク質結晶の微小硬さ測定による塑性変形挙動の解析、また、放射光 X 線トポグラフによる、パルス応力によるインデンテーションによる無転位タンパク質結晶の変形前後の転位の挙動を解析することにより、タンパク質結晶の微視的な塑性変形挙動を理解することを目的とした。

〔参考文献〕

[3] K. Wako, M. Tachibana, K. Kojima et al; *J. Cryst. Growth* **401** (2014) 238–241.

[4] H. Koizumi, M. Tachibana, K. Kojima et al; *Phys. Rev.* **E79** (2009) 061917–1–6.

3. 研究の方法

本研究に関しては無転位ないしは低転位密度結晶を育成するために、グルコースイソメラーゼ(GI)結晶と卵白リゾチウム(HEWL)結晶が育成された。本研究では放射光 X 線トポグラフと微小硬さ試験(インデンテーション)の実験を行うため、mmサイズの大きな結晶を必要とする。そのために種結晶を使って育成する方法と種結晶を使用しないで育成する方法で大きな結晶を得る条件を見つける実験を行った。それら結晶の評価は、高エネルギー研究機構(KEK)の放射光施設で放射光 X 線トポグラフの実験で行われた。塑性変形の実験はインデンテーションと放射光 X 線トポグラフ装置に自作の硬さ試験機を取り付けその場観察を行えるようにした。ま

た、変形後の結晶欠陥、転位の観察は全て放射光 X 線トポグラフで行った。なお、高いビームの平行度を必要とする場合は、大型放射光施設 SPring-8 で実験を行った。

4. 研究の成果

(1) 完全性の高いタンパク質結晶の育成と評価

グルコースイソメラーゼ(GI)単結晶の育成とその評価

GI 結晶は二つの方法で結晶化した。一つはグルタルアルデヒドで架橋した GI 結晶を種結晶として育成する方法と架橋しない GI 結晶を種結晶とする方法である。図 1 はグルタルアルデヒドで架橋した GI 結晶を種結晶として結晶を育成した放射光トポグラフである。図の中心の黒い部分は種結晶の位置である。種結晶から二本の転位線が結晶表面に向かって伸びている。この転位線は $[101]$ の反射ベクトルでトポグラフを撮ると消えている。転位線の消滅則 $g \cdot b = 0$ (g は反射ベクトル、 b は転位のバーガスベクトル)により、転位のバーガスベクトルは $[111]$ であることが分かった。

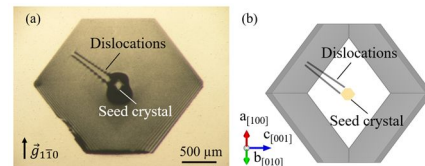


図 1. GI 結晶の(a)X 線トポグラフ像と(b)模式図 .

もうひとつの特徴は、明らかに結晶の端に完全性の高い結晶のときに現れるペンデル縞が観察されている。架橋しない種結晶を用いた場合はあとで述べる図 7 で分かるようにペンデル縞だけが観察される放射光トポグラフ像が得られている。これらの結果は、5 章の主な発表論文の(3)、(6)として発表されている。

グルコースイソメラーゼ (GI) 結晶の動力的回折曲線の観察

放射光 X 線トポグラフによって GI 単結晶が無転位であること、またペンデル縞が観察されることから、完全性が高いことが証明された。そこでさらにロッキングカーブ (回折強度曲線) の解析を行った。図 2 は単色で平行性の高い X 線を照射することによって得られた GI 結晶の典型的な回折強度曲線である。横軸はブラッグ角からのずれ、

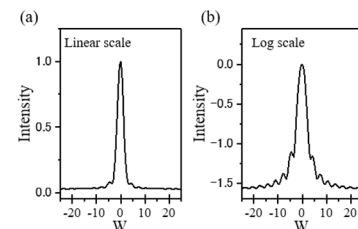


図 2. GI 結晶の回折強度曲線 .
(a)リニアスケール , (b)ログスケール .

縦軸は回折強度を表しており、結晶の回転角に対して回折強度曲線は振動していることが分かる。このような回折強度曲線の振動は、完全性の高い Si 結晶や Ge 結晶などでは観察されているが、タンパク質結晶では初めて観察された。この回折強度曲線を X 線の動力的回折理論で解析した結果、動力的理論曲線と測定された曲線との良い一致が見られた。このことから、タンパク質結晶でも非常に完全性の高い結晶の場合は動力的な考察を行う必要があることを示唆している。これらの結果は、5 章の主な発表論文の(2)として発表されている。

(2) タンパク質結晶の塑性変形挙動

高品質卵白リゾチウム結晶の塑性変形挙動

正方晶卵白リゾチウム (以下、T-HEWL と記述する) 単結晶を用いて湿度制御できる微小硬さ試験によって塑性変形挙動が観察された。その典型的な微小硬さ (H_v) の大気暴露時間依存性の変形挙動を図 3 に示す。横軸は大気暴露時間、縦軸は微小硬さを表している。微小硬さは湿度を約 36% に保持し、大気中に結晶を暴露しその微小硬さを測定している。

図 3(a) から分かるように、硬さは大気中に暴露させると、初めの約 30 分間は 16MPa とほぼ一定の値になるが、その後硬さは急激に上昇し、ほぼ一定の値になる。我々は最初の Hv の低い値で一定の値を持つ領域を潜伏期、次の急激に Hv が増加する領域を遷移期、最後にほぼ一定の値になる領域を飽和期と名付けている。この現象は、いわゆる mobile water が結晶から抜けてゆく量と速さに関係すると考え、これらの領域と湿度の関係を調べた。その結果、図 4 に示すように、硬さの大気暴露時間依存性は、湿度に強く依存し湿度が 36% から 84% まで上昇すると飽和期の Hv は約 250MPa から約 50MPa まで減少した。一方、図 5 に見られるように、潜伏期の Hv は、湿度に依存せずに 16MPa であった。このことから、正方晶卵白リゾチウム結晶の本来の硬さは 16MPa であり、大気暴露させた場合は環境（湿度）に強く依存することが分かった。

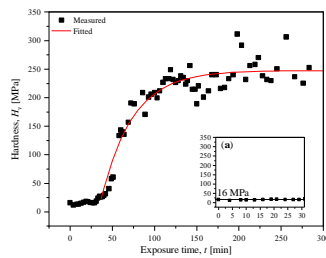


図 3. 湿度 36% における微小硬さの大気暴露時間依存性。

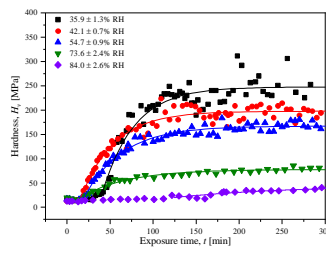


図 4. 様々な湿度における微小硬さの大気暴露時間依存性。

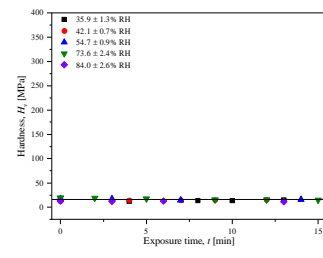


図 5. 様々な湿度における潜伏期の微小硬さ。

次に、斜方晶卵白リゾチウム（以下、O-HEWL と記述する）単結晶の大気暴露時間に対する微小硬さの実験が、T-HEWL 結晶と同じようにいくつかの湿度環境下で行われた。その結果 O-HEWL 結晶も T-HEWL 結晶と同じように Hv がほぼ 6MPa で一定になる潜伏期、急激に硬さが上昇する遷移期、そして最大の値をとる飽和期という変形挙動を示した。しかしながら、湿度に関しては必ずしも T-HEWL 結晶とは同じにならなかった。O-HEWL 結晶の変形挙動の特徴はそのすべり系の多さである。T-HEWL 結晶のすべり系は{110}<110>系のみであることが分かっているが、O-HEWL 結晶の場合は図 6 に示されるように圧痕の周りに、複数のすべり線のトレースが観察された。

それらを解析すると 6 種類のすべり系が活動していることが分かった。このようにタンパク質結晶は一般に分子間相互作用が弱いこと、対称性が低下するとすべり面間の相互作用が{110}、{011}でも大きく変わらないことなどから、一般の結晶のように最短のバーガスベクトルを含む最稠密面がすべり面になるのではなく、むしろすべりに適した系が変形に寄与するものと考えられる。結晶は一般に分子間相互作用が弱いこと、対称性が低下するとすべり面間の相互作用が{110}、{011}でも大きく変わらないことなどから、一般の結晶のように最短のバーガスベクトルを含む最稠密面がすべり面になるのではなく、むしろすべりに適した系が変形に寄与するものと考えられる。このように卵白リゾチウム結晶の塑性変形は、すべり線観察から転位によって律速されていると結論された。これらの結果は、5 章の主な発表論文の(4)と(5)として発表されている。

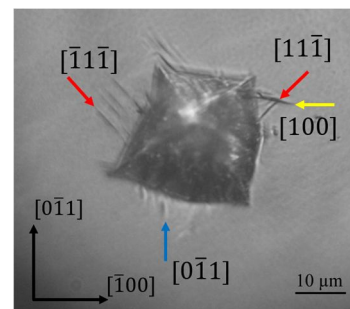


図 6. O-HEWL 結晶の圧痕像。

無転位グルコースイソメラーゼ (GI) 単結晶の塑性変形特性

前述のようにタンパク質結晶の転位機構、すなわち転位の運動と増殖によって塑性変形が律速されていることを直接観察するために、放射光 X 線トポグラフによるその場観察を行った。実験は高エネルギー加速器研究機構 (KEK) で行われ、無転位 GI 単結晶に針でパルス的に応力を加えるインデンテーションを行い、その前後を放射光 X 線トポグラフによって観察した。図 7(a)

は応力を加える前の放射光 X 線トポグラフである。明らかに結晶の端にペンデル縞が観測され、結晶内は無転位であり完全性の高い結晶であることがわかる。図 7(b)は結晶の模式図であるが図中の I の位置に針でインデンテーションを行った。図 7(c)はその後のトポグラフ像である。

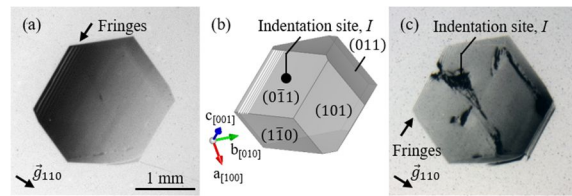


図 7. (a)インデンテーション前のトポグラフ像, (b)結晶外形の模式図, (c)インデンテーション後のトポグラフ像, (d)インデンテーション領域の拡大像.

インデンテーションを行った場所では大きく歪み、そこから延びる転位像が観測される。その領域を拡大した像が、図 8 である。圧痕、I からループ状と線状の転位が確認された。転位の消滅則 ($g \cdot b = 0$) から、圧痕周囲の強く変形した領域中の転位のバーガスベクトルを決定したところ $[010]$ 、 $[100]$ 、 $[111]$ であることがわかった。GI 結晶は斜方晶に結晶化し、ほぼ体心立方格子に近いので $[111]$ はすべり転位で、 $[010]$ 、 $[100]$ は表面からパルス的に加えられた応力によるパンチアウト転位と考えられる。このようにタンパク質結晶でも、一般の金属結晶、半導体結晶、有機結晶と同じように塑性変形が転位の増殖と運動によることが確かめられた。これらの結果は、5 章の主な発表論文の(1)として発表されている。

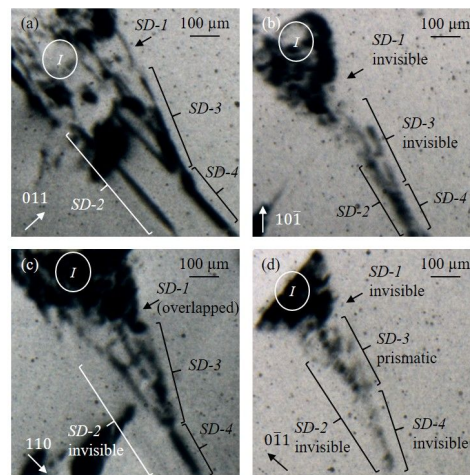


図 8. インデンテーション後の(a)011回折像, (b) $10\bar{1}$ 回折像, (c) 110回折像, (d) $0\bar{1}1$ 回折像.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) R. Suzuki, M. Tachibana, H. Koizumi, K. Kojima, Direct observation of stress-induced dislocations in protein crystals by synchrotron X-ray topography, *Acta Mater.*, 査読有, 156, 2018, 479–485.
DOI: 10.1016/j.actamat.2018.06.018
- (2) R. Suzuki, H. Koizumi, K. Hirano, T. Kumasaka, K. Kojima, M. Tachibana, Analysis of oscillatory rocking curve by dynamical diffraction in protein crystals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 115, 2018, 3634–3639. DOI: 10.1073/pnas.1720098115
- (3) R. Suzuki, H. Koizumi, K. Kojima, S. Fukuyama, Y. Arai, K. Tsukamoto, Y. Suzuki, M. Tachibana, Characterization of grown-in dislocations in high-quality glucose isomerase crystals by synchrotron monochromatic-beam X-ray topography, *J. Cryst. Growth*, 査読有, 468, 2017, 299–304.
DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2016.10.047
- (4) T. Kishi, R. Suzuki, C. Shigemoto, H. Murata, K. Kojima, M. Tachibana, Microindentation Hardness of Protein Crystals under Controlled Relative Humidity, *Crystals*, 査読有, 7, 2017, 339–1–14.
DOI: 10.3390/cryst7110339
- (5) R. Suzuki, T. Kishi, S. Tsukashima, M. Tachibana, K. Wako, K. Kojima, Hardness and slip systems of orthorhombic hen egg-white lysozyme crystals, *Phil. Mag.* 査読有, 96, 2016, 2930–2942.
DOI: 10.1080/14786435.2016.1219074
- (6) H. Koizumi, R. Suzuki, M. Tachibana, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, Y. Suzuki, S. Uda, K. Kojima, Importance of Determination of Crystal Quality in Protein Crystals when Performing

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 鈴木凌, 小泉晴比古, 平野馨一, 熊坂崇, 小島謙一, 橘勝, タンパク質結晶における X 線の動力学的回折の初観測, 口頭発表, 第 66 回応用物理学会春季学術講演会, 2019 年 3 月.
- (2) R. Suzuki, C. Shigemoto, M. Abe, H. Murata, M. Tachibana, K. Kojima, Micro-indentation hardness of Lysozyme crystals, 口頭発表, 6th International Indentation Workshop, 2018 年 7 月.
- (3) R. Suzuki, C. Shigemoto, M. Abe, H. Murata, M. Tachibana, K. Kojima, X-ray topography of dislocations by indentation of protein crystals, ポスター発表, 6th International Indentation Workshop, 2018 年 7 月.
- (4) 鈴木凌, 村田秀信, 小泉晴比古, 小島謙一, 橘勝, インデンテーションにより導入されたタンパク質結晶のプリズマティック転位の観察, 口頭発表, 日本物理学会第 73 回年次大会, 2018 年 3 月.
- (5) 鈴木凌, 小泉晴比古, 平野馨一, 杉山弘, 熊坂崇, 小島謙一, 橘勝, ロッキングカーブ測定によるタンパク質結晶の動力学的回折の観測, 口頭発表, 日本物理学会 2017 年秋季大会, 2017 年 9 月.
- (6) 鈴木凌, 村田秀信, 小泉晴比古, 塚本勝男, 荒井康智, 福山誠二郎, 鈴木良尚, 小島謙一, 橘勝, 擬 BCC 構造を有するタンパク質結晶の転位の運動と塑性変形, 口頭発表, 日本物理学会第 72 回年次大会, 2017 年 3 月.
- (7) 鈴木凌, 若生啓, 小島謙一, 橘勝, 斜方晶リゾチーム結晶の微小硬さと塑性変形, 口頭発表, 日本物理学会 2016 年秋季大会, 2016 年 9 月.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

若生 啓(WAKO Kei)

横浜創英大学・こども教育学部・講師

研究者番号: 40515839

橘 勝(TACHIBANA Masaru)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号: 80236546

小泉 晴比古(KOIZUMI Haruhiko)

名古屋大学・未来材料システム研究所・特任講師

研究者番号: 10451626