

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23579

研究課題名(和文)次世代の材料応用へ向けたタンパク質結晶の転位論に基づく解析

研究課題名(英文)Characterization of protein crystals based on the dislocation theory for the material application

研究代表者

鈴木 凌 (Suzuki, Ryo)

横浜市立大学・理学部・助教

研究者番号：70846708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質結晶の応用へ向けた力学的性質に関する基礎的な研究を行った。具体的には、大きく分けて「巨視的な変形試験によるタンパク質結晶の力学的性質の評価」と「放射光線トポグラフィによるタンパク質結晶の欠陥観察法の構築および回折理論に基づいた緻密な完全性評価を行った。では、最大5ミリメートルにも及ぶ巨大な結晶の変形試験により、ヤング率や破壊応力などの見積もりに成功した。では、X線CCDカメラを使用したデジタルトポグラフィ法によって撮影した数百枚の一連の回折像を画像解析により、欠陥像の取得が難しい結晶であっても転位などの結晶欠陥の観察を可能とする方法(Median Image法)の構築に成功した。

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、脆く壊れやすいと定性的な認知で収まっていたタンパク質結晶の力学的性質をヤング率や破壊応力、ひずみ量などの値から定量的な評価まで落とし込めたことにある。また、その変形機構は転位の運動による塑性変形に支配されていることから、本研究で得られた知見を基にその変形の制御を行うことで、高強度化法に期待できる。さらには、海洋問題をはじめとして現在課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素材として、自然由来のタンパク質結晶の工学的な利用は持続可能な社会に重要である。

研究成果の概要(英文)：We have conducted fundamental research on the mechanical properties of protein crystals for applications. In particular, we have conducted two main studies: (1) evaluation of the mechanical properties of protein crystals by macroscopic deformation tests, and (2) development of a method for observing crystal defects in protein crystals by synchrotron radiation X-ray topography, and precise evaluation of their perfection based on diffraction theory. In (1), Young's modulus and fracture stress were successfully estimated by deformation tests using huge crystals up to 5 mm in size. In (2), we succeeded in constructing a method (Median Image Method) to observe crystal defects such as dislocations even in crystals for which it is difficult to obtain defect images by image analysis of a series of several hundred diffraction images taken by digital topography using an X-ray CCD camera.

研究分野：結晶工学

キーワード：タンパク質結晶 力学的性質 転位 X線回折 インデンテーション 圧縮試験

1. 研究開始当初の背景

タンパク質結晶は巨大で複雑なタンパク質分子から構成された結晶性材料であり、分子サイズに伴った巨大な結晶格子を有している。結晶内に最大 70%もの多量の水を含むというこれまでの結晶材料にはない特徴がある。そして、結晶水を他の物質と置換できることから、次世代の結晶性多孔質生体材料として注目されている。しかし、もろく壊れやすい弱点があり実用化には至っていない。弱点克服が望まれる一方、結晶欠陥が多く、高品質な結晶を得ることが困難なため、転位の挙動やその運動などの力学的な性質に関する知見は非常に少なかった。このような背景のもとで本研究は行われた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質結晶の力学的性質を転位論に基づいた解明をすることである。具体的に、結晶欠陥の一つである転位は、結晶材料の強度を決めるファクターの一つである。その転位がどのようにして生成や運動が引き起こされるのか、どのようにふるまうのかということをも明らかにすることで、タンパク質結晶の強度を理解する。

本研究では申請者が無転位化に成功したグルコースイソメラーゼ結晶 (GI 結晶) と大型結晶を育成しやすい鶏卵白リゾチーム結晶、高い結晶対称性を有するフェリチン結晶を対象とした。タンパク質結晶は脆く壊れやすいといった定性的知見で留まっていた一方、未解明な変形挙動を明らかにすることで、タンパク質結晶の強度の定量的な理解を試みた。

また、結晶欠陥の評価に最も有効な方法の一つである X 線トポグラフィは欠陥が多い結晶では多くのひずみにより回折 X 線のコントラスト差が得られにくくなる。そのため、X 線トポグラフィは「ある程度高い品質を保持した欠陥の存在する結晶」において、高い有効性を示す。タンパク質結晶の多くは GI 結晶やフェリチン結晶とは異なり、品質の低さが問題となっている。そのため、品質の低いタンパク質結晶の結晶性や欠陥の評価が重要となる。そこで、鶏卵白リゾチームをモデル試料として、X 線 CCD カメラによって取得したデジタルトポグラフィ像の画像解析により、欠陥像を取得する方法を構築した。

3. 研究の方法

無転位グルコースイソメラーゼ結晶の作製では、工業用グルコースイソメラーゼ (Nagase Chemtex, SPEZYME Gipf) を透析膜 (MWCO 500-1000 Da) によって防腐剤などの不純物濃度を落とし、既知の結晶化条件で結晶を析出させた。また、鶏卵白リゾチーム (ナカライテスク) とフェリチン (Sigma-Aldrich) は試薬グレードの粉末および溶液を使用し、既知の結晶化条件で結晶の育成を行った。図 1 のように、初めにハンギングドロップ法でおよそ 100 μm ほどの種結晶を育成し、同濃度の結晶化溶液に移し替え、再成長させることで任意の大きさを持つ結晶を育成した。



図 1 種結晶 (左) と再成長した結晶 (右)。

結晶の完全性評価は高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の放射光施設であるフォトンファクトリー (PF) の BL14B および BL20B で X 線トポグラフィ観察により行った。二結晶分光器により任意の波長に単色化された X 線を任意の大きさにスリットで切り出し、ビームサイズが結晶全体を完全に覆う完浴の条件を使用した。ステップモーターを使用し、X 線 CCD カメラで回折像を取得しながら、結晶を微小回転させることで、結晶による回折強度の変化を測定する回折強度曲線 (ロッキングカーブ) を取得した。また、X 線フィルムを使用することで、結晶内の結晶欠陥 (主に転位) の観察を行った。

結晶の力学的性質の評価にはマイクロビッカース硬さ試験によるインデンテーション法を用いた。結晶表面に任意の荷重を負荷することで、微小変形による圧痕像の観察を行った。また、結晶の異方性を観測すべく、測定可能な結晶面における硬さ試験を行った。

4. 研究成果

① グルコースイソメラーゼ (GI) 結晶およびフェリチン結晶の育成とその評価

工業用グレードの GI 溶液から先行研究で得られていた試薬グレードで育成した GI 結晶と同等の極めて完全性の高い GI 結晶の育成に成功した。また、図 2 に示すように、フェリチン結晶においても、既報の GI 結晶と同様なふるまいであるロッキングカーブ曲線の明確な振動現象が観察された。この振動曲線を X 線の回折原理に基づいて解析すると、欠陥などを有した不完全な結晶で生じる運動学的回折と完全結晶における X 線の多重反射による動力的回折の双方から説明することが出来た。そのため、両者を区別することが難しいことが分かった。これは、結晶の厚さが X 線の消衰距離よりも小さいためであり、結晶の薄さが原因となっている。

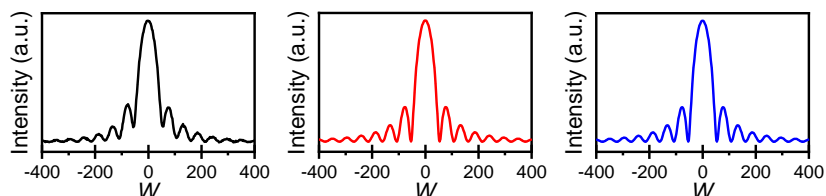


図 2 フェリチン結晶の回折強度曲線。

左から、観測結果、動力的回折理論、運動学的回折理論による計算結果。

一方、図 3 に示すように、フェリチン結晶の X 線トポグラフィ観察により、完全結晶に由来する等厚干渉縞が明瞭に観察された。等厚干渉縞は X 線の多重反射、すなわち、動力的回折でしか説明することが出来ない。したがって、フェリチン結晶においても、GI 結晶と同様に、半導体 Si 結晶に匹敵する極めて高い完全性を有していることが明らかとなった。以上より、薄いタンパク質結晶であっても、X 線トポグラフィ観察により、完全性の定量的な解析を行うことが出来ることが分かった。結晶の回折強度にのみ頼るのではなく、回折像を利用した結晶の完全性評価の重要性が改めて認識された。この結果は、5 章の発表論文の (1) として発表している。

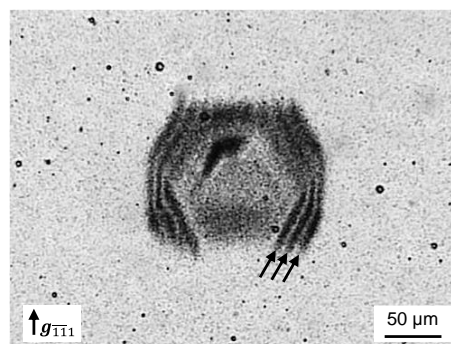


図 3 フェリチン結晶のトポグラフィ像。

② 不完全なタンパク質結晶中の結晶欠陥の観察方法の構築

鶏卵白リゾチーム結晶の一連のデジタルトポグラフィ像を再構築した回折像と対応するロッキングカーブ曲線を図 4 に示す。最大強度や平均強度のマッピングとは異なり、強度の中央値を抽出することで、結晶欠陥である転位に対応した回折像を描くことに成功した。これは、ロッキングカーブ曲線から分かるように、欠陥領域では最大回折強度が完全領域のそれよりも低くなり、曲線のすそが広がるため、結果的に中央値が押し上げられることに起因しているものと考えられる。

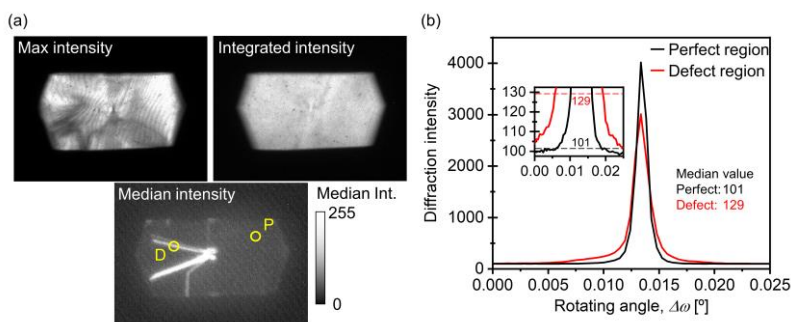


図 4 (a) 最大強度、平均強度、Median (中央値) の重ね合わせ像、
(b) 完全領域、欠陥領域の回折強度曲線。

この方法により、図5に示すように、X線フィルム法では取得が難しい回折面であっても、容易に欠陥像の取得が可能となったため、欠陥の緻密な解析が可能となった。この結果は、5章の発表論文の(2)として発表している。

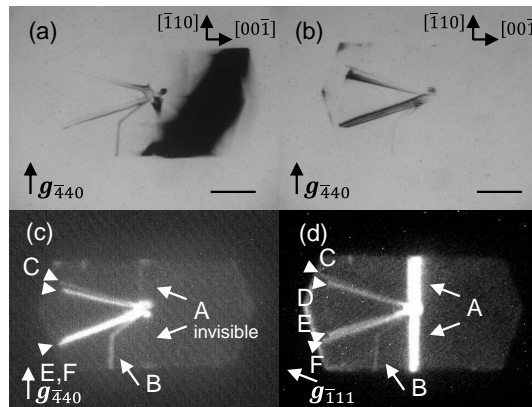


図5 (a,b) X線フィルムによるトポグラフ像、(c)-440回折および(d)-111回折のMedian像

③ 異方性の大きいタンパク質結晶の塑性変形機構の解明

鶏卵白リゾチーム結晶はいくつか結晶多形を有しており、中でも三斜晶系は最も対称性が低い。図6に示すように、三斜晶リゾチーム結晶は単位胞に1分子が存在したP1の対称性を有している。図7に典型的な微小硬さの大気暴露時間依存性を示す。横軸は大気暴露時間、縦軸は微小硬さを示しており、湿度約76%に保持した大気中に結晶を暴露し、その微小硬さを測定した。図7から分かるように、微小硬さは大気中に暴露させると初めの10分間はおよそ25 MPaを示し、その後硬さの上昇が生じ、30分以降は硬さの飽和が見られた。これは結晶内におよそ30 vol.%存在する結晶水の脱離によるものと考えられる。次に結晶の面依存性を確認するために、(010)面と(100)面における微小硬さを測定した。図8は各面の硬さを示している。大気湿度によらず、およそ一定の値を示すことから、各値は各面の硬さに対応すると考えられる。各面の平均硬さは2.5 MPaの違いが見受けられた。

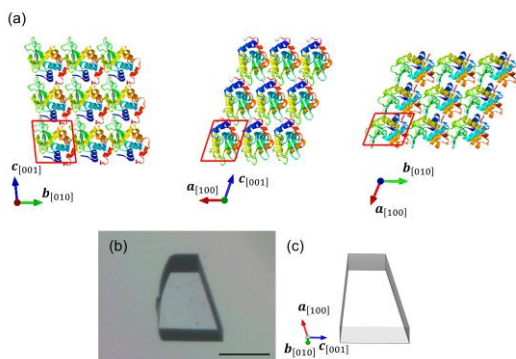


図6 (a) 各方向から見た分子配列 (赤枠は単位胞)、(b) 結晶の光学顕微鏡像 (スケールバーは500 um)、(c) 結晶外形の模式図

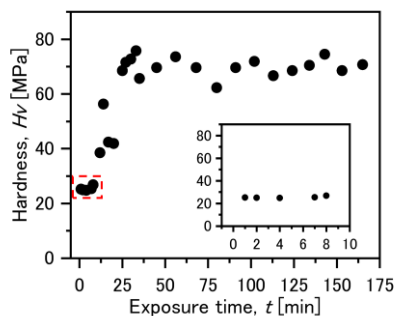


図7 微小硬さの大気暴露時間依存性 (insetは初めの10分間の拡大図)

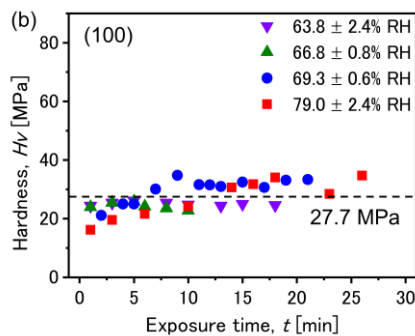
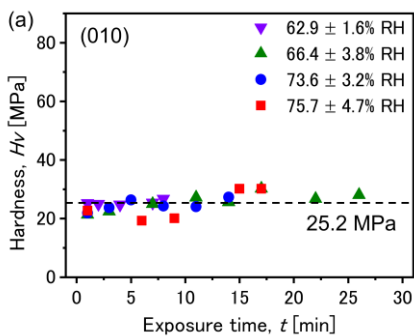


図8 (a) (010)面と(b) (100)面の硬さの大気暴露時間依存性。

結晶の変形を司る機構を解明するため、圧痕像の観察を行った。図 9 および 10 は(010)面と(100)面の圧痕像を示している。どちらの面においても、圧痕周辺に結晶学的な方向に対応したトレースが確認された。解析の結果から、これらは押し込みによって生じたすべり線であると考えられ、三斜晶リゾチーム結晶の転位の導入、運動に対応している。一般に結晶の変形を司るすべり系のすべり面の同定には、面間の結合の強さがカギを握る。タンパク質結晶は結晶を構成するタンパク質分子が巨大で複雑な形状を有しているため、実験的にも理論的にも結合力を見積もった例が少ない。中でも、マクロボンド法はタンパク質分子表面から 4 Å 以内の距離にいる原子分子を相互作用の対象とし、その表面エネルギーを見積もる方法である。実際に、マクロボンド法はリゾチーム結晶の結晶外形（モルフォロジー）をよく説明できる。既報の正方晶系および斜方晶系のリゾチーム結晶のすべり系の同定において、マクロボンド法から見積もられた表面エネルギーによってすべり面を決定することが出来ている。しかしながら、三斜晶リゾチーム結晶ではマクロボンドの強さまでは見積もられているものの、表面エネルギーの計算は行われていなかった。そこで、既報のマクロボンド強度を用いて、表面エネルギーの見積もりを本研究で行った。そして、得られた表面エネルギーを用いて、三斜晶リゾチーム結晶のすべり系の同定に成功した。

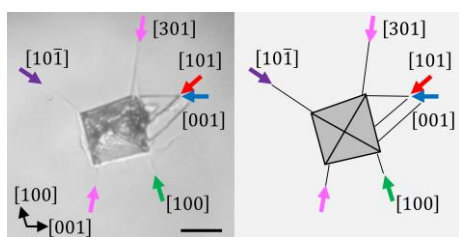


図 9 (010)面の圧痕像（左）と模式図（右）。各矢印はすべり線の方角に対応している。

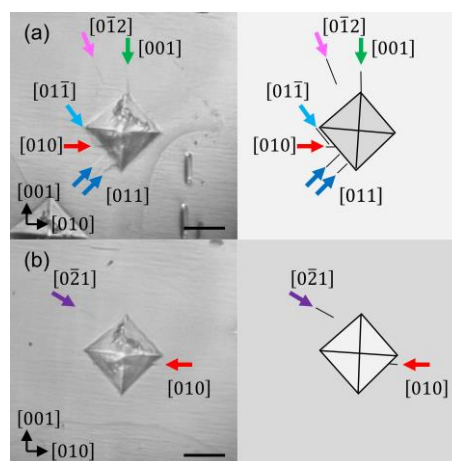


図 10 (100)面の圧痕像（左）と模式図（右）。各矢印はすべり線の方角に対応している。

解析の結果から、三斜晶リゾチーム結晶のすべり系は 11 種類に対応することが分かった。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く、すべり面間の相互作用の差異が小さいことから、一般の金属や無機結晶のように最短のバーガースベクトルを含む最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モデルが考えられる。これらの結果は 5 章の発表論文の(3)として発表している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Marina Abe, Ryo Suzuki, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana	4. 巻 7
2. 論文標題 Evaluation of crystal quality of thin protein crystals based on the dynamical theory of X-ray diffraction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 761-766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2052252520007393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Suzuki, Marina Abe, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana	4. 巻 54
2. 論文標題 Identification of grown-in dislocations in protein crystals by digital X-ray topography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Appl. Cryst.	6. 最初と最後の頁 163-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S1600576720015356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Suzuki, Chika Shigemoto, Marina Abe, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana	4. 巻 -
2. 論文標題 Analysis of slip systems in protein crystals with a triclinic form using a phenomenological macro-bond method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CrystEngComm	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1CE00241D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 阿部満理奈, 鈴木凌, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 X線トポグラフィによるタンパク質結晶の干渉縞の解析に基づく完全性評価
3. 学会等名 第49回結晶成長国内会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下沙緒梨, 阿部満理奈, 鈴木凌, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 共焦点ラマン分光法によるタンパク質結晶中の水の拡散係数の測定
3. 学会等名 第49回結晶成長国内会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部満理奈, 鈴木凌, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 放射光トポグラフィによるタンパク質結晶の干渉縞の解析に基づく完全性評価
3. 学会等名 令和2年度 日本結晶学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下沙緒梨, 阿部満理奈, 鈴木凌, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 ラマン分光法を用いたタンパク質結晶中の水の拡散係数の測定
3. 学会等名 令和2年度 日本結晶学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 凌, 熊坂 崇, 馬場 清喜, 水野 伸宏, 長谷川 和也, 小島 謙一, 橘 勝
2. 発表標題 タンパク質結晶のX線による照射損傷
3. 学会等名 日本物理学会 2019年秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 凌, 熊坂 崇, 馬場 清喜, 水野 伸宏, 長谷川 和也, 小泉 晴比古, 小島 謙一, 橘 勝
2. 発表標題 タンパク質結晶のX線照射損傷の観察
3. 学会等名 第48回結晶成長国内会議 (JCCG-48)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Suzuki, Haruhiko Koizumi, Keiichi Hirano, Takashi Kumasaka, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana
2. 発表標題 Observation of dynamical diffraction in high-quality protein crystals
3. 学会等名 16th Conference of the Asian Crystallographic Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Marina Abe, Ryo Suzuki, Keiichi Hirano, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana
2. 発表標題 Observation of twisting of protein crystals by X-ray topography
3. 学会等名 16th Conference of the Asian Crystallographic Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部満理奈, 鈴木凌, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 デジタル放射光X線トポグラフィによるタンパク質結晶の“ねじれ”の観測
3. 学会等名 日本物理学会 2019年秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部満理奈, 鈴木凌, 平野馨一, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 X線トポグラフィによるタンパク質結晶のねじれの観測
3. 学会等名 第48回結晶成長国内会議 (JCCG-48)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柄澤彩乃, 鈴木凌, 丸山美帆子, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 圧縮試験によるリゾチーム結晶の力学的性質の測定
3. 学会等名 第48回結晶成長国内会議 (JCCG-48)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木凌, 阿部満理奈, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 タンパク質結晶の動力学的回折に関する研究
3. 学会等名 日本物理学会 第75回年次大会 (2020年)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部満理奈, 鈴木凌, 平野馨一, 小島謙一, 橘勝
2. 発表標題 タンパク質結晶のねじれと結晶サイズとの相関
3. 学会等名 日本物理学会 第75回年次大会 (2020年)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------