

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：42727

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22560661

研究課題名（和文）ロッキングカーブイメージングによるタンパク質結晶の完全性の評価

研究課題名（英文）Assessment of crystal quality of protein crystals by using rocking curve imaging.

研究代表者

小島 謙一 (KOJIMA KENICHI)

横浜創英短期大学・情報学科・教授

研究者番号：90046095

研究成果の概要（和文）：完全性の高いタンパク質結晶は 21 世紀の新材料として期待されている。特に、タンパク質結晶は結晶中を自由に動く水が存在し、それを他の物質と置換することにより、ポーラス材料として利用することができる。また、タンパク質分子の構造決定には完全性の高い結晶が必要である。しかし、タンパク質結晶の完全性の評価は簡易的な方法によってのみ行われている。そこで卵白リゾチウム結晶をもちいて、CCD システムを用いたデジタル放射光トポグラフにより、局所領域における回折曲線（ロッキングカーブ）を測定し、その情報をマッピングすることによって結晶の完全性を評価する方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：In the past, the main goal of protein crystallization was to explore the structure of protein molecules using X-ray. Recently, protein crystals have emerged as promising bio-nanoporous materials for different applications including highly selective bio-catalysis, bio-sensing and drug delivery. We identified the dislocation images in the identical protein crystals which are tetragonal hen-egg white lysozyme (HEWL) crystals not only by the conventional film method but the digital method using X-ray CCD camera systems. The simultaneous measurements of both methods were also carried out in the identical HEWL crystals. We evaluate the crystal perfection by mapping angular positions of maximum and the full width of half maximum (FWHM) for the local rocking curves. It is shown that the digital topography is more effective for assessment of crystal quality in protein crystals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・金属物性

キーワード：格子欠陥、転位、放射光 X 線回折トポグラフ、ロッキングカーブ、イメージング、デジタルトポグラフ、

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

タンパク質結晶はタンパク質分子の構造を決定するために 20 世紀後半から現在にいたるまで広範囲にかつ大規模に行われている。この解析手段として主に NMR(核磁気共鳴)と X 線が使用されている。このなかで X 線による構造解析は分子を構成している原子の位置の特定について、水素以外は比較的正確な情報を得ることができる。しかしながら、タンパク質結晶に関しては高分解能を得るためや中性子回折実験に必要な、大きくて完全性の高い結晶が要求される。大きな結晶が育成できたとしても、完全性の高い、高品質な結晶でなければ精度の高い結晶解析ができない。構造解析の領域では、その結晶性の評価は高次の反射が観測されることや、回折曲線（いわゆるロッキングカーブ）の半値幅やウイルソン・プロットなどによって行われてきた。これらは結晶全体の平均の評価であって、結晶全体の各部分でどのようになっているかは明らかでない。また、その不完全性が何によるかは不明確である。

そこで完全性を理解し、タンパク質結晶の評価法を確立するために、タンパク質結晶の各部分での評価や欠陥の特定が必要になっている。一方、格子欠陥の立場からはタンパク質結晶は魅力的な結晶である。それは、タンパク質結晶が、通常金属結晶、半導体結晶、有機結晶に比べると圧倒的に大きな格子定数を持っていることである。点欠陥のひとつの空孔でも分子一個の大きさになるので、その体積が数十 nm^3 のオーダーになり、さらに線欠陥の転位のバーガースベクトルは数 nm のオーダーになる。そのような巨大な格子欠陥が存在するかどうか興味のあるテーマである。また、面欠陥の積層欠陥にしても積層欠陥エネルギーがどのくらいになるかなども興味の対象となる。

近年、X 線の検出装置のデジタル化が進んでおり、X 線受光部は CCD カメラの分解能の高性能化によって、受光部 1 ピクセルが数 μm のオーダーとなっている。それによって、結晶の微小領域での情報を得ることができるようになった。このような状況のもとでタンパク質結晶の完全性の評価をより正確に行うことができると判断し、計画を立てるに至った。

2. 研究の目的

タンパク質結晶の完全性の評価は不明確であり、その評価法は結晶全体における X 線の巨視的なロッキングカーブの半値幅やウ

イルソン・プロットなどによって決められることが多い。しかしながら、その半値幅の絶対値やウイルソン・プロットの持つ物理的な意味は不明な点が多い。そこで、本研究の目的は放射光 X 線による CCD システムと X 線トポグラフを組み合わせて、局所的なロッキングカーブの角度位置、最大強度、半値幅の結晶全体にわたるイメージマッピングを行い、それと従来のアナログ法による X 線トポグラフとの比較を行い、結晶欠陥とロッキングカーブの対応を行う。ロッキングカーブイメージングにより、従来のロッキングカーブによる完全性評価の再評価を行い、その不完全性の原因がどのような欠陥によるものかを解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 結晶の育成

使用するタンパク質結晶はモデルタンパク質の卵白リゾチウム結晶（以下、リゾチウム結晶と略す）を用いて行われた。リゾチウム結晶は正方晶、斜方晶、単斜晶のような種々の多形を持つ。その方法として、塩化ニッケル濃度勾配法、塩化ニッケル・塩化ナトリウム二液界面法などを用い、成長温度、塩濃度、育成時間などのパラメータを変えることによって正方晶、斜方晶、単斜晶を育成した。育成時間に依存して結晶の大きさは 1mm から最大 6mm になり、大きな結晶が得られた。本研究では主に正方晶と単斜晶結晶について研究が行われた。

(2) X 線トポグラフ

X 線トポグラフによる観察はフィルムによるアナログ法と、高分解 X 線イメージャを用いた局所観察用 X 線 CCD カメラシステム一式によるデジタル法によって行われた。使用した X 線はシンクロトロン放射光[以下、放射光と略す。(KEKPF と SPRING-8)]を使用した。ここからは従来のフィルムによる放射光トポグラフをフィルム法、CCD カメラシステム一式による放射光トポグラフをデジタル法と呼ぶ。

(3) デジタルトポグラフの解析

CCD カメラシステムによるデジタルデータの解析は以下のようにして行われた。まず、1 ピクセルごとの X 線回折曲線（以下、ロッキングカーブと呼ぶ）が角度を変えて撮影されたデジタルトポグラフの連続像から、ピクセルを指定して回折強度を抜き出すことで得られた。さらに、そのようにして得られた各ピクセルのロッキングカーブの半値幅、ピ

ークの最大強度、ピークの角度位置を解析するプログラムを開発し、それを使用して解析を行った。さらに、そのプログラムを用いて解析した値を二次元的にマッピングした。

4. 研究成果

図1はフィルム法とデジタル法によって観察された転位である。図に示されているようにS1は結晶の中心から直線状に伸びる成長転位である。(a)と(b)を比較するとフィルム法の方が、解像度が高いことがわかる。これはフィルムの銀粒子の方がCCDカメラの分解能よりも良いことによる。Tは転位が集団になりトポグラフの分解能では分解できないので一様に観察される。Cはループ状の転位でこれは数十個の分子が抜けた空孔の集合体によって生じた転位ループと考えられる。また、Lを境にコントラストが変わっているのはサブグレインによるものと考えられる。このように従来のフィルム法とCCDシステムによるデジタル法の両方で転位像の比較を行い、どちらの方法でも転位像が得られることがわかった。

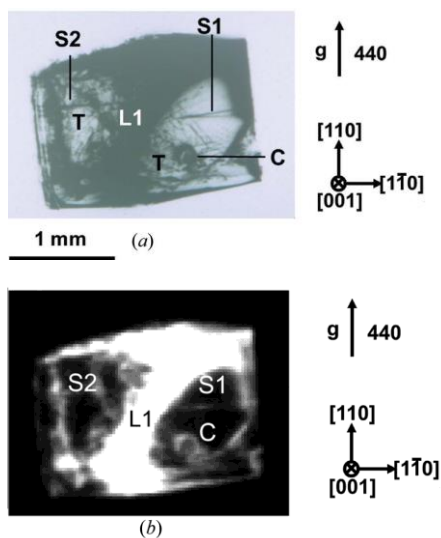


図1 (a)フィルム法による正方形リチウム結晶の放射光トポグラフ像。(b)同じ結晶をデジタルトポグラフによって画像化した放射光トポグラフ像。用いた反射は440反射光を用いた。S1とS2は直線状の転位を表している。Tは絡み合った転位群を示し、Cはループ状の転位を示している。

図2はデジタルトポグラフ全体像と局所的なロッキングカーブを示している。図2(a)は局所領域L1のロッキングカーブを示している。半値幅は 0.005° でピーク幅は狭い。このL1領域はトポグラフ像から見て転位が観察されず、完全性が高い領域である。図2(b)はループ状転位が存在する領域Cの局所的ロッキ

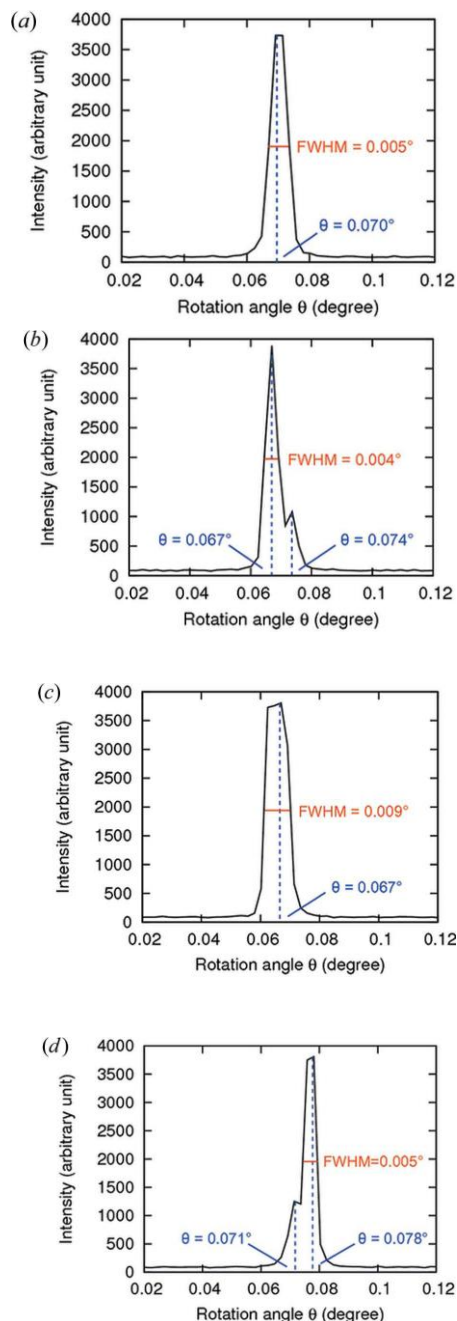


図2 結晶の局所領域L1, S1, S2, Cでのロッキングカーブ

ングカーブである。半値幅は 0.074° となり、転位の存在によって完全性が悪くなっているのが分かる。さらに、S1領域の局所的ロッキングカーブはピークが非対称になり、半値幅は 0.009° になる(図2(a))。また、S2領域ではピークは二つに分離して不完全性が増している。このように結晶の領域に完全性の定量的な評価が可能になる。

さらに、局所的なロッキングカーブの半値幅、ピーク強度などを結晶全体にわたってマッピングしたのが図3である。図3(a)は局所的ロッキングカーブのピークの角度位置の結晶全体にわたるマッピングである。また、図3(b)は同じく半値幅の結晶全体にわたる

マッピングである。色は $^{\circ}$ 単位で表され、青が小さく、赤が大きくなっている。ピーク位置のマッピングで色が一様でないことから、ピーク位置が右と左では 0.03° ずれていることが分かる。これは結晶全体が湾曲していることを示している。一方、半値幅の分布は結晶の右上部と左下部で半値幅は広がって不完全性が増している。しかしながら、中央部などはほぼ同一色なので良い完全性を示している。

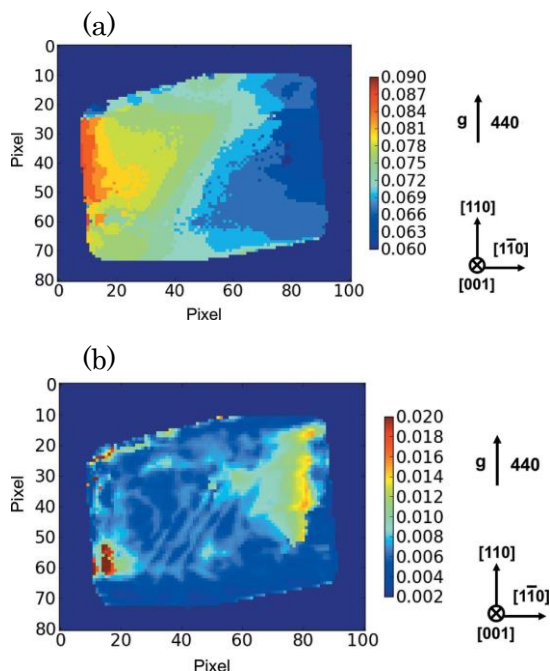


図3 正方晶リチウム結晶のロックンングカーブのピーク位置 (a) と半値幅 (b) のマッピング

図4は結晶全体のロックンングカーブを示している。従来のタンパク質結晶の評価に用いたロックンングカーブはこのロックンングカーブに対応する。このロックンングカーブの半値幅は 0.016° となり局所的なロックンングカーブに比べると大きな値を持つ。このように従来の結晶の評価に使われている結晶全体にわたるロックンングカーブによる結晶の評価は、局所的ロックンングカーブを積算したものであるため、それによって結晶を評価することは難しい。

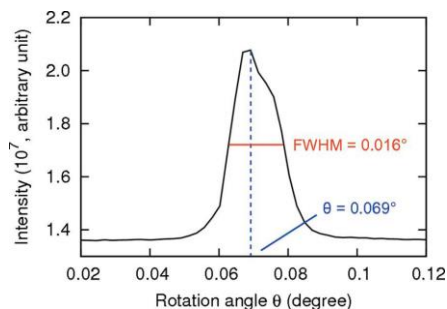


図4 結晶全体のロックンングカーブ

タンパク質結晶のようにモザイク構造をとると考えられている結晶では局所的ロックンングカーブのマッピングによって結晶性を評価することが望ましい。

(2) 単斜晶リチウム結晶のロックンングカーブのイメージングマップ

単斜晶リチウム結晶は結晶成長の際、b軸[010]方向の結晶成長速度が異なり、+b方向の成長速度が-b方向に比べて速い。このため、+b方向の結晶面は荒れる。図4は典型的な単斜晶リチウム結晶のデジタルトポグラフである。Aは結晶核の位置を示している。+b方向の成長速度が速く非対称になっていることが分かる。この図は局所的ロックンングカーブのピーク強度の結晶全体へのマッピングであるので、正方晶結晶の図1(b)に対応するものである。後で述べるように、正方晶結晶に比べると完全性が悪く、転位などの欠陥は確認できていない。

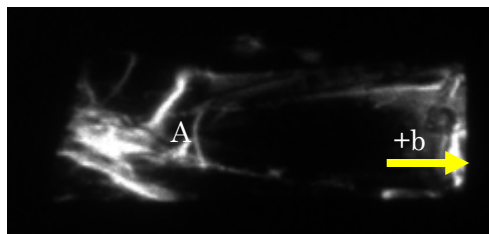


図4 単斜晶リチウム結晶のデジタルトポグラフ

図5は同じく単斜晶リチウム結晶の局所的ロックンングカーブの10分の1幅を結晶全体にマッピングしたものである。色は $^{\circ}$ 単位で表されている。結晶の完全性が高い青い領域は結晶の上部と下部にあるが少なく、それ以外の結晶性の悪い領域が広がっていることが分かる。とくに、+b方向に扇形に広がっていることが分かる。図4と同じようにAの位置は結晶核である。単斜晶の局所的ロックンングカーブは正方晶とはかなり異なる。

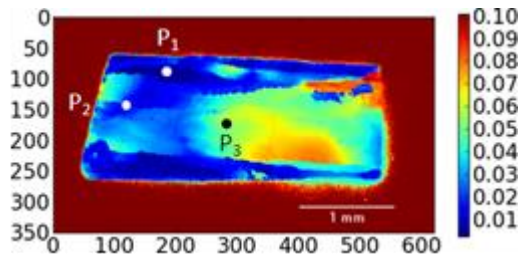


図5 単斜晶リチウム結晶の半値幅のマッピング (半値幅の定義が正方晶とことなることに注意)

図5は正方晶の図3に対応するマッピングである。図6、図7、図8は図5の領域P1、P2、P3に対応する局所的ロックンクカーブである。P1の領域では比較的ロックンクカーブは単独で半値幅も狭い。比較的完全性の高い領域である。

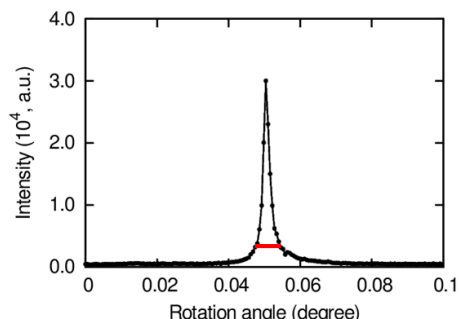


図6 図5の点P1における単斜晶リゾチウム結晶の局所的ロックンクカーブ

一方、図7はP2の領域であるが、局所的ロックンクカーブはダブルピークになる。

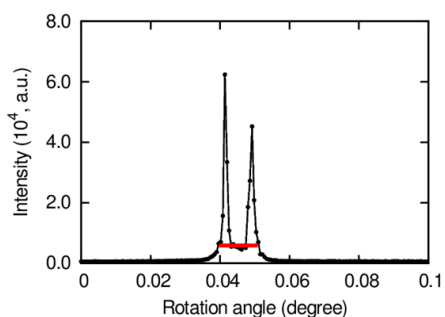


図7 図5の点P2における単斜晶リゾチウム結晶の局所的ロックンクカーブ

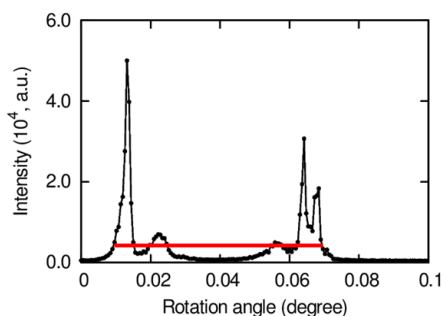


図8 図5の点P3における単斜晶リゾチウム結晶の局所的ロックンクカーブ

さらに、図8ではロックンクカーブはマルチピークとなり正方晶のような単独ピークでの解析ができない。これらの領域はP1の領域に比べると完全性の悪い領域であると考えられる。このように、単斜晶は場所により、ロックンクカーブの形状が大きく異なることがわかった。このため、半値幅の定義が正方晶と異なり、図の赤線で示すように複数の

ピークの中で最大強度の10分の1の角度幅を半値幅と再定義して解析しなければならない(具体的には図の赤線の2分の1の角度)。このような定義によってマッピングした図が図5になる。このため、正方晶結晶に比べると青が 0.01° で5倍程度、半値幅が広がっていて、完全性は単斜晶結晶の方が悪いことを示している。

(3) 結論

図3および図5のロックンクカーブの半値幅のマッピングから、局所的な半値幅は結晶の位置によって異なる値を持つことがわかる。このように結晶の完全性を評価するときに結晶全体に対する半値幅で結晶の完全性を評価することは誤った結論に導くことになる。例えば半値幅は少し大きくても、その値が結晶全体にわたって一様であれば結晶としては均一と評価される。一方、局所的に半値幅が小さく、局所的に完全性が高くとも、結晶全体で大きな半値幅の分布を持っているとすれば結晶性は悪いことになる。このように特に半値幅をマッピングすることによって完全性をより定量的に評価することができる。

図1のように転位のある領域での半値幅のマッピングを調べると、転位が存在することによって半値幅のマッピングがどのようになるかが解析できる。このことにより転位がどのように半値幅と関係しているかを定量的に解析できる。

以上のことから、タンパク質結晶で今まで行われていた評価を、ロックンクカーブの各パラメータをマッピングすることにより、定量的に評価でき、また不完全性の原因となっている格子欠陥もまた定量的に評価できる。

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6件)

(1) H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara, M. Tachibana, K. Kojima, & J. Nozawa, Improvement of crystal quality for tetragonal hen egg white lysozyme crystals under application of an external alternating current electric field, *Journal of Applied Crystallography*, 査読有, 46(1), 25-29, 2013
doi:10.1107/S0021889812048716

(2) Kei Wako, Kunio Kimura, Yu Yamamoto, Takuya Sawaura, Mengyuan Shen, Masaru Tachibana and Kenichi Kojima,

Digital topography with an X-ray CCD camera for characterizing perfection in protein crystals, *Journal of Applied Crystallography*, 査読有, vol.45, p.1009-1014, 2012 doi:10.1107/S0021889812032049

(3) 小島謙一、橘勝、タンパク質結晶の X 線トポグラフィ、*日本結晶学会誌*、査読有、第 54 号、29-36、2012
url: <http://www.crsj.jp/journal/Vol54/abstract-54-1.html#A5>

(4) 若生 啓、タンパク質結晶の X 線トポグラフィ像の画像解析による結晶性評価、*横浜創英短期大学 紀要*、査読有、第 7 号、29-33、2011

(5) Takuya Sawaura, Daiki Fujii, Mengyuan Shen, Yu Yamamoto, Kei Wako, Kenichi Kojima and Masaru Tachibana, Characterization of dislocations in monoclinic hen egg-white lysozyme crystals by synchrotron monochromatic-beam X-ray topography, *Journal of Crystal Growth*, 査読有, vol.318, p.1071-1074, 2011
doi:10.1016/j.jcrysgro.2010.11.018

(6) 若生 啓、小島 謙一、タンパク質結晶の X 線トポグラフィ像の画像処理 II、*横浜創英短期大学 紀要*、査読有、第 6 号、23-25、2010

〔学会発表〕 (計 13 件)

(1) 塚島史朗、藤居大毅、若生啓、小島謙一、橘勝、斜方晶リゾチーム結晶の塑性変形挙動、*日本物理学会 第 68 回年次大会*、2013/03/27、*広島大学 東広島キャンパス*

(2) 若生啓、藤居大毅、塚島史朗、橘勝、小島謙一、X 線デジタルトポグラフィによるタンパク質結晶の完全性の評価、*日本物理学会 第 68 回年次大会*、2013/03/27、*広島大学 東広島キャンパス*

(3) 塚島史朗、藤居大毅、若生啓、小島謙一、橘勝、リゾチーム結晶の力学的性質、第 42 回結晶成長国内会議 (NCCG-42)、2012/11/11、*九州大学 筑紫キャンパス*

(4) 藤居大毅、澤浦拓也、若生啓、小島謙一、橘勝、CCD カメラを用いた X 線デジタルトポグラフィによるタンパク質結晶の完全性の評価、第 42 回結晶成長国内会議 (NCCG-42)、2012/11/11、*九州大学 筑紫キャンパス*

(5) 沈夢遠、藤居大毅、大嶋一恵、若生啓、小島謙一、橘勝、X 線デジタルトポグラフィによる正方晶リゾチーム結晶の転位の解析、第 41 回結晶成長国内会議 (NCCG-41)、2011 年 11 月 3 日、*つくば国際会議場*

(6) 橘勝、澤浦拓也、沈夢遠、藤居大毅、若生啓、小島謙一、タンパク質結晶の X 線トポグラフィとその現状、PF 研究会「X 線トポグラフィの現状と展望」、2011 年 1 月 11 日-12 日、*つくば KEK*

(7) Mengyuan Shen, Takuya Sawaura, Daiki Fujii, Kei Wako, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana, X-ray topographic system with high-resolution CCD for characterizing imperfection in protein crystals, The 16-th International Conference on Crystal Growth (ICCG-16), 2010 年 8 月 8 日-13 日, Beijing, China

(8) Takuya Sawaura, Mengyuan Shen, Daiki Fujii, Kei Wako, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana, Characterization of dislocations in monoclinic hen egg white lysozyme crystals by synchrotron monochromatic-beam X-ray topography, The 16-th International Conference on Crystal Growth (ICCG-16), 2010 年 8 月 8 日-13 日, Beijing, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 謙一 (Kojima Kenichi)
横浜創英短期大学・情報学科・教授
研究者番号：90046095

(2) 研究分担者

若生 啓 (Wako Kei)
横浜創英短期大学・情報学科・講師
研究者番号：40515839

橘 勝 (Tachibana Masaru)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授
研究者番号：80236546