

## 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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22760001

研究課題名（和文） 交流電場を用いたタンパク質核形成速度の制御

研究課題名（英文） Control of Nucleation Rate for Protein Crystals under Application of an External AC Electric Field

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

研究成果の概要（和文）：新薬創製や生体機構の解明という観点から、新しいタンパク質結晶育成技術の確立は重要である。我々はこれまで交流電場印加による卵白リゾチーム結晶の核形成速度の制御に成功し、さらに、交流電場を利用した本育成技術において界面で形成される電気二重層が重要な役割を果たしていることを示してきた。そこで、本課題では、その形成された電気二重層の厚さを用いる沈殿剤の種類や濃度によって操作することにより、核形成速度への電場印加効果を自在に制御できることを示した。さらに、卵白リゾチーム以外のタンパク質においても、本育成技術が応用可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：The establishment of novel techniques for the crystallization of proteins is necessary. In previous work, we have succeeded in controlling the nucleation rate of hen-egg white lysozyme crystals under application of an external ac electric field. Moreover, we have also suggested that the electric double layer (EDL) formed at the interface play a key role for this crystallization technique. In this subject, therefore, we controlled the effect of the external electric field on the nucleation rate by regulating the thickness of the EDL formed at the interface by using the various precipitants and concentrations. In addition, we also controlled the nucleation rate for porcine insulin using this crystallization technique. This suggests that this crystallization technique be also adapted to almost all proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用物性・結晶工学

キーワード：結晶成長

## 1. 研究開始当初の背景

昨今のゲノム解析により、高齢化社会に対応できるゲノム創薬（ゲノム関連情報に基づいた新薬の開発）やテーラーメイド医療（個人の遺伝的背景にあった薬の処方や治療）に注目が集まっているが、それらの技術を実現するためには、実際の生命現象の場で“はたらく”個々のタンパク質の構造を知ることが重要である。タンパク質の構造は主に X 線構造解析によって決定され、それには高品質のタンパク質単結晶が必要となる。しかしながら、タンパク質は核形成が起こりにくく、単結晶を得ることが難しい。このため、ゲノム創薬やテーラーメイド医療を現実にするためには、「タンパク質の核形成を如何に促進方向に制御するのか」という困難な問題を解決しなければならず、このような問題を解決することのできる新しい結晶育成技術の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

これまで申請者は、そのような「タンパク質の核形成を如何に促進方向に制御するのか」という問題に焦点を当てて研究を行ってきた。そして、交流電場印加により固相と液相の化学ポテンシャルに付加される静電エネルギー項の大きさを操作し、固相と液相の化学ポテンシャルを自在に制御することにより、卵白リゾチーム結晶の核形成速度の促進方向への制御に成功してきた。さらに、5 MHz 以上の印加周波数において、核形成速度への交流電場印加の効果が減少していき、8 MHz 以上で消失することを示し、交流電場印加を用いた本育成技術においては、タンパク質溶液とパラフィンオイルとの界面で形成される電気二重層が重要な役割を果たしていることを示唆してきた。

タンパク質溶液は導電性のため、バルク溶液中の電極間のポテンシャル分布はほぼフラットであり、バルク溶液中では、電界強度がほとんど発生していないと考えられる。しかしながら、タンパク質溶液とパラフィンオイルの界面には、顕著な電位のドロップが存在し、そこに電気二重層が形成していると考えられる。

電気二重層の厚さ  $\lambda$  は以下のように表されることが知られている。

$$\lambda^2 = \epsilon k T / 8 \pi q^2 I \quad (1)$$

ここで、 $\epsilon$  は溶液の誘電率、 $k$  はボルツマン定数、 $T$  は温度、 $q$  は陽子の電荷、 $I$  は溶液のイオン強度である。つまり、溶液の誘電率が一定であると仮定すると電気二重層の厚さはイオン強度  $I$  のみに依存していることがわかる。一般的に卵白リゾチームの場

合、沈殿剤として NaCl を用いて結晶が育成されているが、NiCl<sub>2</sub> などのような他の沈殿剤においても育成可能であることが知られており、例えば 0.5 M の NaCl と 0.5 M の NiCl<sub>2</sub> のイオン強度はそれぞれ 0.5 と 1.25 と異なる。つまり、異なる種類の沈殿剤を用いればイオン強度が変化するため、それに伴い電気二重層の厚さが変化し、そこで生じる電界強度が変化することにより核形成速度に変化が生じるものと考えられる。そこで、本申請では、一つ目の課題として、(1) 電気二重層の厚さの操作による卵白リゾチーム核形成速度の制御を試みた。

加えて、これまでの実験で用いている卵白リゾチームは、比較的核形成の起こしやすいタンパク質である。しかしながら、一般的にタンパク質は核形成を起こし難い。このため、交流電場を用いた本育成技術が、様々なタンパク質に応用可能か確かめるために、二つ目の課題として、(2) 交流電場印加による他タンパク質であるインシュリン核形成速度の制御も試みた。

## 3. 研究の方法

(1) タンパク質試料には、卵白リゾチームを用い、57 mg/mL の濃度で実験を行った。また、沈殿剤には、0.5 M NaCl、0.5 M NiCl<sub>2</sub>、0.5 M YbCl<sub>3</sub> と様々な価数の沈殿剤を用いた。さらに、NiCl<sub>2</sub> においては、0.31 M と 1.05 M の濃度においても実験を行った。この際、溶液の pH は、pH 4.5 とした。

図 1 に実験手法の模式図を示す。図 1 に示されるように、タンパク質溶液を電極間に保持するために、高密度オイルであるフロリナートと低密度オイルであるパラフィンを使用した。このような配置で、1 MHz の交流電場を 800 V/cm の電界強度の下で印加し、1 日間育成した後、顕微鏡下で晶出した結晶の数を観察することにより、核形成速度を評価した。

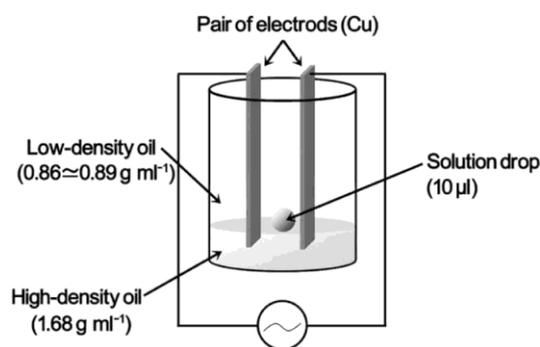


図 1 タンパク質溶液への交流電場印加の手法。

(2) タンパク質試料には、インシュリンを用い、10 mg/mLの濃度で実験を行った。また、沈殿剤には、0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ を用い、pH 9.5の下で実験を行った。交流電場の印加方法は、前述の実験と同様に行い、3 MHzの交流電場を900 V/cmの電界強度の下で印加し、4日間育成した後、顕微鏡下で晶出した結晶の数を観察することにより、核形成速度を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 電気二重層の厚さの操作による卵白リゾチーム核形成速度の制御

図2(a)と(b)に沈殿剤として0.5 M NaClと0.5 M  $\text{NiCl}_2$ を用いたときの核形成速度の分布を示す。沈殿剤として0.5 M NaClを用いた場合、1 MHzの交流電場を印加することにより、核形成速度は、13から21に増加していることが分かった。これに対し、沈殿剤とし

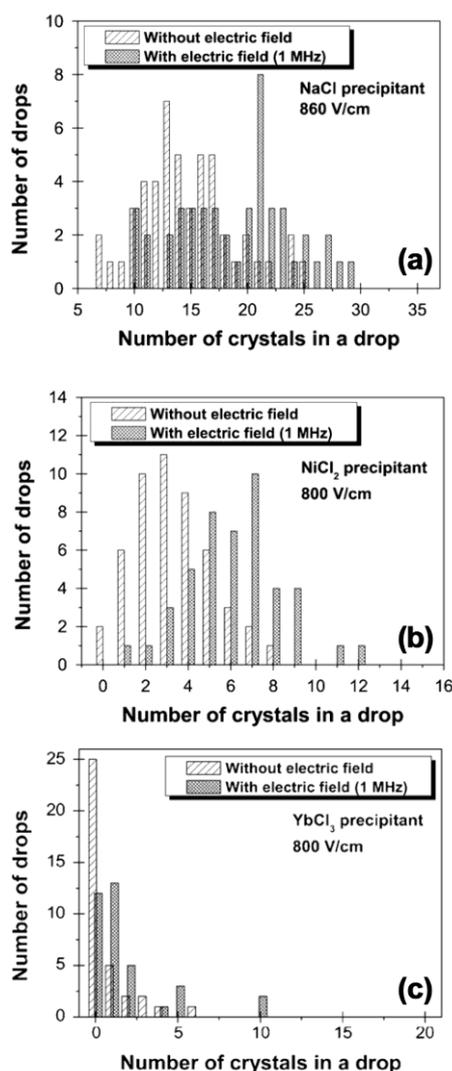


図2 様々な沈殿剤を用いたときの交流電場印加による核形成速度の変動。(a) 0.5 M NaCl、(b) 0.5 M  $\text{NiCl}_2$ 、(c) 0.5 M  $\text{YbCl}_3$

て0.5 M  $\text{NiCl}_2$ を用いた場合、1 MHzの交流電場を印加することにより、核形成速度は、3から7に増加することが分かった。つまり、核形成速度の増加率は、NaClの場合は1.6倍で、 $\text{NiCl}_2$ の場合は2.3倍であった。0.5 M NaClと0.5 M  $\text{NiCl}_2$ のイオン強度は、それぞれ、0.5と1.5であるため、核形成速度の増加率はイオン強度の増加に伴って増加していることが分かる。さらに、0.5 M  $\text{YbCl}_3$ のイオン強度は、3であるため、更なる電場印加効果の増大が期待できる。図2(c)に沈殿剤として0.5 M  $\text{YbCl}_3$ を用いたときの核形成速度の分布を示す。沈殿剤として0.5 M  $\text{YbCl}_3$ を用いた場合、交流電場印加なしでは、ほとんどのドロップにおいて結晶が晶出しなかったが、1 MHzの交流電場を印加した場合には、半分以上のドロップにおいて結晶が晶出することが分かった。ポアソン関数により電場印加なしとありの核形成速度の分布をフィッティングすると、電場印加なしとありの核形成速度は、それぞれ、0.21と0.94となり、核形成速度の増加率は4.4倍と見積もられ、期待通りにイオン強度の増加に伴って、電場印加効果が大きくなることが示された。

さらに、沈殿剤として $\text{NiCl}_2$ を用いた場合、卵白リゾチームの溶解度は、0.5 Mで最小値をとり、0.31 Mと1.05 Mにおいてはほぼ同じ値をとることが知られている。つまり、0.5 M  $\text{NiCl}_2$ を沈殿剤として用いたときに、核形成速度が最も大きくなることが予想される。しかしながら、各々のイオン強度は、0.93、1.5、3.15と $\text{NiCl}_2$ 濃度の増加に従って増加するため、電場印加効果は $\text{NiCl}_2$ 濃度の増加に伴って大きくなっていくと期待できる。

図3に様々な $\text{NiCl}_2$ 濃度の沈殿剤を用いたときの核形成速度の分布を示す。ポアソン関数により、それぞれの場合において電場印加なしとありにおける核形成速度の分布をフィッティングすると、1 MHzの交流電場を印加することにより、0.31 M  $\text{NiCl}_2$ を用いた場合には、核形成速度は、0.37から0.56になることが分かり、0.5 M  $\text{NiCl}_2$ を用いた場合には、核形成速度は、3.30から6.28になることが分かり、最後に、1.05 M  $\text{NiCl}_2$ を用いた場合には、核形成速度は、0.18から1.15になることが分かった。このため、それぞれの核形成速度の増加率は、1.5倍、1.9倍、6.3倍となり、イオン強度の増加に伴って、電場印加効果が増大していくことが期待通りに示された。特に、興味深いのは、0.31 Mと1.05 Mでは卵白リゾチームの溶解度がほぼ同じであるために、電場印加なしのときは、ほぼ同じ核形成速度の分布を示しているが、電場印加を行った場合は、イオン強度の違いから核形成速度の分布に顕著な違いが生じていることが分かった。

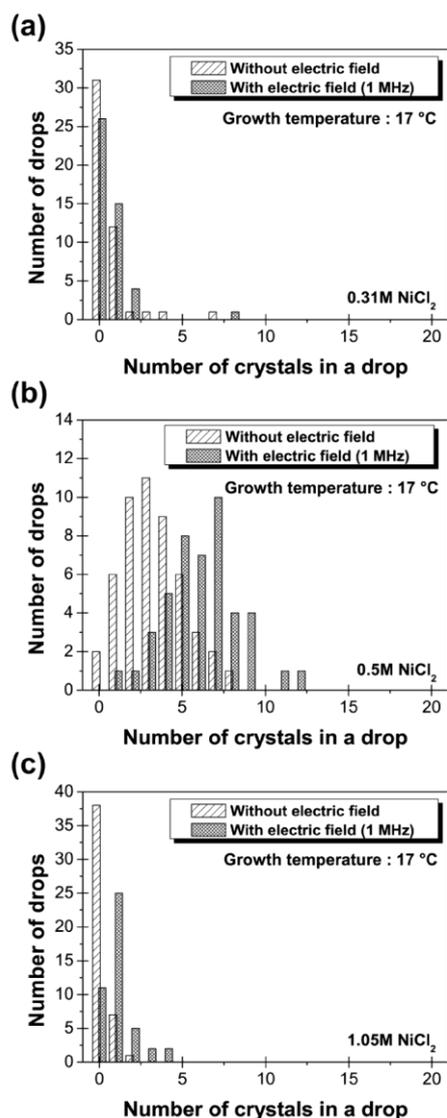


図 3 様々な濃度の  $\text{NiCl}_2$  を沈殿剤として用いたときの核形成速度の分布。  
(a) 0.31 M、(b) 0.5 M、(c) 1.05 M

## (2) 交流電場印加による他タンパク質であるインシュリン核形成速度の制御

図 4 に 3 MHz の交流電場を印加した際のインシュリン核形成速度の分布を示す。図 4 に示されているように、交流電場印加なしでは、ほとんどのドロップにおいて結晶が晶出しなかったが、3 MHz の交流電場を印加した場合は、ほとんどのドロップにおいて結晶が晶出することが分かった。このことは、交流電場印加を用いた本育成技術が、様々なタンパク質に応用可能であることを示唆している。

さらに、核形成速度の変動から計算される必要とされる電界強度が  $10^4 \text{ V/cm}$  のオーダーであることから、インシュリンの場合においても卵白リゾチームのときと同様に、界面で形成されている電気二重層が重要な役割

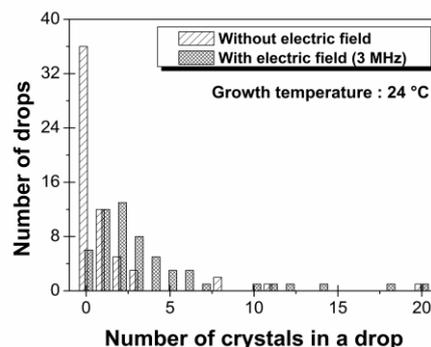


図 4 交流電場印加によるインシュリン核形成速度の変化。

を果たしていると考えられる。つまり、インシュリンの場合においても、沈殿剤の濃度を変えることにより、核形成速度への交流電場の効果を制御できると期待できる。

## 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 4 件) (すべて査読有)

- ① H. Koizumi, Y. Tomita, S. Uda, K. Fujiwara and J. Nozawa, Nucleation Rate Enhancement of Porcine Insulin by Application of an External AC Electric Field, *J. Crystal Growth* (2012). (in press.)
- ② Y. Tomita, H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara and J. Nozawa, Control of Gibbs Free Energy Relationship between Hen-Egg White Lysozyme Polymorphs under Application of an External AC Electric Field, *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 207-212 (2012).
- ③ H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara and J. Nozawa, Control of Effect on the Nucleation Rate for Hen Egg White Lysozyme Crystals under Application of an External ac Electric Field, *Langmuir* **27**, 8333–8338 (2011).
- ④ H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara and J. Nozawa, Effect of Various Precipitants on the Nucleation Rate of Tetragonal Hen Egg-white Lysozyme Crystals in an AC External Electric Field, *J. Crystal Growth* **312**, 3503-3508 (2010).

[学会発表] (計 9 件)

- ① 小泉晴比古, 藤原航三, 野澤純, 宇田聡, “交流電場印加によるタンパク質結晶の新しい育成技術”, 2012 年春季第 59 回応用物理学関係連合講演会, 2012 年 3 月 17 日, 東京
- ② 小泉晴比古, “交流電場印加によるリゾチーム結晶核形成速度の制御”, 日本結晶成長学会 バルク成長分科会第 84 回研究会, 2012

年2月24日、仙台

③富田陽介, 小泉晴比古, 野澤純, 藤原航三, 宇田聡, “交流電場印加による卵白リゾチーム結晶多形の晶出相制御”, 日本金属学会 2011 年秋期(第 149 回)大会、2011 年 11 月 7 日、沖縄県宜野湾市

④小泉晴比古, 野澤純, 藤原航三, 宇田聡, “電気二重層を利用した交流電場印加タンパク質育成技術の制御”, 第 41 回結晶成長国内会議、2011 年 11 月 5 日、つくば

⑤富田陽介, 小泉晴比古, 藤原航三, 野澤純, 宇田聡, “交流電場印加による卵白リゾチーム結晶の相平衡制御”, 第 72 回応用物理学会学術講演会、2011 年 9 月 1 日、山形

⑥H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara, J. Nozawa, “Role of the electric double layer in controlling the nucleation rate for tetragonal hen-egg white lysozyme crystals by application of an external AC electric field” The 18th American Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ACCGE-18), August 3, 2011, Monterey, California

⑦富田陽介, 小泉晴比古, 藤原航三, 野澤純, 宇田聡, “交流電場印加による卵白リゾチーム結晶多形の晶出相制御”, 2011 年春季第 58 回応用物理学関係連合講演会、2011 年 3 月 26 日、神奈川県厚木市

⑧

小泉晴比古, 野澤純, 藤原航三, 宇田聡, “外部交流電場印加によるタンパク質核形成速度の制御”, 日本金属学会 2010 年秋期(第 147 回)大会、2010 年 9 月 26 日、札幌

⑨H. Koizumi, J. Nozawa, K. Fujiwara, S. Uda, “Novel crystallization method for protein by applying an AC external electric field” The 16th International Conference on Crystal Growth (ICCG-16), August 10, 2010, Beijing, China

[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