

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651164

研究課題名(和文) タンパク質分子を会合制御する結晶化装置の製作

研究課題名(英文) Development of aggregation control protein crystallization apparatus

研究代表者

宮武 秀行 (Miyatake, Hideyuki)

独立行政法人理化学研究所・連携支援ユニット・専任研究員

研究者番号：50291935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：試行錯誤によらない、合理的な過程でタンパク質結晶を調製するための装置を試作した。この装置は、溶液経路内をタンパク質溶液が循環する方式を採用しており、動的な光散乱装置でタンパク質分子の会合状態をモニターしながら、結晶化に最適な状態に会合状態を誘導することが可能である。この装置を用い、試験タンパク質を高品質な単結晶に成長させられることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We developed a solution circulating crystallization apparatus, which can grow protein crystals in the rational way. We can control the nano-aggregation of the protein molecules by changing the solution composition in the apparatus, which optimizes the chance of crystallization. We observed the sample protein crystallization with the apparatus.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：マイクロ・ナノデバイス ナノ・マイクロ科学

キーワード：タンパク質結晶 タンパク質結晶化装置 ナノ会合制御

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造を解析する方法としては、X線結晶構造解析が最も有力な方法である。しかし、構造解析に先立って、目的タンパク質を結晶化する必要がある。結晶化の方法としては、タンパク質濃度、沈殿剤種類・濃度、結晶化温度などの結晶化に関わるパラメーターを様々に組み合わせて、絨毯爆撃的に同時に多数の条件を検索することにより、結晶の兆候を目視によって判定するという方法によって行われる。しかし、目視によって結晶化の兆候がありと判定されたとしても、その条件を精密化することにより得られる結晶が、最終的にX線を良好に回折する、構造解析可能な結晶になる保証はない。事実、最近の高難度タンパク質を対象とした構造解析の現場では、形状、サイズとも良好なタンパク質結晶が、全くX線を回折しないか、低分解の回折点しか与えたいために、構造解析が不可となる事例が頻発している。こうした場合には、他の結晶化条件を更に試行錯誤により検索するか、目的タンパク質に変異等を導入するなどの遺伝子工学的な手法により結晶の品質を向上させるための試みがなされるが、この過程もまた試行錯誤的な手法に多くを依存しており、決定的に有効な方法が存在していないのが現状である。

このように、最近のタンパク質X線結晶構造解析の現状としては、特に目的タンパク質の結晶化が律速段階となっており、最終的に構造解析に成功する確率は数%程度しかない。こうした状況が、タンパク質の立体構造を基にした、生命科学や創薬研究の効果的な推進にとって、深刻な障害となっている。こうした状況を打破するために、様々な結晶化方法が考案されてきている。例えば、結晶化ロボットを使用したハイスループット結晶化、新規な結晶化剤や結晶化を促進するための低分子化合物、微小重力化での結晶化、高磁場中での結晶化、フェムトレーザー照射による結晶化促進、結晶化溶液の積極的な攪拌による結晶化促進、脱水操作による結晶性改善操作等である。しかし、これらの方法も、個別のタンパク質結晶化に対しては有効な場合がある一方、一般的な事例に適用できるわけではなく、最終的な構造解析の成功確率が低いことには変わらない。このような状況に対して、本質的に良質な結晶化の成功確率を向上させる、技術的ブレークスルーが強く必要とされている。

2. 研究の目的

目的タンパク質の結晶化を試みる際に、従来方法のような絨毯爆撃的な非合理的過程に代わり、合理的な方法により結晶化条件を決定しつつ、目的タンパク質を調製する方法について検討する。具体的には、タンパク質結晶は目的タンパク質分子が3次元的に規則正しく会合した物質であることから、この会合状態をナノレベルで積極的に制御すること

が可能であれば、良質な目的タンパク質の合理的調製に結び付き、という前提を仮定する。これは、分子レベルで分子状態を制御することを志向する、ナノテクノロジー的な方法論をタンパク質結晶化に適応しようとする試みとも捉えられる。

具体的には、目的タンパク質の分子会合状態を動的光散乱測定(DLS)でモニターしつつ、タンパク質溶液組成や温度などの会合状態に影響を与えるパラメーターをリアルタイムに制御することにより、タンパク質分子の会合状態を最も結晶化しやすい状態に維持する方法を検討する(図1)。

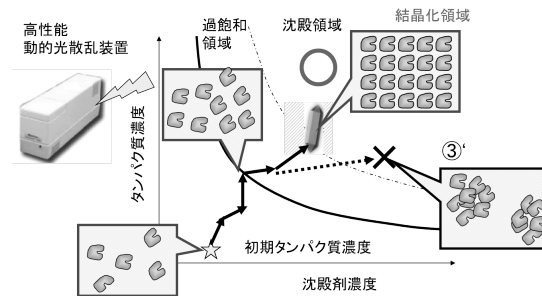


図1：タンパク質の会合状態を動的光散乱測定でモニターしつつ、結晶化領域まで溶液状態を変化させる過程の概念図

そのために、容器循環型の、タンパク質分子会合制御装置を製作し、これにより最適なタンパク質分子会合制御方法について検討を行う。

3. 研究の方法

目的タンパク質溶液が溶液サーキット内で循環しつつ、タンパク質分子の会合状態を制御することが可能な装置を製作する。この装置の基本的なコンセプトは、申請者が特許(第3567988: 生体高分子の結晶化条件探査方法及び探査装置)が基になっている。これは、半透膜で仕切られた容器中で、タンパク質溶液中のタンパク質分子の会合状態をモニターしつつ、半透膜を通して適切な溶液を注入することによって結晶化を行う方法である。こうした装置の実際的な製作のためには、半透膜溶液中の溶液組成が、外部から沈殿剤等を加えられた際にも常に濃度的偏りのない均一な状態に維持される必要がある。そこで、新たに溶液が強制的に溶液サーキット内で循環される装置の基本コンセプトを考案し、実際に装置を制作した(図2)。

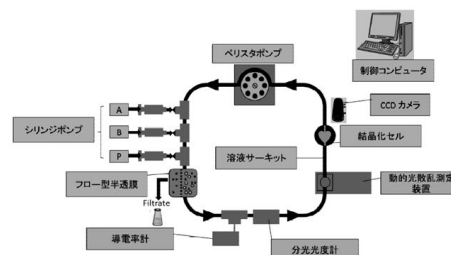


図2：溶液循環型結晶化装置の概要

この溶液サーキット内に、沈殿剤・タンパク質溶液を注入するためのシリンジポンプユニット、フロースルー型半透膜ユニット、会合状態をモニターするためのフロースルー型動的分散装置、タンパク質濃度計、導電率計等の各種検出装置、結晶化が進行する結晶化セル、結晶化内をモニターするための CCD カメラ等が挿入されている。各ユニットは、LabVIEW で書かれた制御ソフトをインストールした、Windows PC により統合制御されている。の具体的には、この装置を用い、どのように溶液状態を制御すれば結晶化が起こりやすいかについて、一般的な知見を得られるように、数種類の試験タンパク質により結晶化実験を行った。

4. 研究成果

本装置により、試験タンパク質としてリゾチウムおよびグルコースイソメラーゼを用いて、タンパク質分子の会合状態をモニター・制御しつつ溶液状態を変化させる実験を行った。その結果、タンパク質結晶化の過程において、良質な結晶化につながりやすい会合状態変化についての知見が得られた。具体的には、目的タンパク質溶液に結晶化剤（沈殿剤）を適切な速度および濃度で混合すると、瞬間的にタンパク質分子の会合状態が変化し、結晶初期核が形成されることを見出した。初期核形成後に、タンパク質分子が単分散状態に維持されるようにタンパク質濃度および沈殿剤濃度を上昇させた場合に、良質なタンパク質結晶の生成に結び付きやすいことが見いだされた（図3）。

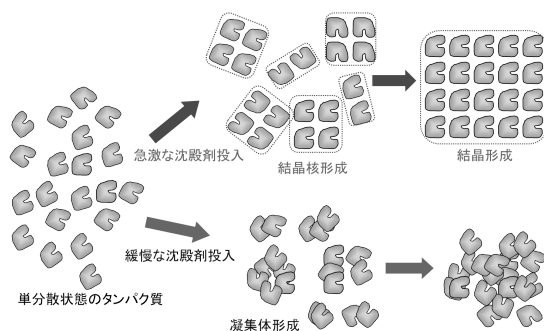


図3：急激な沈殿剤注入による、初期核形成と結晶成長の関係の概要

従って、沈殿剤が急速に注入される際の初期核形成に着目して、結晶化相図上でタンパク質および沈殿剤濃度が移行するように溶液状態が遷移するように、制御ソフトを作成した。この制御ソフトを使用して、リゾチウムの結晶化を行った例を示す（図4）

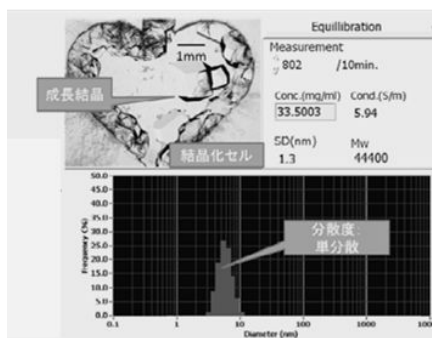
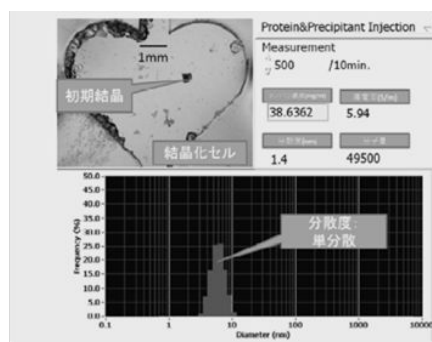


図4：本研究で開発した制御ソフトによりリゾチウムを結晶化した例

初期結晶核を形成後、溶液中のタンパク質分子が単分散状態を維持するように溶液状態を制御したところ、1mm以上のサイズの単結晶を調製することができた。ハート型の結晶化セルのサイズに制限があるため、結晶の成長は途中で止めたものの、容易に大型の単結晶を調製できることが示唆された。従って、本方法は、中性子回折で必要とされる、大型のタンパク質結晶の調製にも有効であることが示唆された。

本方法で調製したリゾチウム結晶を、大型放射光施設 SPring-8 にて X 線回折実験を行い、結晶の品質を評価した結果を示す（図5）

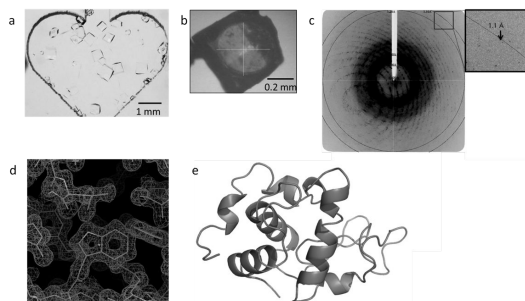


図5：本方法で作成したリゾチウム結晶の品質評価。(a)結晶化セル内の結晶(b)クライオルーブで掬い取った結晶 (c)X 線回折パターン。1 程度の高分解能までの回折点の確認できる(d)得られた電子密度(e)解析されたリゾチウムの分子モデル. Miyatake, H. et al. *Crystal Growth & Design*. **12**, 4466-4477 (2012). より転載。

その結果、原子レベル分解能の回折点を得られ、本方法が高品質の結晶化に結びつくことが示唆された。

今後の予定としては、新規タンパク質に対しても本方法を適用することが可能になるように、装置全体をダウンサイジングし、小容量のタンパク質量でも結晶化実験が行える装置の開発を進めたい。

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 1件)

Miyatake, H. *et al.* Real-Time Control of Nanoscale Protein Assembly for Further Crystallization Using a Solution Circulating Nanoaggregation Control Apparatus. *Crystal Growth & Design*. **12**, 4466-4477 (2012). (査読有) (DOI: 10.1021/cg300619d)

[学会発表](計 3件)

- 1) Hideyuki Miyatake, Tomohiro Yano, Ryo Shiroma, Nobuo Fukumoto, Kazuki Matsumoto, Masahide Kobayashi, Shin Maezawa, Naohiro Kuriyama. Protein crystallization by real-time controlling of solution composition. 第86回日本生化学会. 2013/9/11-2013/9/13. パシフィコ横浜、日本.
- 2) Hideyuki Miyatake, Tomohiro Yano, Ryo Shiroma, Nobuo Fukumoto, Kazuki Matsumoto, Masahide Kobayashi, Shin Maezawa, Naohiro Kuriyama. Real-time control of protein aggregation for further rational crystallization. ICSG2013-SLS. 2013/7/29 - 2013/8/1. Sapporo, Japan.
- 3) Miyatake, H. Development of a DLS-based protein crystallization apparatus. 46th Erice Course, 2013/5/30-2013/6/8, Erice, Italy.

[図書](計 0件)

6. 研究組織

宮武 秀行(MIYATAKE HIDEYUKI)
独立行政法人理化学研究所・連携支援ユニット・専任研究員
研究者番号：50291935