

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657071

研究課題名(和文)蛋白質結晶の高圧状態凍結トラップ法の開発

研究課題名(英文)Development of a high-pressure freeze trap method of protein crystals

研究代表者

渡邊 信久(Watanabe, Nobuhisa)

名古屋大学・シンクロトロン光研究センター・教授

研究者番号：70212321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質結晶の高圧結晶構造解析は室温実験が必須であるため、放射光の高輝度X線照射による放射線損傷が問題であった。本研究では、高圧を印加した状態のまま蛋白質結晶を凍結し、それを用いてX線回折実験を行う手法開発を試みた。加圧状態で結晶凍結可能な装置開発には成功した。加圧によって蛋白質結晶から結晶水が滲み出し、凍結時の結晶性低下をもたらすことが判明したが、それを回避する方策は創出出来なかった。

研究成果の概要(英文)：X-ray radiation damage is a serious problem for the high-pressure protein crystallography, because the method uses a diamond anvil cell and it is necessary to perform experiments at room temperature. In this study, we have tried to develop a new method that makes protein crystals frozen under high-pressure condition. A new apparatus has been developed. However, we found the mother liquid oozes from the crystal when we pressurize protein crystals, and that degrades crystal quality during the freezing process. We could not find a workaround for this problem.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：高圧結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

我々は先行する科研費挑戦的萌芽研究(課題番号:21657027)において、放射光の短波長X線とダイヤモンドアンビルセル(DAC)を用いる蛋白質の高圧結晶構造解析法を開発して来た。DACを使用すれば常圧から1GPa程度の高圧下で蛋白質の結晶構造解析を実施することが可能であり、本研究開始当時までも、蛋白質の圧力変性の初期過程の構造変化を捉えることに成功している[1]。

しかし、DACによる蛋白質結晶構造解析は室温での測定に限られており、高輝度な放射光X線の使用による放射線損傷が切実な問題である。図1は高エネルギー加速器研究機構のビームラインPF-AR NW12AにおいてDACを用いて高圧下でデータ収集した際の、測定の進行に対する結晶格子長変化のプロットである。この場合はデータ収集の進行に連れて、a軸が53.4 Åから58.1 Åに、c軸が124.7 Åから125.7 Åに伸びてしまっている。

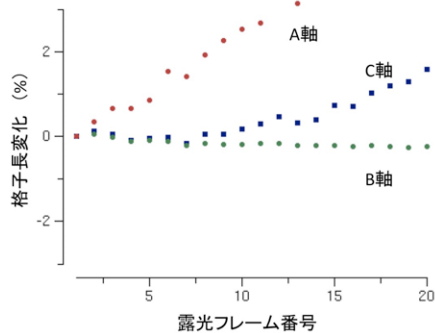


図1. 常温測定による格子長の変化。

同様なことは結晶のモザイク角の増加にも観られ、それらは、高輝度な放射光X線照射によって蛋白質分子の構造に乱れが生じていることを示している。高圧結晶構造解析では、加圧による分子の微小な構造変化や圧縮率の評価が重要であるため、これは実験結果の解釈に影響を及ぼす可能性がある。放射線損傷を避けて高圧構造解析を行う実験手法の開発が必要である。

2. 研究の目的

蛋白質結晶構造解析の場合、一般に放射線損傷を軽減するためには結晶を100K程度の低温状態に凍結して測定することが有効である。従って、本研究の目的は、数百MPaの高圧状態を保ったままで蛋白質単結晶を凍結し、それを用いてX線回折実験を行うことが出来る高圧下結晶凍結の新規手法を開発することである。

3. 研究の方法

蛋白質結晶の高圧凍結方法としては、従来は、Kimらによるガス加圧による高圧下での

凍結方法[2]と、クライオ電子顕微鏡の含水生体試料の高圧凍結法用に開発され市販されている微小試料凍結装置を利用した高圧結晶凍結法がある[3]。前者は高圧ガス保安法の関係で日本国内では実施し難く、実際にKimらの手法に従ってJAXAで製作された装置は160 MPaまでしか使用出来ない。後者は装置の本来の目的から、凍結時の圧力は約210 MPaに限定される。

これに対して、本研究では、凍結した試料結晶のみを取り出せるようにDACを改良し、静水圧印加状態でそのまま結晶を凍結し、その結晶のX線回折強度データ収集を行う手法開発を行う(図2)。

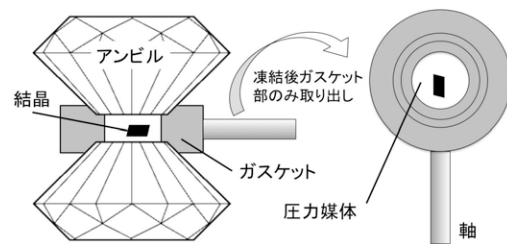


図2. 結晶高圧凍結装置の概念図。

4. 研究成果

(1) 結晶凍結装置の開発

我々は、これまで、室温実験用の通常のDACにガスケットピン固定用のXYZステージを付加し、それを用いて高圧下凍結を試みていたが、凍結後、DACを解放して結晶を取り出すことが非常に困難であった。従って、本研究ではSyntek社のSEEDをベースにして構造の改良を加え、結晶凍結装置の開発を試みた。図3に装置全体の写真を示す。これは本研究期間の最終的な構造である。図2の概念図に

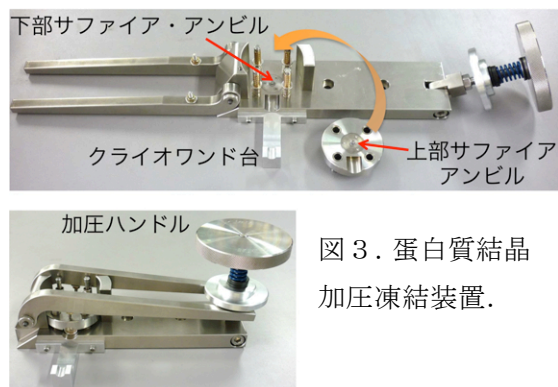


図3. 蛋白質結晶加圧凍結装置。

も示したように、下部サファイア・アンビルと上部アンビルの間にクライオピンを兼ねたガスケットを挟み、その部分に蛋白質結晶を保持する。ルビー蛍光測圧装置で圧力をモニターしつつ、加圧ハンドルで所定圧力まで昇圧し、所定の圧力に達した後、液体窒素で凍結する。

初年度は、先端にガスケット部を保持して

液体窒素外部から駆動するためにXYZステージを付加していたが、ステージの凍結を防止することが困難なことが判明したため、最終的には図にあるようなクライオワンド台を設置し、手で位置調整を行う形状となった。

一方、ガスケットを兼ねるクライオピンの開発に関しては、加圧凍結後に液体窒素中でアンビルを開放して、ピンを容易に取り出すことが可能であり、かつ凍結試料結晶にX線を照射して回折データ収集が可能な構造を意識して改良を行った。図4に本研究期間の最終的なピンの構造と、それをアンビル部に設置した状態の写真を示す。凍結後、X線回折装置上で冷却窒素ガスを吹き付けて低温を維持し、長時間の回折データを収集することを可能とするために、クライオピンのベース部分と先端部のガスケットはマコールで接続している。

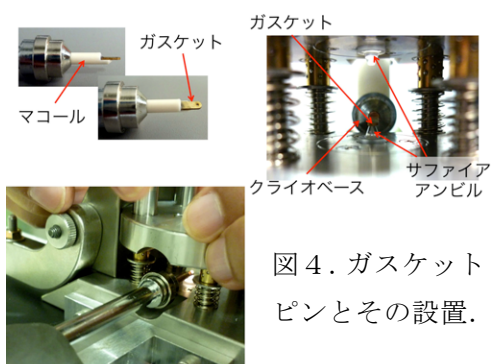


図4. ガスケットピンとその設置.

(2) 圧力媒体の検討

蛋白質結晶の凍結処理による結晶性の低下を避けるためには、一般に凍結速度は十分に速い必要がある。しかし、本課題では高圧状態を維持して凍結する必要があるため、加圧装置全体を液体窒素で冷却する。そのため凍結速度は非常に遅い。本研究では、Warkentinらのスロー凍結法[4]を参考に、結晶周辺の母液を完全に除去して別の圧力媒体と入れ替えることとし、使用可能な圧力媒体の検討を行った。

本研究で検討を行ったのは、各種粘度のフォンブリンオイル (YL-VAC 06/6, 14/6, 16/6, 25/6)、フロリナート (FC-770)、ノベック (7100, 7200) とパラトンオイルである。図5に実際に圧力媒体を交換して加圧セル中に蛋白質結晶を保持した例の写真を示す。結晶周辺の結晶化母液は完全に除去し、圧力測

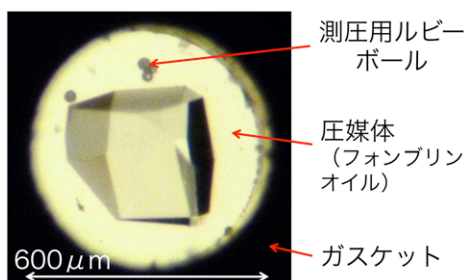


図5. 加圧セル中の結晶写真.

定のルビーボールも同時に挿入している。

検討を行った圧力媒体のうち、ノベックは凝固点が -135°C 程度と低く、凍結時に蛋白質結晶に与える影響が小さいことを期待したが、蒸気圧が低く蛋白質結晶の取扱が困難であり、最終的に、本手法には高粘度のフォンブリンかパラトンの使用が適していることが分かった。

(3) 高圧凍結実験

上記(1)および(2)に従って、高圧凍結を行い、低温下で凍結状態のまま取り出した後、実験室系のX線回折装置 Rigaku FR-E, R-AXIS VII を用いて結晶の評価を行った。

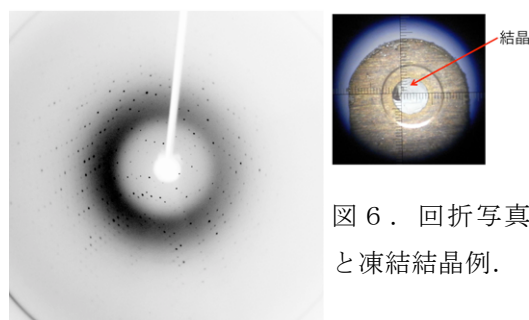


図6. 回折写真と凍結結晶例.

常圧菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) の L106M, A268I 変異体を用いて 250 MPa で高圧凍結実験を行った際の、凍結結晶の写真と、回折写真の例を図6に示す。

実験室系のX線回折装置による評価実験では、結晶周辺に金属ガスケットを有す本手法の場合、完全性の高い回折データは収集出来ないため、格子定数の比較による加圧状態の確認を行った。表1に示すように、同じバッ

表1. IPMDH の格子定数比較

結晶	a	b	c	β	mosaicity	
常圧	瞬間凍結	103.0	58.3	76.6	118.7	1.1
	スロー凍結	103.6	58.5	76.4	118.8	1.0
高圧凍結		100.1	56.1	74.6	118.6	2.1
		101.0	57.2	75.3	118.8	2.0

チの結晶を常圧でフラッシュ凍結したものと、液体窒素で比較的ゆっくり凍結したものと比較すると、格子定数は2~3%縮んでおり、高圧による圧縮の効果は保ったままで凍結出来ていることが分かった。この傾向は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 等の他の蛋白質の結晶でも同様であった。

しかし、さらにいくつかの種類の結晶を用いて実験を行ったところ、250 MPa 程度までの比較的低压領域では凍結可能な場合も、さらに高圧下で凍結を試みると成功率が極端に下がることが判明した。

本課題では(2)に記述したように結晶周辺の母液は完全に除去しているため、冷却時に氷 I 相 (高圧では氷 II 相) を通過すること

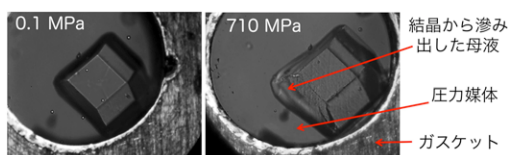


図7. 加圧による母液の滲み出し.

による影響は小さいと考えていた. ところが, 図7の例に示すように, 高圧下では結晶内部から母液(蛋白質結晶の場合は体積の50%程度が構造を取らない結晶水である)が滲み出して結晶表面に付着することが観察された. 加圧すると結晶全体が圧縮されるが, 内部の蛋白質分子とその周辺の結晶水の圧縮率が異なるため, スポンジを絞ったように母液が押し出されたものである. この結晶外部に滲み出した水溶液(母液)が冷却時に凍結してしまうため, スロー凍結が可能な条件でなくなり, 蛋白質結晶の結晶性を落としてしまうのではないかと考えられる. 表1の例にあるように250 MPaでもモザイク角が約2倍に悪化していることから, この母液の滲み出しとその影響は比較的低压領域から始まっていることも考えられる.

圧力媒体や装置の改良を含めて検討を行ったが, 残念ながら, 現時点では, 加圧下で結晶表面に滲み出して来る母液を再度除去してしまう方策を創出することが出来ていない.

参考文献

- [1] Nagae, T., *et al.*, *Acta Cryst.*, **D68** (3), 300-309 (2012).
 [2] Kim, CU, *et al.*, *Acta Cryst.* **D61**, 881-890 (2005).
 [3] McDonald, KL, *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, **369**, 143-173 (2007).
 [4] Warkentin, M & Thorne, RE, *J. Appl. Cryst.* **42**, 944-952 (2009).

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 永江峰幸, 濱島祐輝, 河村高志, 丹羽健, 長谷川 正, 加藤千明, 渡邊信久: 加圧による3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素への水分子の侵入: 深海微生物の酵素の圧力適応, 高圧討論会 (2012. 11. 7-9) 大阪大学会館
 ② T Nagae, Y. Hamajima, T. Kawamura, K. Niwa, M. Hasegawa, C. Kato, N. Watanabe: High-pressure-induced water penetration into IPMDH and pressure-adaptation mechanism of the

proteins from deep-sea bacteria, 生物物理学会年会 (2012. 9. 22-24) 名古屋大学

- ③ 渡邊信久, 永江峰幸: 蛋白質結晶の高圧状態凍結トラップ法の開発, 日本結晶学会年会 (2013. 10. 12-13) 熊本大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 信久 (WATANABE NOBUHISA)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号: 70212321

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし