

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：32727

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420694

研究課題名(和文) デジタル放射光トポグラフィによるタンパク質結晶の塑性と脆性の研究

研究課題名(英文) Studies on plasticity and brittleness of protein crystals by using synchrotron digital X-ray topography

研究代表者

小島 謙一 (KOJIMA, Kenichi)

横浜創英大学・こども教育学部・教授

研究者番号：90046095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が知っているタンパク質は、3大栄養素の一つであり、生存するために必要な物質である。このタンパク質は巨大分子から構成され、鎖状アミノ酸分子から成っている。その一つに、鶏卵白リゾチウム(卵の白身の一成分)というものがある。このようなタンパク質分子も食塩のように、ある条件のもとで結晶になる。本研究では、タンパク質結晶を実用化するためにその弱点である、弱さ(強度)や脆さ(脆性)を克服するための基礎研究を行い、主に、以下のような結果を得た。強度は一般の結晶と同じ転位論で説明できること、架橋やゲル化によって強度を上げ、脆さを克服することができることである。

研究成果の概要(英文)：Proteins are one of three main organic nutrients consisting of carbohydrates and fats and components in food that an organism uses to survive and grow. These proteins are large biomolecules, or macromolecules, consisting of one or more long chains of amino acid residues. For example, the hen-egg white lysozyme is shown as one of typical proteins. These kinds of protein molecules could be crystalized as same as a table salt. In this research, we carried out fundamental experiments on mechanical properties of protein crystals such as hen-egg white lysozyme and glucose isomerase crystals. We found some important results as follows; the plastic deformation of protein crystals are controlled by the normal dislocation mechanisms. the strength of protein crystals could be improved by chemical binding and gel-method.

研究分野：タンパク質結晶の強度と転位の研究

キーワード：タンパク質結晶 力学的性質 結晶塑性 脆性 放射光X線トポグラフィ 材料強度 デジタル画像 転位

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質結晶の研究はその結晶成長の機構や X 線回折法や NMR(核磁気共鳴法)によってその分子構造の決定などが中心であった。最近、タンパク質結晶は分子間に大量に含まれている結晶水を他の物質と置換できるので次世代のバイオセンサーやバイオ触媒などタンパク質デバイスやバイオポラスマテリアルとして脚光を浴びている[1-2]。一般にタンパク質は、たとえば目玉焼きの白身は、鶏卵白リゾチウム（以下リゾチウムと略）というタンパク質が主成分であるが、柔らかで弾力のあるソフトマターと考えられている。しかし、これは加熱によりタンパク質分子が変性し高分子化しているためである。実際のタンパク質結晶は大量の結晶水を含み、角砂糖のように脆く壊れやすい物質である。その脆さを克服するために、分子間に低分子で架橋することなどにより強度を高める方法も考えられている。しかしながら、より良い改良方法を見つけるためには、まず、純粋なタンパク質結晶の力学的強度を理解しなければならない。このために、結晶塑性の機構、すなわち転位の運動と増殖の機構を知る必要がある。また、その脆さ、脆性を知るためには転位を動かすのに必要な応力と破壊応力との競合が問題となる。このようなタンパク質結晶の実用化に向けて、結晶の脆性と低い機械的強度を理解するためにはタンパク質結晶の力学的性質を総合的に解明しなければならない。

研究代表者はこれまでにタンパク質結晶中の力学的性質について研究を進めてきた。まず弾性的性質に関しては、超音波パルスエコー法によって正方晶リゾチウム結晶の各種音速測定から 6 個の全ての弾性定数を決定した[3]。その結果、剛性率は 0.7 GPa となり Si 結晶の約 100 分の 1 となることがわかった。これらの弾性定数はタンパク質結晶の結晶水に依存し、脱水すると弾性定数は約 2-4 倍も大きくなることも分かった。一方、塑性的性質は正方晶リゾチウム結晶のインデンテーションの実験からビッカース硬さの測定を行い、イ) 圧痕の周囲にできるすべり線の観察、ロ) ビッカース硬さの温度依存性、ハ) 結晶水の量の依存性などを観測した。その結果から塑性変形が転位によるものと結論した[4]。

タンパク質結晶中の転位に関しては、そのバーガース・ベクトルが数 nm から数十 nm と極端に大きいため、その弾性エネルギーが凝集エネルギーを凌駕して存在できないものと考えられていた。しかしながら、われわれは、放射光トポグラフィにより転位の観察

を可能にした。これは従来のフィルム法と新しく開発した CCD システムによるデジタル放射光トポグラフィの双方で、正方晶リゾチウム結晶の転位を初めて、転位像の消滅則によって特定した[5-7]。現在では、正方晶、斜方晶、単斜晶でも転位の存在が確認されている。これらの結果を踏まえ、タンパク質結晶の塑性と脆性を解明する。

## 参考文献

- [1] K. Malek; Biotechnical Lett. 29 (2007) 1865-1873
- [2] Hu Zh Jiang; J. Langmuir 24 (2008) 4215-4223
- [3] H. Koizumi, M. Tachibana, and K. Kojima; Phys. Rev. E79, (2009) 061917-1-6.
- [4] H. Koizumi M. Tachibana, K. Kojima et al; J. Phys. D: Appl. Phys. 41, (2008) 074019-1-5
- [5] M. Tachibana, K. Kojima et al., J. Synchrotron Rad. 10, (2003) 416-421.
- [6] T. Sawaura, K. Kojima et al., J. Cryst. Growth 318 (2011) 1071-1074
- [7] K. Wako, K. Kojima et al., J. Appl. Cryst. 45, (2012) 1009-1014

## 2. 研究の目的

タンパク質結晶を実用化するための問題点は脆くて壊れやすいことである。この機械的性質を改善する基礎研究として研究代表者らによって開発された CCD システムによるデジタル放射光トポグラフィにより、タンパク質結晶のモデル物質であるリゾチウム単結晶に荷重を加えながら、その塑性変形の挙動を追跡する。また、それに付随するタンパク質結晶の強度について実験も合わせて行い、タンパク質結晶の塑性と脆性の総合的な解析を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究はタンパク質結晶の実用化に向けて、その強度を高めるために塑性と脆性の研究を行う。研究の方法としては、われわれによって開発された CCD システムによる放射光トポグラフィ実験により、リゾチウム結晶、グリコース・イソメラーゼ結晶中の転位の応力下での挙動を観察すること、またはクラックの発生の機構を観察することである。具体的には a) 転位の運動と増殖の機構を確認すること、そして b) 塑性と脆性の競合の問題を解決することが必要である。このために有効な手段は、われわれによって開発された CCD システム放射光 X 線トポグラフィにより、荷重をかけた状態での結晶の変形挙動を時間的に追跡することである。従来の X 線トポグラフィによる動的な観察はアナログ手法によってビデオに記録させる方法で解析されていた。しかしながら、CCD システムによるデジ

タル化された放射光 X 線トポグラフは約 1 秒程度で微小領域 ( $8 \times 8 \mu\text{m}/1$  ピクセル) の回折強度、回折曲線の半値幅、ピーク位置が結晶全体にわたってデータとして保存され、画像化することによって可視化される。たとえば強度分布を可視化すると転位を観察することができ、デジタル画像による転位像とフィルム法による転位像とは一対一に対応することが確かめられている[1]。この方法により応力下での転位の運動や増殖を観察することが可能になる。さらに、各ピクセルでの半値幅の値はその領域での完全性の指標となるので、たとえば応力下での半値幅の急激な時間変化はその領域での結晶の変形を意味する。これは破壊の機構を理解するのに役立つ。このよう本実験では、新しく開発作製をする応力を負荷する装置とデジタル放射光 X 線トポグラフの装置を一体化することにより、タンパク質結晶の塑性変形機構を解明する。

また、タンパク質結晶の強度を理解するために必要な、超音波法による弾性定数の測定、微小硬さ試験機や圧縮試験機による結晶の強度の測定など必要な実験も平行して行う。

参考文献

[1] K. Wako, K. Kojima et al., J. Appl. Cryst. 45, (2012) 1009-1014

#### 4. 研究成果

本課題で得られた平成 25 年度から 27 年度までの研究成果は、以下のように大きく分けて 5 つある。

##### (1) デジタル放射光トポグラフ用の応力負荷装置の開発と転位の観察

高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー (KEKPF) でデジタル放射光トポグラフにより、応力下での欠陥、主に転位の動的観察を行う際に必要な**応力負荷装置**の開発を行った。図 1 はその装置の写真である。垂直方向に数 mm/sec の速度で針が移動し、試料に微小硬さの測定と同じように、局所的に応力を加えることが出来る。この装置を KEKPF の実験ラインに装着して、正方晶リゾチウム結晶に針で応力中のデジタル放射光トポグラフの撮影に成功した。しかしながら、リゾチウム結晶では画像の解像度、針と結晶の位置関係、初転位密度に依存する個々の転位像の分解能などが十分でないことが分かった。この中で一番の問題点は使用したリゾチウム結晶は初転位密度(成長転位)が高く、応力下によって導入された運動転位との区別が十分でないことが判明した。



図 1 KEKPF に取り付けられた応力負荷装置

最近、より完全性の高いタンパク質結晶、すなわち初転位密度の低いグリコース・イソメラーゼ(GI)結晶を育成することに成功した(図 2)。そこで、この GI 結晶を用いて実験を行っているが、針で加圧した領域からの転位の増殖と運動が確認された。これらの成果に関しては、現在、論文を作成中である。

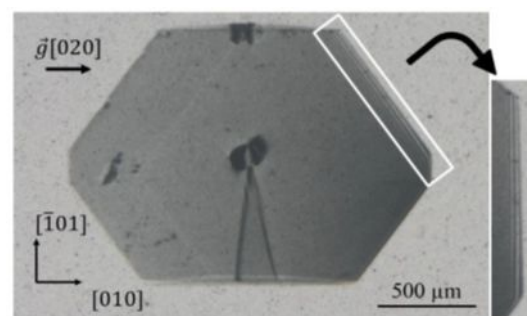


図 2 完全性の高い GI 結晶。中央から 2 本の転位に注意。

##### (2) デジタル放射光トポグラフによる完全性の評価

タンパク質結晶の完全性の評価は X 線回折の高次の反射の有無などから得られる分解能によって評価されている。結晶全体の平均的な評価は可能であるが、局所的な解析ないしは評価には不適切である。そこで、デジタル放射光トポグラフによりリゾチウム結晶の局所的な不完全性の原因を明らかにした。

単斜晶リゾチウム結晶は、結晶成長の段階で [010] 方向 (b 軸、図 3 の横軸に平行) の成長速度が +b と -b では異なることは周知の事実である。デジタル放射光トポグラフにより局所的な回折強度の半値幅 (FWHM) の結晶全体の分布を観察した。その結果が図 3 であるが、明らかに結果成長速度が速い領域 (図 3 の右側、黄色、橙色の領域) では半値幅が広く、結晶性の劣化が観察された。この成果に関しては、主な発表論文等の雑誌論文 (2) として発表されている。

また、正方晶卵白リゾチウム結晶の結晶育成時に交流電場中で育成された結晶と電場を加えないで育成された結晶をデジタル放射光トポグラフにより半値幅の解析を行った。その結果、交流電場中で育成された結晶の方が半値幅の絶対値が小さく、結晶性が



良いことが分かった。また、半値幅のピームサイズ依存性から交流電場中の方が、サブグレインサイズが大きいことが分かった。この成果に関しては、主な発表論文等の雑誌論文(1,3)として発表されている。

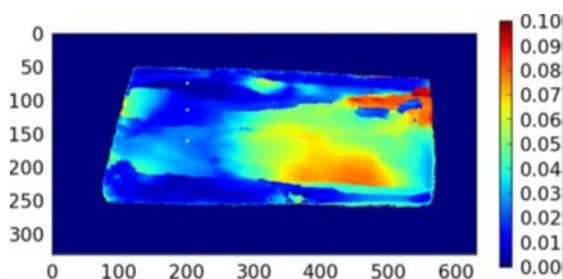


図3 単斜晶リゾチウム結晶の回折強度の半値幅の分布。濃い青色は半値幅が狭い(完全性高い)領域、黄色、橙色は半値幅が広い(完全性が低い)領域

### (3) 正方晶リゾチウム結晶の脆性(破壊)の改善について

タンパク質結晶の実用材として利用するためには、その弱点である脆性(破壊)を改善しなければならない。そのためにこの課題では以下のような種々の研究がなされ、脆性の改善を行った。

まず、純粋な正方晶リゾチウム結晶(以下 Pure-T-Lz と略)、グルタルアルデヒドで架橋した正方晶リゾチウム結晶(以下 G-T-Lz と略)、ゲル成長による正方晶リゾチウム結晶(以下 Gel-T-Lz)の力学的強度の比較をマイクロ・ピッカース硬さ(微小硬さ)測定によって研究を行った。その結果、Pure-T-Lz 結晶のピッカース硬さは15MPaであり、Gel-T-Lz 結晶のそれ14MPaから17MPaまでゲル濃度によって変化したが、結晶成長の違いによる差は見られなかった。一方、グルタルアルデヒドで架橋したG-T-Lz 結晶は29.7MPaとなり、分子間を架橋すると微小硬さが増加した。さらに、結晶全体を変形する巨視的な変形がインストロン型試験機によって行われ、興味のある結果が得られた。Pure-T-Lz 結晶では弾性領域で脆性破壊がおり、塑性変形は見られなかった。一方、Gel-T-Lz 結晶では弾性領域の後に塑性領域が観察され、その後、延性破壊により応力が減少した。このように、結晶の中にゲル組織を含んだ結晶は数十 $\mu\text{m}$ の領域の微小硬さには影響がないが、mmオーダの巨視的な変形ではゲル組織が強度に強い影響を及ぼしていることがわかった。これはタンパク質結晶を実用化するうえで重要な知見である。これらの結果については論文を作成中である。

### (4) 斜方晶リゾチウム結晶の力学的強度について

これまで正方晶リゾチウム結晶の力学的強度の研究を中心に行ってきたが、リゾチウム

結晶は多形を持つので、違う晶系も調べる必要がある。斜方晶リゾチウム結晶の微小硬さが測定され、硬さは、測定する結晶面により、5.7MPaから9.6MPaまで変化した。この値は正方晶リゾチウム結晶と比べると小さくなっている。この違いは結晶構造による弾性定数の違いによるものと考え、斜方晶リゾチウム結晶の弾性定数の決定を行った。その結果は、主な発表論文等の雑誌論文(5)として発表した。

### (5) グリコール・イソメラーゼ結晶(GI)の力学的性質について

GI 結晶は図2に示すように、完全性が高いタンパク質結晶が得られることが放射光トポグラフによって確かめられている(3)。このGI 結晶の弾性的性質が、超音波パルスエコー法によって測定された。[101]方向に進む縦波の音速は1197m/sとなり、斜方晶リゾチウム結晶のそれと比べると約40%減少している。このことはGI 結晶の方がリゾチウム結晶よりも柔らかいことを示している。一方、微小硬さは1-2MPaとリゾチウム結晶に比べると50%以上も減少している。このようにGI 結晶は異常に柔らかいタンパク質結晶であることが分かった。これらの結果については論文を作成中である。

### 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 and J. Nozawa, Crystallization of high-quality protein crystals using an external electric field, *J. Appl. Crystallogr.* **48**, **2015**, **1507-1513**  
DOI: 10.1107/S1600576715015885

(2) H. Koizumi, M. Tachibana, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, K. Tsukamoto, Y. Suzuki, S. Ueda and K. Kojima, Dislocations in high-quality glucose isomerase crystals grown from seed crystals, *J. Cryst. Growth and Desighn*, **14**, **2014**, **5111-5116**  
DOI:10.1021/cg500731v|Cryst. Growth Des. 2014, 14, 5111-5116

(3) 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), **2013**, **25-29**,  
DOI:10.1107/S0021889812048716

(4) Kei Wako, D. Fujii, S. Tsukashima, T. Kishi, M. Tachibana and K. Kojima, Crystal distortion of monoclinic hen egg-white lysozyme crystals using X-ray digital topography, Journal of Crystal Growth, 査読有, **401**, **2014**, **238-241**  
DOI:10.1016/j.jcrysgro.2014.01036

(5) N. Kitajima, S. Tsukashima, D. Fujii, M. Tachibana, H. Koizumi, K. Wako and K. Kojima, Elastic constants in orthorhombic hen egg-white lysozyme crystals, Phys Rev, 査読有, **E89**, **2014**, **012714- 1- 6**  
DOI:10.1103/PhysRevE89.012714

(6) 橘 勝, 小泉晴比古, 小島謙一, タンパク質結晶の弾性定数、日本結晶成長学会誌、査読有、**40**、**2013**、**126-134**

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 鈴木凌, 岸健晴, 小泉晴比古, 塚本勝男, 荒井康智, 福山誠二郎, 鈴木良尚, 小島謙一, 橘勝, 「グルコースイソメラーゼ結晶の成長転位の同定」, 日本物理学会, 第 71 回年次大会, 東北学院大学泉キャンパス 2016 年 3 月 19 日 ~ 22 日

(2) 重本知華, 岸健晴, 村田秀信, 橘勝, 「湿度制御下でのタンパク質結晶のマイクロピッカーズ硬さ」, 第 11 回ナノテク交流シンポジウム, 横浜国立大学 常盤台キャンパス 2016 年 3 月 2 日

(3) 鈴木凌, 岸健晴, 小泉晴比古, 塚本勝男, 荒井康智, 福山誠二郎, 鈴木良尚, 小島謙一, 橘勝, 「グルコースイソメラーゼ結晶の転位の運動と塑性変形」, 第 45 回結晶成長国内会議, 北海道大学 学術交流会館  
2015 年 10 月 19 日 ~ 21 日

(4) 鈴木凌, 岸健晴, 小泉晴比古, 塚本勝男, 荒井康智, 福山誠二郎, 鈴木良尚, 小島謙一, 橘勝, 「放射光単色 X 線トポグラフィによるグルコースイソメラーゼ結晶中の転位発生の観察」, 日本物理学会 2015 年秋季大会, 関西大学, 2015 年 9 月 16 日 ~ 19 日

(5) 若生啓, 藤居大毅, 岸健晴, 鈴木凌, 小島謙一, 橘勝, 「X 線デジタルトポグラフィの解析によるタンパク質結晶の完全性の評価」  
日本物理学会 2015 年第 70 回年次大会, 早稲田大学, 2015 年 3 月 21 日 ~ 24 日

(6) 岸健晴, 鈴木凌, 若生啓, 小島謙一, 橘勝, 「グリコールイソメラーゼ結晶の力学的性質」, 日本物理学会第 70 回年次大会, 早稲田大学, 2015 年 3 月 21 日 ~ 24 日

(7) 岸健晴, 鈴木凌, 橘勝, 小泉晴比古, 若生啓, 小島謙一, 吉崎泉, 福山誠二郎, 鈴木良尚, 「グリコールイソメラーゼ結晶の完全性」, 第 44 回結晶成長国内会議, 学習院大学, 2014 年 11 月 6 日 ~ 8 日

(8) 岸健晴, 小泉晴比古, 小島謙一, 塚本勝男, 鈴木良尚, 吉崎泉, 福山誠二郎, 橘勝, 「Xトポ

グラフによるグリコールイソメラーゼ結晶の評価」, 日本物理学会 2014 年秋季大会, 中部大学, 2015 年 9 月 7 日 ~ 10 日

(9) 岸健晴, 塚島史朗, 若生啓, 小島謙一, 橘勝, 「鶏卵白リゾチウム結晶の硬さの放置時間依存性」, 日本物理学会 第 69 回年次大会, 東海大学, 2014 年 3 月 27 日 30 日

(10) 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 alternative current electric field", 17th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, 2013 年 8 月 11 日 ~ 15 日

(11) 塚島史朗, 若生啓, 小島謙一, 橘勝, 「リゾチウム結晶の塑性」, 第 43 回結晶成長学会, 長野市, 2013 年 11 月 6 日 ~ 8 日

〔図書〕(計 1 件)

橘 勝, 小島謙一, シーエム・シ出版, 「タンパク質結晶の最前線」2013 年 pp120-128

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島 謙一 (KOJIMA Kenichi)

横浜創英大学・こども教育学部・教授

研究者番号 : 90046095

### (2) 研究分担者

若生 啓 (WAKO Kei)

横浜創英大学・こども教育学部・講師

研究者番号 : 40515839

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

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