

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650017

研究課題名(和文) 交流電場を用いたエントロピー操作によるタンパク質結晶の高品質化技術の開発

研究課題名(英文) Improvement of Crystal Quality for Protein Crystals under Application of an External Alternating Current 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

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タンパク質結晶の核形成頻度の制御に成功してきた。そこで、本課題では、タンパク質結晶の完全性に焦点を当てることにより、交流電場を印加しながら育成することで、タンパク質結晶の局所的な完全性、および、結晶全体の均質性が向上することを示した。さらに、タンパク質結晶の不完全が、結晶内のサブグレイン間の配向不整に支配されていること、1 MHz印加による完全性の向上がサブグレイン間の配向不整の減少に起因していることを明らかにした。

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 protein crystals under application of an external alternating current electric field. In this subject, therefore, we indicated that crystal quality and crystal homogeneity of protein crystals is improved under application of an external electric field. Moreover, It was determined that the imperfections in protein crystals are predominantly caused by misorientation between subgrains in the crystal. It was also revealed that improvement of the quality of crystals grown under a 1 MHz applied field is achieved by a decrease in the misorientation between subgrains in the crystal.

研究分野：結晶成長

キーワード：交流電場印加 タンパク質結晶 ロッキング・カーブ測定 結晶の完全性

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、それには高品質な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、さらに、高品質な単結晶を育成することが難しい。このため、ゲノム創薬やテーラーメイド医療を実現するためには、「タンパク質結晶の核形成過程の制御」および「結晶の高品質化」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

申請者は、これまで、交流電場を利用することによって、タンパク質核形成の制御に成功しており、加えて、1 MHz の交流電場を印加することにより、育成された正方晶リゾチームの局所的なロッキング・カーブ曲線の半値幅の値が、交流電場を印加しなかった正方晶リゾチームよりも狭くなることを明らかにしている。特に、この効果は、高次の回折において顕著であり、これは、X 線構造解析時における分解能の向上につながる期待できる。しかしながら、中性子線構造解析においては、十分な回折強度を得るために、1 mm 角のタンパク質単結晶が必要であり、このため、結晶全体の高品質化が望まれている。そこで、本申請では、交流電場印加によるタンパク質結晶の均質性向上について調べた。加えて、交流電場印加によるタンパク質結晶の完全性向上のメカニズムを明らかにするために、ロッキング・カーブ曲線の半値幅の詳細な解析を行った。

3. 研究の方法

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、NaCl を用い、最終濃度は 0.5 M とした。この際、100 mM 酢酸バッファーを用いることにより、結晶化溶液の pH を pH 4.3 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、角柱セル(12×12×45 mm)に結晶化溶液を封入し、角柱セルを電極間で挟み込むことによって、静電場印加を行った。このような配置で、1 MHz の交流電場を 400 V/cm の電界強度の下で印加し、21 °C で 9 日間育成した。

ロッキング・カーブ測定には、高エネルギー加速器研究機構の PF を用い、ビームラインには BL15B1 を用いた。実験に用いた X 線

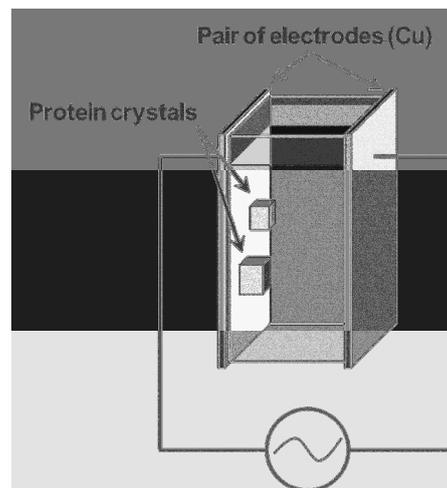


図 1 タンパク質溶液への交流電場印加の手法。

の波長は、1.2 Å で、3×3 mm のビームを正方晶リゾチームの[001]方向から入射し、回折像を CCD カメラによって検出することにより、ロッキング・カーブ測定を行った。その後、CCD カメラによって測定された正方晶リゾチームの回折像から、ロッキング・カーブ曲線を再構築し、ガウス関数によってフィッティングすることにより、半値幅を評価した。

4. 研究成果

(1) 交流電場印加によるタンパク質結晶の均質性向上

図 2 に電場印加なしと 1 MHz の交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームの 440 反射と 12 12 0 反射の半値幅のマッピングを示す。この際、ビーム径を 387 μm (60 pixels) とすることによって、半値幅は求められた。まず、電場印加なしで育成された正方晶リゾチームの 440 反射と 12 12 0 反射の半値幅のマッピングに注目すると、440 反射のマッピングにおいて、半値幅の値が徐々に変化していることが見て取れる(図 2(a))。さらに、図 2(c)に示してあるように、12 12 0 反射の半値幅の均質性は、440 反射よりもより悪くなっていることが分かる。これは、高次の反射が結晶内の歪みに敏感であることに起因している。つまり、この電場印加なしで育成された正方晶リゾチームの 12 12 0 反射における半値幅の不均質性は、結晶内の顕著な歪みの存在を示唆しており、電場印加なしで育成された正方晶リゾチームの結晶全体の品質は、不均一であることが分かった。

これに対し、図 2(a)と(b)に示されているように、1 MHz の交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームの 440 反射の半値幅の均質性は電場印加なしのものよりも改善していることが分かる。この傾向は、12 12 0 反射においても同様であることが分かる(図 2(c)と(d))。加えて、1 MHz の交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームの 12 12 0 反射のマッピングは、440 反射のマッピングと同程度の均質性を保っていることが分

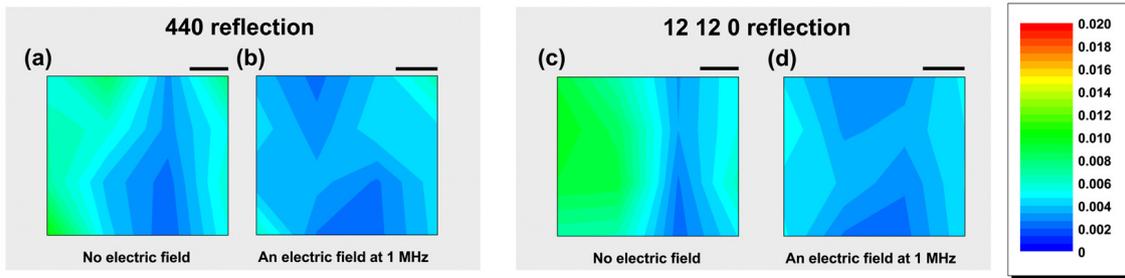


図2 電場印加なしとありで育成された正方晶リゾチームの440反射と12 12 0反射の半値幅のマッピング。(a)と(c)電場印加なし、(b)と(d)1 MHz印加。各々のマッピングデータの右上のスケールは、それぞれ0.3 mmを表している。

かる。これは、1 MHz印加によって、結晶内の歪みが顕著に減少したことを示唆している。このため、1 MHzの交流電場を印加することにより、正方晶リゾチームの結晶全体の均質性が改善することが分かった。

次に、ロックン・カーブ測定により得られた半値幅のプロファイルをシングルピークとマルチピークに分けた。図3に電場印加なしと1 MHzの交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームの12 12 0反射から得られたシングルピークとマルチピークの比率について示す。図3(a)に示されているように、交流電場を印加しながら育成しなかった場合、ロックン・カーブ曲線のほとんどのプロファイルがマルチピークだった。これは、結晶内にわずかに方位の異なる結晶粒の存在を示している。このため、タンパク質結晶の不完全性は、結晶内の多くのサブグレインにあるのかもしれない。これに対して、図3(b)を見て分かるように、1 MHzの交流電

場を印加しながら育成した正方晶リゾチームでは、多くのロックン・カーブ曲線のプロファイルがシングルピークとなることが分かった。これは、交流電場印加の効果によるサブグレイン間の配向不整の改善に起因しているのかもしれない。

(2) ロックン・カーブ曲線の半値幅の詳細な解析

測定した結晶が完全結晶ではない場合、得られたロックン・カーブ曲線の半値幅は、格子の傾き、局所的な歪み、粒径、格子の曲がりといった様々な効果によってブロードニングを起こす。これらの広がり効果を分離するためには、Williamson-Hallプロットのような二つの支配的な要因に注目する手法がある。そこで、はじめに、タンパク質結晶の半値幅の広がり主要因の同定を行った。

図4に電場印加なしで育成された正方晶リゾチームの半値幅のビーム径依存を示す。図4に示されているように、ビーム径の増加と共に220反射の半値幅が広がっていることが分かる。このような傾向は、格子が非常に曲がった結晶、もしくは、サブグレインのサイズがビーム径のサイズと同程度のとき、起きるといことが知られている。ここで、タンパク質結晶の格子が非常に曲がっていると仮定すると、12 12 0反射において得られるビーム径依存は、220反射よりも小さくならなければならない。しかしながら、12 12 0反射においても、220反射と同程度のビーム径依存が得られている。ゆえに、今回の実験で得られた半値幅のビーム径依存は、格子の曲がりではなく、サブグレインのサイズが、ビーム径のサイズと同程度のために起こったものだと考えられる。さらに、図4の両端では、半値幅の値がほぼ一定になっていることが見て取れ、これは、サブグレインのサイズが、ビーム径のサイズと同程度ではなくなったことを示唆しており、この結果から、結晶中のサブグレインのサイズが200 μmから600 μmであることが予想できる。このため、粒径による広がり、ほとんど寄与しないことが分かる。つまり、タンパク質結晶の半値幅の広がり、局所的な歪みとサブグレイン間の配向不整に分離することができることが分かった。そして、タンパク質結晶の

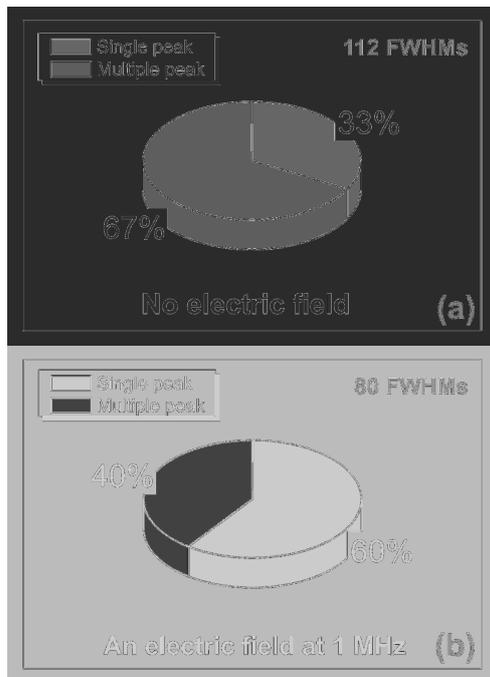


図3 電場印加なしとありにおける正方晶リゾチームの12 12 0反射から得られたシングルピークとマルチピークの比率。(a)電場印加なし。(b)1 MHz印加。

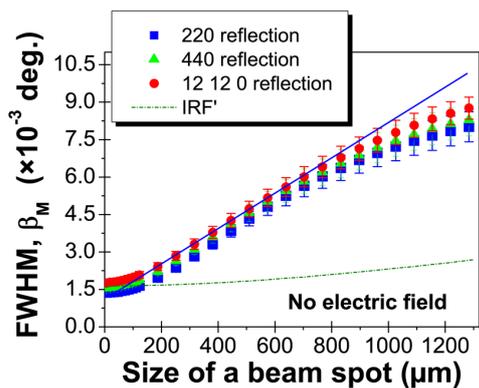


図4 電場印加なしで育成された正方晶リゾチームの半値幅のビーム径依存。

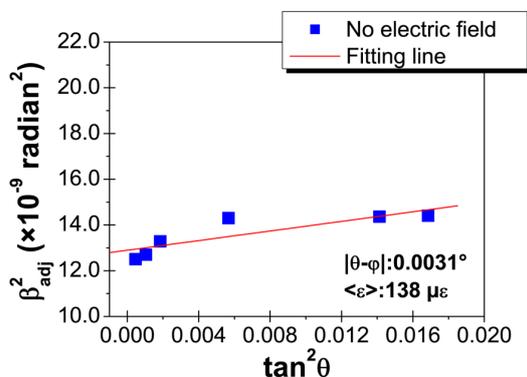


図5 電場印加なしで育成された正方晶リゾチームの半値幅の広がり要因の分離。

半値幅の広がり主要因を決定するために、図5に示したように、測定された半値幅の値をプロットし、タンパク質結晶の不完全性は、サブグレイン間の配向不整に支配されていることを明らかにした。

同様の解析を1 MHzの交流電場を印加しながら育成した正方晶リゾチームにおいても行ったところ、電場印加なしで育成した正方晶リゾチームと同様に、半値幅の広がり、局所的な歪みとサブグレイン間の配向不整に分離することができ、サブグレイン間の配向不整に支配されていることが分かった。さらに、1 MHz印加における結晶性の改善は、サブグレイン間の配向不整の減少に起因していることも明らかにした。

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2件) (すべて査読有)

① H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara, M. Tachibana, K. Kojima and J. Nozawa, Control of Subgrain Formation in Protein Crystals by the Application of an External Electric Field, *Cryst. Growth Des.* **14**, 5662-5667 (2014).

DOI: 10.1021/cg500946b

② H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara, M. Tachibana, K. Kojima and J. Nozawa, Enhancement of Crystal Homogeneity of Protein Crystals under Application of an External Alternating Current Electric Field, *AIP Conference Proceedings* **1618**, 265-268 (2014).

DOI: 10.1063/1.4897724

[学会発表] (計8件)

① 小泉晴比古、宇田聡、藤原航三、橘勝、小島謙一、野澤純、“交流電場印加による高品質タンパク質結晶の育成機構の解明 I” 2015年第62回応用物理学会春季学術講演会、2015年3月14日、東海大学(神奈川県平塚市)

② 小泉晴比古、宇田聡、藤原航三、橘勝、小島謙一、野澤純、“交流電場印加によるタンパク質結晶中の sub-grain 形成の制御” 第44回結晶成長国内会議(NCCG-44)、2014年11月6日、学習院大学(東京豊島区)

③ 小泉晴比古、宇田聡、藤原航三、橘勝、小島謙一、野澤純、“交流電場印加によるタンパク質結晶中の sub-grain の制御” 2014年第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月20日、北海道大学(北海道札幌)

④ 小泉晴比古、“交流電場印加によるタンパク質結晶の育成技術” 第31回無機・分析化学コロキウム、2014年5月30日、東北大学川渡共同セミナーセンター(宮城県大崎市)

⑤ H. Koizumi, S. Uda, K. Fujiwara, M. Tachibana, K. Kojima, J. Nozawa, "Enhancement of crystal homogeneity of protein crystals under application of an external alternating current electric field" 10th International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering (ICCMSE 2014), April 6, 2014, Athens (Greece)

⑥ 小泉晴比古、宇田聡、藤原航三、橘勝、小島謙一、野澤純、“交流電場下での固相と液相のエントロピー操作による高品質タンパク質結晶の育成” 2014年第61回応用物理学会春季学術講演会、2014年3月18日、青山学院大学(神奈川県相模原市)

⑦ 小泉晴比古、宇田聡、藤原航三、橘勝、小島謙一、野澤純、“交流電場下での固相と液相のエントロピー操作による高品質タンパク質結晶の育成”、第43回結晶成長国内会議、2013年11月6日、長野市生涯学習センター(長野県長野市)

⑧ **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" 17th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ICCGE-17), August 15, 2013, Warszawa (Poland)

[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