

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26887001

研究課題名(和文)フルイド反応TEMを用いたタンパク質の結晶化過程“その場”観察

研究課題名(英文) In-situ observation of protein crystallization by fluid reaction-transmission electron microscopy (FR-TEM)

研究代表者

山崎 智也 (YAMAZAKI, Tomoya)

北海道大学・低温科学研究所・学術研究員

研究者番号：50735032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：溶液中やそこで生じる現象をナノのスケール、実時間で直接観察できるフルイド反応透過型電子顕微鏡法(FR-TEM)を、溶液中でのリゾチームタンパク質の結晶化に応用した。

結晶化条件を最適化することで、FR-TEMを用いてリゾチームの結晶化を“その場”観察することに成功した。今回用いた溶液条件では、ナノ領域で2つの結晶相(斜方晶・正方晶)とアモルファス相が共存することが分かった。また、斜方晶リゾチーム結晶が核生成する瞬間を捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)： The fluid reaction transmission electron microscopy (FR-TEM), which can directly observe inside liquids at nano-scale and in real time, was applied to crystallization of lysozyme protein in a solution.

By optimizing the crystallization condition, in-situ observation of crystallization of lysozyme was successfully performed. Two crystalline phases (orthorhombic and tetragonal) and an amorphous phase coexisted at nano-scale under the solution condition. The moment of the nucleation of orthorhombic lysozyme crystal was successfully captured.

研究分野：結晶成長学

キーワード：透過型電子顕微鏡 リゾチーム 結晶化 核生成 結晶成長 溶液成長 “その場”観察 タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

結晶化における核生成は、原子や分子などの成長単位が集合し、母相よりもエネルギー的に安定な結晶核が生成することである。この過程において、生成物質のサイズや数密度、晶癖（形）、結晶構造、サイズ分布などが決まるため、これらを制御するには核生成のメカニズムを理解することが重要である。

本研究の対象物質であるタンパク質の結晶化は、タンパク質分子が規則的に集合して結晶核を生成し（核生成）、そこに規則的に分子が組み込まれていくこと（結晶成長）で行われる。タンパク質分子の立体構造は、主にタンパク質結晶を用いたX線3次元分子構造解析で行われるため、多くのタンパク質結晶化の試みがなされてきた。しかし、タンパク質を結晶化することは未だに難しく、そのメカニズムの解明は長年に渡り取り組まれている。特に核生成に関しては、その生成頻度が古典的な核生成理論で予測される値よりも数桁小さいという問題がある。これを解決するために、まず、タンパク質分子が濃集した液相（Dense liquid）が生成し、そこから結晶核が生成するという核生成モデル（Two-step mechanism）が提案された。実験的にこのようなクラスターを検出しようと、主として光学的な手法を用いた観察や測定が行われてきた。その結果、溶液中に数百ナノメートルサイズの準安定なクラスターが存在することが明らかになった。このクラスターが、タンパク質の結晶化において、結晶核生成のための前駆物質と考えられており、これを經由して結晶核が生成すると考えられてきた。しかし、核生成におけるクラスターの役割（クラスターの内部から核生成する、クラスター表面から不均質的に核生成する、また、核生成過程には直接関わっていない、など）は分かっておらず、モデルを支持する実験的根拠が乏しい。この問題に直接アプローチするには、溶液中に存在する準安定なクラスターを検出することができる空間分解能で、結晶核の生成を“その場”観察することが必要である。

“その場”観察法は、主として光学顕微鏡を用いて行われてきた。タンパク質は、その分子サイズが大きいことを利用し、タンパク質結晶の成長過程を光学顕微鏡で“その場”観察することで溶液中での結晶成長のメカニズムが議論されるために用いられてきた。しかしながら、核生成はナノの空間領域で生じる現象のため、光学顕微鏡で“その場”観察することができなかった。そこで本研究では、透過型電子顕微鏡（Transmission electron microscopy, TEM）を用いた液中“その場”観察法に着目した。TEMは光源に電子線を用いるため、その空間分解能はサブナノオーダーに及び、電子線を発生させるため高真空環境が必要であり、そこに直接水溶液

を入れることはできなかった。また、TEMで観察できる試料は薄い試料が必要であった。そこで、アモルファス窒素シリコンやグラフェン等の薄膜を用いて薄い溶液層（1 μm以下）を作製し、高真空環境と溶液を分離した状態にすることで、TEMで溶液中を観察できる技術が開発された。研究代表者の所属する研究室では、近年、溶液中で生じる現象をナノの空間スケールで“その場”観察できるフルイド反応 TEM（FR-TEM）をシステムとして確立した。本手法を用いて、タンパク質であるリゾチームの結晶化を、ナノの空間分解能、実時間で“その場”観察することを試みた。

## 2. 研究の目的

FR-TEMをリゾチームタンパク質の結晶化に応用し、その結晶化過程を“その場”観察する。ここからタンパク質の結晶化のメカニズムを調べ、従来、核生成の前駆物質と考えられてきた準安定なクラスターが核生成にどのような役割を担っているのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

タンパク質結晶化試料として、鶏卵白リゾチームを用いた。結晶化には、pH 4.5の酢酸バッファーと塩化ナトリウムを用いた。

まず、リゾチーム結晶化溶液中のクラスターの存在を確認するため、動的光散乱法（Dynamic light scattering, DLS）を用いた溶液の分析を行った。

次に、FR-TEMでの観察と比較するため、光学顕微鏡（位相差顕微鏡）を用いてリゾチーム結晶の成長を“その場”観察を行い、結晶成長速度の過飽和度依存性を測定した。

また、FR-TEMを用いた観察では、液中観察用ホルダーとアモルファス窒素シリコン窓を使用した液中セルを用いた。ホルダーには溶液を流すためのチューブが内蔵されており、そこに一定過飽和度のリゾチーム結晶化溶液を継続的に流すことで、溶液セル中の過飽和度を一定に保つ。このチューブは非常に細い（内径 100、150 μm）ため、溶液の粘性や核生成が多数生じてしまうと、チューブが詰まるおそれがある。タンパク質濃度が高くなると、溶液の粘性と核生成頻度は高くなるが、送液に支障をきたすため、いたずらに高濃度の溶液を用いることができなかった。そのため、過去の実験データから、送液に支障がなく、FR-TEMにより結晶核の生成が期待できる最適な溶液条件を設定した。

## 4. 研究成果

まず、従来無機化合物や難溶性結晶に用いられてきた TEM での液中観察技術は、溶液の条件を最適化することにより、タンパク質の結晶化にも応用できることが分かった。

DLS で結晶化溶液を分析した結果、本実験の溶液中には、直径数百 nm のクラスターが含まれることが分かった。DLS 分析の結果が先行研究の実験データと一致していることから、このクラスターが結晶核生成の前駆物質と考えられているクラスターである。この溶液を FR-TEM で観察し、分析したところ、直径数百 nm のアモルファス粒子として溶液中に存在することが分かった。

また、リゾチーム結晶を FR-TEM で“その場”観察することに成功し、今回用いた溶液条件では、2 つの結晶相（斜方晶・正方晶）とアモルファス相が共存することが分かった。結晶の形は、光学顕微鏡で観察されるものと類似していた。さらに、電子回折パターンが取得できることも分かったため、これを用いて結晶相の同定を行った。

観察中、しばしば電子線により結晶が溶解する様子が見られた。結晶に対する電子線照射の影響を評価するため、照射する電子量を制御して斜方晶結晶の大きさ変化から、成長速度の時間変化を測定した。光学顕微鏡を用いて測定した同一の溶液条件での結晶成長速度と比較したところ、電子線照射後の数十秒間は同一の値を示した。そのため、結晶化に対して電子線の影響を無視できる電子線量のしきい値が存在することが分かった。このことより、成長速度が電子線の影響を評価するパラメータとして有用であることが分かった。

相の安定性を評価するため、出現する相を同一の視野内で“その場”観察した。斜方晶結晶と正方晶結晶を同時観察した場合は、斜方晶結晶は成長し、正方晶結晶は徐々に溶解していく様子が観察された。また、斜方晶結晶とアモルファス粒子の場合では、斜方晶結晶は成長し、アモルファス粒子は溶解する様子が観察された。このことから、この系で最も安定な相は斜方晶であることが分かった。

さらに、斜方晶結晶が核生成する瞬間を捉えることに成功した。結晶核は、前駆物質と考えられていたクラスター（アモルファス粒子）内部から生成するのではなく、クラスターの表面から生成した。このことから、従来前駆物質と考えられてきたクラスターは、不均質核生成のためのサイトとして働くことが明らかになった。また、核生成した粒子の成長速度の時間変化を詳細に解析した。その結果、核生成直後（粒子が出現してから 1 秒程度あと）の粒子の成長速度は、通常の結晶

の成長速度よりも桁で大きいことが分かった。考察の結果、核生成直後の粒子がリゾチーム分子を取り込むために越えなければならないバリアが、結晶に取り込まれる際のバリアよりも非常に低いことが分かった。これは、核生成直後の粒子が結晶相ではなく、アモルファス相であるためである。このことより、リゾチーム結晶の核生成過程では、1. 不均質核生成サイトとして働くアモルファス粒子、2. 結晶核が生成する直前に生成するアモルファス粒子、の 2 種類のアモルファス相が関わっていることが分かった。

## 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. T. Yamazaki, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, H. Miura, T. Shimaoka, T. Maki, K. Oshi and Y. Kimura, Development of compartment for studies on the growth of protein crystals in space. *Review of Scientific Instruments* **87**, 033107-1-7, 2016, DOI: 10.1063/1.4942961
2. T. Yamazaki, M. Shirai, H. Matsumoto and Y. Kimura, Transmission Electron Microscopy of Crystallization of Lysozyme in a Solution. *Microscopy and Microanalysis* **21**, 255-256, 2015, DOI: 10.1017/S143192761500207X

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 山崎智也, 木村勇気, 透過型電子顕微鏡を用いたタンパク質の結晶化における準安定相の直接観察. 日本地球惑星科学連合 2016 年大会, 2016 年 5 月 22-26 日, 幕張メッセ (千葉県千葉市).
2. 山崎智也, 木村勇気, 透過型電子顕微鏡を用いたリゾチーム結晶成長“その場”観察. 第 45 回結晶成長国内会議, 2015 年 10 月 19-21 日, 北海道大学 (北海道札幌市).
3. 山崎智也, 木村勇気, 透過型電子顕微鏡によるタンパク質結晶化“その場”観察. 第 39 回結晶成長討論会, 2015 年 9 月 24-28 日, 同志社びわこリトリートセンター (滋賀県大津市).
4. T. Yamazaki, M. Shirai, H. Matsumoto and Y. Kimura Transmission Electron Microscopy of Crystallization of Lysozyme in a Solution. *Microscopy and Microanalysis* 2015, August 2-6, 2015, Portland, OR, USA.
5. 山崎智也, 木村勇気, 溶液中の結晶化過

程の研究に対する透過型電子顕微鏡の応用. 日本地球惑星科学連合 2015 年大会, 2015 年 5 月 24-28 日, 幕張メッセ (千葉県千葉市).

6. 木村勇氣, 山崎智也, 佐藤久夫, 塩素酸ナトリウムナノ結晶の溶解過程の TEM 観察. 日本地球惑星科学連合 2015 年大会, 2015 年 5 月 24-28 日, 幕張メッセ (千葉県千葉市).

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

山崎智也 (YAMAZAKI, Tomoya)

北海道大学・低温科学研究所・学術研究員

研究者番号 : 50735032

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし