

令和元年6月17日現在

機関番号：56101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05668

研究課題名(和文)新規タンパク結晶場としてのフィルター孔の活用とその構造解析・分離デバイスへの展開

研究課題名(英文) Utilization of membrane filter for a protein crystallization field and single-crystal X-ray diffraction analysis

研究代表者

山田 洋平 (Yamada, Yohei)

阿南工業高等専門学校・創造技術工学科・助教

研究者番号：70706936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質結晶成長場及びX線回折実験用試料固定材としてトラックエッチドメンブレンフィルター(TEMF)を利用した。TEMF切片をリゾチームの結晶化溶液に浸漬することで、孔内で成長した結晶を得た。結晶を含むTEMFをX線回折装置にマウントし、単一孔内の結晶から回折像を得た。その結果、2.1 分解能程度の回折強度データを得た。

また、タンパク質結晶を鋳型にした材料合成について検証した。まず、グルタルアルデヒドで架橋したタンパク質結晶を各種溶媒(塩基、酸、有機溶媒)に浸漬し、その安定性を評価した。次いで、無機酸化物の結晶内部への導入操作を行い、TEMを用いて結晶内部での元素分布を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、トラックエッチドメンブレンフィルター(TEMF)の孔内という微小空間をリゾチームの結晶成長場に利用することで、結晶成長にどのような影響を及ぼすのかを検証した。結果として、孔内とバルク相で結晶化条件や頻度の差異を確認することはできなかったが、孔で得られた結晶をTEMFごとマウントしてX線構造解析を行うことができた。これは、X線回折実験における操作の簡略化に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, track-etched membrane filters (TEMF), which have highly homogeneous micropores, were applied to a protein crystal growth field and used as a crystal mounting tool for single-crystal X-ray diffraction analysis. A lysozyme crystal was obtained in the pore by keeping TEMF in a lysozyme-crystallization solution. In addition, the crystal which grew in a single pore was analyzed by performing single-crystal X-ray diffraction analysis. The resolution limit of the crystal was 2.1 .

As an applied study, we utilized protein crystals as a template for synthesizing porous materials. First, we investigated the stability of cross-linked crystals in several solvents such as alkaline, acidic, and organic media. Then, an inorganic material was introduced by soaking crystals in a precursor solutions. By using TEM, we confirmed that the existence of the inorganic oxide in the protein crystal.

研究分野：分析化学

キーワード：タンパク質結晶 グルタルアルデヒド トラックエッチドメンブレンフィルター 単結晶X線構造解析

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造解析は、大きく結晶調製と X 線回折実験の二つの過程に分けることができる。結晶調製の過程においては、様々な手法や結晶化条件が提案されている一方で、X 線回折実験に関わる一連の操作（サンプルループでの結晶採取、凍結防止剤への含浸、フラッシュクーリングなど）については、共通操作として広く実施されている。我々は、結晶品質の向上と X 線回折実験操作の簡略化を図る方法として、トラックエッチドメンブレンフィルター (TEMF) を利用できないかと考えた。TEMF の孔径は均一かつ微小（孔径は 0.01 ~ 30 μm 、膜厚は 6 ~ 50 μm の範囲で制御可能）であり、このような微小な孔の中では溶液の対流が抑制されると考えられる。一般に対流が抑制された環境は、高品質な結晶成長に資するとされるが、特殊な器具や条件を用いることなく、簡易にこのような条件を利用できる点で TEMF は興味深い。さらに、結晶を TEMF 孔内に得ることができれば、一度のマウント操作で複数個の結晶を X 線回折装置に設置できる。X 線照射位置の変更のみで試料交換が可能であり、X 線回折実験時の省力化が期待できる。

次いで、我々はタンパク質結晶を物質合成場として活用するための研究を実施した。タンパク質結晶の内部は複雑なチャンネル構造をしており、これまでにその空間を利用した物質の分離・合成法が報告されている。我々はフェリチン結晶の形状に目を付け、フェリチン結晶を鑄型とした多孔質材料の合成に取り組んだ。結晶に骨格材料となるテトラエトキシシラン (TEOS)、チタン (IV) テトライソプロポキシド (TTIP) などの酸化物前駆体を導入し、材料導入後の結晶内部の状態に関して、TEM などによる評価を行うことを計画した。

2. 研究の目的

TEMF 孔内でリゾチーム結晶を調製し、結晶を含む TEMF を X 線回折装置に設置し、回折実験を行うことを目的とした。また、タンパク質結晶を鑄型にした材料合成に関しては、グルタルアルデヒドで架橋処理した結晶が鑄型材料に資する化学的安定性を有しているかを検証し、フェリチン結晶を鑄型にした材料合成を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

TEMF をリゾチームの結晶化溶液に浸漬し、孔内でのリゾチーム結晶の成長や溶解過程を光学顕微鏡で観察した。また、リゾチーム結晶を内包した TEMF を手製の治具を用いて、X 線回折装置にマウントし X 線回折実験を行った。本研究では、孔径 30 μm の TEMF を用いたため、孔内で得られた一つの結晶からデータを得るためには、孔と同サイズまで集光された X 線源を用いる必要がある。そこで X 線回折実験は SPring-8 BL38B1 にて実施した。

タンパク質結晶を鑄型にした材料合成に関して、まず架橋処理したタンパク質結晶の溶媒安定性を評価するために、種々の溶媒（酸、塩基、有機溶媒）に架橋処理した結晶を 24 時間浸漬し、その間の外観および結晶構造の変化を光学顕微鏡、単結晶 X 線構造解析により観察した。次いで、架橋処理したフェリチン結晶を調製し、これらの結晶を TEOS や TTIP といった酸化物前駆体溶液に含浸させた。一定時間経過後、溶液から結晶を取り出し加熱乾燥させた後、単結晶 X 線構造解析や SEM, TEM 観察によって、結晶構造の保持や材料の結晶内への導入を確認した。

4. 研究成果

(1) タンパク質結晶成長場及び X 線回折実験用試料固定材としてのトラックエッチドメンブレンフィルターの利用

孔径 30 μm の TEMF 切片をリゾチームの結晶化溶液に浸漬することで、孔内を充填するように成長した結晶を得た（図 1）。孔で得られた結晶は、TEMF の孔外（バルク相）では孔径の制約を受けずに成長した。TEMF 上に形成した結晶を溶解させると、バルク相から溶解が始まり、孔内部では溶解が遅延する傾向が観察された。最後に、手製の治具を用いて結晶を含む TEMF を X 線回折装置にマウントし、直径 30 μm （円形）のシンクロトロン放射光を用いて、単一孔内の結晶から回折像を得た。回折像より算出された格子定数は $a = b = 78.7 \text{ \AA}$, $c = 37.0 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90.0^\circ$ で、2.1 \AA 分解能程度のデータを得ることができた。

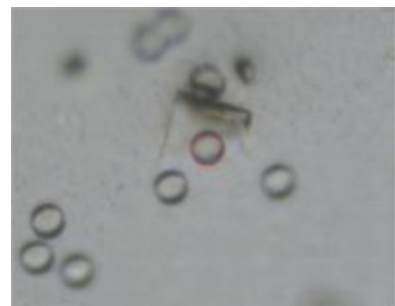


図 1 X 線回折実験に用いたリゾチーム結晶。丸く見えるものが TEMF の孔（直径 30 μm ）。赤色の丸印の位置に X 線を照射して回折データを得た。

(2) グルタルアルデヒドで架橋処理したリゾチーム結晶の各種溶媒中での安定性評価

グルタルアルデヒドで架橋処理したリゾチーム結晶を各種溶媒（酢酸、塩酸、アンモニア、水酸化ナトリウム、エタノール、アセトン、2-プロパノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)）中での安定性について評価した。水酸化ナトリウムと DMSO 中では結晶の変性が速やかに進んだが、その他の溶媒では 24 時間浸漬後も単結晶 X 線構造解析によって格子定数を算出することができた。

(3) 架橋処理したフェリチン結晶を鋳型にした多孔質材料の合成

タンパク質結晶はその内部に、結晶体積の 1/3 ~ 2/3 とされる空隙を持っている。その空隙に TEOS や TTIP などの骨格材料の前駆体を導入することで、タンパク質結晶構造をインパース化した材料を合成することを目標とした。架橋処理したフェリチン結晶を金属酸化物前駆体を含む溶液に浸漬し、結晶空隙への前駆体溶液の含浸を図った。

含浸処理後の結晶に対し、SEM-EDX による面分析を行ったところ、フェリチン結晶の断面全体から導入した金属成分由来のシグナルが観測された。また、TEM による像観察とその FFT 像から試料の結晶構造を評価した(図2)。加えて TEM-EDX による点分析により、TEM スケールでの元素分析を実施した。TEM スケールでも断面全体から導入した金属が観測されたことから、金属酸化物の導入は達成できたと考えられる。最後に、金属酸化物を導入したフェリチン結晶を焼成し、フェリチン成分の除去を図った。金属酸化物を導入していない試料(架橋処理したフェリチン結晶)では、フェリチンが内包する鉄成分が凝集して、鉄由来の強いシグナルが観測されたのに対し、金属酸化物を導入した試料については、鉄の凝集が抑制されたという結果が得られた。これは、金属酸化物の存在により、鉄の凝集が抑制されたものと思われる。しかし、焼成後の試料の TEM 像から規則構造を観測するには至らなかった。

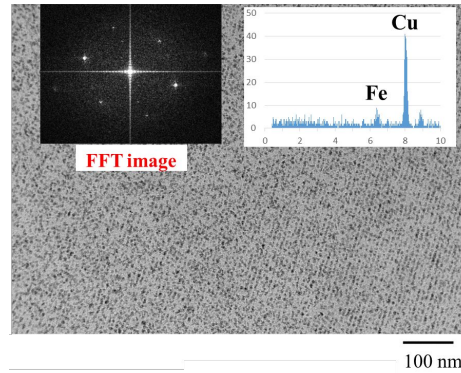


図2 架橋処理したフェリチン結晶の TEM-EDX による断面観察像。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. 山田 洋平, 鈴木 崇仁, 岡田 英理子, 高柳 俊夫, 鈴木 良尚, 村井 啓一郎, 藪谷 智規, タンパク質結晶成長場及びX線回折実験用試料固定材としてのトラックエッチドメンブレンフィルターの利用, 分析化学, 査読有, 印刷中
2. Y. Yamada, S. Toyama, T. Yabutani, Effects of solvents on the crystal structure of cross-linked lysozyme crystals, International Journal of Modern Physics B, 査読有, 32(19) (2018)
3. 山田 洋平, 耐熱性酵素・タンパク質結晶を基盤とするバイオセンシング材料の開発, 分析化学, 査読有, 65(4) 229-230 (2016)

[学会発表](計4件)

1. 山田 洋平, 過酸化水素を溶離液とした水酸化ランタン共沈殿からの金属回収 / タンパク質結晶の鋳型材料への応用, 第11回中四国若手 CE 合宿, 2017年8月31日, かんぼの宿(徳島県徳島市)
2. Y. Yamada, T. Yabutani, Investigation of solvent effects on crystal structure of cross-linked lysozyme crystals, the 8th International Conference on Advanced Materials Development and Performance, 2017年7月12日, University of Pune (India, Pune)
3. 山田 洋平, 岡田 英理子, 鈴木 良尚, 藪谷 智規, トラックエッチドメンブレンフィルター内でのリゾチーム結晶成長と構造解析, 第77回分析化学討論会, 2017年5月28日, 龍谷大学深草学舎(京都府京都市)
4. 山田 洋平, 岡田 英理子, 鈴木 良尚, 藪谷 智規, トラックエッチドメンブレンフィルター孔内で成長したリゾチーム結晶の単結晶 X線構造解析, 第76回分析化学討論会, 2016年5月28日, 岐阜薬科大学(岐阜県岐阜市)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 藪谷 智規

ローマ字氏名: Yabutani Tomoki

所属研究機関名：愛媛大学
部局名：紙産業イノベーションセンター
職名：教授
研究者番号（8桁）：80335786

研究分担者氏名：鈴木 良尚
ローマ字氏名：Suzuki Yoshihisa
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院社会産業理工学研究部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60325248

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。