

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：52101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05024

研究課題名(和文) 局在光散乱による局所領域におけるタンパク質凝集・結晶化の分析技術開発

研究課題名(英文) Development of analysis technology for protein aggregation and crystallization in near-field area using localized light scattering

研究代表者

若松 孝 (WAKAMATSU, Takashi)

茨城工業高等専門学校・国際創造工学科・教授

研究者番号：80220838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質結晶の作製は、タンパク質構造解析上のボトルネックである。本研究では、全反射エバネッセント光励起下における前方小角散乱光計測システムを開発し、結晶化溶液の液滴におけるタンパク質の凝集・結晶化を調査した。その結果、微量の液滴サンプルでタンパク質の凝集化プロセスを高感度に分析できることが判明し、タンパク質の結晶化スクリーニングや結晶作製で頻繁に使用される、ハンギングドロップ蒸気拡散法に適した分析法であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の構造解析は、タンパク質を主原料とする機能性食品、化学、化粧品や医薬品などの研究開発で重要なデータベースとなるが、構造解析に必要な良質のタンパク質結晶作製がボトルネックである。本研究では、タンパク質結晶化のスクリーニングや結晶作製で頻繁に使用される、タンパク質液滴を用いるハンギングドロップ蒸気拡散法に適するタンパク質凝集・結晶化分析法として、局在光である全反射条件下のエバネッセント光励起による前方光散乱計測技術を提案し、その実証試験を行った。結晶化モデルタンパク質のリゾチームの液滴に対して、高感度に凝集化分析が行えることが判明し、当開発技術の有用性が分かった。

研究成果の概要(英文)：In protein crystallography, the crystallization of proteins is a main bottleneck. We have developed a method and an apparatus for measuring forward light scattering at small angle, induced by an evanescent wave under a total reflection, and evaluated protein aggregation in pre-crystallization for a protein solution droplet. The demonstration shows that the developed apparatus sensitively detects the aggregation process. This provides an analytical method suitable for a hanging-drop-vapor-diffusion technique that is frequently used for screening and production of protein crystals.

研究分野：応用物性

キーワード：タンパク質結晶 タンパク質凝集 エバネッセント光 光散乱 液滴 ハンギングドロップ蒸気拡散法

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の結晶構造解析は、抗体タンパク質等の診断薬をはじめ、タンパク質を活用した治療薬、機能性食品や化粧品などの研究開発において重要である。しかしながら、依然としてその結晶化機構の統一した原理は確立されてはならず、タンパク質の結晶作製は、試行錯誤で行われているのが現状であり、タンパク質構造解析のボトルネックとなっている。このため、高感度かつ高精度のタンパク質結晶化分析法の確立、及びタンパク質結晶の効率的で高品質な作製技術の開発が求められている。

研究代表者は、これまでにタンパク質結晶化溶液の低角度レーザ光前方散乱($\theta_s < 8^\circ$)が、タンパク質の凝集体形成に極めて高感度であることを見出し[1]、散乱角スキャン方式の前方光散乱計測によるタンパク質凝集・結晶化分析装置を開発した[2]。また、透明導電膜電極を用いて生成結晶の顕微鏡観察可能な小型結晶化溶液セルを考案し、低電圧印加(数ボルト)でタンパク質(リゾチーム, ソーマチン)の結晶化促進効果を実証している[3,4]。さらに、開発の分析装置を用いて電場印加状態で、リゾチームの凝集・結晶化促進の様子を捉えることに成功した[5,6]。これまでに、結晶化へ向かうタンパク質溶液の前方静的光散乱(F-SLS)の放射パターンが、非整数のべき乗則となることを見出し、結晶化前段階で自己相似フラクタル凝集体が形成されることを明らかにしている[7]。これまでの研究から、タンパク質の結晶化では、添加塩や電場印加によって結晶化前に、密な構造をもつフラクタル凝集体(フラクタル次元 $D > 1.5$)を形成すること、密な構造のフラクタル凝集体の形成は、添加塩に含まれるイオン種や塩添加後の時間、電場印加時間等に依存することが分かってきた[1,3-7]。

上記の研究では、タンパク質と結晶化剤の濃度一定(初期)にしたバッチ法の溶液試料を対象にしていたが、一般にタンパク質の結晶化スクリーニング、及び結晶作製では、蒸気平衡下で結晶化させるハンギングドロップ蒸気拡散法がむしろ広く用いられている。従って、微量な液滴を対象にした、タンパク質凝集・結晶化分析法の確立が急務となっている。さらにタンパク質結晶は、溶液内部よりもむしろ溶液セルの内壁付近で成長する場合が多く、従って、溶液内部での凝集体だけでなく、結晶化に活性な溶液界面付近における凝集体形成に関する詳細な情報が特に必要である。

このような課題を解決するには、光散乱による凝集体分析において、液中を伝搬する通常の光照射ではなく、溶液界面に局在する全反射エバネッセント光を用いれば、溶液界面付近におけるタンパク質凝集体による前方散乱光を抽出できることになる。エバネッセント光は、微小領域で増強した光の場であるために、微量物質に対して高感度な分析となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、局在光のエバネッセント光を用いて、微小領域におけるタンパク質凝集体の形成(結晶化前段階)を高感度にその場分析できる技術を開発し、微量溶液サンプルに対して、結晶化に活性な溶液界面近傍における、タンパク質の凝集・結晶化過程を追跡・評価することである。モデルタンパク質を対象に、タンパク質液滴を扱うハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化分析を目標にした。タンパク質結晶化溶液の界面近傍に全反射エバネッセント光を発生させ、光波長オーダー領域の微小領域における前方散乱光を計測・解析する装置を開発し、溶液界面近傍で形成されるタンパク質凝集化を分析した。

3. 研究の方法

(1) 測定原理

図1に示すように、屈折率の大きな媒質(屈折率 n_1)から小さい媒質(n_2)へ、光が臨界角度 θ_c 以上で界面に入射すると全反射し、屈折率の小さい媒質(n_2)側には、界面から指数関数的に減衰するエバネッセント光(消衰波, EV 光)が浸出する。界面からの距離 z に対して、電場強度は次のように与えられる。

$$E^2(z) = E(0)^2 e^{-\frac{2z}{d_p}} \quad (1)$$

ここで、浸出長 d_p は次式で表される。

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad (2)$$

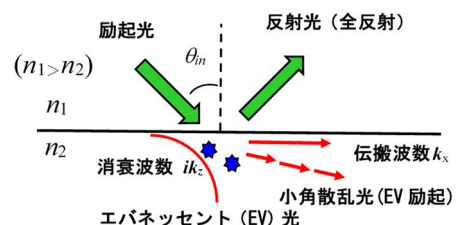


図1 全反射エバネッセント光励起光散乱

エバネッセント光の存在領域にある微粒子や凝集体のような散乱体によって、光散乱が発

生ずる。特に全反射エバネッセント光励起下における低角度の前方散乱光は、タンパク質などの溶解状態から形成される凝集体に対して高感度であり、これを計測することによって、局所領域（マイクロメートルオーダー）におけるタンパク質の凝集体形成を高感度・高精度に捉えることができる。

(2) 開発装置

初めに開発した測定システムは、図 2(a)に示すように 60°正三角形プリズム(BK-7, 25×25×25 mm)と液滴サンプルの界面近傍に全反射エバネッセント光を励起して、液滴中の微粒子や凝集体からの散乱光を、コリメートレンズを介してリニアアレイタイプの CCD 光検出器(1024×122 ピクセル)により検出する。光源には、波長 543 nm の緑色 DPSS レーザ(ビーム径約 1 mm, 25 mW)を用いた。撥水処理した薄い円形ガラスプレート(直径 22 mm, $t = 0.15$ mm)を屈折率接合オイルで三角プリズムの底面に貼り付け、サンプル液滴(< 20 μ L)を撥水ガラスプレートに附着させた。プリズム側から全反射角度以上の入射角約 62°でレーザ光をプリズム底面に照射して、液滴中に全反射エバネッセント光を発生させた。ここで、ガラスプリズム/液滴(水)の全反射臨界角度 θ_c は、 $\lambda = 543$ nmで BK-7 ガラス $n_1 = 1.5195$ 、水 $n_2 = 1.333$ より、 $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1) = 61.3^\circ$ である。また、プリズムを通して液滴への入射角が $\theta = 62^\circ$ の場合、式(2)よりエバネッセント光の浸出長 $d_p = 279$ nmである。

図 2(a)の測定装置では、全反射エバネッセント光励起下における低角度の前方静的光散乱(F-SLS)の散乱角分布($I_s - q$)を計測する。ここで、 q は散乱ベクトルである。さらにこの測定系では、F-SLS 測定データには散乱光の空間分布以外にも CCD 光検出の時間スキャンにより、散乱体のブラウン運動による動的散乱成分が含まれるため、その有用性についても解析検討を行った。

次に、全反射エバネッセント光励起下における前方動的散乱(F-DLS)を計測するために、図 2(a)の散乱光検出部を図 2(b)に示すように変更した。すなわち、CCD 光検出器を小型固体光電子増倍管(PMT)に変更し、光検出器への散乱光導入をコリメートレンズから 2 枚組絞り素子に替えた。光電子増倍管からの増幅した散乱光信号をストレージオシロスコープに取り込み、散乱光強度の時間的変動測定やその周波数解析を行った。

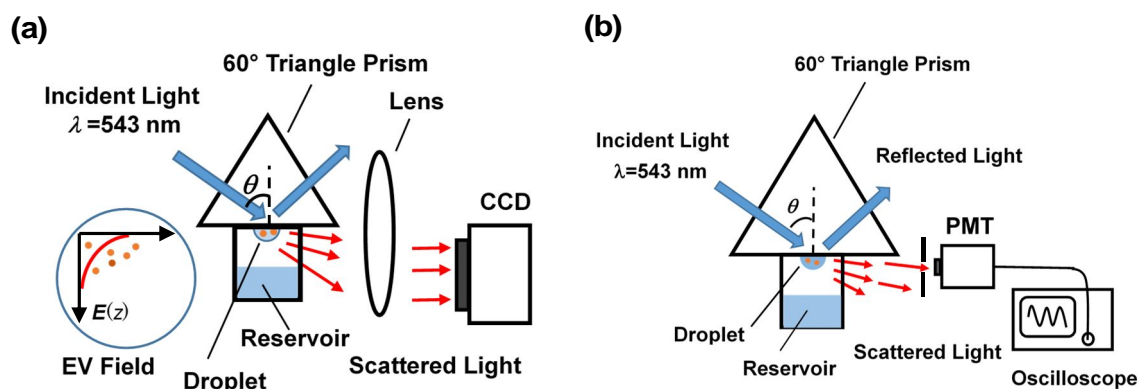


図 2 開発装置の構成 (a) F-SLS 測定用 (b) F-DLS 測定用

(3) 測定サンプル

初期開発の測定システム(図 2(a))の動作や性能を調べるために、ここでは、標準粒子のシリカ粒子(NIST 規格サイズ $0.49 \pm 0.02 \mu\text{m}$, $\lambda = 589$ nm で屈折率 $n = 1.43$, 密度 2.0 g/cm^3)を純水に分散させたサンプル(3.33 mM)を使用した。また、結晶化モデルタンパク質には、ニワトリ卵白リゾチーム(Hen-egg White Lysozyme: HEWL)を用いた。Hampton Research (USA)社から購入した高純度(3 回結晶化)の HEWL を精製せずに使用した。HEWL を pH 調整した酢酸-酢酸 Na 緩衝液(0.05 M, pH 4.57)に濃度 90 mg/ml で常温で溶かし、また結晶化剤の塩化ナトリウムを同種緩衝液に 15 % (wt/v)で溶かした。3 種類の試料液、すなわち、光散乱測定直前に HEWL 溶液、NaCl 溶液、及び緩衝液を適宜の比率で混合させて測定サンプルとして使用した。室温でのバッチ法によるリゾチーム結晶化条件については、引用文献[7]を参照されたい。

(4) 測定データの解析法

散乱体の静的光散乱(SLS)の散乱角分布($I_s - q$)からは、散乱体の構造(密度)に関する情報が得

られる[6,7]。一方、動的光散乱(DLS)の時間的揺らぎから、散乱体の運動(移動度)に関する情報が得られる。さらに、DLS 解析で散乱体が球形モデルと想定すれば、そのサイズ(回転半径)を見積もることが可能である。ここでは、出来るだけ、対象散乱体のモデル仮定の導入を避け、計測データのみに基づいて全反射エバネッセント光励起下における前方散乱光特性の本質を調査するために、サイズの評価は行わずに DLS データの周波数パワースペクトル解析までに留めた。

4. 研究成果

まず、初期開発の測定システム(図 2(a))の動作や性能を調べるために、ここでは標準粒子のシリカ粒子(NIST 規格サイズ $0.49 \pm 0.02 \mu\text{m}$)を純水に分散させたサンプル(3.33 mM)を使用した。シリカ粒子を含む液滴と含まない液滴サンプルと比較した結果の一例を図 3 に示す。ここで、全反射臨界角以上の入射角 $\theta = 62.5^\circ$ でレーザー光を液滴サンプルへ照射し、液滴はセルで封止せずリザーバー液無し状態で液滴からの蒸発を考慮して速やかに散乱光測定を行った。シリカ粒子を含む液滴の場合、粒子を含まないサンプルに比べて約 2.5 倍、光散乱強度が高い。しかもこれは、透過光の垂直入射で測定した同濃度のシリカ粒子サンプル(溶液セルの光路長 1 mm)よりも 1 桁、散乱強度が大きく、全反射エバネッセント光励起による光散乱が液滴のような微量サンプルに対して高感度であることが分かった。さらに、明らかにシリカ粒子による光散乱シグナルの変動(DLS 成分)も大きい(図 3)。この光散乱の変動成分について、CCD 光検出器の検出走査時間から、周波数パワースペクトルを解析したところ、主に 1~20 kHz の高周波帯に分布している。使用したシリカ粒子のサイズから予測される DLS の周波数パワースペクトルは、10 Hz 程度と低周波域であるのに対して、帯域が高い応答を示している。これは、シリカ粒子間の多重光散乱の影響などが原因と考えられる。

図 3 に示すように、狭い散乱角度($2\text{--}12^\circ$)で測定したシリカ粒子の F-SLS は、散乱角度に対してほぼ一定で、特徴的な空間的パターンは現れない。低濃度のシリカ粒子は分散した状態であり、凝集体のような構造を形成されていないことが確認できる。

次に、図 2(b)に示す全反射エバネッセント光励起下における F-DLS の計測システムを使用して、タンパク質の凝集体形成を調べた。測定には、リゾチームの結晶化相図上で準安定領域の溶解域側付近の濃度条件の結晶化溶液を用い、塩添加後の全反射下における液滴サンプルからの前方動的散乱光の経時変化をストレージオシロスコープで信号観察を行った。室温 20 のバッチ法でリゾチームが数日後に結晶化する条件 HEWL 濃度 30 mg/ml, 4%(wt/v) NaCl と、結晶化しない NaCl 3%(wt/v)の場合で比較した。なお、リザーバー液無しで液滴からの蒸発を防止するために、サンプルを角セルで封止した状態で散乱光測定を行った。測定液滴からの前方散乱角度は $3\text{--}5^\circ$ であった。

どちらの場合でも、結晶化剤の塩添加後から散乱光の揺らぎが観察された。この散乱光の揺らぎは、塩添加

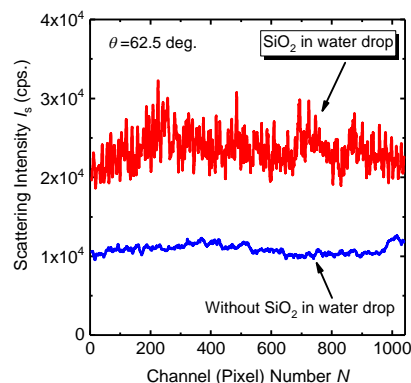


図 3 初期開発装置で測定したシリカ粒子の光散乱特性

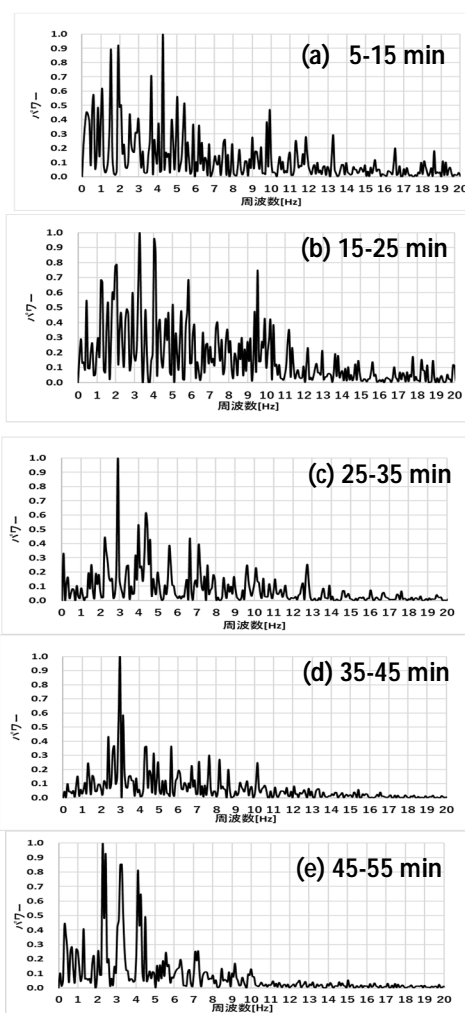


図 4 F-DLS の周波数パワースペクトル分布の経時変化(リゾチーム液滴)

無しの HEWL 単体の液滴の場合に比べて 2 桁以上大きく、リゾチーム凝集体形成によるものである。塩添加後約 5 分から計測して得られたデータを 10 分間ごとに連結して、一群の測定データに対してフリーエ解析を行った(図 4)。ここで、各解析データで周波数パワースペクトルの最大値で規格化して表示しているため、異なる時間群間のパワースペクトルの相対値の比較は出来ないことに注意する。実際、塩添加後の初期過程における DLS 成分(揺らぎ)は非常に小さく、従って、他の時間群に比べて 1 桁以上、スペクトル値は小さい。経過時間とともに、10Hz 以上の高い周波数領域のパワースペクトル成分が減少し、スペクトル分布が全体的に低周波へシフトしている様子が分かる。つまり、この結晶化条件(室温)の試料では、塩添加後、35~55 分後に F-DLS パワースペクトル分布がより低周波(10 Hz 以下)へシフトしている(図 4(d), (e))。これは、塩によるリゾチームタンパク質が凝集化して密な構造で凝集体サイズが大きくなり、ブラウン運動が穏やかに経時変化しているプロセスを捉えていることが分かる。ここで、塩添加後 15 分までの解析データに出現している 0~2 Hz の揺らぎの信号強度が極端に小さいため、すなわち SN 比の関係から出現したと考えられ十分に無視できる。

タンパク質結晶化溶液の微量な液滴に対して、全反射エバネッセント光励起下における前方小角散乱光計測システムを開発し、結晶化モデルタンパク質のリゾチームの凝集・結晶化のプロセスを調査した。サンプルセルを水平に設置し、ガラスプリズム/液滴の全反射条件下で液滴界面にエバネッセント光を発生させ、低角度(3~5°)における動的散乱(DLS)をリアルタイムで経時的に計測した。結晶化剤 NaCl を含むリゾチーム結晶化溶液の液滴に対し、結晶化剤添加直後から全反射エバネッセント励起の前方動的散乱光(F-DLS)測定を行い、F-DLS の時間系列データ群の周波数パワースペクトル解析を評価した。光散乱強度の増加を伴いパワースペクトル分布が低周波へシフトしていることから、リゾチーム凝集体のサイズがより大きくなり、より密な凝集体構造を形成したことが判る。

本研究により、開発した全反射エバネッセント光励起による F-DLS 計測システムが、微量液滴サンプルでタンパク質の凝集・結晶化を高感度に分析できることが判明し、タンパク質結晶化で頻繁に使用されるハンギングドロップ蒸気拡散法に適した分析法であることが分かった。

引用文献

- [1] T. Wakamatsu, *Appl. Phys. Lett.* **98**, 263701 (1-3) (2011).
- [2] 若松, 丸山, 大西, 特許第 5821127 号
- [3] T. Wakamatsu and Y. Ohnishi, *Jpn. J. Appl. Phys.* **50**, 048003 (1-2) (2011).
- [4] T. Wakamatsu, *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **41**, 13-15 (2016).
- [5] T. Wakamatsu S. Toyoshima, and H. Shimizu, *Appl. Phys. Lett.* **99**, 153701(1-3) (2011).
- [6] T. Wakamatsu, *Rev. Sci. Instrum.*, **86**, 15112 (1-8) (2015).
- [7] T. Wakamatsu, *Am. J. Anal. Chem.* **5**, 581-588 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Wakamatsu, Takashi Onoda, and M. Ogata	4. 巻 57
2. 論文標題 Time-resolved forward-light-scattering monitoring of protein-lysozyme aggregation in precrystalline solutions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 058003(1-3)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.7567/JJAP.57.058003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾形慎、小野田崇司、若松孝
2. 発表標題 糖鎖-レクチン架橋複合体形成反応のリアルタイム観察
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会(第68回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若松孝、田中大輔、尾形慎
2. 発表標題 液滴対象の全反射エバネッセント散乱光測定装置の開発
3. 学会等名 第28回電気学会東京支部新潟支所研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾形慎、小野田崇司、若松孝
2. 発表標題 前方光散乱瞬時測定による糖鎖 - レクチン架橋反応のリアルタイム観察
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣戸雄大、若松孝、尾形慎、田中大輔
2. 発表標題 液滴対象のエバネッセント散乱光溶液セルの試作
3. 学会等名 電気学会九州支部第9回高専研究講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若松孝、小野田崇司、尾形慎
2. 発表標題 前方光散乱瞬時測定によるリゾチーム凝集・結晶化のキャラクタリゼーション
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若松孝
2. 発表標題 Effects of Salts on Lysozyme Pre-Crystalline Aggregation Evaluated by Forward Light Scattering Method
3. 学会等名 第27回MRS-Japan 2017年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尾形 慎 (OGATA Makoto) (10532666)	福島工業高等専門学校・化学・バイオ工学科・准教授 (51601)	

