

平成22年 6月 2日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19760009
 研究課題名(和文) 高圧力下のステップ前進速度のその場測定による分子取り込み過程の活性化体積の研究
 研究課題名(英文) Studies on the activation volume of an incorporation process by in situ measurements of step velocities under high pressure
 研究代表者
 鈴木良尚 (SUZUKI YOSHIHISA)
 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部・講師
 研究者番号：60325248

研究成果の概要(和文)： グルコースイソメラーゼ結晶のステップ前進速度の圧力依存性を測定し、ステップカイネティック係数を求めることができた。その活性化体積は負の値をとった。

研究成果の概要(英文)： Effects of pressure on the step kinetic coefficients of glucose isomerase crystals were determined by in situ observation of growing step of the crystals under high pressure. An activation volume of glucose isomerase crystals took a negative value.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・応用物性・結晶工学

キーワード：結晶成長

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで「**タンパク質の結晶成長に及ぼす圧力効果**」の研究を行ってきた。これは、主に加圧によるタンパク質の結晶化の促進効果を解明し、未結晶化タンパク質の結晶化実現に資するという目的の研究テーマであったが、「**巨大成長ユニットの結晶成長**」という観点で見つめなおすと、結晶成長機構の基礎的な側面を明らかにできる可能性を秘めていることが分かってきた。特に高圧力下における結晶表面の分子ステップの

運動が、タンパク質分子の巨大さゆえに光学的に明らかにできるようになったことから、キンク位置における分子取り込み過程の**活性化体積**という、従来の手法では得られない重要な情報が得られるのではないかということに着想した。キンク位置における分子の取り込み過程は、結晶成長の素過程である。その素過程を活性化エネルギーのみではなく、活性化体積を使って考察することは、例えば水分子がいくつ脱水和することによって反応が進むかといった具体的なデータで

議論が出来ることに相当する。もちろんここまで詳細なデータが議論できれば、元に戻って「タンパク質の結晶化に及ぼす圧力効果」を明らかにするのも役立つデータになることは間違いない。

2. 研究の目的

H19年度は、グルコースイソメラーゼ (GI) 結晶を用いて、ステップ前進速度の圧力依存性を、本学共通機器の共焦点微分干渉顕微鏡 LCM-DIM を用いて測定すること。また、新たに購入する予定の位相差顕微鏡 PCM による結晶表面のステップ観察技術、まず常圧下において確立することを目的とした。

H20年度以降は、LCM-DIM と PCM を併用して結晶表面のステップ観察を行うとともに、PCM の高圧力下での観察技術確立を目指した。これを出来るだけ早期に実現し、GI 結晶の活性化体積および活性化エネルギーの測定をまとめることを目的とした。その後は、タンパク質中最も基礎データが豊富なニワトリ卵白リゾチーム正方晶系結晶 (t-HEWL) における同様の測定を行い、さらに高圧力下で酵素活性が促進される α -キモトリプシン (α -CHT)、高圧力下で安定な分子構造を大きく変えることがわかっているユビキチン (UB) について同様の測定を行うことを目的とした。

以上の測定により、全研究期間内に上記 **4種類**のタンパク質のステップカイネティクスをその場観察し、**分子の取り込みの活性化エネルギーおよび活性化体積**を求めるところを目標とした。

3. 研究の方法

上記 LCM-DIM、PCM を用いた、タンパク質結晶表面のステップの前進速度の濃度・温度・圧力依存性を測定して、活性化体積を求めると同時に、その温度依存性および活性化エネルギーの圧力依存性を明らかにする。

4. 研究成果

結局、GI 結晶に関してのみの結果までしか得られなかったが、ステップ前進速度 V の濃度依存性のグラフ (図1) から、圧力とともにステップ前進速度が速くなることが明らかになり、その濃度 C に対する依存性および $C - C_e$ に対する依存性 (C_e は GI の溶解度) も大きくなることが分かった。ステップ前進速度 V と、 $C - C_e$ の間には、以下のような関係式が成り立つ。

$$V = \beta_{st} \Omega (C - C_e) \quad (1)$$

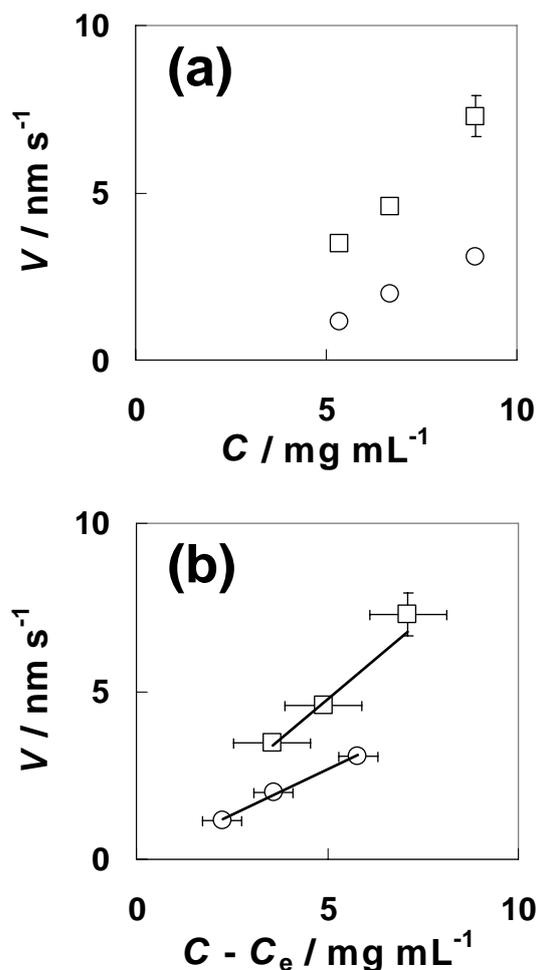


図1. GI 結晶の{011}面のステップ前進速度 V 。(a)GI 濃度 C に対するプロット。(b) $C - C_e$ に対するプロット (C_e は GI の溶解度)。 V は、0.1 MPa (○) と 50 MPa (□) の元で測定した。温度は 25.0 °C であった。(b)の直線は、重みつき直線近似による結果を示している。

ここで、 Ω は結晶中の分子が占める体積、 β_{st} はステップカイネティック係数を示す。(1)式から計算される β_{st} は、0.1 MPa で $(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-7} \text{ m s}^{-1}$ 、50 MPa で $(5.7 \pm 0.9) \times 10^{-7} \text{ m s}^{-1}$ となることがわかった。ここまでの結果は、Suzuki et al. Crystal Growth & Design, Vol. 9, 2009, 4289 として原著論文化することができた。

実験の難易度が高く、なかなか結果が出なかったが、最終的に成功したのは、高圧容器内の溶液の完全な置換のため、一度導入した内部セル様式をやめ、セル内部を一回ごとに洗浄・乾燥後に新たな試験溶液を注入する方式を導入したことによる。しばらくの間導入していた内部セル様式では、圧漏れによる試料流出などを防ぐことはできたが、溶液の完全な交換に難があり、再現性のある濃度依存性を取ることができなかった。しかし、新方

式では、圧漏れ対策を十分に行うことでうまくいった。

ステップカインエティック係数 β_{st} の圧力依存性から、(2)式によって、活性化体積 ΔV^\ddagger が計算される。

$$\partial \ln \beta_{st} / \partial P = -\Delta V^\ddagger / RT \quad (2)$$

計算の結果、 $\Delta V^\ddagger = -28 \pm 8 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ となった。この結果と、溶解度の圧力依存性から得られる結晶化に伴うモル体積変化 $\Delta V = -60 \pm 40 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ とをあわせると、活性化体積がちょうど結晶化に伴うモル体積変化の半分程度になることが分かった(図2)。

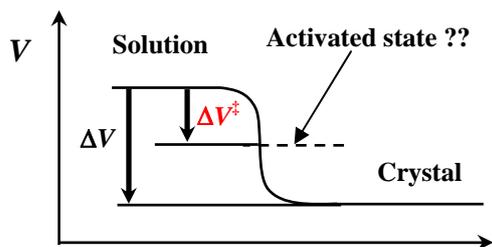


図2. 活性化体積と、溶解に伴うモル体積変化の模式図。GIは、結晶化に伴うモル体積変化の半分程度の負の値を結晶化の活性化体積として持つ。

このようにして得られた活性化体積を定量的に評価するために、高圧力下の結晶構造解析は必要不可欠である。そのための準備として、まず自立型圧力インジケータつき高圧力下X線散乱測定セルを新たに作製した(図3)。

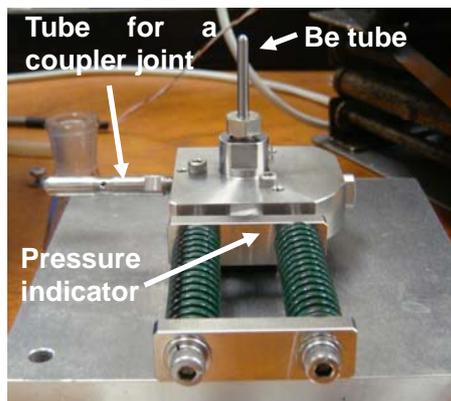


図3. 自立型圧力インジケータつき高圧力下X線散乱測定セル。Be製のサンプルチューブ中にキャピラリーチューブを入れて、液圧によってキャピラリー内壁に結晶化したタンパク質結晶を高圧力下でその場X線結晶構造解析する装置。

このセルは、バルブを締め切った後、カップジョイントから加圧装置からのチューブをはずした後も、 $100 \pm 1 \text{ MPa}$ の圧力を24時

間以上保持することができた。この高圧力セルを用いて、常圧下で育成した0.5 mmサイズのGI結晶について、高圧力下その場構造解析を実施した。その結果、2Å程度の高い分解能のdiffractionを0.8 kWという比較的弱いX線源を使うことによって得ることができた(図4)。ビームの強度を抑えることは、タンパク質分子が水分子と水和構造を形成しているままで、常温の状態でも構造解析をするために必要不可欠であるが、このセルを用いることによって、それが可能となった。

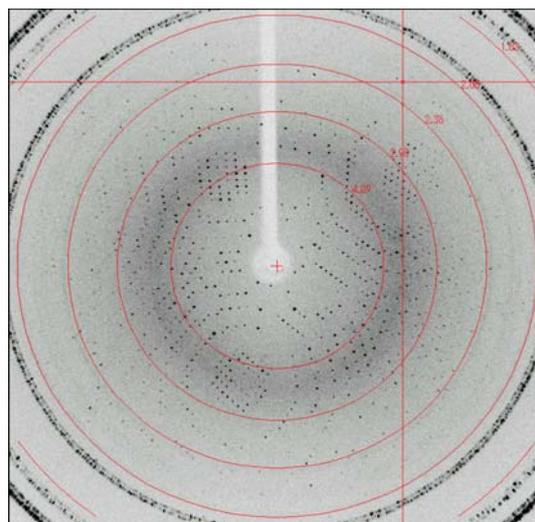


図4. 自立型高圧力下X線散乱測定セル中のGI結晶の振動写真。リングは多結晶性のBe tubeからの回折によるもの。中心付近の回折斑点が、GI結晶の回折によるもの。2Å程度の分解能を示す円形のライン当たりまで、回折斑点が出ている様子が分かる。

この回折点を解析することによって、高圧力下でのmonomerの圧縮が明らかになった(図5)。

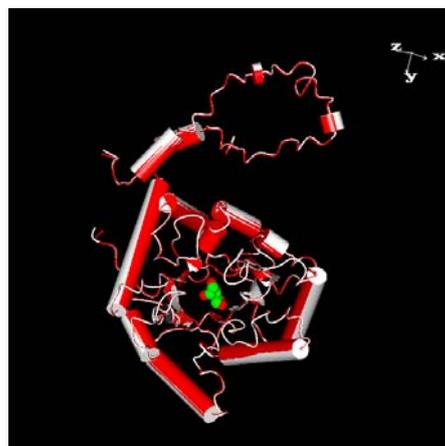


図5. GIのモノマー分子間の構造比較。常圧の構造(白)に対する100 MPa下における構造(着色)の模式図。全体的に収縮している。

更に、monomer 間の配置から、tetramer 内の圧縮と tetramer 間の距離の収縮を明らかにすることができた。

この結果は、高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー 第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム抄録集、査読有 Vol.2, 2008, 29.にまとめ、現在、Journal of Crystal Growth に投稿準備中である。

そして、今後の展開のため、ステップの前進・後退を観察することによる、迅速・高精度溶解度測定法を確立した。この結果は、Fujiwara et al., Journal of Physics Conference Series, 査読有 Vol.215, 2010, 012159. としてまとめている。

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4件)

- (1) Takeshi Maruoka, Yoshihisa Suzuki and Katsuhiro Tamura : Effects of High Pressure on the Three-Dimensional Nucleation Rates of Glucose Isomerase Crystals, Journal of Physics Conference Series, 査読有 Vol.215, 2010, 012158.
- (2) Takahisa Fujiwara, Yoshihisa Suzuki, Gen Sasaki and Katsuhiro Tamura : Solubility measurements of protein crystals under high pressure by in situ observation of steps on crystal surfaces, Journal of Physics Conference Series, 査読有 Vol.215, 2010, 012159.
- (3) Yoshihisa Suzuki, Gen Sasaki, Masamitsu Matsumoto, Makoto Nagasawa, Kazuo Nakajima and Katsuhiro Tamura : First Direct Observation of Elementary Steps on the Surfaces of Glucose Isomerase Crystals under High Pressure, Crystal Growth & Design, 査読有 Vol.9, 2009, 4289.
- (4) 塚本 雅之, 鈴木 良尚, 櫻庭 春彦, 田村 勝弘 : 高圧力下で成長したグルコースイソメラーゼ結晶の常圧下での X 線結晶構造解析, 高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー 第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム抄録集, 査読有 Vol.2, 2008, 29.

[学会発表] (計14件)

- (1) 鈴木 良尚, 佐崎 元, 柳谷 伸一郎, 田村 勝弘 : グルコースイソメラーゼ結晶の結晶化素過程における活性化体積, NCCG-39 予稿集, 130 頁, 2009 年 11 月 13 日, 名古屋.
- (2) 藤原 貴久, 鈴木 良尚, 森 篤史, 柳谷

伸一郎, 田村 勝弘 : リゾチーム正方晶系結晶の外形変化とステップ速度から求めた溶解度の比較, NCCG-39 予稿集, 9 頁, 2009 年 11 月 12 日, 名古屋.

- (3) Takeshi Maruoka, Yoshihisa Suzuki and Katsuhiro Tamura : Effects of High Pressure on the Three-Dimensional Nucleation Rates of Glucose Isomerase Crystals, International Conference on High Pressure Science and Technology AIRAPT-22, 2009 年 7 月 30 日, 東京.
- (4) Takahisa Fujiwara, Yoshihisa Suzuki, Gen Sasaki and Katsuhiro Tamura : Solubility measurements of protein crystals under high pressure by in situ observation of steps on crystal surfaces, International Conference on High Pressure Science and Technology AIRAPT-22, 2009 年 7 月 29 日, 東京.
- (5) 内田 直祐, 鈴木 良尚, 田村 勝弘 : 正方晶系リゾチーム結晶のステップ前進速度に及ぼす pH の効果, 2008 日本化学会西日本大会, 2008 年 11 月 15 日, 長崎.
- (6) 田中 孝典, 鈴木 良尚, 田村 勝弘 : 共焦点微分干渉顕微鏡を用いたリゾチーム単斜晶系結晶表面のステップ前進速度の測定, 第 38 回結晶成長国内会議, 2008 年 11 月 4 日, 仙台.
- (7) 藤原 貴久, 鈴木 良尚, 田村 勝弘 : リゾチーム正方晶系結晶の外形・表面のその場観察による溶解度測定法, 第 38 回結晶成長国内会議, 2008 年 11 月 4 日, 仙台.
- (8) Yoshihisa Suzuki, Gen Sasaki, Masamitsu Matsumoto, Makoto Nagasawa, Kazuo Nakajima and Katsuhiro Tamura : Effects of pressure on the step velocity, two-dimensional nucleation rate and solubility of glucose isomerase crystals, 5th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2008 年 9 月 17 日, San Diego.
- (9) Takahisa Fujiwara, Yoshihisa Suzuki and Katsuhiro Tamura : Solubility measurements by in situ observation of the steps of tetragonal lysozyme crystals under high pressure, 5th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2008 年 9 月 16 日, San Diego.
- (10) Masayuki Tsukamoto, Yoshihisa Suzuki, Haruhiko Sakuraba and Katsuhiro Tamura : X-ray structure analysis of glucose isomerase crystals prepared under high pressure, Program and abstract book 5th International

Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2008年9月16日, San Diego.

- (11) 藤原 貴久, 鈴木 良尚, 田村 勝弘 : リゾチーム正方晶系結晶の三面角付近の観察による溶解度測定, 第37回結晶成長国内会議, 2007年11月6日, 札幌.
- (12) 塚本 雅之, 鈴木 良尚, 櫻庭 春彦, 田村 勝弘 : 高圧力下で成長したグルコースイソメラーゼ結晶の常圧下でのX線結晶構造解析, 第37回結晶成長国内会議, 2007年11月5日, 札幌.
- (13) 鈴木 良尚, 佐崎 元, 田村 勝弘 : 位相差顕微鏡によるグルコースイソメラーゼ結晶表面の分子ステップ観察, 第15回生物関連高圧研究会 20周年記念シンポジウム, 2007年9月7日, 横須賀.
- (14) 塚本 雅之, 鈴木 良尚, 櫻庭 春彦, 田村 勝弘 : グルコースイソメラーゼの三次元分子構造に及ぼす圧力効果, 第15回生物関連高圧研究会 20周年記念シンポジウム, 2007年9月6日, 横須賀.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木良尚 (SUZUKI YOSHIHISA)

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・講師

研究者番号 : 60325248

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :