

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656016

研究課題名(和文) タンパク質分子のコロイド結晶化

研究課題名(英文) Colloidal crystallization of protein molecules

研究代表者

鈴木 良尚 (SUZUKI, Yoshihisa)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60325248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、タンパク質結晶化を従来の塩析によってではなく、コロイド結晶化によって得ようという試みではじめられた研究である。コロイド結晶化は、一般的に斥力によって規則構造への相転移を起こすため、従来の塩析とは逆に脱塩をし、その後濃縮するという手法で結晶化を試みた。残念ながら、典型的なコロイド結晶を得ることはできなかったが、全く塩を用いずに塩析で得られたものと同等の結晶を得ることができた。また、液液相分離を経由した結晶成長を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：We tried to crystallize protein molecules not via conventional salting-out method but via colloidal crystallization method. Protein molecules were concentrated by centrifugal dialyztation against ultra-pure water or dilute aqueous HCl solutions. Unfortunately, we could not obtain typical colloidal crystals of protein. Instead, normal protein crystals without using conventional salting-out method. In addition, we also confirm novel crystallization processes via liquid-liquid phase separations.

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：コロイド結晶化 タンパク質結晶 遠心濃縮

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の結晶化の大多数は、種々の沈殿剤による引力的沈殿形成により行われている。

しかし、従来の引力的な結晶化法では結晶化できるタンパク質に限りがある。申請者はこれまで既結晶化タンパク質の結晶成長素過程の速度論的な研究を行ってきたが、分子表面に柔らかい糖鎖を有する糖タンパク質やリン脂質二分子膜中に浮かんでいる膜タンパク質など、構造の揺らぎ等が大きく、引力を利用した方法だけでは結晶化できないタンパク質については本質的な解決にならない。

もし、タンパク質分子を一定の間隔を保ちつつ斥力的に規則配列させられれば、分子構造の揺らぎ等があっても、構造解析を行える可能性がある。本研究では、申請者が行ってきたコロイド結晶化プロセス³をタンパク質の規則構造形成に応用しようと考えた。コロイド結晶では粒子間の斥力的相互作用により、粒子同士が非接触の状態でも規則的な構造を保持できる。

申請者は研究開始時まで、超濃厚リゾチーム溶液を用いて、上記の予備実験を行ってきた。その結果、(1)沈殿剤フリーの結晶化に成功し、(2)酸性溶液を乾燥した不定形固体で規則構造を示す回折斑点を得ていた。これらの間に本申請のゴールがあると考えていた。

2. 研究の目的

本研究ではまず、脱塩もしくは濃縮によるタンパク質結晶のコロイド結晶化法の確立を目的とした。その後、そのコロイド結晶を単結晶化することを目的とする。そこまで成功したら、単結晶の構造解析を行って3次元分子構造を解析することを目的とすることにした。

具体的には、脱塩・pH制御・濃縮によるタンパク質のコロイド結晶化法を確立する予定であった。そして次年度は、得られたコロイド多結晶を単結晶化する予定であった。そして最終年度は、コロイド単結晶を用いた分子構造解析を行い、格子間隔と分解能の比較考察を行うことを目標としていた。

3. 研究の方法

ニワトリ卵白リゾチーム(生化学工業)を用いて、水溶液を調製したのち遠心濃縮を行い、そこから先のコロイド結晶化を試みる。溶媒として超純水・0.001, 0.01 M HCl水溶液に溶かしたものを遠心濃縮器(Millipore, Amicon Ultra-4 3K)に入れ、冷却遠心機(Kubota, 6200(現有・徳島大学))で3回程度10倍ほどの濃縮を繰り返し行う

ことで脱塩し、分子間反発力を強める。その際、濃縮器は分子量3000で分画できるものを用いる。その後そのまま遠心濃縮をすることで超濃厚リゾチーム溶液が完成する。

予備実験において、この濃厚溶液($\sim 200 \text{ mgmL}^{-1}$)はpHによって異なる挙動を示した。25°Cで静置すると、超純水の濃厚溶液からは多数の針状結晶が成長した。0.001 M HCl水溶液の場合は、一部で結晶が少量晶出した。0.01 M HCl水溶液の場合は、全く結晶化しなかった。よって、針状結晶の溶解度はpHの減少に伴い増加することが分かった。この結晶は、明確なファセットを持ち、昇温で溶解したことから引力結晶の可能性が高いが、コロイド結晶の可能性も十分あるので、単結晶化・構造解析を行う。構造解析は連携研究者の櫻庭とともにX線振動写真(Rigaku, RAXIS VII)で行い、分子間の直接的な水素結合、および水分子を介した水素結合がなければコロイド結晶、あれば引力結晶と判断する。

実は遠心濃縮器を利用したタンパク質の結晶化については既に報告されている¹が、引力結晶として取り扱っていて、格子定数等の詳細な記述はない。また、沈殿剤濃度ゼロのリゾチーム結晶の溶解度も既に報告されている²、pHの減少による増加も報告されているが、結晶形、格子定数についての記述はない。したがって、構造解析によるコロイド結晶化の有無の確認が急務である。

一方、結晶が晶出しなかった0.01 M HCl水溶液の場合、予想していなかったことであるが、溶液をゆっくり乾燥させて得られた不定形固体の振動写真を撮影したところ、単結晶的な回折スポットを得ることができた。現時点では、詳細な分子構造の決定には使えないレベルの回折像ではあるが、不定形固体全体として均一な規則配列をしている可能性を十分に示している。乾燥前の溶液状態では回折スポットは見られなかったため、その乾燥・濃縮プロセスを追う過程で、分子間の距離の減少に伴う斥力の増加によって、コロイド結晶化による規則構造形成を追うことができると考えている。連携研究者の津下とともにX線振動写真(Rigaku, RAXIS VII)を撮影し、分子間の直接結合の有無により、コロイド結晶化の有無を判断する。

1. J.E. Pitts *Nature*, 1992, 355, 117.

2. P. Retailleau et al. *Biophys. J.*, 1997, 73, 2156.

4. 研究成果

遠心濃縮器を用い、超純水およびHCl水溶

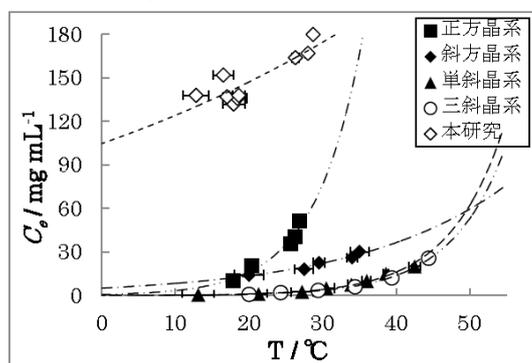
液中において遠心濃縮及び脱塩を行った結果、液液相分離を経て、結晶化を行うことができた。しかしながら、格子定数レベルで塩析による結晶化で得られた結晶との差異は見いだせなかった。すなわち、コロイド結晶化には残念ながら至らなかった。

そのかわり、コロイド結晶化を目指すプロセスで以下のような重要な知見を得ることができた。

- (1) 沈殿剤を使用せずに、遠心濃縮によって通常の結晶（引力結晶）を得ることができた。



- (2) このようにしてできた結晶の溶解度は塩析で得られたものに比べてけた違いに大きかった。



- (3) pH の変化によって、結晶形を制御することができた。
- (4) 遠心濃縮の際、タンパク質溶液が二相以上に液液相分離し、その中から結晶化が起こった。
- (5) 濃厚溶液相は非常に高粘度ながら多くの核生成を起こし、生成した結晶はファセットを持っていることから沿面成長を行っていることがわかった。

これらの結果については、日本結晶成長学会や日本物理学会等で数度報告しているが、本研究の期間終了後も継続研究中であり、現在投稿準備中の内容もあるため、これ以上詳細な内容についての掲載は見合わせる。

本研究課題を採択して戴き、貴重な予算を配分して戴いた日本学術振興会、並びに事務手続きなどに関して多大なる支援を戴いた徳島大学の事務職員の皆様に深く感謝申し上げます。

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13件)

- 1) Mamoru Fujine, Masahide Sato, Hiroyasu Katsuno and Yoshihisa Suzuki :
Effect of container shape and walls on solidification of Brownian particles in a narrow system,
Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics, Vol.89, p.042401, 2014, 査読有
- 2) Masahide Sato, Hiroyasu Katsuno and Yoshihisa Suzuki :
Ordering of Brownian Particles from Walls Due to an External Force,
Journal of Crystal Growth, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2014.01.074>, 2014, 査読有
- 3) Yoshihisa Suzuki, Atsushi Mori, Masahide Sato, Hiroyasu Katsuno and Tsutomu Sawada :
Colloidal crystallization on tilted substrates under gravitational fields,
Journal of Crystal Growth, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2013.11.101>, 2014, 査読有
- 4) Atsushi Mori, Yoshihisa Suzuki and Masahide Sato :
Gravitational Tempering in Colloidal Epitaxy To Reduce Defects Further,
Crystal Growth & Design, Vol.14, No.5, pp.2083--2086, 2014, 査読有
- 5) Izumi Yoshizaki, Katsuo Tsukamoto, Tomoya Yamazaki, Kenta Murayama, Kentaro Oshi, Seiji Fukuyama, Taro Shimaoka, Yoshihisa Suzuki and Masaru Tachibana :
Growth rate measurements of lysozyme crystals under microgravity conditions by laser interferometry,
Review of Scientific Instruments, Vol.84, pp.103707-1--103707-8, 2013, 査読有
- 6) Yoshihisa Suzuki, Gen Sazaki, Kaori Hashimoto, Takahisa Fujiwara and Yoshinori Furukawa :
Colloidal crystallization utilizing interfaces of unidirectionally growing ice crystals,
Journal of Crystal Growth, Vol.383, pp.67--71, 2013, 査読有
- 7) 鈴木 良尚, 佐崎 元, 藤原 貴久, 塚本 雅之 :
圧力を使ったタンパク質の結晶成長の研究,
日本結晶成長学会誌, Vol.40, No.2, 107

～114 頁, 2013 年, 査読有

- 8) **Masahide Sato, Hiroyasu Katsuno and Yoshihisa Suzuki** :
Crystallization of Brownian Particles from Walls Induced by a Uniform External Force,
Journal of the Physical Society of Japan, Vol.82, No.8, pp.084804-1--084804-8, 2013, 査読有
- 9) **Atsushi Mori and Yoshihisa Suzuki** :
Vanishing linear term in chemical potential difference in volume term of work of critical nucleus formation for phase transition without volume change,
Journal of Crystal Growth, Vol.375, No.1, pp.16--19, 2013, 査読有
- 10) **Atsushi Mori and Yoshihisa Suzuki** :
Grand potential formalism of interfacial thermodynamics for critical nucleus,
Natural Science, Vol.5, No.5, pp.631--639, 2013, 査読有
- 11) **Masahide Sato, Hiroyasu Katsuno and Yoshihisa Suzuki** :
Formation of a crystal of Brownian particles under a uniform external force,
Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics, Vol.87, No.3, p.032403, 2013, 査読有
- 12) **Kaori Hashimoto, Atsushi Mori, Katsuhiro Tamura and Yoshihisa Suzuki** :
Enlargement of Grains of Silica Colloidal Crystals by Centrifugation in an Inverted-Triangle Internal-Shaped Container,
Japanese Journal of Applied Physics, Vol.52, No.3, pp.030201-1--030201-3, 2013, 査読有
- 13) **Atsushi Mori, Yoshihisa Suzuki and Shigeki Matsuo** :
Possibility of Gravitational Tempering in Colloidal Epitaxy to Obtain a Perfect Crystal,
Chemistry Letters, Vol.41, No.10, pp.1069--1071, 2012, 査読有

[学会発表](計 18 件)

- 1) **藤原 貴久, 鈴木 良尚, 佐藤 正英, 佐崎 元, 勝野 弘康** :
リゾチーム存在下でのグルコースイソメラーゼ結晶の平衡温度,
第 43 回結晶成長国内会議, 長野市生涯

学習センター(長野県), 2013 年 11 月 7 日.

- 2) **鈴木 良尚, 津下英明, 上田昭子, 細川 晃平** :
沈澱剤フリー高濃度リゾチーム溶液からの結晶成長,
第 43 回結晶成長国内会議, 長野市生涯学習センター(長野県), 2013 年 11 月 6 日.
- 3) **森 篤史, 鈴木 良尚** :
正方格子基板上へ成長した重力下剛体球系結晶中の欠陥の同定,
日本物理学会 2013 年秋季大会, 徳島大学常三島キャンパス(徳島県), 2013 年 9 月 25 日.
- 4) **Yoshihisa Suzuki, Jin Endoh, Yohei Hamada, Atsushi Mori, Masahide Sato and Hiroyasu Katsuno** :
Crystallization and annealing of colloidal crystals under gravitational field,
The 17th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, Univ. Warsaw (Poland), 15th Aug. 2013
- 5) **Masahide Sato, Hiroyasu Katsuno and Yoshihisa Suzuki** :
Ordering of Brownian Particles from Walls Due to an External Force,
The 17th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, Univ. Warsaw (Poland), 12th Aug. 2013.
- 6) **Katsuo Tsukamoto, Izumi Yoshizaki, Yoshihisa Suzuki, Hitoshi Miura, Gen Sasaki, Masaru Tachibana, Kentaro Oshi and Manuel Juan Garcia-Ruiz** :
Growth Mechanism of Lysozyme Crystals in The International Space Station Based on The Analysis of In-Situ Interferometric Observation,
The 17th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, Univ. Warsaw (Poland), 12th Aug. 2013.
- 7) **Atsushi Mori, Yoshihisa Suzuki and Shigeki Matsuo** :
Monte Carlo Simulation of Gravitational Tempering in Colloidal Epitaxy,
International Topical Team on Crystal Growth, Colloidal Crystallization and Protein Crystallization, Hotel Sakan (Miyagi), 4th Mar. 2013.
- 8) **藤原 貴久, 鈴木 良尚, 佐藤 正英, 佐崎 元, 勝野 弘康** :

グルコースイソメラーゼ結晶の成長過程に及ぼすリゾチームの不純物効果,
第42回結晶成長国内会議,九州大学筑紫キャンパス(福岡県),2012年11月10日.

- 9) **中尾 恭兵, 鈴木 良尚, 藤原 貴久, 佐藤 正英, 佐崎 元, 勝野 弘康** :
リゾチーム結晶成長に及ぼすグルコースイソメラーゼの不純物効果,
第42回結晶成長国内会議,九州大学筑紫キャンパス(福岡県),2012年11月10日.
- 10) **細川 晃平, 鈴木 良尚** :
遠心濃縮によるリゾチームの結晶化と溶解度測定,
第42回結晶成長国内会議,九州大学筑紫キャンパス(福岡県),2012年11月10日.
- 11) **鈴木 良尚** :
沈澱剤フリーで結晶化したリゾチーム結晶の構造解析,
第42回結晶成長国内会議,九州大学筑紫キャンパス(福岡県),2012年11月10日.
- 12) **伊藤 大祐, 鈴木 良尚** :
撥水性基板を用いたコロイド結晶のグレインサイズ制御,
第42回結晶成長国内会議,九州大学筑紫キャンパス(福岡県),2012年11月9日.
- 13) **森 篤史, 鈴木 良尚, 松尾 繁樹** :
コロイドエピタキシーにおける重力テンパリングの可能性,
第42回結晶成長国内会議,九州大学筑紫キャンパス(福岡県),2012年11月9日.
- 14) **Takahisa Fujiwara, Gen Sasaki, Shin-ichiro Yanagiya and Yoshihisa Suzuki** :
Activation volume of crystallization of tetragonal lysozyme crystals,
The 7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Piazza Ohmi (Shiga), 1st Nov. 2012.
- 15) **森 篤史, 鈴木 良尚, 松尾 繁樹, 伊藤 研策** :
コロイドエピタキシーにおける重力テンパリングによる欠陥低減化のモンテカルロ・シミュレーション,
第2回ソフトマター研究会,九州大学西新プラザ(福岡県),2012年9月24日.
- 16) **森 篤史, 鈴木 良尚, 松尾 繁樹** :
剛体球系のモンテカルロシミュレーションから示唆されるコロイドエピタキシー

における重力テンパリングの可能性,
日本物理学会2012年秋季大会,横浜国立大学(神奈川県),2012年9月21日.

- 17) **Yoshihisa Suzuki** :
Enlargement and annealing of a single colloidal crystal grain,
JANE-2012 Japan-Netherlands Symposium on Crystal Growth -Theory and in situ Measurements-, Hotel Sakan (Miyagi), 23th Jul. 2012.
- 18) **Atsushi Mori, Yoshihisa Suzuki and Shigeki Matsuo** :
Monte Carlo simulation of improvement of crystallinity in colloidal epitaxy on square pattern under gravitational field using hard-sphere model,
14th International Association of colloid and Interface Scientist, Conference, Sendai International Center (Miyagi), 14th May 2012.
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・准教授
研究者番号: 60325248
- (2) 連携研究者
櫻庭 春彦 (SAKURABA, Haruhiko)
香川大学・農学部・教授
研究者番号: 90205823
- 津下 英明 (TSUGE, Hideaki)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号: 40299342