

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：51601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390049

研究課題名(和文) 低電圧印加によるタンパク質凝集・結晶化促進の分析技術開発と促進機構の解明

研究課題名(英文) Development of analysis technique for accelerating protein aggregation and crystallization under applied electric fields and the clarification of the mechanism

研究代表者

若松 孝 (Wakamatsu, Takashi)

福島工業高等専門学校・電気工学科・教授

研究者番号：80220838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：数ボルト以下の低電圧印加状態下においてタンパク質結晶化溶液の低角度前方散乱光を瞬時に計測できる(数十ミリ秒以下)分析装置を開発した。開発したタンパク質凝集・結晶化分析装置でリゾチームタンパク質の凝集体形成を追跡したところ、結晶化しない条件にある低濃度塩を含むリゾチーム溶液に対しても低電圧を印加した場合には、前方光散乱強度の増大が確認され、溶液中に不均一な状態でリゾチームの凝集化が進行した。電場印加には、タンパク質の結晶化前段階においてフラクタル凝集体の形成を促進させる効果があり、その結果、タンパク質の結晶化が進行する。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new analysis apparatus with the ability to in situ measure forward scattering light at small angle for crystallizing protein solutions under a low applied voltage.

We tracked protein lysozyme aggregation in the pre-crystalline solutions using the developed apparatus. An enhancement of forward scattering intensities was observed for lysozyme solutions with a low-concentration salt under electric fields, which were under not crystallizing condition without applied voltages. We have found that the application of electric fields provides an effect of accelerating a formation of fractal aggregates on the pre-crystalline step.

研究分野：応用物性

キーワード：タンパク質 凝集体 結晶化 光散乱 電場刺激 フラクタル 微粒子

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や機能的食品の研究開発に大変重要である。しかしながら、依然としてタンパク質結晶化機構の統一した原理は確立されてはならず、現状ではタンパク質の結晶作製は、様々な結晶化条件についてスクリーニングするという試行錯誤で行われており、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、タンパク質結晶の効率的な作製技術、及び高精度な結晶化分析法の確立が求められている。

研究代表者らは、上記のようにタンパク質構造解析のボトルネックとなっている、タンパク質結晶作製の効率化を図るために、タンパク質結晶化分析法の確立、及び電場印加による結晶化促進技術の確立を目指す研究を進めてきている。これまでに、代表的な結晶化のモデルタンパク質であるリゾチーム(ニワトリ卵白由来)の結晶化溶液の低角度レーザ光前方散乱($<8^\circ$)が、微弱ながらも結晶化前のリゾチーム凝集体形成に極めて高感度であることを見出し、低角度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ている(引用文献、)。一方、透明導電膜電極を用いて生成結晶の顕微鏡観察可能な結晶化溶液セルを考案し、1ボルト程度の低電圧印加でリゾチームについて結晶化の促進効果を実証している(引用文献、)。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・結晶化促進効果を調べたところ、電場印加によって、結晶化前段階で凝集体の形成が進むことが分かった(引用文献、)。しかしながら、開発の分析装置は、散乱光の検出器を走査(移動)させるタイプであるために、タンパク質の凝集体形成を短時間で追従することが困難であり、電場印加によるタンパク質凝集体形成促進の詳細は不明のままであった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、タンパク質結晶化溶液の前方光散乱の測定を瞬時に実行する技術を開発し、低電圧印加状態でタンパク質が凝集促進する過程をその場追跡して、電場印加による凝集・結晶化の促進プロセスを調査する。

3. 研究の方法

(1) 電場印加下における前方静的散乱(F-SLS)の瞬時測定システムの開発

今回、図1に示すように、タンパク質結晶化溶液に電場を印加しながら、前方散乱光をモニターできるように、タンパク質凝集体の形成をリアルタイムで分析できる装置を新たに開発した。

光源には、小型固体レーザ($\lambda=473\text{ nm}$ 、出力 25 mW)を用い、タンパク質試料溶液にレーザ光を入射させ、コリメートレンズと CCD 光

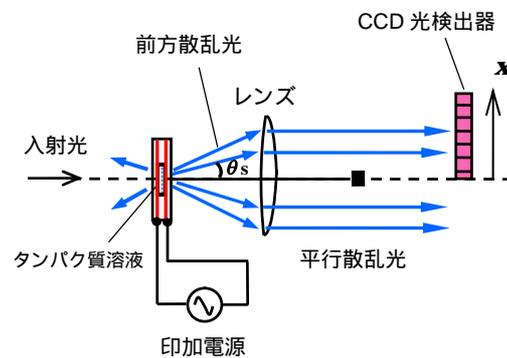


図1 タンパク質凝集・結晶化その場分析装置

検出器の組み合わせで、試料溶液からの前方散乱光の強度分布を一度に瞬時に測定する。前方散乱光の瞬時測定は、試料溶液に低電圧を印加した状態で行う。コリメートレンズで平行化した前方散乱光は、CCD 光検出器の各素子(ピクセル)に垂直に入射させ、ピクセル位置 x から散乱角度 θ_s を求め、瞬時の前方静的散乱光(F-SLS)パターン($I-\theta_s$ 特性)を得る。CCD 光検出器の露光時間は、 $10\sim 50\text{ ms}$ である。

(2) 電場印加用タンパク質結晶化溶液セル

図2に示すように、電場印加用のタンパク質結晶化溶液セルは、直径約 7 mm の穴を開けた厚さ約 1 mm のシリコンゴムシートを、透明導電膜(ITO、インジウム酸化スズ)がコートされた2枚のガラス板で挟んだものであり、この穴に試料溶液(約 $20\text{ }\mu\text{l}$)を注入し封止した構造である。電圧印加用の安定化電源には、ファンクションジェネレータを使用し、タンパク質結晶化溶液に低周波・交流の低電圧($<2\text{ V}$)を印加する。

(3) タンパク質結晶化溶液の作製

タンパク質試料には、結晶化のモデルとして頻繁に用いられるニワトリ卵白リゾチームとクズウコン科ソーマチンを使用した。結晶化で作製した溶液は、各タンパク質の結晶化に適した pH 値をもつ緩衝液、それらの緩衝液に各タンパク質を溶解させたタンパク質溶液(濃度 90 mg/ml)、及び結晶化剤溶液(濃度 $15\%w/v$)である。作製の各溶液は、埃などを除去するために $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 径のフィルターを通し、各専用のマイクロチューブ容器(1.5 mL)に分割し、冷蔵庫の中で保存した。各種

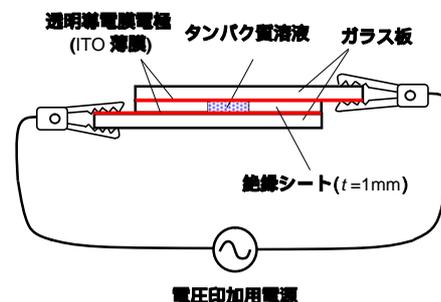


図2 電場印加用タンパク質結晶化溶液セル

実験、すなわちタンパク質の結晶化実験や溶液の光散乱測定、及び電場印加による結晶化実験などを行う直前に、保存していた各種溶液をそれぞれ適宜の割合でマイクロチューブ容器内にて混合し、タンパク質結晶化溶液として使用した。なお、各種溶液の調合は、室温 20 で行った。

リゾチーム結晶化溶液は、緩衝液に酢酸-酢酸 Na 溶液(50 mM、pH 4.5-4.6)を使用し、同緩衝液に溶かした HEWL 溶液(90 mg/ml, 6.3 mM)、同緩衝液に溶かした結晶化剤の各種塩溶液(NaCl、又は KCl)をそれぞれ調合した。リゾチームの原料には、安価なニワトリ卵白由来のリゾチーム(Hen Egg-White Lysozyme: HEWL, HAMPTON RESEARCH, 又は和光純薬工業)を精製せずに用いた。

一方、ソーマチンには、クズウコン科植物から抽出された市販品(和光純薬工業)を原料として用い、精製せずに使用した。緩衝液には、HEPSS バッファ(N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), HAMPTON RESEARCH, 1.0 M, pH 7.0,)を 10 mM 濃度に希釈して使用した。結晶化(沈殿剤)には、酒石酸ナトリウムカリウム(Potassium Sodium-Tartrate Tetrahydrate: PST, 和光純薬工業)を用い、同緩衝液に溶解させて PST 溶液を調合した。

なお、ソーマチンの結晶化は、PST 添加によって一度沈殿が生じ、沈殿物を含んだ溶液においてソーマチンが結晶成長した。PST 沈殿剤を含むがソーマチンが結晶化しない溶液条件で、電場印加による結晶化促進効果が見られたが、溶液中の沈殿物から強い散乱光が生じたために、結晶化前段階で形成されたソーマチン凝集体からの前方散乱光シグナルが埋もれ、凝集体形成の分析が困難であった。そのため、ここでは、結晶化前に沈殿物が生成されない、透明溶液のリゾチームについての分析結果を述べる。

4. 研究成果

表 1、2 にそれぞれ室温 20 で所定濃度の結晶化溶液を容器内に封止しバッチ法で得られた、NaCl 及び KCl 添加によるリゾチーム(HEWL)結晶化条件の結果を示す。塩添加後、4日~6日後にマイクロチューブ内、または、結晶化マイクロプレートにて目視と光学顕微鏡(x20~x40)で結晶成長の有無を確認した。各電解質(塩)添加によって、リゾチーム結晶化と非結晶化の境界が存在する。この境界付近(準安定領域)の非結晶化領域側において、生成する結晶の個数が少なく比較的大型の結晶が得られ易く、タンパク質の結晶作製に適する。すなわち、この条件下では、表 1、2 から NaCl 添加で濃度 4%w/v 付近、KCl 添加では 6%w/v 付近で、生成結晶の個数が少なく、比較的大型のタンパク質結晶が得られやすい。

リゾチーム溶液に電圧(電場)を印加し、そ

表 1 NaCl によるリゾチームの結晶化条件(20)

NaCl (%w/v)	0	1	2	3	4	5	6
HEWL	30				+	+	+
(mg/ml)	20				+/-	+	+
	10					+/-	+

+ 結晶化, -非結晶化, +/- 結晶化/非結晶化

表 2 KCl によるリゾチームの結晶化条件(20)

KCl (%w/v)	1	2	3	4	5	6	7
HEWL	30				+/-	+	+
(mg/ml)	20				-	+/-	+
	10						

+ 結晶化, -非結晶化, +/- 結晶化/非結晶化

の結晶化効果を調べた。電場印加条件は、周波数 20 Hz、印加電圧(実効値)0.7 V であった。溶液試料に約 7 時間、電圧を印加し、その後電圧印加を止め、20 で静置して 4 日後に観察した。試料は、3%w/v の NaCl を含む、30 mg/ml の HEWL 溶液であり、表 1 から分かるように、通常は結晶化しない溶液条件である。電解質塩を含むが、結晶化しない未飽和状態溶液条件でも、電場印加の場合には、リゾチームが結晶成長し、明らかにリゾチーム結晶化における電場印加による促進効果が認められた。同様な電場印加の効果は、KCl 添加でも確かめられた。

タンパク質の結晶化前段階における凝集体の形成についても、電場印加による促進効果が予想できる。電場印加無しの場合と電場印加した場合の瞬時 F-SLS 測定結果の一例を図 3 に示す。電圧印加条件は、周波数 15 Hz で実効値 0.813 V であった。試料は、NaCl 3%w/v、HEWL 30 mg/ml であった。この試料溶液は、表 1 に示したように電場を印加しない場合には、結晶化しない条件である。図 3(a)に示すように、電場印加無しの場合、NaCl 結晶化剤溶液との混合後も、F-SLS 強度はあまり変化しておらず、SLS パターンにも大きな変化は見られない。これは、結晶化剤によるリゾチーム凝集体形成が進行していないことを意味する。そのため、凝集体から結晶核へ移行も起こらず、従って、結晶化しないことが予想できる。実際、この溶液条件では、結晶成長は観察されなかった。

これに対して、図 3(b)に示すように、電場印加状態下では、電場印加無しの場合に比べて、明らかに F-SLS 強度は増大し、SLS パターンも経過時間帯によっては大きく変化している。明らかに電場印加によって、リゾチームの凝集化が促進されていることが分かる。しかも、電場印加直後から、SLS 強度が大きくなり、リゾチームの凝集が促進している。

さらに SLS 強度が増大する、経過時間 25 分後付近、及び 98 分後付近の F-SLS を解析したところ、べき関数型プロファイルであった。すなわち、 $I=cq^{-\alpha}$ の形状を示した。ここ

で q は散乱光波数ベクトル($q=4\pi/\lambda \cdot \sin(\theta/2)$)、 α はべき乗数である。それぞれの α の値は、1.46 (25分後)、1.61(98分後)であった。SLSパターンがべき関数型を示し、しかも α の値が ~ 1.5 以上であることから、比較的密な構造をもった、リゾチームのフラクタル凝集体が形成されたと解釈される。このような密なフラクタル凝集体が形成されると、結晶化、すなわち凝集体から核形成さらに微結晶の成長へと高い確率で進展することを意味する。従って、このように電場印加状態でタンパク質の凝集が促進された結果、結晶成長に繋がったと考えられる。

図4は、図3により電場印加下におけるF-SLS強度の散乱角度分布の平均値(赤)と経過時間との関係を示したものである。比較のために、電場印加無しの場合の結果(青)も示す。電場印加の場合が散乱光強度(平均値)は増大しており、リゾチームの凝集化が進行していることが容易に分かる。しかも、散乱光強度の時間的な変動は大きい。2つの時間帯(25分後と98分付近、図4矢印)で、散乱光強度が大きく変化している。一度形成された密なフラクタル凝集体が、その後すぐに崩壊して、さらにまた形成されたとは考え難い。むしろこれは、溶液中に均一に溶解していたリゾチームが、電解質塩、さらに電場印加によって、リゾチーム濃度、又は凝集体の不均一な分布が生じたものと解釈するのが妥当である。準安定領域外のこのような溶液中で

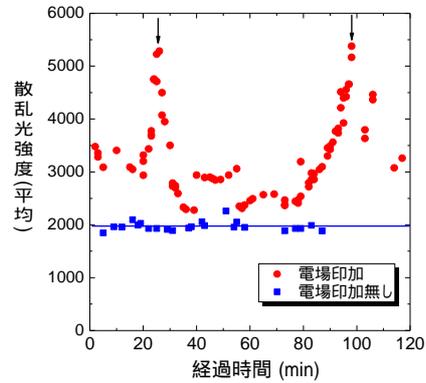


図4 SLS強度(平均値)の経時変化

の不均一分布の発生現象は、一種の相分離と考えられる。リゾチームの微結晶が多数形成される、過飽和溶液条件において、溶液中で相分離が生じることが光学顕微鏡で既に観察されているが、ここでの溶液は、電場印加無しでは結晶化しない準安定領域付近であって、その上、電場印加状態下という条件において、結晶化前の相分離現象は、初めての観測である。

開発した前方光散乱瞬時計測装置を用いて、リゾチームタンパク質の電場印加による凝集化促進を追跡することに成功した。電場印加による凝集化促進の効果を確認し、結晶化溶液中で不均一な状態で凝集化が生じることが初めて示唆された。

<引用文献>

T.Wakamatsu, Forward light scattering for highly sensitive detection of aggregation in crystallizing protein solutions, Applied Physics Letters, Vol. 98, 263701(1-3), 2011.

特許第 5821127 号、タンパク質結晶化分析装置及びタンパク質結晶化分析方法、若松孝、丸山智章、大西裕季、高専機構、2015.

特許第 5626914 号、生体高分子の結晶化装置、生体高分子の結晶化溶液セル、生体高分子の配向制御方法、生体高分子の結晶化方法、及び生体高分子の結晶、若松孝、大西裕季、高専機構、2014 / US8945303B2(2015).

T. Wakamatsu and Y. Ohnishi, Transparent Cell for Protein Crystallization under Low Applied Voltage, Japanese Journal Applied Physics, Vol.50, 048003 (1-2), 2011 / Erratum, Vol.50, 089201, 2011.

特許第 5858274、結晶化促進方法、結晶化解析方法、結晶の製造方法、結晶化装置の制御プログラム、記憶媒体、及び結晶化装置、若松孝、豊島晋、高専機構、

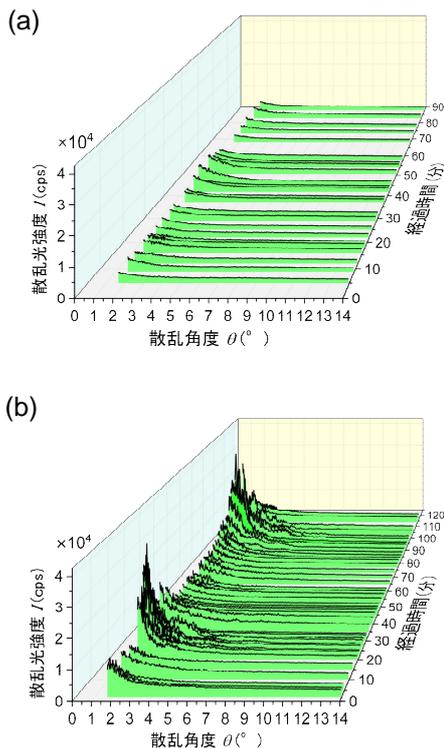


図3 (a)HEWL 溶液の F-SLS(電場印加無し)
(b)電場印加下の HEWL 溶液の F-SLS

2015 .

T. Wakamatsu, S. Toyoshima and H. Shimizu, Observation of electric-field induced aggregation in protein crystallization solutions by forward light scattering, Applied Physics Letters, Vol.99, 153701 (1-3), 2011.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Takashi Wakamatsu, Low Applied Voltage Effects on Thaumatin Protein Crystallization, Transactions of the Materials Research Society of Japan, 査読有, Vol.41, 2016, pp.13-15.
<http://doi.org/10.14723/tmrsj.41.13>

Takashi Wakamatsu, Method and apparatus for characterization of electric field-induced aggregation in pre-crystalline protein solutions, Review of Scientific Instruments, 査読有, Vol.86, 2015, pp.015112(1-8).
<http://dx.doi.org/10.1063/1.4906328>

Takashi Wakamatsu, Forward-Light-Scattering Characterization of Pre-Crystalline Aggregates in Crystallizing Lysozyme Solutions, American Journal of Analytical Chemistry, 査読有, Vol.5, 2014, pp.581-588.
<http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2014.59065>

[学会発表](計7件)

若松孝,第64回応用物理学会春季学術講演会,前方光散乱瞬時測定による電場印加におけるタンパク質凝集の観察,2017.3,パシフィコ横浜

Takashi Wakamatsu, Characterization of Electric Field-Induced Aggregation of Lysozyme using In Situ Forward-Light-Scattering Measurement Technique, The 26th Annual Meeting of MRS-Japan, 2016.12, Yokohama Media & Communications Center.

若松孝,前方散乱光瞬時計測によるリゾチーム凝集・結晶化の評価,第77回応用物理学会秋季学術講演会,2016.9,朱鷺メッセ

Takashi Wakamatsu, Characterization of Lysozyme Pre-Crystalline Aggregates using Forward-Light-Scattering Method, The 25th Annual Meeting of MRS-Japan,

2015.12, Kanagawa Kenmin Hall.

Takashi Wakamatsu, Effects of Applied Electric Field on Protein Crystallization, The 24th Annual Meeting of MRS-Japan, 2014.12, Yokohama Media & Communications Center.

若松孝,電場印加によるタンパク質凝集・結晶化の促進効果,平成26年度電子情報通信学会信越支部大会,2014.10,信州大学長野キャンパス

若松孝,前方光散乱法による塩のリゾチーム結晶化作用の評価,第14回日本蛋白質科学会年会,2014.6,横浜市横浜産産ホール

[産業財産権]
出願状況(計2件)

名称:結晶化分析装置及び結晶化分析方法
発明者:若松孝
権利者:国立高等専門学校機構
種類:特許
番号:国際特許出願 PCT/JP2016/079197
出願年月日:平成28年3月10日
国内外の別:国外

名称:結晶化分析装置及び結晶化分析方法
発明者:若松孝
権利者:国立高等専門学校機構
種類:特許
番号:特許願2015-198366号/特開2017-72436
出願年月日:平成27年10月6日
国内外の別:国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

若松 孝 (WAKAMATSU, Takashi)
茨城工業高等専門学校・電気電子システム工学科・准教授(平成26年12月まで)
茨城工業高等専門学校・電気電子システム工学科・教授(平成27年1月から平成28年3月まで)
福島工業高等専門学校・電気工学科・教授(平成28年4月から平成29年3月まで)
研究者番号:80220838

(2)研究分担者

千葉 薫 (Chiba, Kaoru)
茨城工業高等専門学校・自然科学科・准教授(平成27年6月から平成29年3月まで)
分担)
研究者番号:50415775