

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14134

研究課題名(和文) その場観察による実空間と逆空間におけるタンパク質結晶欠陥の評価

研究課題名(英文) Evaluation of protein crystal defects in real and reciprocal space by in situ observation

研究代表者

山崎 智也 (Yamazaki, Tomoya)

北海道大学・低温科学研究所・特別研究員(PD)

研究者番号：50735032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質結晶の品質を劣化させる結晶欠陥の動的挙動を透過型電子顕微鏡で可視化することに成功した。ミクロンサイズ以下のタンパク質結晶中に空隙やブロック状の構造が観察され、これらが生成したり動いたり、消失したりする様子を捉えた。これらの挙動を解析したところ、個々の結晶における欠陥密度などの時間変化は見られなかった。このことは、欠陥の起源は結晶がミクロンサイズになる以前、すなわち核生成前後の過程にあることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結晶の質を悪くする欠陥の動きの可視化に成功したことは、その欠陥が導入される原因を排除できることに繋がる。これは欠陥が導入される原理解明や高品質な結晶を育成するための指針となる。また、タンパク質の機能を理解したり、創薬に応用したりするためにはタンパク質分子の構造(形)を知る必要があり、これは調べたいタンパク質分子の高品質な結晶を作製して行う。より高品質な結晶を用いることで詳細なタンパク質分子の構造を知ることができる。

研究成果の概要(英文)：The dynamic behavior of defects in protein crystals, which degrade the quality of protein crystals, has been successfully visualized by transmission electron microscopy. The voids and the block structure were observed in protein crystals of micron size or smaller and their formation, movement, and disappearance were also observed. Analysis of these behaviors revealed that there is no time dependence on number density of defects in each crystal. This suggests that the defects originated before the crystals reached micron size, i.e., before, or immediately after nucleation.

研究分野：結晶成長

キーワード：タンパク質結晶 透過型電子顕微鏡 溶液セル 結晶欠陥

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の対象であるタンパク質結晶は、分子量が数千～数十万のタンパク質分子が周期配列した巨大分子結晶である。タンパク質結晶は X 線などの放射線を用いたタンパク質分子の三次元構造解析に用いられ、解かれた分子構造はそのタンパク質の機能の理解や創薬への応用に重要な情報となる。この過程において、対象となるタンパク質の結晶を得ること、高分解能な構造解析ができる高品質な結晶を育成することは非常に困難である。そのため、結晶化の促進や、欠陥の少ない高品質な結晶の育成技術の研究と共に[1]、結晶化そのもののメカニズムに迫る研究が求められてきた[2]。しかしながら、タンパク質結晶において、どのような欠陥が、どのようなメカニズムで生成するのか、という欠陥制御に関する問題や、回折点の広がりや乱れは、どのような欠陥の寄与が大きいのか、といった実空間と逆空間の相関に関する問題に対する明確な答えは未だに不明である。

### 2. 研究の目的

申請者は溶液中でタンパク質が結晶化する瞬間を透過型電子顕微鏡 (TEM) でその場観察することに成功した[3]。TEM はナノメートル以下の空間分解能、実時間で観察が行えるほか、逆空間の情報である電子回折図形を取得することができる。本研究では上記の問いに対し、溶液中で成長するタンパク質結晶を TEM でその場観察することからアプローチする。また、結晶中に導入される欠陥を制御することは、結晶の品質を向上するための基礎である。本研究では、TEM を用いたタンパク質結晶の欠陥のその場観察を行うことで、タンパク質結晶の品質低下に繋がる欠陥の生成メカニズムを明らかにすることを旨とする。ここから、欠陥の直接観察とその生成メカニズム、欠陥が電子回折図形に与える影響を調べることを目的とする。

### 3. 研究の方法 (本研究課題の研究方法について、その具体的内容を簡潔に記入)

試料にはリゾチームタンパク質結晶を用いた。タンパク質結晶欠陥のその場観察は、TEM と溶液セルを仕込む液中観察専用の TEM 試料ホルダーを用いた。試料ホルダーの先端部には、シリコン (Si) チップと O-リングを組み合わせて溶液セルを作製した (図 1)。この溶液セルにタンパク質結晶化溶液を密封することで、TEM 内の真空環境と溶液を隔離した状態に保てる。Si チップにはスペーサー (厚み < 500 nm) と非晶質窒化ケイ素 ( $a\text{-SiN}_x$ ) の観察窓 (厚み 50 nm) が付いている。スペーサーにより薄い溶液層を作製し、観察窓を介して電子ビームを透過することで、TEM による溶液中の観察が可能となる。

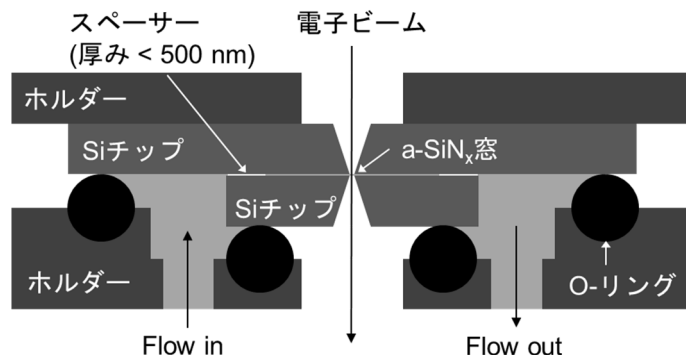


図 1. 溶液セルの模式図。スペーサーの厚みに応じた薄い溶液層 (観察試料) を作り、非晶質窒化ケイ素 ( $a\text{-SiN}_x$ ) の観察窓を介して電子ビームを透過させることで溶液中を観察する。

### 4. 研究成果

溶液セルを用いた TEM によるその場観察により、サブミクロンからミクロンサイズの正方晶と直方晶のリゾチーム結晶を捉えることに成功した。本実験条件下においては、正方晶と直方晶の溶解度がほとんど変わらないが、両者が共存したときに直方晶が成長し正方晶が溶解する様子が観察されているため[3]、直方晶のほうが熱力学的に安定である。

それぞれの結晶中には、周りとは比べて電子が透過しやすくなったために生じる明るいコントラストが観察された。これは結晶中に生成した空孔 (結晶中の 1 分子が抜けた箇所) が集まって形成された空隙 (ポイド) と考えられ、その大きさは数十ナノメートル (リゾチーム分子の大きさは約 3 ナノメートル) であった。また、このようなポイドが生成する瞬間や動く様子 (図 2) 消失する瞬間を捉えた。このようなタンパク質結晶中に生成されるポイドの動的な挙動を可視化した例ははじめてであり、タンパク質結晶を構成する分子が動いている直接的な証拠である。また、結晶中に生成するポイドの数と面積の時間変化を解析したところ、今回の実験条件下 (結晶の破壊が数秒で確認される電子フラックス以下) ではこれらに明確な変化は観察されなかった。また、サブミクロンサイズ以上に成長した個々の結晶においては、ポイドの数や面積には個体差があることが分かった。

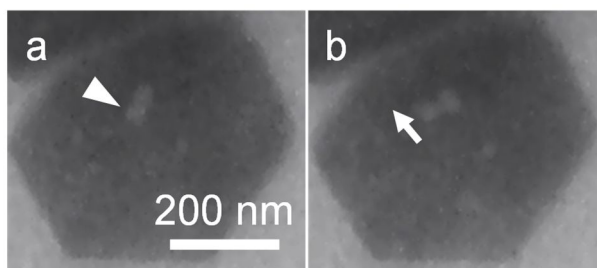


図 2. 生成したボイドが正方晶リゾチーム結晶中を移動する様子。a の三角印で示したボイドが 10 秒後(b)に矢印方向に沿って移動した。

また、これらの結晶中には、数十 nm サイズのブロック状に回折コントラストが生成し、これらが動く様子が観察された (図 3)。このようなコントラストは、結晶がいくつかのブロックで構成され、これらのブロックの結晶学的方位がわずかにずれることで生成されたと考えられる。タンパク質結晶の完全性を悪くし、回折斑点幅を広くさせる原因として、タンパク質結晶のモザイク構造が予測されていた。本研究で初めて、数十~数百 nm のオーダーにおいて、モザイク構造 (ブロック状構造) を可視化することに成功した。

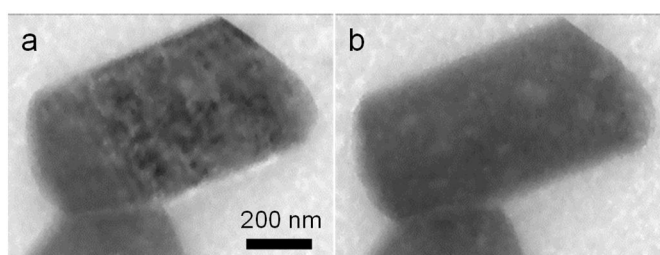


図 3. 直方晶リゾチーム結晶中に生成したブロック状のコントラスト群が移動する様子。a で結晶中に観察されているコントラストは、明暗の対になっている結晶由来のコントラストである。これらのコントラストは 10 秒後(b)に消失した。消失した後の結晶中にはボイドのコントラストが観察された。

ブロック状構造は、結晶がわずかに動くだけでもその見え方は変化する。実際に、直方晶結晶ではバンド状のコントラスト (バンドコントラスト) が観察され、それが結晶の長軸方向に沿って動く様子が観察された。このことは、直方晶結晶が長軸方向に沿ってわずかに湾曲していること、観察中に結晶が動いていることを示す。一方で、1つのバンド状コントラストは入射電子ビームと結晶面がブラッグの条件を満たすことで形成する。すなわち、1つのバンド状コントラストに着目すれば、結晶を同じ方位から観察できる。この条件下でブロック状構造を観察したところ、ブロックの形状が変化していることが分かった。これは結晶中の分子が移動しドメインを再構築していることを示す。

一方、数ミクロンサイズに成長した結晶中には、ブロック状構造や積層欠陥、転位がすでに存在していたため、これらが生成する様子は観察されなかった。また、個々の結晶においては、欠陥の数密度や結晶中で欠陥の占める割合にばらつきはあるものの、一つの結晶 (数ミクロンサイズ) においては、これらの時間変化は観察されなかった。このことは、今回観察された結晶中に生成する欠陥の起源が、結晶が数ミクロンサイズになる前の段階、すなわち、核生成前後にあることを示唆するという成果を得た。そのため、欠陥の起源を調べるためには核生成前後の過程を詳細に調べる必要がある。

また、ブロック状構造の電子回折図形の取得に成功し、回折点の広がりを確認することができた。一方、電子回折図形の取得に必要な時間に対し、欠陥の挙動のタイムスケールが短いことや、現状のセットアップでは軸調整範囲に制限があることなどの影響で、定量的な評価にはつながってはいないため、今後の課題となる。

本研究成果は学会で発表し、*Soft Matter* 誌に論文投稿し掲載された[4]。また、この論文が掲載された号のフロントカバーに、本研究の図が採用された[5]。

#### 4. 参考文献

- [1] Y. Tominaga *et al.*, *Nat. Photon.* **10**, 723, 2016.
- [2] S. -X. Lin *et al.*, *Cryst. Growth & Des.* **7**, 2124, 2007.
- [3] T. Yamazaki *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Soc.* **114**, 2154, 2017.
- [4] T. Yamazaki *et al.*, *Soft Matter* **16**, 1955, 2020.
- [5] <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/sm/d0sm90036b>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki Tomoya, Kimura Yuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Electron-Beam-Induced Nucleation in an Antisolvent	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 1480 ~ 1481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1431927619008134	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Yamazaki Tomoya, Van Driessche Alexander E. S., Kimura Yuki	4. 巻 16
2. 論文標題 High mobility of lattice molecules and defects during the early stage of protein crystallization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 1955 ~ 1960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9SM02382H	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 該当する
1. 著者名 Ishizuka Shinnosuke, Kimura Yuki, Sakon Itsuki, Kimura Hiroshi, Yamazaki Tomoya, Takeuchi Shinsuke, Inatomi Yuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Sounding-rocket microgravity experiments on alumina dust	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3820-1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06359-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishizuka Shinnosuke, Kimura Yuki, Kawano Jun, Escibano Rafael, Yamazaki Tomoya, Hama Tetsuya, Sato Rikako	4. 巻 122
2. 論文標題 Immiscibility of Nucleating Aluminum Oxide Nanoparticles in Vapor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 25092 ~ 25101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b08355	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山崎智也、木村勇気
2. 発表標題 Investigation of liquid cell transmission electron microscopy combined with antisolvent crystallization
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎智也、木村勇気
2. 発表標題 溶液透過型電子顕微鏡を用いた貧溶媒からの結晶化その場観察法の検討
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Yamazaki, Yuki Kimura
2. 発表標題 In situ observation of crystallization of a salt using an antisolvent by transmission electron microscopy
3. 学会等名 International Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ICCGE-19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Yamazaki, Yuki Kimura
2. 発表標題 Electron-beam-induced nucleation in an antisolvent
3. 学会等名 Microscopy & Microanalysis 2019 (M&M 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Yamazaki, Yuki Kimura
2. 発表標題 In-situ observation of dynamics of defects in a protein crystal
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎智也、木村勇氣、清水洋、藤田咲子、藤原正裕、大野智子
2. 発表標題 リゾチームタンパク質の結晶化に関わる2種類の非結晶粒子
3. 学会等名 分子・物質合成プラットフォーム 平成30年度 シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎智也, A. E. S. Van Driessche, 木村勇氣
2. 発表標題 タンパク質結晶中の欠陥の挙動
3. 学会等名 第47回結晶成長国内会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎智也
2. 発表標題 透過型電子顕微鏡による溶液からの結晶化 “ その場 ” 観察法の検討
3. 学会等名 結晶表面・界面での相転移ダイナミクスに関するその場観察および理論
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------