

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04902

研究課題名（和文）溶液成長における分子レベルでの溶媒和構造と結晶の完全性との相関の解明

研究課題名（英文）Relationship between solvation structure and crystal perfection at the molecular level for solution growth

研究代表者

小泉 晴比古（Haruhiko, Koizumi）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・准教授

研究者番号：10451626

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質結晶成長中の脱溶媒和過程のダイナミクスを制御することで、ペンデル効果に起因した等高干渉縞が、正方晶リゾチーム結晶のくさび型の領域において明瞭に観察された。このことは、育成された結晶が完全結晶に近い完全性を有していることを示しており、溶液成長における脱溶媒和過程の制御の重要性を示している。また、溶液成長における脱溶媒和過程を制御することで、局所的な結晶の完全性のみならず、全体の均質性も改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

溶液成長は、パウデバイスであるSiCから有機高分子であるタンパク質の結晶化まで、極めて幅広い分野で用いられており、重要な技術となっている。このため、溶液から成長する様々な材料における結晶の完全性を制御するための普遍的なプロセスを構築するためにも、溶液成長における結晶成長機構の解明は重要となる。ゆえに、溶液成長を特徴付けている脱溶媒和過程が、結晶の完全性への影響を解明することは、極めて重要な研究課題となる。

研究成果の概要（英文）：Equal-thickness fringes were clearly observed in the region of a tapered tetragonal hen egg white (HEW) lysozyme crystal with a wedgelike edge. This is attributed to control of the dehydration process for crystal growth from solution, which plays an important role. Both the local quality and whole homogeneity of the crystals were improved by regulating the dehydration process.

研究分野：結晶成長物理学

キーワード：タンパク質結晶 結晶性 溶媒和

1. 研究開始当初の背景

溶液成長は、パワーデバイスである SiC から有機高分子であるタンパク質の結晶化まで、極めて幅広い分野で用いられており、重要な技術となっている。このため、溶液から成長する様々な材料における結晶の完全性を制御するための普遍的なプロセスを構築するためにも、溶液成長における結晶成長機構の解明は重要となる。

結晶が成長する際、まず結晶の構成原子（構成分子）は、結晶表面上のテラスに到達した後（図 1 の過程①）、テラスを拡散しステップへと到達する（図 1 の過程②）。その後、構成原子（構成分子）はステップ上を拡散し、キンクに一原子（一分子）ずつ取り込まれ（図 1 の過程③）、結晶が成長していく。このとき、溶液から結晶が成長する際には、溶液に存在する分子は多数の水分子で囲まれた水の状態にある。それらが結晶に取り込まれるには、水のジャケットを脱ぐ必要がある。つまり、溶液成長では各々の過程において脱溶媒過程が存在し、この過程の存在が溶液成長を特徴付けている。これまでに溶媒和と結晶の成長速度との相関を示唆する結果がいくつか得られているが、溶媒和の構造を直接的に観察することが困難なことから、溶液成長における溶媒和と結晶成長機構との関連は十分に理解されてこなかった。しかし、溶液成長の結晶成長機構を完全に理解し、溶液から成長する様々な材料における結晶の完全性を制御するための普遍的なプロセスを構築するためにも、溶媒和構造の実態を分子レベルで解明することは、極めて重要な研究課題といえる。

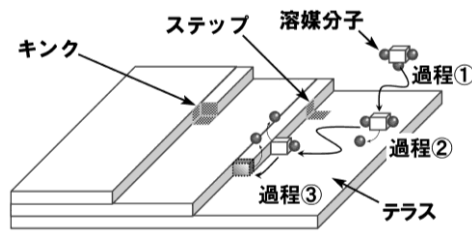


図 1 BCF 理論に則った結晶成長様式。原子が一原子ずつキンクに取り込まれる様子が描かれている。

2. 研究の目的

原子や分子が、結晶表面上のステップに取り込まれるとき、溶液からの結晶成長においては、脱溶媒過程は支配的な役割を果たし、その脱溶媒過程は、結晶成長速度を決定する。このところは、溶液からの結晶成長においては、水和構造の重要性を示している^{1), 2)}。しかしながら、水和構造を直接的に観察することは難しいため、脱溶媒過程と結晶成長メカニズムの関係は、十分には理解されていない。

近年我々は、タンパク質結晶を育成する際に添加する NaCl といった塩の濃度を高くすると、タンパク質結晶の結晶成長速度が増加し、結晶の完全性が向上することを明らかにし³⁾、これは、タンパク質分子周りの水分子のダイナミクスが速くなったことに起因している^{4), 5)}。このことは、脱溶媒過程が結晶の成長速度だけではなく、結晶の完全性にも大きな影響を与えることを示している。さらに近年、グルコースイソメラーゼというタンパク質を用いることによって、タンパク質結晶においても完全結晶が育成できることを実証した^{6), 7)}。しかしながら、溶液から成長する高分子結晶の完全性に関する研究は、タンパク質を用いて精力的に行われているが⁸⁾、グルコースイソメラーゼというタンパク質において、なぜ完全結晶が育成されたのか理解できていない。これまでの我々の研究におけるグルコースイソメラーゼ結晶の成長条件下では、タンパク質分子周りの水分子のダイナミクスがより速い条件であったと推察される。ゆえに、より速い水分子のダイナミクスが、完全結晶への成長と強い相関があるかどうかを明らかにすることは、極めて重要となる。

本研究では、加える塩の濃度を制御することにより、タンパク質分子周りの水分子のダイナミクスを制御すれば、正方晶リゾチーム結晶のくさび型領域においても、ペンデル縞に起因する等高干渉縞が観察できることを実証した。このことは、結晶内の結晶子間の配向不整が極めて小さいことを示唆している。また、タンパク質分子周りの水分子のダイナミクスを制御することによって、育成される結晶の均質性も向上することも明らかにした。この結果は、脱溶媒和によって特徴付けられる溶液からの高分子の結晶成長において、普遍的な現象であると考えられる。

3. 研究の方法

本研究で用いた正方晶リゾチーム結晶は、和光純薬から購入された。また、結晶化溶液を準備する前に、透析によって卵白リゾチーム溶液から NaCl が除去された。正方晶リゾチーム結晶の育成は、化学固定された種結晶を用いることで行われた。詳細については、参考文献 [9] を参照されたい。正方晶リゾチーム結晶は、0.34 M、0.68 M、0.86 M、及び、1.20 M の NaCl 濃度の下、育成された。結晶は、育成セル (25×25×2 mm) を用いて、1 週間育成された。

放射光単色 X 線トポグラフィは、あいちシンクロトロン光センターの BL8S2 を用いて行われた。Si(111)から構成されている二結晶モノクロメータが、光源から 16 m の距離に設置されており、波長 1.0 Å の条件の下、室温で実験が行われた。トポグラフ像は、正方晶リゾチーム結晶の 110 反射を用いて撮影され、原子核乾板 (Ilford) により記録された。露光時間は、約 3 分であった。

放射光を用いた X 線ロックンクカーブ測定には、高エネルギー加速器研究機構・フォトンファクトリーの BL20B を用いて、室温で行われた。放射光を用いた X 線ロックンク。カーブ測定の詳細については、参考文献 [9] を参照されたい。

4. 研究成果

図 2 は、正方晶リゾチーム結晶の 110 反射から得られた放射光単色 X 線トポグラフ像である。結晶は、NaCl 濃度が 1.20 M の下、育成されたため、タンパク質分子周りの水分子のダイナミクスは極めて速くなっていると考えられる^{4),5)}。図 1 から見られるように、転位に起因したコントラストは観察されないが、結晶の中心部のコントラストは、種結晶に由来した歪みに起因している。そして、正方晶リゾチーム結晶のくさび型の領域において、明瞭な直線状のコントラストを観察することができる。このコントラストは、くさび型の領域において観察されていることから、モアレ縞ではなく、ペンデル効果に起因した等高干渉縞であることが分かる。これは、育成された結晶の完全性が極めて完全結晶に近い、つまり、結晶子間の配向不整が 10^{-4} 程度しかないことを示している。

表 1 に、様々な NaCl 濃度を用いて育成された正方晶リゾチーム結晶における結晶子間の配向不整を示す。表 1 に示してあるように、NaCl 濃度が高いほど、結晶子間の配向不整が小さくなっていることが分かる。近年、タンパク質溶液内の塩濃度を変えることで、タンパク質分子周りの水分子のダイナミクスが変化することが報告されている^{4),5)}。このため、高分子から構成されている結晶の完全性は、高分子周りの水分子のダイナミクス、つまり、溶液からの結晶成長における脱溶媒和過程と強い相関を持つ。

さらに、様々な NaCl 濃度で育成された正方晶リゾチーム結晶の均質性を評価するために、結晶内の結晶子間の配向不整の二次元マッピングが行われた。図 3 は、様々な濃度で育成された正方晶リゾチーム結晶内の結晶子間の配向不整の二次元マッピング像である。図 3 から分かるように、結晶全体の完全性、つまり、均質性が、NaCl 濃度の増加と共に、向上していることが分かる。特に、{101} 成長セクターよりも {110} 成長セクターの完全性が、NaCl 濃度の低下と共に、劣化していることが分かる。このことは、卵白リゾチーム分子周りの水分子のダイナミクスが、育成される結晶の全体の均質性に強い影響を与えることを示している。ゆえに、脱溶媒和の制御は、局所的な結晶の完全性の向上だけではなく、均質性の向上にも重要である。

また、近年我々は、結晶内の結晶子間の配向不整が 10^{-4} であるグルコースイソメラーゼ結晶において、X 線回折によるロックンク・カーブの振動現象の観察にも成功している。しかし、今

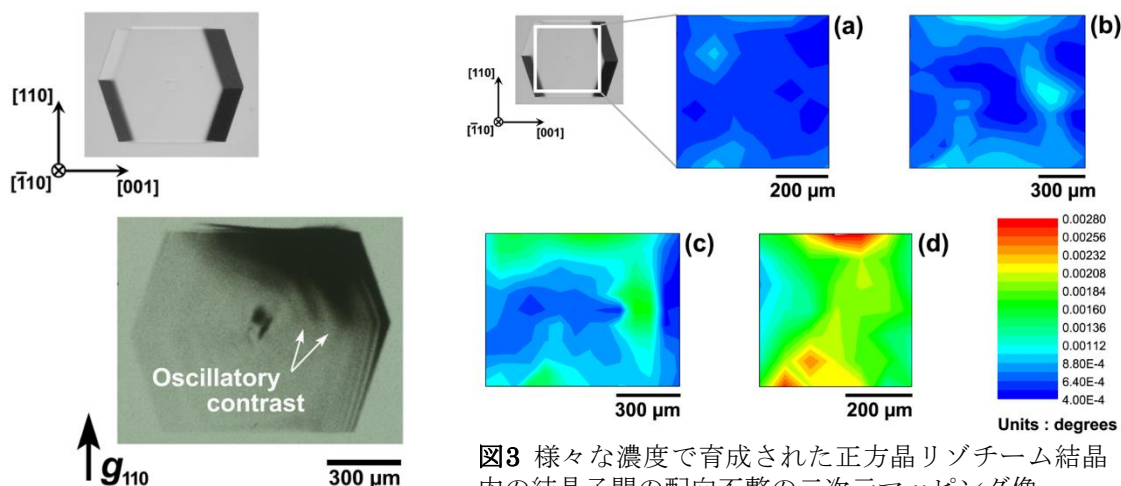


図2 正方晶リゾチーム結晶の110 反射から得られた放射光単色X線トポグラフ像。

図3 様々な濃度で育成された正方晶リゾチーム結晶内の結晶子間の配向不整の二次元マッピング像。(a) 1.20 M、(b) 0.86 M、(c) 0.68 M、(d) 0.34 M。

表 1 様々な NaCl 濃度を用いて育成された正方晶リゾチーム結晶における結晶子間の配向不整。

NaCl concentration mol/L (w/v %)	supersaturation σ	misorientation deg
0.34 M (2.0 w/v%)	2.34	0.00143
0.68 M (4.0 w/v%)	2.39	0.00103
0.86 M (5.0 w/v%)	2.35	0.00069
1.20 M (7.0 w/v%)	2.32	0.00041

回育成された正方晶リゾチーム結晶においては、結晶内の結晶子間の配向不整が 10^{-4} であるにもかかわらず、この X 線回折によるロッキング・カーブの振動現象は観察されなかった。これは [001] 方向に歪みが蓄積していたことに起因している。正方晶リゾチーム結晶の [001] 方向には、水分子が通ることができるチャンネルが存在している。そして、このチャンネル内に存在する水分子は、バルクの水分子よりも拡散係数が小さく、また、NaCl 濃度がより高くなると、このチャンネル内の水分子の拡散係数が減少することも報告されている¹⁰⁾。ゆえに、正方晶リゾチーム結晶の [001] 方向に存在する歪みは、チャンネル内に存在する水分子の水素結合のネットワークに起因している可能性がある。

<引用文献>

- 1) P. Bennema, *J. Crystal Growth* **1**, 278 (1967).
- 2) P. G. Vekilov, *Cryst. Growth Des.* **7**, 2239 (2007).
- 3) H. Koizumi, S. Uda, K. Tsukamoto, K. Kojima, M. Tachibana, and T. Ujihara, *Cryst. Growth Des.* **18**, 4749 (2018).
- 4) K. Aoki, K. Shiraki, and T. Hattori, *Appl. Phys. Lett.* **103**, 173704 (2013).
- 5) K. Aoki, K. Shiraki, and T. Hattori, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 15060 (2016).
- 6) H. Koizumi, R. Suzuki, M. Tachibana, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, Y. Suzuki, S. Uda, and K. Kojima, *Cryst. Growth Des.* **16**, 4905 (2016).
- 7) R. Suzuki, H. Koizumi, K. Hirano, T. Kumasaka, K. Kojima, and M. Tachibana, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 3634 (2018).
- 8) J. Helliwell, *J. Cryst. Growth* **90**, 259 (1988).
- 9) H. Koizumi, S. Uda, K. Tsukamoto, M. Tachibana, K. Kojima, J. Okada, and J. Nozawa, *Cryst. Growth Des.* **17**, 6712 (2017).
- 10) V.N. Morozov, G.S. Kachalova, V.U. Evtodienko, N.F. Lanina, and T.Ya. Morozova, *Eur. Biophys. J.* **24**, 93 (1995).

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 Koizumi Haruhiko, Uda Satoshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Theoretical and Practical Studies on Effects of External Electrostatic Electric Field on Nucleation and Growth Kinetics of Protein Crystals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials	6. 最初と最後の頁 100568-1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pcrysgrow.2022.100568	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小泉晴比古
2. 発表標題 交流電場印加によるソフトマテリアル材料の結晶化制御
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小泉晴比古
2. 発表標題 交流電場によるタンパク質結晶化過程の制御
3. 学会等名 第73回コロイドおよび界面化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小泉晴比古
2. 発表標題 転位によるタンパク質結晶内のサブグレイン中の歪みの制御
3. 学会等名 第50回結晶成長国内会議
4. 発表年 2021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
---------	---------