

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04908

研究課題名（和文）結晶化によるタンパク質分子立体構造の統計力学的状態分布の推定

研究課題名（英文）Presumption of statistical mechanical state distribution of 3D protein structure in solution states by crystallization

研究代表者

鈴木 良尚（SUZUKI, Yoshihisa）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（理工学域）・准教授

研究者番号：60325248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、結晶化条件の違いにより、有意に3次元立体分子構造が変化すること、グルコースイソメラーゼ（GI）とニワトリ卵白リゾチーム（HEWL）について明らかにした。具体的には、結晶化過程の沈殿剤の有無、および回折データ収集時の温度条件の違いによって実証した。GIでは、塩濃度の変化による局所構造および全体構造は有意に変化しなかった。それに対して、温度変化に対しては全体構造が有意に変化した。HEWLは、塩濃度変化による局所構造の変化として、Na⁺の有無およびSER72の水酸基の向きの変化が見られた。温度変化では、活性部位入り口付近のTRP62のヒスチジン、および全体構造が変化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Structure Based Drug Design（SBDD）のためには最高回折分解能0.15 nm以上の高分解能結晶が必要になると言われている。その一方で、タンパク質分子の構造は結晶化条件や回折データ収集時の温度条件などによっても系統的に大きく変化する可能性があるにもかかわらず、「それは単なる偶然誤差に過ぎない」という見方が一般的である。

本研究では、沈殿剤の有無、回折データ収集時の温度の違いによる有意な変化を2種類のタンパク質分子で明らかにした。これにより今後のSBDDにおいて成功の確率を増やすことができれば、新型コロナウイルス感染症等の特效薬の製造に役立てる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Three-dimensional molecular structures of glucose isomerase (GI) and hen egg-white lysozyme (HEWL) changes significantly with the crystallization and data collection conditions. For GI, no significant changes in local and global structure were observed with salt concentrations. Significant changes in the overall structure were observed with temperatures during diffraction data collection. For HEWL, significant changes in the presence or absence of Na⁺ at the Na⁺ site and the orientation of hydroxyl groups in SER72 were observed with salt concentrations, but no significant changes in the overall structure. Temperature changes during diffraction data collection showed a change in the orientation of the histidine of TRP62 near the entrance to the active site and significant changes in the overall structure.

研究分野：結晶成長

キーワード：結晶成長 タンパク質 沈殿剤フリー

1. 研究開始当初の背景

タンパク質分子は、その複雑な3次元分子構造により、最安定状態の構造の他に、準安定状態の構造を複数持つと考えられている。タンパク質分子の高度な触媒活性はこの準安定な構造によって与えられる可能性があり、その解明は機能構造関連の重要なテーマとなり得る。しかし、準安定状態の原子レベルの立体構造を明らかにすることは困難である。赤坂らは、高圧力下のNMRによって、タンパク質のある準安定構造の統計力学的存在確率が、加圧によって増えることで、新たな構造として測定できることを示した[1]。しかし、NMRでは共存するもう一つの構造は同時には現れてこないため、存在確率を定量化できない。それに対して、もし、複数の構造状態の溶液をそのまま結晶化することが可能であれば、その結果は電子密度の数値として両方の存在確率をそのまま抽出することができるのではなからうか。当初、我々はその証拠の一端となるデータを得ていた(Fig. 1)。我々は、沈殿剤フリーのニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)結晶化と構造解析によって、多量のNaCl添加で結晶化した塩析結晶中の構造と有意に異なることを示した(Fig. 1(a), (b)) [2]。これもNaCl濃度を変数とした、複数構造の統計力学的存在確率の結果とも言える。そこで、通常の場合の1/3程度の、生体内塩濃度条件下でのタンパク質の結晶化と結晶構造解析(18K04960)を行った。その結果、脱塩結晶の構造と塩析結晶の構造の両方の構造を、電子密度の割合を変えながら重ね合わせた構造として現れることがわかった(Fig. 1(c), (d))。実際、本来期待される電子密度と、実際の電子密度との差を表す2Fo-Fcマップでは、生理食塩水中で、Na⁺の電子密度(Fig. 1(c))が塩析結晶よりも低いこと(二重になっていて、外側が赤いマップ)を示している(Fig. 1(d))。溶液中の存在確率を結晶化プロセスで保持できるのであれば、結晶構造解析によって溶液中の存在確率分布を推定できることになる。

よって、まずはNaClを細かく振って、複数の構造の占有率を詳細に明らかにすることを目的とした。しかし、思わぬことが明らかになり、研究方針を大幅に変更する必要が出てきた。

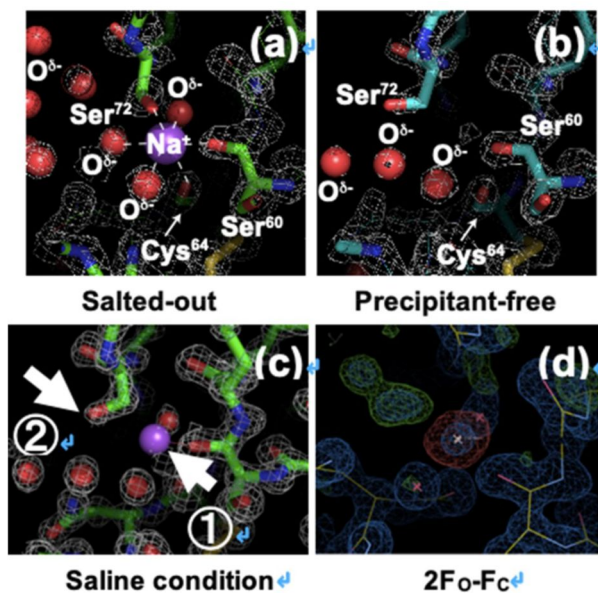


Fig. 1. HEWL 斜方晶系結晶中の Na⁺サイト周辺の、(a)塩析結晶中、(b)沈殿剤フリー結晶中、(c)生理食塩水中の分子構造。(d)には(c)と同じデータの 2Fo - Fc map を表示。

2. 研究の目的

当初はあまり温度のことは気にしていなかったが、結晶化条件における塩の有無よりも、回折データ収集時の温度を変えたときの方が、平均二乗変位(rmsd)が大きいことが明らかになった。これは、沈殿剤濃度による構造変化の詳細な検証を行う段階で、Protein Data Bankの他の構造との比較を行う必要があり、その際に回折データ収集時の温度によってrmsdが変化することがわかってきたことによる。このことより、詳細な塩濃度の変化の前に、濃度温度の両方についての系統的な研究が必要不可欠であるという認識に至った。本研究では、同じタンパク質の結晶において沈殿剤濃度と温度の両方を系統的に変化させ、局所的・全体的な分子立体構造の変化について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

HEWL(生化学工業もしくは和光純薬)およびGI(Hampton ResearchもしくはNagase Spezyme G1pf)

を用いて、遠心濃縮および透析を行い、そこから先の結晶化を試みた。溶媒としてそれぞれの緩衝液もしくは水か、その溶媒を用いた glycerol 溶液を用い、HEWL については NaCl、GI については (NH₄)₂SO₄ の濃度を变化させる。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・再稀釈を繰り返し行うことで溶液置換したのち、最後に濃縮して過飽和状態にした。

4. 研究成果

(1) 令和 3 年度 :

「研究実施計画」において、初年度はニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) 斜方晶系結晶を使って、NaCl 濃度を細かく刻んで結晶化し、Na⁺サイト周辺で、変化する電子密度の NaCl 濃度依存性を明らかにする予定であったが、塩濃度の変化による構造変化よりも、温度変化による構造変化の効果が圧倒的に大きいという予定外の事実が判明したため、急遽確認作業に追われた。2022 年度に実験を予定していて、予備実験を実施していたグルコースイソメラーゼ (GI) について、沈殿剤フリーの遠心濃縮によって得られた結晶を、SPRING-8 において 90 K で構造解析して得られた構造と、Protein Data Bank (PDB) に登録されている、硫酸アンモニウムによる塩析で得られた結晶による 1XIB という構造を比較したところ、構成分子の平均二乗変位 (RMSD) が 0.0234 nm であった。それに対して、研究室線源で 100 K で構造解析した沈殿剤フリー結晶で得られた構造との間の RMSD は 0.0075 nm であったため、塩濃度による違いが明らかに出たと思っていた。ところが、念のため、硫酸アンモニウムの塩析結晶における構造の一つである 4A8I と比較したところ、RMSD = 0.0072 nm となり、塩濃度による違いはなかった。4A8I は 100 K で構造解析していたため、温度変化の方がはるかに大きかった。これらの結果から、再現性の良い、常温における沈殿剤フリーのタンパク質結晶構造解析法が必要となり、その過程で、蒸発によるタンパク質の新規結晶化法を開発できたため Crystals 誌に論文化した。また、タンパク質分子の単純化モデルとしてパッチ粒子の相互作用と結晶構造の相関について、シミュレーションした結果を Scientific Reports, Japanese Journal of Applied Physics 誌に投稿した。

(2) 令和 4 年度 :

初年度に計画していた、ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) 斜方晶結晶の、Na⁺サイト周辺で、NaCl 濃度の変化に伴う電子密度の変化を、より一般的に得られる HEWL 正方晶系結晶について、全て常温で行い、第 51 回結晶成長国内会議にて発表した。予想通り、NaCl 濃度とともに HEWL 分子中の Na⁺の電子密度が大きくなる結果が得られたが、活性部位においては、有意な構造の変化は見られなかった。その一方で、既に Protein Data Bank (PDB) に報告されている、極低温における構造との間には大きな変化が見られた。特に ASN59 のアミノ残基の位置は 0.3 nm 程ずれていた。それに対して、グルコースイソメラーゼ (GI) については、活性部位についての大きな変化は見られず、あくまでも分子全体としての個々の原子位置についての平均二乗変位 (RMSD) についての温度変化が 0.02 nm 程度のオーダーにとどまっていた。その一方で、超濃厚溶液における成長速度の大きな促進に関しては HEWL 正方晶系結晶については一桁程度にとどまった。詳細な速度データを集めるには至っていないため、決定的なことは言えないが、テトラマーが成長単位の成長ユニットの GI に比べ、HEWL のモノマーは非対称性が大きいことによると考えている。成果のアウトプットとしては、Crystal Growth & Design 誌に、ステップ前進速度に及ばず微小重力効果について、CrystEngComm 誌に、引力系コロイド結晶における kink 取り込み過程の活性化エネルギーについての報告を行った。また、タンパク質分子の単純化モデルとしてパッチ粒子の相互作用と結晶構造の相関について、シミュレーションした結果を Scientific Reports, Langmuir 誌に投稿した。

(3) 令和 5 年度 :

温度変化と塩濃度変化の両方を総合的に明らかにすることに成功した。2022 年度に、温度変化による活性部位の変化の可能性について、ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) 斜方晶結晶で、自前の常温のデータと Protein Data Bank (PDB) に報告されている極低温における構造との間に活性部位の一部である ASN59 のアミノ残基の位置が 0.3 nm 程ずれていることを確認した。しかし、測定法や結晶化法などによる影響を含む可能性があるため、今年度は、HEWL 正方晶結晶を使い、塩の有無、常温と極低温の、全ての条件の構造解析を行った。その結果、塩の有無に関しては、Na⁺が配位している SER72 の水酸基の位置が、斜方晶系結晶の時と同様に大きく変化していた。また、活性部位については、斜方晶系結晶の時とは違う、TRP62 の向きが 298 K と 90 K の構造解析結果で大きく異なっていた。それに対し、塩の有無は温度が同じであればほとんど影響を及ぼさないことがわかった。以上の結果は、日本物理学会第 78 回年次大会にて発表した。また、関連する内容の結果を、Journal of Crystal Growth、および Modern Physics Letters B で発表した。また、タンパク質分子の単純化モデルとして相互作用を变化させることによって起こるコロイド結晶の構造変化や、タンパク質の分子形状の変化の単純化モデルとしての、コロイド結晶化におけるヘテロエピタキシーについて、シミュレーションした結果を ACS Omega、および Scientific Reports 誌で発表した。

- [1] Akasaka, et al. Chem. Rev.106, 1814-1835, 2006.
- [2] Suzuki, et al. Cryst. Growth Des. 18, 4226-4229, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ryusei Fukunaga, Masahide Sato, Yoshihisa Suzuki	4. 巻 Online ready
2. 論文標題 In-situ observation of homogeneous nucleation of colloidal crystals formed with attractive interactions under density-matching conditions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Modern Physics Letters B	6. 最初と最後の頁 2441017-1~5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1142/S02179849244101732441017-1	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 Yoshihisa Suzuki, Akiho Ikeuchi, Koichiro Taoka, Gen Sasaki	4. 巻 Online ready
2. 論文標題 Solution-mediated phase transition of protein crystals	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Modern Physics Letters B	6. 最初と最後の頁 2441015-1~5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1142/S021798492441015X2441015-1	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 Yoshihisa Suzuki, Kohei Hosokawa	4. 巻 630
2. 論文標題 Very high solubility and low enthalpy of dissolution of orthorhombic lysozyme crystals grown in deionized water	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Crystal Growth	6. 最初と最後の頁 127600-1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcrysgro.2024.127600	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 -

1. 著者名 Masahide Sato	4. 巻 14
2. 論文標題 Formation of various structures caused by particle size difference in colloidal heteroepitaxy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3245-1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-53850-2	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 Ryo Muragishi, Masahide Sato	4. 巻 8
2. 論文標題 Structures Formed by Particles with Shoulderlike Repulsive Interaction in Thin Systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 30450-30458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.3c03624	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 Yoshihisa Suzuki, Ai Ninomiya, Seijiro Fukuyama, Taro Shimaoka, Masae Nagai, Koji Inaka, Shinichiro Yanagiya, Takehiko Sone, Shingo Wachi, Satoshi Kawaguchi, Yasutomo Arai, Katsuo Tsukamoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Highly Purified Glucose Isomerase Crystals under Microgravity Conditions Grow as Fast as Those on the Ground Do	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Crystal Growth& Design	6. 最初と最後の頁 7074-7078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.cgd.2c00751	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 -

1. 著者名 Masahiro Kanno, Yutaka Tsuboi, Shigeki Matsuo, Yoshihisa Suzuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Activation energy of kink incorporation of particles into colloidal crystals with attractive interactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CrystEngComm	6. 最初と最後の頁 1828-1832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ce01524b	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 -

1. 著者名 Masahide Sato	4. 巻 38
2. 論文標題 Two-Dimensional Structures Formed by Triblock Patchy Particles with Two Different Patches	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 15404-15412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c02699	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 -

1. 著者名 Masahide Sato	4. 巻 12
2. 論文標題 Two-dimensional binary colloidal crystals formed by particles with two different sizes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12370-1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16806-y	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 -

1. 著者名 Yoshihisa Suzuki, Shiori Fujiwara, Shoko Ueta, Takashi Sakai	4. 巻 12
2. 論文標題 Precipitant-Free Crystallization of Lysozyme and Glucose Isomerase by Drying	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Crystals	6. 最初と最後の頁 129-1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cryst12020129	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 Masahiro Fuwa, Masahide Sato	4. 巻 61
2. 論文標題 Effect of impurities on tiling in a two-dimensional dodecagonal quasicrystal	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 045504-1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac5530	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 -

1. 著者名 Masahide Sato	4. 巻 11
2. 論文標題 Clusters formed by dumbbell-like one-patch particles confined in thin systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18078-1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97542-7	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木良尚
2. 発表標題 リゾチーム分子構造の塩濃度・温度変化
3. 学会等名 日本物理学会第78回年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 良尚、藤原 汐里
2. 発表標題 結晶化条件の変化によるリゾチーム分子立体構造の変化
3. 学会等名 第51回結晶成長国内会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 汐里、鈴木 良尚
2. 発表標題 蒸発による沈殿剤フリーのタンパク質の結晶化・結晶構造解析
3. 学会等名 第51回結晶成長国内会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 良尚、池光 直人、柳谷 伸一郎
2. 発表標題 タンパク質の高速・高品質結晶化
3. 学会等名 日本物理学会2022年秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 良尚、塚本 勝男、佐崎 元、福山 誠二郎、島岡 太郎、永井 正恵、曾根 武彦、和知 慎吾、荒井 康智、吉崎 泉、神野 真宏、坪井 優、柳谷 伸一郎、松尾 繁樹
2. 発表標題 その場観察による結晶成長機構の解明
3. 学会等名 日本セラミックス協会第35回秋季シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木良尚
2. 発表標題 乾燥によるタンパク質結晶化
3. 学会等名 日本物理学会第77回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木良尚
2. 発表標題 超濃厚溶液からのタンパク質結晶化
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
研究 分担者	佐藤 正英 (SATO Masahide) (20306533)	金沢大学・学術メディア創成センター・教授 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	佐崎 元 (SAZAKI Gen) (60261509)	北海道大学・低温科学研究所・教授 (10101)	

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