

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390054

研究課題名(和文) タンパク質結晶の融液様成長

研究課題名(英文) Melt-like growth of protein crystals

研究代表者

鈴木 良尚 (Suzuki, Yoshihisa)

徳島大学・大学院理工学研究部・准教授

研究者番号：60325248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：塩を使わず遠心濃縮法によって濃度を上げるだけでタンパク質結晶ができる方法を開発した。この方法では液液相分離によって形成される超濃厚相中で結晶が核生成する。成長しつつある結晶表面の分子ステップを観察することに成功した。また、得られたリゾチーム結晶を放射光を用いて構造解析したところ、結晶構造は塩析によってえられた結晶中のものと有意に異なる部分を有した。

研究成果の概要(英文)：Salt-free protein crystallization method with centrifugal concentration apparatus has been developed. With this method, nucleation of hen egg-white lysozyme (HEWL) crystals occurs in hyper-concentrated liquid phase obtained by liquid-liquid phase separation during centrifugal concentration processes. We could successfully observed molecular steps on the obtained crystal surface. Three-dimensional structure of lysozyme molecule obtained in this method is significantly different from that obtained by normal salting-out method.

研究分野：結晶成長

キーワード：脱塩 遠心濃縮 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

シリコンの単結晶の作製法に代表される、融液からの結晶成長は、半導体産業を中心とした産業の根幹を支える重要な材料創製プロセスである。シリコンの無転位単結晶(線欠陥の無い高品質な結晶)は流通しているもので直径 300 mm に達し、450 mm も今後の視野に入っている。

ただ、これらの制御は、膨大な実験結果に基づいた要素技術の集積によって成り立っているもので、本質的な成長メカニズムの解明によって行われているものではない。転位以外の格子欠陥の完全な排除も含めた結晶の更なる高品質化の実現のためには、融液成長の素過程レベルでの結晶化メカニズムの解明は重要である。

しかし、融液成長では一般的に成長界面を観察することが難しく、成長メカニズムを素過程レベルで明らかにすることは出来ない。もし、分子量が大きく、かつ室温付近で融液成長を観察できる結晶があれば、素過程レベルで融液成長を明らかに出来る。本申請では、そのモデル実験系として、分子量(MW)が大きい(MW=14307)、HEWL 結晶のバルク超濃厚溶液相からの成長界面のその場観察を提案した。

鈴木は、H23~24 年度の挑戦的萌芽研究(研究課題番号:24656016)により、遠心透析および濃縮により、HEWL 水溶液の液液相分離および相分離後の超濃厚溶液相($\sim 500 \text{ mgmL}^{-1}$)からの結晶核生成・結晶成長を確認した。この超濃厚溶液相の状態は、結晶中の分子数密度の半分以上の濃度であり、融液とまでは行かないまでもその状態にかなり近い。そのため、通常の希薄環境相(気相や溶液相)から分子が一つ一つ結晶に取り込まれていくというコッセル模型の描像とは大きく異なる新しい結晶化メカニズムが期待される。それを明らかにするには分子の大きさ程度の高さの段差(分子ステップ)を観察する必要があるが、鈴木、佐崎および藤原は、佐崎が 2004 年に開発した共焦点微分干渉顕微鏡を用いて、これまでにタンパク質結晶成長界面の分子ステップを数多く観察してきているため、このような成長界面のステップ観察は十分可能であると考えていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、融液成長に代表される超濃厚環境相からの結晶成長界面の分子取り込み機構を明らかにすることであったが、初期データ以降の定量的なデータを得るためには多くの障害があり、速度論的な詳細データの取得以外に、新たな目的を立てた。

それは、原子レベルでの結晶内の分子構造の解明である。本研究では、融液成長のモデルとして結晶成長機構を取り扱うことを目的としているが、その際に重要になるのは結晶中における結合エネルギーである。結合エ

ネルギーを評価するために使われるマクロボンドエネルギーの算出には、詳細な分子構造及びその結晶中におけるパッキングの情報が必要になる。そのために詳細な分子構造を解明することを新たな目的とした。

3. 研究の方法

ニトリ卵白リゾチーム(HEWL)の水溶液を遠心透析濃縮して得られる超濃厚溶液を用いて、超濃厚溶液からの HEWL の結晶成長過程を共焦点微分干渉顕微鏡(LCM-DIM)を用いてその場観察した。

また、マクロボンドエネルギーの算出に必要な分子構造の解析のために、単結晶 X 線構造解析を行った。高エネルギー加速器研究機構のフotonファクトリーで放射光を用いた結晶構造解析を行うとともに、回転対陰極による徳島大学所有の X 線源による結晶構造解析も同時に行った。

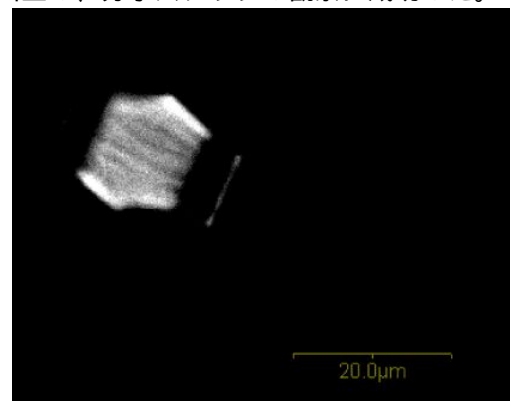
計算機実験では、引力的相互作用を考慮したブラウン動力学(BD)シミュレーションにより、結晶成長界面での濃厚溶液相の形成と濃厚溶液相中の結晶化機構を確認した。

実験と理論で頻りに議論を行い、緊密に連携して研究を進めた。

4. 研究成果

H26 年度

液液相分離後の超濃厚溶液から核生成・成長することを確認した。また、成長した正方晶系リゾチーム結晶の $\{110\}$ 面および $\{101\}$ 面上の、分子ステップの観察に成功した。



ステップのモルフォロジーは、通常の塩析法によって得られた正方晶系結晶の各面上での観察されているものと比較して、特に大きな変化は見られなかった。ステップカイネティック係数が通常のものよりも小さくなったが、オーダーは同じであった。これらの観察結果から、融液に近い高濃度の溶液からの成長(融液様成長)であるにもかかわらず、従来の溶液成長とステップ上のキंक密度や活性化エネルギーに大きな違いがないことが明らかになった。

H27 年度

(1) 超純水中での遠心濃縮法によって得られた HEWL 斜方晶系結晶の構造解析を行い、塩析によって結晶化されたものとの 3 次元分

子構造の比較考察を行った。その結果、塩析によって得られた結晶では、分子の中にナトリウムイオンが存在し、周辺残基との間に水素結合を形成して、酸素原子の正八面体構造を形成しているのに対し、遠心濃縮法による結晶化ではナトリウムイオンが存在せず、そのサイトにおける SER72 のヒドロキシ基の配向に大きな変化が確認できた。

(2) グルコースイソメラーゼでも遠心濃縮による液液相分離を経由した結晶化を確認できた。

構造解析により 1.7 オングストローム程度の最高回折分解能で立体構造がわかったこと、かつ遠心濃縮法によって得られた結晶中における構造がわかったことは原子レベルの情報を得るために必須であり、それが得られたことは意義深い。結晶構造解析によって得られた立体構造は本手法が通常のタンパク質の構造決定に十分使える分解能の結晶を育成できるという意味を持ち、大変重要である。また、グルコースイソメラーゼでも全く同様に結晶化・結晶構造解析を行えることが確認できたことは新たな結晶化法の確立という意味での重要性和、融液様成長がタンパク質の結晶化において、普遍的に重要なプロセスであることを示唆しているという重要性を持つ。

H28 年度

(1) 遠心沈降濃縮によって誘起される液液相分離に関して、pH や溶液の状態によって、濃厚相の粘度が大きく変化することが分かった。最も高粘度のものは超純水中のもので、濃厚相に縫い針を立てると倒れない程度にまでなった。それに対して不凍液であるグリセロールが入ると桁違いに粘度が下がり、流動性が復活した。融液に近い超濃厚環境相の物性が、分子間相互作用の違いによってどのように変化するかをいろいろと試すことができる点が意義深い。濃厚環境相の状態を個々の分子、溶媒の性質によって有意に制御できることが証明できた点が重要である。

(2) 超純水中で遠心沈降濃縮によって結晶化した、HEWL 斜方晶系結晶の構造解析をより詳細に行った結果、既に解明していたナトリウムイオンサイトの周辺部のほかに、活性部位の端に位置する ASP101 がその付近にある ASN103 との相互作用によって、塩析条件と超純水中で大きく位置を変化させることが分かった。活性部位のその他の部分がほとんど変わらないことから、この ASP101 の大きな変化が、塩濃度を少なくしていった時の酵素活性の増加の原因につながっているものと考えられる。活性の増加と、分子構造の変化が直接議論できる点が意義深い。酵素活性と分子構造変化の相関が一つ解明できた点は重要である。

(3) グルコースイソメラーゼ結晶の構造をより詳細に解析したところ、不凍液の成分であるグリセロールが、活性部位にしっかり固定されていることが明らかになった。フラッ

シユクーリングの為の不凍液により、有意な構造変化が誘起される可能性を見いだせた点は意義深い。フラッシュクーリングによって得られるメリットに対し、不凍液添加によるデメリットの一つが明らかになった点は重要である。

以上の結果については、International Organization for Crystal Growth、日本結晶成長学会、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為、これ以上詳細な内容についての掲載は見合わせる。

本研究課題は分担研究者の皆様のご協力なしには成立しなかった。ここに深く感謝申し上げます。また、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ご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 17 件)

1. Ryo Suzuki, Haruhiko Koizumi, Kenichi Kojima, Seijiro Fukuyama, Yasutomo Arai, Katsuo Tsukamoto, Yoshihisa Suzuki, Masaru Tachibana and Satoshi Uda, Characterization of grown-in dislocations in high-quality glucose isomerase crystals by synchrotron monochromatic-beam X-ray topography, Journal of Crystal Growth, 468, 299-304, 2017. 10.1016/j.jcrysgro.2016.10.047, 査読有

2. Masahide Sato, Hitoshi Miura, and Makio Uwaha, Two mechanisms forming a comblike step pattern induced by a moving linear adatom source, Physical Review E, 95, 032803, 2017. 10.1103/PhysRevE.95.032803, 査読有

3. Masahide Sato, Effect of Direction of an External Force on Crystallization of Colloidal Particles in a V-Groove by Sedimentation, Japanese Journal of Applied Physics, 55, 095601, 2017. 10.7567/JJAP.55.095601, 査読有

4. Yoshihisa Suzuki, Yoshiaki Hattori, Jun Nozawa, Satoshi Uda, Akiko Toyotama and Junpei Yamanaka, Adsorption, Desorption, Surface Diffusion, Lattice Defect Formation, and Kink Incorporation Processes of Particles on Growth Interfaces of Colloidal Crystals with

Attractive Interactions, *Crystals*, 6, 80, 2016. 10.3390/cryst6070080, 査読有

5. Haruhiko Koizumi, Ryo Suzuki, Masaru Tachibana, Katsuo Tsukamoto, Izumi Yoshizaki, Seiji Fukuyama, Yoshihisa Suzuki, Satoshi Uda and Kenichi Kojima, Importance of Determination of Crystal Quality in Protein Crystals when Performing High-Resolution Structural Analysis, *Crystal Growth & Design*, 16, 4906-4909, 2016. 10.1021/acs.cgd.6b00457, 査読有

6. Hiroyasu Katsuno, Yuya Maegawa, and Masahide Sato, Two-dimensional Crystal Structure Formed by Two Components of DNA Nano-Particles on a Substrate, *Journal of the Physical Society of Japan*, 85, 074605, 2016. 10.7566/JPSJ.85.074605, 査読有

7. Harutoshi Asakawa, Gen Sazaki, Ken Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, Two types of quasi-liquid layers on ice crystals are formed kinetically, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 1749-1753, 2016. 10.1073/pnas.1521607113, 査読有

8. Hiroyasu Katsuno and Makio Uwaha, Mechanism of chirality conversion by periodic change of temperature: Role of chiral clusters, *Physical Review E*, 93, 013002, 2016. 10.1103/PhysRevE.93.013002, 査読有

9. Yoshihisa Suzuki, Katsuo Tsukamoto, Izumi Yoshizaki, Hitoshi Miura and Takahisa Fujiwara, First Direct Observation of Impurity Effects on the Growth Rate of Tetragonal Lysozyme Crystals under Microgravity as Measured by Interferometry, *Crystal Growth & Design*, 15, 4787-4794, 2015. 10.1021/acs.cgd.5b00456, 査読有

10. Takahisa Fujiwara, Yoshihisa Suzuki, Izumi Yoshizaki, Katsuo Tsukamoto, Kenta Murayama, Seiji Fukuyama, Kouhei Hosokawa, Kentaro Oshi, Daisuke Ito, Tomoya Yamazaki, Masaru Tachibana and Hitoshi Miura, Correction of the equilibrium temperature caused by slight evaporation of water in protein crystal growth cells during long-term space experiments at International Space Station, *The Review of Scientific Instruments*, 86, 083704, 2015. 10.1063/1.4928491, 査読有

11. Kazuhiro Kishi, Masashi Kawaguchi, Hitoshi Miura, Masahide Sato, Makio Uwaha, Relation between the Step Pattern and the Velocity of the Moving Linear Adatom Source, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, 13, 269-274, 2015. 10.1380/ejssnt.2015.269, 査読有

12. Yoshihisa Suzuki, Atsushi Mori, Masahide Sato, Hiroyasu Katsuno and Tsutomu Sawada, Colloidal crystallization on tilted substrates under gravitational fields, *Journal of Crystal Growth*, 401, 905-909, 2014. 10.1016/j.jcrysgro.2013.11.101, 査読有

13. Mamoru Fujine, Masahide Sato, Tetsuya Toyooka, Hiroyasu Katsuno, Yoshihisa Suzuki and Tsutomu Sawada, Crystallization of Brownian particles in thin systems constrained by walls, *Physical Review E*, 90, 032404, 2014. 10.1103/PhysRevE.90.032404, 査読有

14. Haruhiko Koizumi, Masaru Tachibana, Izumi Yoshizaki, Seiji Fukuyama, Katsuo Tsukamoto, Yoshihisa Suzuki, Satoshi Uda and Kenichi Kojima, Dislocations in High-quality Glucose Isomerase Crystals Grown from Seed Crystals, *Crystal Growth & Design*, 14, 5111-5116, 2014. 10.1021/cg500731v, 査読有

15. Masahide Sato, Hiroyasu Katsuno and Yoshihisa Suzuki, Ordering of Brownian Particles from Walls Due to an External Force, *Journal of Crystal Growth*, 401, 87-92, 2014. 10.1016/j.jcrysgro.2014.01.074, 査読有

16. Gen Sazaki, Harutoshi Asakawa, Ken Nagashima, Shunichi Nakatsubo, Yoshinori Furukawa, Double spiral steps on Ih ice crystal surfaces grown from water vapor just below the melting point, *Crystal Growth & Design*, 14, 2133-2137, 2014. 10.1021/cg4014448, 査読有

17. Hiroyasu Katsuno and Masahide Sato, Cluster diffusion on two-dimensional surface with immobile impurities, *Journal of Crystal Growth*, 401, 504-507, 2014. 10.1016/j.jcrysgro.2013.10.050, 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Gen Sazaki, Harutoshi Asakawa, Ken-ichiro Murata, Ken Nagashima, Shunichi Nakatsubo, and Yoshinori

Furukawa, In Situ Observation of Ice Crystal Surfaces by Advanced Optical Microscopy (invited), The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, 2016/8/11, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

2. Yoshihisa Suzuki, Takahisa Fujiwara, and Shoko Ueta, Protein Crystallization by Slow Evaporation of Precipitant-free Solution in the Presence of Hydrochloric Acid, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, 2016/8/10, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

3. Takahisa Fujiwara, Daido Nakahashi, Shin-ichiro Yanagiya, and Yoshihisa Suzuki, Step velocities of glucose isomerase crystals in the presence of hen egg-white lysozyme in solution, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, 2016/8/9, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

4. Masahide Sato, and Makio Uwaha, Relation between the period of protrusions in a comb-like step pattern and the velocity of adatom source moving in front of the step, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, 2016/8/9, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

5. Yuya Maegawa, Hiroyasu Katsuno, and Masahide Sato, Crystal lattice structure of two components of DNA nano particles on a substrate, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, 2016/8/8, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

6. Masahide Sato, Effect of Direction of External Force on Crystallization of Colloidal Particles in a V-Groove in Sedimentation, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, 2016/8/8, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

7. 鈴木良尚、真板宣夫、グルコースイソメラーゼの沈殿剤フリー結晶化と結晶構造解析、日本物理学会第71回年次大会、2016/3/21、東北学院大学 (宮城県・仙台市)

8. Yoshihisa Suzuki, Katsuo Tsukamoto, Takahisa Fujiwara, Tomohiro Shiomoto, Daido Nakahashi, Izumi Yoshizaki, Seiji Fukuyama, Masaru Tachibana, Haruhiko Koizumi, Shin-ichiro Yanagiya, Yasutomo Arai, and Makoto Natuisaka, Recent

Advances on the Ground-Based Experiments of Protein Crystallization after the NanoStep Project, The Joint Conference of 6th International Symposium on Physics in Space & 10th International Conference on Two-Phase System for Space and Ground Applications, 2015/9/18, 同志社大学 (京都府・京都市)

9. Gen Sasaki, Harutoshi Asakawa, Ken-ichiro Murata, Ken Nagashima, Shunichi Nakatsubo, Yoshinori Furukawa, In situ observation of surface melting processes of ice crystals by advanced optical microscopy, International Symposium on Semiconductor Materials and Devices (invited), 2015/2/2~2/5, Anna University (Chennai, India).

10. Yoshihisa Suzuki, Masayuki Tsukamoto, Takahisa Fujiwara, and Yuta Uehara, High pressure crystallization and crystallography of glucose isomerase, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014) (invited), 2014/8/5~8/12, Palais des congress de Montreal (Montreal, Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 良尚 (SUZUKI, Yoshihisa)
徳島大学・大学院理工学研究部・准教授
研究者番号：60325248

(2) 研究分担者

佐崎 元 (SAZAKI, Gen)
北海道大学・低温科学研究所・教授
研究者番号：60261509

佐藤 正英 (SATO, Masahide)
金沢大学・総合メディア基盤センター・教授
研究者番号：20306533

勝野 弘康 (KATSUNO, Hiroyasu)
立命館大学・理工学部・助教
研究者番号：70377927

藤原 貴久 (FUJIWARA, Takahisa)
徳島大学・大学院理工学研究部・教務補佐員
研究者番号：10648695