

学位論文審査の結果の要旨

氏名	阿部 満理奈		
学位の種類	博士（理学）		
学位記番号	甲 第 1919 号	※論文博士は乙	
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当 ※論文博士は第4条第2項		
学位論文題目	Existence of twisting in dislocation-free protein single crystals		
主指導教員	橘 勝		
論文審査委員	(主査) 横山 崇	教授	
	(副査) 山田 重樹	准教授	
	(副査) 立川 仁典	教授	
	(副査) 吉本 和生	教授	

論文内容の要旨

高品質なタンパク質結晶は、これまでも微小重力下、ゲル中、電場・磁場下など様々な手法によって育成されてきた。しかしながら、無機物のシリコンやダイヤモンドのような物理的に完全な結晶はほとんど得られていない。これは、タンパク質分子間の結合が弱く複雑であることによると考えられている。このようなタンパク質結晶が、物理的にどの程度の完全性を示すのか、また、どのような結晶欠陥をもつのかを明らかにすることは、結晶学における基礎的側面だけでなく、タンパク質の構造解析や新材料開発においても重要である。

本研究では、結晶を構成するタンパク質分子の形状に着目し、デジタルX線トポグラフィ技術を駆使して、タンパク質結晶の完全性の解明を行った。結果として、球状分子から成るフェリチン結晶においては、完全結晶を示すX線の動力的回折現象の観察に成功した。一方で、一般的に非対称な形状をもつタンパク質分子からなるリゾチーム、タウマチン、リボヌクレアーゼ結晶では、動力的回折現象は観測されず、結晶全体にわたって均一に微少なねじれが存在することを世界ではじめて明らかにした。本発見は、タンパク質結晶に限らず非対称分子から構成されている分子性結晶の一般的な性質であることも提案した。

本論文では、1～2章で研究背景と先行研究を述べ、3章では本研究のひとつ目のトピックスであるフェリチン結晶における完全結晶を示す動力的回折現象の観察

に関する研究、4章ではふたつ目のトピックスで主論文でもあるリゾチーム、タウマチン、リボヌクレアーゼ結晶の微小ねじれの観測に関する研究、5章では、本研究のまとめが記述されている。以下に、本研究のトピックスである3章、4章の具体的な研究内容に関して要約する。

3章では、球状分子から成るフェリチン結晶における完全結晶を示す動力的回折現象の観察が示されている。フェリチン結晶の厚さが連続的に変化するくさび形の領域にX線の多重散乱に起因する干渉縞が明確に観察された。この干渉縞がX線の入射角によって変化する様子も観察された。これらの干渉縞の間隔の変化が動力的回折理論によるものと極めて良い一致を示し、フェリチン結晶が完全結晶であることを明らかにした。一方で、動力的回折現象の一つとしてロッキングカーブ振動も観察された。しかし、このロッキングカーブ振動は今回の結晶のように結晶サイズが小さい場合は運動学的回折による振動と区別できなくなることもわかった。したがって、このような小さな結晶における完全結晶の評価には、干渉縞の解析が有効であることを明らかにした。

4章では、主に非対称分子からなるリゾチーム結晶の微小ねじれの観測が示されている。ハンギングドロップ法により無転位の高品質なリゾチーム結晶の4つの多形（正方晶、斜方晶、単斜晶、三斜晶）が育成された。デジタルX線トポグラフィによって、いずれの結晶も $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ }^\circ/\mu\text{m}$ オーダーの微小ねじれが観察された。このねじれの観測は、タンパク質結晶では世界ではじめてのものであり、他の無機結晶や有機結晶で観察されているねじれの大きさに比べても遥かに小さなねじれであることが明らかとなった。また、このねじれの大きさは、結晶サイズに強く依存することも明らかにした。さらに、興味深いことに、ねじれの方向が単斜晶のみ右巻きで、それ以外の晶系では左巻きであることがわかった。これらの結果から、本研究で観察された微小ねじれの起源は、結晶の幾何学的構造とは関係なく、分子あるいは分子間相互作用といったタンパク質分子本来の性質であることも明らかにした。また、本研究で観察された微小ねじれが高品質なタンパク質結晶に残存するイントリンジックな不完全性の起源であることも明らかにした。

以上の研究より、タンパク質結晶の完全性が、それを構成するタンパク質分子あるいはその分子間相互作用と密接に関係していることを明らかにした。特に、本研究で明らかになった微小ねじれは、タンパク質結晶に限らず、非対称な分子からなる一般の分子性結晶においてもみられる本質的な現象であることが提案された。また、本研究で確立されたデジタルX線トポグラフィによるねじれの観察手法を用いることによって、これまでに知られていないより多くのねじれ結晶が観察され、ねじれがより一般的な現象であることが実験的に証明されるかもしれない。これは、これまでの結晶の概念を覆すような結果であり注目される成果と言える。

論文審査結果の要旨

申請者である阿部満理奈による「Existence of twisting in dislocation-free protein single crystals」に関する口頭発表、補足説明、および論文内容について、主査および副査による質疑が行われた。

まず専門分野に関する質疑が行われた。山田副査より「ねじれは結晶の空間群でみられるらせん軸と関係はないか」という質問があり、「らせん軸をもたない結晶多形の三斜晶系の実験も行っており、明確なねじれが観察されたことから、ねじれと空間群のらせん軸は関係ないと考えている」との回答があった。吉本副査より「非対称分子から構成されている結晶でねじれが観察されたということだが、非対称分子からなる完全結晶が得られたらどうなるか」という質問があり、「完全結晶を実験的に得ることは興味があるが、まだ実験的には得られていない」との回答があった。立川副査より、「シミュレーションでベンジル結晶のねじれが報告されているようだが、すでにベンジル結晶のねじれは実験的に報告されているのか」という質問があり、「マイクロメートルサイズの結晶で大きなねじれが光学顕微鏡で観察されているが、申請者はミリメートルサイズのベンジル結晶も作製して、タンパク質結晶だけでなく分子性結晶のベンジル結晶でも微小ねじれが存在することを初めて観察した」との回答があった。続いて、「このように分子レベルからマクロなレベルへねじれが引き継がれるシミュレーションは非常に興味深いが、この類のシミュレーションは他にも行われているのか」との質問があり、「紹介した先行研究以外に行っているグループは知らない」との回答があった。横山主査より、「先行研究ではオングストロームオーダーの結晶のねじれのシミュレーションであって、本研究ではそれよりも遥かに大きなミリメートルサイズの結晶においてねじれが残存していることを見つけたということなのか」とのコメントがあり、「その通りです」との回答があった。吉本副査より、「要旨の最後の方にねじれの制御の話が書かれているが、どのようなイメージを持っているか」との質問があり、「現段階では、大きな結晶を作るのがねじれの無い結晶を得ることに繋がると考えている」との回答があった。横山主査より、「微小重力、ゲル中など成長条件によってねじれが制御できるのか」との質問があり、「現在のところ、濃度を変えたり、ゲル中で育成したりしても、本研究で見られるねじれは制御できず、いつも結晶サイズに依存する一つの傾向にのり、本研究で観察されたねじれは結晶のイントリンジックな性質であると考えている」との回答があった。横山主査より「ほかの回折面での測定もしているのか」との質問があり、「発表で示した回折面以外にも他の様々な回折面の測定から、どの方向にねじれているかを結晶学的に同定している」との回答があった。以上より、かなりの量の緻密な実験が行われており、質疑応答からも高い専門性を備えていると判断した。

次に、関連する分野に関する質疑が行われた。最初に横山主査より「TEMにおいても同様なイメージングと解析ができると思うが、それは行われているのか」との質問があり、「他のグループで成長過程の観察が行われているが、ねじれは観察されていない。また、本研究のX線トポグラフィはTEMに比べて角度分解能が高いことから今回のような微小なねじれが観察されたと考えている。分解能的には3桁ぐらい違うと思われる」との回答があった。立川副査より「シミュレーションに関してどのような手法を知っているか」との質問があり、「分子間距離や結合角をパラメータとしてエネルギーを最小にするような構造最適化のシミュレーションの知識しかない」との回答があった。横山主査より「動力学的回折と運動学的回折の違いを説明できるか」との質問があり、「動力学的回折はX線の多重散乱によるもので、運動学的回折は一回の回折によるものである」との回答があった。続いて、「干渉縞が見える理由はなぜか」との質問に対して、「結晶の厚さが連続的に変化しているようなくさび形の領域で厚さに依存した干渉縞が観察される」との回答があった。吉本副査より「今回の発表では、ねじれの大きさと結晶サイズとの相関を示していたが、他の物性などに関してもサイズ効果のような現象はあるのか」との質問があり、「サイズ効果ではないが、半導体結晶の移動度やフォトルミネッセンスがねじれの大きさに強く依存するといった興味深い報告がある」との回答があった。山田副査より「高エネ研では20Bと14Bを利用しているようだが、どのようなビームラインなのか」との質問があり、「20Bはトポグラフィ専用のビームラインで、14Bは精密回折のビームラインでトポグラフィ以外にもCTなどの実験も行われている。特に、20Bではビームライン担当者と共同研究でX線CCDカメラを用いたデジタルX線トポグラフィシステムの構築を行った」と回答があった。以上より、申請者は専門分野だけでなく関連分野の知識も十分に備えていると判断した。

最後に、英語に関する質疑応答が行われた。横山主査より「論文は自分で執筆したか、レフェリーとのやり取りも自分で行ったか」との質問があり、「指導教員のチェックを受けているが、投稿手続きも含めてすべて自分で行った」との回答があった。続いて、「国際会議での発表の経験はあるか」との質問があり、「修士課程では国際会議等での数回の英語での口頭発表を行っているが、博士課程ではコロナ禍で発表ができなかった」との回答があった。以上より、コロナの影響で博士課程では英語での口頭発表を行うことはできなかったが、英語論文の執筆や博士審査論文の内容からも英語の能力は十分な水準に達していると判断した。

申請者は、第一著者として2報の原著論文が著名な学術誌にアクセプトされており、そのうち主論文の1報は世界トップジャーナルのPNAS (IF: 12.777) に掲載されていることから、十分な研究内容であることが伺える。以上の理由より、申請者は、専門分野だけでなく、関連する理学の知識、および、研究を独力で遂行し得る十分な能力を備えており、総合的に博士(理学)の学位を授与するのに相応しいと判断した。