

論文内容要旨

Existence of twisting in dislocation-free protein single crystals

タンパク質結晶の微小なねじれの観測

学位申請者氏名：阿部 満理奈

研究指導教員：橘 勝

1. 序

タンパク質結晶とは、ナノメートルサイズの巨大で複雑なタンパク質分子が周期的に配列した物質である。タンパク質分子間の結合は非常に弱く複雑であり、凝集エネルギーすら見積もられていない。温度、pH、濃度などの結晶化条件のわずかな違いによって、結晶構造の異なる多形が現れ、結晶化すら難しいものも多い[1]。さらに、結晶内には 30–80 vol.%もの多量の水分子を含んでいる。これらの特徴は、一般の無機結晶や分子量の比較的小さな有機物から成る低分子有機結晶と大きく異なる。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理解することは、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といった応用においても非常に重要である。しかし、タンパク質結晶は育成や取扱いが難しいため、結晶の完全性や結晶欠陥などの物理的側面からの研究は極めて少ない。

結晶の完全性はX線回折法によって評価することができる。X線回折は大きく分けると動力学的回折と運動学的回折の2つに分類される[2]。動力学的回折はX線が結晶内で多重散乱するもので、完全結晶に極めて近い高品質な結晶においてのみ起こる現象である。一方で、運動学的回折は主に1回のみの回折で、モザイク結晶などの欠陥を多く含んだ結晶において起こる現象である。この完全結晶とモザイク結晶を両端とした場合、世の中に存在する結晶はその完全性に応じて間に位置している。したがって、動力学的回折が観察されるかどうか？ということが結晶の完全性に対して重要な指標となる。この動力学的回折は Si、Ge、ダイヤモンドのようなごく限られた高品質な結晶でのみ報告があった。

一方で、最近ではタンパク質結晶の1つであるグルコースイソメラーゼ (GI) 結晶において、結晶の完全性に由来する X 線の動力学的回折現象が観測されている[3]。これにより、タンパク質結晶の完全結晶の可能性が提案された。しかし、なぜ GI 結晶で完全性の高い結晶が得られたのか、その理由については未だ理解されていない。また、これまでも高品質なタンパク質結晶を目指した育成法が世界中で開発されているものの、GI 結晶と同等な完全性の高いタンパク質結晶は得られていない。これらの理由は、タンパク質結晶の完全性の起源が十分に理解されていないことに起因する。

タンパク質結晶の完全性の起源解明に向けて、転位などの結晶内の欠陥の理解や結晶の品質評価は重要である。結晶内の欠陥を評価する手法の1つに X 線トポグラフィ法がある[2,4]。この手法では、結晶中の転位といった格子欠陥を非破壊で観察することができる。また、近年発達した手法であるデジタル X 線トポグラフィ法*では、結晶を微小回転させながら X 線 CCD カメラで連続的にデジタルトポグラフ像を取得することで、結晶内の微小なひずみを非破壊で観察することができる[5]。

本研究ではタンパク質結晶の完全性の解明に向けて、結晶を構成するタンパク質分子の形状に着目した。GI 結晶は図 1(a)に示すような球状の GI 分子によって構成されている。本研究では GI 分子と同様に球状分子であるフェリチン (図 1(b)) で構成された『フェリチン結晶』の放射光単色 X 線トポグラフィ観察を行った。結果として、フェリチン結晶においても、GI 結晶と同様な結晶の完全性に由来する X 線の動力学的回折現象が観測された。したがって、タンパク質分子の球状な形状が完全性の要因であることを示した。

さらに、この仮説を実証するため、非対称な形状のタンパク質分子で構成されたリゾチーム結晶とタウマチン結晶において、同様の測定を行った。それぞれの分子形状を図 1(c), (d)に示す。結果として、非対称な形状の分子で構成されたタンパク質結晶においては、上述のような結晶の完全性は確認されなかった。一方で、これらの結晶では、光学顕微鏡や電子顕微鏡では観測できない微小なねじれの存在が明らかにした。これらの結果は、結晶を構成する分子の非対称性が結晶の完全性の起源であ

る可能性を示している。また、タンパク質結晶のねじれを制御・抑制することで、高品質化が期待される。

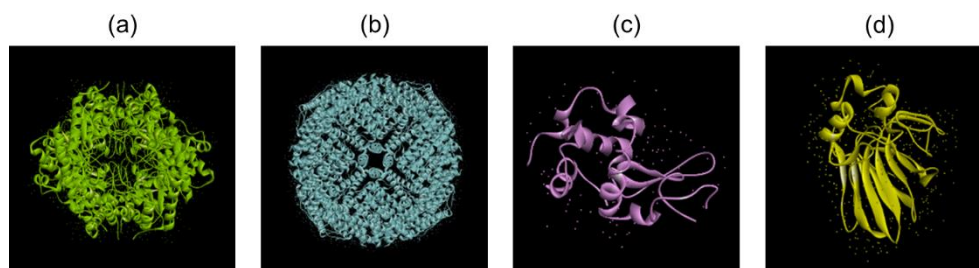


図 1. タンパク質分子の形状

(a)グルコースイソメラーゼ(GI), (b)フェリチン, (c)リゾチーム, (d)タウマチン

2. 実験方法

1) フェリチン結晶の作製

本研究では、Sigma-Aldrich社から購入したウマ脾臓由来のフェリチン溶液を試料として用いた。フェリチン 1.06 mg/mL、酢酸-酢酸ナトリウムバッファー (pH5.0) 0.2 M、硫酸カドミウム 125 mM に調製し、ハンギングドロップ法を用いて結晶の作製を行った。次に、得られた結晶を種結晶とし、自作のサンプルホルダー内に移し替えて再成長を行った。20 °C で 2 週間静置させることで、150 μm 程度の結晶が得られた。

2) リゾチーム結晶の作製

ハンギングドロップ法を用いて正方晶リゾチーム結晶の作製を行った。試料には富士フィルム和光純薬株式会社およびナカライテスク株式会社から購入したリゾチーム粉末を用いた。成長溶液はリゾチーム 40 mg/mL、酢酸-酢酸ナトリウムバッファー (pH4.5) 0.1 M、塩化ナトリウム 0.5 M に調製した。21 °C で 1 日静置させることで 100 μm 程度の種結晶が得られた。次に、得られた結晶を種結晶とし、自作のサンプルホルダー内で再成長を行った。23 °C で 1 週間静置させることで、最大で 3 mm の結晶が得られた。

3) X線トポグラフィ・デジタルトポグラフィ測定

測定は高エネルギー加速器研究機構の PF BL-14B および BL-20B において 23 °C で行った。幾何学的な配置を図 2 に示す。Si の二結晶分光器を用いて波長 1.2 Å に単色化し、入射 X 線とした。ビームサイズ 3×5 mm² の入射 X 線を用いて、結晶全体の測定を行った。デジタル X 線トポグラフィ測定では、結晶を精密ゴニオメーターに固定し、ブラッグ角近傍で結晶を一軸で微小回転させ、100 枚程度の連続したデジタル X 線トポグラフ像を X 線 CCD カメラ (Photonic Science X-RAY FDI 1.00:1, effective pixel size: 6.45×6.45 μm^2) で取得した。得られた連続トポグラフ像を解析することにより、ロッキングカーブの半値幅 (FWHM) やピーク位置の見積もりを行った。さらに、解析ソフトウェアを用いてこれらのマッピング像を作成した[6]。また、X 線トポグラフィ観察には高分解能 X 線フィルム (Agfa D2) を用いた。

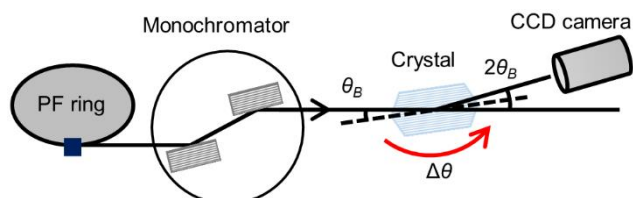


図 2. デジタルトポグラフィ測定の実験的配置

3. 研究結果・考察

1) 球状分子で構成されたタンパク質結晶の X 線トポグラフィ測定

得られたフェリチン結晶の光学顕微鏡像を図 3(a)に示す。150 μm 程度の結晶の作製に成功した。また、フェリチン結晶の模式図を図 3(b)に示す。フェリチン結晶にはくさび形領域（厚さが連続的に変化する領域）が存在していることが確認できる。

次に、異なる回折角度で撮影したフェリチン結晶のトポグラフ像を図 3(c)、(d)に示す。どちらのトポグラフ像においても、結晶のくさび形領域で干渉縞が観察された。一般に、完全結晶における動力学的回折では、X線の多重散乱により結晶のくさび形領域において干渉縞が生じる。そこで、動力学的回折理論に基づいて、くさび形領域の厚さに対応した干渉縞の振る舞いを解析した。

図 3(e)、(g)に干渉縞の見られた領域の回折強度の変化、図 3(f)、(h)に動力学的回折理論から予測される干渉縞の強度分布を示す。両回折角度位置において、干渉縞の本数と周期が非常に良い一致を示した。したがって、フェリチン結晶では X 線の動力学的回折が支配的に生じており、GI 結晶と同様な完全結晶であることが明らかとなった。これらの結果は結晶を構成するタンパク質分子の対称性が完全結晶の起源である可能性を示唆している。

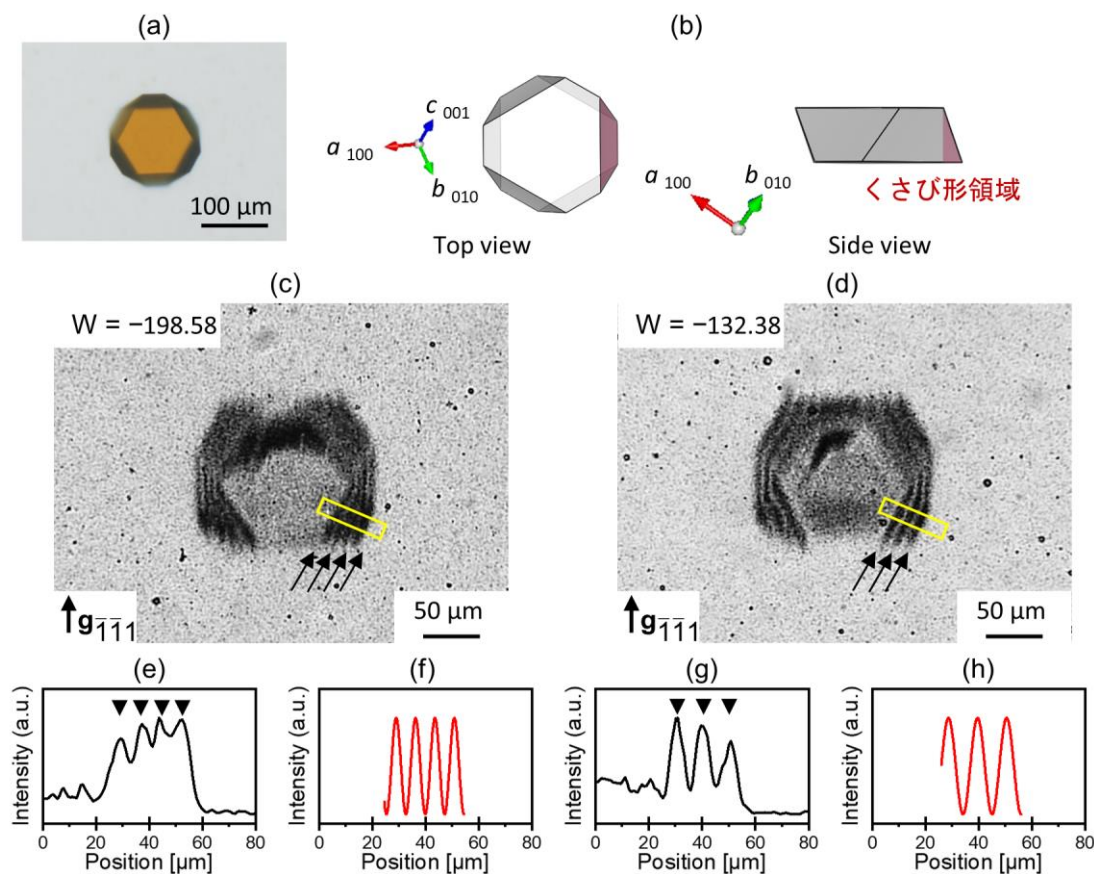


図 3. (a)フェリチン結晶の光学顕微鏡像、(b)模式図、(c)(d)トポグラフ像、干渉縞のコントラストの(e)(g)実験値と(f)(h)理論値

2) タンパク質結晶における微小なねじれの観測

上述の研究結果より、タンパク質結晶の完全性は結晶を構成するタンパク質分子の対称性に由来する可能性がある。そこで、非対称な形状を持つタンパク質分子から構成されるリゾチーム結晶に着目する。図 4(a)に得られた正方晶リゾチーム結晶の光学顕微鏡像を示す。結晶構造に対応した晶壁面を持つことが分かる。得られた結晶を図 4(b)のように固定し、デジタルトポグラフィ測定を行った。正方晶リゾチーム結晶のデジタル X 線トポグラフィ像 (slice images) を図 4(c)に示す。図中の白いライン状のコントラストは回折強度の強い領域を示している。微小回転させると、ブラッグ回折を満たす領域が移り変わる様子が観察された。移り変わる方向は結晶の回転方向とは一致せず、結晶の回転軸と平行な方向に一致している。

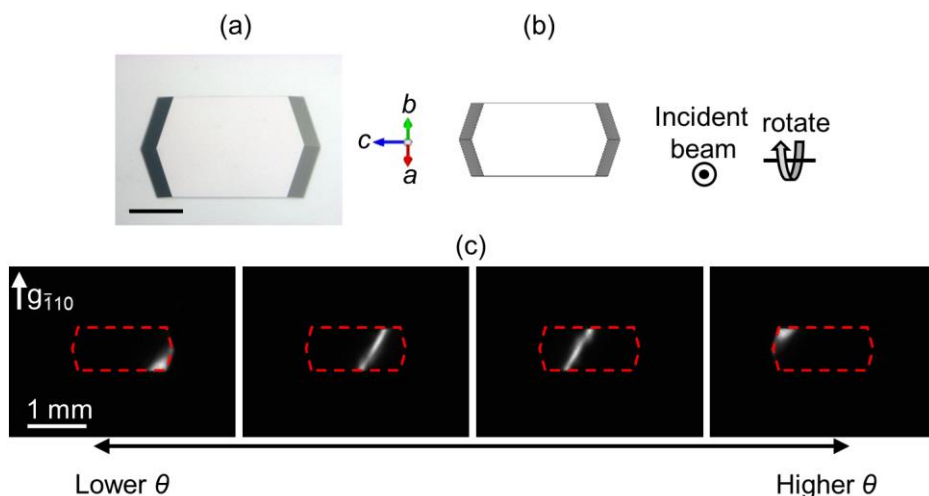


図 4. (a) 正方晶リゾチーム結晶の光学顕微鏡像、
(c) 幾何学的な配置と (b) デジタル X 線トポグラフィ像

光学顕微鏡像中のスケールバーは 500 μm に対応している。

このような現象は図 5(a)に示すように結晶のねじれによって説明できる。そこで、結晶の品質とねじれの大きさを調べるために、デジタル X 線トポグラフィ像の解析を行った。重ね合わせたデジタル X 線トポグラフィ像 (median 像) を図 5(b)に示す。測定したリゾチーム結晶は転位などの欠陥のない高品質な結晶であることが確認できる。したがって、転位のない高品質な結晶においてもねじれが存在している。次に、図 5(c)に回折角度位置のマッピングを示す。また、図 5(c)の白線領域における回折角度位置の変化を図 5(d)に示す。これらの図より、回折角度位置が結晶の c 軸に沿って連続的かつ一様に変化していることがわかる。これは測定した正方晶リゾチーム結晶に均一なねじれが存在していることを示している。回折角度位置の変化の傾きはねじれの大きさに対応しており、ねじれの大きさは $1.4 \times 10^{-5} \text{ }^\circ/\mu\text{m}$ と見積もられた。これまでに結晶のねじれに関する研究は 100 年以上にわたって行われており、世の中に存在する分子結晶の 25% 以上はねじれているといった大胆な予測もある [7]。しかし、これらの研究は光学顕微鏡や電子顕微鏡で確認できる大きなねじれ (10^{-3} から $10^4 \text{ }^\circ/\mu\text{m}$) に限られている。今回観測されたねじれは極めて微小なため、光学顕微鏡などの従来のねじれの測定方法では検出することができない。今回、デジタル X 線トポグラフィ法により、結晶外形から確認できない微小なねじれの観測に世界で初めて成功した。

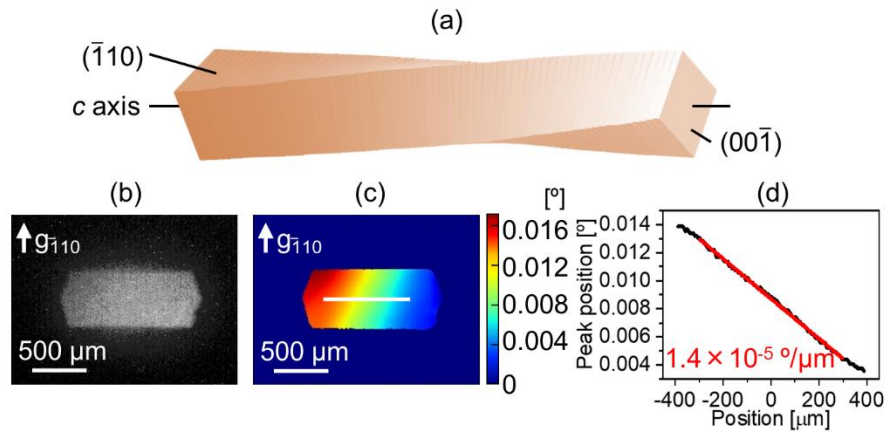


図 5. (a)ねじれている結晶のモデル、(b)デジタルトポグラフィ像
(c)回折角度位置のマッピング、(d)(c)の白線領域の回折角度位置の変化

また、様々なサイズの正方晶リゾチーム結晶において同様の測定と解析を行った。測定した 55 個の結晶はすべて左巻きにねじれていた。図 6(a)に結晶サイズとねじれの大きさの関係を示す。ここで、結晶サイズは短軸方向の長さを示している。結晶サイズが小さいほど、ねじれは大きいという相関がある。結晶サイズが小さい場合には非対称な分子の形状を反映してねじれが現れていると解釈できる。一方で、結晶サイズが大きいほど、ねじれは小さい。これは、ねじれている結晶は結晶学的には不安定なため、結晶成長とともにねじれが緩和していると考えられる。また、図 6(a)中の赤のプロットは転位のない結晶、青のプロットは転位のある結晶を示している。したがって、ねじれと転位には関係がないことが確認できる。

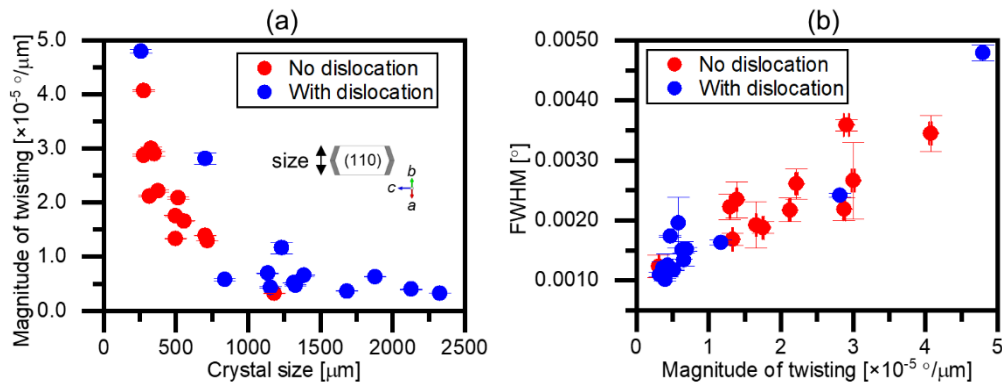


図 6. ねじれ度合いと(a)結晶サイズ、(b)ロックンカーブの半値幅の相関

さらに、図 6(b)に示すように、ねじれは結晶の品質評価の指標の 1 つであるロックンカーブの半値幅ともよい相関を示した。ねじれが小さいほど半値幅の狭く、結晶の品質が高いことが分かる。さらに、これらの相関は結晶欠陥である転位の存在には依存しない。したがって、結晶内のねじれを制御することで、さらなる結晶の品質向上が期待される。

同様の測定をタウマチン結晶において行ったところ、リゾチーム結晶と同程度の微小なねじれが観測された。一方で、極めて高品質な 2 種類のタンパク質結晶 (GI 結晶とフェリチン結晶) ではねじれが確認されなかった。冒頭で述べたように、ねじれの観測されたリゾチーム分子やタウマチン分

子はいびつな形状（クロワッサン型）であるのに対し、GI 分子とフェリチン分子は球のような高い対称性を持つ形状である。タンパク質結晶の微小なねじれは結晶を構成する分子の非対称な形状によって引き起こされていると考えられる。

これまでに、ねじれ結晶の起源として格子欠陥であるらせん転位や表面の応力の影響など外的 (extrinsic) 要因による様々なメカニズムが提案させているものの、未解明な点が多く、系統的な研究は発展途上にある。近年、結晶がねじれる起源として、『geometric frustration (幾何学的フラストレーション) mechanism』*がシミュレーションによって提案された[8]。このメカニズムでは、分子の非対称な形状によって結晶がねじれるといった内的 (intrinsic) 要因つまり構成分子自体の形状および分子間相互作用といった原理的な要因が提案された。本研究はその概念のはじめての実験的な証拠となる可能性がある。

以上より、転位のない高品質なタンパク質結晶の微小なねじれの観察に初めて成功した。このようなねじれが結晶の品質低下を引き起こしていることが明らかになった。欠陥であるねじれの起源を解明し、ボトムアップ的にねじれの制御を行うことで、高品質な結晶の育成法の確立が期待できる。本研究はタンパク質結晶のみならず、高品質な結晶育成が求められる様々な分野において重要な知見になると言える。さらに、この微小ねじれの発見は、タンパク質結晶に限らず多くの非対称な分子から構成されている結晶の一般的な性質であることを示唆しており、本手法を用いてまだ知られていない多くのねじれ結晶の発見につながることを期待される。

4. まとめ

- 1) 球状タンパク質の結晶において、動力的回折現象の観測に成功した。球状分子がタンパク質結晶の完全性の起源であると考えられる。
- 2) 非対称な形状のタンパク質の結晶において、結晶の微小なねじれの観測に世界で初めて成功した。
- 3) 微小なねじれの存在が結晶の品質を低下させる要因であることを示した。
- 4) タンパク質結晶の微小なねじれは結晶を構成する分子の非対称な形状によって引き起こされていると考えられる。

5. 参考文献

- [1] N. E. Chayen, J. R. Helliwell, E. H. Snell, *Macromolecular Crystallization and Crystal Perfection* (Oxford University Press, Oxford) 2010.
- [2] A. Authier, *Dynamical Theory of X-Ray Diffraction* (Oxford Science Publications, Oxford) 2001.
- [3] R. Suzuki et al., Analysis of oscillatory rocking curve by dynamical diffraction in protein crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, 3634–3639 (2018).
- [4] D. K. Bowen, B. K. Tanner, *High Resolution X-Ray Diffractometry and Topography* (Taylor & Francis, London) 1998.
- [5] D. Lübbert, T. Baumbach, J. Härtwig, E. Boller, E. Pernot, μm -resolved high resolution X-ray diffraction imaging for semiconductor quality control. *Nucl. Instr. and Meth. In Phys. Res. B* **160**, 521–527 (2000).
- [6] R. Suzuki, M. Abe, K. Kojima, M. Tachibana, Identification of grown-in dislocations in protein crystals by digital X-Ray topography. *J. Appl. Cryst.* **54**, 163–168 (2021).
- [7] A. G. Shtukenberg, Y. O. Punin, A. Gujral, B. Kahr, Growth actuated bending and twisting of single crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 672–699 (2014).
- [8] E. Efrati, Geometric frustration in molecular crystals. *Isr. J. Chem.* **60**, 1185–1189 (2020).

6. 用語集

- * **デジタル X 線トポグラフィ法** : 一般に X 線トポグラフィとは X 線回折を用いて結晶内の欠陥を観察する手法である。デジタル X 線トポグラフィ測定では X 線検出器にデジタル検出器を用いることで、ブラック回折の連続的な変化を観測し、ローカルからグローバルな領域の結晶性の評価をすることができる。

- * **geometric frustration (幾何学的フラストレーション) mechanism** : 結晶がねじれるメカニズムの1つとして近年提案されている。レゴブロック (完全にぴったりと隣に並べられるもの) を並べる場合とは異なり、(形を持った) 分子が集まると、分子間に避けられない misfit があるため、分子スケールでねじれが生じる。一方で、このようなねじれは結晶学的な対称性とは矛盾した構造であるため、結晶成長とともに緩和するとシミュレーションによって提案されている。

7. 論文リスト

主論文

- [1] Marina Abe, Ryo Suzuki, Keiichi Hirano, Haruhiko Koizumi, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana: Existence of twisting in dislocation-free protein single crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 119, e212084611, 2022.
(Impact Factor: 12.291)
- [2] Marina Abe, Ryo Suzuki, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana: Evaluation of crystal quality of thin protein crystals based on the dynamical theory of X-ray diffraction. *IUCrJ* 7, 761-766, 2020.
(Impact Factor: 5.401)

参考論文

- [3] Ryo Suzuki, Marina Abe, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana: Identification of grown-in dislocations in protein crystals by digital X-ray topography. *J. Appl. Cryst.* 54, 163-168, 2021.
(Impact Factor: 2.995)
- [4] Ryo Suzuki, Chika Shigemoto, Marina Abe, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana: Analysis of slip systems in protein crystals with a triclinic form using a phenomenological macro-bond method. *CrystEngComm.* 23, 3753-3760, 2021.
(Impact Factor: 3.117)
- [5] Ryo Suzuki, Marina Abe, Keiichi Hirano, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana: Rocking-curve imaging of high-quality protein crystals by non-dispersive X-ray optics in the double-crystal configuration. *J. Appl. Cryst.* 55, 1111-1115, 2022.
(Impact Factor: 2.995)
- [6] Saori Matsushita, Ryo Suzuki, Marina Abe, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana: Diffusion coefficient of intracrystalline water in intrinsic hen egg-white lysozyme crystals determined by confocal Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* 126, 9000-9007 (2022).
(Impact Factor: 3.466)

8. 学会発表

国際学会

- [1] Marina Abe, Ryo Suzuki, Keiichi Hirano, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana
Observation of twisting of protein crystals by X-ray topography (口頭発表・ポスター発表)
2019年12月17日 16th Conference of the Asian Crystallographic Association
- [2] Marina Abe, Masaru Tachibana
Mechanical properties of protein crystals (口頭発表)
2018年9月13日 Yokohama meets Padova: Forging links among PhD students in Physics, Material Science and Technology, and Psychological Sciences
他3件

国内学会

- [3] 阿部満理奈、鈴木凌、平野馨一、小泉晴比古、小島謙一、橘勝
結晶成長・溶解過程におけるタンパク質結晶の微小なねじれの観測 (口頭発表)
2022年11月2日 第51回結晶成長国内会議 (JCCG-51)
- [4] 阿部満理奈、鈴木凌、平野馨一、小泉晴比古、小島謙一、橘勝
結晶成長過程におけるタンパク質結晶の微小なねじれの観測 (口頭発表)
2022年9月14日 日本物理学会 2022年秋季大会
- [5] 阿部満理奈、鈴木凌、平野馨一、小島謙一、橘勝
結晶成長過程におけるタンパク質結晶の微小なねじれの観察 (口頭発表)
2021年10月27日 第50回結晶成長国内会議 (JCCG-50) ※講演奨励賞受賞
- [6] 阿部満理奈、鈴木凌、小島謙一、橘勝
放射光X線トポグラフィによるタンパク質結晶の干渉縞の解析に基づく完全性評価 (口頭発表)
2020年11月28日 令和2年(2020年)度年会
- [7] 阿部満理奈、鈴木凌、小島謙一、橘勝
X線トポグラフィによるタンパク質結晶の干渉縞の解析に基づく完全性評価 (口頭発表)
2020年11月11日 第49回結晶成長国内会議 (JCCG-49)
他3件