

## 地上対流抑制実験におけるタンパク質結晶のステップ前進速度

鈴木良尚（徳島大），塚本勝男（阪大），藤原貴久（徳島大），柳谷伸一郎（徳島大）

### Step Velocities of Protein Crystals in Ground-based Convection Free Experiments

Yoshihisa Suzuki\*, Katsuo Tsukamoto, Takahisa Fujiwara, Shin-ichiro Yanagiya

\*Inst. Tech. Sci. / Tokushima Univ., 2-1 Minamijosanjima, Tokushima 770-8506

E-Mail: yoshis@tokushima-u.ac.jp

**Abstract:** Convection flows induced by formation of solute depletion zone around growing protein crystals are visualized to clarify the reason why step velocities of a hen egg-white lysozyme (HEWL) tetragonal crystal grown at a ceiling position (top wall of a growth container) are not different from those at a sitting position (bottom wall of the container). Parabolic flight experiments revealed that flow rates of polystyrene particles (as marker particles) around a ceiling crystal do not indicate zero at hyper gravity conditions, and the particles completely stop at zero gravity, although the flow rates show slightly less values than those around a sitting crystal. Ceiling experiments cannot reproduce the effective suppression of convection flows around growing protein crystals in microgravity at this stage. Thus microgravity experiments are still indispensable to attain complete convection free conditions.

**Key words:** Step velocity, In situ observation, Flow rates, Ceiling position

#### 1. はじめに

高品質タンパク質結晶（分解能 1.5 Å 以上）の育成は、抗インフルエンザ薬や HIV の阻害薬など、病因タンパク質の構造をもとにした創薬（**Structure based drug design: SBDD**）のために必須である<sup>1)</sup>。重要な新薬の開発に成功すれば、数 100 億～数兆円レベルの売り上げになる為、世界中の多くの製薬会社が SBDD にしのぎを削っている。

しかし、このレベルのタンパク質結晶の育成は大変困難である。Protein data bank<sup>2)</sup>に登録されているタンパク質分子の構造の数は、構造因子までわかっているもので 2016 年 2 月 7 日現在 92,863 個にもなるが、その中で、1.5 Å より高い分解能を持つものは 7,825 個に限られる。

そのような状況の中、多くのタンパク質結晶の育成が宇宙ステーションで執り行われている。宇宙でタンパク質の結晶を作ると、その中の 20%程度が、地上のチャンピオンデータよりも高い分解能を持つものになるということが報告されている通り、宇宙環境の利用により、これまで実現できなかった高分解能結晶成長が実現できる可能性が示されたことによる<sup>3)</sup>。

しかし、「何故、宇宙でタンパク質結晶の品質が向上するか？」ということについてはいまだに最終結論が得られていない。この「何故」の部分に、初めて宇宙で結晶成長界面のその場観察を行うことでメスを入れたのが、2012 年に塚本らによって行われた NanoStep project である<sup>4)</sup>。「何故」の部分明らかにするために、過飽和度  $\sigma$  ( $\sigma = \ln(C/C_0)$ ) に対す

る結晶成長速度、ステップ前進速度などを系統的に測定した結果、「ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) の正方晶系結晶の成長速度を測定したところ、宇宙では地上よりも成長速度が大きくなる」ということがわかった<sup>5)</sup>。これは、これまで言われてきた「宇宙では物質の移動が拡散のみになるため、結晶の成長速度が小さくなり、その結果きれいな結晶が成長する」という予想と正反対の結果であった。

この原因については、現時点では、HEWL の主要な不純物が共有結合の二量体であることにあると考えている。つまり、地上では物質輸送が対流によって支配されているため、HEWL の結晶化分子である単量体と不純物の二量体は同程度成長界面に運ばれ、その結果成長界面に不純物が多く輸送されるため、ステップ前進の阻害が起こり、成長速度が遅くなる。それに対して、宇宙では物質輸送が拡散のみになるので、二量体は単量体に比べて拡散が遅くなり、成長界面に到達する数が少なくなる。その結果として成長速度が速くなると考えている。

この推測が本当であれば、結晶の高品質化メカニズムの本質は対流の抑制にあり、もし地上実験で十分に対流が抑えられれば、宇宙に行かなくても地上において十分に高品質化を実現できるということになる。そこで、我々は次なる宇宙実験の前に、地上対流抑制実験を検討することにした。

これまでに知られている地上対流抑制実験の代表的なものとしては、ゲル成長<sup>6)</sup>、磁気浮遊、Ceiling 法<sup>7)</sup>の 3 種類が挙げられる。ゲル成長は、ゲルのネットワーク中で結晶成長させることによって巨視的

な対流を抑制することができる。また、磁気浮遊は、水溶液の反磁性によって強磁場中で疑似的につくられた無重力状態である。そして、Ceiling 法は、成長する結晶周囲での溶質の枯渇による低密度溶液の発生および浮力による上昇に誘起される対流を、結晶を容器天井 (Ceiling) から成長させることによって幾何学的に抑制する方法である。ただし、ゲル成長は、ゲルそのものが不純物としての効果を持つことが知られている<sup>6)</sup>。磁気浮遊は大変強力な磁場が印加されていることから、外場としての地場の効果との区別ができない可能性がある。Ceiling 法については、Adawy らは、結晶の品質の評価で、Ceiling 位置で成長させたものは、得られた結晶の品質は、取り込む不純物の量が多かったとしても良くなることを報告した<sup>7)</sup>。彼らは、その理由として、対流が抑制されることによる、成長速度の低下によって品質が向上したと結論付けているが、彼らは実際に成長速度を測定していない。また、これは、我々が NanoStep で得た結論とは正反対の結果になっている。そこで、我々は、Ceiling 法を用いて得られた結晶のステップ前進速度を直接測定することにした。

NanoStep の時と同様、化学固定した種結晶<sup>8)</sup>から再成長させることにより、意図的にスパイラル成長丘を導入した全く同じ HEWL 正方晶系結晶を用いて、ステップ前進速度の濃度依存性をセル底部 (Sitting 位置) と Ceiling 位置で測定した結果、ステップ前進速度に有意な変化はなかった<sup>8)</sup>。そして、それらは NanoStep で得られたステップ前進速度よりも有意に小さく、まだ何か、宇宙実験と地上対流抑制実験の間に隔たりがあることを示していた。

そこで、航空機実験で実際に Ceiling 法を試してみることにより、

- (1) 結晶成長に誘起される密度対流が、地上対流抑制実験でどの程度抑制できるのか
  - (2) 航空機実験によって完全な微小重力になった際、その状態にどのような変化が生じるのか
- について、対流マーカを用いた定量的な評価を行い、地上対流抑制実験における問題点の抽出と、宇宙実験の必要性の確認を行うことを目的とした。

## 2. 実験

結晶成長によって誘起される密度対流をモニターするため、マーカ粒子として、ポリスチレン粒子 (Thermo Fischer Scientific, 5050A, diameter: 500 nm) を体積分率  $10^{-5}$  に調製した成長溶液を用いた。成長溶液は、HEWL  $30 \text{ mgmL}^{-1}$ , NaCl  $25 \text{ mgmL}^{-1}$  になるよう、 $0.05 \text{ M}$  酢酸ナトリウム緩衝溶液 ( $\text{pH} = 4.5$ ) に溶かしたものを用いた。これらをグルタルアルデヒドで化学固定したのち、再成長させた HEWL 正方晶系結晶とともに O-ring とカバーガラスの空間に封入

し、銅製のサンプルホルダで密封した。ペルチエ素子を用いた温度コントローラ上で温度変化により、過飽和度を制御してステップ前進速度を測定した。

微小重力は、ダイヤモンドエアサービス株式会社において、MU-300 型小型ジェット機のパラボリックフライトによって、最長 20 秒間連続して得ることができた。成長する結晶表面は、MU-300 機内のジュラルミン製の専用ラック内で制振装置上に設置した、倒立型の位相差顕微鏡 (Olympus, IMT-2) を用いて、20 倍の対物レンズを用いて透過位相差観察によってその場観察した (Fig. 1)。

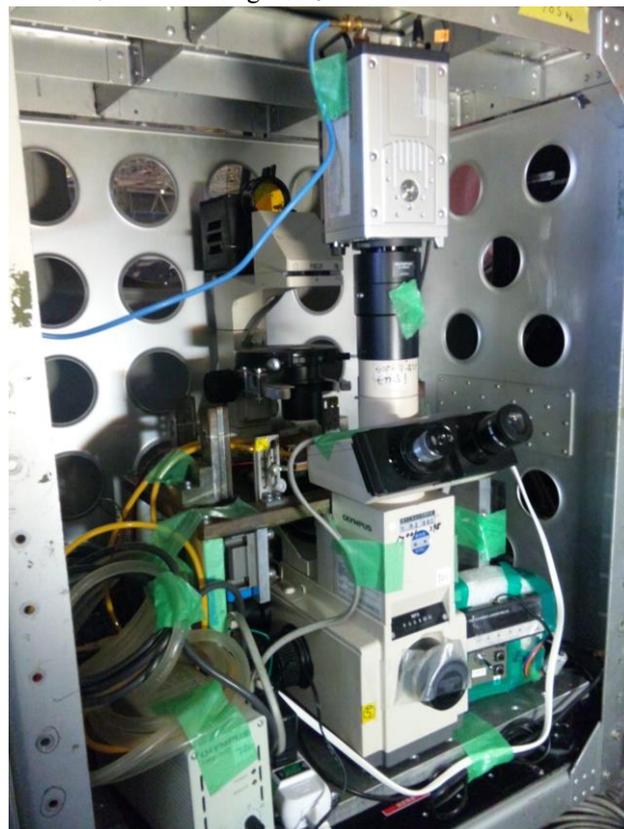


Fig.1 Experimental setup in MU-300 rack. An inverted microscope is fixed on a vibration control device. Precise focus adjustments during parabolic flights are achieved by using a piezo stage.

## 2. 結果と考察

実験上危惧されたのは、パラボリックフライトにおいて不可避な、微小重力になる前の過重力状態で、Ceiling 位置に付着している結晶が剥がれ落ちる可能性である。幸いにして 15 回のパラボリックフライトでの  $2 \text{ G}$  前後の過重力下においても、結晶が剥がれ落ちることはなかった。

Ceiling 位置における、透過位相差像と、画面の縦方向の粒子の変位の時間変化を以下に示す (Fig. 2)。この時の温度は  $15.2 \sim 15.5 \text{ }^\circ\text{C}$  で、過飽和度は十分

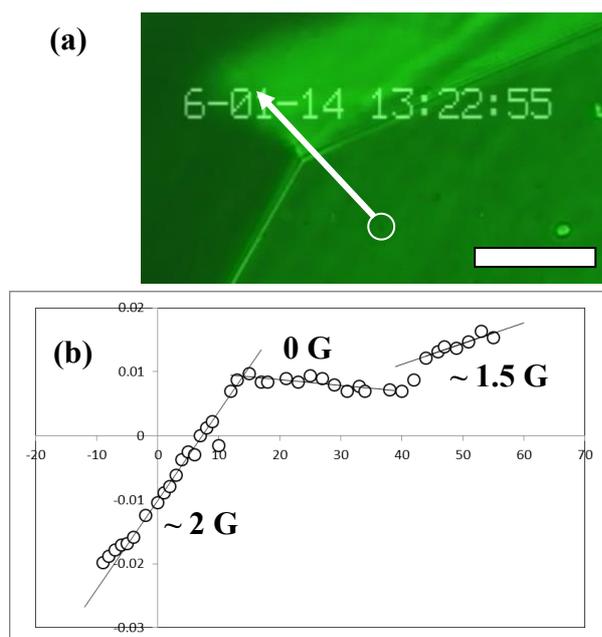


Fig.2 Visualization of convection flows around a growing crystal at a ceiling position. (a) A marker particle (in a white circle) moves along the white arrow. Scale bar represents 30  $\mu\text{m}$ . (b) Vertical positions (mm) of the marker particle with time (s). Flow rates of the marker change with changing gravitational acceleration values.

大きく、結晶の周囲に溶質枯渇領域が発生できる状態にある。グラフからわかるとおり、Ceiling位置にある結晶でも、成長中は溶質の密度対流が起こることが分かった。また、Sitting位置における成長結晶の周囲での密度対流の場合は結晶の周囲から結晶に向かう流れが誘起されるが、Ceiling位置の結晶の場合、結晶から外側に向かう流れが誘起されることがわかった。流速は重力に依存して変化した。0 Gになった瞬間、マーカ粒子はほぼ完全にストップし、慣性による流れは発生しなかった。また、結晶成長の過飽和度が大きいほど密度対流のスピードは大きくなった。

微小重力および過重力におけるマーカ粒子の流速を Fig. 3 に示す。■は Ceiling 位置の結晶周囲、□は、Sitting 位置の結晶周囲におけるマーカ粒子の流速を示している。結晶との間の距離や、温度の微妙な差 (■は  $15.4 \pm 0.1$  °C, □は  $16.3 \pm 0.1$  °C) による差はあると考えられるが、重要なのは、  
 (1) 0 G にならないと、対流は完全になくならない。  
 (2) Ceiling 位置でも対流は起こる。これがステップ前進速度に差異がない理由であろう。  
 (3) Sitting 位置の結晶の方が幾分対流の流速が速い傾向にある。Ceiling 位置において、多少の対流抑制効果はある。

ということが分かったという点である。

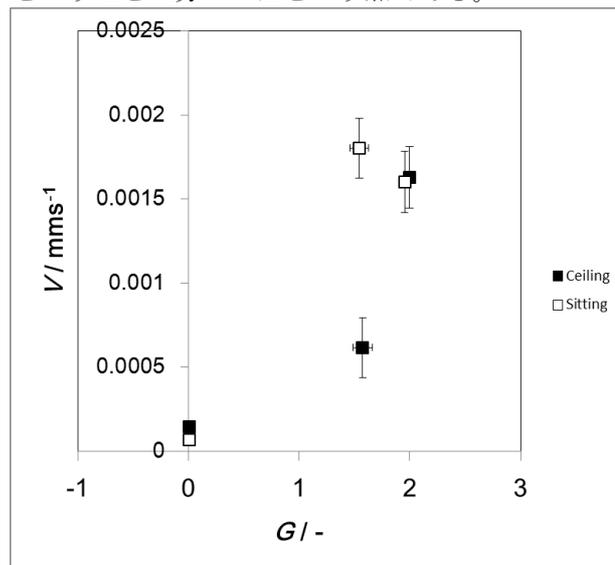


Fig.3 Flow rates  $V$  of marker particles around the same crystal at ceiling (■) and sitting (□) positions with gravitational acceleration values  $G$ .

### 3. まとめ

航空機実験において、過飽和状態で成長するニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) 正方晶系結晶周辺で誘起される密度対流の様子を、ポリスチレン粒子をマーカ粒子として定量的に評価したところ、以下のような結果が得られた。

(1) Sitting 位置および Ceiling 位置で成長している HEWL 結晶周辺で誘起される対流の方向は、それぞれ反対になった。Sitting 位置の結晶周囲では結晶周囲から結晶へ向けて、Ceiling 位置の結晶周囲では結晶から結晶周囲に向けての対流が誘起されていた。

(2) Ceiling 位置では、Sitting 位置より、誘起される対流の流速は幾分抑えられている傾向がみられるが、やはり対流が発生していることが分かった。

(3) 対流を完全になくすためには、やはり 0 G を実現する必要がある。

### 参考文献

- 1) Davis, A. M., Teague, S. J. and Kleywegt, G. J.; Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2718-2736 (2003).
- 2) <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>
- 3) Task Group for the Evaluation of NASA's Biotechnology Facility for the International Space Station, Space Studies Board, National Research Council: Future Biotechnology Research on the International Space Station, Chap. 1, pp13, The National Academic Press, Washington, DC, (2000).

- 4) Yoshizaki, I., Tsukamoto, K., Yamazaki, T., Murayama, K., Oshi, K., Fukuyama, S., Shimaoka, T., Suzuki, Y. and Tachibana, M.; Growth rate measurements of lysozyme crystals under microgravity conditions by laser interferometry, *Rev. Sci. Instrum.*, **84**, 103707 (2013).
- 5) Suzuki, Y., Tsukamoto, K., Yoshizaki, I., Miura, H. and Fujiwara, T.; First direct observation of impurity effects on the growth rate of tetragonal lysozyme crystals under microgravity as measured by interferometry, *Cryst. Growth Des.*, **15**, 4787-4794 (2015).
- 6) Van Driessche, A. E. S., Otalora, F., Gavira, J. A. and Sazaki, G.; Is agarose an impurity or an impurity filter? In situ observation of the joint gel/impurity effect on protein crystal growth kinetics, *Cryst. Growth Des.*, **8**, 3623-3629 (2008).
- 7) Adawy, A., van der Heijden, E. G. G., Hekelaar, J., van Enkevort, W. J. P., de Grip, W. J. and Vlieg, E.; A comparative study of impurity effects on protein crystallization: diffusive versus convective crystal growth, *Cryst. Growth Des.*, **15**, 1150-1159 (2015).
- 8) Iimura, Y., Yoshizaki, I., Rong, L., Adachi, S., Yoda, S. and Komatsu, H.; Development of a reusable protein seed crystal processed by chemical cross-linking, *J. Cryst. Growth*, **275**, 554-560 (2005).
- 9) Suzuki, Y., Tsukamoto, K., Fujiwara, T. and Yanagiya, S. in preparation.