

## 溶液相の状態変化によるタンパク質結晶の界面成長 kinetics および界面 morphology の変化

鈴木 良尚 (徳島大), 塚本 勝男 (阪大), 吉崎 泉 (JAXA), 福山 誠二郎 (AES), 藤原 貴久 (徳島大), 柳谷 伸一郎 (徳島大), 橋 勝 (横市大), 小泉 晴比古 (東北大)

### Change in interface growth kinetics and interface morphology of a protein crystal accompanied by change in solution phase

Yoshihisa Suzuki\*, Katsuo Tsukamoto, Izumi Yoshizaki, Seijiro Fukuyama, Takahisa Fujiwara, Shin-ichiro Yanagiya, Masaru Tachibana, Haruhiko Koizumi

\*Institute of Technology and Science, Tokushima University, 2-1 Minamijosanjima, Tokushima 770-8506

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

**Abstract:** We focus on the growth mechanism of protein crystals and their perfection. The growth mechanism will be studied by surface observation and by measuring growth rates. The crystal defect will be studied by X-ray topography. We successfully carried out Nanostep project as an international space station (ISS) experiment in 2012 using lysozyme crystals as model protein crystals. From the results of the Nanostep project, we concluded that larger-size impurities are effectively filtered during crystallization owing to smaller diffusion constants of the larger impurities, and this filtration mechanism results in the increase in growth rate of lysozyme crystals in microgravity. However, from this assumption, we can easily anticipate that same-size impurities will not lead the faster growth rates, and smaller impurities will lead more suppression of growth rates in microgravity. To confirm these anticipations, a new ISS experiment is planned in near future using glucose isomerase (GI) crystals. We need to obtain ground based data for the comparison with the Nanostep data. Until now, we successfully confirm regrowth of GI crystals on chemically fixed seed crystals, conduct X-ray topography of regrown crystals on the seed crystals, and observe elementary steps on ceiling lysozyme crystals.

**Key words;** Crystal growth, Normal growth rate, Step velocity, Surface morphology, In situ observation

#### 1. はじめに

タンパク質の結晶化は、タンパク質分子の構造解析に必須なプロセスである。2015年1月24日現在、Protein data bank<sup>1)</sup>に登録されているタンパク質分子の構造の数は98,404個で、ほぼ10万に到達する勢いである。これでもまだ存在するタンパク質100万程度からすると少数ということもできるかもしれないが、もはやかなり多くのタンパク質で構造解析されていると言える。しかしながら、その中でドラッグデザインに利用できる基準である、1.5 Åより高い分解能を持つものは7,340個に限られる。これは、このレベルの高分解能のタンパク質結晶を作製することはまだまだ困難な作業であることを示している。

一方、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<sup>2)</sup>。すなわち、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、ISSの主要な研究テーマとして、タ

ンパク質結晶化プロジェクトが数多くおこなわれている。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。これがわからない限りは、いつまでも博打的要素を抱えたままで宇宙実験を繰り返すしかなく、地上での高品質化技術の開発に宇宙実験の結果をフィードバックできない。

この「何故」の部分に初めてメスを入れたのが、2012年に塚本らによって、ISS Kibo 実験棟で行われたNanostep projectである<sup>3)</sup>。「何故」の部分明らかにするためには、結晶成長プロセスを明らかにする必要があり、そのためには、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する必要がある。これまでも、このような測定をしようという試みはいくつもなされてきたが、長期間にわたる測定になるため、溶液の蒸発等が起こり、きちんと詳細な速度論データを宇宙で得た実験はなかった。Nanostepでは、溶液濃度の変動が極力起こらないようにするため、1個の化学

固定種結晶を使い、蒸発を極限まで防ぐ高分子チューブを使ったその場観察セルを開発した。その結果、宇宙実験としては初めて、過飽和度に対する面成長速度を測定することができた。つまり、この Nanostep で、初めて、地上の研究室レベルの実験を宇宙で実現できるようになったということである。

Nanostep で得られた最も大きな成果は、「宇宙では地上よりも成長速度が大きくなる」ということである。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。

この原因は、物質輸送がキーワードになる (Fig. 1)。地上では物質輸送が対流によって支配されているため、結晶化分子と不純物は同程度成長界面に運ばれ、

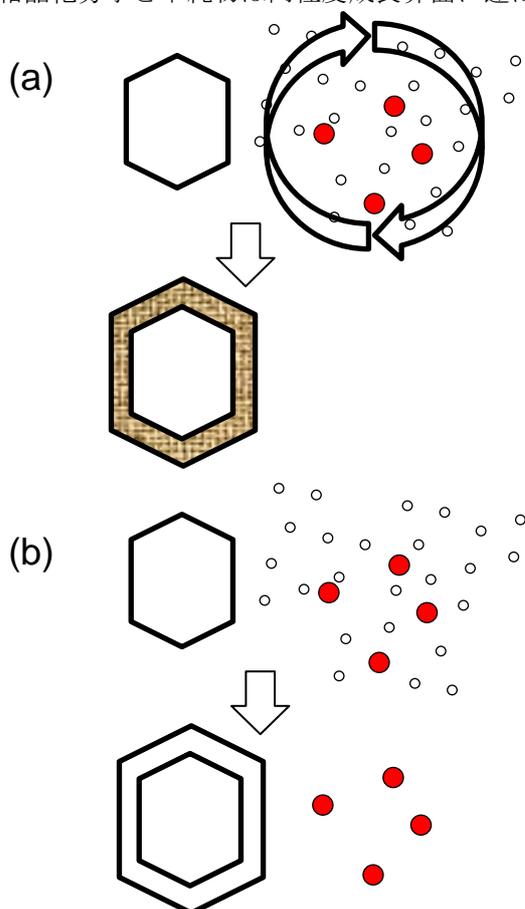


Fig.1 Schematic illustrations of a crystal growth process on ground. (a) On ground, a seed crystal grows in convective flows of solute molecules and impurity molecules. Crystal quality of over-growth region is relatively low. (b) In microgravity, a seed crystal grows only by diffusion of molecules. Impurities are left in solution, and thus, the quality of crystal becomes high.

その結果不純物の多く取り込まれた品質の悪い結晶になる (Fig. 1(a))。それに対して、宇宙では拡散のみになるので、結晶化分子よりも不純物が大きい場合、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り、結晶の品質も良くなると考えられる (Fig. 1(b))。

しかし、不純物として考えられるのは、結晶化分子より大きいものばかりではない。もし、同サイズであれば対流の有無にかかわらず不純物が結晶表面に到達する頻度が変わりはなく、小さいものであれば逆に宇宙の方がより多くの不純物が結晶表面に到達することになり、「宇宙では結晶品質が劣化する」という可能性も出てくる。もし、これが本当であれば、結晶化実験をやみくもに宇宙で行うのは得策ではなく、不純物のサイズによって、宇宙実験を行うべき試料を選別 (サイズスクリーニングと名付ける) する必要があることになる。もちろん、不純物の分配係数が異なれば、その点も考慮する必要がある。また、Nanostep ではリゾチームのみの結果であり、この現象がリゾチーム特有の現象である可能性もありうる。

そこで我々は、Nanostep の次の宇宙実験で使用するタンパク質として、グルコースイソメラーゼ (GI) を選択した。GI 結晶には、下記に示すようなメリットがある。

1. リゾチームに次いで多くの地上での成長速度の研究例がある。本 RT (成長メカニズムに依存するタンパク質結晶の完全性) メンバーとして、著者ら日本グループとベルギーグループ (PI: Prof. Dominique Maes) によって、すでにいくつかの実験がされている。
2. ベルギーグループが、遺伝子組み換え体を作り、それが同サイズの不純物として、成長阻害効果が大きいことを突き止めている。

これらを踏まえ、まず本研究では、GI 結晶を使って Nanostep 実験と同じ供試体を使って、サイズスクリーニングを行うため、化学固定結晶の作製を試みた。また、化学固定結晶から成長した GI 結晶の X 線トポグラフを撮影し、結晶の完全性の評価を行った。さらに、サイズスクリーニングを実施する予定のため、Nanostep の時に比べて、不純物サイズを変化させたセルを用意するなど実験条件が増えることから、実験条件を厳選する必要がある。そのため、地上実験の段階で、対流抑制環境を作り出して条件を精査する必要がある。その準備として結晶をセル上面から成長させる Ceiling 法<sup>4)</sup>を試みた。

## 2. GI 結晶の化学固定

吉崎、福山によって、GI 結晶を化学固定する試みが行われた。既に報告されている、リゾチームの場

合同様、グルタルアルデヒド水溶液による結晶内の架橋反応により、結晶の化学固定を行った<sup>5)</sup>。その結果、結晶の方位を継承した再成長を行える化学固定に成功した (Fig. 2)。また、再成長した結晶表面の観察により、Nanostep の供試体でのマイケルソン



Fig.2. Regrowth of GI crystals (transparent part) on yellow chemically-fixed seed crystals.

型二光束干渉計での表面観察が可能な、スパイラル成長丘が発達していることを確認した。これにより、Nanostep 供試体を使った同様の実験が GI 結晶で可能であることが示された。

#### 4. GI 結晶の X-ray topography

小泉、橘、吉崎、福山らが中心となって、種結晶から再成長した GI 結晶の X 線トポグラフィーを行った<sup>6)</sup>。高エネルギー加速器研究機構の放射光を用いて、測定した結果、GI 結晶が大変完全性の高い結晶であることがまずわかった (Fig. 3)。通常の種結晶を用いるときはほぼ転位が観察されなかった。し

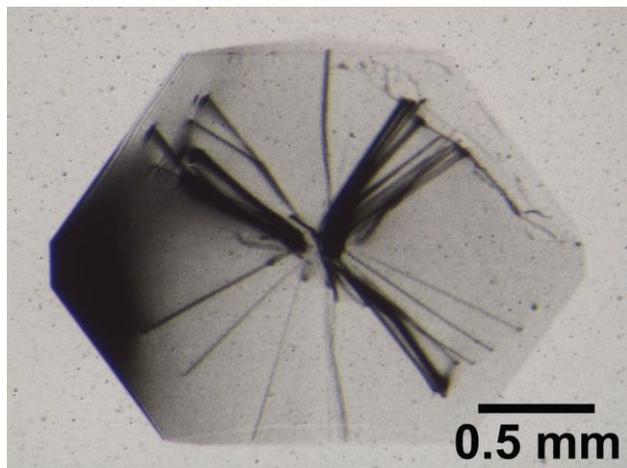


Fig.3. An X-ray topograph of a GI crystal in the 020 reflection. Center part of this topograph shows a chemically-fixed seed crystal. From the surface of the seed, several grown-in dislocations are propagated.

かし、化学固定結晶から再成長した結晶には種結晶表面からスタートした転位が見られた。GI 結晶はそ

の対称性の高さゆえか、欠陥密度が少なく、詳細な格子欠陥の構造の議論が行える。不純物を故意に加えた系での結晶品質劣化等を議論する際、このような結晶は適している。

#### 5. Ceiling 法における界面モルフォロジーのその場観察

成長条件によって、結晶成長カイネティクスや不純物の分配係数が変化することがありうるが、これらは宇宙実験を実施する前に十分に吟味されなければならない。そのためには、宇宙実験で最も主要な影響を及ぼす「対流の抑制」を地上で実現できるのであれば、予備実験として実施すべきである。

結晶成長カイネティクスの実験を予定している我々としては、それプラス「界面モルフォロジー変化の分子レベルでの観察」を実現すべきである。

これらの条件を満たし、現実的に実現可能性の最も高い、Ceiling 法<sup>4)</sup>で成長する結晶表面の単位ステップ観察をリゾチーム結晶で試みた。

倒立型の共焦点微分干渉顕微鏡 (LCM-DIM) によって、セル内溶液の厚みが 1 mm 程度のセルの Ceiling 位置で成長する結晶の成長界面を観察した結果、十分な解像度で、単位ステップを観察することができた (Fig. 4)。このためには対物レンズの補正環を調

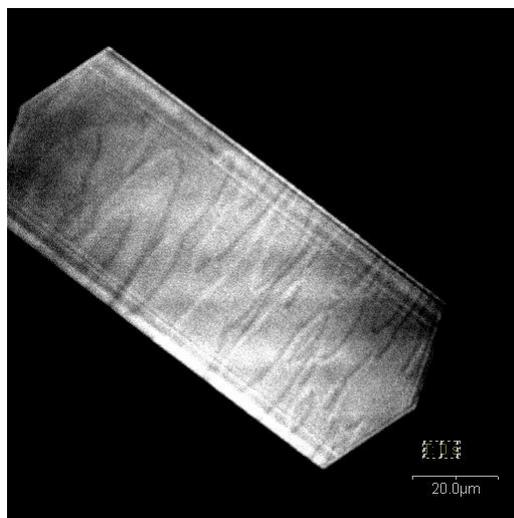


Fig.4. An LCM-DIM micrograph of the {110} face of a tetragonal lysozyme crystal. Two-dimensional islands nucleate and spread. Almost all steps show properties of elementary steps.

整し、光学収差を抑える必要があるが、我々はすでに、光学高圧セル中での単位ステップの観察等で経験があり、それほど困難なく測定することができた。スパイラル成長丘およびその上の単位ステップの観察にも成功し、ステップ前進速度の過飽和度依存性を測定中であるが、現状では地上での既出の論

文データとあまり違いがない。今後、Ceiling 法です  
で実績を上げている Prof. Elias Vlieg らとともに、  
実験条件の具体的な精密化を試みていく予定である。

crystals grown from seed crystals, *Cryst. Growth Des.*,  
**14** (2014) 5111-5116.

## 6. まとめ

成功裏に終わった Nanostep の結果を受け、次期の  
宇宙実験のモデルタンパク質として GI 結晶を選択  
し、また、地上実験の充実化を行うため Ceiling 法で  
の界面ステップモルフォロジー観察を試みた結果、  
以下のような結果が得られた。

1. GI 結晶をグルタルアルデヒド水溶液で化学固  
定に成功した。また、その固定結晶からの再成  
長、スパイラル成長丘の確認ができた。
2. GI 結晶の X 線トポグラフィーを実施した結果、  
非常に高品質な結晶であることが分かった。化  
学固定結晶から再成長させた結晶には化学固  
定結晶表面から再成長結晶面まで転位が伝播  
していたが、それ以外の場合、結晶内にほとん  
ど転位が見られなかった。
3. リゾチーム結晶を使って、結晶成長容器天井か  
ら成長した (Ceiling 位置) の結晶の界面ステ  
ップモルフォロジーの LCM-DIM 観察に成功  
した。スパイラル成長丘の観察にも成功したが、  
ステップ前進速度のスピードは従来報告され  
ているものとあまり変わりなかった。

## 参考文献

- 1) <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>
- 2) 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, p. 13, The  
National Academic Press, Washington, DC, 2000.
- 3) 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** (2013) 103707.
- 4) Adawy, A., Marks, K., de Grip, W. J., van Enckevort,  
W. J. P. and Vlieg, E.; The development of the  
depletion zone during ceiling crystallization: phase  
shifting interferometry and simulation results, *Cryst.  
Eng. Commn.*, **15** (2013) 2275-2286.
- 5) Iimura, Y., Yoshizaki, I., Rong, L., Adachi, S., Yoda,  
S., Komatsu, H.; Development of a reusable protein  
seed crystal processed by chemical cross-linking, *J.  
Cryst. Growth*, **275** (2005) 554-560.
- 6) Koizumi, H., Tachibana, M., Yoshizaki, I., Fukuyama,  
S., Tsukamoto, K., Suzuki, Y., Uda, S. and Kojima,  
K.; Dislocations in high-quality glucose isomerase