

平成20年3月28日

平成19年度「成長メカニズムに依存するタンパク質結晶の完全性」 活動報告書

代表者所属 東北大学 氏名 塚本勝男

1. 構成メンバ

氏 名	所属
塚本 勝男	東北大学
小島 謙一	横浜市立大学
橘 勝	横浜市立大学
佐崎 元	北海道大学
吉崎 泉	宇宙航空研究開発機構
森 勇介	大阪大学
Garcia Ruiz	スペイン・グラナダ大学
横山 悦郎	学習院大学
和泉 研二	山口大学
奥津 哲夫	群馬大学
Elias Vlieg	オランダ・ ナイメーヘン大学
中田 俊隆	立命館大学
本同 宏成	北海道大学
小泉晴比古	東北大学
小野えりか	東北大学
福山誠二郎	エイ・イー・エス
向林 祐	横浜市立大
北島菜津子	横浜市立大
山元 悠	横浜市立大
山崎 智也	東北大学

西村 良浩	レーザーテック
小石真由美	横浜市立大学
大矢 直希	横浜市立大学

2. 本年度 WG 会合開催実績

- (1) 8月14日～9月12日まで順次オランダにてフライト試料準備
- (2) 9月19日、東京にて研究会開催
- (3) 9月24日～10月2日までオランダで飛行後解析
- (4) 10月2日～10月6日まで高エネルギー加速器研究機構にて解析
- (5) 10月7日～10月10日までSPring8にて解析
- (6) 10月～21日、奈良で研究会開催、ITTと同時開催
- (7) 12月26日、東京で研究会開催
- (8) 1月4日、サンプル受け渡し
- (9) 1月6日、仙台で結晶観察
- (10) 1月18日、未来館で報告
- (11) 1月25日、横浜にて研究会開催
- (12) 1月28日～31日、SPring8にて追加解析

その他別経費で打ち合わせ会議を多数実施。

3. 活動目的

本 WG ではタンパク質結晶の完全性が成長メカニズムにどう依存するかを多角的に調べるために、光学的手法、X線的手法などを用いて、不純物分子などによる表面モルフォロジーの変化やステップ成長速度の変動、欠陥発生などをとらえ、完全性との相関を調べる。

2007 年度は、9 月に予定されていた FOTON-M3 を用いた回収衛星実験の準備に注力し、実験終了後は結果の解析を進めることを目的とした。

4. 活動内容

スペイン・グラナダ大学 Garcia-Ruiz 教授との共同研究により、回収衛星を用いた宇宙実験を実施し、成功した。今回の宇宙実験の目的は、微小重力下における結晶成長速度を計測すること、得られた結晶の完全性を評価することであった。完全性の評価には、結晶内の欠陥分布検出に優れる X 線トポグラフィ法を用いることとした。これらの目的のために、宇宙実験として初めての試みと思われるが、タンパク質の種結晶を用いることとした。種結晶を適切な過飽和度の結晶成長溶液に入れることで複数の結晶生成を抑制し、種結晶のみを育成することができるため、ある過飽和度における成長速度を見積もることが可能となる。また、X 線トポグラフィ法で良好なコントラストの画像を得るためには、1mm 以上の結晶が必要であるため（小島・橘ら）、あらかじめ大きな種結晶を準備した。地上で成長させた種結晶と、微小重力環境でその上に成長する部分との品質の比較も可能である。

一部の種結晶は日本で準備し、オランダに持ち込んだが、大半の結晶はオランダ・ナイメーヘン大学の Elias Vlieg 研究室にて準備した。最終的にはφ3mm 程度のキャピラリー56 本、ガラス製の平板容器 9 個を準備し、オランダ・ノルドバイクにて Garcia-Ruiz のグループに引渡した。結晶は ESA によってカザフスタンに輸送され、9 月 14 日に打ち上げられた。着陸は 9 月 26 日であった。なお、打ち上げ前・着陸後はアルカンを用いて 20 度前後に温度制御した。得られた結晶を共焦点顕微鏡で観察した一例を図 1 に示す。種結晶を使用

したため、打ち上げまでの 1g での成長部分、打ち上げ後の μg での成長部分、着陸後の 1g での成長部分が結晶面に平行なゾーニングとして見える。これは、温度揺らぎなどによる環境の変化により結晶層の屈折率がわずかに異なるためである。これにより、打ち上げ前後の結晶の厚み、結晶成長速度を計測できることとなる。結晶の成長速度は、結晶のもつ大きさや欠陥の種類などの個性によって、同一過飽和度でも 20% 程度の成長速度の幅をもつが、今回のように種結晶を用いることで、同一結晶中での 1g 部分・ μg 部分を比較することが可能となり、成長条件の違いによる成長速度

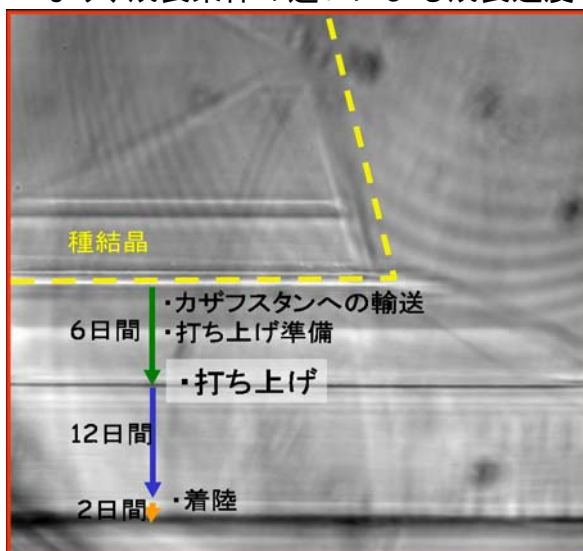


図 1 初めて得られた宇宙実験後の成長ゾーニング。成長領域の比較により、成長速度や完全性を調べることができる。

の違いを明らかにすることができた。これまで数多くの地上実験・宇宙実験が行われてきたにもかかわらず、タンパク質の成長速度に関しては、信頼に足るデータがほとんどない状況であるが、実際に成長速度を計測したところ、驚くべき結果が明らかとなった。航空機実験結果による推測では成長速度は一桁以上減少すると予想していたが、微小重力における成長速度は

地上と変わらないか、むしろ条件によっては 50%ほど速くなることが明らかになったのである。これは、対流が抑えられる宇宙では、拡散支配になるために結晶成長速度が減少するという従来の考えが一律に正しいわけではないことを明確に示した最初の宇宙実験である。

この解釈としては、現在のところ、以下のように考えている。今回の宇宙実験では市販のリゾチームを用いたが、この溶液にはリゾチーム 2 量体（ダイマー）は約 1.5%含まれる。中田・佐崎・吉崎らの研究により、リゾチームダイマーはリゾチーム結晶にとって不純物であることがわかっているが、塚本らはさらに、リゾチーム成長溶液中においてダイマーは 2 次元核形成を促進する効果（成長速度増加）及び、ピンニング効果（成長速度減少）の両方の効果を持つことを明らかにしている。過飽和度、ダイマー濃度によってそれらの寄与する割合が異なる。一方、ダイマーは塩濃度によって分配係数が異なるが、今回用いた実験の条件では、分配係数は 1.1 程度であり、結晶から排出されるよりも取り込まれる傾向にあることもわかっている（吉崎ら）。

これらの研究結果を踏まえると、以下のような推測が成り立つ。

(a)種結晶が微小重力環境におかれる前後にはダイマーが分配係数に基づき結晶に取り込まれる。

(b)微小重力であるため、密度差対流が生じず、結晶周囲のダイマー濃度の低い層が乱されず維持される。流れによって新たなダイマーが結晶表面に運ばれることもない。

(c)微小重力中はダイマーの結晶への取り込みが少ない（モノマーとの比率として相対的に少ない）。

(d) その結果、成長速度を急激に低下させる不純物効果が薄れ、結果的にリゾチーム結晶成長速度を増大させる。より正確には、上で述べた、ダイマー

による成長促進効果・抑制効果の過飽和度、ダイマー濃度との兼ね合いにより、成長速度がほとんど地上と変化しない／あるいは増加したと考えられる。

今後より詳細な解析、検証が必要であるが、不純物分子は結晶表面での滞在時間と成長ステップで覆われる速度との競合で結晶への取り込み方が異なり、結晶の純度、結果的には完全性が変化するという全く新しいストーリーができつつある。

一方、成長した結晶の完全性についても新しい結果が得られている。フライト後、オランダにて数日間詳細な光学観察を行い、結晶成長速度の計測などを行ったが、日本へ帰国した翌日から KEK で放射光による X 線トポグラフの撮影に供した。さらに 1 週間後には SPring8 にて追加解析を行った。結晶サイズが 2mm 程度と巨大であるため、良質なトポグラフ像が得られた。1g および μg での完全性の違いについては、結晶の全体にわたるロッキングカーブ解析を試みており、現在精力的に解析を進めている。

このように、安価な実験でできたという対費用効果を考えなくても、得られた成果そのものが、従来の欧米の宇宙実験では得られない画期的なものであったとして誇ることができる。これは、宇宙実験を行うまでに十分な地上実験を行っていたからこそ達成できたことである。同時に、この WG のようにフレキシビリティに富むチームワークがあり、海外の強い協力機関があったからこそ実現できたことである。

次年度は結果の解析を継続する。

5. 成果

1) K. Furuta, T. Okutsu, G. Sazaki, I. Yoshizaki, H. Horiuchi, T. Shimizu, M.

Yamamoto, Y. Tanaka, H. Hiratsuka,
"Detection of covalent-bonded dimer in
photochemical-induced crystallization of
protein", *Chem. Lett.*, **36**, 714-715
(2007).

2) H. Yoshikawa, T. Adachi, G. Sasaki, T.
Matsui, K. Nakajima, H. Masuhara,
"Surface enhanced hyper-Raman
spectroscopy using optical trapping of
silver nanoparticles for molecular
detection in solution", *J. Opt. A: Pure
Appl. Opt.*, **9**, S164-S171 (2007).

3) A.E.S. Van Driessche, G. Sasaki, F.
Otalora, F.M. Gonzalez-Rico, P. Dold, K.
Tsukamoto, K. Nakajima, "Direct and
non-invasive observation of
two-dimensional nucleation behavior of
protein crystals by advanced optical
microscopy", *Crystal Growth and Design*,
7, 1980-1987 (2007).

4) T. Okutsu, K. Sugiyama, K. Furuta, I.
Watanabe, H. Mori, K. Obi, K. Horota, H.
Horiuchi, G. Sasaki, S. Veessler, H.
Hiratsuka, "Photochemically induced
nucleation in supersaturated and
undersaturated thaumatin solutions", *J.
Photochem. Photobiol.*, **190**, 88-93
(2007).

5) G. Sasaki, M. Okada, T. Matsui, T.
Watanabe, H. Higuchi, K. Tsukamoto, K.
Nakajima, "Single-molecule visualization
of diffusion at the solution-crystal
interface", *Crystal Growth & Design*,
accepted.

6) I. Hanasaki, H. Takahashi, G. Sasaki,
K. Nakajima, S. Kawano,

"Single-molecule measurements and
molecular dynamics simulations of
protein molecules near silicon
substrates", *Biophys. J. D: Appl. Phys.*,
accepted.

7) E. Petrova, P. Dold and K. Tsukamoto,
Growth of tetragonal lysozyme crystals
from solutions containing NaCl, CsCl
and NaNO₃. *J. Crystal Growth*, **304**,
141-149, 2007.

著書

1) K. Tsukamoto and P. Dold,
Interferometric Techniques for
Investigating Growth and Dissolution of
Crystals in Solutions, pp. 329-341, in;
Perspectives on Inorganic, Organic, And
Biological Crystal Growth: From
Fundamentals to Applications, ed. A.
Skowronski, J. J. DeYoreo and C. Wang,
American Institute of Physics, Melville,
New York, 2007.

学会発表 (国際学会)

1) Katsuo Tsukamoto, Molecular-level
imaging during protein crystallization.
Gordon Research Conference "THIN
FILM & CRYSTAL GROWTH
MECHANISMS", South Hadley, USA,
June 24-29, 2007. 【Invited; 招待講演】

2) K. Tsukamoto, Interferometric
investigations of crystal growth and
mineralization. the 13th International
Summer School on Crystal Growth, Utah,
USA, August 5-11, 2007. 【Invited; 招待
講演】

3) G. Sasaki, G. Dai, A.S.E. Van Driessche, I. Yoshizaki, T. Matsui, F. Otalora, K. Tsukamoto, K. Nakajima, "Application of single molecule visualization to protein crystallization", 15th International Conference on Crystal Growth, Salt Lake City, USA, August 12-17, 2007. 【Invited; 招待講演】

4) K. Tsukamoto, P. Dold, G. Sasaki, "Application of high-resolution interferometry to the growth of lysozyme crystals at wide ranges of supersaturation", in The 15th International Conference on Crystal Growth, Salt Lake City, Utah, August 12-17 (2007). 【Invited; 招待講演】

5) A.E.S. Van Driessche, J.A. Gavira, G. Sasaki, F. Otalora, "In situ observation of the joint gel/impurity effect on protein crystal growth kinetics", 15th International Conference on Crystal Growth, Salt Lake City, USA, August 12-17, 2007.

6) A.E.S. Van Driessche, G. Sasaki, G. Dai, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, F. Otalora, "Impurity effects and adsorption sites of impure proteins on protein crystal", in The 15th International Conference on Crystal Growth, Salt Lake City, Utah, August 12-17 (2007).

7) A.E.S. Van Driessche, G. Sasaki, M. Gonzalez-Rico, P. Dold, K. Tsukamoto, K. Nakajima, F. OF. Otalora, "In situ measurements of two-dimensional nucleation rates of protein crystals by

advanced optical microscopy", in The 15th International Conference on Crystal Growth, Salt Lake City, Utah, August 12-17 (2007).

8) I. Yoshizaki, K. Tsukamoto, M. Tachibana, K. Kojima "Japanese PCG experiments on FOTON-M3 using GCB2" Third International Symposium on Physical Sciences in Space (3rd ISPS 2007), (2007.10.22-26, Nara, Japan)

9) M. Koishi, N. Oya, Y. Mukobayashi, N. Kitajima, Y. Yamamoto, M. Tachibana, I. Yoshizaki, K. Tsukamoto, K. Kojima "Observation of dislocations in protein crystals by X-ray topography" Third International Symposium on Physical Sciences in Space (3rd ISPS 2007), (2007.10.22-26, Nara, Japan)

関係する外部資金

1) 平成 18 年度科学研究費補助金（基盤研究(B), 平成 18 年 4 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日, 9,700 千円, No. 18360003) , 「分子レベルその場観察によるタンパク質結晶へのマイクロ欠陥取り込み機構の解明」平成 18 年度 5,300 千円, 平成 19 年度 2,000 千円, 平成 20 年度 2,400 千円