

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」  
平成17 年度採択研究代表者

森 勇介

大阪大学大学院工学研究科・教授

## タンパク質完全結晶創成

### § 1. 研究実施の概要

本研究では、我々がこれまでに開発した新しいタンパク質結晶化手法である①レーザーによる結晶核発生方法、及び②溶液攪拌による高品質化技術に関するの高度化を行うとともに、結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメータの探索を行い、難結晶化タンパク質の高品質大型結晶育成技術の確立を目指している。本年度では以下の結果が得られている。

レーザー核発生については、これまでの研究からキャビテーション発生に伴う局所的な分子の高濃度化が結晶核発生を促進し、溶液の高粘性化が結晶核発生確率向上に効果的であることが、リゾチームなどのモデルタンパクを用いて示唆されてきたが、本年度の結果から、細胞増殖必須因子タンパク質 SAT や膜タンパク質 AcrB 等の難結晶化タンパク質においても同様に効果的であることが示された。

溶液攪拌技術に関しては、溶液攪拌が結晶欠陥の種類や密度に及ぼす影響を調べた結果、攪拌速度の増加に伴い、結晶中の転位密度が増加し、点欠陥密度は減少するという傾向が見られた。また、タンパク質だけでなく有機低分子化合物においても X 線構造解析分解能を向上できることが分かった。さらに、難結晶化タンパク質である膜タンパク質 AcrB 結晶の成長表面観測に初めて成功し、渦巻き成長中心からステップ成長していることを確認した。

難結晶化タンパク質高品質結晶化に関しては、Tomato mosaic virus 130K タンパク質、細胞増殖必須因子 Spermidine acetyltransferase (SAT)、RNA アプタマー (AML38) - AML-1 複合体など、7種類の難結晶化共同研究サンプルにおいて初めて高品質結晶化に成功し、その中の1種類のタンパク質については高分解能構造解析を実現した。

大型タンパク質結晶育成キットの実用化に向けて、高効率タンパク質試料利用に必要となる育成溶液中のタンパク質濃度制御が可能となることを確認した。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「大阪大学」グループ

①研究分担グループ長:森 勇介(大阪大学大学院、教授)

#### ②研究項目

タンパク質完全結晶創成のための要素技術の開発と実証研究

本研究では、フェムト秒レーザー照射による核発生技術や溶液攪拌による結晶高品質化技術などの新しいタンパク質結晶化手法の高度化、及び結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメータの探索を行い、膜タンパク質や水溶性タンパク質をはじめ、様々な難結晶化タンパク質の完全結晶育成技術創成のための要素技術開発とその実証研究を行う。

### (2)「東京工業大学」グループ

①研究分担グループ長:村上 聡(東京工業大学大学院、教授)

#### ②研究項目

膜タンパク質完全結晶創成

タンパク質結晶化のなかでもとりわけ困難であると言うことが良く知られている膜タンパク質の結晶化は、構造生物学分野での最後の開拓地であると表現されている。我々がこれまで開発してきた高品質結晶化支援のための技術を、膜タンパク質に対して適用させる為に、より多くの膜タンパク質結晶化に対して結晶化を実施し、技術の一般化を目指す。大腸菌多剤排出トランスポーターAcrB をサンプルとして、結晶化技術を改良すると共に、他の膜タンパク質標品の大量精製の為の遺伝子組み換え実験や、生化学実験を行う。

### (3)「創晶」グループ

①研究分担グループ長:安達 宏昭(株式会社創晶、代表取締役社長)

#### ②研究項目

タンパク質・難結晶化材料結晶化受託と大型結晶育成キットの実用化

依頼されたタンパク質・難結晶化材料の結晶化を、レーザー核発生技術や溶液攪拌技術などを駆使して行うとともに、本 CREST で開発された技術の実用化を積極的に進める。

本 CREST 研究で開発した溶液攪拌技術等の結晶大型化技術を基に、大型タンパク質結晶育成キットの実用化を進める。

## § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

【新しい結晶化技術の原理解明と高度化】

#### (レーザー核発生技術)

結晶核発生の強制的誘起を可能にするレーザー核発生技術については、より効果的に結晶核発生を誘起するレーザー照射条件を探索するため、高速度カメラを用いてレーザー照射時に集光点で誘起される現象を観察した。その結果、核発生誘起に必須と考えているキャビテーションの挙動(膨張・収縮、崩壊等)をマイクロ秒オーダーで捉えることに成功した。また、有色の水溶性タンパク質チトクロム C を用いて、溶液の濃度分布を画像の明度分布として観察した結果、キャビテーションの発生前後でチトクロム C の濃度分布が変化し、集光点付近に低濃度領域が、その周囲に高濃度領域が形成されるのを見出した。本結果より、キャビテーションの膨張、収縮によって周囲の分子が強制的に移動させられ、局所的に高タンパク質濃度領域が形成されることで核発生の促進が起これると考えている。

高タンパク質濃度領域の緩和時間を長くして核発生確率を高めるため、溶液の高粘性化による分子拡散の抑制を試みた。1 wt%のアガロースを添加して溶液をゲル化し、レーザー照射を行った結果、ニワトリ卵白リゾチームの結晶化において、従来では結晶核の発生が見られなかった過飽和度 ( $\sigma = ((\text{タンパク質濃度}) - (\text{溶解度})) / (\text{溶解度})$ ) 1.3 以下の低過飽和溶液 ( $\sigma = 0.3, 1.0$ ) において核発生を誘起することに成功した<sup>8)</sup>。また、細胞増殖必須因子 SAT や膜タンパク質 AcrB といった難結晶化タンパク質においても、溶液をゲル化してレーザー照射を行うことにより、より低過飽和度で核発生を誘起することに成功した。さらに、キャビテーション挙動を観察した結果、ゲル中ではキャビテーションが崩壊し難くなること、崩壊が起これない条件において核発生誘起効率が顕著に向上することが明らかになった。キャビテーションの崩壊は分子高濃度領域の破壊や、熱発生、化学反応の促進などの核発生を妨げる要因になり得ることから、キャビテーション崩壊の抑制も核発生誘起にプラスに働いたと考えられる。以上の結果から、溶液のゲル化はフェムト秒レーザー照射による結晶核発生誘起に非常に有効な手法であると考えられる。

#### (溶液攪拌技術)

溶液攪拌技術はタンパク質結晶の大型化・高品質化に有効かつ重要な技術であるが、高品質結晶化の原理や最適攪拌条件の検討指針は良く分かっていない。これらを明らかにするために、溶液攪拌や溶液流れが結晶成長プロセスに及ぼす様々な影響の観測に取り組んでいる。

レーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用い、溶液流れ下でリゾチーム正方晶・単斜晶表面の成長様式、ステップ成長速度を測定したところ、晶系、成長様式に応じてステップ成長速度には異なる流速依存性があること、流れは溶質分子の供給と不純物の供給を共に促進し、両者の競合で成長速度が決定されることが明らかになった。特に、低速度領域(数~20  $\mu\text{m/s}$  程度)では、流速の増加に応じてステップ成長速度が増す傾向が多くみられた。これは、この流速領域が溶質供給を促し、不純物供給を抑制している可能性を示唆している。尚、この流速領域は我々が溶液攪拌に用いているロータリーシェーカーで生じる流速に極めて近いものであった。

また、実際の結晶育成では、シェーカーでの攪拌速度が 50~100rpm 程度で結晶品質向上(X線分解能向上など)の効果がみられることが多い。そこで我々は、攪拌無し、有り(50rpm,

100rpm)の各条件下にてリゾチーム正方晶・単斜晶、グルコースイソメラーゼ斜方晶を育成した後にエッチング処理を行い、結晶表面に出現したピット形状・密度の観測から、溶液攪拌が結晶欠陥の種類や密度に及ぼす影響を調べた。その結果、攪拌速度の増加に伴い、結晶中の転位に基づく deep pit 密度が増加し、一方で点欠陥に基づく shallow pit 密度は減少するという傾向が見られた(但し、リゾチーム正方晶の shallow pit に関しては全条件で密度が高く計測不可)。点欠陥は不純物に由来する欠陥であることから、本結果は、50~100rpm 程度のシェーカー攪拌が不純物供給を減少させること、転位よりも点欠陥の存在がタンパク質結晶の品質に悪影響を及ぼす可能性があることを示唆していた。

### 【難結晶化タンパク質結晶育成】

(難結晶化タンパク質の完全結晶育成技術創成のための要素技術開発とその実証研究、及びタンパク質・難結晶化材料結晶化受託)

本研究では、我々の技術の汎用性を様々なタンパク質において検証し、その知見を結晶化手法の高度化へとフィードバックすることを目的とし、多種にわたる生体高分子について、国内外の大学や公的研究機関との共同研究を展開しながら高品質結晶化に取り組んでいる。現在、複合体を含む9種類の難結晶化共同研究サンプルにおいては、初めて高品質結晶化に成功し、その中の1種類のタンパク質については高分解能構造解析に成功している。

(1) Soybean vacuolar sorting receptor (VSR) タンパク質の結晶化 (京都大学大学院農学研究科・丸山伸之先生との共同研究)

21世紀の食糧問題に対処しうる新規な食糧素材の開発ターゲットである、ダイズ種子タンパク質の貯蔵液胞への選別輸送を決定するレセプターVSR タンパク質の結晶化実験を試みた。従来法では、X線構造解析の分解能は20Å分解能までであったが、キャピラリー法を適用することによって分解能が4.5Åと飛躍的に向上した。さらに、2種類のペプチド(RAFYとILRAFY)との複合体結晶を作製することによって、それぞれ分解能が4.1Åと3.1Å分解能まで向上した。現在、構造解析が進行中である。

(2) Tomato mosaic virus 130K タンパク質の結晶化 (農業生物資源研究所・加藤悦子先生との共同研究)

植物ウイルス感染症であるトマトモザイク病に関与している130Kタンパク質の結晶化実験を試みたところ、溶液攪拌を行わない場合は2.1Å分解能までの反射を持つ結晶が得られたのに対して、溶液攪拌技術により育成した場合には、1.8Åまで分解能が向上した。さらに、X線回折の異方性が大きく改善された。現在、構造解析が進行中である。

(3) Tm-1/Helicase 複合体タンパク質の結晶化 (農業生物資源研究所・加藤悦子先生との共同研究)

植物ウイルス感染症であるトマトモザイク病に関与している Tm-1/Helicase 複合体タンパク質の結晶化実験を試みたところ、初めて結晶を得ることに成功した。得られた結晶はまだ小さいため、現在結晶化条件の最適化が進行中である。

(4) Polyamine ABC transport protein (PotA)の結晶化(千葉大学・五十嵐一衛先生と千葉科学大学・柏木敬子先生との共同研究)

大腸菌の細胞増殖に関与しているポリアミンの ABC トランスポータータンパク質 PotA の結晶化に初めて成功し、3.5 Å 分解能までのX線回折データが得られている。現在、更なる分解能向上を目指して溶液攪拌技術を用いた結晶化実験を行っている。

(5) RNA アプタマー(AML38)/AML-1 複合体の結晶化と構造解析(東京大学医科学研究所・中村義一先生と千葉工業大学・坂本泰一先生との共同研究:平成17年度CREST「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」採択課題)

急性骨髄性白血病に関与している AML-1 と RNA アプタマー(AML34)との複合体結晶化を試みたところ、従来法では X 線構造解析の分解能は 10 Å 分解能までであったが、溶液攪拌法では、分解能が 3.0 Å と飛躍的に向上した。現在、構造解析が進行中である。

(6) 細胞増殖必須因子 Spermidine acetyltransferase (SAT)の結晶化と構造解析(千葉大学・五十嵐一衛先生と千葉科学大学・柏木敬子先生との共同研究)

細胞増殖必須因子であるポリアミン代謝に関与している SAT の結晶化に初めて成功し(図 1)、2.6 Å 分解能のX線強度データにて構造解析に成功した(図 2)。



図 1. SAT 結晶

初めて  
立体構造解析  
に成功

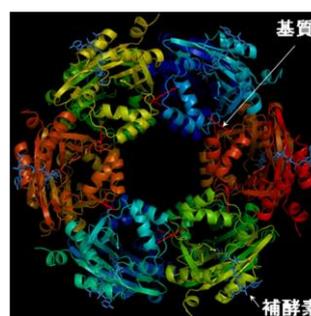


図 2. SAT の結晶構造

(7) 抗酸化タンパク質 peroxiredoxin (Prx) 結晶の大型化((独)産業技術総合研究所・中村努先生と日本原子力研究開発機構・黒木チームとの共同研究)

中性子回折測定を目的とした過酸化水素を水に還元する抗酸化タンパク質 Prx 結晶の大型化は、従来法では多結晶化するために大型結晶育成は困難であったが、我々の結晶育成技術(気液界面育成法)により、2.0×2.0×0.8mm の大型結晶を得ることに成功し、4 Å 分解能の中性子回折強度データを収集することができた。さらに最近では、2.5×2.5×1.0mm の良質な大型結晶を得ることに成功している。

(8) Calmodulin 結晶の大型化(日本原子力研究開発機構・黒木チームとの共同研究)

中性子回折測定のために重水素化したサンプルと各種溶液を用いた Calmodulin 結晶の大型化は、従来の静置法では細い針状結晶しか得られなかったが、我々の結晶育成技術(リザーバー溶液の濃度制御による結晶育成)により、 $2.0 \times 1.0 \times 0.2\text{mm}$  の大型結晶を得ることに成功した。

(9) Minichromosome Maintenance (MCM) タンパク質とDNA 複合体の結晶化と構造解析(イギリス ケンブリッジ大学との共同研究)

DNA の複製過程(開始および伸長過程)で DNA 開裂を担う MCM タンパク質と DNA 複合体の高品質結晶化に成功した。これまで低分解能( $\sim 4.5 \text{Å}$ )かつ低品質(mosaicity :  $1.0^\circ$ 以上)の結晶しか得ることができなかったが、溶液攪拌技術を用いることによって解析可能な高品質結晶を得ることに成功した。現在、高分解能( $3.1 \text{Å}$ 分解能、mosaicity :  $0.2\text{-}0.4^\circ$ )の回折強度データを収集し、構造解析が進行中である。

(膜タンパク質完全結晶創成)

タンパク質結晶化のなかでもとりわけ困難であるということが知られている膜タンパク質の結晶化は、構造生物学分野での最後の開拓地であると表現されている。

これまで開発・高度化を進めてきたフェムト秒レーザー照射や微量溶液攪拌あるいは、ゲル中での結晶化を膜タンパク質に適用し、これら技術の汎用性の拡張を狙い研究を進めてきた。本年度はAcrBの高濃度(2%)アガロースゲル中での結晶化を行い、X線回折実験を行った。殆どの場合において結晶性は向上しており、少なくとも2002年nature誌に発表したものと同程度か、それ以上の分解能を確認している。また、大腸菌AcrB結晶はフェムト秒レーザー照射や溶液攪拌により分解能が著しく向上することから、AcrB結晶における育成条件と結晶性との相関を調べる事が、難結晶化タンパク質結晶育成技術の高度化に繋がる。その第一歩として、大腸菌AcrB結晶表面の微分干渉顕微鏡による観察などを行ったところ、渦巻き成長中心からステップ成長していることを初めて確認できた。これら、高濃度アガロース中での膜タンパク質の結晶化、および、膜タンパク質結晶の成長過程の微分干渉顕微鏡を用いた詳細な解析などはこれまで全く前例がなく、これらの研究をさらに発展させることにより、難結晶化サンプルに対する本開発技術の適用範囲が広がることが期待できると考えている。

(有機低分子化合物結晶化)

溶液攪拌技術を有機低分子化合物である蛍光性機能探索分子 enantiomer A、enantiomer B(両者は異性体の関係)とそのヨウ素誘導体の結晶化(CREST:東京大学長野哲雄先生との共同研究)に用いたところ、enantiomer B ヨウ素誘導体において、結晶化、X線構造解析による絶対配置の決定に初めて成功し、溶液攪拌技術が有機低分子化合物の高品質結晶化においても

十分に応用可能な技術であることを示した。

また、溶液の過飽和度を制御することも高品質結晶化には重要である。半導体超微細加工用分子レジスト材料であるカリックスアレーン誘導体の結晶化(神奈川大学西久保忠臣先生との共同研究)においても、溶媒蒸発量の制御により過飽和度を制御し、5種の誘導体の結晶化とX線回折データの取得に初めて成功し、現在構造解析・精密化検討中である。

#### 【大型結晶育成キットの実用化:研究成果の社会還元加速テーマ】

本CREST研究で開発した溶液攪拌技術などを駆使した結晶大型化技術を、J-PARC等、中性子線回折装置のユーザーとなる研究者が活用できるように、本年度から大型タンパク質結晶育成キットの実用化に取り組んでいる。

高効率タンパク質試料利用技術の開発において、溶液追加・交換が可能な結晶育成装置を検討し、育成溶液中のタンパク質濃度を制御出来ることを確認した。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

#### (1) Chiral Tetraazamacrocycles Having Four Pendant-Arms

Org. Lett. 11 (2009) 2289-2292

S. Kamioka, T. Takahashi, S. Kawauchi, H. Adachi, Y. Mori, K. Fujii, H. Uekusa, T. Doi

DOI: 10.1021/ol9005954

#### (2) Protein crystallization in Agarose Gel with High Strength: Developing an Automated System for Protein Crystallographic Processes

Jpn. J. Appl. Phys. 48 (2009) 075502

S. Sugiyama, K. Tanabe, M. Hirose, T. Kitatani, H. Hasenaka, Y. Takahashi, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, T. Inoue, H. Matsumura

DOI: 10.1143/JJAP.48.075502

#### (3) Femtosecond Laser Processing of Agarose Gel Surrounding Protein Crystals for Development of an Automated Crystal Capturing System

Jpn. J. Appl. Phys. 48 (2009) 105502

S. Sugiyama, H. Hasenaka, M. Hirose, N. Shimizu, T. Kitatani, Y. Takahashi, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, H. Matsumura

DOI: 10.1143/JJAP.48.105502

- (4) Femtosecond laser processing of protein crystals grown in agarose gel  
J. Cryst. Growth 312 (2009) 73-78  
H. Hasenaka, S. Sugiyama, M. Hirose, N. Shimizu, T. Kitatani, Y. Takahashi, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, H. Matsumura  
DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2009.09.031
- (5) A Manipulating Tool for Protein Microcrystals in Solution Using Adhesive Materials  
Jpn. J. Appl. Phys. 48 (2009) 118001  
T. Kitatani, H. Adachi, S. Sugiyama, H. Matsumura, R. Murai, Y. Takahashi, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, K. Takano  
DOI: 10.1143/JJAP.48.118001
- (6) Growth of large protein crystals by top-seeded solution growth together with floating and solution-stirring technique  
Cryst. Growth Des. 9 (2009) 5227-5232  
N. Shimizu, S. Sugiyama, M. Maruyama, H. Y. Yoshikawa, Y. Takahashi, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H. Matsumura, Y. Mori  
DOI: 10.1021/cg900740n
- (7) Promotion of Crystal Nucleation of Protein by Semi-Solid Agarose Gel  
Appl. Phys. Ex. 2 (2009) 125501  
K. Tanabe, M. Hirose, R. Murai, S. Sugiyama, N. Shimizu, M. Maruyama, Y. Takahashi, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, E. Mizohata, T. Inoue, H. Matsumura  
DOI: 10.1143/APEX.2.125501
- (8) Enhancement of femtosecond laser-induced nucleation of protein in a gel solution  
Appl. Phys. Lett. 96 (2010) 043702  
R. Murai, H. Y. Yoshikawa, Y. Takahashi, M. Maruyama, S. Sugiyama, G. Sasaki, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori  
DOI: 10.1063/1.3294622
- (9) Molecular resolution investigation of tetragonal lysozyme(110) face in liquid by

FM-AFM.

Appl. Phys. J. Vac. Sci. Technol. B 28 (2010), accepted

K. Nagashima, M. Abe, S. Morita, N. Oyabu, K. Kobayashi, H. Yamada, M. Ohta, R. Kokawa, R. Murai, H. Matsumura, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori

DOI: 10.1116/1.3386383