

研究終了報告書

「タンパク質結晶の転位論に基づく力学特性の解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：鈴木 凌

1. 研究のねらい

生体高分子であるタンパク質から構成される結晶材料として、タンパク質結晶がある。一般的な金属材料や無機材料と比較して、タンパク質結晶は数十～数百ナノメートルといった巨大分子から構成されており、その大きさに伴った結晶格子の大きさが特徴の一つである。実際に本研究の対象であるグルコースイソメラーゼ結晶(GI結晶)はその格子定数がおよそ100Åである。さらに、タンパク質結晶は結晶内におよそ30~70 vol.%の水分子を含んでいる。その水は無機結晶や有機結晶でみられるような水和物における水とは異なり、格子内を自由に動き回ることが出来るといった特徴がある。そのため、タンパク質結晶はこれまでの一般的な材料にはない「結晶水を他の物質と置換できる」という類稀な特徴を有していることから、次世代の結晶性生体材料として注目されている[例として, S. Lopez et al., *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 17994 (2017).]。

一般的に、材料の強度などの力学特性はその構成要素同士の結合の強さや変形のしやすさがカギとなる。結晶材料の変形のしやすさを考える概念として、すべり変形がある。すべり変形では結晶構造から考えられるすべり面の面間隔、すべり方向を示すバーガースベクトル、結晶の剛性率などが因子として与えられる。また、多結晶材料においては粒界がすべるといったモデルも考えられている。これらのモデルは基本的には金属材料や無機材料などの研究が盛んにおこなわれてきており、結晶材料の変形機構として普遍性が確立されてきた。一方で、タンパク質結晶はこれらの結晶材料とは異なり、その結晶を構成する構成要素(タンパク質分子)や結晶格子の大きさが巨大である。さらに、タンパク質結晶は分子間の結合が非常に弱く、その結晶格子内に大量の水分子が存在しているといった特徴がある。そのため、上述した変形機構が成立するのか?といった疑問が残る。この問題を解決することが出来れば、「もろく壊れやすい」という弱点のため実用化には至っていないタンパク質結晶の応用も可能になる。しかし、タンパク質結晶は一般の材料に比べて成長時に発生する結晶欠陥(主に転位)が多く、高品質な結晶を得ることが困難なため、転位の挙動やその運動など、力学的な性質に関する知見は非常に少ない。そこで、本研究のねらいは、タンパク質結晶の一つであるGI結晶を用いてタンパク質結晶の力学的性質を転位論に基づいて明らかにすることである。

2. 研究成果

(1) 概要

本さきがけ研究では、およそ3年半の期間を通し、タンパク質結晶の力学特性の解明とタンパク質結晶と水和ゲルの融合による新しい力学特性の付加とその機構解明に成功した。

金属材料や無機材料において、電子顕微鏡は結晶欠陥の転位や空孔などの緻密な観察を可能としている。タンパク質結晶は結晶格子内に大量の結晶水を含んでおり、真空などの条件では脱水和による結晶性の低下、結晶の破壊を引き起こすため、電子顕微鏡による観察は現実的ではない。研究テーマ①「力学試験によるタンパク質結晶の力学的性質の解明」では、X線トポグラフィによるタンパク質結晶の変形挙動の直接観察に尽力した。X線トポグラフィとは、単結晶材料中の転位や介在物などの欠陥情報を非接触・非破壊で観察できるX線回折法の一つである。古くから半導体結晶中の転位などの欠陥評価に使われてきた。本研究では、ステップモーター駆動の応力負荷装置を放射光施設のビームラインに組み込み、タンパク質結晶の変形の動的観察に成功した。結果として、タンパク質結晶への応力負荷による塑性変形挙動の観察により、転位を主機構とする塑性変形の定量化に成功した。さらに、ナノインデンテーション試験による荷重変位曲線の観察から弾性変形から塑性変形へと移り変わる変位量と荷重の定量化を行い、転位発生に必要な臨界せん断応力の推定に成功した。また、弾性変形から塑性変形に移行した変位量はおおよそタンパク質分子一つ分の大きさに対応しており、タンパク質結晶の塑性変形が分子1個分の変位量を与えただけで塑性変形が生じる可能性が示された。研究テーマ①により、タンパク質結晶の転位の発生や運動を制御することが固体材料としての応用に求められることが示された。

研究テーマ②では、もろく壊れやすいタンパク質結晶の高強度化法として、水和ゲル法に着目した。水和ゲル法とは、アガロースゲルなどの水和ゲル中でタンパク質結晶の作製を行う方法である。結晶作製時のゲル濃度条件を0, 0.1, 0.5, 1.0 wt.%として作製したタンパク質結晶の圧縮試験を行うと、ゲル濃度の増加と共に破壊応力が大きく上昇することが明らかとなった。一方、ヤング率はゲル濃度に依存せず、およそ一定の値を示した。すなわち、破壊挙動にのみ水和ゲルの効果が発現していることが分かった。ゲル成長のタンパク質結晶を純水に溶解させると、元の結晶の形を保持したゲルが残留した。これは、水和ゲルが結晶内に存在しながら単結晶であることを示している。さらに、ゲル濃度が高いほど、ゲルの網目構造が微細化しており、この網目構造が結晶内部のクラックの発生と伝播を抑制していることが考察される。

(2) 詳細

研究テーマ①「力学試験によるタンパク質結晶の力学的性質の解明」

タンパク質結晶は結晶水を大量に含んでおり、脱水和による結晶性の低下や結晶の破壊が容易に生じる。そのため、真空条件や大気開放系でのその場観察は困難であった。さきがけ研究期間の2年次までに、結晶性を保持したまま力学試験とX線トポグラフィの同時測定を可能とする方法を確立した。具体的には、ガラス基板上にタンパク質結晶を直接作製し、結晶を結晶化

溶液ごとパラフィンオイル中に封じ込める方法である。さらに、ステッピングモーターを組み合わせた応力負荷装置にロードセルとダイヤモンドバーコピッチ圧子の実装を行い、一定の変形速度下における力の検出を可能とする実験系の高度化を図った。

放射光X線トポグラフィ技術と変形試験のその場観察手法、そしてインデンテーション試験による荷重変位曲線の観測から塑性変形を担う転位の発生と伝播がタンパク質結晶で存在することが示された。この点においては、一般の金属材料や無機材料と同様に転位論を借りて説明できる。一方、塑性変形に移行する変位量と結晶を構成するタンパク質分子の大きさが等価である点は非常に興味深い。これは金属や無機結晶など、原子を構成要素とする材料に比べて、数 nm 程度の大きさを持ちながら、分子間力が非常に弱いタンパク質で構成されたタンパク質結晶特有のふるまいである可能性が示された。すなわち、タンパク質結晶の特異性として期待できる。なお、本成果は現在論文の投稿準備中であるため、詳細は割愛する。

研究テーマ②「水和ゲルとの協奏による特異な力学特性の発現」

もろく壊れやすいタンパク質結晶の高強度化法として、水和ゲル法に着目した。水和ゲル法とは、アガロースゲルなどの水和ゲル中でタンパク質結晶の作製を行う方法である。図 1 に示すように、結晶作製時のゲル濃度を 0, 0.1, 0.5, 1.0 wt.% と条件として作製したタンパク質結晶の圧縮試験を行うと、ゲル濃度の増加と共に破壊応力が大きく上昇することが明らかとなった。一方、ヤング率はゲル濃度に依存せず、およそ一定の値を示した。すなわち、破壊挙動にのみ水和ゲルの効果が発現していることが分かった。

ゲル成長のタンパク質結晶を純水に溶解させると、元の結晶の形を保持したゲルが残留した(図 2)。これは、水和ゲルが結晶内に存在しているながら単結晶であることを示している。さらに、ゲル濃度が高いほど、ゲルの網目構造が微細化しており、この網目構造が結晶内部のクラックの発生と伝播を抑制していることが考察される。

生体触媒やバイオセンサーなど生分解性や生体適合性を兼ね備えた生体高分子から成るタンパク質結晶は今後の環境親和性の高い材料となりうる。一方でもろく壊れやすい課題があるため、その応用には壁が大きい。本研究では水和ゲル法で作製したタンパク質結晶の力学特性に関する定量化と構造モデルの提案に成功した。ヤング率や降伏応力など、力学物性値は使用用途や環境において求められる基準が異なる。今後は水和ゲル法で使用できるゲルの種類や適応可能なタンパク質の種類など、系統的な研究が求められる。なお、本成果は項目 5 の 1 に対応する。

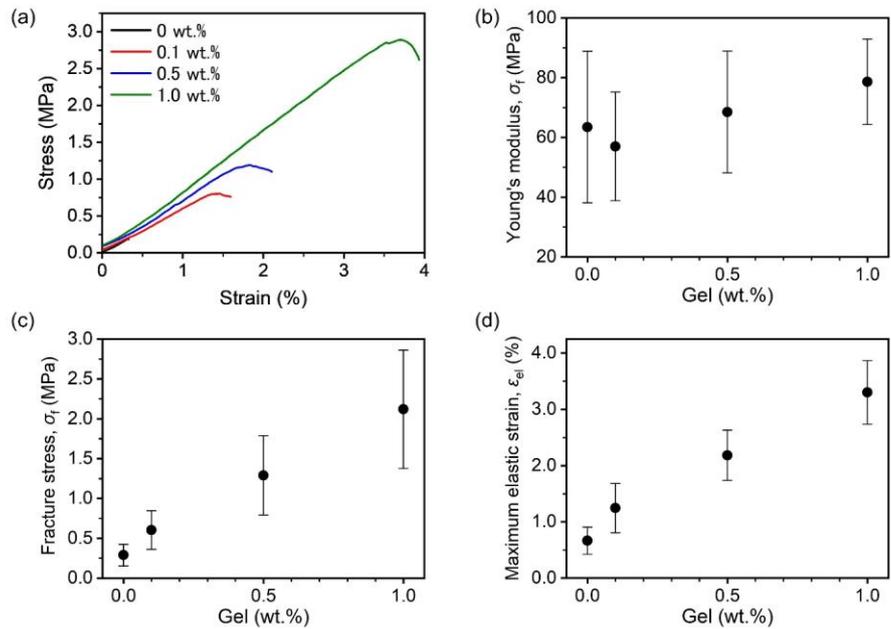


図 1. (a) 各ゲル濃度の応力ひずみ曲線, ゲル濃度に対する (b) ヤング率, (c) 破壊応力, (d) 最大弾性ひずみの関係.

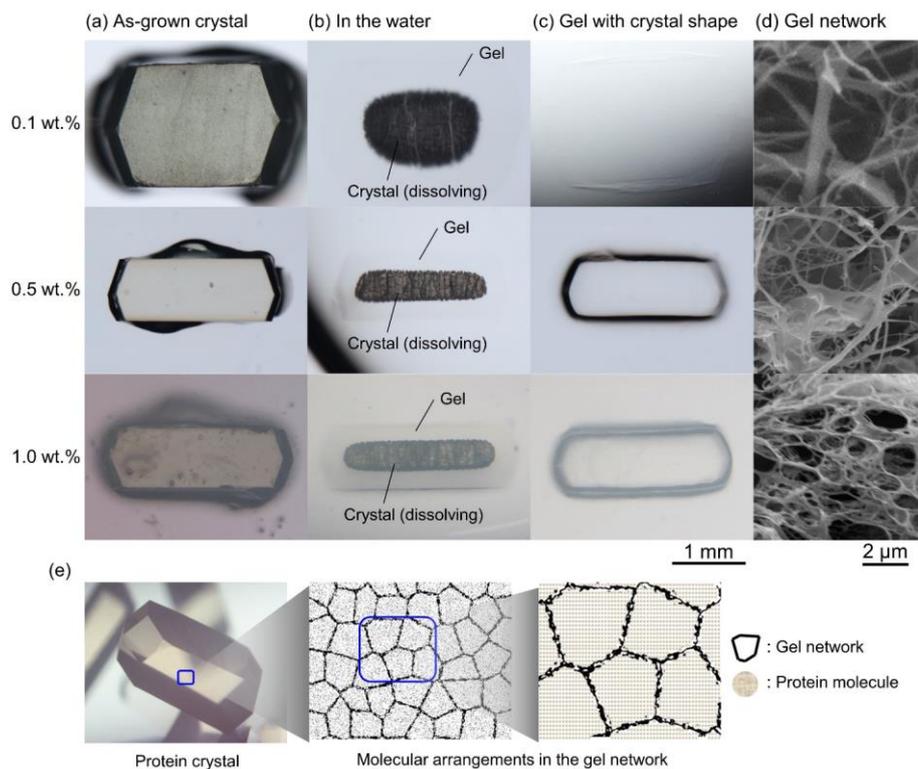


図 2. (a) 溶解前, (b) 溶解途中, (c) 溶解後の結晶の光学顕微鏡像, (d) ゲル単体の電子顕微鏡像, (e) ゲルの網目構造を含有するタンパク質結晶の模式図.

3. 今後の展開

本さきがけ研究では、これまで系統的な研究や知見の乏しかったタンパク質結晶の力学特性の定量的な解釈に向けた第一歩を踏み出せた。もろく壊れやすいタンパク質結晶の転位論的な解釈を通し、強度のコントロール法の創出が求められる。それらが可能となれば、生分解性や生体適合性を兼ね備えたタンパク質結晶の材料応用へ向けて、大きな展開が期待できる。また、本研究では、転位論に基づいた力学特性の解釈だけでなく、水和ゲル法などの添加剤を融合しながらもタンパク質結晶の特異性を維持する新しい力学特性の付加も可能であることが明らかとなった。そこで、水和ゲル法のみならず、架橋剤などのドーピングによる力学特性の制御も期待できる。

本さきがけ研究期間の最終年度には、タンパク質間を架橋するような化学架橋剤を添加することで、その力学特性が劇的に変化することを見出し始めている。そこで、本さきがけ研究期間で積み上げることのできた純粋なタンパク質結晶の力学特性の知見を軸に、添加剤による力学特性の制御・解明、そしてタンパク質の機能を活かした新しいバイオマテリアルの創出を目指していきたい。まずはこれらのタンパク質結晶の力学特性を定量的に解釈すべく、本さきがけ研究期間で築き上げた力学特性評価法を用いてさきがけ研究期間と同様な期間内(3年ほどを目安)で研究を進める。並行して、具体的に機能や活性を期待されるタンパク質の種類に着目し、力学特性と材料機能(タンパク質の酵素活性など)の両輪で発展を目指す。

4. 自己評価

2019年10月より開始したさきがけ研究において、開始早々半年ほどで世界が一変した新型コロナウイルス感染症により、2020年の研究は計画通りに進みませんでした。しかし、そのような環境であったからこそ進められる範囲で発展できた研究が項目3で先述しました研究テーマ②の水和ゲル法の成果です。アイザック・ニュートンが数々の成果をあげた一因として、ペストの流行を原因とした大学の閉鎖による自由に思考する時間の取得です。ニュートンの偉大な研究成果と比べてしまうとその規模は違いますが、コロナ禍で一步踏み出した研究テーマの発展は結果的に良かったと感じます。また、さきがけ研究期間3年半を通して、期間開始前は半ば遂行が可能か不透明であった研究テーマ①においても、タンパク質結晶の他材料に対する類似性や相違点が明らかになったことは大きな成果です。これらの成果は今すぐに応用や社会・経済に大きな波及効果をもたらすものではないかもしれませんが、しかし、新たな生体材料として環境負荷の小さい新材料創出に向けて、基礎を築く成果であると自負します。すなわち、さきがけの目指す先駆的な基礎研究であり、科学技術のイノベーションを司る新しい知見の創出と言えると思います。一方で、たった3年半での研究生生活は私の研究に対する視野を少し広げたにすぎません。さきがけ研究で培った研究者間のネットワークを今後大事にするとともに、今後の研究を発展できる基盤が出来たことは一個人として評価しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:9件

1. Ryo Suzuki, Ayano Karasawa, Ayaka Gomita, Marina Abe, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana, Unique mechanical properties of gel-incorporating protein crystals. ACS Applied Bio Materials, revised.

溶液成長法とゲル成長法による大型のタンパク質結晶の作製とその力学特性の解明に成功した。圧縮試験の結果、明瞭な塑性変形をせず破壊する脆性材料に見られるような応力ひずみ曲線が得られた。また、ゲル濃度が大きくなるにつれて、弾性限界のひずみ量と破壊に必要な応力が大きくなる様子が観測された。しかしながら、ゲル濃度の違いによるヤング率の大きな違いは見られなかった。さらに、結晶内のゲルのネットワーク構造が明瞭に観察され、タンパク質結晶とゲルの協奏による破壊を抑制するメカニズム解明に成功した。

2. 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 55 (2022) 1111-1115.

タンパク質結晶が見た目から確認できないほど微小にねじれていることを発見した。このねじれの大きさは非常に小さいため、一般的な手法では観察できない。デジタル X 線トポグラフィ技術を駆使することで観察可能となった。この手法を用いることで、多くの結晶においてねじれの存在を明らかにできる可能性がある。また、ねじれは非対称な分子形状に起因していると明らかにした。ねじれは、非対称な形状を持つ分子からなるすべての結晶に存在する、結晶本来の性質であると言える。

3. Ryo Suzuki, Seiki Baba, Nobuhiro Mizuno, Kazuya Hasegawa, Haruhiko Koizumi, Kenichi Kojima, Takashi Kumasaka, Masaru Tachibana, Radiation-induced defects in protein crystals observed by X-ray topography. Acta Cryst. D78 (2022) 196-203.

本研究では、タンパク質結晶の X 線による照射損傷の解明を目的とし、就航した X 線のスポット照射を行った。X 線トポグラフィ測定から、スポット照射によって格子欠陥が発生したことが明らかとなった。これまで無機材料では電子線などによる点欠陥の発生が報告されているが、X 線では例がない。また、照射した X 線の合計量で欠陥の発生が決まるのではなく、単位時間あたりの照射量(レート)が欠陥の発生を支配していることが明らかとなった。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 鈴木凌, 小島謙一, 橘勝, 水和ゲルを内包したタンパク質結晶の力学特性. 日本機械

学会 M&M2022 材料力学カンファレンス, 2022 年 9 月 27 日.

2. 高久大輝, 鈴木凌, 小島謙一, 橘勝, 架橋タンパク質結晶の圧縮試験による力学特性の評価. 日本機械学会 M&M2022 材料力学カンファレンス, 2022 年 9 月 27 日.
3. 鈴木凌, タンパク質結晶の転位の運動と塑性変形. 第 2 回マルチスケールマテリアルモデリングシンポジウム, 2022 年 5 月 31 日.

プレスリリース

4. タンパク質の結晶のほとんどはねじれている！ —微小な“ねじれ”の観測に成功—, 2022 年 5 月 18 日.
5. X 線を当てるだけで発生するタンパク質結晶の欠陥を観測, 2022 年 2 月 8 日.