

ゲルを用いた結晶化法による高品質タンパク質結晶の育成
Crystallization of high quality protein crystals using hydrogel methods

丸山美帆子^{1*}, 林佑紀¹, 富永勇佑¹, 山形眞¹, 小泉晴比古²,
橘勝³, 杉山成⁴, 吉村政志¹, 森勇介^{1,5}

¹大阪大学大学院工学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

²東北大学金属材料研究所, 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

³横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科, 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2

⁴大阪大学大学院理学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

⁵株式会社創晶, 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

Mihoko Maruyama¹, Yuki Hayashi¹, Yusuke Tominaga¹, Shin Yamagata¹, Haruhiko Koizumi²,
Masaru Tachibana³, Shigeru Sugiyama⁴, Masashi Yoshimura¹ and Yusuke Mori^{1,4}

¹Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1, Suita, Osaka 565-0087, Japan

²Institute for Materials Research, Tohoku University, 2-1-1, Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577,
Japan

³Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku,
Yokohama, 236-0027, Japan

⁴Graduate School of Science, Osaka University, 2-1, Suita, Osaka 565-0087, Japan

⁵SOSHO Inc., 2-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan

1 はじめに

多種多様なタンパク質個々の機能を理解するために、タンパク質を結晶化し、その結晶を用いて X 線構造解析や中性子線構造解析を行う。一方、構造解析が可能なタンパク質結晶を得るのは極めて難しく、得られたとしてもその後のハンドリング作業がタンパク質結晶にダメージを与えてしまい、これらの過程が構造解析のボトルネックになっている。

高強度ハイドロゲルを用いたタンパク質結晶化技術は、タンパク質の核発生確率を向上させる[1, 2]。更に、得られたタンパク質結晶の機械的・化学的強度は、従来法で得られたタンパク質結晶と比べて高いことが明らかになっており[3, 4]、構造解析に必須のマウント操作などにおいて結晶が損傷しにくく、これが高精度な X 線回折データ取得を実現させる要因となっている。一方で、ゲル中育成結晶は結晶内部に 3 次元的な構造を持つハイドロゲルを取り込んで成長しているが、ハイドロゲルとタンパク質分子そのものの相互作用、結晶欠陥の変化

などについての報告はいくつかあるものの[5]、まだ十分には明らかにはなっていない。そこで本研究では、ハイドロゲルを用いたタンパク質結晶化技術によって得られたゲル中育成結晶の完全性を X 線トポグラフィで観察し、ハイドロゲル中育成結晶の欠陥キャラクター化を明確にすることを目的とした。

2 実験方法

3 回再結晶鶏卵白リゾチーム (HEWL), NaCl, NaAc, および粉末アガロースは和光純薬工業から購入した。0.1M NaAc buffer を用いて 2.0~5.0%(w/v)に調整したアガロース溶液, 12~15% NaCl in 0.1M NaAc buffer (pH4.5), および 75~125 mg/ml HEWL in 0.1 M NaAc buffer (pH4.5)それぞれを 45 度に恒温しながら適切な量を混ぜあわせ、結晶化溶液を調整した。最終的な溶液の条件は HEWL 25 mg/ml, NaCl 3%, アガロースゲル濃度 0~2.0%(w/v)であり、バッファーは 0.1M NaAc (pH4.5)とした。溶液混合後、結晶化プレートもしくは 1 ml ガラスバイアル

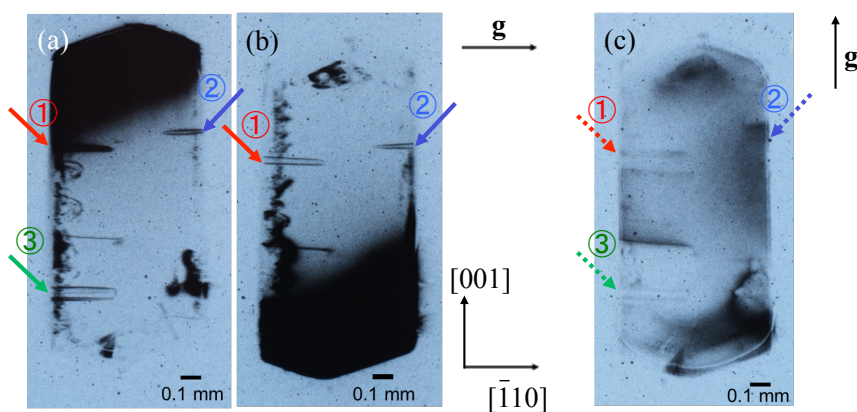


図 1. 0.25%アガロースゲル溶液中で得られた HEWL 結晶のトポグラフ像。(a)および(b) $g = 440$, (c) $g = 004$ 。(a)および(b)で見られた転位線は、(c)において消滅している。

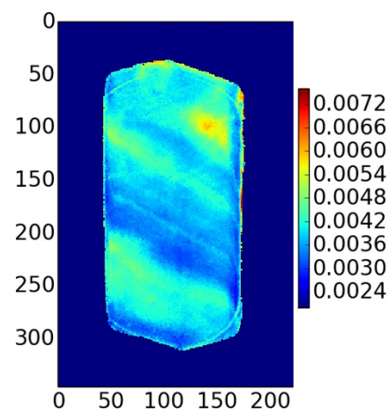


図 2. 0.25%アガロースゲル溶液中で得られた HEWL 結晶の XRC 半値幅マッピング像。

中にタンパク質溶液を分注し、これらを 21 ± 0.5 度のインキュベータ内で保存し、結晶化を行った。得られた結晶を傷つけないように容器から取り出し、プラスチック製のストローに結晶を固定して封入し、観察用サンプルとした。

これらのサンプルを、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の BL-20B (測定波長 1.2\AA , 電流値 450mA) において観察し、結晶の X 線トポグラフ像 (フィルムおよび CCD) を得た。得られた CCD の画像から、X 線ロッキングカーブの測定も試みた。画像の解析にはプログラム YSU-DTI (Copyright(C)2013 Kei Wako) を用いた。

3 実験結果および考察

図 1 (a) ~ (c) に、アガロースゲル 0.25% のリゾチーム溶液から得られた正方晶 HEWL 結晶の X 線トポグラフ像を示す。図 1 (a) および (b) の回折ベクトルは $g = 440$, (c) の回折ベクトルは $g = 004$ である。(a) および (b) には、複数本の転位線と見られる黒いコントラストが観察された。多くのものは、2本の線が隣り合うような形で観察されている。同じ結晶の 004 反射において、440 反射で見られた黒い線 ((a) および (b) に矢印① ~ ③で示したもの) が消滅することが確認された。転位の消滅則 $g \cdot b = 0$ (b : 転位のバーガスベクトル) より、今回観察された転

位線は b が $\langle 110 \rangle$ であり、転位線の方向と並行であることからせん転位であることが確認された。なお、(c) において消滅したそれぞれの転位線の周辺にやや黒いコントラストが残留しているのは、転位線周辺に残留する歪の影響であると考えている。全ての転位線の長さの総和を結晶の体積で除したものを転位密度として定義し計算したところ、本結晶の転位密度は $2.55 \times 10^2 \text{cm}^{-2}$ であった。図 2 に、同じ結晶の CCD トポグラフ像から計算した XRC 半値幅のマッピング像を示す。画像の処理により、図 1 と左右が反転している。半値幅マッピング像は、斜めのコントラストを呈した。結晶の中央付近で転位線と重複しない範囲を選び、30 ピクセルほどの範囲で XRC の半値幅を測定したところ、 $3.8 \times 10^{-3} \text{deg.}$ 程度の値であった。

今回得られたトポグラフ像、得られた転位密度および XRC 半値幅を過去の溶液中育成結晶のものと比較を試みた。Mukobayashi らによって報告された NiCl_2 濃度勾配法で溶液中育成した結晶は、転位密度が $10^2 \sim 10^3 \text{cm}^{-2}$ のオーダーであり、XRC 半値幅の分布は $1.5 \times 10^{-3} \sim 3.0 \times 10^{-3} \text{deg.}$ 程度であった [6]。本研究で得られた値は、この溶液中育成結晶と比較して同程度の転位密度および XRC 半値幅を呈している。結晶内部にアガロースゲルという異物を混入

しながらも、結晶の欠陥（らせん転位）は溶液中結晶とほとんど変わらない振る舞いをするのが初めて明らかにされた。

4 まとめ

0.25 ~ 2.0%(w/v)アガロース溶液中で結晶化した HEWL の結晶について、X線トポグラフィ観察を行った。今回、0.25%(w/v)アガロース条件で育成した結晶に関して良好なトポグラフィ像が得られ、結晶内部に $b = \langle 110 \rangle$ のらせん転位が複数存在することが確認された。見積もられた転位密度および XRC 半値幅の値は、これまでに報告されている溶液中リゾチーム結晶と同等程度であり、結晶内部に含有されるアガロースゲルの繊維によって結晶の完全性が大幅には乱されないことが明らかになった。

今回の報告では、解析の都合上 0.25%アガロースゲル中で得られた結晶のみを示した。得られたデータの解析が進行し次第、再度の報告を予定している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、現場での作業をサポートいただいた横浜市立大学の岸健晴氏、鈴木凌氏に感謝いたします。また、データの解析プログラムをご提供くださった横浜創英大学の若生啓博士に感謝いたします。

参考文献

1. Vidal, O., M.C. Robert, and F. Boué, *Gel growth of lysozyme crystals studied by small angle neutron scattering: case of agarose gel, a nucleation promotor*. Journal of Crystal Growth, 1998. **192**(1-2): p. 257-270.
2. Tanabe, K., et al., *Promotion of Crystal Nucleation of Protein by Semi-Solid Agarose Gel*. Applied Physics Express, 2009. **2**(12): p. 125501.
3. Gavira, J.A. and J.M. Garcia-Ruiz, *Agarose as crystallisation media for proteins II: Trapping of gel fibres into the crystals*. Acta Crystallographica Section D, 2002. **58**(10 Part 1): p. 1653-1656.

4. Sugiyama, S., et al., *Growth of Protein Crystals in Hydrogels Prevents Osmotic Shock*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(13): p. 5786-5789.
5. Robert, M.C., et al., *Influence of impurities on protein crystal perfection*. Journal of Crystal Growth, 2001. **232**(1-4): p. 489-497.
6. Mukobayashi, Y., et al., *Observation of dislocations in hen egg-white lysozyme crystals by synchrotron monochromatic-beam X-ray topography*. Phys. Status Solidi A, 2009. **206**(8): p. 4.

* maruyama@cryst.eei.eng.osaka-u.ac.jp