

# 高品質グルコースイソメラーゼ結晶の成長転位の同定 Characterization of grown-in dislocations in high-quality glucose isomerase crystals

鈴木凌<sup>1</sup>, 小泉晴比古<sup>2</sup>, 小島謙一<sup>3</sup>, 橘勝<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>横浜市立大学, 〒236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 22-2

<sup>2</sup>東北大学, 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

<sup>3</sup>横浜創英大学, 〒226-0015 神奈川県横浜市緑区三保町 1

Ryo Suzuki<sup>1</sup>, Haruhiko Koizumi<sup>2</sup>, Kenichi Kojima<sup>3</sup> and Masaru Tachibana<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-0027, Japan

<sup>2</sup>Tohoku University, 2-1-1, Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

<sup>3</sup>Yokohama Soei University, 1 Miho-cho, Midori-ku, Yokohama, 226-0015, Japan

## 1 はじめに

我々はこれまで、モデルタンパク質であるリゾチーム結晶を用いて、X線トポグラフィによる結晶欠陥の評価、特に転位の観察やキャラクタリゼーションを行ってきた。リゾチーム結晶は正方晶、斜方晶、単斜晶といった結晶多形をもつ。それらを用いたX線トポグラフィ観察では、同じリゾチーム結晶でも結晶系の違いによる転位のキャラクターの違いを明らかにした[1-3]。しかし、タンパク質結晶の結晶欠陥の一般性を明らかにするためには、異なる種類のタンパク質結晶を用いる必要がある。そこで、本研究では、グルコースイソメラーゼ (GI) 結晶を用いた結晶欠陥のキャラクタリゼーションを行った。

## 2 実験

本測定で用いた GI 結晶は化学固定した種結晶から成長させる方法を用いて育成した[4]。X線トポグラフィ測定は BL20B で行った。カバーガラス上に育成された GI 結晶を作製したアクリルセルにセットし、成長溶液を取り除き、ポリエチレンフィルムで封をした。ゴニオメーター上にマウントした後、1.2 Å の単色 X 線を照射させながら X 線 CCD カメラ (Photonic Science X-RAY FDI 1.00:1) を用いて目的の回折に合わせ、トポグラフィ像の撮影を行った。

## 3 結果および考察

実際に育成された典型的な GI 結晶の光顕像と模式図を図 1 に示す。以下に示す結晶の模式図はすべて VESTA を用いて作製した[5]。矢印で示された結晶中央部のコントラストは化学固定された種結晶である。化学固定溶液であるグルタルアルデヒドが黄色であるため、グルタルアルデヒドが入りこんだ化学固定結晶は黄色を呈す。晶壁面は {110}、{101}、{011} である。この結晶の X 線トポグラフィ観察を行った。実際に得られた様々な回折面のトポグラフィ

像を図 2 および 3 に示す。ここで、特徴的なコントラストのうち、以下の 3 点について述べる。

1. 結晶中央部から伸びる直線状コントラスト
2. 結晶の端に見られている干渉縞
3. 1. の振動コントラスト

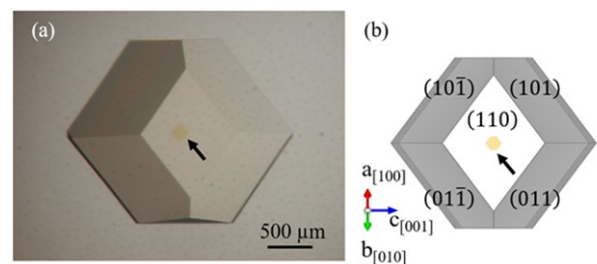


図 1. GI 結晶の (a) 光顕像と (b) 模式図

図 2 (a) および (b) はそれぞれ  $1\bar{1}0$  回折によって得られたトポグラフィ像とその時の模式図を示している。トポグラフィ像のコントラストはこれまでのリゾチーム結晶やリボヌクレアーゼ結晶等の他のタンパク質結晶と比べてはるかに明瞭である[1-3,6]。これは今回育成した GI 結晶の高品質性に由来していると考えられる。図 2 (a) に見られるように、これらの 2 本の直線状コントラストは化学固定された種結晶の周辺から伸びている。これらの線状コントラストは転位であると考えられる。転位の発生は上述した通り、格子定数の違いによって生じた分子配置のずれによるものであると考えられる。

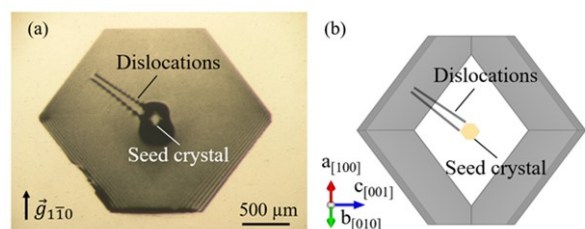


図 2.  $1\bar{1}0$  回折の (a) トポグラフィ像と (b) 模式図

図3 (a)および(b)は図2で示した結晶の異なる回折面である  $10\bar{1}$  回折および  $011$  回折をそれぞれ示している。図3の  $10\bar{1}$ 回折と  $011$  回折では図2の  $1\bar{1}0$  回折で見られた2本の直線状のコントラストが観察されなかった。この回折面の違いによる直線状のコントラストの消失は、これらのコントラストが転位に由来していることを示している。転位像の消失条件（回折ベクトル  $\mathbf{g}$  とバーガースベクトル  $\mathbf{b}$  の空間的配置； $\mathbf{g}\cdot\mathbf{b}=0$ ）から転位のバーガースベクトルを求めることができる。回折ベクトル  $10\bar{1}$ と  $011$  の時に転位像が消失していることから、これらの転位のバーガースベクトルは $[1\bar{1}1]$ であることが求められ、GI結晶の転位のバーガースベクトルが実験によって決定された。

最後に、干渉縞と転位線の振動コントラストについて着目する。図2 (a)および3に見られるように、結晶の端にあたる領域において干渉縞が明瞭に観察された。このような干渉縞は他のタンパク質結晶では観察されることがない。この干渉縞は動力学的回折によって生じたペンデル効果に由来する等厚干渉縞であると考えられる。これまでSiなどの極めて完全性の高い結晶もしくは完全結晶でしか観察されておらず、タンパク質結晶では初である。さらに、4つ目の振動コントラストも等厚干渉縞と同様、Siなどの完全結晶でのみ観察されており、タンパク質結晶では観察されることがない。この特異なコントラストは動力学的な回折効果に由来する中間的なコントラストとして知られている[7,8]。具体的には、結晶の完全領域内に伝播する元の波と転位などの欠陥によって生じた新しい波動場間の干渉によって生じる。これらの結果は、これまで報告されているタンパク質結晶と比較するとGI結晶の完全性は極めて高く、さらにはSiと比較しても遜色ない完全性を有していることを示している。

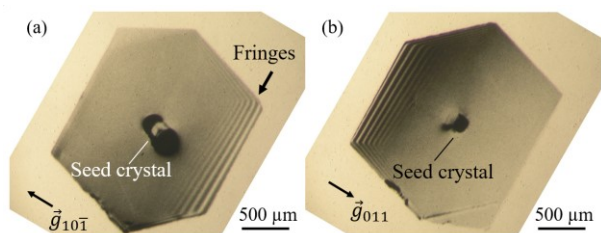


図3. (a)  $10\bar{1}$ 回折と (b)  $011$ 回折のトポグラフィ像

#### 4 まとめ

放射光単色 X 線トポグラフィを用いて高品質なGI結晶の成長転位の同定に成功した。さらに、転位線に沿った振動コントラストと干渉縞が明瞭に観察された。これらはSiのような非常に完全性の高い結晶でしか観察されていない動力学的な回折効果に起因するとされる。すなわち、GI結晶はリゾチーム結晶などの他のタンパク質結晶と比較して極めて高品質

であることが示された。タンパク質結晶の X 線トポグラフィといった観点から、高品質なGI結晶は非常に有用であるといえる。

#### 謝辞

実験準備および試料提供に多大な支援を頂いた大阪大学塚本勝男教授、徳島大学鈴木良尚准教授、独立行政法人宇宙航空研究開発機構 (JAXA) 吉崎泉博士、荒井康智博士、株式会社エイ・イーエス福山誠二郎氏に感謝致します。

#### 参考文献

- [1] H. Koizumi *et al.*, Phys. Stat. Sol. **204**, 2668 (2007).
- [2] Y. Mukobayashi *et al.*, Phys. Stat. Sol. **206**, 1825 (2009).
- [3] T. Sawaura *et al.*, J. Cryst. Growth **318**, 1071 (2011).
- [4] H. Koizumi *et al.*, Cryst. Growth Des. **14**, 5111 (2014).
- [5] K. Momma *et al.*, J. Appl. Cryst. **44**, 1272 (2011).
- [6] D. T. Gallagher *et al.*, J. Cryst. Growth **255**, 403 (2003).
- [7] J. E. A. Miltat *et al.*, J. Appl. Cryst. **8**, 657 (1975).
- [8] B. Raghoechamachar *et al.*, Microsc. Res. Techniq. **69**, 343 (2006).

#### 成果

1. H. Koizumi *et al.*, Cryst. Growth Des. **16**, 4905 (2016).
2. R. Suzuki *et al.*, J. Cryst. Growth **468**, 299 (2017).

\* tachiban@yokohama-cu.ac.jp