

動力学的回折理論に基づいた薄いタンパク質結晶の品質評価 Evaluation of crystal quality of thin protein crystals by dynamical diffraction

阿部満理奈¹, 鈴木凌^{1,2}, 小島謙一¹, 橘勝^{1*}

¹横浜市立大学, 〒236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 22-2

²科学技術振興機構, さきがけ, 〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

Marina ABE¹, Ryo SUZUKI^{1,2}, Kenichi KOJIMA¹ and Masaru TACHIBANA¹

¹Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-0027, Japan

²Japan Science and Technology Agency (JST), PREST,
4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama, 332-0012, Japan

1 はじめに

新規創薬や生命現象の理解に向けて、タンパク質の立体構造の解明に関する研究は世界中で活発に行われている。タンパク質結晶は、その立体構造の解明に向けた最も有力な手法である X 線結晶構造解析において必要不可欠である。その構造解析の精度は、測定に使用する結晶の品質に強く依存する。したがって、高品質なタンパク質結晶の育成やそのメカニズムの解明に向けた数多くの研究が盛んに行われてきた。

結晶における X 線回折は大きく分けると二つに分類される。一つは、入射 X 線が結晶中で 1 回だけ散乱を受ける運動学的回折で、結晶粒界や転位などの格子欠陥を多く含み、三次元的な周期性が乱れた結晶で観測される。もう一つは、結晶中で多数回の散乱(多重散乱)を受ける動力学的回折で、シリコンのような極めて高品質な結晶(完全結晶)においてのみ観測される[1]。したがって、動力学的回折現象の観測は完全結晶の指標の一つである。

我々はこれまでにタンパク質結晶の一つであるグルコースイソメラーゼ(GI)結晶において、結晶の完全性に由来する X 線の動力学的回折現象の観測に成功した[2]。これにより、前述の X 線結晶構造解析には考慮されていない動力学的回折理論の必要性およびタンパク質結晶の完全結晶の可能性が提案された。

しかしながら、GI 結晶と同程度に完全性の高いタンパク質結晶は依然として得られておらず、タンパク質結晶の完全性の起源は十分に理解されていない。そこで、本研究ではタンパク質結晶の完全性の解明に向けて、GI 結晶と同様に球状分子で構成されているフェリチン結晶のロッキングカーブ測定およびイメージング測定を X 線トポグラフィ法によって行った。

2 実験

本測定で用いたフェリチン結晶は先行研究の GI 結晶と同様に、種結晶から成長させる方法を用いて育成した。X 線トポグラフィ測定は PF の BL-14B および BL-20B において行った。カバーガラス上に育成されたフェリチン結晶をアクリルホルダーにセット

し、ポリエチレンフィルムで封をした。結晶の入ったアクリルホルダーごとゴニオメーター上にマウントした。入射 X 線には 1.2 Å の単色 X 線を用いた。ロッキングカーブ測定には回折強度の検出器として高分解能 X 線 CCD カメラ (Photonic Science X-RAY FDI 1.00:1) を用いた。結晶を微小回転 (~0.0003°/step) させながら回折強度の測定を行った。また、イメージング測定には回折像の検出器として X 線フィルム (Agfa D2) を用いた。

3 結果および考察

ロッキングカーブ測定の結果、フェリチン結晶においても GI 結晶と同様に回折強度曲線の振動現象の観測に成功した。しかし、試料の厚さが X 線の消費距離に比べてはるかに薄いため、この振動現象は運動学的回折理論と動力学的回折理論の双方から説明することができる。このため、ロッキングカーブ測定ではフェリチン結晶が完全性を有しているかどうか確認することはできなかった。

イメージング測定においても GI 結晶と同様に結晶のくさび型領域で等厚干渉縞の観測に成功した。得られた干渉縞の本数および干渉縞の間隔は動力学的回折理論から得られる理論値と非常に良い一致を示した。この結果は、フェリチン結晶においても結晶の完全性に由来する動力学的回折現象が生じることを示している。したがって、フェリチン結晶はシリコンや GI 結晶と同様に極めて高い完全性を有していることが明らかになった。また、薄い結晶の品質を評価する場合、イメージング測定は有効な手法であることを改めて認識できる結果となった。

最後に、タンパク質結晶の完全性の起源について考察する。モデルタンパク質結晶であるリゾチーム結晶において、塩濃度を上げると結晶の品質が向上するという報告がある[3]。しかし、GI 結晶やフェリチン結晶のように、結晶の完全性に由来する動力学的回折現象は観測されていない。分子の形状に着目すると、GI 分子やフェリチン分子は球状であるのに対し、リゾチーム分子は非対称な形状をしている。したがって、結晶を構成する分子の形状が結晶の完全性の起源となっていることが示唆される。

4 まとめ

本研究ではフェリチン結晶のロッキングカーブ測定およびイメージング測定を行った。ロッキングカーブ測定では回折強度曲線の振動現象が観測されたが、試料の厚さが極めて薄いため、動力学的回折現象が生じるかどうか確認することはできなかった。一方で、イメージング測定では結晶のくさび型領域に等厚干渉縞が観測され、その等厚干渉縞の本数や間隔が動力学的回折理論の理論値と非常に良い一致を示した。したがって、フェリチン結晶においても結晶の完全性に由来する動力学的回折現象が観測されることが明らかになった。また、薄い結晶の品質を評価する場合、イメージング測定は有効な手法であることを改めて認識できる結果となった。本研究は高精度なX線構造解析および高品質なタンパク質結晶の育成に向けて、重要な知見となる。

謝辞

本研究は JST さきがけ (JPMJPR1995), JSPS 科研費 (16K06708, 17K06797, 19K23579) および池谷科学技術振興財団 (0291078-A) の助成を受けたものです。

また、X線トポグラフィ測定はKEKのフォトンファクトリーBL-14B および BL-20B (2019G103) にて行われました。

参考文献

- [1] A. Authier, *Dynamical Theory of X-Ray Diffraction* (Oxford Science Publications, Oxford, 2001).
- [2] R. Suzuki, H. Koizumi, K. Hirano, T. Kumasaka, K. Kojima and M. Tachibana, *PNAS* **115**, 3634-3639 (2018).
- [3] H. Koizumi, S. Uda, K. Katsuo, K. Hanada, R. Suzuki, M. Tachibana and K. Kojima, *Cryst. Growth Des.* **19**, 5955-5960 (2019).

成果

1. Marina Abe, Ryo Suzuki, Kenichi Kojima and Masaru Tachibana, "Evaluation of crystal quality of thin protein crystals based on the dynamical theory of X-ray diffraction", *IUCrJ* **7**, 761-766 (2020).

<https://doi.org/10.1107/S2052252520007393>

* tachiban@yokohama-cu.ac.jp