

デジタル X 線トポグラフィ法を用いた
 画像解析によるひずんだタンパク質結晶中の成長転位の観察
 Observation of grown-in dislocations in distorted protein crystals
 by digital X-ray topography

鈴木凌^{1,2}, 阿部満理奈¹, 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

Ryo SUZUKI^{1,2}, Marina ABE¹, 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

高品質な結晶の育成に向けて、結晶内の欠陥の理解や結晶の品質評価は重要である。X 線トポグラフィは、結晶中の転位といった格子欠陥を非破壊で観察することができる有用な手法の一つである[1]。これまで半導体材料や低分子有機結晶などの様々な結晶材料において、X 線トポグラフィを用いた転位の観察および結晶の品質評価が行われてきた[2]。従来の X 線トポグラフィでは、X 線の検出器としてフィルムを用いて転位像の観察を行ってきた（以下、フィルム法と呼ぶ）。一方、フィルムの代わりに CCD カメラを用いることで、取得できる情報量が格段に多くなる。例えば、結晶を微小回転させながら CCD カメラで連続的にデジタルトポグラフ像を取得することで、結晶の任意の箇所（1 ピクセル）における領域から結晶全体といった広い領域における回折強度曲線を得ることができる。そのため、任意の箇所（例えば、欠陥領域や完全領域など）の結晶の品質を緻密に評価することができる。

タンパク質結晶においても X 線トポグラフィ測定が四半世紀にわたって数多くの研究グループによって行われている。最近、著者らのグループでは無転位の完全結晶[3,4]および転位を含む不完全な結晶[5]に関する報告を行ってきた。しかし、未だタンパク質結晶の完全性や不完全性の起源は解明できておらず、結晶の完全性を制御することはできていない。高品質な結晶の育成に向けて、タンパク質結晶の欠陥などの不完全性に関するより多くの知見が求められる。

本研究では、典型的なタンパク質結晶の一つである正方晶リゾチーム結晶の X 線トポグラフィ測定を行った。CCD カメラを用いて、ブラッグ角近傍で数百枚のトポグラフ像を取得し、回折 X 線の強度を解析することで、フィルム法では観察が難しかったひずんだ結晶中の転位の観察方法の構築に成功した。さらに、結晶中に存在した折れ曲がった形状の成長転位のふるまいについて、転位論に基づいた転位のエネルギー計算により考察を行った。

2 実験

本測定で用いた正方晶リゾチーム結晶は先行研究のグルコースイソメラーゼ結晶と同様に、種結晶から再度成長させる方法[3]を用いて、自作のサンプルホルダー内で育成した。

X 線トポグラフィ測定は PF の BL-14B および BL-20B にて行った。結晶に対するハンドリングダメージを避けるため、サンプルホルダーごとを高精度ゴニオメーターに固定して測定した。両 BL において、二結晶分光器で単色化された 1.2 Å の単色 X 線を入射 X 線として使用した。フィルム法によるトポグラフ像の取得には X 線フィルム (Agfa D2) を用いた。また、結晶を微小回転させながら高分解能 X 線 CCD カメラ (Photonic Science X-RAY FDI 1.00:1) を用いて、測定反射指数のブラッグ角近傍のトポグラフ像を連続的に取得した。得られた連続像をフリーの画像解析ソフトウェア『Image J』によって解析した。

3 結果および考察

フィルム法による X 線トポグラフィ観察により、結晶成長とともに種結晶から発生した転位像が確認された。さらに、この転位像は折れ曲がった形状を有していた。折れる前の成長転位の方向は正方晶リゾチーム結晶の(110)と(101)の成長境界に沿って導入されていた。種結晶からおおよそ 260 μm 外側において、成長転位の方向が[110]に曲がったことが確認された。結晶学的な方向に沿って成長転位が折れるふるまいは、古く低分子有機結晶などで見られていたものの[2]、タンパク質結晶におけるこのような転位のふるまいは初めての観測である。

続いて、X 線 CCD カメラを用いて得られた連続像の解析を行った。局所的（1 ピクセル：6.45 μm×6.45 μm）な回折強度曲線の中央値を抽出し、結晶全体で重ね合わせたマッピング像（以下、Median 像）では、上述のフィルム法による X 線トポグラフ像と同様のコントラストを得ることができた。一般に、タンパク質結晶の低次の反射指数の間隔（例えば、 $d = 71.58 \text{ \AA}$ ）は二結晶分光器の

Si(111)の面間隔 ($d = 3.14 \text{ \AA}$) よりも非常に大きい。そのため、完全なタンパク質結晶であっても、X線回折が生じる領域は結晶の回転に従ってシフトするため、最大回折強度の角度位置は結晶全体で一様にならない。また、X線トポグラフィによる転位像の観察は、転位芯周りのひずみ場におけるブラッグ角の違いを検出していることに対応する。そのため、結晶に存在するひずみが大きい場合、反射指数によっては転位像のコントラストが得られにくい。以上の理由により、フィルム法ではタンパク質結晶中の転位像の観察が困難な反射指数がある。一方で、Median 像ではブラッグ角近傍の一連のトポグラフィ像を重ね合わせて転位像を抽出していることに対応する。そのため、フィルム法では転位像の観察が困難な反射指数であっても明瞭な転位像の観察が可能となった。

Median 像が転位像を抽出できる理由は、欠陥周辺の局所的な回折強度曲線のふるまいが完全領域の場合と異なるためである。結晶性の高い領域では最大強度が大きく、曲線の形状が鋭くなる。一方、欠陥を含む領域では最大強度が少し小さくなるが、その曲線は完全領域の曲線よりも広がった形状を示す。結果として、欠陥を含む領域では回折強度の中央値が完全領域の中央値よりも大きくなる。Median 像はこのような中央値の違いを反映することで、フィルム法による X 線トポグラフィ像と同様のコントラストが得られる。Median 像はフィルム法では転位像の得られにくい反射指数に関係なく転位像を描くことができ、ひずんだ結晶中の転位のキャラクタリゼーションに有用な方法である。そこで、様々な回折ベクトルにおいて Median 像を取得し、折れ曲がった形状の成長転位に関する解析を行った。

測定した正方晶リゾチーム結晶の Median 像の解析により、101 反射と $01\bar{1}$ 反射では転位のコントラストの消失が確認された。転位の消失条件より、バーガスベクトルは $[1\bar{1}\bar{1}]$ であり、混合転位であることが明らかになった。

最後に、この成長転位が折れ曲がった理由について考察する。結晶成長後に成長転位が折れ曲がったことから、成長境界上のエネルギー的に不安定な成長転位が過飽和度の減少に伴い安定な方向に曲がったと考えられる。そこで、① $[110]$ に折れ曲がった場合、②折れ曲がらずに成長境界上に存在している場合、③ $[001]$ に折れ曲がった場合のように、結晶学的に存在し得る転位の方向を仮定し、転位のエネルギー計算を転位論[6]に基づいた行った。その結果、① $[110]$ に折れ曲がった場合のエネルギーが最小であることが確認された。これは実際に転位が折れ曲がった方向に一致している。したがって、成長境界上の不安定な成長転位がエネルギーを最小にするためにエネルギー的に安定な方向に折れ曲がったと考えられる。本研究により、複雑な高分子によって構成されるタンパク質結晶においても転位論に基づいて転

位のエネルギーを計算でき、実験で得られた現象と良い一致をするということが実証された。

4 まとめ

本研究では X 線トポグラフィを用いて正方晶リゾチーム結晶の成長転位の同定を行った。CCD カメラを用いて取得したデジタルトポグラフィ像の解析により、従来のフィルム法による X 線トポグラフィ観察では観察が不可能であった転位像の抽出に成功した。回折強度の中央値をマッピングした Median 像によって、ひずんだ結晶中の転位の観察が可能となった。実際に、様々な反射指数の Median 像において、折れ曲がった形状の成長転位が確認された。転位の消失条件から成長転位のバーガスベクトルを決定に成功した。さらに、転位論に基づいた転位のエネルギーを見積もることで、転位のエネルギーを最小にするために成長転位が折れ曲がったと合理的に説明することができた。

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]. B. K. Tanner, *X-ray Diffraction Topography* (Pergamon Press, Oxford, 1976).
- [2]. H. Klapper, *Crystals*, Vol. 13, edited by H. C. Freyhardt (Springer, Berlin, 1991).
- [3]. R. Suzuki, H. Koizumi, K. Hirano, T. Kumasaka, K. Kojima and M. Tachibana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 3634-3639 (2018).
- [4]. M. Abe, R. Suzuki, K. Kojima and M. Tachibana, *IUCrJ* **7**, 761-766 (2020).
- [5]. H. Koizumi, S. Uda, R. Suzuki, M. Tachibana, K. Kojima, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, Y. Suzuki, *Acta Cryst.* **D77**, 599-605 (2021).
- [6]. J. P. Hirth and J. Lothe, *Theory of Dislocations*, 2nd ed. (Wiley, New York, 1982).

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>
2. Ryo Suzuki, Marina Abe, Kenichi Kojima and Masaru Tachibana, "Identification of grown-in dislocations in protein crystals by digital X-ray topography", *J. Appl. Cryst.* **54**, 163-168 (2021).

<https://doi.org/10.1107/S1600576720015356>

* tachiban@yokohama-cu.ac.jp