

デジタル X 線トポグラフィ法を用いた  
タンパク質単結晶中の微小なねじれに関する研究  
The study on slight twisting in protein single crystals by digital X-ray  
topography

阿部満理奈<sup>1</sup>, 鈴木凌<sup>1,2</sup>, 平野馨一<sup>3</sup>, 小泉晴比古<sup>4</sup>, 小島謙一<sup>1</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>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  
<sup>3</sup>高エネルギー加速器研究機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1  
<sup>4</sup>広島大学, 〒739-8528 広島県東広島市鏡山 1-4-4

Marina ABE<sup>1</sup>, Ryo SUZUKI<sup>1,2</sup>, Keiichi HIRANO<sup>3</sup>, Haruhiko KOIZUMI<sup>4</sup>,  
Kenichi KOJIMA<sup>1</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>Japan Science and Technology Agency (JST), PREST,  
4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama, 332-0012, Japan

<sup>3</sup>High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki, 305-0801,  
Japan

<sup>4</sup>Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-8528, 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が求められている[1]。高品質な結晶を得るために、微小重力場や電場、磁場、ゲル中での結晶育成法の開発が行われてきた。しかし、半導体シリコン結晶のような欠陥を含まない極めて高品質なタンパク質結晶はたった 2 種類（グルコースイソメラーゼ結晶とフェリチン結晶）に限られている[2,3]。言い換えると、多くのタンパク質結晶はこれまでの手法では解消できない何らかの欠陥を含んでいる。

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。結晶内の欠陥を評価する手法の 1 つに X 線トポグラフィ法がある。この手法では、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。また、近年発達した手法であるデジタル X 線トポグラフィ法では、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ィ像を取得することで、結晶内の微小なひずみを非破壊で観察することができる[4]。

そこで、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育成およびデジタル X 線トポグラフィ測定を行った。結果として、タ

ンパク質結晶の微小なねじれの観測に世界で初めて成功したので報告する。

## 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と同様に、種結晶から再度成長させる方法を用いて、自作のサンプルホルダー内で育成した。

デジタル X 線トポグラフィ測定は PF の BL-14B および BL-20B にて室温で行った。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。また、結晶を微小回転 ( $\Delta\theta \approx 0.03$  度) 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ィ像を連続的に取得した。得られた連続像から、回折角度位置の変化および局所的な回折角度曲線の半値幅を評価した。

## 3 結果および考察

正方晶リゾチーム結晶のデジタル X 線トポグラフィ像 (Slice images) を図 1 に示す。デジタル X 線トポグラフィ像の白いライン状のコントラストは回折強度の高い領域に一致している。図 1 (a) のように結晶をセットし、004 回折を測定した場合、図 1 (b) に示すように結晶の回転方向と一致した方向に、ブラッグ回折を満たす領域がシフトした。このような現象は一般に分光結晶と測定試料の面間隔の不一致によって生じる波長分散で説明することができる

[4]. 次に、図 1 (c) のように結晶をセットし、 $\bar{1}10$  回折を測定した。その結果、図 1 (d) に示すように、結晶の回転方向と垂直な方向にブラッグ回折を満たす領域がシフトした。このような現象は上述の波長分散では説明することができない。したがって、結晶の不完全性によって生じていると考えられる。

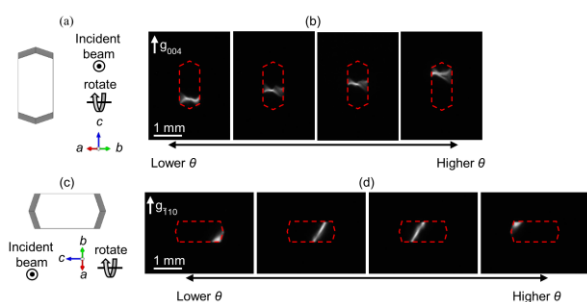


図 1 正方晶リゾチーム結晶の幾何学的な配置とデジタル X 線トポグラフィ像[5]

いくつかの回折面においてデジタル X 線トポグラフィ測定を行った結果、正方晶リゾチーム結晶は図 2 に示すように  $c$  軸に沿って均一にねじれていることが明らかになった[5]。そのねじれの大きさは  $1\text{ mm}$  あたり  $0.01$  度程度であった。極めて微小なため、光学顕微鏡などの一般的な測定方法では見ることができない。今回、デジタル X 線トポグラフィ法により、世界で初めて観測に成功した。このような非常に小さなねじれは、タンパク質結晶のみならず、他の多くの無機結晶や有機結晶においても存在している可能性がある。



図 2  $c$  軸に沿ってねじれている結晶のモデル[5]

また、結晶の品質を示す回折強度曲線の半値幅は結晶内のねじれの大きさと非常に良い相関を示した。ねじれの大きさが小さいほど半値幅は狭く、高品質な結晶であった。したがって、タンパク質結晶の微小なねじれは今まで見逃されていた解決すべき不完全性であると言える。

さらに、極めて高品質な 2 種類のタンパク質結晶（グルコースイソメラーゼ結晶とフェリチン結晶）ではねじれが確認されなかった。グルコースイソメラーゼ分子とフェリチン分子は球のような高い対称性を持つ形状であるのに対し、ねじれの観測されたリゾチーム分子はいびつな形状（クロワッサン型）をしている。結晶に存在するねじれの起源は結晶を構成するタンパク質分子の形状であることが示唆される。

結晶がねじれる起源として、これまでにいくつかのメカニズムが提案されているが、そのほとんどが温度や圧力などの外的な環境因子により説明されている。今回発見された微小なねじれは、結晶が持つ本来の性質であり、より原理的で本質的な現象と言える。近年、そのメカニズムとして「geometrical frustration（幾何学的フラストレーション）」モデルが提唱されている。本結果は、その概念のはじめでの実験的な証拠であると言える。

#### 4 まとめ

本研究ではリゾチーム結晶の育成およびデジタル X 線トポグラフィ測定を行なった。結晶の回転方向と垂直な方向にブラッグ回折を満たす領域がシフトする様子が観測され、タンパク質結晶中の微小なねじれの存在が明らかになった。このような微小なねじれは結晶を構成する分子の非対称な形状に起因しており、タンパク質結晶のみならず、他の多くの無機結晶や有機結晶においても存在している可能性がある。また、このような微小なねじれが結晶の品質を低下させる要因であり、ねじれの緩和により高品質な結晶育成が期待される。

#### 謝辞

本研究は JST さきがけ (JPMJPR1995), JSPS 科研費 (16K06708, 17K06797, 19K23579, 21K04654) 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 (2021G022) にて行われました。

#### 参考文献

- [1] N. E. Chayen, J. R. Helliwell and E. H. Snell, *Macromolecular Crystallization and Crystal Perfection*, Oxford University Press, Oxford, (2010).
- [2] R. Suzuki, H. Koizumi, K. Hirano, T. Kumasaka, K. Kojima and M. Tachibana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 3634-3639 (2018).
- [3] M. Abe, R. Suzuki, K. Kojima and M. Tachibana, *IUCrJ* **7**, 761-766 (2020).
- [4] Ryo Suzuki, Marina Abe, Kenichi Kojima and Masaru Tachibana, *J. Appl. Cryst.* **54**, 163-168 (2021).
- [5] Marina Abe, Ryo Suzuki, Keiichi Hirano, Haruhiko Koizumi, Kenichi Kojima and Masaru Tachibana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **119**, e212084611 (2022).

#### 成果

1. 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. D* **78**,

196-203 (2022).

<https://doi.org/10.1107/S205979832101281X>

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* **119**, e212084611 (2022).

<https://doi.org/10.1073/pnas.2120846119>

\* tachiban@yokohama-cu.ac.jp