

高品質なタンパク質結晶の結晶多形とねじれ Polymorphism and twisting in high-quality protein crystals

鈴木凌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

Ryo SUZUKI¹ and Masaru TACHIBANA^{1,*}

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

1 はじめに

結晶とは、原子や分子が規則正しく配列した固体状態のことを示す。1992年に世界結晶学連合はX線や電子線などを照射したとき、回折パターンが明瞭に生じる固体を結晶として公式に定義している[1]。一般に結晶の形として、例えば氷の結晶は六回対称を持つ形状、塩（塩化ナトリウム）の結晶は立方体など、物質固有の結晶学的に安定で平滑な結晶面から構成される。しかし、一見すると不安定であるにもかかわらず、世の中にはねじれた形を持つ結晶が多くあることが古くから知られている[2]。

最近、我々はタンパク質の結晶がわずかにねじれていることを発見し、この“ねじれ”が非対称な形状を有する分子から構成されたすべての結晶に存在する、結晶本来の性質である可能性を提案した[3]。一方、転位などの格子欠陥や“ねじれ”が一切存在しない完全結晶の性質を示すタンパク質結晶があることも報告してきた[4,5]。しかし、なぜねじれた結晶になるのか、完全結晶になるのか、その原理は未解明であった。

本研究では、これまで完全結晶として明らかとなったグルコースイソメラーゼ結晶（以下、GI結晶）の結晶多形に着目した。GI結晶はGI分子の積層がわずかに異なった $I222$ （以下、 I -GI結晶）と $P2_12_12$ （以下、 P -GI結晶）の空間群を持つ結晶多形が存在する。これまで、 I -GI結晶は完全結晶に匹敵する極めて高い品質を持つ結晶であることが分かっている[4]。結果として、 P -GI結晶は高い完全性を持ちながらわずかにねじれていることが明らかとなったので報告する。

2 実験

本測定で用いた P -GI結晶の結晶化には硫酸アンモニウムを沈殿剤として用い、Tris塩酸塩の緩衝条件の下で育成した。GI濃度、沈殿剤濃度を制御することで任意の過飽和度における結晶成長を行った。

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、アクリルで作成した試料ホルダー内で結晶を作製し、ホルダーごとゴニオメーターに固定し、回折の測定を行った。両BLにおいて、二結晶分光器で単色化された 1.2 \AA 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

図1は P -GI結晶のデジタルX線トポグラフィ像と回折角度位置のマッピングを示している。 I -GI結晶と同じく転位に代表される結晶欠陥が存在せず、極めて品質が高いことが明らかとなった。一方、結晶の回転軸に沿ってX線回折位置が変化する特異なふるまいが観測された。このふるまいは $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ }^\circ/\mu\text{m}$ 程のわずかな“ねじれ”に起因している。これは、本研究グループが報告した鶏卵白リゾチーム結晶の微小な“ねじれ”以下の大きさである。

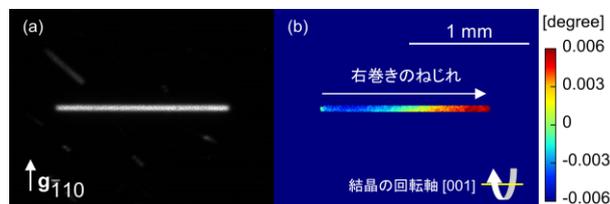


図1 P -GI結晶の (a) デジタルX線トポグラフィ像と (b) 回折角度位置のマッピング図[6].

興味深いことに、結晶がねじれているにもかかわらず、 I -GI結晶と同様に結晶の完全性を由来とするX線の動学的回折現象が観測された。図2は、 P -GI結晶の回折強度曲線を示している。回折強度曲線の振動は動学的回折効果に由来している。このような動学的回折現象はダイヤモンドやSi結晶、そして先述の I -GI結晶など、極めて完全性の高い限られた結晶でしか観察されていない。しかし、 P -GI結晶で観測されたふるまいは、X線の動学的回折理論から予測されるふるまいからわずかにずれていることが分かった。さらに、結晶のねじれが大きいほど、動学的回折理論からのずれが大きくなることが明らかとなった。これは P -GI結晶の不完全性が“ねじれ”に起因していることを示している。すなわち、“ねじれ”が結晶の不完全性として残された

最後の欠陥であり、“ねじれ”の制御が結晶の品質制御に重要であることを示している。

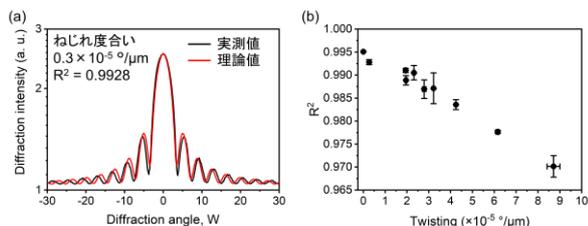


図2 (a) *P*-GI 結晶の回折強度曲線の実測値と理論値, (b) ねじれの大きさと回折強度曲線の理論値との相関 [6].

図3は *I*-GI 結晶と *P*-GI 結晶の結晶構造を示している。結晶構造データより、完全結晶である *I*-GI 結晶の GI 分子間の接触 (相互作用) は等方的である一方、ねじれ結晶である *P*-GI 結晶では分子間接触が異方的であることが分かった。結晶の“ねじれ”の原因について、これまでいくつか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[7]。一方、これまで本研究グループが発見したタンパク質結晶の微小な“ねじれ”の起源は、結晶を構成するタンパク質分子の形状に由来することを考察している[5]。本研究により、同一分子から完全結晶とねじれ結晶が観測されたことで、ねじれの起源として分子間接触の異方性を提案することができる。また、結晶を構成する分子を由来とするより原理的で本質的な“ねじれ”のメカニズムとして注目される理論モデル「geometrical frustration (幾何学的フラストレーション)」を改善できる重要な実験的証拠となる可能性もある。

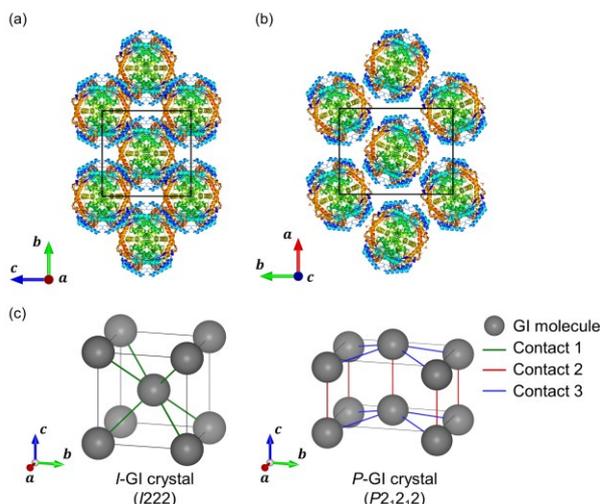


図3 (a) *I*-GI 結晶と (b) *P*-GI 結晶の結晶構造, (c)簡易的に描いた各 GI 結晶の構造 [6].

4 まとめ

本研究では、同一のタンパク質を用いて、完全結晶とねじれ結晶の存在を明らかにした。デジタル X 線トポグラフィによるロッキングカーブイメージングの回折理論に基づいた解析から、微小な“ねじれ”が結晶に取り残された最後の結晶欠陥であることが明らかとなった。また、結晶構造情報から、その“ねじれ”の起源として、結晶を構成する分子間の異方的な接触 (相互作用) であることが示唆され、“ねじれ”の原理解明に一步前進したといえる。タンパク質をはじめとした分子性結晶の“ねじれ”の制御により、新薬開発のための単結晶構造解析のみならず、材料の開発促進が期待される。

謝辞

本研究は JST さきがけ (JPMJPR1995) および JSPS 科研費 (19K23579, 21K04654, 23H01305) の助成を受けたものです。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, 2023G030) にて行われました。

参考文献

- [1] International Union of Crystallography. Report of the executive committee for 1991. *Acta Cryst. A* **48**, 922–946 (1992).
- [2] F. Bernauer, *Gedrilte” Kristalle: Verbreitung, Entstehungsweise und Beziehungen zu Optischer Aktivitat und Molekulasymmetrie*; Gebrüder Borntraeger, 1929.
- [3] M. Abe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **119**, e212084611 (2022).
- [4] R. Suzuki *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 3634–3639 (2018).
- [5] M. Abe *et al.*, *IUCrJ* **7**, 761–766 (2020).
- [6] R. Suzuki *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **15**, 4031–4039 (2024).
- [7] A. G. Shtukenberg *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 672–699 (2014).

成果

1. Marina Abe, Ryo Suzuki, Keiichi Hirano, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana, "In Situ Observation of Slight Twisting in Hen Egg-White Lysozyme Crystals during Crystal Growth and Dissolution by Digital X-ray Topography", *Cryst. Growth Des* **23**, 4130–4137 (2023).
<https://doi.org/10.1021/acs.cgd.2c01537>
2. Ryo Suzuki, Marina Abe, Kenichi Kojima, Masaru Tachibana, "Unraveling Polymorphism and Twisting in Near-Perfect Protein Crystals", *J. Phys. Chem. Lett.* **15**, 4031–4039 (2024).
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.4c00319>

* tachiban@yokohama-cu.ac.jp