

X線トポグラフィによる架橋タンパク質結晶の運動転位の観察

Observation of mobile dislocations in cross-linked protein crystals by X-ray topography

高久大輝¹, 鈴木凌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

Daiki TAKAKU¹, Ryo SUZUKI¹, Kenichi KOJIMA¹, and Masaru TACHIBANA^{1,*}

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

1 はじめに

近年、気候変動による社会問題や国際情勢を背景に、エネルギー消費量の削減が求められ、材料分野においても脱炭素化に向けた取り組みが行われている。こうした背景からタンパク質を素材とする材料の開発が注目されている。実際に、蜘蛛の糸は鉄鋼よりも優れた延性や硬さを誇り、高強度素材として実用化が進んでいる[1]。

タンパク質分子から構成される「タンパク質結晶」も次世代のタンパク質デバイスとして注目されている[2]。しかし、弱い分子間相互作用によって結合しているため、非常に脆く壊れやすい。その解決策の一つとして架橋がある。架橋とは、一般に高分子同士を架橋分子によって結合し、物理的・化学的性質を制御する手法である。タンパク質結晶においても結晶内のタンパク質分子間に共有結合が形成され、結晶が強化されることが古くから知られている。しかし、この強化法は経験的な域を出ておらず、架橋タンパク質結晶の材料力学的特性はほとんど理解されていない。この強化現象を明らかにすることは、架橋による強化のメカニズムの理解に留まらず、新材料創成に向けても重要な知見となる。

そこで、本研究では架橋剤の一つであるグルタルアルデヒドを用いた架橋タンパク質結晶の圧縮試験による力学特性の評価、及びX線トポグラフィ測定による変形後の結晶欠陥評価を行った。

2 実験

正方晶リゾチーム結晶を塩濃度勾配法によって作製した。23℃の恒温槽に2週間静置することで最大3 mm程度の結晶が得られた。その得られた結晶を同じく23℃でグルタルアルデヒド水溶液に7日間浸漬することで架橋を施した。

圧縮試験は引張圧縮試験機を用いて、室温で $4 \pm 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ のひずみ速度で行われた。乾燥による劣化を防ぐため、溶液内に結晶を入れて試験を行った。

デジタルX線トポグラフィ測定はPFのBL-14Bおよび、20Bにて室温で行った。結晶の乾燥による劣化を防ぐため、ストローの内に結晶を入れ、そのストローごとゴニオメーターに固定し、回折の測定を行った。二結晶分光器を用いて単色化した1.2 Åの

単色X線を用いた。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ィ像を連続的に取得した。

3 結果および考察

図1の(a)と(b)は純粋なタンパク質結晶と架橋タンパク質結晶の応力ひずみ曲線を示している。両方の曲線でひずみの増加とともに応力が線形的に上昇する「弾性域」が観察された。この領域では材料は可逆的な変形である弾性変形を示す。この線形領域の傾きはヤング率と呼ばれ、材料の変形のしやすさを示す。純粋なタンパク質結晶のヤング率は54.7 MPaであったのに対し、架橋タンパク質結晶では540 MPaで、架橋によって大幅に向上した。

また、純粋なタンパク質結晶は弾性変形の限界を迎えると、破壊に伴い応力の急激な低下が見られた。これは、塑性変形を伴わない脆性破壊に対応する。光学顕微鏡像からも圧縮によって結晶が粉碎していることがわかる(図1(b)と(c))。一方、架橋タンパク質結晶は弾性変形後、破壊せずに明瞭な塑性変形を示した。さらに光学顕微鏡像からは圧縮後の架橋タンパク質結晶にすべり線が観察された(図1(f))。このすべり線は応力によって結晶内の転位が運動し、塑性変形が生じたことを示唆している。

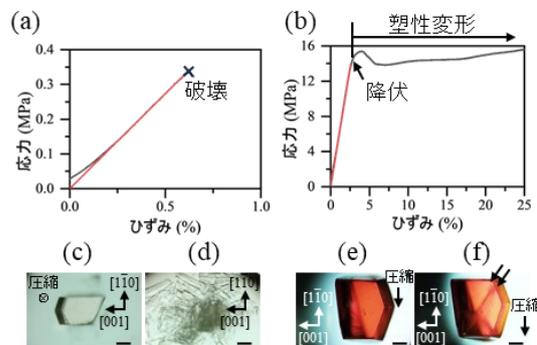


図1：(a, c, d) 純粋なタンパク質結晶の典型的な応力ひずみ曲線と圧縮前後の様子
(b, e, f) 架橋タンパク質結晶の典型的な応力ひずみ曲線と圧縮前後の様子

図 2 は正方晶リゾチーム結晶の理想的な模式図及び、110回折、 $\bar{1}10$ 回折のX線トポグラフィ像とそれに対応する模式図を示している。それぞれの回折で結晶の外形に対応するコントラストが観察された。これは圧縮された架橋タンパク質結晶が単結晶性を保持していることを示している。110回折ではその結晶外形のコントラスト以外に図 2 (b) に示されるような線状のコントラストが観察された。この線状のコントラストの方位は図 1 (f) で見られたすべり線と一致する。しかし、その線状のコントラストは図 2 (c) で示される $\bar{1}10$ 回折では消滅した。このような回折方向によってコントラストが消える現象は転位の特徴である。そのため、圧縮後の架橋タンパク質結晶に見られるすべり線は転位の運動に由来するものであることが明らかになった。転位のコントラストの見え方やその方位から、図 1 (f) で観察された線 A のすべり系は (111) $[\bar{1}12]$ に特定された。

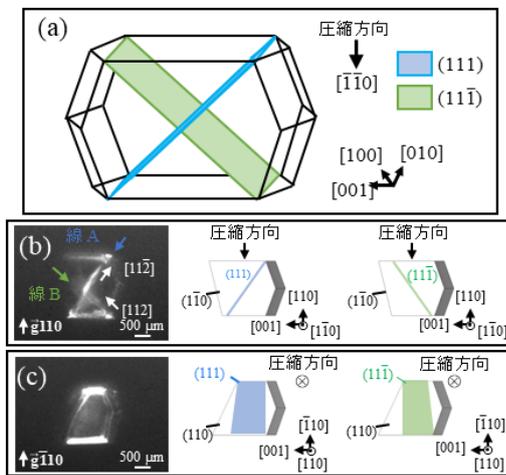


図 2： (a) 正方晶リゾチーム結晶の模式図
(b, c) 圧縮後の 110 と $\bar{1}10$ 回折の典型的な X 線トポグラフィ像とそれに対応する結晶外形の模式図

図 3 はリゾチーム分子の配列と架橋部位を示している。グルタルアルデヒドによる正方晶リゾチーム結晶への架橋はリゾチーム分子中に存在するリジン残基 (Lys13) とアルギニン残基 (Arg45) で主に行われる[3]。図 3 の右上にはリゾチーム分子が示されており、緑色と赤色はそれぞれ Lys13 と Arg45 を示している。図 3 (a) はすべり面である (111) を上から見た時の分子配列と架橋部位を示している。水色は (111)、白の楕円はリゾチーム分子、ピンクは単位格子、緑色と赤色はそれぞれ Lys13 と Arg45 の架橋結合を示している。さらに (111) 上の面内結合は線で、(111) 同士の面間の結合は☆で示されている。図 3 (b) は (a) を 90 度回転させ、横から見た時の模式図である。架橋によって面内に 6 個 (紫色) の結合が単位格子中に形成された (図 3 (a))。面内の分子間相互作用が強固になった (111) が、圧縮によって面間の結合を切って $[\bar{1}12]$

にすべり変形を起こす。架橋前は分子間相互作用が小さく圧縮によって割れが先行し、破壊を起こすが、架橋によって面内の分子間相互作用が強固になり、破壊ではなく強固になった面がすべり変形を起こす。それにより、塑性変形が可能になったと考えられる。

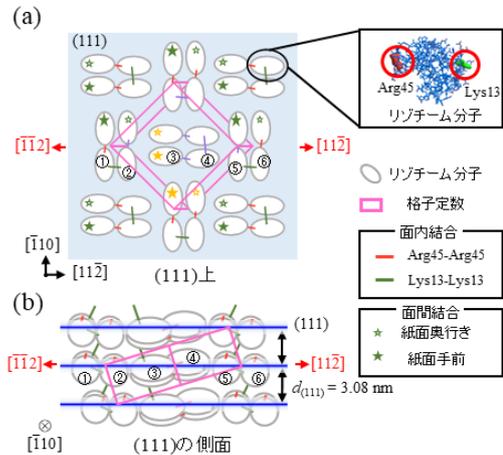


図 3： (a) $[\bar{1}11]$ ((111) を上から見る方向) から見た分子配列の模式図
(b) $[\bar{1}\bar{1}0]$ ((111) を横から見る方向) から見た分子配列の模式図

4 まとめ

圧縮試験による力学特性の評価からタンパク質結晶は架橋によって力学特性が大幅に改善されることが示された。さらに架橋によって転位を起源とした塑性変形能を獲得し、脆性から延性へと変化したことが明らかとなった。変形機構が変化する上に力学特性がここまで変化する材料はこれまでに見られていない。今後より詳細に解析することで材料特性の新たな知見となる可能性がある。

謝辞

本研究は JST さきがけ (JPMJPR1995) および JSPS 科研費 (19K23579, 21K04654, 23H01305, 23K26000) の助成を受けたものです。X 線トポグラフィ測定は KEK-PF の BL-14B および BL-20B (2021G022, 2023G030) にて行われました。

参考文献

- [1] I. Agnarsson, *et al.*, PLoS ONE 5, e11234 (2010).
- [2] K. Malek, *Biotechnol. Lett.* 29, 1865 (2007)
- [3] M. Buch, *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1296 (2014).

成果

1. Daiki Takaku, Ryo Suzuki, Kenichi Kojima, and Masaru Tachibana, "Cross-linking controls the mechanical properties of protein crystals", *Phys. Rev. Mater.* 8, L052601 (2024).

* tachiban@yokohama-cu.ac.jp