

## タンパク質結晶における X 線の動学的回折効果の観測

鈴木凌<sup>1</sup>, 小泉晴比古<sup>2</sup>, 平野馨一<sup>3</sup>, 熊坂崇<sup>4</sup>, 小島謙一<sup>5</sup>, 橘勝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科, <sup>2</sup>東北大学 金属材料研究所 (現 名古屋大学 未来材料・システム研究所),

<sup>3</sup>高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所, <sup>4</sup>高輝度光科学研究センター タンパク質結晶解析推進室,

<sup>5</sup>横浜創英大学

### Observation of X-ray Dynamical Diffraction in Protein Crystals

<sup>1</sup>Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, <sup>2</sup>Institute for Materials Research, Tohoku University,

<sup>3</sup>Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization,

<sup>4</sup>Japan Synchrotron Radiation Research Institute, SPring-8, <sup>5</sup>Yokohama Soei University

#### Abstract

酵素タンパク質の一つであるグルコースイソメラーゼの単結晶を用いたロッキングカーブ測定により、回折強度の振動曲線の観測に成功した。この振動曲線のふるまいは入射 X 線の波長や結晶試料厚さに応じて変化し、X 線の動学的回折理論と非常に良い一致を示した。これはタンパク質結晶であっても X 線の動学的回折 (多重散乱) が生じることを示している。本研究結果はこれまで X 線構造解析では考慮されていなかった動学的回折モデルの必要性を提案している。

#### 1. はじめに

超高齢化社会を迎え、病気の原因解明や新規創薬の開発などが盛んに行われている。それらの鍵となるタンパク質など生体高分子の機能や機構を理解するためには、タンパク質の立体構造を原子レベルで理解する必要がある。また、多種多様なタンパク質の構造を理解することは、生命現象を理解することにも繋がる。1962 年ノーベル化学賞を受賞した J. C. Kendrew らによって行われた、分解能 6 Å によるミオグロビンの立体構造の解明を皮切りに、放射光技術の進歩も相まって今日までタンパク質の構造解析の分野は飛躍的に発展してきた。

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の一つである X 線構造解析に必要不可欠である。X 線による構造解析はタンパク質分子の構成原子の位置情報を比較的正確に求めることが出来る。しかし、その解析精度は X 線回折実験に使用する結晶の品質に大きく左右される。2018 年 9 月 12 日現在、Protein Data Bank (PDB; <https://www.rcsb.org/>) に 144,211 種のタンパク質の立体構造情報が登録されている。自然界には 100 億種を超えるタンパク質が存在するとされており、それに比較すると未だ少数ともいえるが、数多くのタンパク質の立体構造が明らかにされてきている。実際にドラッグデザインとして利用するためには 1.5 Å の高分解能を有する構造が必要とされる。しかし、そのような高分解能な構造が得られているタンパク質は 14,155 種であり、PDB 登録数の 10% にも満たない。たとえ対象のタンパク質の構造が得られていても、そのタンパク質結晶の品質が問題であるとされる。そのため、より高品質なタンパク質結晶を作製するために、国際

宇宙ステーションを利用した微小重力実験をはじめとして、ハイドロゲルや電場などの外場印加による結晶育成技術の提案など、様々な研究が世界中で盛んに行われている [1]。

タンパク質結晶に限らず、結晶の完全性は X 線回折によって評価できる。一般的に、結晶による X 線回折は大きく分けると乱れた結晶による回折を考慮した運動学的回折理論 (kinematical diffraction theory) と完全結晶による回折を考慮した動学的回折理論 (dynamical diffraction theory) の二つになる [2,3]。Fig. 1 に示すように、前者の運動学的回折は結晶粒界や転位などの格子欠陥を多く含み、3 次元の周期性が乱れた結晶、すなわち、モザイク結晶で観察される。モザイク結晶は周期性に乱れない多数の微小領域 (モザイク片) がわずかな方位のずれを持ち合わせて集合していると考えられる。モザイク結晶では互いに干渉しあうことのできる領域が非常に小さいので、入射された X 線は結晶中でほとんど 1 回のみ散乱を生じる。一般の無機材料や有機材料、さらには非晶質材料や液体などの場合にも生じる回折現象である。実際のタンパク質分子の立体構造

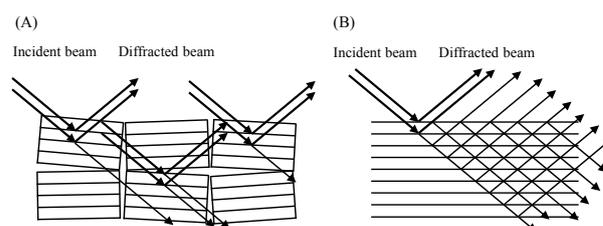


Figure 1 Schematic of (A) kinematical diffraction in mosaic crystal and (B) dynamical diffraction in perfect crystal.

解析においても、この運動学的回折理論のみを考慮している。一方、後者の動力的回折は、Si, Ge, ダイヤモンドのようなごく限られた高品質な結晶、すなわち、完全結晶で生じる[4-7]。結晶の品質をモザイク結晶と完全結晶を両極端として考えた場合、世の中に存在する結晶の多くは完全性の程度に応じてその間に存在する。結晶が完全結晶に近い完全性を有するとき、結晶内ではX線の多重散乱が生じる。この多重散乱を考慮した理論が動力的回折理論である。したがって、後者の動力的回折の観察は、結晶の完全性の指標にもなる。しかし、これまでタンパク質結晶では、動力的回折の明瞭な証拠は得られておらず、依然として、その結晶品質がSiなどの高品質な結晶に比べて劣っているのか、もしくは、そもそも観察することが出来ないのか、タンパク質結晶でX線の多重散乱による動力的回折が観察できるかは長年の課題であった。

タンパク質結晶の完全性の評価は、1990年代の後半からNSLS, PF, ESRFの放射光X線トポグラフィ施設において、筆者らの研究グループも含めいくつかのグループによって先導的研究が行われてきた[8-10]。それらの研究やその発展については、このPFニュース[11]やその他の解説記事[12,13]でも紹介されている。また、最近では、放射光技術や結晶育成技術の進歩により、高品質なタンパク質結晶を用いた放射光単色X線トポグラフィにおいて、上述の動力的回折によるペンデル縞や振動コントラストと考えられるイメージが観察され、動力的回折現象を示唆する実験結果が報告されていた[14]。このような背景の下、筆者らのグループは、結晶性の定量的な理解を目的とし、高品質なタンパク質結晶を用いて、放射光単色X線トポグラフィを用いたロッキングカーブ測定を行った。結果として、動力的回折現象に対応するロッキングカーブの振動構造の明確な観測とその定量的な解析に成功した[15]。これは高品質なタンパク質結晶がSi結晶と同程度の完全性つまり完全結晶の可能性を示している。さらには、タンパク質の結晶構造解析において、従来は考慮されていない動力的回折理論の必要性を示している。

## 2. 実験方法

### 2-1. グルコースイソメラーゼ結晶の作製

本研究では、試料として酵素タンパク質のひとつであるグルコースイソメラーゼ(GI)を用いた。GI結晶は、育成した種結晶を再成長させる方法を用いた。結晶化溶液はハンプトンリサーチ社から購入した。種結晶は蒸気拡散法のひとつであるハンギングドロップ法を用いて育成した。結晶化には33 mg/mLグルコースイソメラーゼ、6 mM TRIS 塩酸塩 (pH7.0), 0.91 M 硫酸アンモニウム, 1 mM 硫酸マグネシウムを混合させた結晶化溶液を用いた。育成した種結晶を取り出し、あらかじめ作製したアクリル製の結晶ホルダー内に満たした結晶化溶液内に移した。成長過程で生じる不均一核生成を抑えるため、種結晶の入ったホルダーを40°Cで30分間熱処理した。その後、20°Cで2週間静置した。

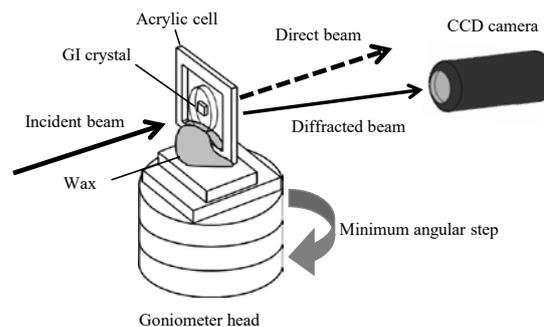


Figure 2 Schematic of X-ray topography.

### 2-2. X線トポグラフィとロッキングカーブ測定

放射光単色X線トポグラフィは高エネルギー加速器研究機構のPhoton Factory BL-20B および SPring-8 BL38B1にて行った。Si(111)の二結晶分光器を用いて、蓄積リングから発生する白色X線を単色化した。測定で用いたX線の波長は1.0, 1.2, 1.4 Åである。Fig. 2に示すように、結晶が固定されたアクリルホルダーをゴニオメーター上に設置し、光軸調整を行った。その後、目的的回折に合わせて、高分解能X線CCDカメラ(Photonic Science X-RAY FDI 1.00:1, 有効素子サイズ:  $6.45 \times 6.45 \mu\text{m}^2$ ) および、高分解能X線sCMOSカメラ(Hamamatsu C12849-101U, 有効素子サイズ:  $6.5 \times 6.5 \mu\text{m}^2$ )を用いて1stepあたり  $3.31 \times 10^{-4}$  の回転角度でロッキングカーブ測定を行った。また、X線フィルム(Agfa D2)を用いたトポグラフ像の撮影も行った。なお、本測定では結晶全体の回折像が得られるよう、完浴条件で測定を行った。

## 3. 結果と考察

### 3-1. 高品質グルコースイソメラーゼ結晶のX線トポグラフ像と回折強度の振動曲線

典型的なGI結晶の光学顕微鏡像と結晶外形の模式図、得られたトポグラフ像をFig. 3に示す。得られた結晶は転位などの欠陥由来のコントラストが一切見られないことから、欠陥の無い高品質な結晶であることが分かった。さらに、結晶の稜にあたるくさび形領域において、完全結晶でのみ生じる等厚干渉縞に由来するコントラストが見られることが分かる。このような非常に高品質なGI結晶を用いてロッキングカーブ測定を行った。

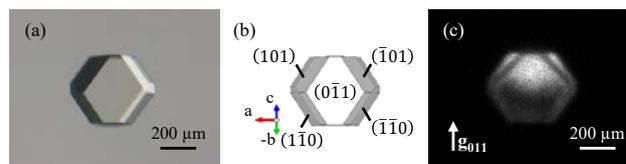
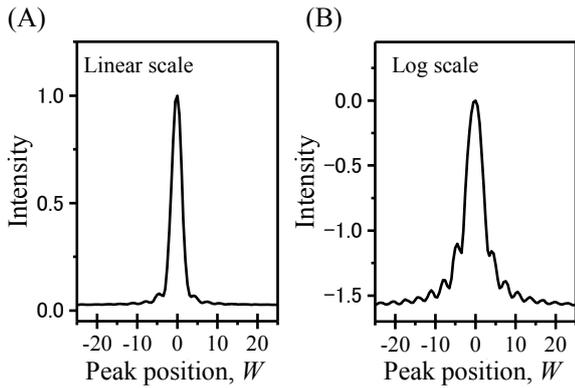


Figure 3 Typical GI crystal. (A) Optical micrograph, (B) corresponding schematic prepared with VESTA software [19], and (C) digital X-ray topograph with the CCD camera in BL-20B at KEK-PF.



**Figure 4** Typical rocking curve for 011 reflection of a GI crystal with a thickness of 199  $\mu\text{m}$ , taken with an incident beam with a wavelength of 1.2  $\text{\AA}$  in BL-20B at KEK-PF. In (A) and (B), the intensities of the same rocking curves are shown on linear and logarithmic scales, respectively.

Fig. 4 にリニアスケールおよびログスケールで描かれた 011 回折のロッキングカーブプロファイルを示す。結晶厚さは 199  $\mu\text{m}$  である。横軸は回折角度位置（ブラッグ角からのずれ）、縦軸は回折強度を示している。得られた回折強度は回折角に応じて振動している様子が見られた。このような振動曲線を有するロッキングカーブプロファイルは、半導体結晶の Si 結晶のような完全結晶でのみ観察されているが [5]、タンパク質結晶ではこれまで報告がない。タンパク質結晶におけるロッキングカーブの振動現象を動力的回折によるものであることを裏付けるため、入射 X 線の波長依存性と結晶の厚さ依存性の二つの依存性を測定した。なお、以降の解析はすべてログスケールで行っている。

### 3-2. 動力的回折効果の裏付け① 入射 X 線の波長依存性

動力的回折理論 [3] によると、ロッキングカーブの横軸  $W$  は以下のように与えられる。

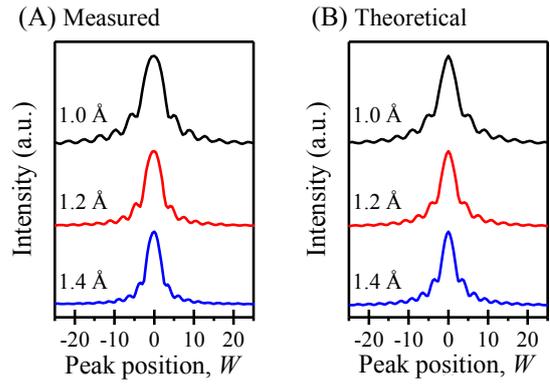
$$W = \frac{2\Lambda \sin \theta_B}{\lambda} (\theta_B - \theta), \quad (1)$$

$$\Lambda = \frac{\pi V_c \cos \theta_B}{r_e \lambda |F|}. \quad (2)$$

ここで、 $W$  は回折条件であるブラッグ角からのずれを表すパラメーターである。また、 $\Lambda$  はペンデル幅であり、入射 X 線の波長  $\lambda$  に逆比例することが分かる。その他のパラメーターはそれぞれ、ブラッグ角  $\theta_B$ 、ユニットセルの体積  $V_c$ 、古典電子半径  $r_e$ 、構造因子  $F$  である。さらに、吸収を考慮しない完全結晶における回折強度曲線は入射 X 線の強度を  $I_0$ 、回折強度を  $I_g^n$  として、次式で与えられる。

$$\frac{I_g^n}{I_0} = \frac{\sin^2(\pi H \sqrt{W^2 + 1} / \Lambda)}{W^2 + 1}, \quad (3)$$

ここで、 $H$  は結晶の厚さを示し、回折強度が回折位置  $W$  に応じて振動することが予測される。しかし、実際の X 線回折実験では入射 X 線の広がりがあるため、結晶の厚さに



**Figure 5** Rocking curves for 011 reflections of the same GI crystals with a thickness of 199  $\mu\text{m}$ , taken with incident beams with different wavelengths of 1.0, 1.2 and 1.4  $\text{\AA}$ , in BL-20B at KEK-PF. (A) Measured rocking curves and (B) theoretical rocking curves.

よっては振動の周期を分解できず、振動が平均化される。吸収の無い完全結晶における回折強度の平均曲線は回折強度を  $\bar{I}_g^n$  として、次式で与えられる。

$$\frac{\bar{I}_g^n}{I_0} = \frac{1}{2(W^2 + 1)}. \quad (4)$$

すなわち、実際の測定で観測される回折強度曲線は、式 (3) と (4) の割合で決まることが予想される。そこで、測定値をフィッティングするため、次式のように回折強度曲線の理論曲線を描く。

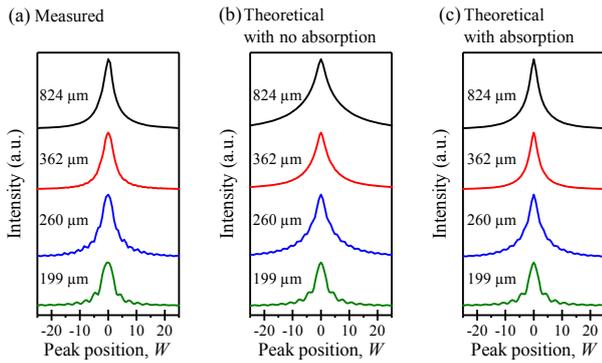
$$I = r \frac{I_g^n}{I_0} + (1-r) \frac{\bar{I}_g^n}{I_0}, \quad (5)$$

ここで、 $r$  は理論曲線と平均曲線の按分比を示している。

入射 X 線の波長を 1.0, 1.2, 1.4  $\text{\AA}$  と変化させたときのロッキングカーブプロファイルを Fig. 5(A) に示す。この時の結晶の厚さは 199  $\mu\text{m}$  である。同様に、入射 X 線の波長を変化させた時に予測される回折強度曲線の理論曲線を Fig. 5(B) に示す。理論から予測される波長が大きくなるにつれ、回折強度曲線の振動幅が小さくなるといったふるまいと同様なふるまいが実験で得られた。すなわち、測定によって得られた回折強度曲線は動力的回折理論から予測される回折強度曲線とよく一致していることが分かる。

### 3-3. 動力的回折効果の裏付け② 結晶の厚さ依存性

さらに、異なる厚さを持つ GI 結晶を用いてロッキングカーブ測定を行った。実際に用いた GI 結晶の厚さは 824, 362, 260, 199  $\mu\text{m}$ 、入射 X 線の波長は 1.2  $\text{\AA}$  である。Fig. 6(A) に実際の測定で得られた回折強度曲線を示す。回折強度曲線の振動が結晶の厚さが大きくなるにつれ減少している様子が見られた。これは厚さが大きくなるにつれ、振動幅が入射 X 線の広がりよりも小さくなり、振動を分解できなくなるためである。上述の波長依存性と同様に、得られた回折強度曲線の理論曲線によるフィッティング結果



**Figure 6** Rocking curves for 011 reflections of GI crystals with different thicknesses of 824, 362, 260 and 199  $\mu\text{m}$ , taken with an incident beam with a wavelength of 1.2  $\text{\AA}$  in BL-20B at KEK-PF. (A) Measured rocking curves, (B) theoretical rocking curves with no absorption and (C) theoretical rocking curves with absorption..

を Fig. 6(B) に示す。結晶の厚さが大きくなるにつれ、そのフィッティング精度が落ちている様子が分かる。とりわけ、厚さ 824  $\mu\text{m}$  の結晶では回折強度曲線のすその領域で測定値と差が大きい。これは結晶の吸収によるものであることが予測される。そこで、吸収を考慮した動学的回折理論 [3] を用いて、回折強度曲線の解析を行った。吸収のある完全結晶における回折強度曲線は次式で与えられる。

$$\frac{I_g^a}{I_o} = \frac{\exp(-\mu H / \cos \theta_B)}{W^2 + 1} \left\{ \sin^2 \left( \frac{\pi H \sqrt{W^2 + 1}}{\Lambda} \right) + \sinh^2 \left( \frac{\chi \pi H \sqrt{W^2 + 1}}{\Lambda} \right) \right\}. \quad (6)$$

ここで、パラメーター  $\mu$  と  $\chi$  はそれぞれ線吸収係数と電気感受率である。また、吸収を考慮した場合の回折強度曲線の平均曲線は次式で与えられる。

$$\frac{\bar{I}_g^a}{I_o} = \frac{1}{4(W^2 + 1)} \left[ \exp \left\{ \frac{-\mu H}{\cos \theta_B} \left( 1 - \frac{\varepsilon}{\sqrt{W^2 + 1}} \right) \right\} + \exp \left\{ \frac{-\mu H}{\cos \theta_B} \left( 1 + \frac{\varepsilon}{\sqrt{W^2 + 1}} \right) \right\} \right]. \quad (7)$$

ここで、 $\varepsilon$  は誘電率である。

吸収を考慮した動学的回折理論から予測される回折強度曲線によるフィッティング結果を Fig. 6(C) に示す。吸収を無視した場合と比べ、その精度は非常に向上し、実際の測定で得られた回折強度曲線とよく一致していることが分かる。また、フィッティングから線吸収係数  $\mu = 0.18 \text{ mm}^{-1}$ 、電気感受率  $\chi = 0.001$ 、誘電率  $\varepsilon = 23$  と得られた。これらの値は計算から見積もられる値や先行研究で得られている値とよく一致した [16–18]。

#### 4. まとめ

本稿では、放射光 X 線トポグラフィによるロッキングカーブの測定により、タンパク質結晶における長年の課題であった X 線による動学的回折現象の観測、並びに完全性の定量的な評価に世界で初めて成功したことを示した。これは、高品質なタンパク質結晶が、Si などの完全結晶と同様に動学的回折現象を示す高い完全性を有することを示している。さらに、この成果は、高品質なタンパク質結

晶を用いた立体構造解析において、従来は考慮されていなかった動学的回折理論の必要性を示している。したがって、このような動学的回折理論を取り入れた構造解析では、回折強度の解析精度の改善につながり、より高精度な電子密度の評価、さらには理論化学計算との比較によるタンパク質の性質の原理的な理解に繋がるものと期待される。また、このような動学的回折では、イメージングにおいてもペンデル縞や干渉縞などのいくつかの興味深い現象が期待され、タンパク質結晶の動学的回折を積極的に利用した新たな結晶評価法に繋がることを期待している。

#### 5. 謝辞

X 線トポグラフィおよびロッキングカーブ測定は放射光共同利用実験課題 (2014G601, 2015G142, 2017G087) および高輝度光科学研究センター実験課題 (2014A1850, 2014B1965, 2015A1994, 2015B1979, 2017A2562) によって、KEK-PF の BL-20B および SPring-8 の BL38B1 にて実施された。ビームライン担当者の物質構造科学研究所の杉山弘助教、高輝度光科学研究センターの馬場清喜博士、水野伸宏博士に心から感謝したい。また、本研究は JSPS 科研費 (25420694, 16K06708) および JST-ACCEL (JPMJAC1304) の助成を受けた。

#### 引用文献

- [1] N.E. Chayen, J.R. Helliwell, E.H. Snell, *Macromolecular Crystallization and Crystal Perfection*, Oxford Univ Press, Oxford, (2010).
- [2] W.H. Zachariasen, *Theory of X-ray Diffraction in Crystals*, Dover Publications, New York, (1945).
- [3] A. Authier, *Dynamical Theory of X-Ray Diffraction*, Oxford Science Publications, Oxford, (2001).
- [4] N. Kato, A.R. Lang, *Acta Crystallogr.* **12**, 787 (1959).
- [5] T. Ishikawa, K. Hirano, S. Kikuta, *Methods Phys. Res. Sect. A* **308**, 356 (1991).
- [6] E. Persson, *Phys. Scr.* **3**, 293 (1971).
- [7] G. Kowalski, A.R. Lang, *J. Appl. Crystallogr.* **22**, 410 (1989).
- [8] V. Stojanoff, D.P. Siddons, *Acta Cryst.* **A52**, 498 (1996).
- [9] F. Otalora, J.M. Garcia-Ruiz, J.A. Gavira, B. Capelle, *J. Cryst. Growth* **196**, 546 (1999).
- [10] M. Tachibana, H. Koizumi, K. Izumi, K. Kajiwara, K. Kojima, *J. Synchrotron Radiat.* **10**, 416 (2003).
- [11] 橋勝, 小泉 晴比古, 小島 謙一, *Photon Factory News* **22**, 17 (2004).
- [12] 小島 謙一, 橋勝, *日本結晶学会誌* **54**, 29 (2012).
- [13] 橋勝, 鈴木 凌, 小泉 晴比古, 若生 啓, 小島 謙一, *日本結晶成長学会誌* **43**, 101 (2016).
- [14] R. Suzuki, H. Koizumi, K. Kojima, S. Fukuyama, Y. Arai, K. Tsukamoto, Y. Suzuki, M. Tachibana, *J. Cryst. Growth* **468**, 299 (2017).
- [15] R. Suzuki, H. Koizumi, K. Hirano, T. Kumasaka, K.

- Kojima, M. Tachibana, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **115**, 3634 (2018).
- [16] M.K. Gilson, B.H. Honig, Biopolymers **25**, 2097 (1986).
- [17] T. Simonson, C.L. Brooks, J. Am. Chem. Soc. **118**, 8452 (1996).
- [18] L.N. Rashkovich, V.A. Smirnov, E.V. Petrova, Phys. Solid State **50**, 631 (2008).
- [19] K. Momma, F. Izumi, J. Appl. Crystallogr. **44**, 1272 (2011).

(原稿受付日：2018年9月27日)

## 著者紹介

鈴木凌 Ryo SUZUKI

横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科 物質システム  
科学専攻 博士後期課程2年

〒236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 22-2

TEL: 045-787-2307 FAX: 045-787-2307

e-mail: n175302b@yokohama-cu.ac.jp

略歴：2015年3月 横浜市立大学 国際総合科学部 国際総合  
科学科 卒業。

2017年3月 横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科 物  
質システム科学専攻 博士前期課程 修了。

最近の研究：新材料応用へ向けた大型タンパク質結晶の作  
製と力学的性質の解明。

小泉晴比古 Haruhiko KOIZUMI

名古屋大学 未来材料・システム研究所 特任講師

〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町

e-mail: h\_koizumi@unno.material.nagoya-u.ac.jp

平野馨一 Keiichi HIRANO

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 准教授

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

e-mail: keiichi.hirano@kek.jp

熊坂崇 Takashi KUMASAKA

高輝度光科学研究センター タンパク質結晶解析推進室 室  
長

〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

e-mail: kumasaka@spring8.or.jp

小島謙一 Kenichi KOJIMA

横浜創英大学 学長

〒226-0015 神奈川県横浜市緑区三保町 1

e-mail: kkojima@soei.ac.jp

橋勝 Masaru TACHIBANA

横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科 教授

〒236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 22-2

TEL: 045-787-2307 FAX: 045-787-2307

e-mail: tachiban@yokohama-cu.ac.jp