

## マイクロ空間を用いたタンパク質の晶析挙動の制御 とX線回折実験への応用

真栄城, 正寿

<https://doi.org/10.15017/1441287>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（工学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

氏 名：真栄城 正寿（まえき まさとし）

論文題名：マイクロ空間を用いたタンパク質の晶析挙動の制御と X 線回折実験への応用

区 分：甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質の結晶化と結晶を用いた立体構造解析は、その機能に関する生化学的情報を与えるため、学術分野だけではなく創薬などの産業分野においても重要なテーマである。しかしながら、良質なタンパク質の単結晶を得るためには、最適な結晶化条件の探索が必要であり、単結晶作製のプロセス自体が立体構造解析におけるボトルネックとなっている。さらに、タンパク質単結晶を得た後の X 線結晶構造解析において、結晶の X 線回折装置へのマウントには、熟練した結晶のハンドリングが必要である。このように、タンパク質の結晶化は未だに職人的な技術やノウハウに頼る部分が多く、プロセスの改善が強く望まれている。一方で、マイクロ流体デバイスを用いたタンパク質の結晶化は、消費サンプル量の低減や結晶化スクリーニングの効率化が期待され、また *In-situ* の X 線結晶構造解析が可能である。タンパク質の結晶化は、タンパク質溶液と貧溶媒を混合した過飽和条件下で行われるが、良質な単結晶を作製するためには核形成、結晶成長の制御が必要である。特に、系内に 100  $\mu\text{m}$  程度の大きさの単結晶を 1 個だけ作製する技術は、マイクロ流体デバイスを用いた *In-situ* X 線回折実験で良質な回折像を得る上で重要な技術である。そこで、本研究では効率良く 1 個の単結晶を微小液滴中で得るために、微小空間でのタンパク質の晶析挙動を解析し、核形成・結晶成長の制御を工学的観点から試みた。また、上記の解析から見出した結晶化制御技術を用いて、*In-situ* での単結晶 X 線回折実験への応用を試みた。

第 1 章では、タンパク質結晶化の重要性と概略を述べ、結晶化における問題点や手法を紹介した上で、本研究の目的を述べた。

第 2 章では、本研究で基盤となるマイクロ流体デバイスを用いてタンパク質の微小液滴を連続的に生成する手法、実験系を確立した。そして、作製したデバイスを用いて微小液滴の体積や形状がタンパク質の核形成や結晶成長に与える影響について調査した。その結果、液滴体積の減少に伴い、液滴内で析出する結晶数が減少する傾向がみられた。また、同じ体積であっても液滴形状によって析出する結晶数が異なり、真球状の液滴ではほぼ 1 個の結晶が析出することを明らかにした。

第 3 章では、前章の晶析挙動の解析結果を基に、マイクロ空間中の微小液滴内におけるタンパク質結晶の成長過程に着目し、タンパク質分子の物質収支から微小液滴内で単結晶が 1 個だけ析

出する液滴の大きさ（臨界サイズ）を理論的に導出し、実験結果との比較を行った。その結果、臨界サイズはタンパク質分子の拡散係数、タンパク質初濃度、タンパク質分子の消費速度で推算することが可能であることを明らかにし、モデルタンパク質のソーマチンの臨界サイズが 600  $\mu\text{m}$  以下であることが示唆された。さらに、実際に微小液滴を用いて 200、360、500  $\mu\text{m}$  の液滴で結晶化を行った。その結果、直径 500  $\mu\text{m}$  の液滴では複数の結晶が析出しやすくなる傾向が示唆された。これは、直径 500  $\mu\text{m}$  の液滴では 1 個目の結晶が析出した後に、液滴内部の過飽和状態の緩和が他のサイズの液滴よりも小さく、次の核形成が生じたからであると考えられる。以上の結果から、推算した臨界サイズを基に、微小液滴によってタンパク質の結晶化を制御できると考えられる。

第 4 章では、前章で提案した臨界サイズを基に、分子量が大きく異なる 4 種類のタンパク質を用いてタンパク質の結晶化制御を試みた。さらに、核形成における重要なパラメータである過飽和度を変化させて晶析挙動の調査を行った。その結果、タンパク質の分子量の違いによって、析出する結晶数の分布に違いがあることが明らかになった。以上より、結晶化条件だけではなく微小液滴の大きさによって、核形成と結晶成長を制御して 1 個の単結晶を作製することが可能であると考えられる。

第 5 章では、前章までに見出した微小液滴を用いた結晶化制御技術を利用して、テフロンキャピラリー、およびガラスキャピラリー内の微小液滴中でタンパク質単結晶を 1 個だけ析出させ、*In-situ* での X 線回折実験を試みた。その結果、微小液滴中に析出した単結晶からも高角側の回折点を確認でき、良好な回折像を得ることが可能であった。解析の結果、微小液滴中で析出した結晶とバッチ法で作製した結晶の空間群、晶系は同じであった。また、キャピラリーの材質、壁の肉厚が結晶の回折像に与える影響について比較した結果、テフロン、およびガラスキャピラリーともに、空間群や格子状数の決定が可能な程度の回折像を得られることが明らかになった。さらに、溶液中での X 線回折実験による結晶への放射線損傷でのダメージについて考察を行った。

第 6 章では、本研究の内容を総括し、マイクロ流体デバイスを用いたタンパク質の結晶化における核形成・結晶成長の制御方法についてまとめた。