



タンパク質結晶ができる瞬間をナノスケールで観察 ～集まり方の異なる非結晶粒子が結晶化を促進～

研究成果のポイント

- ・ 溶液中でリゾチームタンパク質の結晶ができる瞬間を透過型電子顕微鏡で捉えることに成功。
- ・ 役割と性状の異なる 2 種類の非結晶粒子がタンパク質の結晶化を促進することを解明。
- ・ 創薬のブレイクスルーや結晶化の制御につながる成果。

研究成果の概要

タンパク質の結晶化の解明は、創薬に向けた最大の課題です。木村准教授らの研究グループは、その過程を明らかにするため、ナノの空間分解能をもつ透過型電子顕微鏡で、リゾチームタンパク質の結晶化の直接観察を試みました。その結果、このタンパク質の結晶化は不規則に密集して結晶化の土台となる粒子（ガラス状粒子）と、その上にゆったりと不規則に集まった後に結晶に変化する粒子（液滴状粒子）の 2 種類が介在するという想定外の過程で起こることを明らかにしました。この成果は、タンパク質の結晶化手法の確立につながると期待され、一般的な結晶の生成過程を知るうえでも重要な手掛かりになります。

本研究は、米国科学アカデミー紀要のハイライト論文に選ばれました。

論文発表の概要

研究論文名：Two types of amorphous protein particles facilitate crystal nucleation（2 種類のタンパク質非晶質粒子が結晶の核生成を促進する）

著者：山崎智也¹，木村勇氣¹，Peter G. Vekilov²，古川えりか³，白井 学⁴，松本弘昭⁴，Alexander E. S. Van Driessche⁵，塚本勝男³（1. 北海道大学，2. ヒューストン大学，3. 東北大学，4. 株式会社日立ハイテクノロジーズ，5. グルノーブル大学）

公表雑誌：米国科学アカデミー紀要（PNAS）

公表日：日本時間（現地時間） 2017 年 2 月 14 日（火）午前 5 時（米国東部時間 2017 年 2 月 13 日（月）午後 3 時）

研究成果の概要

(背景)

結晶化の最初期の過程である「核生成」は(図1)、結晶のサイズや形、構造を決める非常に重要なプロセスであるにも関わらず、その詳細はほとんど分かっていません。これは、ナノメートルの空間スケール(ナノメートルは100万分の1mm)において、短時間(数秒以内)で完結する現象であるため、顕微鏡での直接観察が困難なためです。核生成が理解できれば、思い通りに結晶を作ったり、様々なタンパク質を結晶化させたりできるようになると期待されます。特にタンパク質の結晶を作ることができると、X線を用いた分子の3次元構造解析により、その分子構造を決定できるため、病気に効く薬を直接デザインできます。そこで、結晶の成長速度や溶解度が最も良く知られているタンパク質である、リゾチームを用いて、核生成過程のその場観察を試みました。リゾチーム結晶の核生成は、まず分子が集合して高濃度な液滴が生成し、その内部から結晶が現れる2段階のプロセスから成ると考えられていますが、これを直接観察した例はありません。

(研究手法)

ナノの空間スケールで起こる現象を観察するのに最も強力な装置は、透過型電子顕微鏡(TEM)ですが、観察には高真空が必要なため、溶液は直接入れられませんでした。研究グループは、2012年に溶液セルを備えたTEMを立ち上げ、最適化を行うことで、フルイド反応TEM^{注)}として確立し、数年にわたってタンパク質結晶の核生成のその場観察を行ってきました。

(研究成果)

リゾチーム分子の高濃度液滴と考えられている粒子が存在する溶液条件で、その粒子を詳細に観察しました。その結果、この粒子は平均直径が170 nm程度で非結晶ですが、粒子同士が接触しても一つの粒子になる様子が全くないことから、定説に反し、液体ではなく固体(ガラス状)であることが分かりました。このガラス状粒子の内部からは、結晶は現れませんでした。一方で、リゾチーム結晶の核生成は、ガラス状粒子の上ではじまり、ガラス状粒子は結晶化を促進する下地として機能することが分かりました(図2)。リゾチーム結晶が核生成する際の粒子の大きさの時間変化を測定したところ、粒子が出現した直後の成長速度は、結晶よりも2~3桁も大きく、結晶やガラス状粒子よりも密度が小さいことが分かりました。これは、出現した直後の粒子が結晶ではなく、液滴状の非結晶粒子であることを示しています。溶液を凍らせて観察するクライオTEMを用いて、液滴状粒子中に結晶が出来ている様子も観察できました(図3)。これまで知られていなかった液滴状粒子の発見は、新たな核生成理論モデルの構築につながる大きな成果です。

(今後への期待)

本成果は核生成の描像解明に向けた大きな進展であり、核生成理論モデルの発展に大きく寄与します。今後、本手法によるさらなる実験と、理論的なアプローチにより、核生成のメカニズムが明らかになり、従来結晶化が困難であったタンパク質の結晶化につながると期待されます。

お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学低温科学研究所 准教授 木村 勇気(きむら ゆうき)
TEL：011-706-7666 FAX：011-706-7666 E-mail：ykimura@lowtem.hokudai.ac.jp
ホームページ：http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/astro/

[用語解説]

フルイド反応 TEM：溶液セルを用いることで、TEM 観察に必要な非常に薄い、厚さ 150~1000 nm 程度の溶液層を TEM 試料室の高真空環境から隔離した状態で準備でき、2 種類の溶液の混合や温度制御をしながら観察が可能な装置。

【参考図】

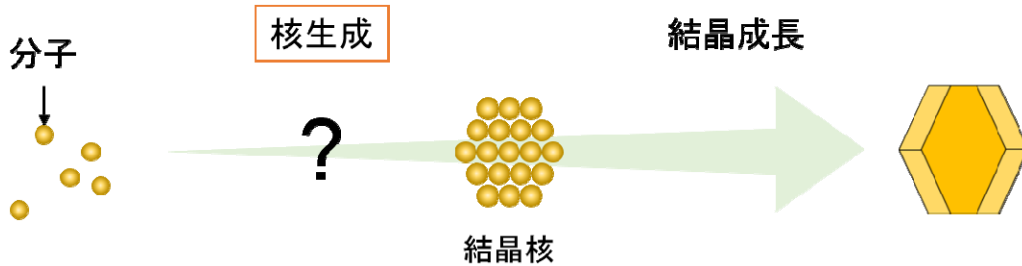


図 1. 結晶化過程の模式図。分子が集合し、熱力学的に安定な大きさ（臨界サイズ）の結晶核が生成する過程を「核生成」、その後の結晶が大きく成長していく過程を「結晶成長」と呼ぶ。近年の結晶成長の目覚ましい理解に対して、核生成は直接観察することが困難なため、その過程はほとんど分かっていない。

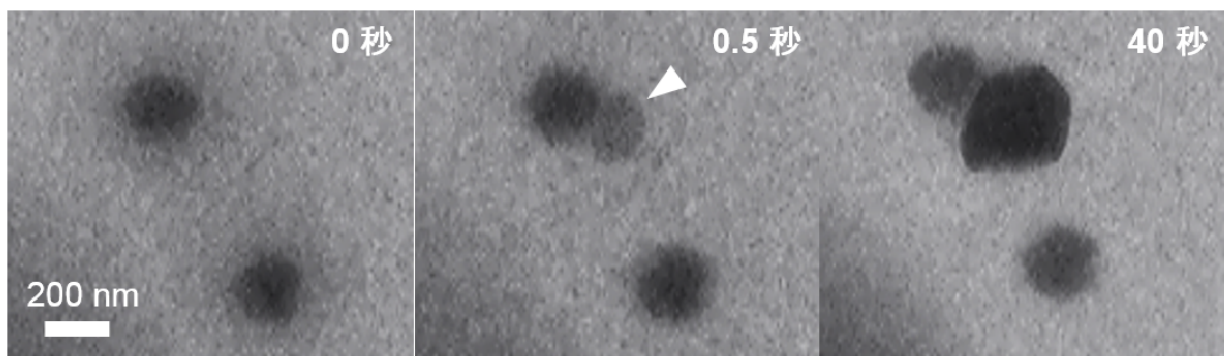


図 2. 結晶ができる様子を TEM で捉えたスナップショット。結晶化が始まる直前の 0 秒時には、ガラス状粒子が 2 つ存在していた。そのうち、片方のガラス状粒子の上から、液滴状粒子が生成し (0.5 秒時、三角で示した位置)、1 秒で約 200nm の大きさに成長した。この粒子は平らな面を持つ結晶になり、その後は毎秒約 1nm で成長した。

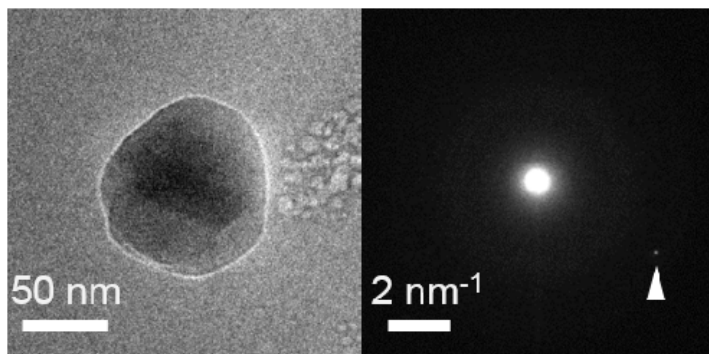


図 3. タンパク質結晶の核生成を捉えたクライオ TEM による明視野像 (左) とその電子回折像 (右)。液滴状粒子中に平らな面を持つリゾチーム結晶が生成している様子が見られる。結晶を示す電子回折スポット (右図中、三角印) も確認できた。