微小気液界面によるタンパク質の結晶化

Protein Crystallization by Micro-Gas-Liquid Interface

○学 高澤 曹 (芝浦工大) 学 栗木 宏樹 (名古屋大学)
正 新井 史人 (名古屋大学) 正 山西 陽子 (芝浦工大, JST さきがけ)

So TAKASAWA, Shibaura Institute of Technology, daig_a10055@shibaura-it.ac.jp

Hiroki KURIKI, Nagoya University, kuriki@biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp

Fumihito ARAI, Nagoya University, arai@mech.nagoya-u.ac.jp

Yoko YAMANISHI, Shibaura Institute of Technology, JST PRESTO, yoko@shibaura-it.ac.jp

We have succeeded in protein crystallization and processing by electrically-induced bubbles. The dispensed directional mono-dispersed micro-bubbles whose air-liquid interface tends to combine the ambient molecules due to by their stiction force on the surface of micro-bubbles. Electrically-induced bubble enables to generate mono-dispersed micro-bubbles by the electrolysis and local heat, and their generation speed was 30.8 kHz. These characteristics enable to agglomerate the protein molecule which brings to successful protein crystallization in the solution with low concentration. The rate of protein crystal-nucleation by electrically-induced mono-dispersed micro-bubble was much higher than that of control condition. The correlation between the number of bubbles and that of generated crystal was confirmed. Also, the crystallization of two different protein sample were successfully operated.

Key Words: Gas-liquid interface, Protein Crystallization

1. 緒言

生命機能の理解や創薬研究などを目的として、タンパク質の立体構造の解析が重要な課題となっている。その立体構造はタンパク質の結晶を作製し、X線を当て、回折像の解析を行うことや、タンパク質溶液に対し核磁気共鳴(NMR)を用いて解析することが可能である。この中で結晶を生成する方法は長らく研究がされてきた。従来手法では塩を利用した、塩析やPEG、MPDなどの水溶性高分子などの結晶化剤を選び実験していく方法がとられている。しかしながらタンパク質の構造解析は結晶の品質に強く依存するために単に結晶を生成するだけではなく、良質な結晶を生成することが求められる。そのために、個々のタンパク質により最適な結晶化条件は異なる。したがって、それがタンパク質の良質結晶の作製、ひいては立体構造解析においてボトルネックとなっている。そのため、近年では、短パルスレーザ[1]、微小重力[2]など[3-7]を用いた結晶化方法も報告されており、様々なタンパク質の結晶化に成功している。筆者らは、電界誘起気泡の界面に付着性があり、mRNAや試薬等の物質が付着して液中中で輸送される現象を発見した[8]。誘起された気泡はその後断熱圧縮し収縮を始める。そのため、付着した溶液がタンパク質溶液の場合には、局所的にタンパク質が集まり、結晶核が形成可能でないかと考えた。気泡は一般的にその表面はマイナスに帯電しているため、プラスに帯電している物質が吸着されやすい[9]。タンパク質分子はプラスもしくはマイナスに両方に帯電するがpHを調整することによって帯電の正負を制御できる。(図1)本稿ではモデルタンパクとして卵白由来リゾチームを使用し準安定領域である条件に溶液を調製し電界誘起気泡による促進を行い、従来法と比較することでその有用性と気液界面の発生特性による結晶生成の違いを確認した。

Fig1. Concept of crystallization

2. 実験

図2に実験系を示す。図2.(a)では電界誘起気泡発生装置は1回につき、600パルスの電界の印加を行い、図2.(b)では所望の印加回数に設定できる[3]。ドロップに対して、これを一律10回の気泡生成を行った。図2.(c)では促進後の密閉保存方法を示した。本研究ではタンパク質結晶生成において広く使用されている蒸気拡散法を用いて電界誘起気泡で発生したタンパク質結晶核を成長させた。

つまり図1からタンパク溶液と沈澱剤溶液に塩濃度の差を与えると、沈澱剤溶液の蒸気圧が低くなるため、タンパク溶液から沈澱剤溶液の方に両者の塩濃度が等しくなるまで水分が移行する。すると、タンパク溶液内のタンパクと塩濃度が上昇し、タンパクの濃度が飽和溶解度以上に達すると結晶が生成促進される方法である。主にタンパク溶液の液滴と沈澱剤溶液の位置によってハンギ

シットングドロップとハンギングドロップと手法が異なる。
そこで本研究では両方の手法を用いて結晶を生成させた。

(a) Overview of electrical circuit

(b) Overview of electrical circuit of manually controlled pulsed power supply

(c) Process flow of bubble treatment and each crystallization method.

Fig2. Experimental setup

2.1 リゾチームの結晶化促進

シットングプレート上に 100 mg/mL のリゾチーム溶液 1 μ L 中を滴下し, 100 μ L のリザーバー溶液 1M NaCl, 25% glycerol, 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5 を 1 μ L 取り出し滴下した. その後, 液滴に電界誘起用微細電極(アクティブ電極と対向電極の 2 本)を限られた空間内に設置し, 電界誘起気泡で結晶化促進を行い, 最後にリザーバー溶液とともにシットングドロップ法にて容器に密封をした. 24 時間後, 観察した写真を図 3 に示す. (a) は気泡による促進を行わなかったものであり, (b) は行ったものを示す.

(a), (b) ともに結晶化が確認できる. また, 図 4 には経過時間による, タンパク質結晶の個数変化を示す.

促進されたものの個数増加は促進されていないものより著しく上昇し, 30 分後から両方とも規則的な増加をし, 最終的に, 6 個ほどの差が見られた.

Fig3. A photo of the produced protein crystal for two condition of control and bubble treatment.

Fig4. Number of produced protein crystals (N=10) as a function of time for two condition (sphere: control, square: with bubble treatment).

2.2 低飽和溶液におけるリゾチームの結晶化促進

電解有機気泡による結晶促進が確認できたため, 今度はより低濃度のタンパク質条件で実験を行った. カバーガラス上に 80mg/mL のリゾチーム溶液 1 μ L 中を滴下し, 150 μ L のリザーバー溶液 1M NaCl, 25% glycerol, 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5 を 1 μ L 取り出し滴下した. 其の後, 電界誘起気泡を射出し結晶化を促進した. 最後にハンギングドロップ法にて容器に密封し, 20°C で静置した. 12 時間後, 観察した写真を図 5 に示す. (a) は気泡による促進を行わなかったものであり, (b) は行ったものである. 促進を行った (a) は結晶が確認されなかったが, (b) の図には結晶が確認できた.

Fig5. A photo of protein crystal production in poor condition

2.3 界面発生因子によるリゾチームの結晶化促進

今度は気泡発生ノズル部の大きさに対する結晶生成個数への効果の評価を行った。カバーガラス上に80mg/mLのリゾチーム溶液1 μ L中を滴下し、150 μ Lのリザーバー溶液1M NaCl, 25% glycerol, 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5 を1 μ L取り出し滴下した。その後、図6の気泡発生部の口径や電界印加回数を変化させ、電界誘起気泡を射出し結晶化を促進した。最後にハンギングドロップ法にて容器に密封し、20 $^{\circ}$ Cで静置した。

24時間後、観測を行った。図7に気泡発生部口径によるタンパク質結晶の個数変化を示す。口径が大きくなるにつれ、結晶数が多くなることがわかる。ここで、図8に、気泡発生部口径により発生する気泡直径の変化を示した。ここから、口径が大きくなるにつれ、気泡が大きくなることわかる。すなわち、気泡直径が大きくなるほど、できる結晶の数が多くなるといえる。さらに、図9には、気泡の大きさによって変化する結晶生成の成功率を個数ともに表したものである。ここから気泡の大きさによって、成功率が上がることもわかる。また、結晶数も同時に増えていく。図10に入力パルス数を変化させた写真を示す。パルス数が増加するにつれて、結晶数が増加することがわかる。ここで、図11に、入力パルス数により発生する気泡数の変化を示した。ここから、入力パルス数が増えるにつれ、気泡数が増加することがわかる。すなわち、気泡数が多くなるほど、できる結晶の数が多くなるといえる。

Fig.6 Bubble generation region

Fig7. Number of produced protein crystals (N=8) as a function of tip diameter

Fig8. Diameter of generated bubbles as a function of tip diameter

Fig9. Success rate of lysozyme crystallization as a function of average bubble diameter. (Yellow: Single crystal in a well, Brown: More than three crystals in a well, Red: Two crystals in a well, Grey: No crystal in a well)

(a) Count 500

(b) Count 3000

(c) Count 6000

Fig10. A photo of protein crystal production as a function of pulse counts

Fig11. Number of bubbles as a function of pulse counts

2.4 チトクローム C の結晶化促進

カバーガラス上に1%のチトクロームC溶液1 μ L中を滴下し、150 μ Lのリザーバー溶液2.5M硝酸ナトリウム、4.0M硫酸アンモニウム、を1 μ L取り出し滴下した。その後、気泡発生部の口径や電界印加回数を変化させ、電界誘起気泡を射出し結晶化を促進した。最後にバッチ法にて容器に密封し、20 $^{\circ}$ Cで静置した。24時間後、観察した写真を図12に示す。(a)は全体図であり、(b)は(a)の一部を拡大したものである。図12(b)において結晶が確認できた。

[9]山本義久,マテリアルインテグレーション,Vol.22,
No.5, P.24-29, (2009).

(a) Bubble treatment (b) Magnified view

Fig12. A photo of the produced protein crystal production
for Cytochrome C from bovine heart

4. 結言

本研究ではタンパク質の結晶化の新手法の確立を目的に,電界誘起気泡によりタンパク質の結晶化を行った.以下に本研究の要点をまとめる.

電界誘起気泡をタンパク質溶液に対し,打ち込むことにより,タンパク質の結晶が従来法より,短時間で多くの個数が形成され,低飽和溶液に対し,促進を行うと従来法には結晶化されない条件において結晶が観察できた. また気泡数と気泡直径が結晶数と関係していることともに,リゾチーム以外のタンパク質に対しても有用であることが確認された.

5. 謝辞

本研究は,JST さきがけ研究の助成を得て行われた. 本研究におけるタンパク質結晶生成において貴重なアドバイスを頂きました栗栖源嗣先生並びに新村加奈子先生に心より感謝申し上げます.

6. 文献

- [1]H.Adachi, *et. al.*, Journal of the Japanese Association for Crystal Growth, Vol.29, No.5, P.445-449, (2002).
- [2]相原 茂夫,化学と生物, Vol.41, No.10, P.657-659, (2003).
- [3]M.Tsukamoto, *et. al.*,Proceedings of the 15th Symposium for Japanese Research Group of High Pressure Bioscience and Biotechnology, Vol.2, P.29-37, (2008).
- [4]N.shimizu *et al*, Cryst Growth Des, Vol.9, No.12, P.5227-5232, (2009).
- [5]R.Murai *et al.*, Journal of the Japanese Association for Crystal Growth, Vol.32, No.3, P.234, (2005).
- [6]M. C. Heijna *et al.*,Appl. Phys. Lett. 90,264105 (2007).
- [7]T.Okutsu, H.Hratsuka, Journal of the Japanese Association for Crystal Growth, Vol.33, No.5, P.336-374, (2006).
- [8]H. Kuriki, *et al.*,Proc. of IEEE MEMS 2013, P.209-212, (2013).