最近の研究から

レーザー照射による蛋白質結晶成長制御

大阪大学大学院工学研究科, 創晶プロジェクト

安達宏昭, 高野和文, 松村浩由, 井上 豪, 森 勇介, 佐々木孝友

Hiroaki ADACHI, Kazufumi TAKANO, Hiroyoshi MATSUMURA, Tsuyoshi INOUE, Yusuke MORI and Takatomo SASAKI: Control of Protein Crystallization Using Laser Irradiation

We developed crystallization method of a protein molecule by laser irradiation, and call this process Laser Irradiated Growth Technique (LIGHT). Effective crystallization was confirmed by applying a femtosecond laser. The crystallization period was shortened by LIGHT. Protein crystals were also obtained by LIGHT from normally uncrystallized conditions. These results indicate that laser irradiation generates crystal nuclei; protein crystals can then be grown from the nuclei that act as seeds in a supersaturated solution. We should optimize the laser-irradiated condition to control the number of crystals and to obtain high-quality crystals because protein crystallization depends on the conditions.

1. はじめに

蛋白質の立体構造解析は, 創薬研究, 構造生物学, 生命現象の解明などの目的で行われている。国際的な蛋白質構造解析プロジェクトが米国を筆頭に進められているが, わが国でも, 国家プロジェクトとして「タンパク 3000」(文部科学省) が進行中である。一般的な構造解析手法である X 線やシンクロトロン放射光を用いた結晶解析では, 結晶作製が不可欠である。しかしながら, 蛋白質の結晶化に関する手法は, いまだ確立されておらず, その結晶化が非常に困難であるため, 構造解析のボトルネックとなっている。

現在の蛋白質結晶化は, 主に構造解析の専門家による知識と経験, 無機や有機低分子化合物を題材として発展してきた結晶成長の理論や概念が組み合わさった方法が用いられている。蛋白質は希少性が高く, 結晶化条件も未知であることから, 条件探索は微量の試料による多種溶液条件のスクリーニングを行う。主に, 沈殿剤溶液や pH を変化させ, 温度を一定に制御した恒温槽内で結晶育成溶液を静置させ, とくとき結晶観察はするものの, 数週間から数カ月の間, 結晶が得られるのを待つしかなかった。結晶化できない場合は, 再度, サンプルを準備し, スクリーニング範囲を広げるしか策はなかった。そのため結晶化条件探索は, 数千から数万条件に及ぶ場合もある。しかしながら, 膨大な結晶化条件探索を行ったにもかかわらず, 結晶が得られない場合が多い。

われわれは, 積極的に結晶成長を制御して結晶を作製する「創晶工学」を提唱している。¹⁾より速く, 確実に高品質蛋白質結晶を作製する技術開発に着手し, 結晶化において

は, 高強度短パルスレーザーを蛋白質の過飽和溶液に集光照射することで, 結晶が生成できることを発見した(国際特許出願中)。^{2),3)}本論文では, この結晶化技術 Laser Irradiated Growth Technique (LIGHT) を用いた手法を紹介する。

2. 結晶化の原理

蛋白質結晶は, 主に溶液中で育成されるが, 結晶を析出させるには, 蒸気拡散や温度変化などにより蛋白質溶液の過飽和度を高くする必要がある。図 1 に蛋白質の状態図と溶解度曲線の模式図を示す。蛋白質の溶解度に影響を及ぼす因子は, 沈殿剤, 塩濃度, pH, 温度などが挙げられる。一般に, 蛋白質は準安定領域(過飽和状態)にあるが, 自然

図 1 蛋白質結晶育成の状態図と溶解度曲線。(Typical phase diagram and solubility curve in the growth of protein crystals.)

核形成には至らない領域。ただし、種結晶が溶液中にある場合は成長する) がきわめて大きく、過飽和度を高くしないと自然核成長による結晶育成はできない。しかしながら、過飽和度の高い溶液中で結晶が析出すると、急成長による結晶品質の低下、結晶の大量析出による多結晶化などの問題が生じる。さらに、結晶の析出時期に大きなバラつきが生じ、実験の再現性が悪い。また、過度の過飽和状態にすると、アモルファス状の沈殿物が生じる。そのため、適度な過飽和度に調整する必要がある。理想的には、より低過飽和の溶液内で結晶化(核形成)させることができれば、結晶の急成長を回避でき、高品質結晶の育成につながる。

蛋白質分子は溶液中で解離と会合を繰り返しているが、結晶化は分子集合体(クラスター)の大きさが、ある一定の大きさ(臨界半径を超える大きさ)に達することで実現する。つまり、過飽和溶液中で結晶を析出させるためには、蛋白質分子の会合を促進させる必要がある。しかしながら、低過飽和溶液中では、蛋白質クラスターが臨界半径を超える確率はきわめて低いため、通常、結晶化は起こらない。核形成を強制的に引き起こすため、溶液への機械的衝撃などの誘因が不可欠であり、われわれは短パルスレーザーを低過飽和溶液に集光照射することにより刺激(摂動)を与え、結晶核を生成することを試みた。これまでに有機物を対象としたレーザー照射による結晶核生成が報告されている。⁴⁾⁻⁶⁾

3. リゾチームを用いたレーザー照射の基礎実験

短パルスレーザーとして、有機物の結晶化で報告されたパルス幅がナノ秒であるNd:YAGレーザーを用いた。レーザー光の波長は1064 nm、パルス幅は23 nsであり、繰り返し周波数は10~1000 Hzまで変化させることができる。モデル蛋白質溶液として、ニワトリ卵白リゾチーム(生化学工業製)を使用した。リゾチームは熱的、化学的に安定であり、結晶化条件や温度に対する溶解度もすでに報告されている。^{7,8)} 溶液の過飽和度は、温度を制御することで変化させ、レーザー照射と結晶核生成の相関を調べた。

結晶育成溶液は、リゾチーム25 mg/mlにpH4.5の0.1 M酢酸緩衝溶液と2.5%の塩化ナトリウムを混合することで作製し、2液バッチ法^{9,10)}にて結晶化実験を行った。酸性環境下の298 K以下におけるリゾチーム結晶の育成では、正方晶系の結晶が得られやすいことから、この溶液の飽和点は296.8 Kである。リゾチーム溶液を冷却機能付き低温恒温水槽内に設置し、目的とする過飽和度が得られる温度まで、溶液温度を降下させた。通常では、自然核による結晶析出が観測されない低過飽和蛋白質溶液(溶液温度287~290 K)に、焦点距離120 mmのレンズを用いて、レーザーを1分間集光照射した。レーザー実験のセットアップを図2に示す。

レーザー照射後の溶液を観察したが、いずれのリゾチー

図2 2液バッチ法を用いたレーザー照射実験。(Experimental setup for laser irradiation using a Two-Liquid batch method.)

図3 レーザー照射によって得られたリゾチーム結晶。(Lysozyme crystals obtained by laser irradiation.)

ム溶液においても、結晶化が確認できなかった。また、レーザーの照射時間を長くして、過度に摂動を与えた場合や、さらに溶液温度を降下させ、過飽和度を高くした場合においても、レーザーによる結晶化は確認できなかった。また、蛋白質の変性などの状態変化も観測できなかった。ナノ秒レーザーによる結晶核生成は、有機物において確認しているが、有機分子よりも結晶化しにくい蛋白質では、その効果は確認できなかった。

そこで、蛋白質の結晶化にはきわめて強い摂動が必要であると考え、パルス幅のより短いレーザーであるフェムト秒レーザーを用いて、前述したリゾチーム溶液へのレーザー照射による結晶化実験を行った。本実験では、高出力フェムト秒チタンサファイアレーザーを焦点距離170 mmのレンズを用いて、集光照射した。レーザー光の波長は800 nm、パルス幅は120 fs(パルス幅はナノ秒レーザーに比べて10万分の1以下)であり、繰り返し周波数は20~1000 Hzまで変化させることができる。

フェムト秒レーザーを溶液温度287 Kに保持したリゾチーム溶液に1分間集光照射して、その状態変化を観察したところ、レーザーの繰り返し周波数により実験結果に違

いが見られた。結晶の析出はレーザーの繰り返し周波数が 50 Hz, 100 Hz においてのみ確認でき, レーザー照射 1 日後には肉眼で確認できる大きさ (100 μm 程度) まで成長し, その後もゆっくり成長した (図 3)。しかしながら, レーザーを照射しない溶液と, 繰り返し周波数 20 Hz でレーザー照射した溶液においては, 結晶析出を確認できなかった。一方, 500 Hz, 1000 Hz の高い繰り返し周波数においては, レーザー照射と同時にリゾチームの変性が起こり, 白色の凝集体が確認できた。これらの結果から, 蛋白質の結晶化はレーザー照射条件に大きく依存しており, その最適化が必要であると考えらる。

4. レーザー照射による結晶化技術の各種蛋白質への応用

フェムト秒レーザー照射による結晶化技術 LIGHT を各種蛋白質サンプルへ適用するためには, 微量サンプルへのレーザー照射が可能なシステムを構築する必要がある。当然ながら, 結晶化手法として, 広範に使用されているハンギングドロップやシッティングドロップ蒸気拡散法を選択することが望ましい。そのため, 対物レンズを用いた顕微鏡下でレーザーを照射するシステムを構築した (図 4)。

図 4 顕微鏡を用いたレーザー照射実験の模式図。(Experimental setup for laser irradiation using a microscope.) (a) ハンギングドロップ蒸気拡散法への応用。(b) シッティングドロップ蒸気拡散法への適応。

ハンギングドロップ法では, 上面がガラスであるため一般的な育成容器を使用することができる。シッティングドロップ法では下面からレーザーを照射するため, 材質や形状を工夫した結晶化プレート (サイボックス製) を開発した (図 5)。

LIGHT の有効性を示す実験結果の一例をご紹介します。ニワトリ卵白リゾチームは結晶化しやすく, 分子量も 14 kDa と比較的小さい。そこで, 分子量がその 10 倍以上となる蛋白質分子であるグルコースイソメラーゼ (4 量体: 173 kDa) を用いて, シッティングドロップ蒸気拡散法にて結晶化実験を行った。結晶育成溶液は, グルコースイソメラーゼ (Hampton Research 製) 13 mg/ml と 0.2 M 硫酸アンモニウム, 15 %ポリエチレングリコール 6000 の混合溶液 (pH7) を使用し, 外液は 0.2 M 硫酸アンモニウムと 15 %ポリエチレングリコール 6000 の混合溶液 (pH7)

図 5 レーザー照射用シッティングドロップ結晶化プレート (Protein crystallization plates for sitting-drop vapor-diffusion technique.)

図 6 レーザー照射によって得られたグルコースイソメラーゼ結晶。(A glucose isomerase crystal obtained by laser irradiation.) (a) 育成 1 日, (b) 育成 7 日。

を用いた。¹¹⁾ 室温でフェムト秒レーザーを蛋白質溶液内に集光照射し、291 K に設定した低温恒温槽内に静置して、その後の溶液状態を顕微鏡にて観察した。レーザー光の照射時間は0.01秒であり、照射なし(0秒)のサンプルと比較した。レーザー照射1日後に、グルコースイソメラーゼの結晶析出を確認し、レーザーで生成した結晶はその後成長した(図6)。一方、レーザー照射していない蛋白質溶液は、結晶の析出が1カ月経っても確認できなかった。

次に、トリパノソーマ由来プロスタグランジン F_{2α} 合成酵素¹²⁾ の結晶化例を示す。蛋白質溶液は、プロスタグランジン合成酵素 20 mg/ml と 0.005 M ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(NADP⁺)、0.04 M トリス塩酸緩衝液(pH8.0)の混合溶液を外液(0.01 M ヘプス水酸化ナトリウム緩衝液、2%ポリエチレングリコール400、1.2 M の硫酸アンモニウム溶液(pH7.5))とを1:1で混合して用いた。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。室温でフェムト秒レーザーを蛋白質溶液内に集光照射し、293 K に設定した低温恒温槽内に静置し、その後の溶液状態を顕微鏡にて観察した。レーザー光の照射時間は0.06秒であり、照射なし(0秒)のサンプルと比較した。レーザーを照射したサンプルは2日後に結晶が析出した。この結晶は結晶化が困難で、結晶が析出したとしても数カ月から半年を要していた。今回もレーザーを照射しないサンプルは、3カ月以上経っても結晶の析出は確認できなかった。

一般に、蛋白質を結晶化させるには、きわめて高い過飽和度を必要とするが、これら実験結果に示すようにレーザーを照射することで、通常核形成にくい低過飽和度の溶液においても、結晶化が促進されることがわかった。つまり、LIGHTにより結晶化スクリーニングのヒット率が向上し、結晶析出までの時間も短縮され、効率的な結晶化スクリーニングを実現できる。さらに、低過飽和溶液中での結晶育成は、準安定領域の溶液内に種結晶を導入し、結晶成長させる無機や有機結晶の大型高品質結晶の作製手法¹³⁾⁻¹⁵⁾と同様、結晶品質の向上につながる。溶液の過飽和度と結晶品質は密接に関連しており、低過飽和溶液で成長した結晶ほど、X線構造解析における回折分解能が高いことが、リゾチーム結晶において報告されており、¹⁶⁾ LIGHTによる結晶品質の向上も期待できる。

5. おわりに

われわれは超短パルスレーザーであるフェムト秒レーザーを用いた蛋白質の新しい結晶化技術 LIGHT を開発した。これまで、ナノ秒レーザーを用いた有機物の結晶化は報告されているが、本論文で示したように蛋白質では、その効果は得られなかった。蛋白質結晶化においては、パルス幅がより短いフェムト秒レーザーが有効であることを実証した。しかしながら、フェムト秒レーザーによる蛋白質結晶核の発生メカニズムは未解明であるが、以下の3つの可能性を考えている。

質結晶核の発生メカニズムは未解明であるが、以下の3つの可能性を考えている。

- 1) パルスレーザーが誘起するアブレーションにより衝撃波が発生し、それにより溶液が局所的に揺らされた結果として結晶核が生成する。
- 2) パルスレーザーにより光熱変換が引き起こされ焦点付近の溶液が瞬間的に蒸発し、溶質の濃縮が起こった結果として結晶核が生成する。
- 3) 高出力フェムト秒レーザーが作る電界により、分子が配向もしくは凝集し、結晶核が生成する。

一方で、新しい現象の可能性が指摘されており、学問的な興味も大きい。¹⁷⁾ ともかく、現象論の解明は今後の課題として、LIGHTはX線結晶構造解析のボトルネックの1つである蛋白質結晶化を加速させる手法として期待できる。本技術が皆様方のお役に立てばと願うばかりである。

謝 辞

ここで報告した研究は、大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻の増原 宏教授、物質・生命工学専攻の金谷茂則教授、物質化学専攻の甲斐 泰教授、CREST研究員の細川陽一郎博士の支援と協力をいただき、得られた結果であります。また、本研究は文部科学省の大学等発ベンチャー創出支援制度の助成を受けて推進したものであります。その他、研究の一部は新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)、光科学技術研究振興財団、科学技術振興機構(JST)の支援を受けた研究にかかわっております。この場を借りて、感謝の意を表します。

文 献

- 1) 安達宏昭, 高野和文: 熱測定 **30**, 148 (2003).
- 2) 安達宏昭, 細川陽一郎, 高野和文, 常定扶美, 増原 宏, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友: 日本結晶成長学会誌 **29**, 445 (2002).
- 3) H. Adachi, K. Takano, Y. Hosokawa, T. Inoue, Y. Mori, H. Matsumura, M. Yoshimura, Y. Tsunaka, M. Morikawa, S. Kanaya, H. Masuhara, Y. Kai and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42**, L798 (2003).
- 4) B. A. Garetz, J. E. Aber, N. L. Goddard, R. G. Young and A. S. Myerson: *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3475 (1996).
- 5) B. A. Garetz, J. Matic and A. S. Myerson: *Phys. Rev. Lett.* **89**, 175501 (2002).
- 6) F. Tsunesada, T. Iwai, T. Watanabe, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *J. Cryst. Growth* **237-239**, 2104 (2002).
- 7) M. Ataka and M. Asai: *J. Cryst. Growth* **90**, 86 (1988).
- 8) G. Sasaki, K. Kurihara, T. Nakada, S. Miyashita and H. Komatsu: *J. Cryst. Growth* **169**, 355 (1996).
- 9) H. Adachi, T. Watanabe, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **41**, L726 (2002).
- 10) H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki: *J. Synchrotron Rad.* **11**, 121 (2004).
- 11) H. L. Carrell, J. P. Glusker, V. Burger, F. Manfre, D. Tritsch and J. F. Biellmann: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4440 (1989).
- 12) Y. Okano, T. Inoue, B. K. Kubota, Z. Kabututu, Y. Urade, H.

- Matsumura and Y. Kai: *J. Biochem.* **132**, 859 (2002).
- 13) T. Sasaki, Y. Mori, M. Yoshimura, Y. K. Yap and T. Kamimura: *Mater. Sci. Eng.* **30**, 1 (2000).
- 14) T. Sasaki, Y. Mori and M. Yoshimura: *J. Nonlinear Opt. Phys. Mater.* **10**, 249 (2001).
- 15) H. Adachi, Y. Takahashi, J. Yabuzaki, Y. Mori and T. Sasaki: *J. Cryst. Growth* **198/199**, 568 (1999).
- 16) I. Yoshizaki, T. Sato, N. Igarashi, M. Natsuisaka, N. Tanaka, H. Komatsu and S. Shinichi Yoda: *Acta Crystallogra.* **D57**, 1621 (2001).
- 17) D. W. Oxtoby: *Nature* **420**, 277 (2002).

プロフィール

安達宏昭 Hiroaki ADACHI
大阪大学大学院工学研究科電気工学専攻
Department of Electrical Engineering, Graduate
School of Engineering, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: adachi@pwr.eng.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了
専門分野：結晶成長, 非線形光学, レーザー光学,
電気材料工学
現在の研究テーマ：有機および蛋白質結晶の育成
とその応用

高野和文 Kazufumi TAKANO
大阪大学大学院工学研究科物質・生命工学専攻
Department of Material and Life Science, Graduate
School of Engineering, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: ktakano@mls.eng.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了
専門分野：蛋白質物理化学
現在の研究テーマ：蛋白質立体構造構築機構の解明

松村浩由 Hiroyoshi MATSUMURA
大阪大学大学院工学研究科物質化学専攻
Department of Materials Chemistry, Graduate School
of Engineering, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: matsuzou@chem.eng.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：炭酸固定酵素の構造機能相関

井上 豪 Tsuyoshi INOUE
大阪大学大学院工学研究科物質化学専攻
Department of Materials Chemistry, Graduate School
of Engineering, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: inouet@chem.eng.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：ブルー銅蛋白質の構造機能相関,
プロスタグランジン合成酵素の構造解析と医薬への応用

森 勇介 Yusuke MORI
大阪大学大学院工学研究科電気工学専攻
Department of Electrical Engineering, Graduate
School of Engineering, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: mori@pwr.eng.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院工学研究科博士後期課程中退
専門分野：結晶成長, 非線形光学, レーザー光学,
電気材料工学
現在の研究テーマ：ホウ酸系非線形光学結晶の開発,
窒化ガリウム・有機・蛋白質単結晶の育成

佐々木孝友 Takatomo SASAKI
大阪大学大学院工学研究科電気工学専攻
Department of Electrical Engineering, Graduate
School of Engineering, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: sasaki@pwr.eng.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院工学研究科博士後期課程中退
専門分野：結晶成長, 非線形光学, レーザー光学,
電気材料工学
現在の研究テーマ：光・電子デバイス用結晶材料
の開発と産業・医療応用