最近の研究から

紫外レーザーを用いた蛋白質結晶の加工

(株)ニコン*, 大阪大学大学院工学研究科**, 創晶プロジェクト***

北野博史*, ***, 安達宏昭**, ***, 松村浩由**, ***, 高野和文**, ***, 井上 豪**, ***,
森 勇介**, ***, 佐々木孝友**, ***Hiroshi KITANO, Hiroaki ADACHI, Hiroyoshi MATSUMURA, Kazufumi TAKANO,
Tsuyoshi INOUE, Yusuke MORI and Takatomo SASAKI: Protein Crystal Processing
Using Ultraviolet Laser

We proposed a new processing technique for protein crystals, pulsed UV laser soft ablation (PULSA). Several kinds of protein crystals were successfully processed by laser irradiation at a wavelength of 193 nm. Unchanged resolution limit between pre- and post-processings in X-ray diffraction measurements showed PULSA had little influence on the crystallinity of the non-irradiated section. This technique will be a powerful tool for processing fragile biological-macromolecule crystals and will accelerate protein structural analysis.

1. はじめに

生命現象の解明や創薬などを目的として、蛋白質の三次元構造を解き明かす研究が盛んに行われている。核磁気共鳴装置による解析と並んで、X線構造解析は蛋白質の立体構造を知るための主要な手段の1つであるが、その測定には該当蛋白質の単結晶が必要である。蛋白質は無機や有機低分子の材料に比べて分子構造が複雑であり、分子間の結合力が弱いと、その結晶化は難しい。さらに、それぞれの蛋白質で結晶化条件も異なる。仮に結晶化に成功したとしても、測定に適した所望の品質、大きさ、形状の単結晶が得られず、多結晶化するなどの問題が生じることが多い。そこで、X線回折測定を行うために、結晶の加工操作を行う場面が多々存在する。

ここで問題となるのが、蛋白質結晶の取り扱いの難しさである。大型の蛋白質単結晶が得られることは少なく、測定に使用される結晶のサイズは、大きくても数百ミクロン程度である。また、通常は一定の温度範囲の水溶液中でしか安定して存在することができず、乾燥あるいは加熱により容易に変性する。さらに、最大の特徴としては、結晶といっても非常に軟らかく脆いことである。ビッカース硬度の測定で定量的に比較した報告によると、その値は代表的な無機結晶に比べて3桁以上小さい¹⁾。このように、蛋白質結晶は非常に繊細な性質を有していることから、硬質で安定な材料を加工操作する手法をそのまま適用することができない。現在用いられている蛋白質結晶の加工方法は、メスや針などを用いた、人の手による再現性の低い手法である。そのため、貴重な蛋白質結晶が、育成後の操作上の

理由でX線回折測定を実現できないという問題がしばしば生じていた。

手動操作による初歩的な方法に依存している限り、加工の成功確率を高めることは難しい。著者らは非熱的な微細加工を可能にする短パルス深紫外レーザーの特性に注目した。レーザー光を使うことにより、個人のスキルに依存しない精密な加工技術の確立が期待できる。本稿では、この新しい蛋白質結晶加工方法 (Pulsed UV Laser Soft Ablation : PULSA) の有用性について紹介する。²⁾⁻⁴⁾

2. レーザー光を用いた蛋白質結晶の加工

2.1 レーザー波長の選定

一般にレーザーアブレーションとは、高密度のレーザー光をターゲットに照射した場合に、レーザー光とターゲット間での種々の相互作用を介して、最終的に表面がエッチング加工される過程のことを呼ぶ。⁵⁾ ターゲットとレーザー照射条件を固定すると、アブレーションによって発生するさまざまな現象が高い再現性をもって得られるため、多方向への応用が可能となっている。現在レーザーアブレーションは加工技術として普及しているが、最も広く用いられている炭酸ガスレーザー (波長 10.6 μm) や Nd : YAG レーザー (波長 1.06 μm) による加工は、レーザー光照射時に被加工材料に大きな温度上昇を生じるため、熱変性を回避しなければならない蛋白質結晶の加工においては不適である。これに対して、深紫外光は、赤外光や可視光に比べて光子エネルギーが高く、パルスレーザー光を用いることで、発熱による悪影響が少ない高精度で平滑な加工が達成できる。そのため、生体系材料の加工において都合が

良い。

レーザーアブレーションの特性は、ターゲットの吸光度に依存する。蛋白質は波長 300 nm 以下の紫外光を吸収するが、その吸収係数は波長が短くなるにつれて大きくなり、特に波長 200 nm 以下の深紫外領域では非常に高い吸収係数をもつ。^{6),7)} 例えば、ニワトリ卵白リゾチーム (hen egg-white lysozyme : HEWL) 水溶液の波長 193 nm における吸収係数は、280 nm 付近の吸収ピークにおけるそれと比べて 40 倍程度も大きい。非常に脆い蛋白質結晶を加工ターゲットにする場合は、結晶内部でのアブレーションによる衝撃の発生を抑え、表層のみで作用を起こしてソフトに加工していく方が望ましいと考えられる。すなわち、吸収の大きい深紫外光を用いることにより、結晶表面で効率的に光が吸収され、低いレーザー強度におけるアブレーションが可能になる。一方で、波長 190 nm 以下の真空紫外領域になると、大気中の酸素による吸収の影響が大きくなり、雰囲気を窒素ガスなどでパージする必要がある、利便性が低下する。以上より、動作波長 190 nm ~ 200 nm 程度の短パルス深紫外レーザーが、蛋白質結晶の加工に特に適した光源と判断することができる。

2.2 装置構成

蛋白質結晶加工の実験装置構成を図 1 に示す。使用したレーザーは、著者らが開発した動作波長 193 nm の深紫外

図 1 蛋白質結晶加工の実験装置構成。(Experimental setup for processing protein crystals.)

表 1 評価した蛋白質結晶の分子量と含水率。(A molecular weight and a solvent content of the examined protein crystals.)

	Molecular weight (kDa)	Solvent content (%)
HEWL	14	39
HL	15	38
GI	173	56
PEPC	400	60

固体レーザーである。⁸⁾ 光リソグラフィーや角膜屈折矯正手術用の光源として、動作波長 193 nm の ArF エキシマレーザーが使用されているが、本固体レーザーは、ArF エキシマレーザーと比較して、パルス時間幅が 1 桁短く、パルス繰り返し周波数の可変性が高いという特徴を有している。レーザーからの出力光は、メカニカルシャッターを通過した後、集光レンズを用いてサンプルに照射した。レーザー光の照射条件は、パルス繰り返し周波数 1 kHz、パルス幅約 1 ns、スポット直径 25 μ m である。モデル蛋白質として、HEWL、ヒトリゾチーム (human lysozyme : HL)、グルコースイソメラーゼ (glucose isomerase : GI)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (phosphoenolpyruvate carboxylase : PEPC) の 4 種類の蛋白質を選び、蒸気拡散法によって各蛋白質の単結晶を育成した。参考のため、上記蛋白質の分子量と、計算により求めた結晶中の含水率を表 1 に示す。⁹⁾ 蛋白質結晶の入った育成容器は、2 軸並進移動可能なステージ上に配置されており、結晶周囲の余分な溶液は加工直前に取り除き、結晶が乾燥しないようにカバーガラスで密閉した。レーザー照射中は継続的にステージを移動して照射位置を変化させ、所望の部位を PULSA 加工により除去した。

2.3 加工結果

各結晶に対して、レーザー照射によって結晶の一部分を除去する加工を行ったところ、いずれの結晶においても、損傷や変性を引き起こすことなく加工を実施できることが確かめられた。実験結果の一例として、図 2 および図 3 に HEWL 結晶、図 4 に PEPC 結晶を加工したときの結晶写真を示す。各図において、左側がレーザー照射前、右側がレーザー照射後の結晶を表している。図 2 は合計約 5×10^4 ショットのレーザーパルスを照射することにより、HEWL 結晶を 2 つに切断したものである。未照射部位に変性やクラックなどの損傷は観測されなかった。図 3 では、約 1×10^6 ショットの照射によって、HEWL 結晶の中央に矩形状の穿孔加工を行った。このような加工形態は従来の機械的な加工ツールでは達成がきわめて困難であるが、短パルス深紫外レーザー光を用いると、劈開などの問題を引き起こすことなく、容易に加工が達成できた。図 4 は、4 種類の結晶の中で最も機械的操作が難しい PEPC 結晶に対して、約 1×10^6 ショットの照射により、レーザーアブレーションを行った結果である。一般に、含水率が高い蛋白質結晶は、育成および加工操作が難しい傾向がある。表 1 に示した含水率の値からも予測できるが、PEPC 結晶は、蛋白質結晶の中でも特に軟らかい結晶に分類される。メスによる機械的手法を用いて PEPC 結晶の加工を試みたが、破損させずに所望の加工を達成することはきわめて困難であった。しかしながら、PULSA 加工では、顕著な損傷を与えることなく PEPC 結晶をアブレーションすることに成功した。

図2 レーザー照射によって2つに切断したHEWL結晶.
(Photographs of a HEWL crystal cut by laser irradiation.) (a) レーザー照射前. (b) レーザー照射後.

図3 レーザー照射によって穿孔加工したHEWL結晶.
(Photographs of a HEWL crystal holed by laser irradiation.) (a) レーザー照射前. (b) レーザー照射後.

図4 レーザー照射によって整形されたPEPC結晶.
(Photographs of a PEPC crystal reshaped by laser irradiation.) (a) レーザー照射前. (b) レーザー照射後.

上記の各結晶に対する実験は、照射した合計パルス数を除き、すべて同一のレーザー照射条件で行ったものである。本稿で扱った複数の蛋白質結晶は、分子量や含水率などの特性が異なっているが、いずれの結晶においてもレーザーアブレーションの結果は類似しており、同一フルエンスにおけるアブレーションレート（1パルス当たりのエッチング量）は同程度であった。結晶ごとに適切なレーザー照射条件を微調整する必要はないという点は、実用的な視点に立ったときに大きな利点となる。

図1と同様の装置構成に基づき、波長193 nm以外の紫外レーザーを用いた場合のHEWL質結晶の加工特性についても評価したが、得られた結果は193 nm光照射の場合とは大きく異なるものであった。加工用光源としてナノ秒パルスNd:YAGレーザーの第3高調波（波長355 nm）および第4高調波（波長266 nm）を用い、パルス繰り返し周波数およびスポット径は193 nm光照射の場合と同じと

した。吸収がきわめて微弱な355 nm光を用いた場合は、熱変性を含む損傷が発生するだけで、実質的にアブレーションを行うことはできなかった。266 nm光を用いた場合は、アブレーションは可能であるが、損傷を伴うものであることがわかった。これらの比較実験より、紫外域でも波長のより短い193 nmレーザー光による加工が、蛋白質結晶に対して好適であることが確かめられた。

3. X線回折測定による結晶性評価

蛋白質結晶育成の目的は構造解析であり、レーザー加工を施した結晶がX線構造解析に耐え得る品質でなければ意味がない。図2bに示した加工後のHEWL結晶について、レーザー照射から2時間放置後に、室温にてX線回折パターンを測定した。X線発生器として理学電機社製ultraX18（電圧50 kV、電流100 mA）、検出器としてRAX-IS IV++を用いた。結晶と検出器の距離は150 mm、振動角度は2度とし、測定時間は30分/2度とした。X線ビーム径は0.3 mmに設定してレーザー切断面も含むようにした。得られた回折パターンの分解能は1.9 Åであり、十分な結晶品質を有していることがわかった。これは、同一条件で育成したレーザー未照射の卵白リゾチーム結晶から得られた回折分解能と同じであり、レーザー加工による結晶性への重大な悪影響はないことが実証された。同様に、加工したPEPC結晶についてX線回折測定を行ったところ、十分な回折分解能が得られることを確かめた。

次に、本技術の利点を活かした実践的な応用を述べる。通常蛋白質結晶は、ループやキャピラリといった測定用の治具に移してX線構造解析装置にマウントされる。しかしながら、先述のとおり、蛋白質結晶は育成および操作が難しいため、育成当初より存在していた欠陥に加え、移管操作時に新たに発生する損傷も加わり、X線構造解析装置にマウントされた結晶は、明らかに結晶品質が悪い部位を含むことがある。このような場合、結晶品質が高いと思われる箇所に限定してX線を照射する措置をとることが多いが、損傷の場所によっては対応できないことがある。原理的に優れている対処法は、損傷部位を除去してから測定することであるが、従来の加工ツールで処置をすることは非現実的であった。しかしながら、PULSA加工では非接触な加工という特徴により、治具に結晶をセットしたまま所望の加工を実現することができる。

図5aに示したHEWL結晶は、ガラスキャピラリにセットされたものであるが、上部にクラックが存在している。図5bに模式的にイラストでその状態を示した。X線ビーム径0.4 mmで本結晶のX線回折パターンを測定した結果が図5cである。明らかに滲んだパターンとなっており、詳細な構造解析には不適である。そこで、キャピラリ中の結晶に対して193 nmレーザー光を照射して損傷部位を削除した。加工後の結晶写真を図6aに示す。図6bにイラスト

図5 ガラスキャピラリ中の損傷したHEWL結晶と得られた回折パターン。(Photograph, corresponding illustration and obtained diffraction pattern of a damaged HEWL crystal sealed in a glass capillary.) (a) 結晶写真. (b) イラスト. (c) X線回折パターン.

図6 レーザー照射によって損傷部を除去したHEWL結晶とその回折パターン。(Photograph, corresponding illustration and obtained diffraction pattern of a laser-irradiated HEWL crystal.) (a) 結晶写真. (b) イラスト. (c) X線回折パターン.

トでも示しているが、損傷部はレーザー照射によって完全に除去されている。この状態で再度X線回折パターンを加工前と同一条件で測定したところ、図6cに示すように、加工前と比べてはるかに綺麗な回折パターンが得られた。本結果は、従来技術では高精度の測定が難しかったサンプルに対して、レーザー加工を施すことで、より精密な構造解析を行える可能性を示している。

4. おわりに

本稿では、蛋白質結晶のX線構造解析研究において、これまであまり注力されなかった結晶の加工技術について、短パルス深紫外レーザーを用いた光ソフトプロセッシングの有用性を述べた。レーザー照射条件を制御することにより、低損傷で再現性よく結晶を加工することに成功した。深紫外レーザー光は容易に1 μm 程度のスポット径に集光できるため、シンクロトン放射光を用いて測定するときの小さな結晶サンプルなどに対しても、有効な加工を施すことが可能である。また、X線構造解析装置に近接してレーザーを設置することにより、回折データの結果を見て、その場でレーザー加工を行うこともできる。

蛋白質の立体構造情報に基づく今日の構造生物学は、学術的な興味だけでなく、ゲノム創薬をはじめとする実用面へのさまざまな波及効果が期待されている。そのなかで、蛋白質の結晶化から回折データの収集に至るまでのプロセスは、いまだに大きなボトルネックになっていると言えよう。より迅速に大量の蛋白質を構造解析するべく、結晶化条件を大規模にスクリーニングするロボットの開発、結晶の移管からデータ収集までを自動化する技術の開発、さらには構造解析ソフトウェアの改良などが精力的に進められている。装置化および自動化に適したレーザー加工技術は、ハイスループットが求められている今日の蛋白質構造解析の潮流に合致している。著者らの進めている「創晶プロジェクト」では、結晶加工技術だけでなく、蛋白質の結晶化にかかわるさまざまな新規技術の開発にも取り組んでいる¹⁰⁾⁻¹³⁾。工学技術を駆使した新しいアプローチが、構造ゲノム科学の進歩に少しでも貢献できることを願いたい。

謝 辞

ここで報告した研究は、大阪大学大学院工学研究科物質・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の支援と協力をいただき、得られた結果であります。また、(株)ニコン・コアテクノロジーセンターの土肥正明氏らとの共同研究による成果であります。さらに、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)、財団法人新世代研究所、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) M. Tachibana, Y. Kobayashi, T. Shimazu, M. Ataka and K. Kojima: *J. Cryst. Growth* **198/199**, 661 (1999).
- 2) H. Kitano, H. Adachi, A. Murakami, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, S. Owa and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, L73 (2004).

- 3) H. Kitano, H. Adachi, A. Murakami, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, S. Owa and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, L297 (2004).
- 4) A. Murakami, H. Kitano, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, L873 (2004).
- 5) 電気学会編: レーザアブレーションとその応用 (コロナ社, 1999).
- 6) A. R. Goldfarb, L. J. Saidel and E. Mosovich: *J. Biol. Chem.* **193**, 397 (1951).
- 7) M. M. Mayer and J. A. Miller: *Anal. Biochem.* **36**, 91 (1970).
- 8) H. Kitano, H. Kawai, K. Muramatsu, S. Owa, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42**, L166 (2003).
- 9) B. M. Matthews: *J. Mol. Biol.* **33**, 491 (1968).
- 10) 安達宏昭, 高野和文, 松村浩由, 井上 豪, 森 勇介, 佐々木孝友: 日本結晶学会誌 **46**, 238 (2004).
- 11) 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).
- 12) H. Adachi, T. Watanabe, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **41**, L726 (2002).
- 13) H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **41**, L1025 (2002).

プロフィール

北野博史 Hiroshi KITANO
 (株)ニコン・コアテクノロジーセンター
 Core Technology Center, Nikon Corporation
 〒140-8601 東京都品川区西大井 1-6-3
 1-6-3 Nishi-ohi, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8601, Japan
 e-mail: hiroshi. kitano@nikon.co.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: 固体レーザー技術
 現在の研究テーマ: 深紫外固体レーザーの開発とその応用

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

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

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

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