

## 短パルスレーザーを用いた蛋白質の結晶化

安達 宏昭<sup>1,2,3</sup>, 細川 陽一郎<sup>1,2,3</sup>, 増原 宏<sup>1,2,3</sup>,  
吉村 政志<sup>1,2,3</sup>, 森 勇介<sup>1,2,3</sup>, 佐々木 孝友<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院 工学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

<sup>2</sup>大阪大学 ベンチャービジネスラボラトリー (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

<sup>3</sup>科学技術振興機構(JST) CREST (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

### Protein Crystallization Using Short Pulse Laser

Hiroaki ADACHI,<sup>1,2,3</sup> Youichiro HOSOKAWA,<sup>1,2,3</sup> Hiroshi MASUHARA,<sup>1,2,3</sup>  
Masashi YOSHIMURA,<sup>1,2,3</sup> Yusuke MORI,<sup>1,2,3</sup> and Takatomo SASAKI<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

<sup>2</sup>Venture Business Laboratory, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

<sup>3</sup>JST-CREST, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

(Received September 3, 2003)

We investigated an effect of short pulse laser irradiation on protein crystallization in supersaturated solution. Effective crystallization of a protein molecule was confirmed by applying a femtosecond laser. We call this process laser irradiated growth technique (LIGHT). Protein crystals were obtained by LIGHT from normally uncrystallized conditions. Experimental results indicate that protein nucleation depends on the laser-irradiated conditions, and thus we must optimize the laser condition to obtain high-quality protein crystals. The crystallization will be promoted by nonlinear phenomena of the femtosecond laser. However, the mechanism is not clear. The challenge is to investigate what really happened.

**Key Words:** Protein molecule, Crystallization, Short pulse, Femtosecond laser, Supersaturated solution

#### 1. はじめに

生体組織は特定の分子, 分子集合体, 細胞が特定の配置をすることによって形成されている。それらが階層構造を有することで, 生体組織は優れた機能を発現している。その中で最小単位となり, かつ最も重要な役割を果たすのが, 蛋白質分子をクラスター化した蛋白モジュールと呼ばれるユニットである<sup>1)</sup>。例えば, 蛋白質分子が3次元的に規則正しく整列した蛋白質結晶は, 蛋白モジュールの一つである。つまり, 蛋白質の結晶化は, 蛋白質分子の自己組織化の一形態であると言える。自己組織化は, 生体内では蛋白質分子レベルから細胞レベルまでの広い範囲で, 当然のごとく実現されているが, 人工的には未だ確立されていない技術である。自己組織化のメカニズム解明は, 生体の多様な機能発現の理解, さらに, 生命現象そのものの解明につながる。また, 自己組織化を人工的に制御・誘導することができれば, 任意の複雑な構造も自由に造ることができ, 生体組織の人工的構築にもつながる。

我々は, これら課題に対して, レーザープロセッシング

技術を用いた研究を展開している。本論文では, 我々が開発した超短パルスレーザーを用いた結晶化技術をご紹介します。

#### 2. 蛋白質の結晶化

蛋白質は, 分子構造が巨大, かつ複雑であり, 多種のコンフォメーションを取り得る。また, 分子間の相互作用が非常に弱く, 分子間に多くの水分子(蛋白質分子と結合している結合水や結晶内を自由に移動できる自由水がある)が占有していることもあり, 蛋白質の結晶化は極めて困難である<sup>2-4)</sup>。しかしながら, 生命科学研究において, 蛋白質の詳細な立体構造決定が不可欠となっており, 蛋白質の結晶化が求められている。何故なら, 高品質な単結晶が得られると, X線結晶構造解析ができるからである。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, その研究において, 蛋白質の結晶化が隘路となっている<sup>5)</sup>。

現在の蛋白質結晶化では, 主に構造解析の専門家による経験と, 無機や有機低分子化合物を題材として発展し

てきた結晶成長の専門家による理論や概念が組み合わさった方法が用いられている。つまり、貴重かつ微量の蛋白質試料から、未知の結晶化条件を探索するため、多種の沈殿剤溶液を用いたスクリーニングを行う。この方法では、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、数週間から数ヶ月、蛋白質結晶が出来るのを待つ。つまり、パッシブな結晶化方法である。結晶化に至らない場合は、スクリーニング範囲をさらに広げ、その数は、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関わらず、結晶が得られないときがある。そのため、より速く、確実に蛋白質を結晶化させるアクティブな技術の開発が必要である。我々は、結晶工学的見地に基づく蛋白質結晶の新しい育成技術を幾つか開発している<sup>6-11)</sup>。特に、結晶化に関する技術は、短パルスレーザーを用いたレーザープロセッシング技術であり、新しい現象の可能性がある<sup>12)</sup>。

### 3. 過飽和溶液中へのナノ秒レーザー照射

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、溶媒蒸発や温度変化などにより過飽和度を高くする必要がある。蛋白質は準安定領域(過飽和状態にあるが、自然核成長が起こらない領域。ただし、種結晶が溶液中にあれば、成長する)が大きいため、過飽和度を極めて高くしないと結晶化には至らない。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、また、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、結晶化する温度や析出時期にも、大きなばらつきがあり、不確定である。そのため、より低過飽和の溶液内で、強制的に結晶化させることができれば、高品質な結晶を育成することが可能となる。また、結晶化の制御は、結晶育成の再現性を向上させることにもつながる。

結晶化は、蛋白質分子集合体(クラスター)の大きさが、臨界核半径を越えることで始まる。つまり、低過飽和溶液中で結晶を析出させるためには、蛋白質分子の自己組織化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、蛋白質のクラスターが臨界核半径を越える確率は極めて低いため、通常、結晶化は起こらない。核発生を強制的に引き起こすため、溶液への機械的衝撃などのトリガーが不可欠となる。そこで、短パルスレーザーを低過飽和溶液に集光することにより刺激(摂動)を与え、結晶核を生成し、結晶化させることを検討した。有機物を対象としたナノ秒Nd:YAGレーザーによる結晶核生成は、これまでに報告されているため<sup>13,14)</sup>、蛋白質分子への適応を検討した。

そこで、短パルスレーザーとして、ナノ秒Nd:YAGレーザーを用いて実験を行った。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まで可変できる。蛋白質溶液として、ニワトリ卵白リゾチームを使用した。ニワトリ卵白リゾチームは安価で市販品を購入できることから、様々な研究領域でモデル蛋

白質として使用されている。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既に報告されている<sup>15-18)</sup>。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、pH4.5の0.1 M酢酸緩衝溶液の中に、6回再結晶したニワトリ卵白リゾチーム(生化学工業製: Rot E99201)25 mg/mlと塩化ナトリウム25 mg/mlを混合することで作製した。酸性環境下の低温(298 K以下)におけるニワトリ卵白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23.8°Cであると考えられる<sup>18)</sup>。

光学実験系をFig. 1に示す。蛋白質溶液をネジ付試験管に入れ、冷却機能を有する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、集光照射した。レーザー強度は1.2 mJ/pulseであり、照射時間は1分とした。

レーザー照射後の変化を観察したが、いずれの蛋白質溶液においても、結晶化が確認できなかった。また、照射時間を長くして、過度にレーザーを照射した場合や、更に過飽和度を高くした(溶液温度を下げた)場合においても、蛋白質の変性などの状態変化すら観測できなかった。つまり、過飽和蛋白質溶液におけるナノ秒パルスレーザー照射の効果は確認できなかった。

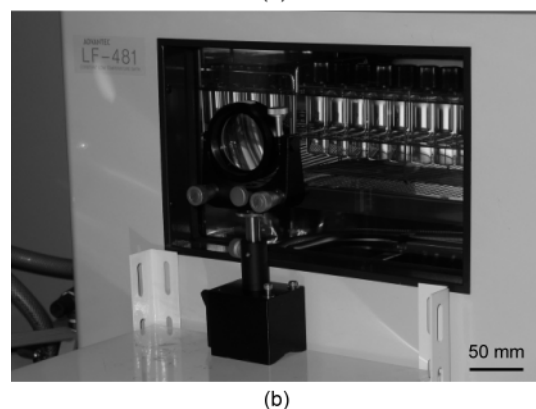
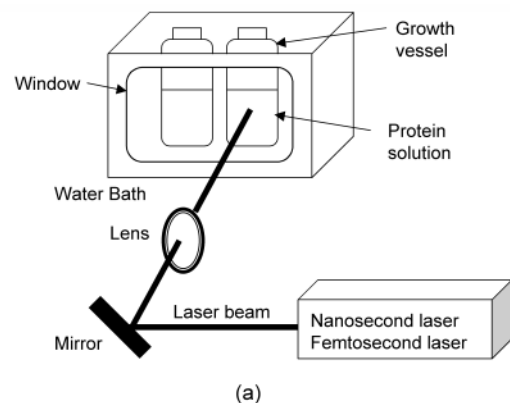


Fig. 1 Experimental setup for nanosecond or femtosecond laser irradiation.

#### 4. 過飽和溶液中へのフェムト秒レーザー照射

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されているが、蛋白質においては、その効果は観測できなかった。有機分子よりも、はるかに結晶化しにくい蛋白質では、極めて強い刺激が必要であると考えられる。そこで、超短パルスレーザーであるフェムト秒レーザーを用いて、同様の実験を行った。前節と同じ条件のニワトリ卵白リゾチーム溶液を準備し、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であり、繰り返し周波数は20~1000 Hzまで可変できる。

フェムト秒レーザーをニワトリ卵白リゾチーム溶液(温度287 K)に1分間照射して、その変化を観察した。繰り返し周波数と析出状態の変化をTable 1にまとめた。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は、結晶の析出が観測されなかった。しかしながら、繰り返し周波数が50 Hz、100 Hzにおいては、蛋白質結晶の析出が見られ、1日後には肉眼で確認できる大きさ(100 μm程度)まで成長した。結晶析出数は、数個から数10個程度と多かった。また、500 Hz、1000 Hzの高い周波数においては、レーザー照射と同時にニワトリ卵白リゾチームが変性し、凝集体が形成されていた。蛋白質の結晶化は、レーザー照射条件に依存しており、自己組織化を制御・誘導するには、その最適化が必要である。

レーザーの励起波長である800 nmにおいて、ニワトリ卵白リゾチームは吸収を持たない。しかしながら、先とう値がギガワットに達する高出力フェムト秒レーザーを集光することで、多光子吸収によるレーザーアブレーションが誘起されると考えられる。溶液のレーザーアブレーションを誘起した場合、熱的な効果が抑制されて衝撃波が生成される可能性が示されている<sup>19-21)</sup>。そのため、本実験で観測された結晶化は、この衝撃波がきっかけとなり生じた可能性がある。また、レーザーによる爆発現象が起こるためのレーザー強度が照射回数増加により減少する現象(インキュベーション効果)が知られている<sup>22)</sup>。つまり、照射回数増加により、結晶核生成に必要なレーザーパルスの光密度やレーザー強度が減少することも考えられる。さらに、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た可能性や<sup>13,23,24)</sup>、光化学反応によるクラスター化が起こる可能性もある<sup>25)</sup>。蛋白質結晶核の発生は、これらの効果によるものと考えられるが、その詳細は不明である。現在、そのメカニズム解明に向け、鋭意検討中である。

Table 1 Experimental result of hen egg-white lysozyme crystallization by femtosecond laser irradiation at 287 K.

Laser frequency (Hz)	No irradiation	20	50	100	500	1000
Effect	No	No	Crystallized	Crystallized	Denatured	Denatured

#### 5. レーザーを用いた蛋白質結晶化

我々は、フェムト秒レーザーを蛋白質の過飽和溶液に集光照射することで、結晶核が生成することをニワトリ卵白リゾチームにて発見した。このレーザーによる蛋白質結晶化技術をLIGHT (Laser Irradiated Growth Technique) と名づけた。ニワトリ卵白リゾチームは、ミリリットルオーダーの大量溶液を準備することが可能であるが、一般には、極微量の蛋白質溶液しか入手できない。そのため、微量のサンプルにおいても、レーザーが照射できる光学系を倒立顕微鏡下で構築した(Fig. 2)。レーザー波長は780 nm、パルス幅は200 fs、繰り返し周波数は1 kHzであり、対物レンズは×10を使用した。さらに、レーザーを照射できる蛋白質結晶化プレート(サイボックス製)を開発した(Fig. 3)。本プレートは、育成溶液を入れる底面部分がガラスでできており、レーザーを下面方向から効率よく照射可能である。また、蛋白質の結晶育成において、主に用いられている蒸気拡散法に対応し、かつ、マイクロリットルオーダーの微量溶液による蛋白質の結晶化が可能となった。そこで、LIGHTが他の蛋白質においても、有効であるかどうかを検証した。そ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

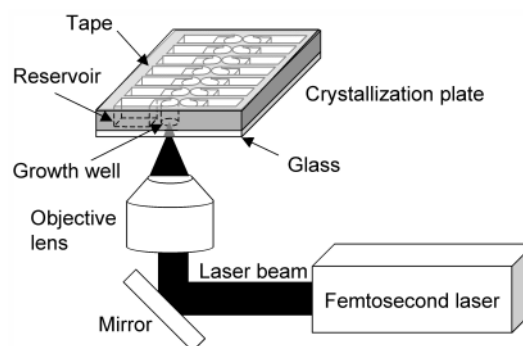


Fig. 2 Experimental setup for femtosecond laser irradiation using a microscope.

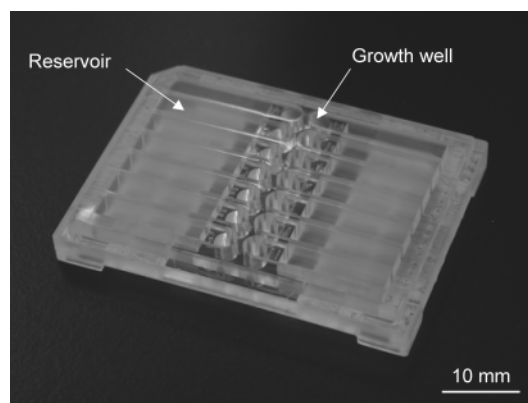


Fig. 3 Photograph of the protein crystallization plate (Cybox, Japan) with dimensions of 47 × 35 × 5 mm<sup>3</sup>. The plate enables us to irradiate a laser beam and apply a small amount of sample solution for sitting-drop vapor diffusion.

も14 kDaと比較的小さい<sup>26)</sup>。そこで、分子量がその10倍以上となる巨大蛋白質分子であるグルコースイソメラーゼ(173 kDa:4量体)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。グルコースイソメラーゼは、ブドウ糖をより甘味度の高い果糖に変換する能力を持つ微生物由来の酵素である。結晶育成溶液は、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)の中に、5回再結晶したグルコースイソメラーゼ(Hampton Research製)20 mg/mlを混合することで作製した<sup>27)</sup>。外液には、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)を使用した。

フェムト秒レーザー照射は、室温にて行い、蛋白質溶液内に集光した。レーザー光強度は、波長板と偏光子により調節し、本実験におけるレーザーのパルス強度は1.95 nJ/pulseであった。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整し、8パルス(1/125秒)と照射なし(0秒)とした。レーザー照射後は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観察した。レーザー照射1日後には、結晶の析出を確認できた。その後も結晶核が増加する(自然核成長が発生することなく、レーザーで生成した結晶のみが成長した(Fig. 4)。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ヶ月経っても確認できなかった(Fig. 4に確認できる析出物はポリエチレングリコールの沈殿であり、蛋白質の結晶ではない)。再現性を確認するために、この実験を3回行ったが、同様の結果が得られた。

この結果は、蛋白質の結晶化には、通常極めて高い過飽和度を必要とするが、低過飽和溶液においても、溶液中に結晶核を生成することができれば、蛋白質結晶は成長するということを意味している。これは、準安定領域

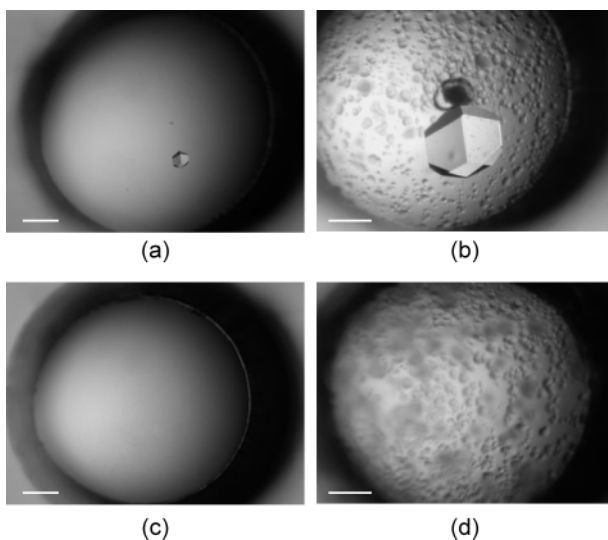


Fig. 4 Comparison of the glucose isomerase crystallization results from sitting-drop vapor-diffusion experiments at 291K. A glucose isomerase crystal was obtained by LIGHT from normally uncrystallized conditions. (a) Laser irradiation, day 1. (b) Laser irradiation, day 7. (c) Without laser irradiation, day 1. (d) Without laser irradiation, day 7. The scale bar represents 500  $\mu\text{m}$ .

にある溶液内に種結晶を導入し、結晶育成する手法と同義である。しかしながら、未だ結晶化がなされていない蛋白質においては、当然ながら種結晶を入手できない。つまり、LIGHTを用いることで、従来は結晶化に至らない過飽和度の溶液においても、結晶化を実現できる可能性がある。その結果、蛋白質結晶化の成功確率を向上することができる。LIGHTは蛋白質結晶化のきっかけを与え、分子が3次的に整列した結晶を作製、つまり外部からの操作により、自己組織化を制御・誘導する手法の一つとして有力である。

## 6. まとめ

本論文では、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結晶化技術、もしくは自己組織化制御技術であるLaser Irradiated Growth Technique (LIGHT)を紹介した。LIGHTは、国際競争が激化しているプロテオームと呼ばれるポストゲノム研究において、ボトルネックの一つである蛋白質の結晶化を、加速させる技術である。それは、低過飽和蛋白質溶液にレーザーを集光照射し、それを摂動として結晶核を生成することで、X線構造解析に不可欠な蛋白質結晶を育成するものである。ただし、そのメカニズムは不明であり、新しい現象の可能性が指摘されていることから、これら課題解決に対して挑戦していく。そして、LIGHTが自己組織化を人工的に制御・誘導する技術へと発展していくことを願う。

## 謝辞

本論文で紹介した研究は、大阪大学大学院工学研究科の高野 和文博士、松村 浩由博士、井上 豪博士の支援と協力をいただき、得られた結果である。この場を借りて、感謝の意を表したい。

## 参考文献

- 1) 徳永 史生, 濱田 格雄, 細川 陽一郎, 中村 亮介, 安達 宏昭, 兼松 泰男, 森 勇介, 佐々木 孝友, 増原 宏: 化学工業54 (2003) 358.
- 2) A. McPherson: *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1999)
- 3) T. Bergfors: *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips*, International University Line, California (1999)
- 4) T. M. Bergfors: *Protein Crystallization*, International University Line, California (1999)
- 5) N. E. Chayen: *Trends Biotech.* **20** (2002) 98.
- 6) H. Adachi, T. Watanabe, M. Yoshimura, Y. Mori, and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **41** (2002) L726.
- 7) H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori, and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **41** (2002) L1025.
- 8) H. Adachi, K. Takano, M. Morikawa, S. Kanaya, M. Yoshimura, Y. Mori, and T. Sasaki: *Acta Crystallogr.* **D59** (2003) 194.
- 9) H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori, and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) L314.
- 10) H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori, and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) L384.
- 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** (2003) L798.
- 12) D. W. Oxtoby: *Nature* **420** (2002) 277.
- 13) B. A. Garetz, J. E. Aber, N. L. Goddard, R. G. Young, and A. S. Myerson: *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3475.
- 14) F. Tsunesada, T. Iwai, T. Watanabe, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori, and T. Sasaki: *J. Cryst. Growth* **237-239** (2002) 2104.
- 15) M. Ataka and M. Asai: *J. Cryst. Growth* **90** (1988) 86.
- 16) S. B. Howard, P. J. Twigg, J. K. Baird, and E. J. Meehan: *J. Cryst. Growth* **90** (1988) 94.
- 17) E. Cacioppo and M. L. Pusey: *J. Cryst. Growth* **114** (1991) 286.
- 18) G. Sazaki, K. Kurihara, T. Nakada, S. Miyashita, and H. Komatsu: *J. Cryst. Growth* **169** (1996) 355.
- 19) Y. Hosokawa, M. Yashiro, T. Asahi, H. Fukumura, and H. Masuhara: *Appl. Surf. Science* **154-155** (2000) 192.
- 20) Y. Hosokawa, M. Yashiro, T. Asahi, and H. Masuhara: *J. Photochem. Photobio.* **142** (2001) 197.
- 21) Y. Hosokawa, T. Mito, T. Tada, T. Tanaka, T. Asahi, and H. Masuhara: *Proc. SPIE* **4426** (2002) 113.
- 22) S. Preuss, M. Spath, Y. Zhang, and M. Stuke: *Appl. Phys. Lett.* **62** (1993) 3049.
- 23) P. Borowicz, J. Hotta, K. Sasaki, and H. Masuhara: *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 1896.
- 24) S. Masuo, H. Yoshikawa, T. Asahi, and H. Masuhara: *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 905.
- 25) A. Tam, G. Moe, and W. Happer: *Phys. Rev. Lett.* **35** (1975) 1630.
- 26) G. Alderton and H.L. Fevold: *J. Biol. Chem.* **164** (1946) 19.
- 27) H. L. Carrell, J. P. Glusker, V. Burger, F. Manfre, D. Tritsch, and J. F. Biellmann: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** (1989) 4440.