



レーザーを用いたタンパク質結晶化・加工技術の開発

タンパク質の立体構造解析に貢献する新しい高品質結晶生成方法

高野 和文

大阪大学大学院 工学研究科
准教授

研究の背景

タンパク質の構造解情報からの機能解明が病気の治療や創薬に役立つことから、構造ゲノム科学と呼ばれるタンパク質の立体構造を解き明かす研究が盛んになっており、詳細なタンパク質立体構造決定の国際競争が始まっている。タンパク質の立体構造を精密に決定するには、高品質タンパク質結晶を用いたX線結晶構造解析法が最も有効な手段であるが、タンパク質高品質結晶化の成功率が非常に低いことが3次元立体構造解析のボトルネックとなっている。また、これまでタンパク質結晶の加工には、メスなどを用いた手動操作による機械的な加工が行われてきたが、高度な技術を要する他、再現性や成功確率が非常に低い操作であるため、画期的な加工技術の開発が望まれていた。

研究の成果

1. フェムト秒レーザー照射によるタンパク質結晶核形成

タンパク質溶液へのフェムト秒レーザー照射が、効果的にタンパク質結晶核を発生させることを発見した(図1) [1]。この発見により、従来法では結晶核発生確率がゼロの条件においても結晶核発生が可能になることによる結晶化成功率の飛躍的な向上、および結晶核発生を結晶成長に適した溶液条件で行うことによる結晶の高品質化が実現した。そして、従来法では高品質結晶化が不可能であった難結晶化タンパク質についても、本技術により高品質

結晶化が実現できるため、X線結晶構造解析法による3次元立体構造解析が可能となった[2]。本結晶化技術は、我々が設立した大学発ベンチャーである(株)創晶で実用化され、既に製薬企業などから多くの難結晶化タンパク質などの結晶化を受託し、結晶化・高品質化に成功し、生命科学の進展、病気の治療や創薬に貢献している。

このフェムト秒レーザー照射によるタンパク質結晶核形成という現象は、これまでの常識とは異なる全く新しい原理・現象を利用しているため、その現象メカニズムは総じて未知であったが、最近では、この現象の原理解明を進め、そのメカニズムが明らかになってきた(図2) [3, 4]。簡潔に記述すると、タンパク質溶液中に照射されたフェムト秒レーザーによるキャビテーション(空孔)が、瞬時に膨張・収縮し、一時的・局所的にタンパク質の高濃度領域を作製し、結晶核が形成される。

2. 全固体紫外レーザーによるタンパク質結晶加工

全固体紫外レーザーによるタンパク質結晶加工技術を開発し、構造解析の精度向

上に成功した[5, 6]。このレーザー加工技術により、タンパク質結晶を低損傷で任意の形状に加工することが可能になった(図3、図4)。

レーザー加工技術として、レーザーアブレーションが普及しているが、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

図1 フェムト秒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

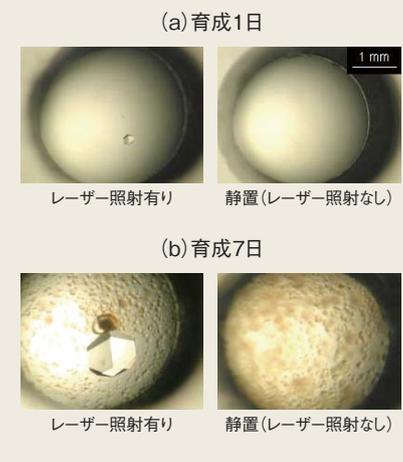


図2 フェムト秒レーザー照射による結晶形成メカニズム

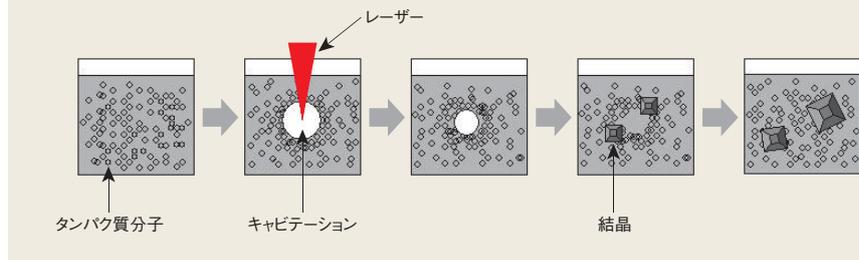


図3 タンパク質結晶のレーザー加工

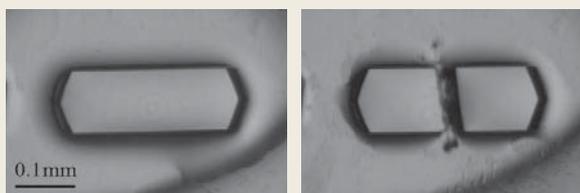


図4 凍結タンパク質結晶のレーザー加工



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タンパク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ため、生体系材料の加工において都合が良いと考えられる。また、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。タンパク質は波長300 nm以下の紫外光を吸収し、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持つ。したがって、動作波長190 nm~200 nm程度の短パルス深紫外レーザーが、タンパク質結晶の加工に特に適した光源と判断することができ、本研究で開発した動作波長193 nmの深紫外固体レーザーによるタン

パク質結晶加工技術は、結晶に損傷や変性を引き起こすことなく加工を実施できる。

将来の展望

タンパク質の結晶化や結晶加工の分野に、初めてレーザーを導入することで、新しい効果的な技術の開発に至ることができた。レーザー加工技術においては、より簡便な手法の開発も進めており、最近では、ゲル中で結晶化した結晶での加工がより実用的であることを報告した。引き続き、より良い技術へと進化するよう取り組んでいる。また、レーザー結晶化技術では、原理解明を進めた結果、現在の技術での限界と新展開の方向性も見えてきた。例えば、タンパク質の結晶核発生では、タンパク質分子をどこまで高濃度圧縮できるのかが本

質的なポイントとなるが、キャビテーション表面での高濃度化では限界がある。そこで、レーザーとゲルを利用して、平衡状態では実現できない高濃度圧縮を達成し結晶化を誘起する全く新しい結晶化手法の開発も進めている。

以上のように、本研究成果は、エレクトロニクス技術の構造生物学分野や創薬分野への新しい応用を見出すとともに、タンパク質の結晶構造解析に役立てられることにより、生命現象の解明という基礎分野から、医療・創薬などの応用分野に至るまで、ライフサイエンスに関する広い領域に大きく貢献することが期待されている。

本研究は、阪大創晶プロジェクトを中心とした多くの共同研究者との共同研究に基づいており、ここに深く感謝いたします。

References(参考文献)

- [1] Adachi H, Takano K, Hosokawa Y, Inoue T, Mori Y, Matsumura H, Yoshimura M, Tsunaka Y, Morikawa M, Kanaya S, Masuhara H, Kai Y, Sasaki T. (2003) Laser irradiated growth of protein crystal, *Jpn J Appl Phys.* 42, L798-L800.
- [2] Numata T, Ikeuchi Y, Fukai S, Adachi H, Matsumura H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Mori Y, Sasaki T, Suauki T, Nureki O. (2006) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tRNA thiolation enzyme MnmA from *Escherichia coli* complexed with tRNA^{Glu}, *Acta Cryst.* F62, 368-371.
- [3] Yoshikawa HY, Murai R, Sugiyama S, Sasaki G, Kitatani T, Takahashi Y, Adachi H, Matsumura H, Murakami S, Inoue T, Takano K, Mori Y. (2009) Femtosecond laser-induced nucleation of protein in agarose gel. *J. Cryst. Growth*, 311, 956-959.
- [4] Murai R, Yoshikawa HY, Takahashi Y, Maruyama M, Sugiyama S, Sasaki G, Adachi H, Takano K, Matsumura H, Murakami S, Inoue T, Mori Y. (2010) Enhancement of femtosecond laser-induced nucleation of protein in a gel solution. *Appl. Phys. Lett.* 96, 043702.
- [5] Kitano H, Adachi H, Murakami A, Matsumura H, Takano K, Inoue T, Mori Y, Owa S, Sasaki T. (2004) Protein crystal processing using a deep-UV laser, *Jpn J Appl Phys.* 43, L73-L75.
- [6] Kitano H, Matsumura H, Adachi H, Murakami S, Takano K, Inoue T, Mori Y, Doi M, Sasaki T. (2005) Protein cryocrystallography using laser-processed crystal, *Jpn J Appl Phys.* 44, L54-L56.