

平成 28 年 10 月 21 日  
国立大学法人 埼玉大学  
国立大学法人 大阪大学  
公立大学法人 横浜市立大学  
国立大学法人 東北大学金属材料研究所  
株式会社創晶

## “壊すことで大きくする”革新的なタンパク質結晶育成法を開発 ～様々なタンパク質の機能解明に期待～

### 研究成果のポイント

1. レーザーによって結晶を局所的に壊すことで結晶を大きくするという、従来法とは根本的に異なる革新的なタンパク質結晶育成法を開発した。
2. 本研究成果は、タンパク質の大型結晶作製とそれを利用したタンパク質分子構造の解明に貢献し、様々な生命現象のメカニズム解明に繋がることを期待できる。

埼玉大学 吉川洋史准教授、大阪大学 丸山美帆子元特任助教（現京都府立大学特任講師および北海道大学低温科学研究所研究員）、森勇介教授、横浜市立大学 橋勝教授、東北大学金属材料研究所 小泉晴比古助教、株式会社創晶らの共同研究グループは、レーザーによる破壊プロセスを用いた、大型タンパク質結晶育成の革新的技術を開発しました。

タンパク質は様々な生命現象を支える重要な物質であり、タンパク質の分子構造はその機能を調べる上で必要不可欠な情報です。一般的に、タンパク質の分子構造を知るためには、まず大きい単結晶（数十マイクロン以上）を作製し、X線や中性子線により解析します。しかし、タンパク質は結晶成長の駆動力が弱く、分子構造の解析に必要な大きさの結晶を得ることが難しいケースが多々あります。

共同研究グループは、フェムト秒レーザーアブレーション<sup>(注1)</sup>という光誘起現象により、タンパク質の結晶面の一部を破壊すると、その結晶面の成長が数倍以上加速するという新奇な現象を発見しました。興味深いことに、レーザー破壊箇所を含む、成長した結晶のX線回折パターンを測定したところ、結晶品質の劣化は認められませんでした。さらに、この新奇な結晶成長現象のメカニズムを光学顕微鏡やX線トポグラフィ法により調べた結果、レーザーによって破壊された箇所から、結晶成長の駆動力が大きい渦巻き状の成長様式（成長モード）が発生することを明らかにしました。このように能動的且つ時空間的にタンパク質結晶の成長モードを制御した例はこれまでになく、これらの結果は、本手法が大型タンパク質結晶作製におけるブレークスルーとなり得ることを示しています。

本研究成果により、今後、開発した手法が種々のタンパク質の大型単結晶の作製に応用され、様々な生命現象のメカニズム解明に役立つことが期待されます。

本研究成果は、「Nature Photonics」誌のオンライン速報版で日本時間 2016 年 10 月 25 日 0 時（英国時間 10 月 24 日 16 時）に掲載されます。

## 1. 研究の背景

タンパク質は様々な生命現象に関わる重要物質であり、その分子構造と機能は密接に結びついていることが知られています。近年では、タンパク質の分子構造を基にした薬の開発も盛んに行われており、今やタンパク質の分子構造は、生物学・薬学・医学分野において欠かすことができない情報です。一般に、目的のタンパク質の分子構造を知るためには、まず最低でも数十マイクロン以上の単結晶を作製し、X線や中性子線により解析します。しかし、タンパク質は結晶成長の駆動力が弱く、濃度や温度などの結晶周囲の環境因子を厳密に制御したとしても、分子構造の解析に必要な大きさの結晶を得ることが難しいケースが多々あります。また、大きな結晶ほど、より詳細な分子構造を決定することができるため、タンパク質結晶を大型化するための技術が求められていました。

そこで、本研究グループは、従来法のような結晶周囲の環境因子の調節ではなく、レーザーにより結晶の局所構造を直接操作することで結晶成長を制御できないかと考え、その検証に挑みました。

## 2. 研究手法

まず、過飽和溶液中のタンパク質結晶に対して、フェムト秒レーザーをレンズで集光照射し、レーザーアブレーションと呼ばれる現象により結晶表面の局所領域（数マイクロン）を破壊しました。その結果、レーザーで局所破壊された結晶面の成長速度が10倍以上促進されることがわかりました（図1）。興味深いことに、レーザー破壊箇所を含む、成長した結晶のX線回折パターンを測定したところ、結晶品質の劣化は認められませんでした。この新奇な結晶成長現象のメカニズムを調べるために、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡<sup>(注2)</sup>という、分子高さの段差を可視化できる光学顕微鏡を用いて結晶を観察しました。その結果、レーザー照射前は、2次元核成長<sup>(注3)</sup>という成長様式であったのに対して、レーザー照射後には、破壊された箇所から渦巻き状の成長丘が発生し、渦巻き成長<sup>(注4)</sup>することがわかりました（図2）。

2次元核成長は殆どのタンパク質で見られる一般的な成長様式ですが、2次元核発生というエネルギー障壁を超える必要があるため、過飽和度が低い溶液中ではその成長速度が極端に低下することが知られています。一方、渦巻き成長は、そのようなエネルギー障壁がないため、低過飽和溶液中でも大きな成長速度を維持することができます。しかし、渦巻き成長は転位と呼ばれる欠陥から発生するため、結晶内に偶然転位が存在するか、力学的な歪をかけて強制的に転位を発生させねばならず、従来法ではその制御ができませんでした。実際、フェムト秒レーザーアブレーションで局所破壊した結晶をX線トポグラフ法で観察したところ、らせん転位と呼ばれる渦巻き成長の源となる歪構造が発生していることがわかりました。これらの結果は、レーザーアブレーションにより結晶に歪を与えることで、渦巻き成長を能動的且つ時空間制御して発生させることが可能であることを明確に示しています（図3）。

## 3. 今後の展開

本研究により開発した手法が、今後、種々のタンパク質の大型結晶を得るために活用され、様々な生命現象のメカニズム解明に役立つことが期待されます。また、本共同研究グループでは、過去にフェムト秒レーザーアブレーションを利用して、タンパク質の結晶核発生（H. Adachi et al., J Jpn Appl. Phys 2003）や種結晶作製（H. Y. Yoshikawa et al., Cryst Growth Des 2012）にも成功しています。今後、それぞれの技術を組み合わせることで、分子構造の解析に最適な結晶を、光技術により一貫して作製する革新的な手法論の創製にも繋がることを期待できます。

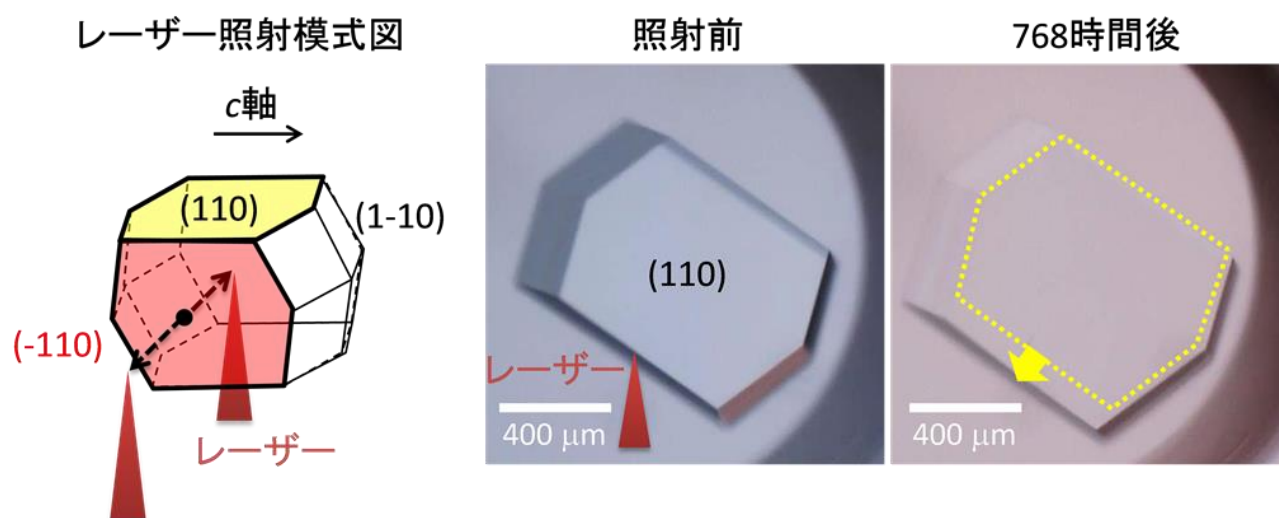


図1：レーザーによるタンパク質（ニワトリ卵白リゾチーム）の結晶成長の促進。結晶がレーザーを照射した面の方向に大きく成長しているのがわかる。

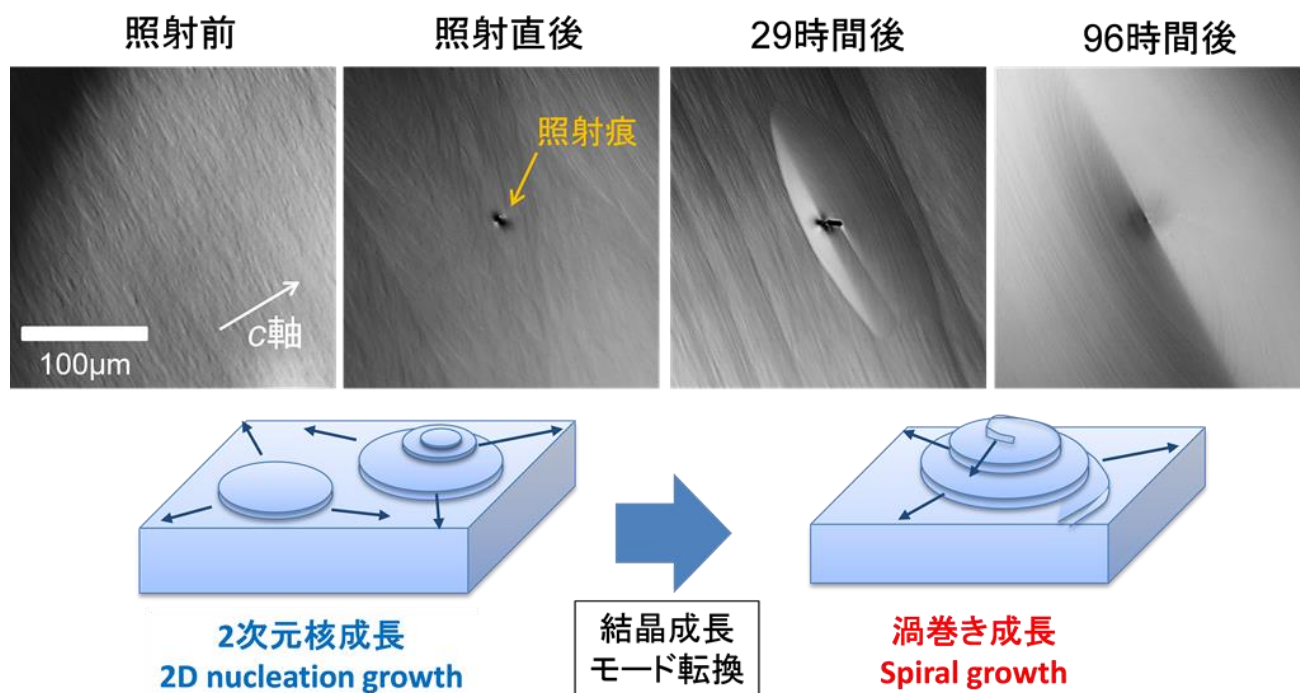


図2：レーザー共焦点微分干渉顕微法によるタンパク質結晶表面の分子レベルでの成長ダイナミクス。レーザー照射痕（矢印）から渦巻き丘が発生し、結晶表面全体を覆う様子がわかる。

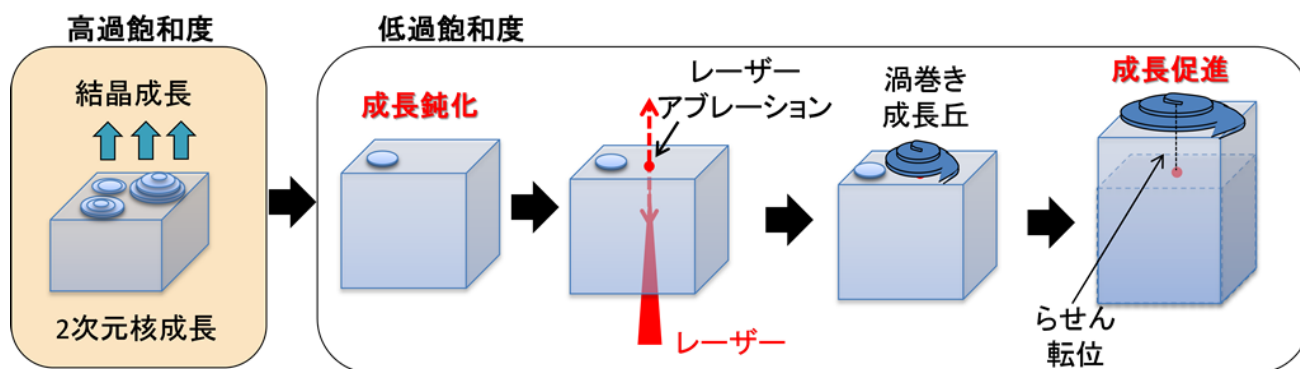


図3：レーザーによるタンパク質結晶の促進メカニズムの模式図

#### 4. 論文情報

<タイトル>

Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation

<著者名>

Yusuke Tominaga, Mihoko Maruyama\*, Masashi Yoshimura, Haruhiko Koizumi, Masaru Tachibana, Shigeru Sugiyama, Hiroaki Adachi, Katsuo Tsukamoto, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Hiroshi Y. Yoshikawa\* & Yusuke Mori

(\*は責任著者)

<雑誌>

*Nature Photonics*

<DOI>

10.1038/nphoton.2016.202

#### 用語解説

- (注1) フェムト秒レーザーアブレーション：レーザー光を物質に照射した場合、レーザー光照射強度がある大きさ（しきい値）以上になると、物質が爆発的に破壊される現象をレーザーアブレーションと呼ぶ。フェムト秒レーザーによるアブレーションでは、熱の影響を抑えて、物質を力学的に破壊できることが知られている。
- (注2) レーザー共焦点微分干渉顕微法：迷光を大幅に除去し観察像を鮮明にするレーザー共焦点顕微法と、透明な物質に明暗のコントラストを与える微分干渉顕微法を組み合わせたイメージング手法。分子レベルでの結晶成長の様子を、溶液中で非接触に計測することが可能である。
- (注3) 2次元核成長：原子や分子の2次元的な島状の層が広がりながら成長する結晶成長モード。この島状の層を二次元核と言う。多くの物質で一般的に見られる成長だが、二次元核の発生にはエネルギー障壁を超える必要があるため、成長駆動力が低い環境では成長が極端に遅くなり、最終

的には過飽和条件にも関わらず成長が停止する。

- (注4) 渦巻き成長：結晶内部に転位と呼ばれる欠陥が存在する時、この転位を中心に螺旋状の渦巻き構造（成長丘）が発生し、この成長丘に原子や分子を取り込みながら成長する結晶成長モード。一度成長丘が発生すると、転位が存在し続ける限り半永久的に原子や分子の取り込み箇所が供給されるため、原理的には平衡濃度に達するまで成長が継続可能である。

## **問い合わせ先**

吉川 洋史 准教授

埼玉大学大学院理工学研究科

E-mail : [hiroshi@mail.saitama-u.ac.jp](mailto:hiroshi@mail.saitama-u.ac.jp) TEL : 048-858-3379

丸山 美帆子 特任講師

(元 大阪大学大学院工学研究科特任助教)

京都府立大学大学院生命環境科学研究科

北海道大学低温科学研究所

E-mail : [maruyama@cryst.eei.eng.osaka-u.ac.jp](mailto:maruyama@cryst.eei.eng.osaka-u.ac.jp) TEL: 06-6879-7705

森 勇介 教授

大阪大学大学院工学研究科

E-mail: [mori.yusuke@eei.eng.osaka-u.ac.jp](mailto:mori.yusuke@eei.eng.osaka-u.ac.jp) TEL: 06-6879-7705

橘 勝 教授

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科

E-mail : [tachiban@yokohama-cu.ac.jp](mailto:tachiban@yokohama-cu.ac.jp) TEL : 045-787-2307

小泉 晴比古 助教

東北大学 金属材料研究所 結晶材料化学研究部門

E-mail: [h\\_koizumi@imr.tohoku.ac.jp](mailto:h_koizumi@imr.tohoku.ac.jp) TEL: 022-215-2103

安達 宏昭 代表取締役社長

株式会社創晶

E-mail : [adachi@so-sho.jp](mailto:adachi@so-sho.jp) TEL : 06-6877-5659