

フェムト秒レーザー照射による構造解析用タンパク質結晶化技術

Protein Crystallization by Femtosecond Laser Irradiation for Structure Determination

阪大¹, 埼玉大学², ㈱創晶³, 東京工業大学⁴, 京都府立大学⁵ ○森 勇介¹, 吉川 洋史², 丸山 美帆子¹, 杉山 成¹, 松村 浩由¹, 安達 宏昭³, 井上 豪¹, 村上 聡⁴, 高野 和文⁵Osaka Univ.¹, Saitama Univ.², Sosho Inc., Tokyo Inst. Tech., Kyoto Pref. Univ. ○Y. Mori¹, H. Y.Yoshikawa², M. Maruyama¹, S. Sugiyama¹, H. Matsumura¹, H. Adachi³, T. Inoue¹, S. Murakami⁴, K.Takano⁵

E-mail: mori.yusuke@eei.eng.osaka-u.ac.jp

はじめに

タンパク質の立体構造は、創薬研究、構造生物学、生命現象の解明に資する重要な情報であるが、タンパク質の単結晶を得ることは未だ非常に困難であり、構造解析における大きなボトルネックになっている。筆者らは近年、集光フェムト秒レーザーによる刺激を用いて、低過飽和溶液から強制的に結晶核を発生させる研究および技術開発に取り組んできた。本稿では、我々のこれまでのフェムト秒レーザーによるタンパク質結晶核発生手法開発の現状を解説する。

フェムト秒レーザー誘起結晶核発生法

結晶化が困難なタンパク質として、トリパソーマ由来のプロスタグランジン F₂ 合成酵素を試したところ、結晶化に要する時間が半年から 2 日に短縮されるなど、レーザー照射による核発生の促進効果が確認された。さらに、タンパク質の中でも特に結晶化が難しいと言われる膜タンパク質について効果を検証した¹⁾。その結果、膜タンパク質 AcrB の低過飽和溶液へのフェムト秒レーザー集光照射により、従来法で 3.5 Å であった分解能を 2.3 Å へと飛躍的に向上させることに成功した。また、膜タンパク質の複合体や、タンパク質-RNA 複合体のような複雑な分子構造をもつタンパク質においても高品質結晶化に成功した²⁾。その他にも、フェムト秒レーザーと溶液攪拌法の併用により Arabinanase Abnx from *Penicillium chrysogenum* 31B の高品質単結晶の作製に成功し、Abnx は 1.14 Å、Abnx との共結晶は 1.04 Å の非常に高い分解能を得ている³⁾。

フェムト秒レーザー誘起核発生メカニズム

フェムト秒レーザーを、タンパク質溶液のようなレーザー波長に対して吸収の無い透明媒体内部に集光照射すると、集光点近傍で熱や熱弾性応力が発生することで溶液が瞬間的に突沸し、キャビテーションバブルが発生する。蛍光分子をラベルしたタンパク質や赤色のタンパク質（シトクロム c）を用いて、キャビテーションバブル周囲のタンパク質濃度のイメージングを行ったところ、キャビテーションバブルの収縮により、集光点付近に局所的なタンパク質濃度上昇が引き起こされることが明らかとなった^{4,5)}。

キャビテーションバブルによる局所的な濃度上昇や圧力変化により、溶液の局所領域の過飽和度が上昇し、核発生が誘起される。この過飽和度の上昇は過渡的であり、拡散により準安定領域へと緩和する。これにより、発生した核が低過飽和条件でゆっくりと成長できるため、結晶の高品質化に繋がると考えられる。これは結晶成長学の原理に基づく結晶高品質化のアプローチであり、タンパク質結晶化における長年のジレンマを解消することができる。

- 1) H. Adachi, S. Murakami, A. Niino, K. Takano, Y. Hosokawa, T. Inoue, H. H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, A. Yamaguchi, and T. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys., **43** (2003) L1376.
- 2) T. Numata, Y. Ikeuchi, S. Fukai, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, T. Suzuki, and O. Nureki: Acta Crystallogr. F, **62** (2006) 368.
- 3) Y. Sogabe, T. Kitatani, A. Yamaguchi, T. Kinoshita, H. Adachi, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, H. Matsumura, T. Sakamoto, and T. Tada: Acta Crystallogr. D, **67** (2011) 415.
- 4) R. Murai, H. Y. Yoshikawa, Y. Takahashi, M. Maruyama, S. Sugiyama, G. Sasaki, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, and Y. Mori: Appl. Phys. Lett., **96** (2010) 043702.
- 5) N. Iefuji, R. Murai, M. Maruyama, Y. Takahashi, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, Y. Koga, K. Takano, and S. Kanaya: J. Cryst. Growth, **318** (2011) 741.