

# フェムト秒レーザーアブレーションを用いたタンパク質結晶の成長制御

## Control of protein crystal growth by femtosecond laser ablation

阪大院工<sup>1</sup>, 埼玉大院理工<sup>2</sup>, 阪大院理<sup>3</sup>, 創晶<sup>4</sup>, 京府大院生命環境<sup>5</sup>, 東工大院生命理工<sup>6</sup>

○富永 勇佑<sup>1</sup>, 林 佑紀<sup>1</sup>, 中山 智詞<sup>1</sup>, 丸山 美帆子<sup>1</sup>, 高橋 義典<sup>1</sup>, 吉川 洋史<sup>1,2</sup>, 吉村 政志<sup>1</sup>,  
杉山 成<sup>3</sup>, 松村 浩由<sup>1,4</sup>, 安達 宏昭<sup>1,4</sup>, 高野 和文<sup>4,5</sup>, 村上 聡<sup>4,6</sup>, 井上 豪<sup>1,4</sup>, 森 勇介<sup>1,4</sup>

Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ.<sup>1</sup>, Dept. of Chemistry, Saitama Univ.<sup>2</sup>, Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ.<sup>3</sup>, SOSHO Inc.<sup>4</sup>,

Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ.<sup>5</sup>, Grad. Sch. of Biosci. and Biotech., Tokyo Inst. of Tech.<sup>6</sup>

○Y. Tominaga<sup>1</sup>, Y. Hayashi<sup>1</sup>, S. Nakayama<sup>1</sup>, M. Maruyama<sup>1</sup>, Y. Takahashi<sup>1</sup>, H. Yoshikawa<sup>1,2</sup>, M. Yoshimura<sup>1</sup>,

S. Sugiyama<sup>3</sup>, H. Matsumura<sup>1,4</sup>, H. Adachi<sup>1,4</sup>, K. Takano<sup>4,5</sup>, S. Murakami<sup>4,6</sup>, T. Inoue<sup>1,4</sup>, Y. Mori<sup>1,4</sup>

E-mail: tominaga@cryst.eei.eng.osaka-u.ac.jp

### はじめに

これまで我々は X 線構造解析を目的とした各種タンパク質の高品質単結晶育成に取り組み、フェムト秒レーザーを用いた結晶核発生技術および種結晶作製技術などを開発してきた<sup>1)</sup>。タンパク質の結晶育成における課題の一つに、構造解析が可能な大きさまで結晶成長が継続しないことが挙げられる。以前の研究で、タンパク質結晶表面のレーザーアブレーション痕から成長ステップの供給源が形成される可能性を見出していた<sup>2)</sup>。本研究ではモデルタンパク質である鶏卵白リゾチーム (HEWL) を用いて、この現象を利用した結晶成長の制御とそのメカニズムの解明に取り組んだ。

### 実験と結果

HEWL 過飽和溶液 (45 mg/ml, 過飽和度 $\sigma=1.5$ ) 中で晶出した正方晶結晶 (晶出 7 日後) に対して、Fig. 1 に示すようにフェムト秒レーザー (中心波長 800 nm, パルス時間幅 330 fs, エネルギー $\sim 0.25 \mu\text{J}/\text{pulse}$ , 繰り返し周波数 1 kHz) を下方から集光照射し、その集光点を側面である(-110)面に垂直に走査して、(-110)面にアブレーション痕を形成した。上面である(110)面を構成する各稜の長さ L1, L2 (照射側) と L3, L4 (非照射側) の経時変化を実体顕微鏡で調べたところ、レーザー照射後に L1, L2 側の成長が促進されていることが明らかになった (Fig. 2)。

次に、アブレーション後に結晶表面で生じる現象を、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡 (LCM-DIM) を用いて観察した。HEWL 過飽和溶液 (35 mg/ml,  $\sigma=0.94$ ) 中で晶出した正方晶結晶 (晶出 8 日後) に対して、フェムト秒レーザーの集光点を(-110)面と等価な(110)面に垂直に走査し、観察面である(110)面に 3 か所のアブレーション痕を形成した (Fig. 3)。その結果、二次元核成長様式で成長していた(110)面において、照射 2 日後にアブレーション痕②を起点としてスパイラル成長のステップが発生する様子が観察された (Fig. 4)。照射 4 日後には(110)面全体が単一の成長丘で覆われ、成長様式が完全に切り替わることが明らかになった。

以上のことから、低過飽和条件における面成長速度が二次元核成長よりも大きいスパイラル成長を、レーザーアブレーション痕を起点として発生させることに成功し、HEWL 正方晶の面成長が促進されたと考えられる。

### 参考文献

- 1) H. Y. Yoshikawa et al., Chem. Soc. Rev., **43** (2014) 2147-2158.
- 2) H. Y. Yoshikawa et al., Cryst. Growth Des., **12** (2012) 4334-4339.

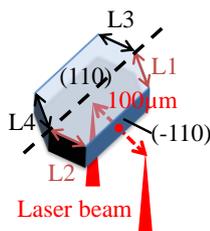


Fig. 1 Schematic illustration of laser ablation.

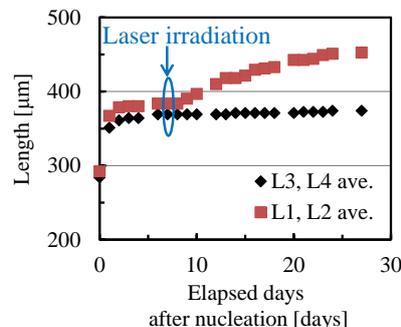


Fig. 2 Crystal size dependency on elapsed days.

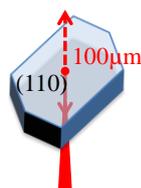


Fig. 3 Schematic illustration of laser ablation.

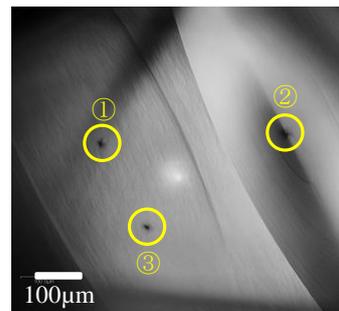


Fig. 4 An LCM-DIM image of the (110) face of the tetragonal lysozyme crystal.