フェムト秒レーザーアブレーションを用いた タンパク質結晶成長初期における成長機構転換

Switching the growth mechanism of protein crystals at the initial stage of their growth by femtosecond laser ablation

°冨永 勇佑[1]、丸山 美帆子[1]、吉川 洋史[1,2]、杉山 成[3]、高橋 義典[1]、安達 宏昭[1,4]、
松村 浩由[4,5]、高野 和文[4,6]、村上 聡[4,7]、井上 豪[1,4]、吉村 政志[1]、森 勇介[1,4]
(1. 阪大院工、2. 埼大理、3. 阪大院理、4. 創晶、5. 立命大生科、6. 京府大院生環、7. 東工大院生理工)
°Y. Tominaga[1], M. Maruyama[1], H. Y. Yoshikawa[1,2], S. Sugiyama[3], Y. Takahashi[1], H. Adachi[1,4],
H. Matsumura[4,5], K. Takano[4,6], S. Murakami[4,7], T. Inoue[1,4], M. Yoshimura[1], Y. Mori[1,4]
(1.Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ., 2.Saitama Univ., 3.Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ., 4.SOSHO Inc.,
5.Ritsumeikan Univ., 6.Kyoto Pref. Univ., 7.Tokyo Inst. of Tech.)
E-mail: tominaga@cryst.eei.eng.osaka-u.ac.jp

はじめに

タンパク質分子の構造解析には良質な単結晶が必要となるが，その結晶成長において二次元核成長機構が高品質化・大型化の阻害要因の一つになる場合がある[1]．我々はこれまでタンパク質結晶育成にフェムト秒レーザーを導入し，結晶核発生の制御や種結晶作製を独自に進めてきた[2]．最近，フェムト秒レーザーを用いて成長中の結晶表面にレーザーアブレーションを施すと，渦巻き成長丘の出現によって結晶成長が促進されるという新しい現象を見出した[3]．そこで，本知見をもとに二次元核成長している結晶に成長初期段階からレーザーアブレーションを行い，理想的な成長機構である渦巻き成長への転換を図ることで結晶の大型化および高品質化を目指した．

実験と結果

モデル材料に鶏卵白リゾチーム（HEWL）の正方晶結晶を用いた．過飽和溶液（35-40 mg/ml，過飽和度σ = 4.6-5.4）中で晶出から 2-5 日経過した後，二次元核成長機構での結晶成長が支配的な成長初期の結晶に対して，Fig. 1 に示すようにフェムト秒レーザーを下方から対物レンズ（10×，N.A. 0.40）により集光照射して結晶上面（{110}面）に垂直な光軸方向に集光点を走査した．レーザーの条件は中心波長 800 nm，パルス時間幅 250 fs，エネルギー0.25 μJ/pulse，パルス繰り返し周波数 250-1000 Hz，走査条件は速度 50 μm/s，走査距離 100 μm（結晶中 50 μm），走査回数 3-5 往復とした．パルス繰り返し周波数 1000 Hz で 5 往復した場合，{110}面にアブレーションによる直径約 6 μm の照射痕が形成され，Fig. 2 (a)に示すようにデブリを起源とする微結晶が生じて照射痕周囲が多結晶化した．一方，照射痕の直径が約 2 μm となるパルス繰り返し周波数 500 Hz，走査 3 往復の条件において，照射痕を起点に渦巻き成長ステップが発生して{110}面全体を単一の渦巻き成長丘が覆い（Fig. 2 (b)），この面の成長機構を初期段階において二次元核成長から渦巻き成長へ転換することに成功した．このときの結晶の光学顕微鏡像を Fig. 2 (c)に示す．照射 120 h 後の<110>方向の面成長速度は 11 μm/day と照射直前の 2.7 倍になり，渦巻き成長誘起による成長促進効果が確認できた．パルス繰り返し周波数 250 Hz で 3 往復した場合，結晶表面に明瞭な照射痕は形成されず，微結晶および渦巻き成長ステップの発生は見られなかった．このことから，直径約 2 μm の照射痕が形成されるレーザー照射条件が，成長機構の転換に最適であることがわかった．また，成長機構転換には直径約 2 μm 程度の照射痕形成が必要なことが明らかになった．

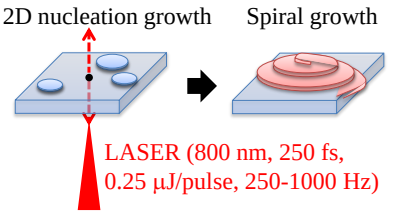

Fig 1. Schematic illustration of two types of crystal growth mechanism and laser ablation.

さらに，SPring-8 の BL38B1，ディテクタ MX225HE を用いて渦巻き成長誘起結晶の XRD データを測定したところ，分解能 1.26 Å，モザイシティ 0.40 °と優れた品質であることが確認できた．レーザーを用いてタンパク質結晶の成長機構を制御した試みは本研究が世界で初めてであり，今後は二次元核成長機構が要因で育成が困難となっている膜タンパク質などの難結晶化タンパク質での検討を進める予定である．

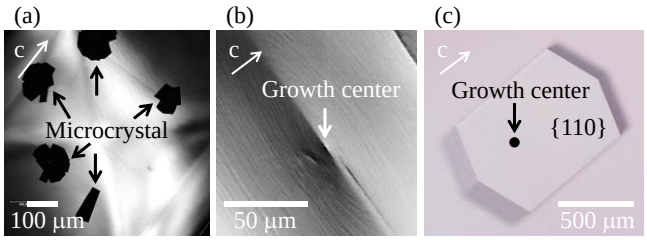

Fig 2. LCM-DIM images of the {110} face and an optical photograph of the tetragonal HEWL crystals. (a) 1000 Hz. (b)(c) 500 Hz.

参考文献

1) M. Maruyama et al., *Cryst. Growth Des.*, **12** (2012) 2856.
2) H. Y. Yoshikawa et al., *Chem. Soc. Rev.*, **43** (2014) 2147.
3) 冨永ほか，第 75 回 応用物理学会 秋季学術講演会 講演予稿集, 17p-S9-7

© 2015年 応用物理学会