

ゲル化タンパク溶液におけるフェムト秒レーザー誘起核発生の空間制御

Control of protein crystal nucleation in gelled solutions using femtosecond laser

○山形真¹, 丸山美帆子¹, 富永勇佑¹, 吉川洋史^{1,2}, 杉山成³, 岡田詩乃⁴, 高橋義典¹,
安達宏昭^{1,4}, 高野和文^{4,5}, 村上聡^{4,6}, 井上豪^{1,4}, 松村浩由^{1,7}, 吉村政志¹, 森勇介^{1,4}

阪大院工¹ 埼玉大院理工² 阪大院理³ 創晶⁴ 京府大院生命環⁵ 東工大院生命理⁶ 立命館大院生命科⁷

S. Yamagata¹, M. Maruyama¹, Y. Tominaga¹, H. Yoshikawa^{1,2}, S. Sugiyama³, S. Okada⁴, Y. Takahashi¹,

H. Adachi^{1,4}, K. Takano^{4,5}, S. Murakami^{4,6}, T. Inoue^{1,4}, H. Matsumura^{1,7}, M. Yoshimura¹, Y. Mori^{1,4}

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

Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ.⁵,

Grad. Sch. of Biosci. and Biotech., Tokyo Inst. of Tech.⁶, Grad. Sch. of Life Sci., Ritsumeikan Univ.⁷

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

はじめに

我々はフェムト秒レーザーによるタンパク質核形成誘起技術を開発し、タンパク質の結晶化そのものが困難であるという構造生物学分野のボトルネックを解決してきた¹⁾。近年ではゲル化した溶液中で結晶化を行い、結晶内部にゲルを取り込ませることで、タンパク質結晶の脆さを改善することに成功した²⁾。しかし、ゲルを用いた結晶化では、多結晶化の問題が起り、結晶大型化が困難なケースも多い。そこで本研究では、ゲルを添加した低濃度のタンパク質溶液に対してフェムト秒レーザーを照射し、局所的に核発生を誘起することで結晶の大型化を試みた。

実験と結果

アガロースゲルを添加したニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) の結晶化溶液 (LZM:22-30 mg/ml, 3%NaCl, Agarose:0.25-1 wt% in 0.1M NaAc buffer (pH4.5)) を 1 ml バイアル瓶に 300 μ l 分注した後、20°C で 7 日間保持した。結晶核が晶出していないことを確認し、フェムト秒レーザー (中心波長 800 nm, パルス時間幅 250 fs, エネルギー 43 μ J/pulse, 照射回数 1 pulse) を Fig.1 に示すようにバイアル瓶 (円筒容器) 断面に中央と上下左右の計 5 箇所へ集光照射した。その後再び 20°C に保持しながら継続的に観察を行った。アガロース濃度 0.25 wt% 条件において結晶数の制御に成功し、2 ヶ月後には 1.5 mm 角程度の大型結晶が得られた (Fig.2-(a))。また、アガロース濃度 1wt% 条件において核発生初期の様子を詳細に観察したところ、レーザー照射位置から 2~3mm 離れて析出していることがわかった (Fig.2-(b))。この領域を核発生確率向上エリアとし、レーザーを 4 ヶ所に照射してそれぞれ照射位置に対する核発生確率向上エリアを重ね合わせたところ (Fig.2-(c))、容器中央に 1 つだけ結晶を晶出させることに成功した。本手法で得た結晶と自然晶出した結晶を SPring-8 の BL38B1 において XRD 測定し、XRD データの統計値を比較した結果レーザー照射による結晶品質の悪化は無いことが示された。

本技術は核発生数のみならずその位置の制御を可能とするこれまでに無い新規技術であり、大型高品質単結晶が必要とされる構造生物学の分野に多大な貢献が可能と考えている。

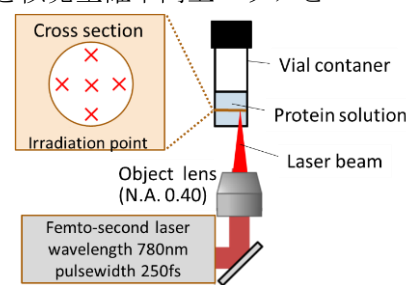


Fig.1 The experimental setup

参考文献

- 1) H. Y. Yoshikawa et al., Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 2147.
- 2) S. Sugiyama, et al., J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 5786.

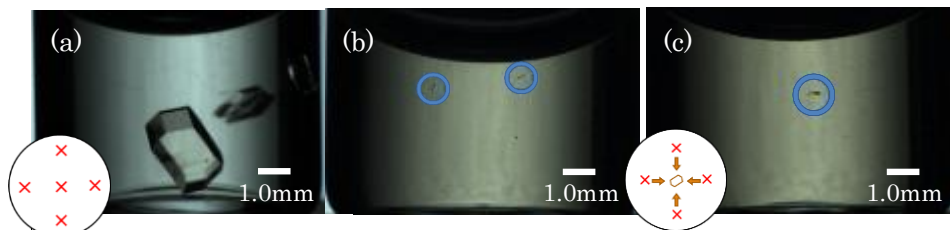


Fig.2 Images of crystals nucleated by the femtosecond laser irradiation. In 0.25 wt% agarose gel (a) and 1 wt% agarose gel (b) and (c). A single crystal nucleated at the controlled position (c).