フェムト秒レーザーアブレーションを用いた 成長機構転換によるタンパク質結晶の高品質化 Improvement of protein crystal quality by switching crystal growth mode with femtosecond laser ablation ^o冨永 勇佑¹、丸山 美帆子¹、吉村 政志¹、杉山 成²、安達 宏昭^{1,3}、塚本 勝男¹、 松村 浩由^{3,4}、高野 和文^{3,5}、村上 聡^{3,6}、井上 豪^{1,3}、吉川 洋史^{1,7}、森 勇介^{1,3} (1. 阪大院工、2. 阪大院理、3. 創晶、4. 立命大生科、5. 京府大院生環、6. 東工大院生理工、7. 埼大理) ^oY. Tominaga¹, M. Maruyama¹, M. Yoshimura¹, S. Sugiyama², H. Adachi^{1,3}, K. Tsukamoto¹, H. Matsumura^{3,4}, K. Takano^{3,5}, S. Murakami^{3,6}, T. Inoue^{1,3}, H. Y. Yoshikawa^{1,7}, Y. Mori^{1,3} (1.Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ., 2.Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ., 3.SOSHO Inc., 4.Ritsumeikan Univ., 5.Kyoto Pref. Univ., 6.Tokyo Inst. of Tech., 7.Saitama Univ.) E-mail: tominaga@cryst.eei.eng.osaka-u.ac.jp

はじめに

我々はこれまで、分子構造解析を目的としたタンパク質結晶育成にフェムト秒レーザーを導入して核発生制御 や種結晶作製を独自に進めてきた¹.本研究では、結晶の成長機構をフェムト秒レーザーにより制御する全く新し い研究に取り組んだ.高品質・大型の単結晶を得るには「渦巻き成長」による結晶成長が有利であるが²、渦巻き 成長機構の発生は従来自然任せであった.最近、「二次元核成長」しているタンパク質結晶表面にレーザーアブレ ーションを施すことで、成長機構を成長早期に渦巻き成長へ転換することに成功した.その結果、結晶成長の継 続による大型化³、および結晶中に取り込まれる不純物量の大幅低減による高品質化を実現した.

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(25 mg/ml, 過飽和度 σ = 3.0)中で 晶出してから1日後の二次元核成長している成長早期の結 晶に対して, Fig. 1に示すように対物レンズ(10×, N.A. 0.40) により集光した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 0.25 μ J/pulse, パルス繰り

返し周波数 1 kHz) を下方から1 秒間照射して,結晶上面({110}面)にアブレーションによる直径~2 μmの照射 痕を形成した.その結果,照射 0.5 h後に照射痕を起点に渦巻き成長丘が発生し,照射 18 h後にはその単一成長丘 が{110}面全体を覆い,渦巻き成長機構への転換に成功した.この面はその後 54 日間で 50 μm の厚み成長した.

上記結晶およびレーザー照射無し(二次元核成長)の結晶を昇温エッチングして、両者が成長過程で取り込ん だ不純物量を比較した. {110}面をレーザー共焦点微分干渉顕微鏡(LCM-DIM)で観察しながら 20~50℃まで昇 温したところ、二次元核成長した結晶の場合、不純物由来の平底ピットが面全体に現れた(Fig. 2a).一方、渦巻 き成長転換結晶の場合、転位由来の尖底ピットが成長丘の中心付近に 2 つ現れたが、平底ピットはほとんど見ら れず、大幅な不純物の取り込み低減が実現した(Fig. 2b).本手法を用いて渦巻き成長へ転換した結晶の XRD デ ータを Spring-8 BL38B1 にて測定したところ、二次元核成長した結晶より優れた品質であることが確認できた.

ウシ膵臓由来インシュリンの三方晶結晶においても、本手法による渦巻き成長誘起に成功している.時間・空間選択的に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る.本技術は、構造解析を求められている難結晶化タンパク質の高品

質・大型単結晶育成への貢献が可能である.

参考文献

[1] H. Y. Yoshikawa *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 43 (2014) 2147-2158.

[2] M. Maruyama et al., Cryst. Growth Des., 12 (2012) 2856-2863.

[3] 冨永ほか,第76回応用物理学会秋季学 術講演会 講演予稿集,13p-2F-11.



Fig 2. LCM-DIM images of {110} face of tetragonal HEWL crystals during thermal etching. (a) 2D nucleation growth (36° C). (b) Spiral growth (50° C).



Fig 1. Schematic illustration of switching crystal growth mode with femtosecond laser ablation.

10000000-077