

レーザー捕捉誘起時空間制御リアルタイムタンパク質結晶化法の開発

Development of Spatiotemporally Controlled Real-time Crystallization Method for Protein Molecules

北大院総化¹, 北大院理² 中筋 裕香¹, °三浦篤志^{1,2}, 藤井翔^{1,2}, 上野貢生^{1,2}

Grad. School Chem. Sci. & Eng., Hokkaido Univ.¹, Fac. Sci., Hokkaido Univ.², Yuka Nakasuji¹,

°Atsushi Miura^{1,2}, Sho Fujii^{1,2}, Kosei Ueno^{1,2}

E-mail: atsushi.miura@sci.hokudai.ac.jp

タンパク質の立体構造決定には高品質な単結晶が必要であるが、結晶化の困難なタンパク質は未だ多く結晶作製が構造決定のボトルネックとなっている。レーザー捕捉誘起結晶化法は、アミノ酸の様な小さな生体分子であればリアルタイムかつ任意の場所での結晶形成誘起、すなわち、時空間制御結晶化が可能である^[1]。しかしながら、タンパク質の様な大きな分子での時空間制御結晶化は未だ成し遂げられていない^[2]。本研究では、レーザー捕捉によるタンパク質の時空間制御リアルタイム結晶化法の確立に向け、ニワトリ卵白由来リゾチーム (HEWL)を試料に用いて捕捉レーザー照射下の集光点およびその近傍における分子挙動の *in situ* 顕微計測を行うことで、結晶化阻害要因の分光学的かつ分子レベルでの解明を目指した。

40 mg/mL HEWL 重水溶液 (0.5 ~ 2.0 wt% NaCl, pD 5.1) を調製し試料溶液とした。密閉型セル内に形成した厚さ約 100 μm の試料溶液液膜の気液界面へ、捕捉レーザー光 ($\lambda = 1064 \text{ nm}$, $\sim 0.8 \text{ W}$) とラマン励起レーザー光 ($\lambda = 532 \text{ nm}$) を倒立顕微鏡の対物レンズ (40 倍, N.A. = 0.95) を用いて同軸で導入・集光し、捕捉レーザー照射下における結晶化挙動の明視野観察と *in situ* 顕微ラマン/偏光ラマン測定を行った。

捕捉レーザー照射下における *in situ* 顕微ラマン/偏光ラマン測定より、レーザー照射に伴うピーク強度と偏光解消度 (ρ) の増加が観測された。これより、集光点近傍における局所的濃度上昇と HEWL 分子の異方的配向が共に亢進していることが示唆された。角度依存偏光解消度測定において、 ρ が特定の角度でピークを示したこと、および、結晶とは異なる角度依存性を示したことより、捕捉レーザー光の偏光 (光電場) 方向に依存して HEWL 分子が結晶中とは異なる様式で異方的に配向していることが示された (Fig. 1)。これより、光電場による結晶中とは異なる異方的分子配向誘起が捕捉レーザー照射下におけるリアルタイム結晶化を阻害していることが明らかになった。

発表では、得られた知見に基づき光学素子により偏光方向を制御した捕捉レーザー光を用いることで達成された、リアルタイム結晶化の結果についても併せて議論する。

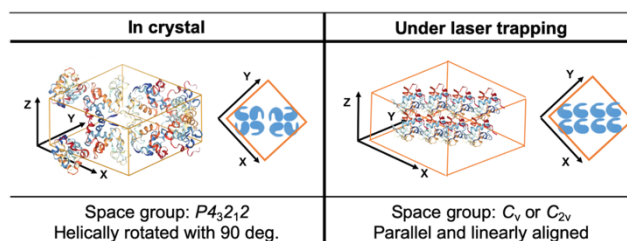


Figure 1 Molecular orientation and arrangement in HEWL crystal and under trapping laser irradiation in solution.

[1] Miura, A. *et al.*, *Appl. Phys. B*, **112**, 473 (2013).

[2] Tu, J.-R., *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, **14**, 15 (2014).