

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13715

研究課題名(和文) 界面レーザー捕捉により誘起される液液相分離を利用したタンパク結晶化の顕微計測

研究課題名(英文) Analysis of surface laser trapping-induced crystallization of proteins via optically induced liquid-liquid phase separation by microspectroscopy

研究代表者

三浦 篤志 (Miura, Atsushi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：90379553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質溶液の気液界面へ捕捉レーザー光を照射すると、集光点の近傍に局所的な高濃度ドメインを形成できる。この時空間的に制御された高濃度ドメインを利用し、効率的かつ短時間での新規結晶化法を着想し、界面レーザー捕捉による結晶化を試みた。捕捉レーザー照射下で誘起される現象(集合体形成過程、液滴形成・消失、結晶形成)の詳細な分光学的検討から、レーザー捕捉下におけるタンパク濃度変化と分子配向変化を明らかにした。リゾチームや対称性の高い球殻状タンパク質フェリチンのレーザー誘起結晶化より、界面レーザー捕捉により結晶形成時間の大幅な短縮と、結晶成長速度の大幅な向上が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated laser-induced rapid and effective crystallization and crystal growth of protein molecules by focusing the trapping laser to the air-solution interface of protein solutions. When trapping laser was focused to the air-solution interface, hen egg white lysozyme solution showed huge two dimensional assembly formation, dense liquid droplets formation due to the liquid-liquid phase separation after turning-off the laser irradiation, and rapid crystal formation and its growth. Confocal Raman and polarized Raman spectroscopy under trapping laser irradiation revealed that lysozyme concentration became more than 10 times higher than starting solution and ordered orientation of lysozyme molecules under photon pressure. In ferritin case, we could induce real-time crystallization of this protein under trapping laser irradiation from the focal spot.

研究分野：化学

キーワード：レーザー捕捉 結晶化 タンパク質 顕微分光 光圧

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造を高精度に決定するためには、高品質な単結晶が必要不可欠であるが、タンパク質単結晶作製は依然として試行錯誤的な方法や運に依存しており、高品質な結晶の作製過程が立体構造決定のボトルネックとなっている。新規かつ迅速なタンパク質結晶化手法が強く求められて久しい。

一方、光の放射圧(光圧)と微小物体との相互作用に基づくレーザー捕捉を用いれば、不飽和溶液や過飽和度の低い溶液においても局所的な濃度上昇を誘起、高濃度液滴を形成させ、溶質の結晶化を誘起・制御できることが近年報告されており、申請者もレーザー捕捉による生体分子であるグリシンのレーザー捕捉誘起結晶化を報告している。しかし、生体分子の結晶化例はアミノ酸の様な小さな分子に限られており、巨大高分子であるタンパク質のレーザー捕捉結晶化に関しては未だ報告されていない。

申請者は最近、液液相分離や液滴形成を起し得ない過飽和度の低いタンパク質溶液において、気液界面へ捕捉レーザー光を集光することにより巨大集合体形成から液液相分離・液滴形成を経て、自然核発生に比べて短時間でタンパク質結晶形成を誘起可能であり、さらに、形成された結晶の成長速度が数倍以上も上昇する事を見いだした。これは、低過飽和度のタンパク質溶液でも局所的濃度上昇と液液相分離を誘起することで結晶化を短時間かつ高効率で成し遂げることが可能なことを示唆している。これらのバックグラウンドのもと、あらゆるタンパク質の結晶化に応用可能な新規結晶化法・結晶成長法を提唱できるものとの着想を得て、本研究課題に取り組んだ。

2. 研究の目的

気液界面への捕捉レーザー照射により誘起されるタンパク質結晶形成率向上と結晶成長速度増加現象を、捕捉レーザーの光圧による新規結晶化・結晶成長の方法論として確立するためには、捕捉光の光圧下で誘起される高濃度領域形成や、この高濃度領域中におけるタンパク質濃度や分子配向の変化を明らかにする必要がある。そこで、レーザー照射下におけるこれらの変化を明らかにし、分子集合体形成・液液相分離・液滴形成と濃度変化、結晶形成率向上との相関関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

界面レーザー捕捉下における集合体形成過程から液滴形成・消失に至る過程を顕微ラマンおよび顕微偏光ラマン分光により測定するための装置を構築し(図1)、レーザー照射開始から集合体・液滴形成・液滴消失・結晶化までのタンパク質濃度変化と分子配向変化の *in-situ* 測定を行った。

構築したレーザー捕捉誘起結晶作製・顕微

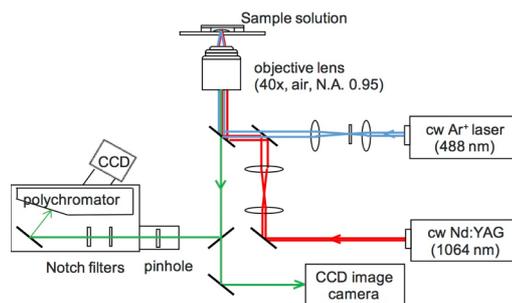


図1. 構築したレーザー捕捉誘起結晶作製・顕微分光システム

分光システムを用いて、以下の3点に関して研究を行った。

(1)『界面へレーザー捕捉下における集光点近傍での濃度変化挙動の解明』: モデルタンパク質としてリゾチームを用い、界面レーザー捕捉により液液相分離に至る分子集合過程の詳細をレーザー捕捉・顕微ラマン分光法により詳細に検討し、明らかにするとともに、分子集合体形成・液液相分離・液滴形成と結晶形成率向上の相関関係を明らかにする。

(2)『光圧により誘起された局所高濃度領域におけるタンパク質分子配向の解明』: 集合体形成から液液相分離、結晶化に至る過程でタンパク質分子配向がどのように変化するか? これを明らかにするため、リゾチーム結晶、捕捉レーザー照射下の溶液中における偏光ラマン測定を行い、光圧下の集合体内外における分子配向変化を明らかにする。

(3)『結晶化対象タンパク質の拡張による方法論の一般化』: 対象タンパク質に種々のタンパク質を用い、界面レーザー捕捉による液液相分離が普遍的に誘起可能か、また分子の対称性とレーザー捕捉下におけるその場結晶化との相関に関し、対称性の高いタンパク質を用いて明らかにする。

4. 研究成果

(1)『界面へレーザー捕捉下における集光点近傍での濃度変化挙動の解明』

まず始めに、タンパク質結晶化研究でモデルタンパク質として広く用いられるニワトリ卵白リゾチームを用いて、レーザー照射による局所濃度変化と結晶化挙動の相関に関して検討した。試料には市販のニワトリ卵白リゾチーム (HEWL, 3 回再結晶品) を用い、試料溶液調製には、近赤外レーザーの吸収による温度上昇を抑制するため重水を溶媒として用いた。80 mg/mL HEWL 溶液と 4.0 wt% 沈殿剤 (NaCl) 溶液を別々に調製、レーザー照射直前に同量混合し、試料溶液 (HEWL, 40 mg/mL; NaCl, 2.0 wt%; pD 5.1) とした。この溶液を密閉型セル内に滴下し、厚さ約 100 μm の液膜を形成した。捕捉レーザー光 (Nd:YAG, 1064 nm, ~0.8 W) およびラマン励起レーザー光 (Ar+, 488 nm, 30 mW) は倒立顕微鏡の対物レンズ (40x, NA 0.95) を通して試料タンパク質溶液の

気液界面へと集光した。レーザー照射により誘起される分子集合体・高濃度液滴形成過程を CCD カメラで観察するとともに、集光点及びその近傍の共焦点顕微ラマン散乱測定を行いラマン散乱の強度変化よりタンパク質濃度を求めた。

HEWL 溶液気液界面へのレーザー照射開始から 40~60 分程で、集光点に数 μm の分子集合体が形成された。レーザー照射を継続すると集合体は徐々に成長し、直径 150 μm を超える巨大分子集合体へと成長した。ラマン散乱強度は集合体形成・成長に伴い急激に増加し初期濃度の 20 倍程度 (~ 800 mg/mL) まで増加していることがラマン散乱測定より確かめられた (図 2)。

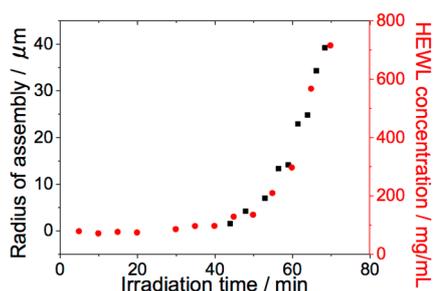


図 2. 集合体径とリゾチーム濃度の変化

レーザー照射を停止すると、集合体下部に多数の液滴の形成が観測された。形成された液滴およびその周辺の溶液のラマン散乱強度より、液滴中のリゾチーム濃度は約 250~300 mg/mL、その周囲でも 100~150 mg/mL となり、初期濃度 (40 mg/mL) に比べ高濃度状態になっている事が示された (図 3)。これより、液滴は局所的な濃度上昇による液液相分離により形成したと考えられる。そこで集合体成長過程でレーザーを on-off し、液滴形成の有無と HEWL 濃度の相関を調べたところ、集光点の HEWL 濃度が 200~500 mg/mL に達した際に液滴が形成されることがラマン散乱強度より示され、液滴形成閾値濃度は約 230 mg/mL と見積もられた。

この液滴は溶液下部へと沈降した後、徐々に縮小し 30 分ほどで消失した。液滴の消失に伴い、レーザー照射停止から 30 分~60 分ほどで数 μm のリゾチーム結晶が形成されているのが観測された。用いた溶液条件では自然核発生による結晶化には 24 時間以上を要するのに対し、レーザー照射した溶液では 1~2 時間程度で結晶形成が誘起されたことになる。形成された結晶の X 線単結晶構造解析より、レーザー照射により形成された結晶は自然核発生により形成された結晶と同じ構造・品質を持つ結晶であることも確かめている。

Fig. 2 にレーザー照射下における集合体直径と HEWL 濃度の変化を示す。HEWL 濃度は集合体の形成・成長に伴って急激に上昇し、最大で初期濃度の約 20 倍 (~800 mg/mL) まで上昇した。捕捉レーザーの集光点から離れた位置 (~50 μm) においても集合体の成長と同期した濃度増加が観測されている。加えて、高

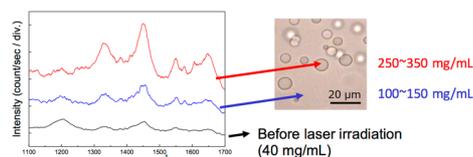


図 3. ラマンスペクトルによる液滴濃度決定

濃度液滴消失後の溶液中ではレーザー非照射溶液と比較して結晶形成数・結晶成長速度の上昇が確認されたが、液滴形成と結晶形成促進は集合体が形成された領域のみ (集光点から半径 200 μm 程度の領域) で顕著に観測されており、結晶形成促進との間に空間的な相関が見られた。

これらの結果より、気液界面において形成された集合体が足場となり捕捉レーザーの放射圧の有効作用領域外でのタンパク-タンパク間相互作用を誘起し、100 μm 以上の広範な領域における局所濃度上昇を可能にしている、すなわち、レーザー照射による短時間かつ高効率な結晶化はリゾチーム分子の界面でのレーザー捕捉により形成される集合体が引き金となり、通常バルク溶液中では為し得ない局所的な高過飽和状態が形成され、レーザー照射停止により分子の拡散により濃度が減少する過程において核形成領域、さらに濃度・過飽和度の低い結晶成長領域である準安定領域を過渡的に生じるために結晶化が高効率かつ迅速に引き起こされると考えられる。界面レーザー捕捉下での濃度変化の詳細な測定より、レーザー捕捉下における結晶化の機構を提案する事ができた。

(2) 『光圧により誘起された局所高濃度領域におけるタンパク分子配向の解明』

上記(1)の結果より、レーザー照射下、溶液中での高濃度ドメイン形成を示唆する結果が得られた。しかしながら、レーザー照射中には結晶形成は観測ず、レーザー照射下の溶液中では分子がある配向を持って固定されていることが示唆される。そこで、偏光ラマン散乱測定による分子配向の検討を行った。偏光解消度 (ρ) の算出は、変化の最も大きな Amide I のピークを用いて算出した。

捕捉レーザー非照射条件での HEWL 溶液の偏光ラマンスペクトルでは、励起光の偏光方向と観測光の相対角度によらず Amide I の偏光解消度 ρ は 0.32~0.36 でほぼ一定であった。一方、HEWL の正方晶の偏光ラマン散乱測定では Amide I ピークの偏光解消度は励起光と観測光の相対角度に依存し、相対角度が 45 度のとき最大値 $\rho=1.1$ を示した。結晶のような配向系では偏光解消度 ρ が大きな値を示すことが知られている。これらの結果より、リゾチームにおいてもランダム配向系である溶液中と配向系である結晶系では偏光解消度に大きな差が出ることが確認された。

次いで、捕捉レーザー照射下での HEWL 溶液の偏光ラマン散乱測定を行った。55~70 分

間のレーザー照射後、集光点近傍の HEWL 濃度が十分に大きくなった時点での偏光ラマンスペクトルを測定したところ、励起光と観測光の相対角度に依存した偏光解消度変化が観測され、 $\rho = 0.86$ とレーザー非照射の溶液と比べ大きな偏光解消度が得られた。これより、捕捉レーザー照射下でレーザーにより形成された高濃度領域中のリゾチーム分子は一様な方向に分子が配向した系になっていることが示された。HEWL 正方晶中の分子配向を ab 平面で見ると、結晶中の分子は 90° 回転しながら対称性が $P4_32_12$ となるような向きで配置されている。一方レーザーの電場により分子が配向する場合、電場方向に沿った同一方向を向いて配向すると予想される。すなわち電場により結晶中での分子配置とは異なる配向で固定されたことで、レーザー照射下での結晶化が抑制されていると考えられる。これらの結果より、界面レーザー捕捉によるリアルタイムなその場結晶化には、濃度制御に加えて分子配向の制御が必要不可欠であることが実験的に示された。

(3) 『結晶化対象タンパク質の拡張による方法論の一般化』

界面レーザー捕捉結晶化がリゾチーム以外のタンパクの結晶化にも有効であるのか？また、(1)、(2)より得られたレーザー捕捉によるリアルタイムな結晶化誘起には、濃度制御と配向制御の双方が必要との知見を確かめるため、捕捉対象タンパク質に対称性の高い球殻状超分子タンパク質であるフェリチンを用い、結晶化の検討を行った。試料には、L 型サブユニットのみからなり N 末端から 8 残基を削除したリコンビナント-L-フェリチン (Fer8) を用い、溶媒には近赤外レーザーの光熱効果を抑制するため重水を用いた。20 mg/mL Fer8 溶液 (0.1 M Tris-HCl buffer, pD = 7.0) と 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 wt% CdCl_2 の沈殿剤溶液を別々に調製、レーザー照射直前に同量調製し、試料溶液 (10 mg/mL Fer8; 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.1 wt% CdCl_2) とした。この試料溶液を密閉型セル溶液に滴下し、厚さ約 100 μm の液膜を形成した。捕捉レーザー光 (Nd:YAG, 1064 nm, 0.9 W) およびラマン励起レーザー光 (Ar+, 488 nm, 30 mW) は倒立顕微鏡の対物レンズ (40 \times , N. A. 0.95) を通して試料溶液の気液界面へ集光した。レーザー照射下における結晶化の挙動を CCD カメラで観察すると共に、ラマン散乱測定を行った。

Fer8 試料溶液への気液界面へ捕捉レーザー光を照射したところ、レーザー照射から約 20 分程度で集光点に微粒子が形成された。レーザー照射を続けると、微粒子が結晶へと成長する様子が観測された。形成された結晶は捕捉レーザーの集光点から外れながら徐々に成長する様子が観測された。このように、Fer8 ではリゾチームと異なりレーザー照射下、レーザーの集光点近傍から結晶が形成された (図 4)。

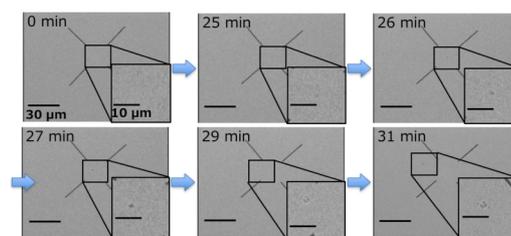


図 4. Fer8 のリアルタイムレーザー捕捉結晶化

レーザー照射下の *in situ* ラマン測定より、レーザー照射に伴いラマン強度が上昇し、結晶化時には初期濃度に比べ ~ 5 倍程度まで濃度が増加していることがわかる。すなわち、捕捉レーザー照射によって Fer8 の局所的な濃度上昇が誘起され、さらに Fer8 の高い対称性により、レーザー照射下におけるリアルタイムな結晶化を可能にしていると考えられる。この結果は、界面レーザー捕捉によるリアルタイムなその場結晶化には、濃度制御に加えて分子配向の制御が必要不可欠であることを示しており、現在レーザー捕捉下での分子配向制御を同時に行うことによるタンパク質のリアルタイムレーザー捕捉結晶化の検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① K.-J. Chen, Y.-C. Tsai, Y. Suzaki, K. Osakada, **A. Miura**, M. Horie, "Rapid and reversible photoinduced switching of a rotaxane crystal", *Nature Commun.*, 査読有, Vol. 7, 2016, 13321-13327.

DOI: 10.1038/ncomms13321

〔学会発表〕 (計 16 件)

① **A. Miura**, I. Yoshimatsu, K. Ueda, N. Kitamura, "Enhanced crystallization of proteins via optically induced microdroplet formation", 9th Asian Photochemistry Conference (APC 2016), 2016 年 12 月 4 日~12 月 8 日, Singapore (Singapore)

② K. Ueda, **A. Miura**, N. Kitamura, "Optically accelerated crystal formation of supramolecular protein molecules under laser trapping", HOKUDAI-NCTU International Joint Symposium on Nano, Opto and Bio Sciences, 2016 年 10 月 4 日~10 月 5 日, 北海道大学 (北海道・札幌市)

③ **A. Miura**, K. Ueda, I. Yoshimatsu, N. Kitamura, "Enhanced crystallization of proteins induced by laser trapping at the air/water interface", 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会, 2016 年 9 月 13 日~9 月 16 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

④ 上田 恭子, **三浦 篤志**, 喜多村 昇, 「レーザー捕捉によるタンパク質結晶化の顕微計測」, 2016 年光化学討論会, 2016 年 9 月 6 日~9 月 8 日, 東京大学駒場第一キャンパス (東京都・目黒区)

⑤ **三浦 篤志**, 「レーザートラッピング化学: 分子捕捉の分析化学への展開」, 光化学の新展

開-新規材料と分光-, 2016年8月13日, 関西学院大学(兵庫県・西宮市)

なし

⑥ 吉松 泉, 上田 恭子, 三浦 篤志, 喜多村 昇, 「レーザー誘起タンパク結晶化促進の顕微分光分析」, 第76回分析化学討論会, 2016年5月28日~5月29日, 岐阜薬科大学(岐阜県・岐阜市)

⑦ 三浦 篤志, 吉松 泉, 喜多村 昇, 「界面レーザー捕捉による局所的タンパク濃度上昇・結晶化促進の顕微分光」, 第63回応用物理学会春季学術講演会, 2016年3月19日~3月22日, 東京工業大学(東京都・目黒区)

⑧ 上田 恭子, 三浦 篤志, 喜多村 昇, 「界面レーザー捕捉により誘起されるタンパク質集合体・結晶形成の顕微計測」, 化学系学協会北海道支部2016年冬季研究発表会, 2016年1月19日~1月20日, 北海道大学(北海道・札幌市)

⑨ I. Yoshimatsu, A. Miura, N. Kitamura, "Light-induced huge assembly formation, dense liquid droplets formation and crystallization of protein at air/solution interface", The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015年12月15日~12月20日, Honolulu (U.S.A.)

⑩ 吉松 泉, 三浦 篤志, 喜多村 昇, 「光圧による局所的タンパク濃度上昇と結晶化促進機構」, 2015年第76回応用物理学会秋季学術講演会, 2015年9月13日~9月16日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

⑪ 吉松 泉, 三浦 篤志, 喜多村 昇, 「光の放射圧によるタンパク質の局所濃度上昇と光誘起結晶化」, 2015年光化学討論会, 2015年9月9日~9月11日, 大阪市立大学(大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0件)
- 取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~bunseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 篤志 (MIURA, Atsushi)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号: 90379553

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者