

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20550002

研究課題名（和文） 光圧誘起分子集合形成に基づく蛋白質の結晶作製の研究

研究課題名（英文） Crystallization of Proteins based on Molecular Assembling by Photon Force

研究代表者

坪井 泰之 (TSUBOI YASUYUKI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：00283698

研究成果の概要（和文）：光圧を用いれば、溶液中の「好きな位置に好きなタイミングで好きな濃度の」局所的な高濃度マイクロドメインを形成できる。そうして形成した微粒子は、結晶形成への格好の“核”となるのではないか？これが当初のアイデアである。

そこで、光圧誘起分子集合形成法を、ニワトリ卵白リゾチームの結晶形成に適用してみた<sup>11)</sup>。その結果、重水溶液中に光照射1時間～数時間で、焦点位置に極めて微小なリゾチーム集合体が確認された。その溶液を24時間静置し、結晶の形成の様子を観察したところ、レーザー未照射の試料では形成されないリゾチームの結晶が明確に観察された。このように、光圧は蛋白質の結晶形成に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated a novel technique to promote crystallization of hen egg-white lysozyme in heavy water. The technique was essentially based on aggregation of the protein molecules by photon pressure generated under irradiation of a cw 1064 nm laser beam to the protein solution. When photon pressure was kept being exerted for 1-2 hours on the sample solution, a small particle identified to the molecular aggregate of lysozyme was produced, as proved by in situ Raman microspectroscopy on the particle. Furthermore, we confirmed that aggregation of lysozyme by photon pressure led to crystallization of the protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：光圧、輻射力、放射圧、結晶化、プラズモン、分子集合体、アミノ酸、リゾチーム

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム創薬過程において蛋白質の構造解明が決定的な役割を担うが、蛋白質の結晶化自体が構造解明のボトルネックとなってきた。蛋白質の高次構造を解明する X 線回折には単結晶が必要であるが、単結晶を得るには熟練した技術と多くの時間が必要であり、新規かつ迅速な蛋白質結晶化手法が強く求められている。

一方我々はこれまでに、レーザーの集光位置に生じる光電場 (光圧) のポテンシャルを利用し、溶液中に均一に溶解した高分子を集合させるとともに、顕微分光法を用いて形成した集合体の構造変化を詳細に解明し、光圧によって高分子の相転移を誘起できることを実証してきた [業績文献 3, 12]。

申請者はこの方法論に着目した。つまり、光圧を用いれば、溶液中の蛋白質分子をレーザー光の集光位置に集合させ、局所的に濃度を上昇させることにより、核形成を誘起させ結晶化を促進できると考えた。

分子サイズが大きい分子ほどレーザー光の集光位置に集合しやすいため、この技術はこれまで困難とされていた巨大分子サイズの蛋白質を結晶化させる強力な手法になると考え、本研究を推進した。

## 2. 研究の目的

分子量の大きな蛋白質を用いることにより、光圧により形成される集合体から結晶核への相転移を顕微ラマン分光法で追跡し、結晶化機構の解明を目指した。これに基き、光圧誘起結晶化の方法論の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

- ① 光圧誘起結晶作成システムの構築
- ② 対象蛋白質系の拡張による方法論の一般的確立
- ③ 蛋白質分子集合体 / 微小結晶核の構造変化の分光学的解析

この三つのポイントから、光圧により形成される集合体から結晶核への相転移を顕微ラマン分光法で追跡する。レーザー強度や蛋白質濃度条件を最適化することにより、光捕捉した集合体から結晶核への相転移を in situ 顕微ラマン分光法で追跡する。さらに、結晶核に光圧を印加し続けられれば、結晶表面に蛋白質分子が結合していく結晶成長が期待できる。その過程を顕微ラマン分光法で追跡する。蛋白質分子表面の水の水和・脱水機構や立体構造変化を解析することにより、集合体から結晶成長までの相転移を解明することを目指した。

## 4. 研究成果

### (1) 卵白リゾチームの結晶化

—まず、タンパク質結晶化の研究によく用いられるニワトリ卵白リゾチームの結果を述べる。分子量 14,400、水溶液中の流体力学的半径 ( $r$ ) が 2 nm 以下のこのタンパク質は、(4)式より単純に見積もれば、 $U_{\text{trap}} > kT$  の光捕捉条件を満たさない。濃度 2.0 mM の重水溶液に対し、 $P_{\text{eff}} = 0.3 \text{ W}$  以上のレーザー強度で1時間以上の集光照射を行なったところ、暗視野観察にて Ar レーザーの後方散乱光により、かろうじて分子の捕捉・集合を確認することができた。集合体のラマンスペクトルは溶液中の参照スペクトルと一致し、実際にリゾチームが光捕捉されていることが確認された。

光捕捉条件  $U_{\text{trap}} > kT$  を満たすには、水溶液中の分子のサイズが  $r > 20 \text{ nm}$  を満たさなければならない。一方、試料溶液の動的散乱を測定してみたところ、 $r = 20 \sim 30 \text{ nm}$  に分布を有するピークが明瞭に観測された。この試料の濃度は過飽和に近く、リゾチーム分子鎖は相互の絡まり合いや水素結合などを介して、部分的に会合体を形成していると考えられる。つまり、このような大きな会合体が集光焦点位置で順次捕捉され、数時間かけて集合体に成長していったと考えられる。リゾチームの場合、この集合体が時として結晶核として働き、微結晶の形成にまで至ることが確認できた。

### (2) ヘムタンパク質の光共鳴型捕捉

次に、他のタンパク質に関する光捕捉についても紹介する<sup>7)</sup>。ヘムタンパク質であるミオグロビンとチトクロム c (馬心臓) について光捕捉の検討を行なった。これらの分子量と水溶液中のサイズは、先に述べたリゾチームの場合とそれほど大差はない。つまり、これらのヘムタンパク質は光捕捉条件  $U_{\text{trap}} > kT$  を満たさない。そして、これらの光捕捉実験は、会合体を形成しないような低濃度 (0.1 ~ 0.5 mM) で行なった。にもかかわら

ず、ミオグロビンでもチトクロムcでも、数10秒～数分以内という迅速な時間スケールでの分子集合体形成が観測された。もちろん、この分子集合体は可逆的に形成され、レーザー照射をストップすれば消失する。集合体のラマンスペクトルは水溶液中のチトクロムcのスペクトルとよく一致し、チトクロムcが迅速に光捕捉されたことが示された。定性的には同様の現象がミオグロビンでも明瞭に観測された。

ヘムタンパク質でこのような迅速な光捕捉・分子集合の原因として、我々はヘムによる捕捉光( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ )の吸収を考えている。最近、大阪府立大の石原らは、捕捉用の光に対し捕捉物質が共鳴吸収を持つ場合には光捕捉の力が最大に1万倍程度まで増幅される「光共鳴ナノ粒子操作」の概念を提唱している。この場合、光共鳴するナノ粒子(分子)は強く光にひきつけられ、吸収したエネルギーは熱に変換する前に光散乱が起こり、熱分解は無視できることが示されている。我々が観測した迅速な光捕捉現象は、この光共鳴機構を実証する例となるかもしれない、現在理論計算を行なっているところである。

### (3) プラズモン増強電場に基くナノ粒子の光捕捉の実現

貴金属ナノアンテナにおけるプラズモン増強された放射圧より、マイクロなナノ粒子が捕捉されることは理論的に予見されてきた。我々は高輝度集光レーザービームを用いたconventionalな光捕捉の研究を小さな分子系を対象にも行なってきたが、強い光強度( $> \text{MW}/\text{cm}^2$ )を必要とする。一方、プラズモン増強場を用いれば捕捉に必要な光強度は著しく減ずることができる。このような増強電場で形成された集合体は、結晶核になりえるかもしれない。

金ナノ粒子が規則配列した基板をプラズモン増強場として使用した。この基板を用いて、発光性量子ドット(CdSe/ZnS)を対象に、プラズモン増強光捕捉を試みた。局在プラズモンを励起する近赤外光をon-off変調しながら、量子ドットの発光を共焦点顕微鏡で分光観察した。量子ドットの発光はプラズモン励起に鮮やかに対応して消光や増大を示し、金ナノ粒子近傍に光捕捉され

る様子が観測された。今のところ、世界最弱の光強度(数 $\text{kW}/\text{cm}^2$ )で世界最小の粒子(10 nm)の捕捉を実現しており、捕捉ポテンシャルや量子ドット運動の動力学の定量的な考察を進めている。

さらに、石光共鳴効果を利用するアプローチに着手しており、ナノ粒子が共鳴吸収波長においてはプラズモン光捕捉が促進されることを見出している。また、蛍光ラベルした鎖状高分子のプラズモン光捕捉にも成功し、興味深い結果を得ている。今後は、このようなプラズモン増強捕捉を蛋白質結晶作製に展開を目指す。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

(1) “Acceleration of a Photochromic Ring-Opening Reaction of Diarylethene Derivatives by Excitation of Localized Surface Plasmon”

Yasuyuki Tsuboi, Ryosuke Shimizu, Tatsuya Shoji, and Noboru Kitamura

*J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* 2011, 印刷中  
査読有

(2) “局在プラズモンを用いた光化学反応の効率化とナノ粒子の光捕捉”

坪井 泰之

*化学工業* 62 巻 5 号 (2011), 46-52. 査読有

(3) “Enhancement of 2-Photon Absorption of a Dye in a Polymer Microsphere Based on an Optical Cavity Effect”

Yasuyuki Tsuboi, Ryosuke Shimizu, Tatsuya Shoji, and Noboru Kitamura

*Anal. Sci.* Vol. 26, No. 12 (2010) 1241-1245.

査読有

(4) “Optical Trapping of Quantum Dots Based on Gap-Mode Excitation of Localized Surface Plasmon”

Yasuyuki Tsuboi, Tatsuya Shoji, Noboru Kitamura, Mai Takase, Kei Murakoshi, Yoshihiko Mizumoto, and Hajime Ishihara

*J. Phys. Chem. Letters*, Vol. 1, No. 15 (2010) 2327-2333. 査読有

(5) “Optical Manipulation of Amino Acids in Aqueous Solution”

Yasuyuki Tsuboi, Tatsuya Shoji, and Noboru Kitamura,

*J. Phys. Chem. C*, Vol. 114, No. 12 (2010), 5589–5593.. 査読有

(6) “レーザー転写によるシリコンバイオセンサの作製”

坪井 泰之

*材料の科学と工学* 47 巻 5 号 (2010), 18-22. 査読有

(7) “Near-Infrared CW Light can Drive 2-Photon Photochromism with a Great Help from Localized Surface Plasmon”

Yasuyuki Tsuboi, Ryosuke Shimizu, Tatsuya Shoji, and Noboru Kitamura

*J. Am. Chem. Soc.* Vol. 131 (2009), 12623–12627 査読有

(8) “Optical Manipulation of Proteins in Aqueous Solution”

Yasuyuki Tsuboi, Tatsuya Shoji, Masayuki Nishino, Seiji Masuda, Koichiro Ishimori, and Noboru Kitamura\*

*Appl. Surf. Sci.* Vol. 255, No. 24 (2009) 9906-9908. 査読有

(9) “Phase Transition Dynamics of Fluorescent-Labeled

Poly(*N*-isopropylacrylamide) in Aqueous Solution as Revealed by Time-Resolved Spectroscopy Combined with a Laser T-Jump Technique”

Yasuyuki Tsuboi, Yasuhiro Yoshida, Noboru Kitamura, Kaoru Iwai

*Chem. Phys. Lett.* Vol. 486, No. 1 (2009) 42-45. 査読有

(10) “ソフトマテリアルのレーザー計測・操作・プロセス”

坪井 泰之

*電気学会技術報告* 第 1157 号 (2009) 31-33. 査読有

(11) “光圧を用いたタンパク質のナノ集合体形成と分光”

坪井 泰之・東海林竜也・喜多村 昇

*生物物理*, 49 巻 5 号 (2009) 252-255. 査読有

(12) “プラズモン吸収に基づくポリマーフィルムของ ナノホール加工”

山田和志・坪井 泰之

*レーザー加工学会誌*, 16 巻 2 号 (2009) 38-41. 査読有

(13) “Nanohole Processing of Polymer Film Based on the Laser-Induced Superheating of Au Nanoparticles”

Kazushi Yamada, Tamitake Itoh, Yasuyuki Tsuboi *Appl. Phys. Express*, Vol. 1, No. 8 (2008) 087001. 査読有

(14) “Phase Separation Dynamics of Aqueous Solutions of Thermo-Responsive Polymers Studied by a Laser T-Jump technique”

Yasuyuki Tsuboi, Yasuhiro Yoshida, Noboru Kitamura

*J. Phys. Chem. B*, Vol. 112, No. 9 (2008) 2562-2565. \*速報欄に掲載. 査読有

(15) “Laser-Induced Shock Wave Can Spark Mechanoluminescence of Amorphous Sugars”

Yasuyuki Tsuboi, Toshiaki Seto, Noboru Kitamura

*J. Phys. Chem. A*, Vol. 112, No. 29 (2008) pp. 6517-6521. 査読有

(16) “Laser-Induced Reversible Volume Phase Transition of a Poly(*N*-isopropylacrylamide) Gel Explored by Raman Microspectroscopy”

Yasuyuki Tsuboi, Masayuki Nishino, and Noboru Kitamura

*Polymer J.*, Vol. 40, No. 4 (2008) pp. 367-374. 査読有

(17) “Preparation of Silver Nanoparticles by Laser Ablation in polyvinylpyrrolidone Solutions” Takeshi Tsuji, Y. Okazaki, Yasuyuki Tsuboi, and Masaharu Tsuji

*Appl. Surf. Sci.*, Vol. 254, No. 16 (2008) pp. 5224-5230 査読有

(18) “レーザーで拓く刺激応答性高分子の新展開”

坪井 泰之・喜多村 昇

*光化学*, 39 (2008) 32-36.

査読有

(19) “Crystallization of Lysozyme Based on Molecular Assembling by Photon Pressure”

Yasuyuki Tsuboi, Tatsuya Shoji, Noboru Kitamura

*Jpn. J. Appl. Phys.* Vol. 46, No. 49 (2007) pp.L1234 - L1236. 査読有

(20) “Laser-Induced Forward Transfer of Luciferase onto a PDMS Microchip as an ATP Sensor”

Yasuyuki Tsuboi, Yosuke Furuhashi, Noboru Kitamura

*Appl. Surf. Sci.*, Vol. 253, No. 20 (2007) 8422-8427. 査読有

(21) “Phase Separation of Aqueous Poly (vinyl methyl ether) Solutions Induced by The Photon

Pressure of a Focused Near Infrared Laser Beam”  
Yasuyuki Tsuboi, Masayuki Nishino, Yasutaka  
Matsuo, Kuniharu Ijio, Noboru Kitamura  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 80 No. 10 (2007) pp.  
1926-1931. 査読有  
(22) “Nanosecond-Time-Resolved Observations  
of Laser Ablation of Noble Metals in Water”  
Takeshi Tsuji, Y. Okazaki, Yasuyuki Tsuboi, and  
Masaharu Tsuji  
*Jpn. J. Appl. Phys.* Vol. 46 No. 4A (2007) pp.  
1533-1535. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

① “局在プラズモンで誘起する非線形光化学”

坪井 泰之

2011 世界化学年記念 JST さきがけ研究領域  
合同シンポジウム「人類の危機に挑む研究開  
発：光と太陽エネルギー」、日本化学会 第 91  
春季年会

2011 年 3 月 28 日 於 神奈川大学.

② “局在プラズモン増強光電場を用いたナ  
ノ粒子の光捕捉”

坪井 泰之

日本分光学会 高感度表面・界面部会 第三  
回シンポジウム

2010 年 12 月 3 日 於 産総研つくばセンタ  
ー.

③ “Laser Chemistry of Soft Materials”

Yasuyuki Tsuboi

*The 1st International Symposium on Advanced  
Soft Materials* (Nov. 25-26, 2010, Kumamoto,  
Japan).

④ “プラズモン増強電場でナノ粒子を捕ま  
えて観る”

坪井 泰之

平成 22 年 電気学会 電子・情報・システム  
部門大会 企画シンポジウム「ビームマニピ  
ュレーションによるレーザープロセッシング」

2010 年 9 月 2, 3 日 於 熊本大学.

⑤ “Optical Trapping of Bio-molecules and  
Nanoparticles Based on Resonance and Surface  
Plasmon”

Yasuyuki Tsuboi

*11th International Symposium on Laser Precision  
Microfabrication* (LPM 2010)

June 7-10, 2010, Stuttgart, Germany

⑥ “Optical Trapping of Bio-molecules and  
Nanoparticles”

Yasuyuki Tsuboi

*The 7th Asia-Pacific Laser Symposium 2010*,  
May 15 - 20, 2010, Jeju Island, Korea

⑦ “フォトン・フォースで蛋白質分子を捕ま  
える”

坪井 泰之

第 47 回日本生物物理学会 年会

2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日 於 徳島文  
理大学.

⑧ “Molecular Trapping and Microspectroscopy  
of Biomolecules”

Yasuyuki Tsuboi

*International Meeting on Interdisciplinary  
Chemistry 2009 at Ikaho* (Sep. 18-19, 2009  
Gunma, Japan)

⑨ “バイオ・ソフトマテリアルへのレーザ  
ー応用”

坪井 泰之

電気学会年次大会 企画シンポジウム「レー  
ザプロセッシングの新潮流」

2009 年 3 月 19 日 於 北海道大学.

⑩ “パルス/CW レーザーのバイオ/ソフトマ  
テリアルへの新規な応用”

坪井 泰之

レーザー学会学術講演会第 29 回年次大会  
2009 年 1 月 10～12 日 於 徳島大学.

⑪ “光増強場における多光子光化学反応誘  
起”

坪井 泰之

2008 年春季第 55 回応用物理学会学術講演会、  
2008 年 3 月 27～30 日 於 日本大学 (船橋)

⑫ “Pulsed/CW Laser Chemistry of Bio- and Soft  
Materials”

Yasuyuki Tsuboi

*International Conference on Fundamentals of  
Laser Assisted Micro- & Nanotechnologies:  
FLAMN-07* (June 25-28, 2007, St. Petersburg,  
Russia).

[図書] (計 3 件)

① “レーザーを用いた蛋白質の結晶化”

坪井 泰之 (分担執筆)

“基礎研究を基盤とする化学の夢ロードマ  
ップ”

日本化学会 学術研究活性化委員会 編  
(2011) 印刷中.

② “New Laser Chemistry of Stimuli-Responsive  
Polymer”

坪井 泰之 (分担執筆)

*“Molecular electronics and related materials —  
Control and probe with light”*

T. Naito et al. eds. RESEARCH SIGNPOST ,  
Chapter 12, Ed., T. Naito, Transworld Research  
Network, Kerala/India, pp. 243-260, 2010.

③ 「レーザープロセスの基礎過程」

坪井 泰之 (分担執筆)

“最新レーザープロセッシングの基礎と産  
業応用”

杉岡幸次・坪井 泰之・他 共編, 電気学会/オ  
ーム社, pp. 53~54, 71~84 東京 (2007)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 泰之 (TSUBOI YASUYUKI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：00283698

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし