

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18985

研究課題名（和文）レーザーと微小空間界面を駆使したタンパク質のリアルタイム結晶化

研究課題名（英文）Real-time crystallization of protein molecules by surface laser trapping in a restricted mesoscopic space

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はタンパク質のin situかつリアルタイムなレーザー捕捉誘起結晶化の実現に向けた検討を行い、マイクロバブル界面がタンパク質分子のレーザー捕捉結晶化に対して有用であること、捕捉レーザー光により形成される高濃度領域へ外部摂動としてのパルスレーザー光をシングルショットで導入することにより、結晶形成の時間と空間を制御したタンパク質分子の時空間制御結晶化が可能であること、捕捉レーザー光照射下におけるタンパク質分子の異方的配向・配置の詳細を明らかにし、分子配向制御により時空間制御タンパク質in situかつリアルタイムなレーザー捕捉誘起結晶化が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、タンパク質の結晶作製は旧態依然とした試行錯誤的な方法や運に依存している。結晶化スクリーニングに要する結晶化時間の短縮と結晶形成率の高効率化が可能な新規結晶作製手法の開発が必要とされているがそのような手法は未だない。本研究成果はレーザー捕捉法を利活用することでこれまで誰も為し得なかった短時間、in-situかつリアルタイムなタンパク結晶化を可能とするものであり、学術的にも産業・興行的にも意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the in situ and real-time laser trapping-induced crystallization of proteins. We revealed that (1) the microbubble interface is useful for laser-induced crystallization of protein molecules, (2) it is possible to control the time and space of crystal formation by introducing a single shot of pulsed laser light as an external perturbation into the high concentration region formed by the trapping laser light, (3) the anisotropic orientation and arrangement of protein molecules under the trapping laser light irradiation can be clarified in detail. We also clarified the details of the anisotropic orientation and arrangement of protein molecules under trapping laser irradiation, and it is possible to perform in situ and real-time laser trapping-induced crystallization of spatio-temporally controlled proteins by controlling molecular orientation.

研究分野：分析化学

キーワード：タンパク質 レーザー捕捉 結晶化 分子配向制御

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、タンパク質の結晶作製は旧態依然とした試行錯誤的な方法や運に依存している。近年、宇宙空間の微小重力場を利用した高品質の結晶作製や、マイクロ流体デバイスを用いた結晶作製、高強度フェムト秒パルスレーザー照射による結晶化誘起が試みられているが、これらのアプローチでは依然として多大な労力と時間を必要とする。結晶化スクリーニングに要する結晶化時間の短縮と結晶形成率の高効率化が可能な新規結晶作製手法の開発が必要とされているがそのような手法は未だない。

界面レーザー捕捉法は、集光点での局所的な濃度上昇と高濃度液滴形成を誘起し、不飽和溶液からでも集光点からたった一つだけの結晶を *in situ* かつリアルタイムに形成可能である。これまでに我々は、グリシンやプロリンといったアミノ酸の不飽和溶液界面でのレーザー捕捉により、集光点からの高濃度液滴形成と形成された高濃度液滴からの *in situ* かつリアルタイムな結晶形成が可能であることを報告している。しかしながら、結晶化のモデルタンパク質として用いられるリゾチームにおいてさえ、レーザー捕捉結晶化の最大の特長・利点である「集光点からのたった一つの結晶の *in-situ* かつリアルタイムな形成」は成し遂げられていなかった。

一方、申請者は本研究課題開始時に於いて、タンパク質溶液の気液界面へのレーザー照射により誘起・形成された高濃度領域におけるタンパク質分子の捕捉レーザーの偏光方向に依存した結晶中での分子配向・配列とは異なる様式での様な方向の配向・配列を示唆する結果を顕微分光により見いだしており、結晶化過程における分子配向の分光学的理解が *in situ* かつリアルタイムなタンパク質の結晶化には必要不可欠であるとの考えのもと、本研究を着想した。

2. 研究の目的

界面レーザー捕捉結晶化法では光圧と微小物体の相互作用により集光点での局所的濃度上昇・高濃度液滴形成を誘起し、不飽和溶液からもたった一つの結晶を集光点からリアルタイムかつ短時間にその場で形成可能である。本手法は、結晶化の学理を研究可能な手法としても実践的結晶化法としても高いポテンシャルを秘めているが、動的な界面である開放系の気液界面に高強度レーザー光を照射して分子クラスターを捕捉する必要があり技術的に難しい。さらに研究開始時に於いて、界面レーザー捕捉結晶化法による集光点からのリアルタイムなその場結晶化はアミノ酸の様な小さな分子に限られており、巨大分子であるタンパク質ではリアルタイムなその場結晶化は未報告であった。また、界面レーザー捕捉結晶化には、(a)動的な気液界面を捕捉場とするため一定点での安定なレーザー捕捉が難しい、(b)集光点への物質輸送を溶液中の分子の拡散と緩やかな熱対流に依存しており集光点近傍での濃度上昇速度が遅い、(c)ミリメートルスケールに達する広域な高濃度領域で多数の結晶が形成されるため結晶形成位置を正確に決定・制御することが難しいといった問題点があった。本研究では、レーザー光とマイクロ流路デバイスを駆使して時間と空間を制御したタンパク質分子の *in situ* かつリアルタイムなレーザー捕捉誘起結晶化法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

上述の問題を解決し時空間制御されたタンパク質の *in situ* かつリアルタイムなレーザー捕捉誘起結晶化を成し遂げるためには、微小空間においてレーザー捕捉誘起結晶化を行うための方法論を開発するとともに、結晶化過程においてレーザー光により異方的な分子配向状態をとるタンパク質分子群を分光学的に精密に計測する方法論を構築する必要がある。そこで本研究では以下の3点に関して検討した。

(1) 『マイクロバブル界面におけるレーザー捕捉誘起結晶化の検討』: 静的かつ安定な気液界面においてレーザー捕捉を行うための微小空間結晶化場としてマイクロ流路デバイス中でマイクロバブルを形成し、この気液界面を捕捉場・結晶化場として利用する。これに向けマイクロ流路デバイスを作製し、作製した流路中における界面レーザー捕捉誘起高濃度領域の形成とその後に誘起されると期待される結晶化の検討を行った。

(2) 『外部摂動レーザー光による *in situ* 結晶化誘起の検討』: 界面レーザー捕捉により集光点近傍のタンパク質濃度をレーザー集光点のみで局所的に著しく増加させることが可能である。これはレーザー照射下において、結晶化に適した過渡的な過飽和状態が形成されていることに等しく形成された高濃度領域では *in situ* かつリアルタイムな結晶化が誘起可能であると期待される。そこで、このレーザー誘起高濃度領域へ外部摂動レーザー光を照射することで即時のタンパク質結晶化が可能であるかを検討した。

(3) 『顕微分光によるタンパク質分子の配向状態の検討』: 捕捉レーザー照射下の集光点近傍で形成される高濃度領域では、タンパク質分子はレーザー非照射の溶液と異なる異方的な配向をとることを示唆する結果を申請者らは得ている。しかしながらその詳細に関しては未解明である。結晶化には濃度のみならず分子配向・配置の制御が必要であり、レーザー照射下におけるタンパク質分子の結晶化を任意に制御するためには、レーザー照射下、結晶化に至る過程でタンパク質分子がどのような配向・配置をとっているのかを明らかにする必要がある。そこで顕微偏光ラマンシステムによりレーザー照射下のタンパク質分子群がとる異方的な分子配向状態を検討した。

4. 研究成果

(1) 『マイクロバブル界面におけるレーザー捕捉誘起結晶化の検討』

シリコン基板上にフォトリソグラフィにより作製した鋳型を用い、PDMS によりマイクロ流路を作製し、これを ITO 基板に貼り合わせてマイクロ流路デバイスを作製した。タンパク質試料として精製済みのニワトリ卵白リゾチーム (Lyz) を用い、Lyz 濃度 40 mg/mL (NaCl, 2.0 wt%; pD 5.1) の試料溶液を調製し、ITO 基板/溶液界面へ 1064 nm 捕捉レーザー光を照射 (<200 mW) したところ、集光点を中心とした直径数十 μm のマイクロバブルを安定に形成させることに成功した。次いで、このバブル界面へ 532 nm 捕捉レーザー光 ($\sim 1\text{ W}$) を照射し結晶化を促したところ、レーザー照射開始から数分~数十分でバブル界面近傍からの Lyz 結晶の形成が確認された。本結果より、マイクロ流路中で生成させたマイクロバブル界面がタンパク質分子のレーザー捕捉結晶化に対して有用であることが示された。

さらに、結晶形成確認後に捕捉レーザー照射を停止し結晶成長過程の観測を行ったところ、 $\sim 50\ \mu\text{m}$ 以上までの結晶成長を示す場合

(図 1) と短時間のうちに結晶が溶解し消失する場合の二つのケースが観測された。後者は過渡的かつ局所的なレーザー捕捉により形成された高濃度領域が、捕捉レーザー照射停止により消失することによると考えられリズナブルな結果である。一方、前者の結晶成長を示した系は濃度低下にもかかわらず結晶成長の駆動力を保つ系として非常に興味深く、本実験系で構築した限定された微小空間においてのみ発現する特異なケースであると考えられる。現在、顕微ラマン分光計測による溶液中のタンパク質分子濃度や配向状態の詳細な分析を進めており、これらの結果からこの特異な結晶成長の機構を明らかにする予定である。

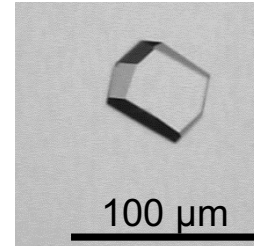


図 1 バブル界面で生成、成長した Lyz 結晶

(2) 『外部摂動レーザー光による in situ 結晶化誘起の検討』

上記と同様の試料溶液を用い、密閉型セル内の厚さ約 100 μm の試料溶液液膜へ 1064 nm 捕捉レーザー光 ($\sim 0.8\text{ W}$) と配向制御用パルスレーザー光を倒立顕微鏡の対物レンズを通して同軸で照射・集光し結晶化挙動を検討した。

まず始めに、30分~60分間捕捉用レーザー光を照射して高濃度領域を形成させた(図 2a)。形成された高濃度領域へ配向制御用のナノ秒パルスレーザー ($5\ \mu\text{J}/\text{pulse}$, 10 ns, $1.6\text{ kW}/\text{cm}^2$) を一発のみ照射したところ、パルスレーザー照射数秒後に顕微鏡下で目視により確認可能な $<1\ \mu\text{m}$ 程度の微小な固体の生成が確認された(図 2b)。その後、生成した微小固体は数百秒には長軸方向が $\sim 3\ \mu\text{m}$ 程度の大きさまで成長した(図 2c)。図 2b~2c に示した過程において、生成した微小固体の偏光クロスニコル観察を行ったところ結晶特有の複屈折性が観測された。

また、この微小固体の顕微ラマンスペクトルを測定したところ、Lyz 結晶特有のラマンスペクトルが観測された。これらの結果より、パルスレーザー照射により生成した微小固体は外部摂動レーザー光により in situ かつリアルタイムにその場で誘起された Lyz 結晶であることが確認された。これらの結果は捕捉レーザー光により形成される高濃度領域へ外部摂動としてのパルスレーザー光をシングルショットで導入することにより、結晶形成の時間と空間を制御したタンパク質分子の時空間制御結晶化が可能であることを示している。我々の知る限り、これは世界で初めてのタンパク質のリアルタイムかつ in situ な時空間制御結晶化である。

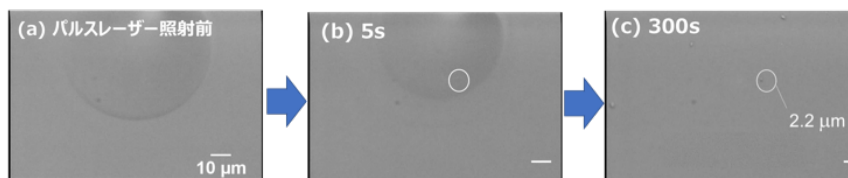


図 2 外部摂動 ns パルスレーザー照射による結晶形成。(a) 外部摂動パルスレーザー照射前、(b)照射 5 秒後、(c)照射 300 秒後。スケールバー: 10 μm 。

(3) 『顕微分光によるタンパク質分子の配向状態の検討』

上記と同様の実験条件において、密閉型セル内の厚さ約 100 μm の試料溶液液膜へ 1064 nm 捕捉レーザー光を照射し高濃度領域を形成させた際の Lyz 分子の配向状態を in situ 顕微偏光ラマン計測により検討した。ラマン励起光には直線偏光した 532 nm レーザー光を用い、捕捉レーザー光とラマン励起光を同軸で導入し試料溶液の気液界面の同一点に集光した。試料からのラマンシグナルを冷却型分光用 CCD カメラを用いて測定した。励起光と散乱光の偏光面を制御した偏光ラマンスペクトル測定においては、励起光と散乱光の偏光面が直交する場合と平行な場合のラマン強度比である偏光解消度から結晶や分子集合体中における分子の配向に関する情報が得られる。結晶の様な配向系の場合、励起光の偏光方向に依存して偏光解消度が変化するのに対し、一方、通常の溶液のようなランダムに分子が分散した

系においては、励起光の偏光方向に依存せず偏光解消度の値は一定となる。すなわち、偏光解消度からレーザー捕捉下におけるタンパク質分子の分子配向に関する情報が得られる。

捕捉レーザー照射下の Lyz 溶液について偏光ラマン測定を行ったところ、捕捉レーザー照射時間の増加に伴う偏光解消度の増加が確認された。捕捉レーザー照射下の Lyz 溶液における偏光解消度 (>0.6) は、捕捉レーザーを照射していない Lyz 溶液における偏光解消度 ($0.2\sim 0.3$) と比較して ~ 3 倍程度高い値を示しており、捕捉レーザー照射により生成した高濃度領域中の Lyz 分子が高度に配向していることが確認された。角度分解偏光ラマン測定結果より、捕捉レーザー光の偏光方向に依存して Lyz 分子の配向方向が変化していることも示された。更に詳細な測定と解析より、捕捉レーザー照射下の Lyz 分子はレーザーの偏光方向とある一定の角度を保って配向・配置しており、これは結晶中における Lyz 分子の配向・配置と全く異なる事も明らかになった。これらの結果を基に、極めて簡便な捕捉レーザーの偏光制御により分子配向制御が可能となり、これまで不可能であった時間と空間を制御したタンパク質分子の *in situ* かつリアルタイムなレーザー捕捉誘起結晶化が可能であることを見いだした。本結果に関しては投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Ryosuke, Miura Atsushi, Abe Sayaka, Kitamura Noboru	4. 巻 93
2. 論文標題 Optical Trapping?Polarized Raman Microspectroscopy of Single Ethanol Aerosol Microdroplets: Droplet Size Effects on Rotational Relaxation Time and Viscosity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5218 ~ 5224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c05406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miura Atsushi, Nohara Riku, Nojima Azumi, Kitamura Noboru	4. 巻 93
2. 論文標題 Laser-Induced Single-Molecule Extraction and Detection in Aqueous Poly(N-isopropylacrylamide)/1-Butanol Solutions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3202 ~ 3208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c04673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miura Atsushi, Nakajima Ryosuke, Abe Sayaka, Kitamura Noboru	4. 巻 124
2. 論文標題 Optical Trapping?Microspectroscopy of Single Aerosol Microdroplets in Air: Supercooling of Dimethylsulfoxide Microdroplets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 9035 ~ 9043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.0c06179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Mari, Yoshida Masaki, Fujii Sho, Miura Atsushi, Ueno Kosei, Shigeta Yasuhiro, Kobayashi Atsushi, Kato Masako	4. 巻 56
2. 論文標題 Liquid?liquid interface-promoted formation of a porous molecular crystal based on a luminescent platinum(ii) complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12989 ~ 12992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC04164E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Kizuku, Fujii Sho, Sun Quan, Miura Atsushi, Ueno Kosei	4. 巻 152
2. 論文標題 Further enhancement of the near-field on Au nanogap dimers using quasi-dark plasmon modes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 104706 ~ 104706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5142569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Kizuku, Fujii Sho, Sun Quan, Miura Atsushi, Ueno Kosei	4. 巻 152
2. 論文標題 Further enhancement of the near-field on Au nanogap dimers using quasi-dark plasmon modes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 104706 ~ 104706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5142569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 中筋 裕香, 三浦篤志, 藤井翔, 上野貢生
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 篤志
2. 発表標題 レーザー誘起単一ピコリットル高分子微粒子を分析場とする微量物質抽出・計測
3. 学会等名 日本分析化学会 第80回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sayaka Abe, Atsushi Miura, Sho Fujii, Noboru Kitamura
2. 発表標題 Size dependent viscosity change of single levitated aerosol droplet by laser trapping-microspectroscopy
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島雄人, 藤井 翔, 孫 泉, 三浦篤志, 上野貢生
2. 発表標題 分子振動 光学モード結合による振動スペクトルの変調を利用した分光分析システム
3. 学会等名 化学系学協会北海道支部2020年冬季研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷岡恵利奈, 藤井翔, 三浦篤志, 上野貢生
2. 発表標題 新規NADH型Ru(II)錯体の合成と機能評価
3. 学会等名 化学系学協会北海道支部2020年冬季研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田 築, 藤井 翔, 孫 泉, 三浦篤志, 上野貢生
2. 発表標題 準ダークブラズモンモードを用いた高感度表面増強ラマン散乱分析
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sho Fujii, Erina Tanioka, Atsushi Miura, Kosei Ueno
2. 発表標題 Syntheses and Characterization of Ruthenium Complexes Bearing 2-(2-Pyridyl)-1H-imidazole[4,5-b]pyridine Ligand
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Nakasuji, A. Miura, K. Ueno, N. Kitamura
2. 発表標題 Spectroscopic study on molecular orientations of proteins under laser trapping for in situ and real-time crystallization
3. 学会等名 10th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE10) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中筋裕香, 三浦篤志, 上野貢生
2. 発表標題 界面レーザー捕捉下におけるタンパク質分子配向の顕微計測
3. 学会等名 第2回「ソフトクリスタル」・「革新的光 - 物質変換」合同若手研究者育成シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中筋裕香, 三浦篤志, 上野貢生, 喜多村昇
2. 発表標題 界面レーザー捕捉下におけるタンパク質分子配向の顕微計測
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中筋裕香, 三浦篤志, 上野貢生
2. 発表標題 レーザー捕捉下における分子配向の顕微計測: レーザー誘起リアルタイムタンパク質結晶化に向けて
3. 学会等名 第35回分析化学緑陰セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中筋 裕香, 三浦篤志, 藤井翔, 上野貢生
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Miura
2. 発表標題 Photoinduced Single Sub-Picolitter Microparticle-Based Ultratrace Analysis at Single Molecule Level
3. 学会等名 14th Hokkaido University, Nanjing University, NIMS/MANA Joint Symposium, "Designed Chemistry for Future" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A. Miura, A. Nojima, R. Nohara, N. Kitamura.
2. 発表標題 Photoinduced smart polymer microparticles utilized ultratrace analysis at single molecule level
3. 学会等名 18th International Symposium on Advanced Organic Photonics (ISAOP-18) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Nakasuji, A. Miura, N. Kitamura
2. 発表標題 Nucleation and Crystallization of Protein Molecules Controlled by Laser Beams
3. 学会等名 14th Hokkaido University, Nanjing University, NIMS/MANA Joint Symposium, "Designed Chemistry for Future" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Abe, A. Miura, N. Kitamura
2. 発表標題 Viscosity of Levitated Single Aerosol Water Droplets Studied by Laser Trapping - Time-Resolved Microspectroscopy
3. 学会等名 14th Hokkaido University, Nanjing University, NIMS/MANA Joint Symposium, "Designed Chemistry for Future" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中筋 裕香, 上田 恭子, 吉松 泉, 三浦 篤志, 喜多村 昇
2. 発表標題 Optically accelerated crystallization of supramolecular protein molecules under laser trapping
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中筋裕香, 三浦篤志, 喜多村昇
2. 発表標題 レーザー誘起分子配向制御によるタンパク質の時空間制御結晶化の試み
3. 学会等名 2018年光化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中筋裕香, 三浦篤志, 喜多村昇
2. 発表標題 光誘起配向制御によるタンパク質の時空間制御結晶化
3. 学会等名 第34回分析化学緑陰セミナー
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤井 翔 (Fuji i Sho) (90725425)	北海道大学・理学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------