

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13380

研究課題名(和文) フェムト秒レーザーによるタンパク質結晶成長モードの時空間制御

研究課題名(英文) Active control of growth mode of organic molecules by femtosecond laser

研究代表者

森 勇介 (MORI, YUSUKE)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：90252618

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)：“フェムト秒レーザー照射による結晶表面への渦巻き成長誘起”現象について、原理
解明を行った。

対象とする物質に応じて、レーザー照射条件の最適値(特に照射パルス数)があり、照射パルス数が少ない場合には渦巻き成長が誘起されず、逆に多すぎる場合には渦巻き成長誘起とともに多結晶化が起こることが分かった。X線トポグラフィ観察により、レーザー集光位置かららせん転位が発生し、これを中心にうずまき成長丘ができることが示された。本手法で育成した結晶は単結晶性を維持し高品質であり、さらに内包する不純物量が少ないことが分かった。結果として本手法は、成長促進に加え、高品質化を促す可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the principle of “an approach for promoting the growth of protein crystals by directly switching the crystal growth mode by femtosecond laser ablation”. We demonstrated that protein crystals with surfaces that are locally etched by femtosecond laser ablation show enhanced growth rates without losing crystal quality. There were appropriate laser irradiation conditions (especially the total pulse number) depending on materials. Fewer laser pulse number could not induce a spiral growth, contrary too many laser pulse number induced also poly crystals. Optical phase-sensitive microscopy and X-ray topography imaging techniques revealed that the local etching induces a screw dislocation then a spiral growth began from the screw dislocation. These findings prove that femtosecond laser ablation can actively switch the crystal growth mode, offering flexible control over the size and shape of protein crystals.

研究分野：総合理工

キーワード：光プロセッシング タンパク質結晶

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造は生体内での機能解明やドラッグデザインに欠かせない情報であるが、X線・中性子線構造解析に適した良質で大きなバルク状の単結晶作製がボトルネックとなり、構造が未決定の材料が多く残っている。単結晶成長は「核生成過程」とその後の「成長過程」の2つに大きく分けられるが、構造が未決定な材料ではそのいずれもが困難な状況にある。申請者らはこれまでフェムト秒レーザーを育成溶液に照射することで核発生を誘起する技術を開発し、多くの難結晶性タンパク質・有機分子の結晶化に成功してきた(例えば、Nature (2006) 442, 419、PNAS (2009) 106, 4641)。一方、後半の「成長過程」は前過程で最適化された溶液状態(過飽和)に委ねられるため能動制御が難しく、構造解析に適した品質と形状、大きさの結晶へと成長しないという課題が残っていた。

最近、申請者らは成長中のタンパク質結晶表面にフェムト秒レーザーを照射してアブレーション痕を形成すると、成長機構を高品質化に最も適した「渦巻き成長」に切り替えられるという現象を発見した(2014年春季、秋季応用物理学会)。他の機構と異なり、低過飽和状態でも成長が持続できるため、レーザー照射面のみを選択的に成長促進することも明らかになった。この新現象の原理解明を進めて基盤技術として確立することで、世界で初めてフェムト秒レーザーによりタンパク質の「核生成」と「成長」の両過程を時間的、空間的に能動制御するという画期的な試みが実現するとの着想を得た。

2. 研究の目的

多くの研究が成されている鶏卵白リゾチーム(HEWL)をモデル物質とし、フェムト秒レーザー照射による渦巻き成長誘起現象が起こる条件(過飽和度、レーザー照射条件など)を明らかにしながら本技術の原理解明を行う。そして、得られた知見を他のタンパク質(グルコースイソメラーゼ、インシュリン、ストレプトアビジン、膜タンパク質 AcrB 等)に適用し、汎用性を示す。本技術によって得られたタンパク質結晶が、従来法によって得られたものよりも高品質であることを明らかにするために、得られた結晶に関しては結晶内部の欠陥キャラクタリゼーション、結晶の構造解析を行なって品質評価を行う。

3. 研究の方法

(1) フェムト秒レーザー照射による渦巻き成長誘起条件の探索

HEWL を用いて、レーザーを照射するタイミング(溶液の過飽和度)と、レーザー照射条件に着眼しながら、渦巻き成長を誘起可能な条件を探索する。レーザーの照射方法は、図1に示すように、結晶表面への直接集光、集光点を走査する、結晶からやや離れた場所に

レーザー照射を行い、キャビテーションバブルによって間接的に結晶を刺激するなどのパターンを試みる。



図1 レーザー照射パターンの検討。

(2) 渦巻き成長誘起結晶の品質評価

レーザー照射後の結晶をX線トポグラフィおよび局所ロッキングカーブマッピングで観察し、レーザー照射によって生じた欠陥の特定や、照射前後の結晶品質の変化を評価する。これにより、本手法の優位性を示す。合わせて構造解析も行い、最高分解能の値などに関しても評価を行う。なお、本手法で用いるモデルタンパク質結晶の多くは、実験室レベルのX線装置では装置限界を超えて品質が良いことが多いため、適宜 SPring8 や KEK などの放射光施設を利用する。

(3) 渦巻き成長誘起技術の多様なタンパク質結晶への適用

HEWL を用いて得られた知見、渦巻き成長誘起の原理にもとづき、他のタンパク質への技術適用を行う。モデルタンパク質として、インシュリンを用いる。

4. 研究成果

(1) フェムト秒レーザー照射による渦巻き成長誘起条件の探索

HEWL の正方晶結晶表面に渦巻き成長丘を誘起可能なレーザー照射条件および溶液の過飽和条件(濃度に対応)に関して成果を得た。現時点で最適なレーザー照射方法は、集光点をある程度走査する集光走査という方法である(図1の)。また、本研究で網羅的な最適条件探索を行ったところ、本実験での過飽和度とレーザーエネルギー条件においては、数千パルス程度の操作が結晶表面に単独の渦巻き成長丘を発生するのに適していることがわかった。一方、パルス数が少なすぎると渦巻き成長は発生せず、逆に数万パルス以上になると結晶表面に多数の微結晶が析出し、多結晶化してしまうことも明らかになった。

(2) 渦巻き成長誘起結晶の品質評価

結晶の欠陥評価は、実験室内の結晶表面観察装置と KEK などの放射光施設を併用して行った。はじめに、結晶の大部分を渦巻き成長機構で成長させた結晶を作成した。この結晶の表面をごく微量溶かすことで、結晶内部に取り込まれている不純物の密度や、結晶欠陥の密度を見積もった。その結果、渦巻き成長で成長した結晶は、劇的に不純物の取り込

み量が低減していることが明らかになった(図2)。次に、同様にして得た結晶を KEK において X 線トポグラフィ観察し、結晶内部の欠陥の同定を行った。その結果、フェムト秒レーザー照射を施した場所から、らせん転位と呼ばれる欠陥が発生していることを確認した。このらせん転位の直上に、実際にうずまき成長が形成されていた(図3)。同様にして得た結晶を SPring8 にて評価したところ、フェムト秒レーザーを照射したにも関わらず結晶品質は良好であり、単結晶性を保存しながら成長を続けていることが明らかになった。

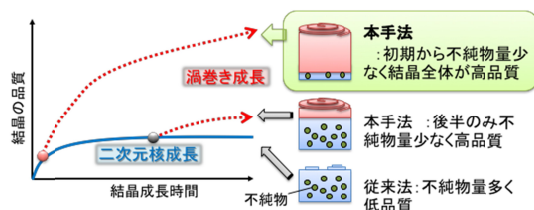


図2. レーザー照射によって渦巻き成長した結晶の不純物取り込み量の変化。

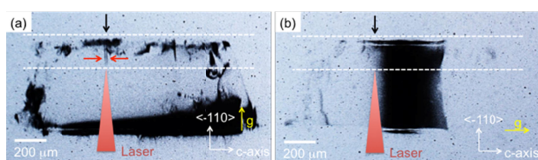


図3. 渦巻き成長丘が形成した HEWL 結晶の X 線トポグラフィ像。(a)内に形成されたらせん転位。(a) -440 反射 (b) 004 反射。

(3) 渦巻き成長誘起技術の多様なタンパク質結晶への適用

ウシ脾臓由来インシュリンを結晶化し、正方晶 HEWL の知見にもとづいて渦巻き成長誘起実験を行ったところ、意図した場所に渦巻き成長丘を発生させることに成功した(図4)。

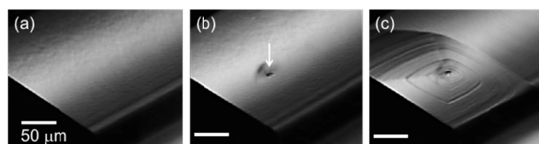


図4. ウシ脾臓インシュリン結晶の表面に形成された渦巻き成長丘。

また、鶏卵白リゾチーム正方晶{101}面へのレーザー照射を試みた。この面は通常二次元核形成が支配的に進む面であったが、{110}面と同様に渦巻き成長を誘起することに成功した。有機低分子のアスピリン結晶については、本研究室のフェムト秒レーザーで核形成を誘起できる条件が明確になった。この条件に基づき、単結晶をレーザー照射可能なサイズまで育成できる条件も明確化した。このようにして得られたア

スピリン単結晶にレーザー照射を行ったところ、リゾチームと同様の条件では結晶が破碎された。アスピリン結晶は板状の結晶のため、レーザーの強度のさらなる微調整が必要であった。その後の検討で、アスピリン単結晶を破壊しないレーザー強度が分かった。

以上より、本手法は結晶の成長促進に加え、高品質化を促す可能性が示された。他物質への汎用性も示されつつあり、今後幅広い材料への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

(1) K. Nii, M. Maruyama, S. Okada, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, H. Y. Yoshikawa, H. Matsumura, T. Inoue, M. Imanishi, K. Tsukamoto, M. Yoshimura, and Y. Mori, "Improvement of metastable crystal of acetaminophen via control of crystal growth rate", Applied Physics Express, Vol.11, pp.035501-1/035501-4, 2018.

<https://doi.org/10.7567/APEX.11.035501>

(2) 吉川洋史, 松崎賢寿, "反射干渉顕微鏡 ~ ソフト界面の非侵襲ナノイメージング ~", 生物物理, 57 巻, pp.318-322, 2017.

<https://doi.org/10.2142/biophys.57.318>

(3) 吉川洋史, 丸山美帆子, "フェムト秒レーザーアブレーションを利用した結晶成長モードの能動的切り替えによるタンパク質結晶の成長促進", 光学, Vol.46, No.6, p.248, 2017.

(4) Yo. Mori, M. Maruyama, Y. Takahashi, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura and Yu. Mori, "Crystallization of acetaminophen form II by plastic-ball-assisted ultrasonic irradiation", Applied Physics Express, Vol.10, No.2, pp.025501-1-4, 2017.

<http://doi.org/10.7567/APEX.10.025501>

(5) Yo. Mori, M. Maruyama, Y. Takahashi, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura and Yu. Mori, "Metastable crystal growth of acetaminophen using solution-mediated phase transformation", Applied Physics Express, Vol.10, No.1, pp.015501-1-4, 2016.

<http://doi.org/10.7567/APEX.10.015501>

(6) Y. Tominaga, M. Maruyama, M. Yoshimura, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Tsukamoto, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H. Y. Yoshikawa and Y. Mori, "Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation", NATURE PHOTONICS, Vol.10, pp. 723-727, 2016. :101038/NPHOTON.2016.202

(7) M. Maruyama, Y. Hayashi, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, S. Murakami, M. Yoshimura and Y. Mori, "A crystallization technique for obtaining large protein crystals with increased mechanical stability using agarose gel combined with a stirring technique", Journal of Crystal Growth, Vol.452, pp.172-178, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2015.11.008>

(8) M. Matsuoka, K. Kakinouchi, H. Adachi, M. Maruyama, S. Sugiyama, I. Nakabayashi, H. Tsuchikura, A. Kuwahara, S. Sano, H. Y. Yoshikawa, Y. Takahashi, M. Yoshimura, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori and K. Takano, "Growth of high-strength protein crystals with nanofibers", Applied Physics Express, Vol.9, No.3, pp.035503-1-3, 2016. <http://doi.org/10.7567/APEX.9.035503>

〔学会発表〕(計31件)

(1) 丸山美帆子, 吉川洋史, 吉村政志, 森勇介, "フェムト秒レーザーアブレーションで制御するタンパク質結晶の成長機構", 日本化学会第98回春季年会, 2018.

(2) 釣優香, 仁井滉允, 丸山美帆子, 岡田詩乃, 安達宏昭, 吉川洋史, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 塚本勝男, 今西正幸, 吉村政志, 森勇介, "外場印加による医薬化合物アスピリンの準安定形晶出", 第65回応用物理学会春季学術講演会, 2018.

(3) 釣優香, 仁井滉允, 丸山美帆子, 岡田詩乃, 安達宏昭, 吉川洋史, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 塚本勝男, 吉村政志, 森勇介, "フェムト秒レーザー誘起結晶化技術を用いた医薬化合物アスピリンの準安定形晶出", レーザー学会学術講演会第38回年次大会, 2018.

(4) 吉川洋史, 鈴木大希, 田村未央, Chi-Shiun Wu, 中林誠一郎, "レーザーアブレーションによる有機結晶の形状制御",

レーザー学会学術講演会第38回年次大会, 2018.

(5) 丸山美帆子, 富永勇佑, 吉村政志, 小泉晴比古, 橘勝, 杉山成, 安達宏昭, 塚本勝男, 松村浩由, 高野和文, 村上聡, 井上豪, 吉川洋史, 森勇介, "フェムト秒レーザーアブレーションで制御するタンパク質結晶の成長機構", 第46回結晶成長国内会議(JCCG-46), 2017.

(6) 鈴木大希, 田村未央, 中林誠一郎, 吉川洋史, "レーザーアブレーションによる有機結晶の成長制御法の開発", 第46回結晶成長国内会議(JCCG-46), 2017.

(7) 吉村政志, 仁井滉允, 藤本吏輝, 釣優香, 丸山美帆子, 岡田詩乃, 安達宏昭, 吉川洋史, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 塚本勝男, 森勇介, "医薬化合物の準安定相晶出技術の開発", 第46回結晶成長国内会議(JCCG-46), 2017.

(8) 釣優香, 高橋義典, 丸山美帆子, 吉川洋史, 岡田詩乃, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 塚本勝男, 吉村政志, 森勇介, "外場印加による医薬化合物アスピリンの結晶化", 第46回結晶成長国内会議(JCCG-46), 2017.

(9) 藤本吏輝, 森陽一朗, 高橋義典, 丸山美帆子, 吉川洋史, 岡田詩乃, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 塚本勝男, 吉村政志, 森勇介, "溶液バブリングによる医薬化合物アセトアミノフェンの準安定形晶出", 第46回結晶成長国内会議(JCCG-46), 2017.

(10) K. Nii, M. Maruyama, S. Okada, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, H. Yoshikawa, H. Matsumura, T. Inoue, K. Tsukamoto, M. Yoshimura, Y. Mori, "Metastable crystal growth of pharmaceutical compound ibuprofen by using polymer induced hetero nucleation", The 7th Asian Conference on Crystal Growth and Crystal Technology(CGCT-7), 2017.

(11) R. Fujimoto, Yo. Mori, M. Maruyama, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, K. Tsukamoto, M. Yoshimura and Yu. Mori, "Growth of high-quality metastable acetaminophen using solution-mediated phase transformation at low supersaturation", The 7th Asian Conference on Crystal Growth and Crystal Technology(CGCT-7), 2017.

(12) 仁井滉允, 岡田詩乃, 安達宏昭, 丸山

美帆子, 高野和文, 吉川洋史, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 塚本勝男, 吉村政志, 森勇介, “ポリマー界面を用いた医学化合物イブプロフェンの準安定形結晶成長”, 第 78 回応用物理学会秋季学術講演会, 2017.

(13) 鈴木大希, 中林誠一郎, 吉川洋史, “レーザーアブレーションによる有機結晶成長の時空間制御 2 ~レーザーエネルギー依存性~”, 第 78 回応用物理学会秋季学術講演会, 2017.

(14) 吉川洋史, “フェムト秒レーザーアブレーションによる有機結晶の成長制御”, 第 78 回応用物理学会秋季学術講演会, 2017.

(15) 藤本吏輝, 森陽一朗, 高橋義典, 丸山美帆子, 吉川洋史, 岡田詩乃, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 塚本勝男, 吉村政志, 森勇介, “溶液媒介相転移による医薬化合物アセトアミノフェンの準安定形成長”, 第 40 回結晶成長討論会, 2017.

(16) 藤本吏輝, 森陽一朗, 高橋義典, 丸山美帆子, 吉川洋史, 岡田詩乃, 安達宏昭, 杉山成, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 塚本勝男, 吉村政志, 森勇介, “溶液媒介相転移による医薬化合物アセトアミノフェンの準安定形成長()”, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 2017.

(17) 鈴木大希, 中林誠一郎, 吉川洋史, “フェムト秒レーザーアブレーションによる有機結晶成長の時空間制御”, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 2017.

(18) K. Nii, M. Maruyama, Y. Takahashi, H. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, K. Tsukamoto, M. Yoshimura and Yu. Mori, “Metastable crystal growth of acetaminophen in low supersaturated solution”, The 5th China-Japan Symposium on Crystal Growth and Crystal Technology, 2016.

(19) R. Fujimoto, Yo. Mori, Y. Takahashi, M. Maruyama, H. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, K. Tsukamoto, M. Yoshimura and Yu. Mori, “Metastable crystal growth of acetaminophen using solvent-mediated phase transformation”, The 5th China-Japan Symposium on Crystal Growth and Crystal Technology, 2016.

(20) 藤本吏輝, 森陽一朗, 高橋義典, 丸山美帆子, 吉川洋史, 岡田詩乃, 安達宏昭, 杉山成, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上

豪, 吉村政志, 森勇介, “溶液媒介相転移による医薬化合物アセトアミノフェンの準安定形成長”, 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会, 2016.

(21) D. Suzuki, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, “Development of a New Microscopy System Toward In-Situ Observation of Laser-Induced Crystal Growth Dynamics”, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ICCGE-18), 2016.

(22) H. Y. Yoshikawa, Y. Tominaga, M. Maruyama, M. Yoshimura, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Tsukamoto, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, “Promotion of Protein Crystal Growth by Spatiotemporally Switching Crystal Growth Mode via Femtosecond Laser Ablation”, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ICCGE-18), 2016.

(23) 富永勇佑, 林佑紀, 中山智詞, 丸山美帆子, 高橋義典, 吉川洋史, 吉村政志, 杉山成, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 森勇介, “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”, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 2016.

(24) 吉川洋史, “フェムト秒レーザーアブレーションによる有機・タンパク質結晶成長の空間制御”, 第 5 回次世代の物質科学・ナノサイエンスを探る, 2016.

(25) 山形眞, 丸山美帆子, 富永勇佑, 吉川洋史, 杉山成, 岡田詩乃, 高橋義典, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 井上豪, 松村浩由, 吉村政志, 森勇介, “ゲル化タンパク質溶液へのフェムト秒レーザー集光による核発生の空間制御”, 第 45 回結晶成長国内会議 (NCCG-45), 2015.

(26) 富永勇佑, 丸山美帆子, 吉川洋史, 杉山成, 高橋義典, 安達宏昭, 松村浩由, 高野和文, 村上聡, 井上豪, 吉村政志, 森勇介, “フェムト秒レーザーを用いた成長機構転換によるタンパク質結晶の不純物取り込み低減”, 第 45 回結晶成長国内会議 (NCCG-45), 2015.

(27) 丸山美帆子, 林佑紀, 吉川洋史, 岡田詩乃, 杉山成, 小泉晴比古, 橘勝, 安達宏昭, 松村浩由, 井上豪, 高野和文, 村上聡, 吉村政志, 森勇介, “ゲル化タンパク質溶液への攪拌操作による結晶核発生数の制御”, 第 45 回結晶成長国内会議 (NCCG-45), 2015.

(28) M. Maruyama, G. Sazaki, H. Adachi, M. Yoshimura, and Y. Mori, "Effects of a Forced Solution Flow on The Step Advancement on {110} Faces of Tetragonal Lysozyme Crystals", The Joint Conference of 6th International Symposium on Physical Sciences in Space (ISPS-6), 2015.

(29) 山形眞, 丸山美帆子, 富永勇佑, 吉川洋史, 杉山成, 岡田詩乃, 高橋義典, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 井上豪, 松村浩由, 吉村政志, 森勇介, "ゲル化タンパク溶液におけるフェムト秒レーザー誘起核発生の空間制御", 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 2015.

(30) 富永勇佑, 丸山美帆子, 吉川洋史, 杉山成, 高橋義典, 安達宏昭, 松村浩由, 高野和文, 村上聡, 井上豪, 吉村政志, 森勇介, "フェムト秒レーザーアブレーションを用いたタンパク質結晶成長初期における成長機構転換" 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 2015.

(31) Y. Tominaga, M. Maruyama, H. Y. Yoshikawa, Y. Hayashi, S. Nakayama, Y. Takahashi, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, M. Yoshimura and Y. Mori, "SPIRAL GROWTH OF PROTEIN CRYSTALS INDUCED BY FEMTOSECOND LASER ABLATION", 20th American Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ACCGE-20), 2015.

〔図書〕(計1件)

(1)吉川洋史, 丸山美帆子, "結晶を壊して大きくする!? - セレンディピティと異分野連携が生んだタンパク質結晶育成法", 化学同人, 「化学」, Vol.72, No.5, pp.21-25, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等: 特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 勇介 (MORI Yusuke)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 90252618

(2)研究分担者

高野 和文 (TAKANO Kazufumi)

京都府立大学・生命環境科学研究所・

教授

研究者番号: 40346185

(3) 研究分担者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA Hiroshi)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 50551173