

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360011

研究課題名(和文) レーザー分子注入法によるタンパク質結晶化技術

研究課題名(英文) Development of a new protein crystallization technique by the femtosecond laser irradiation at gel-solution or air-solution interfaces

研究代表者

森 勇介 (MORI, Yusuke)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90252618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,900,000円、(間接経費) 4,770,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の結晶化確率を向上させる新規手法として、フェムト秒レーザーと界面を組み合わせた新規結晶化手法の開発を行った。

鶏卵白リゾチームを用いた核発生誘起実験の結果、ゲル-液や気-液界面にレーザー照射することで、条件によっては従来までの溶液中照射より核発生確率が高くなることを示した。また、ゲル-液界面に晶出したインシュリン結晶を溶液攪拌しながら育成することで、従来法(溶液中で静置しながら育成)よりも高品質を有する結晶を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a new protein crystallization technique by the femtosecond laser irradiation at gel-solution or air-solution interfaces.

The laser irradiation near the interfaces under optimized conditions could induce the nucleation at very low supersaturation, where no nucleation could be induced even by the femtosecond laser irradiation of bulk solutions. We applied solution-stirring technique to the crystals nucleated at gel-solution interfaces, and succeeded to improve crystal quality.

研究分野：総合理工

科研費の分科・細目：応用物理学・結晶工学

キーワード：レーザー分子注入法 タンパク質 レザー核発生 溶液攪拌 ゲル

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の結晶構造解析は、大型放射光施設、コンピュータ解析技術の飛躍的な進歩により、生命科学の強力かつ必須な手法となり、構造生物学という学術領域が確立されている。しかし、最重要課題である結晶化技術においては、試行錯誤から抜け出せず、様々な困難に直面するのが現状である。

研究代表者である森らは、結晶成長は静置状態が理想である、とされる従来の常識とは逆の発想で、フェムト秒レーザー照射による結晶核発生、及び溶液攪拌による高品質結晶育成という全く新しい手法を開発した。これまでに、多くの難結晶性タンパク質の結晶化に成功し、それらの構造が初めて決定されるに至った。また近年我々は、これら生体材料におけるフェムト秒レーザー誘起結晶核発生メカニズムを詳細に調べ、集光点で発生するキャビテーションバブルが核発生のメイントリガーとなっていることを明らかにした。キャビテーションバブルの発生は全ての溶液中で誘起できる普遍的な物理現象であり、これは本手法が溶液中で結晶化する様々な材料に応用可能であることを示唆している。しかし一方で、レーザーを用いても結晶化が難しいタンパク質も存在し、これまで得られた結晶化原理に関する知見に基づいた技術の更なる向上が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、フェムト秒レーザーによる結晶化技術の更なる向上を目指し、“界面”を用いた新たなレーザー結晶核発生法の開発を目的とした。既に上記で述べたように、フェムト秒レーザーによる結晶核発生手法では、キャビテーションバブルが核発生メカニズムに関わっていることが示唆されている。キャビテーションバブルは、レーザー集光点で発生し、その後膨張収縮を繰り返しながら崩壊する。この時、溶液と接する固体や気体の界面があると、キャビテーションバブルの膨張収縮挙動は大きく影響を受けることが知られており、核発生に対してどのような効果が現れるかは非常に興味深い。そこで本研究では、固液や気液界面へのレーザー照射による核発生への効果を検証した。さらに、キャビテーションバブルの表面にタンパク質などが吸着する特性を利用し、界面とキャビテーションバブルによる分子注入（濃縮）現象の検証も試みた。また将来的なレーザー+界面+溶液攪拌を組み合わせた結晶化を目指し、ゲル上溶液攪拌法を開発し、結晶品質への影響を調べた。これらにより、タンパク質の更なる高品質結晶化を実現することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 界面におけるフェムト秒レーザー誘起核発生法の検証

界面としてはゲル/溶液、気/液界面を選択した。具体的にはレーザーパラメータとして、

界面とレーザー集光点間の距離、レーザーエネルギーなどを変化させ、タンパク質及び有機低分子の結晶化への影響を調べた。ゲルを用いた場合には、ゲル濃度もパラメータとした。また界面におけるキャビテーションバブルの挙動も高速カメラ（時間分解能 $1 \mu\text{s}$ ）を用いて計測し、キャビテーションバブルの挙動と結晶化との相関を調べた。さらに蛍光タンパク質（Green, Fluorescence Protein, GFP）を用いて、キャビテーションバブル近傍でのタンパク質濃度分布の計測にも挑んだ。

(2) ゲル上溶液攪拌法の開発

将来的なレーザー+界面+溶液攪拌を組み合わせた結晶化目指し、図1のようなゲル上溶液攪拌装置を開発した。本装置を用いて、リゾチームやグルコースイソメラーゼといったモデルタンパク質の高品質大型結晶育成を実施し、結晶品質との相関を調べた。

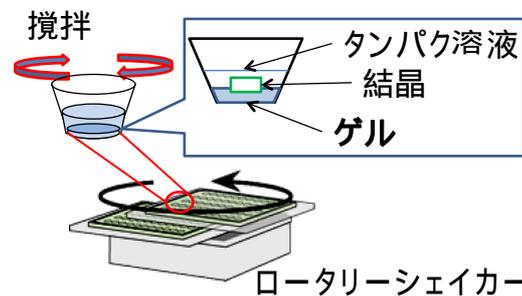


図1 ゲル 溶液界面近傍の結晶に溶液攪拌を行う装置の概念図。

4. 研究成果

(1) 界面におけるフェムト秒レーザー誘起核発生法の検証

まず鶏卵白リゾチーム（HEWL）を用いて、ゲル/溶液界面へのレーザーによる結晶化確率の評価を行った。パラメータとしてゲルの濃度（0.5%および2.0%）、リゾチームの過飽和度を変化させた。その結果、0.5%アガロースゲルを用いた方が、核発生可能な最低過飽和度がより低過飽和側にシフトし、より低い過飽和条件での結晶化が実現した。また、0.5%ゲルの方が、各過飽和度において核発生確率の向上も顕著であった。また有機低分子としてパラセタモールを用いて実験を行ったところ、ゲル溶液界面を起点とした結晶化が観察された。以上から界面+レーザーによる結晶化促進効果を見出すことに成功した。

このようなゲル 溶液界面で起こる爆発的な結晶化現象のメカニズムを探るため、高速度カメラ（ $1 \times 10^6 \text{ frame/s}$, HPV-1, Shimadzu）を用いてゲル 溶液界面でのキャビテーションバブルを系統的に観察した（図3）。その結果、核発生が促進されたレーザー照射条件では、キャビテーションバブルが界面から溶液側へと遠ざかりながら崩壊する様子が観察された（図3d）。キャビテーションバブルが崩壊する際には、バブル中心で局所的に

高温状態が生成することが知られている。一般に、熱の発生は核発生に対してはネガティブに働くが、ゲル 溶液界面がある場合には、キャピテーションが崩壊時に界面から遠ざかることで、膨張・収縮に伴う力学的な刺激が効率的に核発生に作用したことが考えられる。一方、溶液中の場合は、キャピテーションバブルの膨張・収縮・崩壊が集光点を中心として同じ場所で起こるため、ゲル 溶液界面が存在する場合に比べて核発生の効果が弱まるのではないかと考えられる。以上の結果より、ゲル 溶液界面を用いてキャピテーションバブルの挙動を制御することで、より高効率に核発生を誘起できる可能性を見出した。

また、気液界面でも、リゾチームを用いた実験の結果、ゲル/溶液界面と同じく高い核発生効果が得られることが明らかになった。これらの結果は、界面+レーザーにより、溶液中照射を超える核発生促進効果が得られることを示唆している。そこで界面での核発生メカニズムを調べるために、レーザー照射時に発生するキャピテーションバブル近傍の GFP 由来の輝度を観測することで、タンパク質濃縮の定量測定に挑んだ。その結果、気液界面にレーザーを照射した場合に、局所的に数倍以上の濃度上昇が起こることが分かった。これは、キャピテーションバブルによりタンパク質を局所的に濃縮して移動できる可能性を示しており、このような分子濃縮現象が核発生メカニズムに関与していることを示唆していると言える。

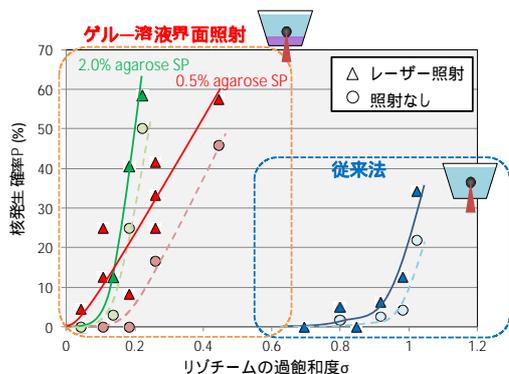


図2 HEWLの過飽和度と核発生確率の関係。0.5%ゲル溶液界面でレーザーを照射することで、最もレーザー照射効果が高くなる。

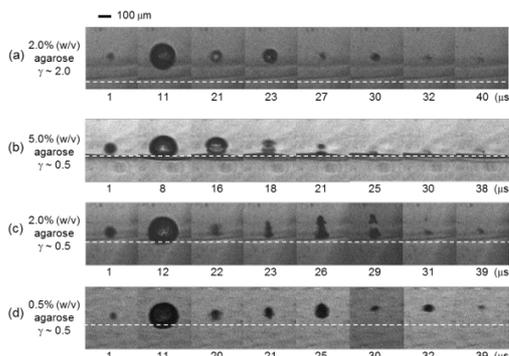


図3 ゲル 溶液界面でのキャピテーションバブルの

挙動。γはキャピテーションバブルとゲル間の距離を、キャピテーションバブルの最大半径で割ったものを示す。発表雑誌論文[3]から許可を得て転載。Copyright (2013) American Chemical Society.

(2) ゲル上溶液攪拌法の開発

図1に示したゲル上攪拌法装置でインシュリン結晶を育成し、得られた結晶をX線で評価することで、結晶品質向上効果を定量的に検証した。その結果、ゲル上育成により、結晶の環境変化に対する耐性が向上することがわかった。具体的には、結晶が溶け出す温度が2ほど高くなった。また、ゲル上攪拌法を行うことで、85%以上の結晶(13/15)で品質向上が確認され(比較対象、攪拌しないゲル上法)ゲル上攪拌法の有効性が明らかになった。

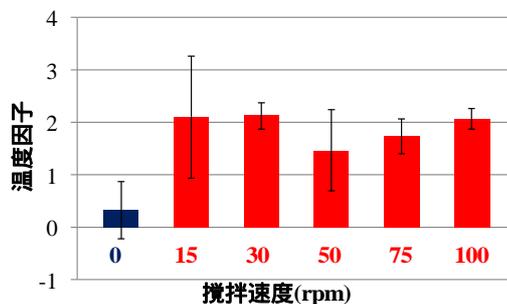


図5 ゲル攪拌法における攪拌速度と、インシュリン結晶の温度因子の関係。温度因子は、大きいほど結晶が高品質であることを示す。

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8件)

1) Y. Aoki, M. Maruyama, Y. Takahashi, M. Yoshimura, H. Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, and Y. Mori, A new practical technique for high quality protein crystallization with the solution stirring technique at the interface between high-concentrated hydrogel and solution, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 2014.5.

<http://dx.doi.org/10.7567/JJAP.53.065502>

2) H. Y. Yoshikawa, R. Murai, H. Adachi, S. Sugiyama, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, H. Masuhara, and Y. Mori, Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding, Chemical Society Reviews, 査読有, Vol.43, No.7, 2014, pp.2147-58 DOI: 10.1039/c3cs60226e

3) S. Nakayama, H. Y. Yoshikawa, R. Murai,

M. Kurata, M. Maruyama, S. Sugiyama, Y. Aoki, Y. Takahashi, M. Yoshimura, S. Nakabayashi, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, S. Murakami, and Y. Mori, Effect of Gel-Solution Interface on Femtosecond Laser-Induced Nucleation of Protein”, CRYSTAL GROWTH & DESIGN, 査読有, Vol.13, Issue 4, 2013, pp.1491-1496 DOI:10.1021./cg301618h

4) H. Y. Yoshikawa, Y. Hosokawa, R. Murai, G. Sazaki, T. Kitatani, H. Adachi, T. Inoue, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, S. Nakabayashi, Y. Mori, and H. Masuhara, Spatially Precise, Soft Microseeding of Single Protein Crystals by Femtosecond Laser Ablation, Crystal Growth & Design, 査読有, Vol.12, No.9, 2012, pp. 4334-4339 DOI:10.1021/cg300018t

5) M. Maruyama, H. Kawahara, G. Sazaki, S. Maki, Y. Takahashi, H. Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, and Y. Mori, Effects of a forced solution flow on the step advancement on {110} faces of tetragonal lysozyme crystals: direct visualization of individual steps under a forced solution flow, Crystal Growth & Design, 査読有, Vol.12, Issue 6, 2012, pp.2856-2863 DOI:10.1021/cg300025b

6) S. Sugiyama, M. Maruyama, G. Sazaki, M. Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, and H. Matsumura, Journal of the American Chemical Society, 査読有, Vol. 134, 2012, pp.5786-5789 DOI: 10.1021/ja301584y

7) R. Murai, H. Y. Yoshikawa, H. Hasenaka, Y. Takahashi, M. Maruyama, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, and Y. Mori, Influence of energy and wavelength on femtosecond laser-induced nucleation of protein, Chemical Physics Letters, 査読有, Vol.510, Issues 1-3, 2011, pp.139-142 DOI:10.1016/j.cplett.2011.05.016

8) 吉川洋史, 村井良多, 杉山成, 安達宏昭, 松村浩由, 井上豪, 村上聡, 高野和文, 森勇介, フェムト秒レーザー誘起キャピテーションバブルによるタンパク質の結晶核発生, 日本結晶成長学会誌, 査読有, Vol.38, No.3, 2011, pp.161-168 ci.nii.ac.jp/naid/110008750278

〔学会発表〕(計 20 件)

1) 中山智詞, 吉川洋史, 倉田将輝, 丸山美帆子, 村井良多, 高橋義典, 吉村政志, 杉山成, 松村浩由, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 井上豪, 森勇介, フェムト秒レーザーを用いたタンパク質の結晶核発生技術~キャピテーションバブル挙動制御による技術の高度化~, レーザー学会学術講演会第 34 回年次大会, 2014.1.20, 北九州国際会議場, 福岡

2) K. Ikeda, T. Yamada, Y. Mori, Y. Takahashi, M. Maruyama, H.Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, Y. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura, and Y. Mori, Laser-induced Crystallization of Metastable Form of Pharmaceutical Compound Indomethacin, International Symposium on Nanophotonics and Nanomaterials 2014 (ISONP2014), 2014.1.15, Beijing, China.

3) 山田利彦, 福喜多俊, 池田憲治, 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, 医薬化合物アセトアミノフェンの多形晶出に及ぼす溶媒種の影響, 第 43 回結晶成長国内会議(NCCG-43), 2013.11.8, 長野市生涯学習センター, 長野

4) 森陽一朗, 福喜多俊, 池田憲治, 山田利彦, 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, 超音波印加による医薬化合物の準安定相晶出, 第 37 回結晶成長討論会, 2013.9.27, 長野勤労者いこいの村アゼリア飯綱, 長野

5) 池田憲治, 山田利彦, 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, フェムト秒レーザー誘起結晶化による医薬化合物インドメタシンの結晶多形制御, 第 74 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013.9.16, 同志社大学, 京都

6) Y. Mori, Y. Takahashi, K. Ikeda, T. Yamada, K. Nishimura, M. Maruyama, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, S. Murakami, M. Yoshimura, and Y. Mori, Polymorphism control of pharmaceutical compound acetaminophen by ultrasonic irradiation, 17th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy - ICCGE-17, 2013.8.12, Warsaw, Poland

7) 森陽一朗, 池田憲治, 山田利彦, 西村健,

高橋義典、丸山美帆子、吉川洋史、岡田詩乃、安達宏昭、杉山成、松村浩由、高野和文、井上豪、村上聡、吉村政志、森勇介、超音波印加によるアセトアミノフェン、インドメタシンの結晶多形制御、日本薬学会第28年会、2013.5.23、ウインクあいち、愛知

8) 森勇介、構造解析に向けた有機・タンパク質結晶化技術の新展開、2013年日本結晶成長学会特別講演会「バイオ有機物質における結晶成長-その基礎と応用-」、2013.5.17、キャンパスイノベーションセンター東京

9) 林佑紀、中山智詞、青木裕介、丸山美帆子、高橋義典、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、大型高品質タンパク質結晶育成に向けた溶液攪拌技術の検討～成長速度と結晶品質の流速依存性～、第60回応用物理学会春季学術講演会、2013.3.30、神奈川工科大学、神奈川

10) 中山智詞、吉川洋史、青木裕介、倉田将輝、丸山美帆子、村井良多、高橋義典、吉村政志、杉山成、松村浩由、安達宏昭、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介、超短パルスレーザーを用いた有機結晶核発生～固相ゲル界面効果の検証～、第42回結晶成長国内会議(NCCG-42)、2012.11.11、九州大学、福岡

11) 吉川洋史、集光短パルスレーザーを駆使したタンパク質結晶化・細胞接着力測定法の開発、第8回鴨観会・生命分子化学科セミナー、2012.10.5、京都府立大学、京都

12) Y. Aoki, M. Maruyama, Y. Takahashi, M. Yoshimura, H.Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, and Y. Mori, Effect of Solution on Protein Crystal Growth on High Concentrated Hydrogel, 14th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules(ICCBM14), 2012.9.26, Alabama, USA

13) M. Maruyama, M. Nakayama, G. Sasaki, Y. Takahashi, M. Yoshimura, T. Nakamura, H. Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, S. Murakami, and Y. Mori, Solution Stirring Affects the Behavior of Dislocations and Microdefects During Protein Crystallization: Case Studies of Three Proteins, 14th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules(ICCBM14), 2012.9.25, Alabama, USA

14) 中山智詞、吉川洋史、青木裕介、倉田将輝、丸山美帆子、村井良多、高橋義典、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、超短パルスレーザーによる膜タンパク質の結晶核発生～界面活性剤のキャビテーションバブルへの影響～、第73回応用物理学会学術講演会、2012.9.11、愛媛大学・松山大学、愛媛

15) 吉川洋史、Bio-applications of ultrafast laser pulses to protein crystallization and cell adhesion strength measurement、エクストリームフォトニクスセミナー、2012.5.31、理化学研究所、埼玉

16) 青木裕介、丸山美帆子、高橋義典、吉村政志、吉川洋史、杉山成、安達宏昭、高野和文、村上聡、松村浩由、井上豪、森勇介、固相ゲル上タンパク質結晶育成法における最適攪拌条件の検討、第59回応用物理学会学術講演会、2012.3.17、早稲田大学、東京

17) 中山智詞、吉川洋史、青木裕介、倉田将輝、丸山美帆子、村井良多、高橋義典、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を用いたタンパク質結晶核発生技術の高度化～固相ゲルへのタンパク質分子の輸送～、第59回応用物理学会学術講演会、2012.3.16、早稲田大学、東京

18) M. Maruyama, M. Nakamura, Y. Takahashi, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, S. Murakami and Y. Mori, Effects of solution stirring on behavior of defects during protein crystallization, Eco-materials and Eco-innovation for Global Sustainability (ECO-MATES 2011), 2011.11.28-29, Osaka

19) 倉田将輝、中山智詞、吉川洋史、丸山美帆子、村井良多、高橋義典、杉山成、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、フェムト秒レーザー誘起タンパク質結晶核発生技術の高度化～キャビテーションバブルの挙動制御～、第41回結晶成長国内会議(NCCG-41)、2011.11.5、つくば、茨城

20) 青木裕介、丸山美帆子、高橋義典、吉村政志、吉川洋史、杉山成、安達宏昭、高野和文、村上聡、松村浩由、井上豪、森勇介、固相ゲルと溶液攪拌を用いた新規高品質タンパク質結晶育成技術の開発、第41回結晶成長国内会議(NCCG-41)、2011.11.5、つくば、茨城

21) 丸山美帆子、村上聡、中村真利子、斎藤諭、高橋義典、吉川洋史、吉村政志、杉山成、

安達宏昭、高野和文、松村浩由、井上豪、森
勇介、溶液攪拌によるタンパク質結晶品質向
上メカニズムの解明、第 41 回結晶成長国内
会議(NCCG-41)、2011.11.3、つくば、茨城

22) M. Maruyama, K. Murakami, Y. Takahashi,
M. Imade, M. Yoshimura, S. Murakami, and
Y. Mori, Improvement of Crystal Qualities
by solution stirring techniques, XXII
Congress and General Assembly of the
International Union of
Crystallography(IUCr2011), 2011.8.22-30,
Madrid, Spain

23) H. Y. Yoshikawa, R. Murai, G. Sasaki,
S. Sugiyama, Y. Takahashi, M. Maruyama, H.
Adachi, S. Murakami, H. Matsumura, T.
Inoue, K. Takano, and Y. Mori, Protein
crystallization controlled by femtosecond
laser-induced cavitation bubbles, The 12th
International Symposium on Laser
Precision(LPM2011), 2011.6.7, Takamatsu,
Kagawa

〔図書〕(計 1 件)

1) 吉川洋史、丸山美帆子、杉山成、シーエ
ムシー出版、2013、タンパク質結晶の最前線、
290

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：低分子有機化合物の結晶多形制御技術
発明者：森勇介、他
権利者：国立大学法人大阪大学
種類：特許
番号：特願 2013-067629
出願年月日：2013 年 3 月 27 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：9 0 2 5 2 6 1 8

(2) 研究分担者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA Hiroshi)
大阪大学・大学院工学研究科・招聘教員
研究者番号：5 0 5 5 1 1 7 3