

# 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高品質タンパク質結晶育成

大阪大学大学院工学研究科 電気電子情報工学専攻  
森研究室 博士前期課程二年

富永 勇佑

## 1. 序言

医療の発達した今日においても治療困難な病気が多数ある。そのような病気を無くすには新薬開発が欠かせない。薬は我々の体内にある「タンパク質」の活動や生成を促進あるいは抑制する化合物である。タンパク質は生体内に数十万種存在し、多種多様な機能を有してあらゆる生命活動を担う。疾患に関わるタンパク質を標的として、その機能を制御する医薬品を論理的にデザインする手法をプロテオーム創薬と呼ぶ。既存の薬に比べて有効性が高く副作用の小さい薬を創製できる。これには、タンパク質個々の機能を定める要素であるタンパク質分子の立体構造を解明する必要がある。しかし、2016年現在の構造決定報告は約11万件であり、未だ構造不明のタンパク質が多数ある。これらの構造を明らかにすることが、現状より薬効の高い薬、治療困難な病気の特効薬の開発に繋がる。

今日、分子構造解明の有力手段としてX線構造解析が盛んである。標的タンパク質の単結晶を作製し、X線照射して得られる回折像を基に分子構造を決定する<sup>2)</sup>。これには高品質、大型のタンパク質単結晶が必要となる。タンパク質の結晶育成では従来、他の有機材料の結晶化と同様に育成溶液の濃度や溶媒、共存溶質、温度など化学的、物理的パラメータを検討し、結晶化駆動力である過飽和度の最適化により結晶の高品質化、大型化を図ってきた<sup>3)</sup>。しかし、このように育成環境を試行錯誤して理想的なタンパク質結晶を得るのは非常に難しく、分子構造解明のボトルネックになっている。

本研究では、高品質、大型のタンパク質結晶を得る新たなアプローチとして、フェムト秒レーザーを用いて結晶成長モードを制御する技術を開発した。光を用いて結晶そのものにはたらきかける、全く新しいタンパク質結晶育成法である。モデルタンパク質である鶏卵白リゾチームの結晶表面にレーザーアブレーション痕を形成することで、結晶の成長モード

を「二次元核成長」から「渦巻き成長」へ強制転換することに成功した。

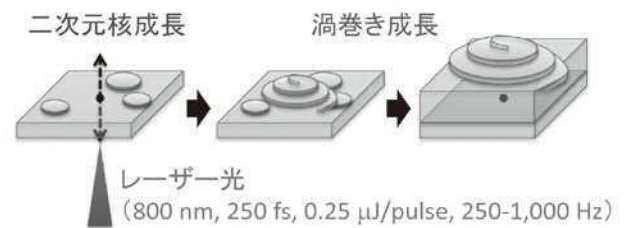


図1 フェムト秒レーザーアブレーションによる結晶成長モード転換の模式図。

渦巻き成長は原理的に結晶の高品質化、大型化に有利であるが<sup>4,5)</sup>、従来育成法ではタンパク質結晶の多くが二次元核成長し、渦巻き成長の発生は自然任せであった<sup>6)</sup>。人為的に渦巻き成長へ転換することで、リゾチーム結晶の大型化および高品質化に成功した。

## 2. 実験

モデル材料に鶏卵白リゾチーム (HEWL :Hen Egg White Lysozyme) の正方晶結晶を用いた。結晶化溶液 (25-45 mg/ml HEWL, 過飽和度  $\sigma=3.0-6.2$ ) 中で晶出した結晶の育成容器を倒立型顕微鏡の観察ステージに乗せ、図2に示すように対物レンズ (10×, NA=0.40) により集光したフェムト秒レーザー光 (中心波長 800nm, パルス時間幅 250fs, エネルギー 0.25  $\mu\text{J}/\text{pulse}$ , パルス繰り返し周波数 250-1000Hz) を結晶の下方から照射した。集光位置は対物レンズまたは観察ステージを鉛直方向に動かすことでZ 軸 (光軸) 方向に、観察ステージを水平方向に動かすことでXY軸方向に調節した。この操作により結晶上面や側面 (いずれも {110}面) に垂直な方向にレーザー集光点を走査して、結晶表面にアブレーションによる直径数  $\mu\text{m}$  の照射痕を形成した。走査条件は速度  $\sim 50-100 \mu\text{m}/\text{s}$ , 距離  $\sim 100 \mu\text{m}$  (結晶内部  $\sim 50 \mu\text{m}$ ), 走査回数 1-5往復とした。

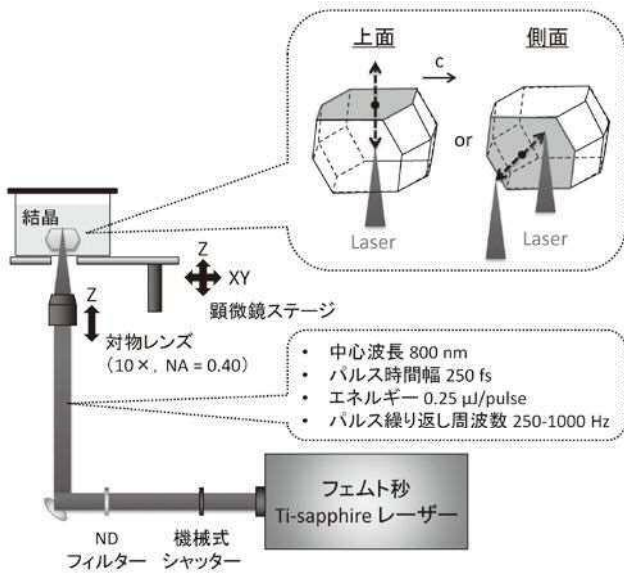


図2 フェムト秒レーザーアブレーション系。

結晶表面モルフォロジーの時間変化（成長モードの時間変化）は、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡（LCM-DIM）<sup>7)</sup>を用いて観察した。LCM-DIMはZ軸方向の垂直分解能が数nmオーダーであり、成長ステップ（HEWL 正方晶{110}面の二次元核成長ステップ1段は高さ約5.6nm）の凹凸を検出できる。

### 3. 結果と考察

結晶化溶液中で晶出してから8日後の、二次元核成長している結晶の上面にレーザー照射痕を形成した（図3c）。その結果、照射29 h後に照射痕を起点に渦巻き成長が発生し（図3d）、照射96 h後にはその単一の渦巻き成長丘が結晶上面全体を覆い（図3e）、成長モードを二次元核成長から渦巻き成長へ転換することに成功した。

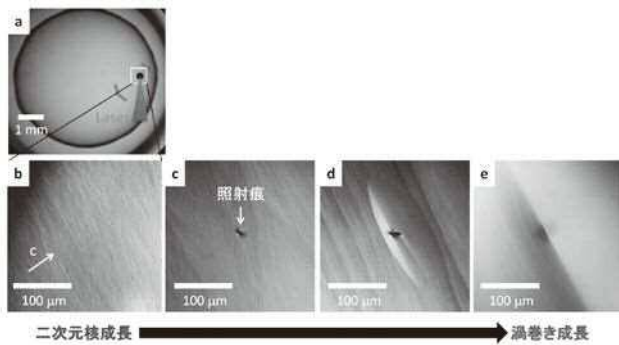


図3 HEWL 正方晶{110}面におけるレーザー照射痕を起点とする渦巻き成長発生。  
(a) 照射直前の育成溶液中の結晶を上面から見た光学実体顕微鏡像。  
(b-e) 結晶上面のLCM-DIM 像。(b) 照射直前。(c) 照射直後 = 0 h。(d) 29 h。(e) 96 h。

次に、晶出7日後の結晶側面にレーザー照射痕を形成し（図4a）、この面と結晶学的に等価対面の成長速度を比較した。側面方向の成長は、上面の外寸（図4aに示す稜L1-L4の長さ）の経時変化に対応する。レーザー照射後、レーザー照射面の成長速度は $\sim 0\mu\text{m/day}$ から $\sim 5\mu\text{m/day}$ へ増大した（図4cのL1, L2）。一方、レーザー非照射面の成長速度は $\sim 0\mu\text{m/day}$ のままであった（図4cのL3, L4）。照射400 h後、結晶はレーザー非照射面の方向にはほとんど成長しなかったが、レーザー照射面の方向には $\sim 100\mu\text{m}$ 成長して大きくなった（図4b）。

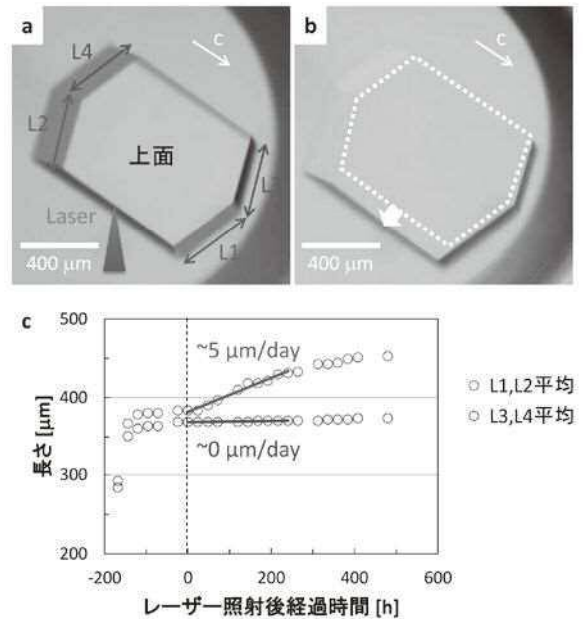


図4 レーザー照射によるHEWL正方晶の結晶成長促進。  
(a,b) 照射直前(a)および照射480h後(b)の結晶を上面から見た光学実体顕微鏡像。  
(c) (a)に示す結晶上面を構成する稜L1-L4の長さの時間変化。

一般に、ある程度過飽和度の低い環境では二次元核成長に比べて渦巻き成長の面成長速度が大きい（図5）<sup>8)</sup>。レーザー照射した面は二次元核成長が支配的な成長モードから渦巻き成長へ転換したことにより、結晶成長が促進されたと考えられる（図5に示す黒矢印）。

最後に、渦巻き成長転換結晶およびレーザー照射無しの結晶（二次元核成長）が成長過程で取り込んだ不純物の量を比較するため、昇温エッチングを行った。渦巻き成長転換結晶として、晶出1日後に結晶上面にレーザー照射して二次元核成長から渦巻き成長へ転換したものを用いた。照射54日後、厚さ方向に $50\mu\text{m}$ 成長したところでエッチングを行った。

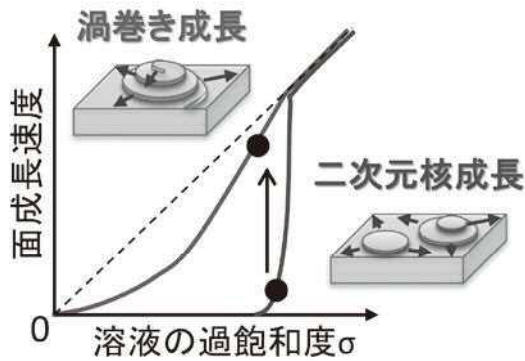


図5 二次元核成長モードおよび渦巻き成長モードにおける育成溶液の過飽和度に対する面成長速度の関係。

上面をLCM-DIMで観察しながら育成温度である20℃から50℃まで昇温したところ、二次元核成長結晶では不純物に対応する平底エッチピット<sup>9)</sup>が面全体に多数現れた(図6a)。一方、渦巻き成長転換結晶ではエッチピットがほとんど見られず(図6b)、不純物の取り込みが大幅に減少していることが明らかになった。

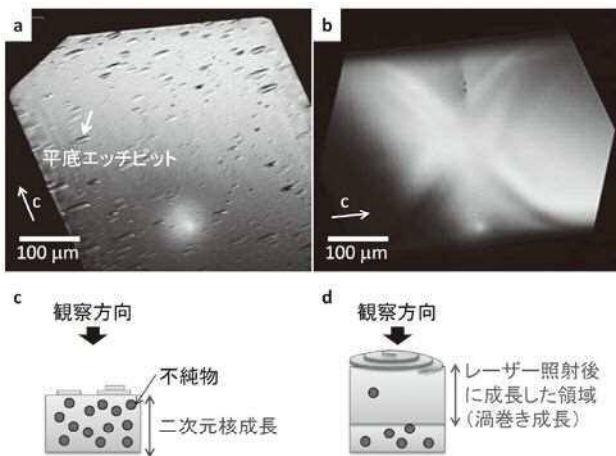


図6 渦巻き成長転換によるHEWL正方晶の不純物取り込み減少。

- (a,b) 昇温エッチング過程の結晶上面のLCM-DIM像。  
 (a) 二次元核成長結晶50℃昇温時。  
 (b) 渦巻き成長転換結晶40℃昇温時。  
 (c,d) 二次元核成長結晶(c)および渦巻き成長転換結晶(d)の断面模式図。

一般に、結晶表面のテラス(成長ステップの段と段の間の平坦領域)に吸着する不純物の場合、テラス露出時間が短いほどその吸着量は少なくなる。このとき、不純物が結晶表面に吸着する前に結晶成長が進行し、結果的に不純物の取り込み量が減少する。HEWL正方晶{110}面における渦巻き成長では、過飽和条件にも依存するが、成長ステップ間隔が二次元

核成長に比べて小さく、テラス露出時間が二次元核成長に比べて短い<sup>5,10)</sup>。丸山らが行った実験条件では、二次元核成長のテラス露出時間が数百分であるのに対し渦巻き成長の場合は数分と2桁短い<sup>5)</sup>。一方、HEWL試薬に含まれる最多不純物はHEWLダイマーであり、それらは正方晶において主に{110}面のテラスに吸着する<sup>11,12)</sup>。これらのことから、本研究では渦巻き成長への転換によりダイマーの取り込み量を減らすことに成功したと考えられる。

渦巻き成長転換結晶のXRD測定をSpring-8 BL38B1にて行ったところ、分解能1.26Å、モザイシティ0.40°と優れた品質であることが確認できた。

#### 4. 結言

本研究では、X線構造解析を目的とした高品質、大型のタンパク質単結晶を育成する全く新しい方法として、フェムト秒レーザーアブレーションを用いて結晶成長モードを制御する画期的な技術を開発した。

「二次元核成長」しているHEWL正方晶結晶の{110}面にレーザーアブレーションを施すことで、成長モードを「渦巻き成長」へ強制転換することに成功した。その結果、結晶の成長を促進し、また結晶が取り込む不純物を大幅に減らすことに成功した。

本技術を他のタンパク質に適用したところ、HEWLの正方晶{101}面やウシ膵臓由来インシュリンの三方晶{01-1}面においても、レーザー照射による渦巻き成長誘起に成功している。タンパク質結晶の成長モードを時間、空間選択的に制御し、さらに結晶の高品質化に成功した例は本研究が世界初である。本技術は原理的に様々なタンパク質に適用可能であり、分子構造解明ひいては新薬開発、医療発展に貢献する。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻機能性材料創製領域の森勇介教授に深く感謝致します。終始ご指導およびご助言を賜りました吉村政志教授、丸山美帆子特任助教に御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 松原謙一, 「ポストシーケンスのゲノム科学」 中山書店 (2001).
- 2) 大場茂, 矢野重信, 「X線構造解析」 朝倉書店 (1999).
- 3) A. McPherson, *Methods*, **34** (2004) 254.
- 4) K. Tsukamoto *et al.* *Space Utiliz. Res.*, **23** (2007)

- 12.
- 5) M. Maruyama *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, **12** (2012) 2856.
- 6) Y. Suzuki *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, **15** (2015) 4787.
- 7) G. Sazaki *et al.*, *J. Cryst. Growth*, **262** (2004) 536.
- 8) I. V. Markov, “CRYATAL GROWTH FOR BEGINNERS, *Fundamentals of Nucleation, Crystal Growth and Epitaxy, 2 edn.*” World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. (2003).
- 9) H. Hondoh *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43** (2004) 4529.
- 10) M. Sleutel *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, **12** (2012) 2367.
- 11) A. E. S. Van Driessche *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, **9** (2009) 3062.
- 12) T. Nakada *et al.*, *J. Cryst. Growth*, **196** (1999) 503.



大阪大学大学院工学研究科  
電気電子情報工学専攻  
機能性材料創製領域 森研究室

勤務先：パナソニック株式会社  
車載向け円筒型リチウムイオン  
二次電池のプロセス開発に  
従事