

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 17 年度採択研究代表者

森 勇介

(大阪大学大学院工学研究科 助教授)

「タンパク質完全結晶創成」

1. 研究実施の概要

本研究では、我々がこれまでに開発した新しいタンパク質結晶化手法である①レーザーによる結晶核発生方法、及び②溶液攪拌による高品質化技術に関しての高度化を行うとともに、結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメータの探索を行い、難結晶化タンパク質の高品質大型結晶育成技術の確立を目指している。

レーザー核発生については、レーザー光強度・パルス時間幅をレーザー光の物理パラメータとして核発生メカニズムに関して検討したところ、バブル発生などによる溶液形態変化と核発生メカニズムとに相関があることが明らかとなった。攪拌においては、管内一次元流れを利用した実験系を構築し、100 nl 程度の微量液滴における攪拌手法の確立および、流れが結晶成長に及ぼす影響の定量的解析が可能となった。

様々なタンパク質における最適条件の指導原理探求を目指し、膜タンパク質やそれらの巨大複合体、さらには単体だけでなくタンパク質との複合体を形成しうる核酸類など、多種に渡る生体高分子の高品質結晶育成を実施している。さらに、動的光散乱 (DLS) や電気泳動、吸収分光による溶液状態評価系を構築し、タンパク質溶液状態が結晶化に及ぼす影響も調べている。

今後も更に様々な膜タンパク質や難結晶化水溶性タンパク質を結晶化することで、本技術の優位性を実証しながら、結晶化における普遍的なパラメータを探し出し、より汎用性の高いシステムの構築を行う。

2. 研究実施内容

【効率的なレーザー照射条件の探索と核発生機構の検討】

レーザー核発生については、核発生に最適なレーザーパラメータの探索を通して、原理説明や手法の高度化を目指し研究を進めている。18 年度は、レーザー核発生最適条件探索の一つとして、レーザー光強度・パルス時間幅を取り上げ、核発生に対しての依存性を調べた。試料として、モデルタンパク質であるリゾチームを用いて実験を行った結果、核発生にはあるエネルギーしきい値(200 fs: 3 $\mu\text{J}/\text{pulse}$, 2000 fs: 8 $\mu\text{J}/\text{pulse}$)以上でレーザーを照射

する必要があることが分かった。また、パルス時間幅が長くなると、核発生に要するしきい値が増加することから、フェムト秒レーザーによる非線形吸収をトリガーとして核発生が誘起されていることが明確に示された。

我々は、この非線形吸収に追従して誘起される、溶液中での形態変化、特にバブルや衝撃波界面での濃度変化により核発生が誘起されると予測している。実際、液中圧力センサーを用いてレーザー誘起衝撃波の圧力を測定し、形態変化のしきい値を調べたところ、核発生のしきい値とほぼ同じオーダーであることが明らかとなった(200 fs: 1 μ J/pulse, 2000 fs: 5 μ J/pulse)。そこで本年度は、溶液形態変化が誘起する核発生メカニズムについての知見を得るために、結晶化の経時観察によりそのダイナミクスを調べた。10~15 wt%でポリエチレングリコール (PEG) を添加した高粘度溶液を用いることで溶質やバブルの拡散を抑え、結晶化過程の長時間観察を行った結果、レーザー照射位置、特に発生したバブルの周囲や界面に結晶が成長する様子が観察された。また、蛍光分子をラベルしたリゾチームの蛍光観察も併せて行い、バブル周囲での凝集挙動を分子レベルで捉えることにも成功した。この結果は、バブルが、尿素などの有機低分子だけでなくタンパク質においても結晶化に関与することを強く示唆している。本年度は、レーザー照射時のバブル周囲での分子挙動の詳細な観察のために、高感度カメラ (EMCCD) を組み込んだ顕微観察システムも構築しており、今度様々なパラメータに対してのマイクロ秒から数日レベルに渡る結晶化経時観察を行い、結晶化ダイナミクスをより詳細に調べていく。

さらに、このような溶液形態変化による核発生機構に関する知見を基に、より大きな溶液形態変化の実現によるレーザー核発生法の高度化についても検討した。その結果、近接 (<100 μ m) した 2ヶ所にレーザーを集光し、より大きな形態変化を誘起すると、核発生確率が増加することを見出した。今後は、膜タンパク質など種々のタンパク質を用いて系統的にこの効果の検証を行い、汎用的技術としての応用を目指す。

【溶液攪拌技術の高度化】

現在タンパク質結晶化においては、溶液の微量化と結晶化剤などによる高粘性化が進み、効率よく攪拌できるシステムを開発することが非常に重要である。しかし、液滴内部に流れを誘起させる場合、微量であるほど定量的な流れ制御が困難になる。そこで我々は、一次元管内で往復運動する溶液中では速度勾配を有する非定常流れが容易に発生することに着目し、18年度は、この原理に基づく新規溶液攪拌システムを開発した。本システムに組み込んだシリンジポンプにより溶液を管内 (内径 0.5mm) で往復運動させたところ、100 nl 以下の微小液滴でも、長時間 (24 h 以上)、数十 μ m/s の緩やかな流れを安定に誘起することに成功した。また、ナビエ・ストークス運動方程式の三次元数値解析からも溶液中の流れの存在を確認し、微量・高粘性タンパク質溶液の高効率攪拌に有効であることを明示した。

【レーザープロセッシング技術の開発】

18年度は、主にフェムト秒レーザーを用いてのタンパク質結晶の高精度加工に関する研究を進めた。フェムト秒レーザーを集光照射することで、従来のメスなどの機械ツールでは非常に困難であった、ガラスキャピラリー内で強固に吸着した結晶の非接触・非損傷剥離に成功した。また、含水率が極めて大きく（～80%）極めて脆いことから高精度加工が不可能であった膜タンパク質において、マイクロメートルの精度で多結晶から単結晶への成長誘導に成功し、本手法がタンパク質加工において広く有効であることを実証した。

【結晶化新技術の開発について】

タンパク質結晶化において、タンパク質の溶解度制御は非常に重要である。18年度は、溶解特性制御の物理因子として圧力に注目し、膜タンパク質結晶化への応用を試みた。先に開発した簡易型高圧結晶育成容器を用いて、膜タンパク質 AcrB を圧力下（500 atm）で育成したところ、常圧より高沈殿剤濃度(PEG15→18%)で結晶化することを見出し、圧力が AcrB の溶解度増加（可溶化）に寄与することを初めて明らかにした。さらに、結晶品質は常圧と同程度であったことから、無侵襲な溶解度の制御が可能であることを示した。

この結果を受け、同じく AcrB の溶解度に大きく影響を及ぼす界面活性剤に注目した。界面活性剤は膜タンパク質の可溶化に必須であるが、結晶中に多量に含有されるため、結晶品質の低下を招くと考えられるが、これまでは界面活性剤はある一定量以上は絶対に必要だと言われており、そのような試みは殆どなされていなかった。我々は、この界面活性剤低減を試み、従来の0.2%から、界面活性剤を低減できる限界である臨界ミセル濃度0.015（cmc）付近で結晶化を行った。その結果、回折分解能が従来の3.5 Åから2.5 Åまで改善することを見出し、界面活性剤の低減が膜タンパク質結晶の高品質化において重要なパラメータとなることを初めて明確化した。

3. 研究実施体制

(1) 「工学研究科」グループ

①研究分担グループ長：森 勇介（大阪大学大学院工学研究科 助教授）

②研究項目

・本研究では、フェムト秒レーザー照射による核発生技術や溶液攪拌による結晶高品質化技術などの新しいタンパク質結晶化手法の高度化、及び結晶核発生や結晶成長に影響を及ぼす新しい物理的パラメータの探索を行い、膜タンパク質や水溶性タンパク質をはじめ、様々な難結晶化タンパク質の完全結晶育成技術創成のための要素技術開発とその実証研究を以下の（1）～（4）の項目に沿って行う。

（1）レーザー核発生技術の高度化

（2）溶液攪拌技術の高度化

- (3) レーザープロセッシング技術の開発
- (4) 水溶性タンパク質完全結晶創成

(2)「産研」グループ

①研究分担グループ長：村上 聡(大阪大学産業科学研究所 助教授)

②研究項目

・タンパク質結晶化のなかでもとりわけ困難であるということが良く知られている膜タンパク質の結晶化は、構造生物学分野での最後の開拓地であると表現されている。我々がこれまで開発してきた高品質結晶化支援のための技術を、膜タンパク質に対して適用させる為に、より多くの膜タンパク質結晶化に対して結晶化を実施し、技術の一般化を目指す。大腸菌多剤排出トランスポーターAcrBをサンプルとして、結晶化技術を改良すると共に、他の膜タンパク質標品の大量精製の為の遺伝子組み換え実験や、生化学実験を以下の項目に沿って行う。

- (1) AcrB タンパク質の大量精製および、結晶化
- (2) 大腸菌薬剤排出トランスポーターのクローニング及び大量精製条件の検討

(3)「創晶」グループ

①研究分担グループ長：安達 宏昭(株式会社創晶 代表取締役社長)

②研究項目

・依頼されたタンパク質・難結晶化材料の結晶化を、レーザーや攪拌などを駆使して行うとともに、本CRESTで開発された技術の移転を積極的に進める。

4. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

○Cooling-rate screening system for determining protein crystal growth conditions

J. Cryst. Growth 292 (2006) 433-436.

R. Murai, S. Nakata, M. Kashii, H. Adachi, A. Niino, K. Takano, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki.

○Effect of ultrasonic irradiation on protein crystallization

J. Cryst. Growth 292 (2006) 437-440

K. Kakinouchi, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, Y. Mori, Y. Koga, K. Takano and S. Kanaya.

○ Crystallization and preliminary crytallographic analysis of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase from human malaria parasite *Plasmodium falciparum*

Acta Crystallogr. F62 (2006) 542-545

S. R. Krungkrai, K. Tokuoka, Y. Kusakari, T. Inoue, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, Y. Kai and T. Horii.

- Application of Femtosecond Laser Ablation for Detaching Grown Protein Crystals from a Glass Capillary Tube

J. Biosci. Bioeng. 102 (2006) 372-374

M. Kashii, R. Fujisawa, H. Adachi, Y. Mori, T. Sasaki, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, K. Sugamoto and H. Yoshikawa.

- Structure of amyloid β fragments in aqueous environments

FEBS J. 273 (2006) 150-158

K. Takano, S. Endo, A. Mukaiyama, H. Chon, H. Matsumura, Y. Koga, and S. Kanaya.

- Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism

Nature 443 (2006) 173-179

S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto and A. Yamaguchi.

- Femtosecond laser-induced cleaving of protein crystal in water solution

Appl. Sur. Sci. (2007) in press

M. Kashii, Y. Hosokawa, H. Kitano, H. Adachi, Y. Mori, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, K. Sugamoto, H. Y. Yoshikawa, T. Sasaki, and H. Masuhara.

- Femtosecond Laser-induced Crystallization of Protein in Gel Medium

Appl. Sur. Sci. (2007) in press

K. Nakamura, Y. Sora, H. Y. Yoshikaw, Y. Hosokawa, Y. Mori, T. Sasaki, and H. Masuhara