

「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・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。本年度では以下の結果が得られている。

レーザー核発生については、集光点からキャビテーションが発生し、膨張と収縮を繰り返しながら崩壊し、細かいバブルが残ることが明らかとなった。キャビテーション周囲の濃度ゆらぎの直接観察から、キャビテーションの収縮時に周囲の領域より数倍程度強い蛍光を発する領域が生じることを観測した。これらの結果より、キャビテーション表面における分子の高濃度化が結晶核発生を促進することが示唆された。

強制流れ下でのリゾチーム単斜晶表面において、蛍光ラベル化リゾチームを用いた蛍光一分子顕微法により個々の蛍光分子の吸着・脱離過程を観察したところ、溶液流れは、結晶成長面における分子の吸着密度を増加させることを初めて明らかにした。

溶液攪拌法により中性子回折測定用大型 HIV protease 結晶 ($2 \times 2 \times 0.5 \text{ mm}^3$) を育成し、構造解析が可能となる 2.3 \AA 分解能の中性子回折強度データの収集に成功した。RNA アプタマー-IgG 複合体の結晶化と構造解析においても、攪拌を行わない場合は 2.8 \AA 分解能までの反射を持つ結晶しか得られなかったのに対して、溶液攪拌技術により育成した場合、分解能が 1.97 \AA と飛躍的に向上し、構造解析の成功に繋がった。

2. 研究実施内容

【核発生に適したレーザー照射条件の探索と核発生機構の検討】

レーザー誘起核発生については、核発生に適した種々のレーザー照射条件の探索を通して手法を高度化すると共に、原理解明を目指し研究を進めている。その中でこれまでに、核発生がレーザー光強度に対してしきい値を有することを見出した¹⁾。一方、フェムト秒レーザーを溶液中に集光した場合に誘起されるキャビテーションなどの溶液の形態変化挙動も、溶液の非線形吸収に追随して起こるしきい値現象であり、核発生に影響を与えていることが示唆される。そこで、19年度は、従来のレーザー最適照射条件の検討を進めるとともに、レーザーによって誘起される溶液の形態変化挙動のダイナミクスを重点的に調べた。その結果、キャビテーションによる核発生メカニズムについての知見が得られ始めたのでその結果について述べる。

まず、フェムト秒レーザーによって誘起される一連の溶液の形態変化挙動を理解するため、高速度カメラを用いてタンパク質リゾチーム溶液を観察した¹⁾。その結果、照射後数マイクロ秒以内に集光点からキャビテーションが発生し、膨張と収縮を繰り返しながら数十マイクロ秒程度で崩壊し、細かいバブルが残ることが明らかとなった。この時のキャビテーション直径のレーザー光強度依存性から、キャビテーション発生のしきい値を定量的に決定したところ、リゾチームの核発生のしきい値と比較するとほぼ一致した。また、この観察結果から見積もられるキャビテーションの最大膨張および収縮速度 ($>10 \mu\text{m}/\mu\text{s}$) は、溶質の自由拡散速度 (リゾチーム $\sim 0.01 \mu\text{m}/\mu\text{s}$) よりも2桁以上大きいことが明らかとなった。このような高速膨張・収縮挙動は、溶液中に局所的な濃度ゆらぎを生じさせると考えられ、核発生のトリガーとなる可能性がある。そこで、我々は、蛍光分子をラベルしたリゾチームの溶液を用いて、キャビテーション周囲の濃度ゆらぎの直接観察を試みた。実験では、高感度カメラ (EMCCD) を組み込んだ顕微システムを構築し、溶液中の高速蛍光像観察を行った。その結果、キャビテーションの収縮時に周囲の領域より数倍程度強い蛍光を発する領域が生じることを観測した。

これらの結果より、キャビテーション表面における分子の高濃度化が核発生を促進すると考えられる。今後は、分子の凝集を強く誘起するレーザー照射条件を検討することによって、核発生効率の向上を目指す。

1)レーザー学会第367回研究報告(レーザー加工)No. RTM-07-40 (2007) 7-1

【溶液攪拌技術の高度化】

溶液攪拌技術は、タンパク質結晶の高品質化に有効かつ重要な技術であるが、高品質結晶化の原理や最適攪拌条件の検討指針については、全く未解明であった。そこで、これらを明らかにするべく、平成19年度は溶液流れ下における結晶成長プロセスの観測に取り組んだ。

リゾチーム単斜晶表面において、蛍光ラベル化リゾチームを用いた蛍光一分子顕微法により個々の蛍光分子の吸着・脱離過程を観察したところ、溶液の流れは結晶成長面における分子の吸着密度を増加させることが明らかになった。これは、溶液流れは、結晶近傍の溶質枯渇帯を低減し、分子供給・吸着を促進することを示唆している。一方、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用いて溶液流れ下でのステップ前進速度を測定した結果、数-100 $\mu\text{m/s}$ 程度の流れ下では結晶成長面のステップ前進速度が低下し、2次元島の形状が変化する傾向があることが分かった。また、表面エッチングにより、結晶内には少なくとも2種の格子欠陥（「転位」、「マイクロ欠陥」）が存在し、特にマイクロ欠陥については、流れの上流部ほど発生量が増加する傾向がみられた。これらの結果は、溶液の流れは、成長面への溶質分子の供給といったプラスの効果のみならず、不純物の輸送をも促進してステップの前進を妨げ、マイクロ欠陥の形成を促す等のマイナスの効果をもたらす可能性を示唆している。よって、溶液攪拌においては、流速および流れの方向等、攪拌条件の最適化が非常に重要であることが明らかとなった。

タンパク質結晶ハンドリング技術として、粘着剤で直接結晶を固定する方法を開発した²⁾。柔軟な粘着剤を使用することで結晶への物理的ダメージの軽減化に成功し、タンパク質種結晶を吊り下げることで大型結晶化を可能にする新しい育成法を開発した。この手法で中性子回折測定用大型 HIV protease 結晶を育成したところ、従来の静置法では $0.8 \times 0.1 \times 0.02 \text{ mm}$ (0.0016 mm^3) 以下の結晶しか得られなかったが、新しい溶液攪拌法では $3.6 \times 2 \times 0.5 \text{ mm}$ (3.6 mm^3) と、体積比で約 2250 倍の大型化に成功している。

2) Appl. Phys. Express 1 (2008) 037002

【各種タンパク質結晶の育成と評価】

本研究では、我々の技術の汎用性を様々なタンパク質において検証し、その知見を結晶化手法の高度化へとフィードバックすることを目的とし、共同研究として国内外の大学や公的研究機関からの多種にわたる生体高分子について高品質結晶化に取り組んでいる。現在、これらサンプルの内、核酸類や複合体を含む3種類のタンパク質については以下に示すように構造解析可能である良質な結晶を得ることに成功している。

(1) HIV protease 結晶の大型化（日本原子力研究開発機構との共同研究）

中性子回折測定を目的とした HIV protease は、従来の静置法では $0.8 \times 0.1 \times 0.02 \text{ mm}$ (0.0016 mm^3) 以下の結晶しか得られなかったが、我々の結晶化技術（二液攪拌法、徐冷法）を活用した結果、 $2 \times 2 \times 0.5 \text{ mm}$ の結晶を得ることに成功した。得られた大型結晶を用いて、原子力研究所にて中性子回折実験を行ったところ、 2.3 \AA 分解能の中性子回折強度データを収集することができた。

(2) RNA アプタマー-IgG 複合体の結晶化と構造解析（東京大学医科学研究所・中村義一先生、千葉工業大学・坂本泰一先生との共同研究：平成17年度CREST「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」採択課題）

ヒト IgG と RNA アプタマーとの複合体を用いて、溶液攪拌技術を適用したところ、攪拌を行わない場合は 2.8Å 分解能までの反射を持つ結晶が得られたのに対して、溶液攪拌技術により育成した場合、分解能が飛躍的に向上した (1.97Å 分解能)。さらに、X線回折の異方性の改善が見られ、独立反射数も 13,985 から 43,844 と大幅に増大し、その結果、構造解析の成功に寄与することができた。

解析によって得られた立体構造情報から、東大・中村グループにおいて RNA アプタマーがヒト IgG にのみ高い特異性と親和性を持つ理由が明らかにされつつある。さらに、この認識メカニズムの解明は、RNA アプタマーの異常な特異性を持つ理由を明らかにし、抗体医薬に次ぐ新しいアプタマー医薬の開発に繋がることが期待される。

(3) Na,Ca-exchanger (NCX1) の Ca²⁺ binding domain の結晶化 (大阪薬科大学・友尾幸司先生との共同研究)

溶液攪拌法を用いることによって、心臓の細胞膜に存在し細胞内 Ca²⁺濃度調節に寄与している NCX1 -Ca²⁺ binding domain の非 Ca²⁺結合型の結晶化に成功し、世界に先駆けて構造解析可能な結晶を得ることができた。現在、大阪薬科大学にて構造解析が進行中である。

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、教授)

② 研究項目

- ・タンパク質完全結晶創成のための要素技術の開発と実証研究

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行う。

(2)「産研」グループ

① 研究分担グループ長：村上 聡 (大阪大学、准教授)

② 研究項目

- ・膜タンパク質完全結晶創成

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、生化学実験を行う。

(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

・タンパク質・難結晶化材料結晶化受託

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実用化を積極的に進める。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- (1) Development of Protein Crystallization and Processing : Femtosecond Laser, All Solid-State 193 nm Laser, and Solution Stirring Techniques
Proceedings of SPIE Vol. 6460, p.646008(1-10)
Y. Mori, K. Takano, H. Adachi, T. Inoue, S. Murakami, H. Matsumura, M. Kashii, H. Y. Yoshikawa, S. Maki, T. Kitatani, S. Okada and T. Sasaki
- (2) Femtosecond laser-induced crystallization of protein in gel medium
Appl. Surf. Sci. **253** (2007) 6425-6429
K. Nakamura, Y. Sora, H. Y. Yoshikawa, Y. Hosokawa, R. Murai, H. Adachi, Y. Mori, T. Sasaki and H. Masuhara
- (3) Femtosecond laser-induced cleaving of protein crystal in water solution
Appl. Surf. Sci. **253** (2007) 6447-6450
M. Kashii, Y. Hosokawa, H. Kitano, H. Adachi, Y. Mori, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, K. Sugamoto, H. Yoshikawa, T. Sasaki and H. Masuhara
- (4) Drug Development Value Chain Constructed by Collaboration Between The SOSHO Project and The NPO BIOGRID
AIP (American Inst. of Physics) CONFERENCE PROCEEDINGS 902 (2007) 85-88
T. Inoue, Y. Kado, K. Tokuoka, H. Matsumura, Y. Kai, Y. Mori, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, Y. Fukunishi, H. Nakamura, T. Kinoshita, I. Nakanishi, Y. O., S. Minakata and T. Sakata

- (5) フェムト秒レーザーによるタンパク質結晶化の制御
レーザー学会第 367 回研究報告 (レーザー加工) No. RTM-07-40 (2007) 7-11
吉川洋史、村井良多、牧祥、北谷友也、杉山成、安達宏昭、高野和文、松村浩由、村上
聡、井上豪、佐々木孝友、森勇介
- (6) 革新技術による有機分子・タンパク質の結晶化
MEDCHEM NEWS 17 (2007) No.2 p.12-15
安達宏昭、森勇介
- (7) タンパク質のレーザー誘起結晶化
高分子 56 (2007) 515
安達宏昭
- (8) New Technique of Manipulating a Protein Crystal Using Adhesive Material
Appl. Phys. Express 1 (2008) 037002
T. Kitatani, S. Sugiyama, H. Matsumura, H. Adachi, H. Y. Yoshikawa, S. Maki, S.
Murakami, T. Inoue, Y. Mori and K. Takano