

創晶プロジェクト

～新しいタンパク質結晶育成技術の開発～

大阪大学大学院工学研究科

安達宏昭*, 新納愛, 北野博史, 村上聡, 高野和文,
松村浩由, 井上豪, 森勇介, 佐々木孝友

SOSHO Project (Crystal Design Project)

~Development of Novel Growth Methods for Protein Crystals~

H. Adachi*, A. Niino, H. Kitano, S. Murakami, K. Takano,
H. Matsumura, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki

*E-mail: adachi@pwr.eng.osaka-u.ac.jp

<http://www.so-sho.jp>

Abstract

Interest in growing protein crystals is related to determining the three-dimensional (3D) structure at atomic resolution by X-ray diffraction (XRD) analysis. An obstacle to the feasibility of 3D structural determination by XRD analysis is the difficulty in producing suitable diffraction-quality protein crystals of adequate size. Additionally, protein crystals are easily damaged due to their softness and fragileness. This leads to difficulty in extraction and processing of crystals after growth. Therefore, we organized the SOSHO project (Crystal Design project) to develop new crystal growth methods including handling of protein crystals.

First, effective crystallization was confirmed by femtosecond laser irradiation (Laser Irradiated Growth Technique: LIGHT). Second, Two-liquid system enables to remove protein crystals easily without causing mechanical damage. Third, stirring a protein solution prevents excess nucleation and promotes large crystals. Moreover, stirred solution improves crystallinity. Finally, pulsed UV soft ablation (PULSA) technique enables to process a protein crystal. Various processing patterns were achieved using 193 nm deep-UV laser, and PULSA did not affect the quality of the crystals.

These techniques will accelerate structural genomics and subsequent structure-based drug discoveries, resulting in important revelations in these fields.

1. はじめに

タンパク質は、無機や有機低分子と比べて分子構造が巨大、かつ複雑であり、多種のコンフォメーションを取り得る。また、分子間の相互作用が非常に弱く、分子間に多くの水分子（タンパク質分子と結合している結合水や結晶内を自由に移動できる自由水がある）が占有していることもあり、タンパク質の結晶化は極めて難しく、三次元的な規則性に大きな乱れ（結晶の不完全性）がある場合が多く、あまり大きく成長することがない。そのため、高品質及び大型結晶の作製は困難である。また、結晶が軟らかく、脆いため、結晶の取り出し操作、加工などの取り扱いも極めて困難である。しかしながら、創薬や生命科学、構造生物学の研究において、タンパク質の詳細な立体構造決定が不可欠となっており、タンパク質の結晶化が求められている。何故なら、高品質な単結晶が得られると、X線やシンクロトロン放射光を用いた結晶構造解析ができるからである。タンパク質構造解析は国家プロジェクトとして推進する国も多く、米国を筆頭に国際的な展開がなされている。我が国でも、「タンパク 3000」（文部科学省）が平成14年度からの5年計画で進行中であり、タンパク質の全基本構造の1/3（約3000種）以上のタンパク質の構造及びその機能を解析し、得られた成果の特許化までを視野に入れている。

構造解析のボトルネックの一つが、タンパク質の結晶化である。溶液状態での解析が可能（結晶化が不要）である核磁気共鳴（NMR）測定による構造解析の技術開発も進んでいるが、構造決定できるタンパク質の分子量に制限があるなど、X線結晶構造解析でしか解明できないタンパク質も多い。タンパク質の結晶化に関する手法は未だ確立されておらず、貴重かつ微量のタンパク質試料から、未知の結晶化条件を探索するため、多種の沈殿剤溶液を用いたスクリーニングを行う。この方法では、温度を一定に制御した恒温槽内で結晶育成溶液を静置させ、数週間から数ヶ月、タンパク質結晶が出来るのを待つ。結晶化に至らない場合は、スクリーニング範囲をさらに広げ、その数は、数千から数万条件に及ぶ場合もある。しかしながら、膨大な結晶化条件探索を行ったにも関わらず、結晶が得られないときがある。結晶育成は試行錯誤の繰り返しであるが、タンパク質の結晶化に見られる受動的な実験では、結晶化の確率や結晶の品質が低いことが多いと思われる。無機や有機結晶の作製において、静置などの受動的な育成法で高品質結晶が得られる場合は極めて少ない。

2. 創晶プロジェクト

我々は、新しいタンパク質結晶の育成技術を開発することを目的に「創晶プロジェクト」を発足させた。“創晶”（しょうじょう：登録商標）は、結

晶を創製するという意味の造語である。このプロジェクトは、電気工学や物質化学、物質・生命工学、生体情報を専門とする研究者の異分野連携から成り立っている。領域で言えば、結晶育成の研究者とタンパク質研究者の連携である。異分野領域では、常識に囚われない発想や専門分野の思わぬ応用展開が期待でき、目的とする領域の専門家と連携することでブレークスルーが生み出される。創晶プロジェクトにおいては、これまでのタンパク質結晶育成の常識とされる静置（パッシブな育成）とは異なるアクティブな育成技術の開発、つまり積極的にタンパク質結晶の育成を制御することで高品質・大型結晶の作製を実現させる“創晶工学”（クリスタルデザイン）を提案している¹⁾。

本稿では、創晶プロジェクトで開発した新しいタンパク質の結晶育成技術である「二液法による高品質結晶育成」、「レーザーを用いた核発生制御」、「溶液状態制御による結晶育成技術」、「紫外レーザーによる結晶加工技術」の4つのコアテクノロジーについて述べる。

3. 二液法による高品質タンパク質結晶の育成

これまでに数多くのタンパク質結晶の育成技術が開発されており、それぞれに特徴がある。その中でも、ハンギングドロップ蒸気拡散法が広く用いられている。この方法では、撥水処理したガラスに、タンパク質溶液が表面張力でぶら下がった状態にあるので、育成容器との接触面積が少なく、結晶が育成容器に付着することなく成長する。そのため、良質なタンパク質結晶が得られる。また、軟らかく脆いタンパク質結晶の取り出しも容易である。しかしながら、この育成法ではタンパク質溶液の表面張力が、重力に勝っていることが条件であるため、その体積は制限される。つまり、期待できる結晶サイズには限界があり、大型タンパク質結晶を得ることができない。

一方、シットィングドロップ蒸気拡散法やバッチ法は、タンパク質溶液の体積制限がなく、大きなタンパク質結晶を育成できる。しかしながら、育成容器との接触面積が大きいため、結晶が育成容器に付着すると、結晶品質の低下や取り出し時に割れや欠け、クラックなどの機械的な損傷、最悪の場合には崩れてしまうなどの問題が生じ、結晶を取り出すことが困難である。

以上のように、簡便に高品質および大型結晶が得られる育成技術の開発が必要不可欠である。最近、各種育成法の提案がなされている²⁻⁶⁾。我々も新しい結晶育成法を開発し、高品質および大型結晶の育成を試みた。理想的には、育成容器中に浮かせた状態で結晶を成長させるのが望ましいと考え、タンパク質溶液よりも比重が大きく、不溶性の液体を用いて、タンパク質結晶を二液界面に浮かべて育成する方法を考案し、二液法(Two-Liquid System)⁷⁾と名づけた。この育成法の模式図を図1に示す。

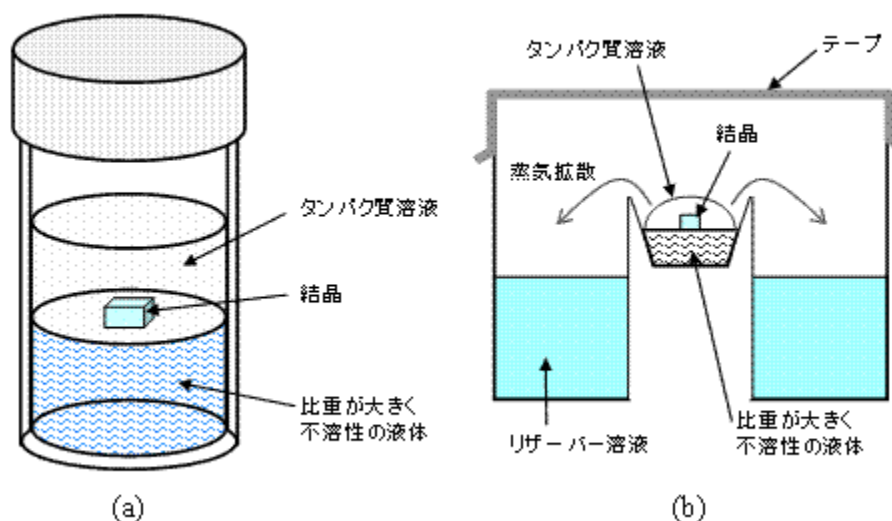


図1 二液法 (Two-Liquid System) (a) 二液バッチ法、(b)フローティングドロップ蒸気拡散法

二液法は、シッティングドロップ蒸気拡散法やバッチ法の操作に、比重が大きく、不溶性の液体をタンパク質溶液に追加するだけで簡単に実現できる。その方法の違いにより、それぞれ二液バッチ法 (Two-Liquid Batch Method) ⁸⁾、フローティングドロップ蒸気拡散法 (Floating-Drop Vapor-diffusion Method) ⁹⁾と呼ぶ。

我々は、比重が大きく、不溶性の液体として、フロリナート(商標名、液状高分子フッ化炭素、3M社(米国))を用いた。この液体は密度が 1940 kg/m^3 (FC-70) と大きく、ほとんどの溶媒に対して不溶であるため、タンパク質溶液と完全に分離し、二層に分かれる。フロリナートは無色透明の液体であり、結晶の観察に影響しない。また、熱的、化学的に安定であり、優れた熱伝導性を有することから、温度変化による育成にも適している。

この育成法では、フロリナート上にあるタンパク質溶液中で結晶が生じると、結晶は二液界面にとどまり、その状態で成長する(図2)。つまり、結晶が容器底面に触れないため、容器に付着しない。そのため、育成終了後は二液界面に浮いている結晶を掬い上げる、吸い上げるなどの操作により、軟らかく脆いタンパク質結晶に機械的な損傷を与えることなく、容易に取り出すことが可能である(図3)。同様に、種結晶を界面上に導入することも容易であり、大きな結晶を得ることができる(図4)。

タンパク質結晶が育成容器に付着して成長すると、結晶の完全性は低下すると報告されている¹⁰⁾。二液法では、タンパク質結晶が下層液体の上に浮かんでいるため、育成容器から応力を受けることがなく、結晶性の低下につながる応力を最小限に抑えることができる。有機非線形光学結晶DASTの育成において、結晶と容器との接触面積を小さくした場合(Slope Nucleation法)、結晶品質が大幅に向上したことから¹¹⁻¹³⁾、二液法において

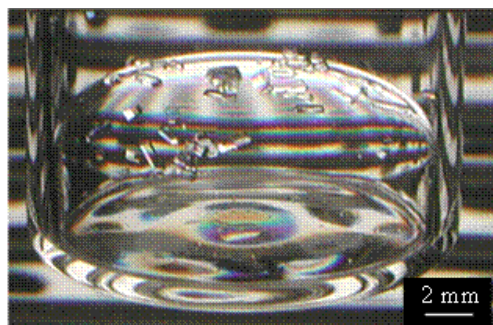


図2 二液バッチ法による結晶育成例

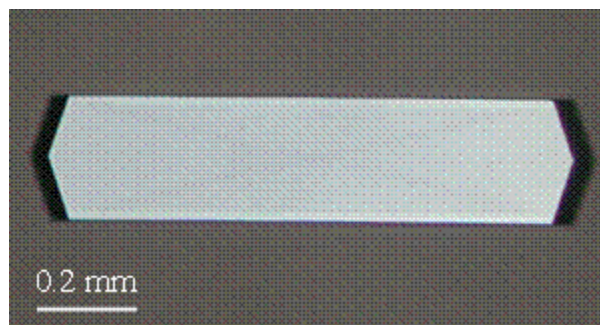


図3 二液界面から取り出した結晶

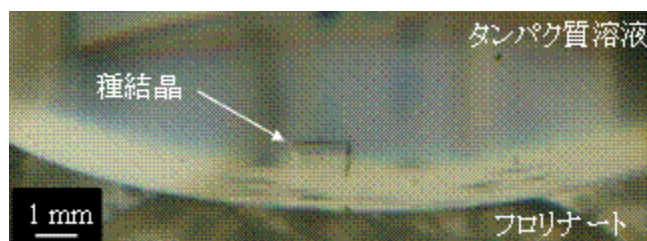


図4 二液界面に導入した種結晶

も結晶品質の向上が期待できる。また、二液法で得られた結晶は、従来法に比べて大きい場合があった(図5)。これは成長過程で結晶が容器に付着しないため、結晶の成長が阻害されず、より大きくなった可能性がある。さらに、ハンギングドロップ法とは異なりタンパク質溶液の体積に制限がなく、大型結晶の育成に対応できる。このように、二液法は高品質および大型タンパク質結晶の育成に適した方法である¹⁴⁾。

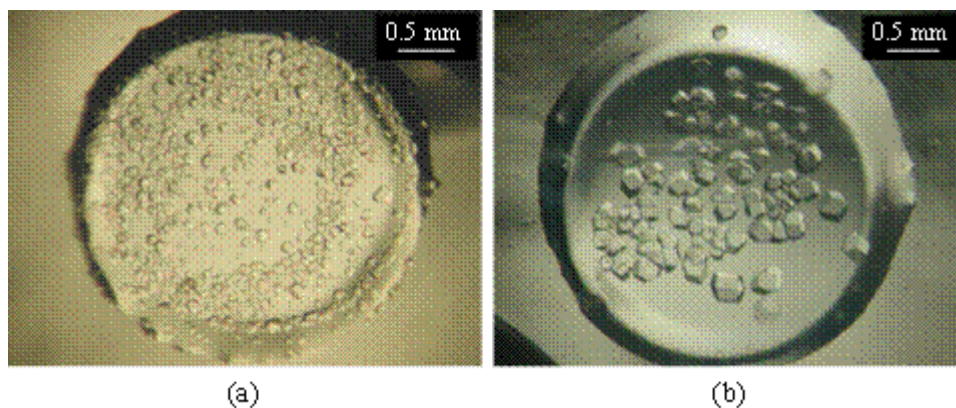


図5 グルコースイソメラーゼの結晶育成例 (a)シットティングドロップ法, (b)フローティングドロップ法

フローティングドロップ蒸気拡散法と従来の蒸気拡散法であるハンギングドロップおよびシットティングドロップ法との特徴比較を表1にまとめた。ハンギングドロップおよびシットティングドロップ法は、それぞれ一長一短があるのに対して、フローティングドロップ法は、両者の利点を合わせ持っており、目立った欠点はない。また、タンパク質の立体構造解析は

表1 各蒸気拡散法の特徴比較

	<i>Hanging Drop</i>	<i>Sitting Drop</i>	<i>Floating Drop</i>
育成準備	×手間がかかる	○簡単	○簡単
結晶の取り扱い	△やや困難	×困難	○容易
結晶品質	○良い	×悪い	○良い
溶液量	×制限あり	○制限なし	○制限なし
結晶サイズ	×小さい	○大きい	○大きい
自動化	×難しい	○容易	○容易

世界的に激しい競争が繰り広げられており、結晶育成においても高速処理や自動化が求められている¹⁵⁻²⁰⁾。フローティングドロップ法は自動化が容易であるという特長も有しており、タンパク質結晶の育成に有効な手法である。

二液法はハンギングドロップ法にも適応でき、ガラスへの結晶付着を防止するDouble-Hanging-Drop Vapor-diffusion Method と、蒸気拡散速度を変化させるSandwiched- Hanging-Drop Vapor-diffusion Methodを開発した*。これらの技術を Two-Liquid Hanging-Drop Vapor-diffusion Methodと呼んでいる。

4. レーザー照射によるタンパク質結晶化技術

タンパク質結晶は水溶液中で育成されるが、結晶を析出させるには、溶媒蒸発や温度変化などにより過飽和度を高くする必要がある。タンパク質は準安定領域（過飽和状態にあるが、自然核成長が起こらない領域。ただし、種結晶が溶液中にあれば、成長する）が大きいいため、過飽和度を極めて高くしないと結晶化しない。しかしながら、過飽和度の高い溶液中で結晶が析出すると、急成長による結晶品質の低下、また、結晶の大量析出による多結晶化などの問題が生じることが多い。さらに、結晶の析出時期に大きなバラツキがある。産業応用されている無機結晶では、低過飽和溶液内に種結晶を導入し、高品質結晶を得ているが、タンパク質結晶では結晶化していない状態から結晶育成を開始するため、種結晶がない。また、結晶が得られているとしても、タンパク質結晶は脆く軟らかいため、種結晶の取り扱いや導入などの操作が困難である。そのため、ヘテロシーディング^{22,23)} やストリークシーディング²⁴⁾ など結晶化を促進させる方法が提案されている。ただし、有機結晶の育成では、種結晶育成より自然核成長で

育成した結晶の方が高品質結晶を得られる²⁵⁾。そのため、より低過飽和の溶液内で、強制的に核発生（結晶化）させることができれば、その後の育成においても低速で結晶を成長させることが可能となり、高品質タンパク質結晶の作製が期待できる。また、結晶化の制御は、結晶育成の再現性を向上させることにもつながる。

結晶化は、タンパク質分子集合体（クラスター）の大きさが、臨界半径を越えることで始まるが、低過飽和溶液中では、タンパク質のクラスターが臨界半径を越える確率は極めて低い。そのため、溶液への機械的衝撃などのトリガーにより、核発生を強制的に引き起こす必要がある。そこで、短パルスレーザーを低過飽和溶液に集光することにより刺激（摂動）を与え、結晶核を生成させることを検討した。有機物を対象としたナノ秒Nd:YAGレーザー（波長 1064 nm, パルス幅 23 ns）による結晶核生成は、これまでに報告されているため²⁶⁻²⁹⁾、タンパク質分子への適応を検討した³⁰⁾。

ニワトリ卵白リゾチームを用いて、通常では自然核による結晶析出が観測されない低過飽和溶液内に、レーザー光をレンズにより集光させて照射した。育成は二液バッチ法で行った。その後の状態変化を肉眼で観察したが、いずれのタンパク質溶液においても、結晶化が確認できなかった。また、照射時間を長くして、過度にレーザーを照射した場合や、繰り返し周波数（10～1000 Hz）、レーザー波長（532 nm）を変化させた場合についても同様の実験を行ったが、タンパク質の変性などの変化すら観測できなかった。つまり、低過飽和タンパク質溶液におけるナノ秒パルスレーザー照射の効果は確認できなかった。

有機低分子よりも結晶化しにくいタンパク質では、より強い摂動が必要と考え、超短光パルスレーザーである高出力フェムト秒チタンサファイアレーザー（波長 800 nm, パルス幅 120 fs）を用いて、レーザー照射実験を行った。光学系はナノ秒Nd:YAGレーザーを用いた実験と同じである。静置では結晶化が起こらない過飽和度に設定したリゾチーム溶液にフェムト秒レーザーを 100 Hz で 1 分間照射して、その変化を観察したところ、結晶の析出を確認した（図 6）。低過飽和溶液内での核生成のため、通常自然核成長で得られるリゾチーム結晶より成長が遅かった。また、過度にレーザーを照射したところ、リゾチームが凝集（変性）した。一方、レーザーを照射しない溶液（静置）は結晶の析出が観測されず、フェムト秒レーザーが結晶核の生成に有効であることが分かった。

我々はレーザーによるタンパク質結晶化技術をLIGHT（Laser Irradiated Growth Technique）³¹⁾と名づけた。微量のサンプルにおいても、レーザーが照射できる光学系を顕微鏡下で構築した。対物レンズの位置を変更することで、広範に使用されているハンギングドロップやシッティングドロップ蒸気拡散法、バッチ法などへの適応が可能である（図 7）³²⁾。グルコースイソメラーゼやリボヌクレアーゼHなどを対象とした実験では、通常核

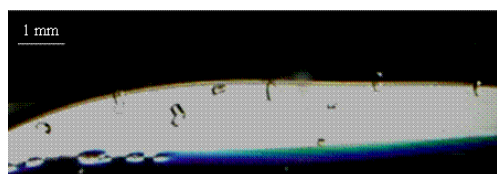


図6 レーザー照射により結晶化したリゾチーム結晶 (二液バッチ法にて育成)

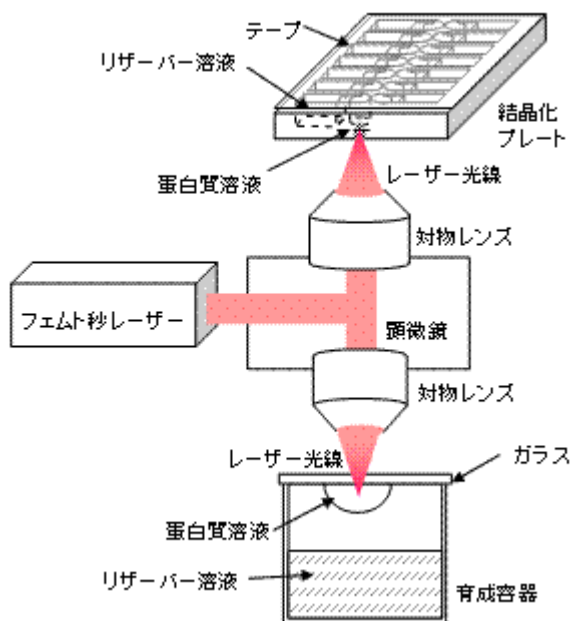


図7 顕微鏡下でのレーザー照射システム

形成しにくい低過飽和溶液中での結晶化や、これまで結晶化しなかった条件での核生成を確認した(図8)。これらの結果は、LIGHTがタンパク質結晶化スクリーニングのヒット率を向上させたことを示すと共に、低過飽和度の溶液においても結晶化が促進できるため、自然核成長法のジレンマ(核発生させるためには、高過飽和にしなければならないが、結晶成長時には低過飽和にしたい)を解決し、高品質結晶の育成に適した手法の一つに成り得る。LIGHTによる結晶品質の向上は水溶性タンパク質のみならず、膜タンパク質の結晶化においても有効であることを確認している³³⁾。

また、LIGHTは結晶析出までの時間を短縮できる。トリパノソーマ由来プロスタグランジンF合成酵素では、結晶析出までの時間が数ヶ月から2日となり、大幅に時間短縮した結果が得られた。つまり、LIGHTは迅速な結晶化スクリーニングを可能にする。

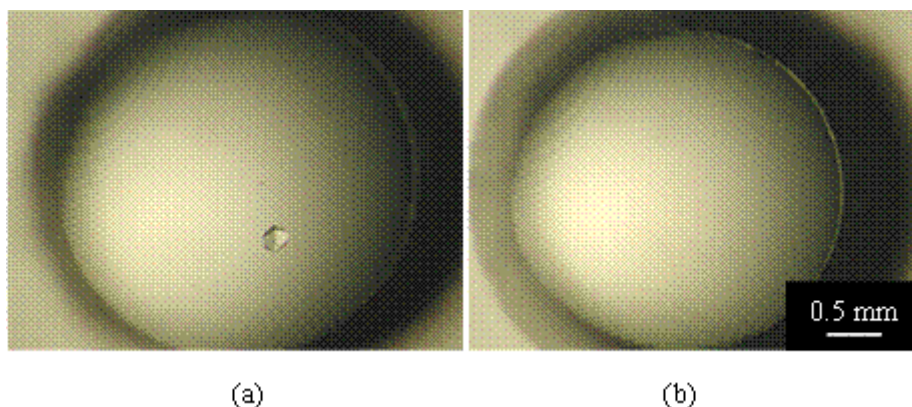


図8 グルコースイソメラーゼの結晶育成例 (a)レーザー照射あり, (b)レーザー照射なし

LIGHTがタンパク質の結晶化に有効であることを各種タンパク質の育成において実証してきたが、その詳細なメカニズムは不明である³⁴⁾。新現象の可能性もあるが、現在考えられるメカニズムを以下に示す。

フェムト秒レーザーの波長 800 nmにおいて、タンパク質溶液は吸収を持たない。しかしながら、先とう値がギガワットに達する高出力フェムト秒レーザーを集光することで、多光子吸収によるレーザーアブレーションが誘起される。溶液のレーザーアブレーションを誘起した場合、熱的な効果が抑制されて衝撃波が生成される可能性が示されており³⁵⁻³⁷⁾、レーザー照射により実現した結晶化は、この衝撃波がきっかけとなり生じた可能性が高い。ナノ秒Nd:YAGレーザーの場合、先とう値がメガワットオーダーであり、衝撃波は発生していないと考えられる。そのため、結晶化には至らなかったと推測される。結晶化にはギガワットオーダーのレーザー強度が必要であると言える³⁸⁾。

その他の解釈として、高出力フェムト秒レーザーが作る電界により、分子が配向もしくは凝集した可能性^{26,39,40)}や光化学反応によるクラスター化が起こる可能性がある⁴¹⁾。また、レーザーによる爆発現象が起こるためのレーザー強度が照射回数の増加により減少する現象（インキュベーション効果）が知られている⁴²⁾。つまり、照射回数の増加により、結晶核生成に必要なレーザーパルスの光密度やレーザー強度が減少することも考えられる。さらに、レーザー照射により光熱変換が引き起こされ、焦点付近の溶液が瞬間的に蒸発し、溶質の濃縮が起こった結果として結晶核が生成した可能性もある。

5. 溶液攪拌によるタンパク質結晶の育成

結晶成長を制御するためには、溶液状態を制御することに他ならない。理想的には、育成溶液の濃度や温度などの状態を可能な限り均一にすることが望まれる。例えば、種結晶育成における濃度分布は、部分的な高過飽和を生むため、二次核（雑晶）の発生を引き起こしたり、結晶品質の低下につながる要因となる。雑晶が発生すると、その成長に溶質が消費され、種結晶に十分な溶質を供給することができなくなり、種結晶の成長が阻害される。また、雑晶の数や大きさが不確定なため、種結晶の成長速度の制御が困難となる。さらに、種結晶に雑晶が付着して多結晶化する恐れがあるため、長期間の育成ができず、目的の大きさまで成長させることが難しい。効率よく品質の良い大きな結晶を育成するには、溶液濃度を均一に保ち、かつ、雑晶の発生を抑制する必要がある。そのため、一般的には結晶育成中に溶液の攪拌が行われる。攪拌により溶液の濃度や温度を均一化することで、精密な過飽和度の制御が容易となり、高品質および大型結晶の

作製が実現されてきた。また、溶液攪拌における流れのダイナミクスや結晶成長メカニズムなどの研究も盛んに行われている⁴³⁾。

一方、タンパク質の結晶育成においては、育成中は可能な限り静置させるのが一般的である。溶液の対流を抑制することで品質の良い結晶が得られるとされてきた。特に、宇宙などの微小重力環境下で対流を抑制し、結晶の高品質化および大型化が検討されてきた⁴⁴⁻⁴⁹⁾。しかしながら、我々は無機や有機などの結晶育成と同様に、タンパク質の結晶成長においても攪拌による溶液状態の制御が必要であると考えた。これは、従来のタンパク質結晶の育成における概念とは異なる新しいアプローチである。

溶液を攪拌するにあたり、最も重要なことは、溶液に機械的な衝撃を与えないこと、全体的に均一な攪拌を行うことなどが挙げられる。溶液への機械的な衝撃は核発生を引き起こし、不均一な攪拌は濃度分布を発生させるためである。さらに、タンパク質の結晶育成においては、結晶が非常に軟らかく脆いため、攪拌による刺激や対流により結晶が崩れたり、変性したりするなどの弊害が生じる恐れがある。そのため、静置や対流を抑制する試みが積極的になったと考えられる。従って、タンパク質の結晶育成においては、機械的な衝撃を極力抑えた攪拌が必要である。つまり、緩やかに溶液を攪拌しなければならない。

タンパク質結晶を二液界面で浮かべて育成するTwo-Liquid Systemの有効性は、前述した通りである。この優れた育成法を発展させ、溶液攪拌を行う新しい手法を考案し、Floating And Stirring Technique (FAST)⁵⁰⁾と名づけた。この手法の模式図を図9に示す。

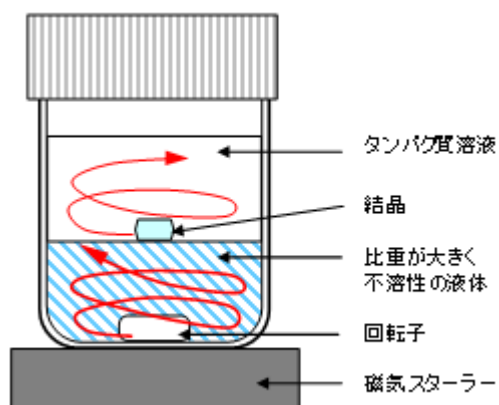


図9 FAST



図10 スターラーによる直接攪拌で白濁したタンパク質溶液

下層の液体に入れた回転子を磁気スターラーにより回転させ、下層の液体を攪拌することにより、上層のタンパク質溶液を間接的に攪拌する。磁気スターラーは小型で簡便なことから、溶液を攪拌する場合に広く利用されている。また、回転子が直接溶液を攪拌するため、攪拌能力が高く、溶質を溶媒に溶解させるときなどに適する。しかしながら、タンパク質の結晶

育成においては、緩やかな攪拌が必要であり、スターラーでの直接攪拌は機械的な刺激が強すぎる。スターラーで直接攪拌したタンパク質溶液は、タンパク質が変性してしまい、溶液が白濁化した（図 10）。通常、スターラーの回転速度を制御できるが、非常に低速な回転では、回転子が停止するケースが多く、継続的に安定した溶液攪拌ができない。たとえスターラーによる低速回転が実現できたとしても、駆動部（回転子）がタンパク質溶液の下部にあるため、回転子がタンパク質結晶と衝突し、機械的な損傷を与えてしまう。一方、FASTは下層液体が磁気スターラーの駆動力を和らげることで、緩やかな攪拌を実現できる。また、タンパク質溶液内に駆動機構（回転子）がなく、界面全体で攪拌を行うため、機械的な刺激や激みが少ない。さらに、FASTは緩やかな攪拌が可能であるため、育成途中で結晶が崩れるなどの弊害は発生しない。攪拌強度などの制御は、回転速度、回転子の形状、下層液体の容量や粘度を変化させることで、任意に調整できることも、FASTの大きな特長の一つである。また、マイクロリットルオーダーの微小容量と蒸気拡散に適応するよう工夫した容器（サイボックス株式会社との共同開発）を用いたFASTのことをMicro-FAST⁵¹⁾と呼んでいる。当然のことであるが、FASTやMicro-FASTはTwo-Liquid Systemの特長をすべて有する。

FASTと種結晶を用いた温度降下法による溶液攪拌実験の一例を示す¹⁴⁾。比較として、攪拌のない二液バッチ法による種結晶育成も同時に行った。ニワトリ卵白リゾチームの種結晶（約 1.5mm）を固定せず、界面に浮遊させた状態で育成した。リゾチーム結晶のc軸方向の長さ（mm）と溶液温度（℃）をプロットした育成履歴を図 11 に示す。溶液攪拌で育成した結晶は、育成期間 20 日で 3.0 mm の結晶が得られた（図 12）。同じ温度降下で育成したにも関わらず、結晶の成長速度は、攪拌なしの場合が 0.03 mm/day であったの

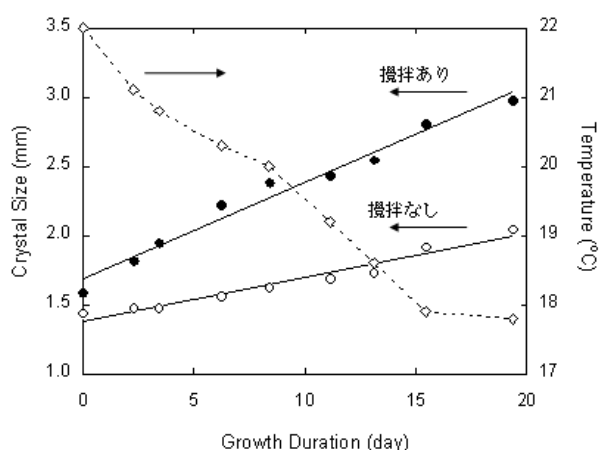


図 11 ニワトリ卵白リゾチームの成長履歴

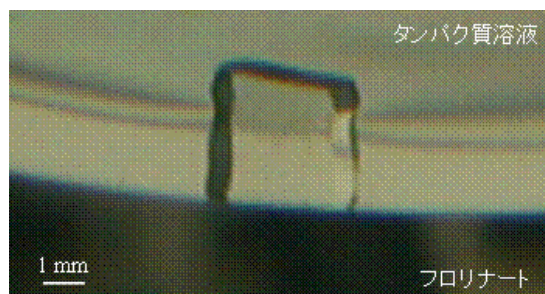


図 12 溶液攪拌により得られた大型ニワトリ卵白リゾチーム結晶

に対して、攪拌ありの場合は 0.07 mm/day と 2 倍以上も速かった。溶液攪拌をすることにより、種結晶への溶質供給が促進され、結晶がより速く成

長したと考えられる。また、静置法により成長速度 0.07 mm/day 程度の高速育成を行うと、20日未満で雑晶が発生していたが、今回の FAST による結晶育成では、雑晶の発生は見られなかった。刺激の少ない適度な攪拌においては、溶液濃度が均一化されることにより、自然核発生を抑制できたと考えられる。

また、より簡便な手法として、結晶育成容器ごと揺り動かし、タンパク質溶液を攪拌させる技術 Micro-Stirring Method⁵²⁾ も開発している。この方法においても、FAST や Micro-FAST と同じ溶液攪拌の効果を確認している。本手法を用いて結晶品質を向上させた実験の一例である藤沢薬品工業株式会社との共同研究で行った アデノシン・デアミナーゼ (ADA) の結果を示す^{53,54)}。ADA の複合体は、従来法では X 線構造解析に適した品質を持つ結晶の作製が困難であったが^{55,56)}、溶液攪拌により高品質結晶が得られた。その X 線回折パターンはスポットが明瞭であるが、静置で得られた結晶からのパターンは歪んでおり、構造解析に適さない (図 13)。また ADA の単体では、これまで結晶化したことがなかったが、溶液攪拌により初めて結晶化に成功し、高品質結晶の作製が可能となるなどの成果も得られている。

以上のように、溶液核攪拌による緩やかな強制対流のもとで育成したタンパク質結晶は、従来の静置で育成した結晶に比べ、大型で高品質な結晶が得られる、自然核発生が抑制され、結晶の析出数が減少する、結晶の成長速度が増大する、核発生の促進・遅延などの効果が分かっている^{57,58)}。

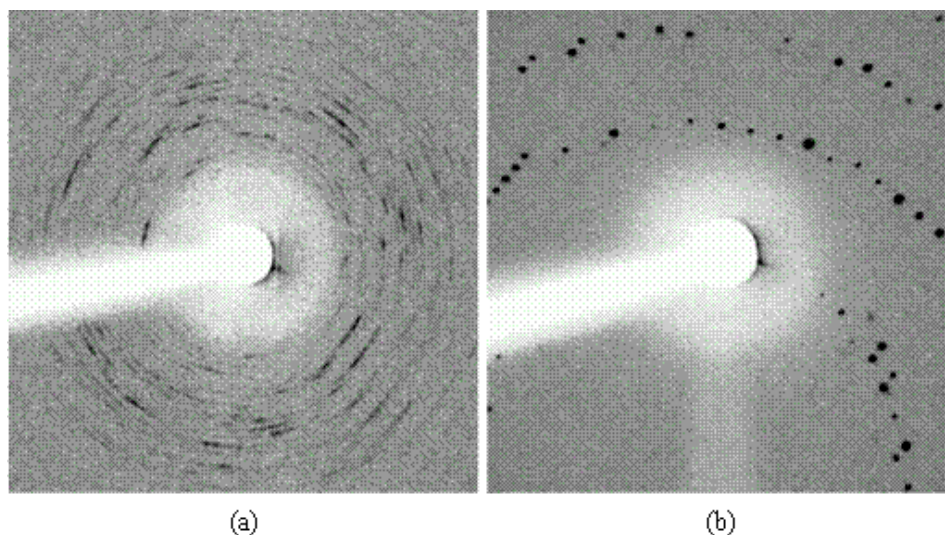


図 13 X 線回折パターン (a) 静置法で得られた結晶, (b) 溶液攪拌法で得られた結晶

6. 紫外レーザーによるタンパク質結晶の加工

タンパク質結晶の育成は難しく、結晶形状の制御はもちろんのこと、近接した結晶同士が付着して多結晶化するなど、X 線結晶構造解析に適する大きさや形状の単結晶が得られにくい。そのため、構造解析に適した結晶

形状に加工を施す場合がある。タンパク質結晶は非常に脆く軟らかいため、機械的なメスや針などによる既存の加工手法では、加工の成功確率が極めて低い。また、熱にも弱いことから、非熱的な加工が求められる。そこで、非接触かつ熱発生が少ない加工を目的とし、紫外パルスレーザー光を用いたソフトな加工技術(Pulsed UV Laser Soft Ablation (PULSA))を開発した⁵⁹⁾。この加工法は、低損傷かつ熱変性の少ない結晶加工を再現性良く実現できる。また、個人のスキルに依存しない精密な加工技術の確立が期待できる。

紫外光は赤外光や可視光に比べて光子エネルギーが高く、タンパク質分子の光吸収も大きい。特に、波長 300 nm以下の紫外光を吸収するが、その吸収係数は波長が短くなるにつれて大きくなり、波長 200 nm以下の深紫外領域では非常に高い吸収係数を有する^{60,61)}。また、発熱の影響を考慮すると連続光よりもパルス光の方が望ましい。我々は、紫外光発生用の波長変換材料であるCLBO(セシウム・リチウム・ボレート)を発見し、その高品質結晶作製技術を開発した^{62,63)}。CLBOを用いた全固体紫外レーザー装置の実用化に関して、株式会社ニコンと共同開発している⁶⁴⁾。レーザー波長 193 nmであり、従来のガスレーザー(ArFエキシマレーザー)に比べてパルス時間幅が一桁短く、パルス繰り返し周波数が高いという特徴を有している。つまり、本レーザー装置はタンパク質結晶加工に必要なとされる条件を兼ね備えている。

紫外パルスレーザー光による加工例を示す。ニワトリ卵白リゾチーム結晶にレンズを用いてレーザーを集光照射し、その光を切断する部分に対して移動させることで、結晶を切断した(図 14)。レーザー照射条件は、パルス幅約 1ns、繰り返し周波数 1kHzである。レーザー照射によるタンパク質の熱変性、クラックなどの機械的損傷は、顕微鏡観察では確認されなかった。さらに、この結晶のX線回折像を測定したところ、回折分解能は、同一条件で育成した未加工の結晶と同じ 1.9 Åであった。つまり、PULSAによる結晶への悪影響はなく、タンパク質結晶の加工に有効であることが分かった。

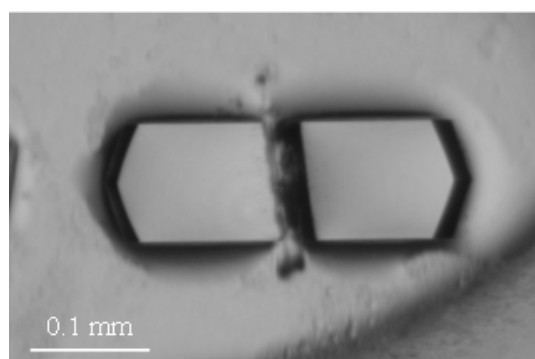


図 14 PULSA で切断したリゾチーム結晶

PULSAは低損傷で精度の高い加工を実現できるため、本稿で示した直線的な加工(切断)以外にも、メスなどを用いた手による操作では不可能な

穴あけや屈曲線加工なども容易である。レーザーの非接触加工を活かしたキャピラリー内の結晶加工なども実現できる⁶⁵⁾。また、より含水率が高く、加工が極めて困難とされるタンパク質結晶の加工にも成功している⁶⁶⁾。

紫外レーザーパルス光によるタンパク質結晶の操作として、ガラスに付着した結晶の剥離技術HACLI (Harvesting adhered crystals by laser irradiation)を開発した⁶⁷⁾。ハンギングドロップ法でガラスに付着した結晶やキャピラリー内に付着した結晶の取り出しに有効である。剥離操作の一例として、ニワトリ卵白リゾチームの実験を示す。波長 193 nmのパルス光をガラスと結晶の接触面に1ショット照射することで、石英キャピラリー内壁に付着した結晶を、機械的な損傷を与えることなく、取り出すことに成功した。また、HACLIにより取り出した結晶をX線回折測定したところ、同条件で育成した結晶と同じ分解能であった。

7. まとめ

異分野連携により結成した創晶プロジェクトから開発された新しいタンパク質の結晶育成技術について概説した。これまで一般的ではなかった積極的に結晶成長を制御する概念“創晶工学”を提唱し、大型および高品質結晶が作製できることを示した。ただし、結晶成長学の観点からすれば、それら詳細なメカニズムは不明である。我々は新技術の開発と立体構造解析に必要な高品質結晶の作製を中心に研究を行ってきた。今後は、基礎や理論を専門とする研究者など、創晶プロジェクトに不足している研究領域の方との連携により、メカニズム解明や新しい理論の提案などの新展開を望む。また、創晶プロジェクトでは、産学連携によるタンパク質結晶化の周辺装置開発も行っており、実用化を目指している。本稿で紹介した技術が、構造解析を始め、多くの研究領域で役立つ技術に発展することを期待する。

謝辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科の甲斐泰教授、金谷茂則教授、増原宏教授、細川陽一郎博士など、多くの研究者・技術者の支援と協力をいただき、得られた結果であります。また、本研究は文部科学省の大学等発ベンチャー創出支援制度の助成を受けて推進したものであります。その他、研究の一部は文部科学省、NEDO、JST、大阪北部(彩都)地域知的クラスター創成事業などの支援を受けた研究に関わっております。この場を借りて、感謝します。

参考文献

- 1) 安達宏昭、高野和文：熱測定 **30** (2003) 148.
- 2) N. E. Chanyen: Protein Eng. **9** (1996) 927.
- 3) P. A. Bancel, V. B. Cajipe, F. Rodier and J. Witz: J. Cryst. Growth **191** (1998) 537.
- 4) N. E. Chanyen: J. Cryst. Growth **196** (1999) 434.
- 5) A. Sanjoh and T. Tsukihara: J. Cryst. Growth **196** (1999) 691.
- 6) N. E. Chanyen: J. Cryst. Growth **198/199** (1999) 649.
- 7) H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki: J. Synchrotron Rad. **11** (2004) 121.
- 8) H. Adachi, T. Watanabe, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys. **41** (2002) L726.
- 9) H. Adachi, K. Takano, M. Morikawa, S. Kanaya, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: Acta Crystallogr. **D59** (2003) 194.
- 10) Y. Higuchi, T. Okamoto and N. Yasuoka: J. Cryst. Growth **168** (1996) 99.
- 11) Y. Mori, Y. Takahashi, T. Iwai, M. Yoshimura, Y. K. Yap and T. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys. **39** (2000) L1006.
- 12) H. Adachi, K. Nagaoka, F. Tsunesada, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, A. Sasaki, T. Nagatsuma, Y. Ochiai and N. Fukasaku: IEICE Trans. Elect. **E86-C** (2003) 1352.
- 13) H. Adachi, T. Taniuchi, M. Yoshimura, S. Brahadeeswaran, T. Higo, M. Takagi, Y. Mori, T. Sasaki and H. Nakanishi: Jpn. J. Appl. Phys. **43** (2004) L1121.
- 14) 安達宏昭、吉村政志、森勇介、佐々木孝友：日本結晶成長学会誌 **29** (2002) 311.
- 15) R. C Stevens: Curr. Opin. Struct. Bio. **10** (2000) 558.
- 16) J. R. Luft, J. Wolfley, I. Jurisica, J. Glasgow, S. Fortier and G. T. DeTitta: J. Cryst. Growth **232** (2001) 591.
- 17) N. E. Chayen and R. Hilgenfeld: Trends Biotech. **20** (2002) 320.
- 18) A. Villansenor, M. Sha, P. Thana and M. Browner: BioTech. **32** (2002) 184.
- 19) N. Watanabe, H. Murai and I. Tanaka: Acta Crystallogr. **D58** (2002) 1527.
- 20) H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, A. Niino, T. Ishizu, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys. **43** (2004) L76.
- 21) H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, A. Niino, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys. **43** (2004) L79.
- 22) N. E. Chayen, E. Saridakis, R. El-Bahar and Y. Nemirovsky: J. Mol. Biol. **312** (2001) 591.
- 23) A. D'Arcy, A. M. Sweeney and A. Haber: Acta Crystallogr. **D59** (2003) 1343.

- 24) E. A. Stura and I. A. Wilson: *J. Cryst. Growth* **110** (1991) 270.
- 25) H. Adachi, Y. Takahashi, J. Yabuzaki, Y. Mori and Y. Sasaki: *J. Cryst. Growth* **198/199** (1999) 568.
- 26) B. A. Garetz, J. E. Aber, N. L. Goddard, R. G. Young and A. S. Myerson: *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3475.
- 27) B. A. Garetz, J. Matic and A. S. Myerson: *Phys. Rev. Lett.* **89** (2002) 175501.
- 28) F. Tsunesada, T. Iwai, T. Watanabe, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *J. Cryst. Growth* **237-239** (2002) 2104.
- 29) 安達宏昭、細川陽一郎、高野和文、常定扶美、増原宏、吉村政志、森勇介、佐々木孝友：日本結晶成長学会誌 **29** (2002) 445.
- 30) 安達宏昭、細川陽一郎、増原宏、吉村政志、森勇介、佐々木孝友：レザ－研究 **32** (2004) 84.
- 31) H. Adachi, K. Takano, Y. Hosokawa, T. Inoue, Y. Mori, H. Matsumura, M. Yoshimura, Y. Tsunaka, M. Morikawa, S. Kanaya, H. Masuhara, Y. Kai and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) L798.
- 32) 安達宏昭、高野和文、松村浩由、井上豪、森勇介、佐々木孝友：日本結晶学会誌 **46** (2004) 238.
- 33) H. Adachi, S. Murakami, A. Niino, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, A. Yamaguchi and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) in press.
- 34) D. W. Oxtoby: *Nature* **420** (2002) 277.
- 35) Y. Hosokawa, M. Yashiro, T. Asahi, H. Fukumura and H. Masuhara: *Appl. Surf. Science* **154-155** (2000) 192.
- 36) Y. Hosokawa, M. Yashiro, T. Asahi, H. Masuhara: *J. Photochem. Photobio.* **142** (2001) 197.
- 37) Y. Hosokawa, T. Mito, T. Tada, T. Tanaka, T. Asahi, H. Masuhara: *Proc. SPIE* **4426** (2002) 113.
- 38) S. Watanabe, S. Nagasaka, K. Noda and H. Tashiro: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) L941.
- 39) P. Borowicz, J. Hotta, K. Sasaki, and H. Masuhara: *J. Phys Chem. B* **102** (1998) 1896.
- 40) S. Masuo, H. Yoshikawa, T. Asahi and H. Masuhara: *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 905.
- 41) A. Tam, G. Moe and W. Happer: *Phys. Rev. Lett.* **35** (1975) 1630.
- 42) S. Preuss, M. Spath, Y. Zhang and M. Stuke: *Appl. Phys. Lett.* **62** (1993) 3049.
- 43) 柿本浩一：流れのダイナミクスと結晶成長、共立出版 (2002)
- 44) W. Littke and C. John: *Science* **255** (1984) 203.
- 45) L. J. DeLucas, F. L. Suddath, R. Snyder, R. Naumann, M. B. Broom, M. Pusey, V. Yost, B. Herren, D. Carter, B. Nelson, E. J. Meehan, A. McPherson

- and C. E. Bugg: *J. Cryst. Growth* **76** (1986) 681.
- 46) A. McPherson: *Trends Biotech.* **15** (1997) 197.
- 47) 田仲広明, 佐藤勝, 桑原啓一: *日本マイクログラフィティ応用学会誌* **18** (2001) 233.
- 48) C. P. Lee and A. A. Chernov: *J. Cryst. Growth* **240** (2002) 531.
- 49) 高妻孝光, 渡辺博義信, 吉崎泉, 山中亜利, 中村裕彦: *日本結晶成長学会誌* **29** (2002) 385.
- 50) H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **41** (2002) L1025.
- 51) H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, M. A. Niino, T. Inoue, Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) L1161.
- 52) H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) L314.
- 53) H. Adachi, H. Matsumura, A. Niino, K. Takano, T. Kinoshita, M. Warizaya, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) L522.
- 54) H. Adachi, H. Matsumura, A. Niino, K. Takano, T. Kinoshita, M. Warizaya, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) L762.
- 55) T. Kinoshita, N. Nishio, A. Sato, M. Murata: *Acta Crystallogr.* **D55** (1999) 2031.
- 56) T. Kinoshita, N. Nishio, I. Nakanishi, A. Sato, T. Fujii: *Acta Crystallogr.* **D59** (2003) 299.
- 57) M. Yaoi, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) L686.
- 58) M. Yaoi, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) in press.
- 59) H. Kitano, H. Adachi, A. Murakami, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, S. Owa and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) L73.
- 60) A. R. Goldfarb, L. J. Saidel and E. Mosovich: *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 397.
- 61) M. M. Mayer and J. A. Miller: *Anal. Biochem.* **36** (1970) 91.
- 62) Y. Mori, I. Kuroda, S. Nakajima, A. Taguchi, T. Sasaki and S. Nakai: *J. Cryst. Growth* **156** (1995) 307.
- 63) R. Ono, T. Kamimura, S. Fukumoto, Y.K. Yap, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki and K. Yoshida: *J. Cryst. Growth* **237-239** (2002) 645.
- 64) H. Kitano, H. Kawai, K. Muramatsu, S. Owa, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) L166.
- 65) H. Kitano, H. Adachi, A. Murakami, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, S. Owa and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) L297.
- 66) A. Murakami, H. Kitano, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43** (2004) L873.

- 67) H. Kitano, H. Adachi, A. Sato, A. Murakami, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi and T. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys. **43** (2004) in press.