

光圧によるアミノ酸・蛋白質の分子集合体形成と結晶化への展開

(北大院理) ○東海林竜也, 坪井泰之, 喜多村 昇

【序】 医学・薬学の分野において、良質なタンパク質の結晶作成手法が要求されており、近年報告されたフェムト秒レーザーや光化学反応などの『光』を用いた結晶化技術は興味深い [1,2]。一方、我々はこれまでに、レーザー光を強く集光することにより発生する光圧を用いて、溶液中に均一に溶解している高分子鎖を集光位置に捕捉し、高分子の集合体が形成されることを明らかにしてきた [3]。この成果に基づき、我々は光圧による分子集合体形成を、タンパク質の結晶核生成に応用できるのではないかと考えた。本研究では、光圧を用いたタンパク質の結晶作成法の確立とその機構の解明を主な目的とし、リゾチームを用いた光圧による分子集合体形成と結晶作成を試みた。さらに、タンパク質のような高分子だけでなく、低分子であるアミノ酸でも、光圧による分子集合体形成が観測できたので、併せて報告する。

【実験】 タンパク質としてニワトリ卵白リゾチームを、アミノ酸として、DL-Arginine (Arg)、Glycine (Gly)、DL-Proline (Pro)、DL-Serine (Ser)を、溶媒として重水を用いた。実験装置は、既報のシステムを用いた [3]。cw Nd³⁺: YAG レーザー光 (1064 nm) を顕微鏡に導入し、集光位置に光圧を発生させた。cw Ar⁺レーザー光 (488 nm) を同軸に導入し、集合体のラマン散乱およびレイリー散乱を共焦点配置により測定した。結晶化にはマイクロバッチ法を用い、23 °C で結晶成長させた。

【結果と考察】 (i) タンパク質 (リゾチーム)

まず、リゾチームの光圧による集合体形成を試みた。リゾチーム過飽和重水溶液中に、YAG レーザーを数時間照射した。その結果、Ar⁺レーザー光の後方散乱光により、集光位置でナノメートルサイズの微粒子の形成を観測した (図 1)。また、図 2 に示すように、微粒子のラマンスペクトル (赤線) は、バルク溶液中のリゾチームのスペクトル (黒線) と一致した。従って、この微粒子はリゾチームの集合体であることが明らかとなった。一方、光圧ポテンシャルの計算を行ったところ、本実験条件においては、リゾチーム単分子ではなく、そのクラスター ($r \gg 20$ nm) が光圧により捕捉されることが示唆された。実際に、試料溶液の動的ラマン散乱を測定したところ、そのようなサイズを有するリゾチームクラスターの存在を確認することができた。

次に、光圧による分子集合体形成が、タンパク質の結晶化に及ぼす効果を検討した。YAG レーザーを照射して集合体を形成させた試料溶液と、未照射の試料溶液を 1 日静置し、溶液中に

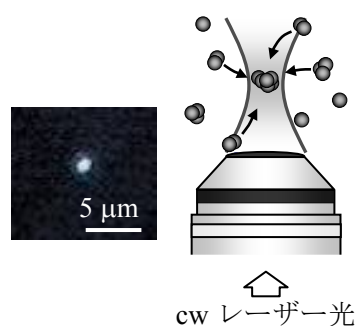


図 1 光圧により捕捉されたリゾチーム集合体の後方散乱画像と光捕捉の模式図

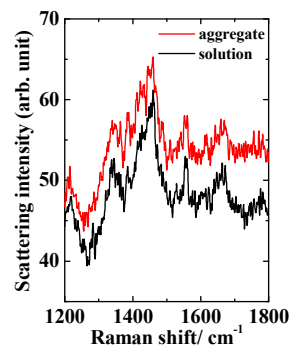


図 2 集合体 (赤線) と溶液中 (黒線) のリゾチームのラマンスペクトル

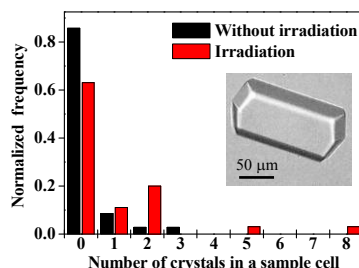


図 3 レーザー照射試料および未照射試料中の結晶数の頻度ヒストグラム

析出する結晶数を比較した (図 3)。その結果、照射試料の方が、結晶析出の確率および結晶数が大きく向上していることが明確に認められた。

このように、光圧は溶液中のリゾチームクラスターを集光位置に捕捉し、リゾチームの分子集合体を形成できること、さらにその集合体が結晶核の前駆体として働き、結晶化を促進することを、初めて明らかにした [4]。

(ii) アミノ酸系

次に、リゾチームよりもはるかに分子サイズの小さいアルギニン (Arg) を対象に、光圧によるアミノ酸分子の集合体形成を試みた。その結果、数分間のレーザー照射による微粒子の形成を、後方散乱光および明視野観察により観測することに成功した (図 4 (a))。また、図 4 (b) に示すように、Arg 溶液中に形成した微粒子のラマンスペクトルは、溶液中の Arg 由来のラマンスペクトルと一致した。したがって、形成された微粒子が、Arg 分子の集合体であることが明らかとなった。次に、Arg 分子の集合体形成機構を明らかにするため、YAG レーザー照射時におけるレイリー散乱強度の時間変化を測定した。図 4 (c) に示すように、散乱強度は段階的に増加したことから、溶液中に存在している Arg クラスターが光捕捉され、集合体が形成したと考えられる。より詳細な集合体形成機構は、現在検討中である。また、Gly、DL-Pro および DL-Ser 重水溶液中に光圧を印加すると、Arg と同様に微粒子の形成が後方散乱光により観測された。

以上の知見から、我々は、アミノ酸分子を光圧によりマニピュレートできることを、初めて明らかにした。今後、種々のタンパク質やアミノ酸などの低分子化合物の、分子マニピュレーションや結晶化への応用を検討していく。

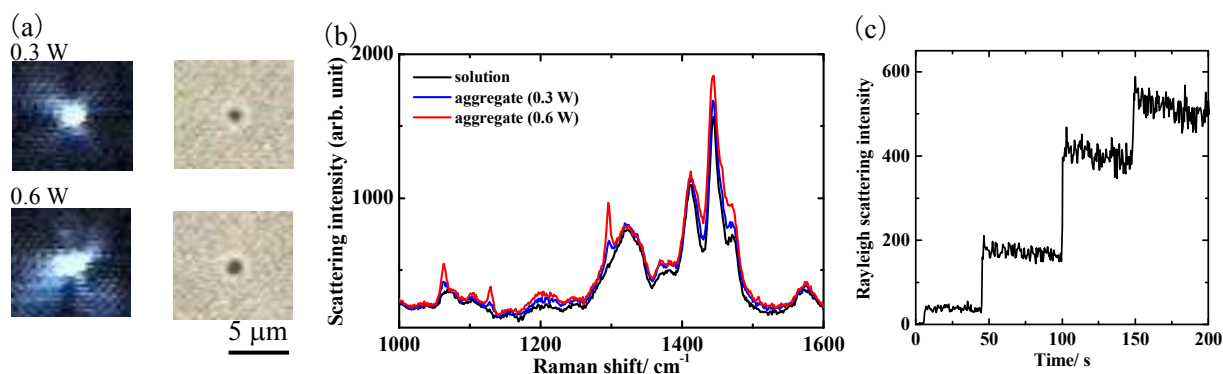


図 4 (a) 光圧により捕捉された Arg 集合体の後方散乱光と明視野画像、(b) 集合体 (赤線、青線) と溶液中 (黒線) の Arg のラマンスペクトル、(c) 光圧印加時におけるレイリー散乱強度の時間変化

【参考文献】

- [1] H. Adachi *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42** (2003), L798
- [2] T. Okutsu *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, **5** (2005), 1393
- [3] Y. Tsuboi *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80** (2007), 1926
(解説として、坪井、喜多村、*光化学*, **39** (2008)、32)
- [4] Y. Tsuboi, T. Shoji, N. Kitamura, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **46** (2007), L1234