

光-分子強結合場を用いたタンパク質の光誘起結晶化

(群馬大院工, さきがけ) 奥津哲夫, 治田 将, 山下 卓勇, 今井 央華, 戸丸 卓真, 堀内 宏明

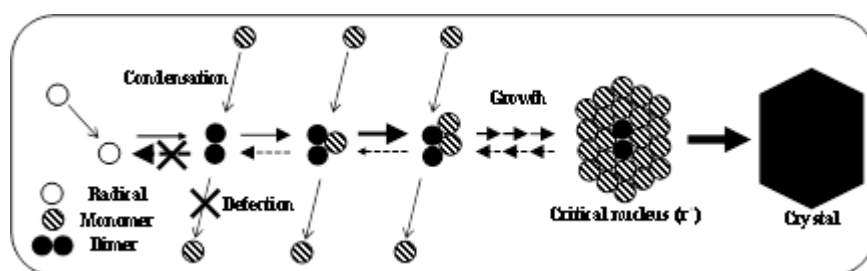
Photoinduced crystallization of protein with strong photon coupling field

(Gunma University, PRESTO JST) T. Okutsu, S. Haruta, T. Yamashita, H. Imai, T. Tomaru, H. Horiuchi

タンパク質の光化学反応をきっかけとして結晶成長が誘起される現象を見出し、機構の解明を進めてきた。今までに、この現象が本当であるか、再現性良く実験を進めるための実験方法の工夫を経て、①タンパク質の光化学反応の機構の解明、②光化学反応と結晶核形成の関連を合理的に説明する機構の提案と実証実験、③この現象をより多くのタンパク質の結晶化に適用する試みを進めてきた。光誘起結晶化の機構は次のように説明できる。

タンパクの Trp, Tyr, Phe 残基が光吸収し、Tyr のラジカルが反応中間体として生成し、ラジカル化したタンパクが基底状態のタンパクと反応して、共有結合性のダイマーを生成し、このダイマーが成長して結晶になる。一般に結晶成長の初期過程では、分子が集合してクラスターを形成してゆくが、最初にできる二量体が最も不安定であり、三量体に成長する前に分解してしまう。光化学反応で生成したダイマーは共有結合性のため分解しないため結晶化が促進されると考えた。共有結合性ダイマーから出発した場合は、モノマーが分子間力で二量体を作るのに比べ結晶になるまでの待ち時間が短縮される。

本研究では、光-分子強結合場を用い、タンパクをタンパクの吸収のない可視光の多光子過程により励起し反応させ、光誘起結晶化に導くことを検討した。



【実験】タンパクにはニワトリ卵白リゾチームを用い、塩化ナトリウムを沈殿剤として結晶化実験を行った。最初にタンパクの二光子励起により反応が進行し、結晶化が促進されるかレーザーを用いた方法で確認し、次に光-分子強結合場として金ナノ粒子および金ナノ構造を用い、可視の定常光励起により反応することを確認、結晶化実験を行った。タンパクの光吸収は 300nm よりも短波長にあり、本実験ではタンパ

クが吸収を持たない可視光を励起光源として用いた。

【結果】 1. YAG レーザーの 532nm をタンパクの過飽和溶液に集光すると、ダイマーが生成した。酵素活性はレーザーを集光した場合にのみ低下し、励起光強度依存性が2次であった。また、集光した溶液にはより多くの結晶が出現した。 2. 金ナノ構造上にタンパク溶液を滴下し、結晶化実験を行った。キセノンランプの 400nm 以下をカットした光を当てた。結果を右図に示す。コントロール(光照射-、金ナノ構造-)では結晶が出現しない条件で、(金ナノ構造+光+)では多くの結晶が出現した。このことから、金ナノ構造が光化学反応を誘起し、タンパクの光結晶化を促進させることがわかった。

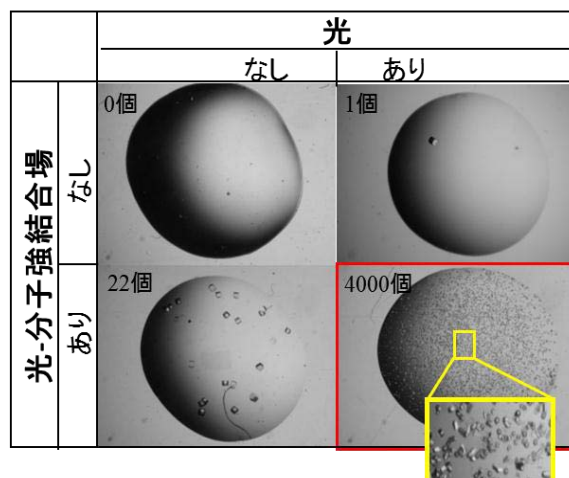
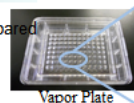


図1 光-分子強結合場を構築した基板上的での結晶化実験結果。溶液はニワトリ卵白リゾチームの過飽和でありながら結晶化が自発的に起こりにくい条件(準安定状態)とした。金ナノ構造+光+で著しく結晶化が促進された。

次に、タンパクの結晶化に用いられているプレートに金蒸着を行い、実用に向けた検討を行った。プレートの半分にウェルに金を蒸着し、その上に準安定状態のタンパク溶液を滴下し、金を蒸着していない部分と比較した。金蒸着膜でもダイマーの形成が確認された。結晶化実験の結果を図2に示す。金を蒸着した領域で光照射を5分行った場合に結晶化が促進された。本実験は光源にXeランプを用いているが、白色の蛍光灯でも効果が確認された。蛍光灯の光はXeランプに比べて弱いですが、特別の装置を用いずに結晶化を促進させることが可能なことを示した。

Examination for practical use

Au nano structure was prepared By Au spatter technique



Crystallization experiment

min	0	5	10	30	
Au	+	○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○
	+	○	○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○
	+	○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○
	-	○ ○ ○		○	
-					
-	○				

Crystallization is enhanced on commercial plate with Au thin film

図2 実用プレートに金蒸着し光を当てた実験結果。金+光で結晶化が促進された。

1. S. Haruta, H. Misawa, K. Ueno, Y. Yokota, H. Uehara, H. Hiratsuka, H. Horiuchi and T. Okutsu, Protein Crystallization Induced by Strong Photons-molecules Coupling Fields Photochemical Reaction, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 221, 268-272(2011).
2. K. Tawa, S. Haruta, T. Okutsu, J. Nishii, Photochemically induced crystallization of proteins promoted on the plasmonic chip, *Japanese Journal of Applied Physics (JJAP)*, in press.