

# 研究報告書

## 「光化学反応を駆使した分子結晶成長過程の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成9年10月～平成13年3月

研究者: 奥津 哲夫

### 1. 研究のねらい

タンパク質の結晶育成は、タンパク質の高次構造を X 線結晶構造解析により明らかにするために必要な工程である。解析されたタンパク質の構造の情報をもとに、創薬の分子設計が進められる。解析用の X 線源として放射光が利用されるようになり、結晶の解析技術は飛躍的に進歩し、結晶の育成技術のさらなる発展が求められるようになった。結晶育成の方法として、光の物理的あるいは化学的な摂動を利用する方法が近年見いだされた。光の物理的な摂動を用いた研究は、米国および大阪大学のグループが中心となり発展させてきた。大阪大学のグループはタンパク質の結晶化をベンチャービジネスとして事業化し、成功している。一方、光の化学的摂動を用いた結晶化の現象は本研究が見いだし、その機構の解明を進めている。光化学反応により結晶化が促進される機構は、反応で生成したタンパク質ダイマーが結晶核へと成長するためと推測されている。しかし、この現象を再現性よく高い確率で起こさせる方法は確立できておらず、実用に供する手法とするには不十分であった。

本研究では、タンパク質の光誘起結晶化の機構を詳細に調べ、結晶核を生成させる方法論を構築する。この方法論を、創薬の研究者が自ら使うことのできる技術に展開する。タンパク質の結晶化はハイスループットで行われることが多いが、光化学反応により核形成する瞬間をリアルタイムで観察し、一滴のタンパク溶液から結晶を得る方法を実現する。膜タンパク質は水に溶けづらく結晶化が難しいタンパク質であり、結晶化法の進歩特に期待されている。近年、膜タンパク質が溶けやすい媒質である脂質中で結晶化する方法が注目されてきた。脂質を用いた膜タンパク質の結晶化は脂質の相転移を利用して起こすものであるが、相転移を自由自在に起こさせる方法論の確立が望まれている。そこで、光化学反応を利用し相転移を空間限定して誘起させる方法論の構築を目指した。

これらの研究を通し、系に光子一個が与えられることにより、そこに存在する分子の集合状態を変化させる新しい光化学の研究を先駆けて展開することとした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

光化学反応を応用し、タンパク質の結晶成長を誘起させる研究を行った。タンパク質の結晶育成はタンパク質の機能を明らかにするための工程であり、創薬の分子設計につながる。このため、タンパク質結晶化の技術としてすぐれた方法の開発が望まれている。この10年の間に光誘起結晶成長の現象が見いだし、研究が進んできた。本研究者は、この分野の開拓者の一人として光化学反応により結晶化が誘起される現象を見いだした。本研究では、機構の解明を行い、実用化検討を進めた。

本研究の研究期間内に、タンパク質の光化学反応により何が起こるのか明らかにし、

反応によりなぜ結晶化が開始されるのか明らかにした。また、より多くのタンパク質にこの方法が適用できるよう、光化学反応の仕組みを構築した。その結果、この技術を必要とする研究者が機構を納得し、自らの手で行える結晶化装置を開発した。また、膜タンパク質の光誘起結晶化を媒質中で行うことを試みた。

光誘起結晶化が、結晶へ成長するテンプレートとなる分子が生成される機構であることを示し、テンプレートの構造を明らかにした。タンパク質の光化学反応に頼らず、カルボニル化合物の光化学反応を用いてタンパク二量体を作り出し、テンプレートとして機能する仕組みを考案し結晶化を誘起させることに成功した。テンプレートの生成を検出する方法として、光散乱強度の変化を観測するアルゴリズムを考案した。得られた結晶を構造解析し、解析に値する結晶が得られることを確かめた。これらの機構を組み込んだ、光誘起結晶化プレートを作製した。現在実用化を進めている。

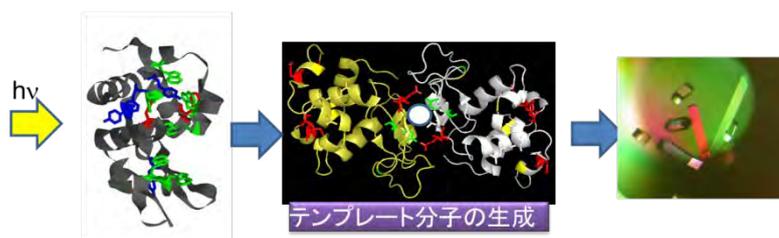
次に、膜タンパク質の光誘起結晶化の検討を行った。膜タンパク質の結晶化には、生体膜のモデル系である脂質の中で結晶化させる方法を検討した。脂質の相を自由自在に相転移させる方法があれば、膜タンパク質の結晶化は進歩が期待できる。本研究では光化学反応を応用して、脂質の相転移を起こすことを試みた。アゾベンゼンの光異性化反応を応用することにより脂質を相転移させることに成功した。膜タンパク質を用いて結晶成長させる実験を進めた。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「光化学反応による結晶化メカニズムの解明」

タンパク質の光化学反応により、なぜ結晶化が促進されるのか機構の解明を進めた。タンパク質のアミノ酸のうち、反応に関与するアミノ酸を特定し、反応生成物の構造を同定した。反応生成物は Tyr 残基間で結合したダイマーであることを解明した。結晶化が促進される機構は、結晶化を誘起する生成物が生成し、結晶成長のテンプレートとして機能する仮説を立て検証を進めた。テンプレートとは、結晶中で隣り合う二つの分子と似た配置をとるダイマーであると考えた。タンパク質の反応を解析し、生成するダイマーの構造を考察したところ、テンプレートとして機能する構造をとるものが生成することが判明し、光誘起結晶化の機構を明らかにした。

同時に、タンパク質の光反応でテンプレートが必ずしも生成しないことも明らかとなった。テンプレートを積極的に作り出す方法として、カルボニル化合物の光化学反応を応用することを考案し、デモンストレーションした。この方法で作製した結晶の構造解析を行い、光化学反応が関与して作られた結晶の構造は、結晶中にテンプレートを不純物として含むが、解析の結果定法で得られたものと同じであり、解析に値する結晶であることを示した。



## 研究テーマ B 「創薬の現場で行える技術への展開」

### 光散乱観測による核形成のアルゴリズム作製

この現象を実用に供する技術として発展させるためには、我々が行った実験結果の中から成功した結果を用いてデモンストレーションするだけでは不十分であり、確実に結晶化を導く方法論が必要である。具体的には反応を起こさせながら散乱光の変化をリアルタイムで観察し、核形成の瞬間をとらえる実験方法を考案した。その結果、テンプレートの形成と続いて起こる結晶成長のプロセスが、散乱光が一旦減少し次に増加する観測結果とよく対応することを突き止めた。この変化のパターンを検出することにより、ハイスループットに頼らず、一つの溶液から結晶を得られる方法論を構築した。

### 光結晶化プレートの作製

光化学反応を促進する結晶化容器の製作を行った。(特許 1-3) これは容器に金のナノ構造を構築し、表面プラズモン共鳴を誘起し、可視光の多光子吸収によりタンパク質を励起し反応させて、テンプレートを生成させるものである。図 2 に製作した結晶化促進プレートの写真を示す。



図 2 作製した結晶化プレート。シットティングドロップ結晶化容器に金ナノ構造を構築してある。このウェルにドロップされた溶液から結晶が出現しやすくなる。

このプレート上のウェルにタンパク溶液を滴下し、蛍光灯の光を当てながら保存すると結晶化頻度が高くなる。このプレートで作製した結晶と定法で作製した結晶の構造を調べたところ違いは見いだせなかった。このことから、実際に用いる方法として好ましいことを示した。現在企業が実用化を進めている。この方法の利点は、創薬の現場で用

いられている実験方法を一切変更することなく、このプレートを用いるだけで、結晶化確率を高めることができる点にある。特許出願を行い、実用化との関連から早期審査を進め出願後一年で登録された。(特許第 5224306 号)

## 研究テーマ C 「膜タンパク質の光誘起結晶化の検討」

膜タンパク質は水に溶けにくく、結晶化が難しいタンパク質である。本研究では膜タンパク質を水中で結晶化するのではなく、脂質の中で結晶化させる方法を、光化学的に制御することを試みた。図 3 に概要を示す。



図 3 脂質を媒質として用いた膜タンパク質の結晶化

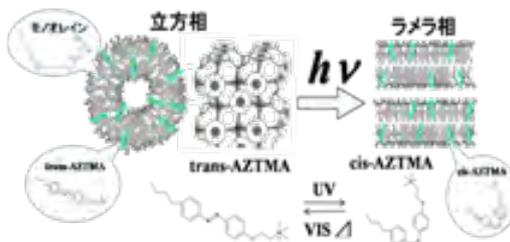


図 4 光誘起膜タンパク質のアイデア

脂質の中での結晶化とは、脂質立方相を膜タンパク質に対する媒質として用い、立方相が

ラメラ相に相転移するとき膜タンパク質を結晶化させるものである。

本研究では、光機能性分子を相転移の摂動として用い、光化学反応により相転移を誘起させることを試みた。図4に本研究のアイデアを示す。光機能性分子には trans-cis 光異性化反応を起こすアゾベンゼン部位を持つ界面活性剤を用いた。構造変化に伴い、膜タンパク質の核形成を制御することができると期待した。

実験を行った結果、立方相 (Ia3d) からラメラ相 ( $L\alpha$ ) への光誘起相転移が確認された。次に、このサンプルにバクテリオロドプシンを加え結晶化実験を行った。光を当てないときに出現した結晶に対し、光を当てて相転移を起こした場合は出現した結晶の数が増えた。このことから相転移により核形成を誘起させることを示すことができた。この結果を踏まえて研究期間の最後に特許申請を行った。(特許4)

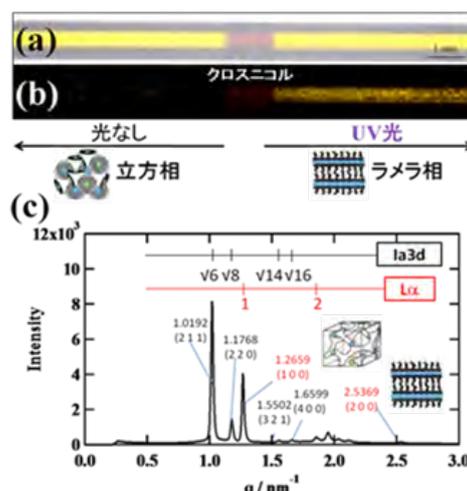


図5 (a) AZITMA/モノオレイン混合相のキャピラリー中の画像。右側のみ UV 光を照射した。 (b) 光照射後の偏光画像。 (c) 光誘起相転移を起こしたサンプルの小角 X 線散乱の結果。

### 3. 今後の展開

さきがけ研究により、タンパク質の光化学反応により結晶核形成が誘起される機構を解明することに成功した。具体的には、光化学反応生成物の構造が、結晶中の分子の配列と類似したテンプレートとして機能することを示した。また、このテンプレートをタンパク質の種類に依存することなく生成させる光化学反応の仕組みを構築した。結晶化誘起のデモンストレーションは自信を持って演示する段階まで来た。次の展開は、今までに結晶化ができておらず構造が明らかでないタンパク質を対象とし、この方法で初めて結晶を育成し、構造解析を行う、という段階に進む。今後は医学・薬学系の研究者と共同で仕事を進める体制をとり、我々の技術の発展がライフ分野の発展に具体的に貢献するべく展開をはかりたい。

膜タンパク質の結晶化方法について、今回研究で端緒をつかんだアイデアを発展させ、新たな結晶化法としての可能性を探究する。相転移を誘起する光機能性界面活性剤に適した化合物の特性を明らかにし、分子設計の指針を得る。これと組み合わせる媒質としての脂質についても分子設計を検討する。これにより、脂質の相転移を自由自在に制御する方法を開発し、膜タンパク質の脂質中における結晶育成法を展開する。光でのみ相転移が実現し、光を当てたところだけで結晶化が起きる仕組みの構築を目指す。

### 4. 自己評価

本研究では、タンパク質の結晶化が光化学反応により誘起される機構を解するだけでなく、タンパク質の結晶化方法として一般的に利用されることを目指した。リゾチームのようなモデル系

タンパク質で起きる光誘起結晶化の機構を解き明かし、テンプレートとなる分子の構造を決定した。と同時に、この結果が、モデルタンパク質以外の系では必ずしも発現せず、普遍的に起こる現象ではないことが判明した。これに対し、カルボニル化合物の水素引き抜き反応でアミノ酸残基と反応させることにより、テンプレートを作り出すアイデアを考案し試み、多くのタンパク質に対し適用可能な方法を開発し解決した。高エネルギー加速器研究機構の構造解析グループ加藤龍一氏の協力を得て、本方法で作製した結晶の構造解析を行い、結晶が定法で作製したものと変わらないことが確認でき、実用に使える技術であることを示した。これらの機構を実現する結晶化プレートを発明し、特許を出願した。さらに、膜タンパクの光誘起結晶化に関する研究にも着手した。研究開始の当初は具体的なアイデアは無く、期間途中からのチャレンジであった。予備実験的な結果ではあるが、アイデアを実現する方向性を見いだした。この研究では、合成、バクテリアの培養、脂質の取り扱い、小角 X 線散乱等の実験を、同僚の協力を得て進めた。この研究は今後プロジェクト型のテーマとして進展させるべきと考える。

## 5. 研究総括の見解

光照射による結晶の核生成と成長のメカニズムを解明し、タンパク質結晶の作製に関する方法論の確立を目指した。その結果、光誘起の化学反応により結晶核となるタンパク質二量体が生成され、その二量体がテンプレートとして働くことにより結晶が成長するメカニズムを明らかにした。また、プラズモンを利用した結晶成長技術を開発し積極的に特許を出願、さらに製品化を目指す一方、脂質膜の光相転移を利用した膜タンパク質の結晶化法を提案した。このように基礎研究、特許出願、製品化展開してきた奥津研究者のアプローチは、「光の利用」研究を体現したモデルケースである。脂質膜の光相転移を利用した膜タンパク質の結晶化法においても同様な研究活動を展開することを期待する。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. 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.
2. T. Kuroiwa, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, T. Okutsu, Verification of Photochemically Induced Crystallization Mechanism of Proteins by Dimer Addition, , Key Engineering Materials, in press.
3. N. Candoni, Z. Hammadi, R. Grossier, M. Ildefonso, E. Revalor, N. Ferté, T. Okutsu, R. Morin, S. Veessler, Nanotechnologies dedicated to nucleation control, *Int. J. Nanotechnology*, 9, 439-459 (2011).
4. 奥津哲夫, 光化学反応をトリガーとするタンパク質の結晶化, *光化学*, 40(1), 26-32 (2009).
5. E. Revalor, Z. Hammadi, J-P Astier, R. Grossier, E. Garcia, C. Hoff, K. Furuta, T. Okutsu, R. Morin and S. Veessler, Usual and Unusual Crystallization from Solution, *J. Crystal Growth*, 312, 939-946 (2009).

(2)特許出願

研究期間累積件数:4件

1.

発明者: 奥津哲夫, 三澤弘明, 上野貢生

発明の名称: 結晶化用基板、結晶化用容器、結晶化装置、及び、結晶の製造方法

出願人: 群馬大学, 北海道大学

出願日: 2010/1/9

出願番号: PCT/JP2010/064908

2.

発明者: 奥津哲夫

発明の名称: 結晶化用基板、結晶化用容器、結晶化装置、及び、結晶の製造方法

出願人: 群馬大学

出願日: 2012/1/31

出願番号: 特願 2012-018239 登録 特許第 5224306 号

3.

発明者: 奥津哲夫

発明の名称: 結晶化用基板、結晶化用容器、結晶化装置、及び、結晶の製造方法

出願人: 群馬大学

出願日: 2013/1/25

出願番号: PCT/JP2013/051544

4.

発明者: 奥津哲夫、高橋 浩、園山正史、伊平 寛

発明の名称: 膜タンパク質の結晶化方法及び膜タンパク質結晶化剤

出願人: 群馬大学

出願日: 2013/3/7

出願番号: 特願 2013-045219

(2) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 日本結晶成長学会誌 vol. 38, 2011 特集「光で成長する結晶」責任編集

2. 日本化学会第 93 春期年会特別企画 「光化学と光生物学のマリアージュ」  
企画責任者

3. 「光化学若手の会」主催 2012 年 6 月 草津セミナーハウス

4. T. Okutsu, Photochemically Induced nucleation of Protein and its Practical Application, International topical meeting, Akiu, Hotspring Miyagi, 4 March 2013 (invited).

5. T. Okutsu, H. Ihira, T. Kuroiwa, S. Haruta, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, Photochemically induced crystallization, APC2012, Osaka, 2012.

