

タンパク質光結晶化技術

安達 宏昭^{*,**}・森 勇介^{*,**}・佐々木孝友^{*,**}・高野 和文^{*,**}
井上 豪^{*,**}・松村 浩由^{*,**}・村上 聡^{*,***}

Protein Crystallization Using Laser Irradiation

Hiroaki ADACHI^{*,**}, Yusuke MORI^{*,**}, Takatomo SASAKI^{*,**}, Kazufumi TAKANO^{*,**},
Tsuyoshi INOUE^{*,**}, Hiroyoshi MATSUMURA^{*,**} and Satoshi MURAKAMI^{*,***}

SOSHO was just founded in July, 2005 by Osaka University researchers of SOSHO project (crystal design project). We developed crystallization method of a protein molecule by laser irradiation, and call this process laser irradiated growth technique (LIGHT). Effective crystallization was confirmed by applying a femtosecond laser. High-quality protein crystals were obtained by LIGHT from normally uncrystallized conditions. These results indicate that laser irradiation generates crystal nuclei; protein crystals can then be grown from the nuclei that act as seeds in a low supersaturated solution. We also proposed new processing techniques for protein crystals, femtosecond laser induced cut and cleave operation (fs-CACO) and pulsed UV laser soft ablation (PULSA). These techniques will be powerful tools and will accelerate protein structural analysis.

Key words: crystallization, protein, femtosecond laser, laser processing, venture business

文部科学省の平成14年度の大学等発ベンチャー創出支援制度に採択され、新機能結晶の開発に携わる研究者とタンパク質研究者との異分野連携によるタンパク質の新しい結晶育成技術を開発する「創晶プロジェクト」が発足した。3年間にわたる研究開発と起業に向けたマネジメント活動を経て、平成17年7月に大阪大学発バイオベンチャーとして「株式会社創晶」を設立した。事業の柱は、タンパク質の結晶化受託である。結晶化は創薬研究のボトルネックになっていた工程のひとつであり、筆者らは創薬を支援するビジネスを展開している。

ポストゲノム時代の創薬研究は、病気に関連するタンパク質分子の立体構造情報に基づき、医薬候補化合物（有機低分子）を設計する。そのためには、タンパク質分子の詳細な立体構造が必要である。タンパク質の良質な結晶が得られれば、X線回折による結晶構造解析が可能であり、原子レベルの分解能で立体構造が明らかとなる。その過程で

ボトルネックとなるのが、タンパク質の結晶作製である。

タンパク質は分子が巨大で、かつ構造が複雑である。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が占有していることもあり、タンパク質の結晶育成は、無機や有機材料の結晶育成に比べて、きわめて困難である。さらに、結晶化条件が個々のタンパク質により異なり、その条件探索は数千～数万にも及ぶ。膨大な条件探索をしても、結晶化に至らない場合が多く、結晶化の成功確率はたかだか20%程度である。幸運に結晶が得られたとしても、結晶が脆く軟らかく、かつ乾燥や温度変化に弱い。そのため、結晶の取り扱いも難しい。

筆者らは、タンパク質結晶育成の工程でボトルネックとなっている結晶化と結晶加工に対して、レーザー光を用いて課題の解決を目指している。タンパク質を専門とする研究者には“非常識”とも思えるレーザー照射による技術開発は、結晶化や結晶加工の成功確率を飛躍的に向上させ、

* (株)創晶 (〒541-0053 大阪市中央区本町1-6-18 丸武本町ビル3F) E-mail: adachi@so-sho.jp

** 大阪大学大学院工学研究科 (〒565-0871 吹田市山田丘2-1)

*** 大阪大学産業科学研究所 (〒567-0047 茨木市美穂ヶ丘8-1)

これまで不可能とされてきたことを可能にするなど革新的な技術として、認知されてきている。本論文では、これら新しいタンパク質の結晶化技術を最近の研究成果を紹介しながら概説する。また、異分野連携による研究の経緯や大学発ベンチャー起業に向けた取り組み、ビジネスの現状、そして今後の事業展開も紹介する。

1. タンパク質の結晶化

タンパク質結晶は、おもに溶液中で育成され、結晶を析出させるには、蒸気拡散や温度変化などによりタンパク質溶液の過飽和度を高くする必要がある。現在のタンパク質結晶化は、おもに回折構造生物学の専門家による経験と、無機や有機低分子化合物を題材として発展してきた結晶成長の専門家による理論や概念が組み合わさった方法が用いられている。それは、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、ハンギングドロップ蒸気拡散法やシットティングドロップ蒸気拡散法などのタンパク質の結晶化に適した手法により、多種の沈殿剤溶液を用いたスクリーニングを行う。

一般的に、温度を一定に制御したインキュベーター内で結晶育成溶液を静置させ、数週間から数か月、タンパク質が結晶化するのをじっと待つ。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、試行錯誤を繰り返す。一般に、タンパク質は準安定領域（過飽和状態にあるが、自然核形成には至らない領域。ただし、種結晶が溶液中にある場合は成長する）がきわめて大きく、過飽和度を高くしないと自然核成長による結晶育成はできない。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、結晶の大量析出による多結晶化などの問題が生じる。さらに、結晶の析出時期に大きくなればつきが生じ、実験の再現性が悪い。また、過度の過飽和状態にすると、アモルファス状の沈殿物が生じる。そのため、適度な過飽和度に調整する必要があり、理想的には、より低過飽和の溶液内で結晶化（核形成）させることができれば、結晶の急成長を回避でき、高品質結晶の育成につながる。

タンパク質分子は溶液中で解離と会合を繰り返しているが、結晶化は分子集合体（クラスター）の大きさが、ある一定の大きさ（臨界半径を超える大きさ）に達することで実現する。つまり、過飽和溶液中で結晶を析出させるためには、タンパク質分子の会合を促進させる必要がある。しかしながら、低過飽和溶液中では、タンパク質クラスターが臨界半径を超える確率はきわめて低いため、結晶化は実現されない。そこで、核形成を強制的に引き起こすため、

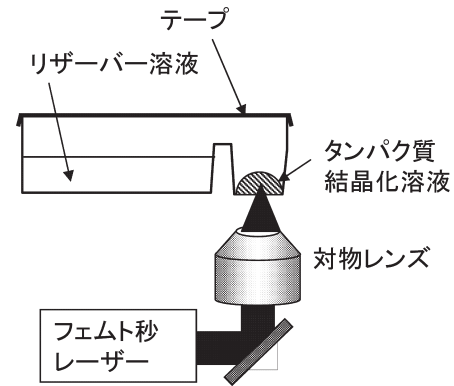


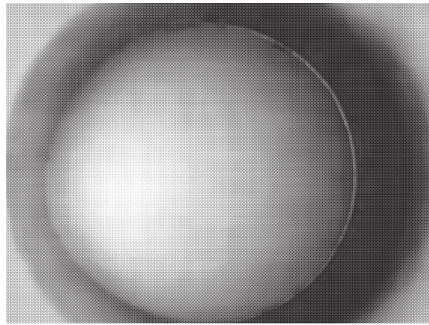
図1 シットティングドロップ蒸気拡散法におけるフェムト秒レーザーを用いたタンパク質結晶化技術 (LIGHT)。

溶液に機械的衝撃などを与えたりする。筆者らは短パルスレーザーを低過飽和溶液に集光照射することにより刺激（摂動）を与え、結晶核を生成することを試みた¹⁾。これまでに有機物を対象としたレーザー照射による結晶核生成が報告されている^{2,3)}。

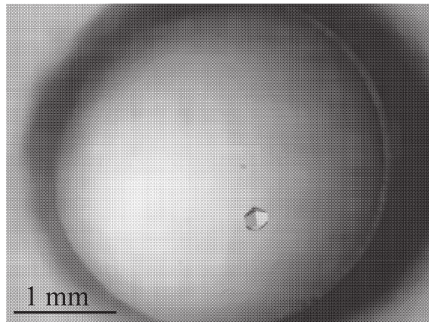
2. レーザー照射による結晶化技術

研究当初は、短パルスレーザーとして、有機物の結晶化で報告されたパルス幅がナノ秒である Nd:YAG レーザー（波長：1064 nm、パルス幅：23 ns）をタンパク質の結晶化にも用いてみたが、結晶化を確認できなかった。レーザーの照射時間を長くすることで、過度に摂動を与えた場合や、溶液濃度を高くしたり、溶液温度を変化させることで、過飽和度をさらに高めた場合においても、Nd:YAG レーザー照射による結晶化は確認できなかった⁴⁾。

これらの結果から、ナノ秒レーザーによる結晶核生成は、有機物においては有効であるが、有機分子よりも結晶化しにくいタンパク質では、その効果は確認できなかった。タンパク質の結晶化にはきわめて強い摂動が必要であると考え、パルス幅のより短いレーザーであるフェムト秒レーザーを用いて実験を行った（図1）。パルス幅はナノ秒レーザーに比べて10万分の1以下であり、ピークパワーはGW/cm²以上となる。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10倍の対物レンズで集光し、結晶化溶液に照射した。結晶育成のモデルタンパク質としてよく用いられるニワトリ卵白リゾチームをはじめ、グルコースイソメラーゼ、リボヌクレアーゼHなどの水溶性タンパク質の結晶化で有効であることがわかった（図2⁴⁾。なかでも、トリパノソーマ由来プロスタグランジン F_{2α} 合成酵素の結晶化では、結晶化期間が劇的に短縮した。この結晶は結晶化が困難で、



静置(レーザー照射なし)



レーザー照射有り

図2 レーザー照射の有無によるグルコースイソメラーゼの結晶化比較(育成1日目)。

結晶が析出したとしても数か月から半年を要していたが、レーザーを照射したサンプルでは2日後に結晶の析出を確認できた。比較対照実験のレーザーを照射しないサンプルは、3か月以上経っても結晶の析出は確認できなかった。

一方、創薬ターゲットのメインである膜タンパク質の結晶化においても、フェムト秒レーザー照射は有効であった。2002年に膜タンパク質である多剤排出トランスポーター AcrB の立体構造を 3.5 Å の分解能で立体構造を解明し、英国科学誌“Nature”の表紙を飾ったが、その後、さらに分解能を上げるため結晶化条件の最適化研究が続いていた⁵⁾。しかしながら、高い分解能のデータが取得できる結晶が得られない。膜タンパク質では、界面活性剤でタンパク質を可溶化しているため、時間とともにその効果が薄れてくる。つまり、結晶化もできるだけ短時間で完了することが求められ、高濃度で一気に結晶化させてしまう。品質を上げようとするれば、低濃度でゆっくりと結晶成長させたほうがいいが、核発生が起こらない。この矛盾点が、高品質結晶の作製を困難にしている。レーザー照射による結晶化は、低濃度溶液でも強制的に核発生が可能のため、結晶化の矛盾点を解決する。AcrB の場合、分解能が 2.3 Å に向上した⁶⁾。

このように、レーザー照射による結晶化技術(LIGHT: laser irradiated growth technique)は、結晶化自体が難

しいタンパク質の結晶化の促進だけでなく、結晶品質の向上により、詳細な立体構造解析に役立つ。最近では、製薬メーカーの創薬ターゲットサンプルの adenosine deaminase (ADA)⁷⁾ や合成酵素と tRNA の複合体⁸⁾、膜タンパク質複合体 SecDF⁹⁾ などの高品質結晶の作製に成功している。

3. レーザー照射による結晶加工

タンパク質の結晶育成途中に、多結晶化したり、内部に損傷が生じたりする場合はよくある。このままでは、X線回折には使えず、結晶育成条件の再検討をしなければならない。たとえば、密閉容器内の液中で結晶を加工することにより、良好な部分をトリミングし、必要に応じて再成長させることができれば、X線結晶構造解析に供する結晶が得られる。これまで小さなメスなど機械的なツールを用いて、結晶を手動操作で加工してきたタンパク質研究者には、不可能とも思える課題である。しかしながら、レーザー光学に詳しい研究者を擁する異分野連携チームであれば、フェムト秒レーザーを用いれば解決できることにたどり着く。フェムト秒レーザーによる加工技術(fs-CACO: femtosecond laser induced cut and cleave operation)では、集光点付近では多光子吸収によるレーザーアブレーションが誘起され、タンパク質結晶が液中で加工できた(図3)¹⁰⁾。また、育成途中の結晶を加工して、良好な結晶部分からの再成長により、大きな結晶を得ることに成功している(図4)¹¹⁾。

一方、筆者らが以前開発した波長 193 nm の紫外レーザーによる加工(PULSA: pulsed UV laser soft ablation)^{12,13)}では、容器や溶液に光が吸収されて育成中の結晶加工ができない。ただし、PULSAは低温で凍結させたクライオ状態のタンパク質結晶の加工には威力を発揮する。たとえば、結晶を保持するループや結晶周囲の溶媒は、測定ノイズとなり、X線回折測定には不要であり、これらをレーザーですべて削ぎ落とし、タンパク質結晶のみの状態にまで加工できる。形状としても、球状加工を実現し、筆者らは protein crystal ball とよんでいる(図5)¹⁴⁾。現在、(株)ニコンで市販化に向けて、製品開発中である。

以上のように、加工課題に応じたレーザー光源を選択することで、従来の手作業では、達成しえない加工を実現した。さらには、研究者の技量と運に依存していた結晶加工の成功率が、レーザー加工においては、きわめて高い成功率で微細、かつ低損傷の加工を容易に達成可能である。

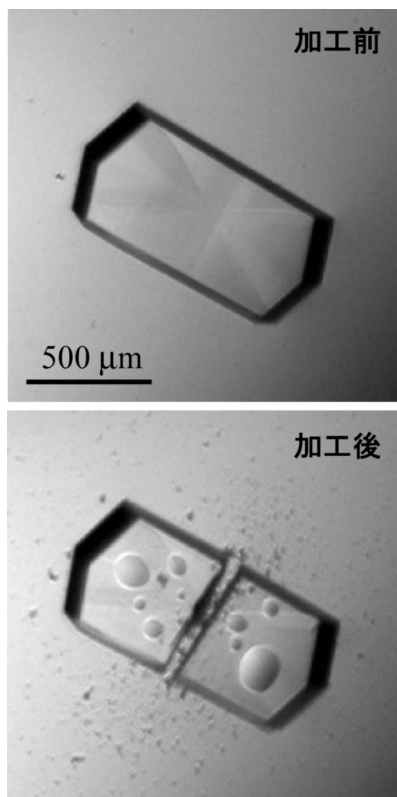


図3 フェムト秒レーザーによるタンパク質結晶の液中での加工例。

4. 大学発ベンチャー起業

タンパク質の結晶化技術の開発において、研究者の異分野連携が革新的な技術の創出につながった。ある分野で難問と思われていたことが、他の分野では既存技術を改良・工夫することにより解決可能と思える場合が多々ある。自分の専門を聖域として異分野を遠ざけがちな研究者が多いとは思いますが、垣根を越えて、目指すべき対象に対して異分野混成チームでニーズや課題を出し合い、議論することが、ブレークスルーとなる革新技術を創出する近道かもしれない。ベンチャー起業も同様に、異分野連携というスキームが成功の鍵であった。研究者は開発した技術には詳し

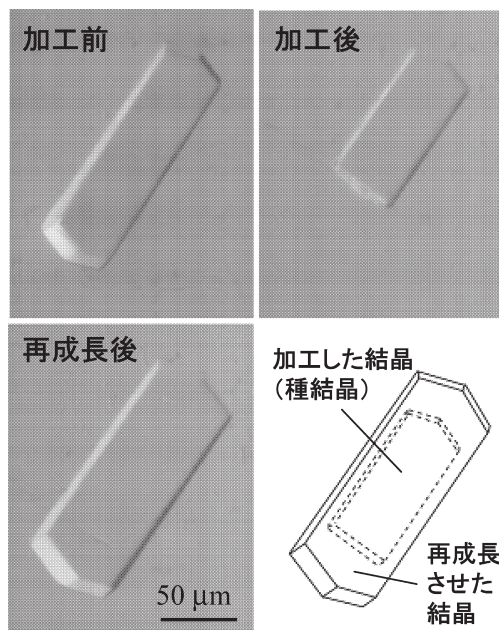


図4 フェムト秒レーザー加工後の再成長によるタンパク質結晶の大型化。

くても、ビジネスは不慣れな領域であるため、三菱商事(株)や大阪 TLO, 弁理士, 弁護士など多くの方と連携が必要であった。筆者らは必要に応じて、最良と思える方と連携を取り、ベンチャー起業という明確な目標に向かって邁進してきたのである。

起業する際、特に議論を重ねたのが、ビジネスモデルである。事業として結晶化受託に特化するのか、創薬ベンチャーを目指すのか。既存のビジネスモデルとしては、2005年春に武田薬品工業(株)が285億円で買収した米国の Syrrx 社(現、武田サンディエゴ(株))や英国の Astex Technology 社などが有名である。創薬支援ビジネスで成功しているベンチャーはいずれも創薬型であった。受託型ベンチャーは市場規模が小さく、当然、株式公開(IPO)も視野に入らないため、夢を大きく描ける創薬ベンチャーが主流であるが、筆者らの強みは結晶化技術である。結晶化

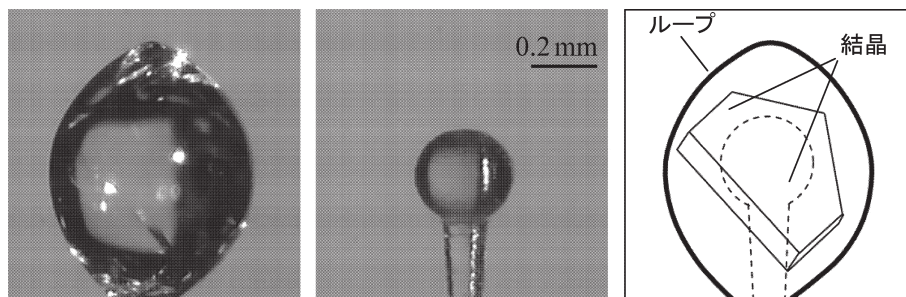


図5 紫外レーザーを用いた凍結状態のタンパク質結晶の球状加工。

の前工程であるタンパク質の発現や精製，後工程である構造解析やリード化合物設計などを手がけるとなると，売上げも増えるが，投資規模が大きくなり，リスクが増大する。ただでさえリスクの高いベンチャーは，リスクをできるだけ低減できるビジネスモデルを構築し，売上げ増よりも事業の存続を第一に考えることが大切と判断し，結晶化受託に特化することにした。

創業して1年が経過したが，製薬会社から順調に発注をいただいております，事業が軌道に乗りつつある。国内での結晶化事業の基盤を固めて，海外展開するのが次なる課題である。海外との連携をスムーズに行い，少しずつ着実に企業発展していければと願う。

レーザーによるタンパク質結晶化技術を中心に話題を展開してきたが，異分野連携の大切さや意義について共感いただければ幸いです。異分野連携というと大げさかもしれないが，情報交換や他人の教をを請うことは，どのような場面でも重要である。言い換えれば，まさに人的ネットワークとコミュニケーションが成功の鍵を握っている。筆者らは技術開発からベンチャー起業という流れの中で，異分野連携を積極的に活用し，その有効性を痛感している。今後も，異分野連携を積極的に推し進め，さらなる企業発展に努めていきたい。

文 献

- 1) 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：“有機およびタンパク質結晶育成における短光パルスレーザーの効果”，日本結晶成長学会誌，**29** (2002) 445-449.
- 2) B. A. Garetz, J. E. Aber, N. L. Goddard, R. G. Young and A. S. Myerson: “Nonphotochemical, polarization-dependent, laser-nucleation in supersaturated aqueous urea solutions,” *Phys. Rev. Lett.*, **77** (1996) 3475-3476.
- 3) F. Tsunesada, T. Iwai, T. Watanabe, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: “High-quality crystal growth of organic nonlinear optical crystal DAST,” *J. Cryst. Growth*, **237-239** (2002) 2104-2106.
- 4) 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: “Laser irradiated growth of protein crystal,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42** (2003) L798-L800.
- 5) S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita and A. Yamaguchi: “Crystal structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB,” *Nature*, **419** (2002) 587-593.
- 6) H. Adachi, S. Murakami, A. Niino, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, A. Yamaguchi and T. Sasaki: “Membrane protein crystallization using laser irradiation,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43** (2004) L1376-L1378.
- 7) H. Adachi, A. Niino, S. Murakami, K. Takano, H. Matsumura, T. Kinoshita, M. Warizaya, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki: “Protein crystallization by combining laser irradiation and solution-stirring techniques,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44** (2005) 1365-1366.
- 8) T. Numata, Y. Ikeuchi, S. Fukai, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, T. Suzuki and O. Nureki: “Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tRNA thiolation enzyme MnmA from *Escherichia coli* complexed with tRNA^{Glu},” *Acta Crystallogr.*, **F62** (2006) 368-371.
- 9) T. Tsukazaki, H. Mori, S. Fukai, T. Numata, A. Perederina, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, D. G. Vassylyev, O. Nureki and K. Ito: “Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*,” *Acta Crystallogr.*, **F62** (2006) 376-380.
- 10) M. Kashii, H. Kitano, Y. Hosokawa, H. Adachi, Y. Mori, T. Sasaki, H. Masuhara, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, K. Sugamoto and H. Yoshikawa: “Femtosecond laser processing of protein crystals in crystallization drop,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44** (2005) L873-L875.
- 11) K. Takeuchi, H. Kitano, H. Adachi, Y. Mori, T. Sasaki, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, M. Doi, Y. Koga, K. Takano and S. Kanaya: “Protein crystal growth using laser-processed seed crystals,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44** (2005) 3177-3179.
- 12) H. Kitano, H. Adachi, A. Murakami, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, S. Owa and T. Sasaki: “Protein crystal processing using a deep-UV laser,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43** (2004) L73-L75.
- 13) A. Murakami, H. Kitano, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi and T. Sasaki: “Universal processing technique for protein crystals using pulsed UV laser,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43** (2004) L873-L876.
- 14) H. Kitano, H. Matsumura, H. Adachi, S. Murakami, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi and T. Sasaki: “Protein cryocrystallography using laser-processed crystal,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44** (2005) L54-L56.

(2006年8月9日受理)