

新規タンパク質結晶化法の開発

～ 若手異分野連携が産む逆転の発想～

株式会社創晶¹、大阪大学²

安達宏昭¹、新納愛¹、松村浩由^{1,2}、高野和文^{1,2}、村上聡^{1,2}、井上豪^{1,2}、森勇介^{1,2}

1. はじめに

生命現象の解明や創薬などを目的として、タンパク質の立体構造を解き明かす研究が盛んに行われている。我が国でも「タンパク 3000」が平成 14 年度からの 5 年計画で進行中である。X 線結晶構造解析は、核磁気共鳴 (NMR) 法による解析と並んで、タンパク質の立体構造を知るための主要な手段である。この X 線解析において、組換えタンパク質の発現・精製、放射光設備、解析ソフトなどの技術が飛躍的に進展している。そしてタンパク質の X 線解析は、専門家だけではなく一般のタンパク質研究者にも広く普及しはじめている。そのような中、ボトルネックとなっているのが、タンパク質の結晶化である。結晶化に関しては、スクリーニングキットや自動化装置などが開発されてきたが、画期的な技術革新がなされてこなかったと言っても過言ではない。それは、結晶化が難しい問題であるためと、結晶作製が最終的な目標でないことによりその問題に取り組む研究者が少なかったためと思われる。

通常、タンパク質の結晶は溶液中で育成される。現在のタンパク質結晶化では、主に構造解析の専門家による経験と結晶成長の専門家による理論的概念が組み入れられた手法が普及している。それは、貴重かつ微量の試料で結晶を作製するため、多種の沈殿剤溶液を用いた蒸気拡散法によるスクリーニングである (図 1)。そして、温度一定で静置させ、数日から数ヶ月、結晶が出来るのをじっと待つ。運が良ければ最初のスクリーニングで構造解析に適した結晶を得ることが出来るが、多くの場合、得られた微結晶をもとに、条件の最適化に向けた二次スクリーニングを行う。

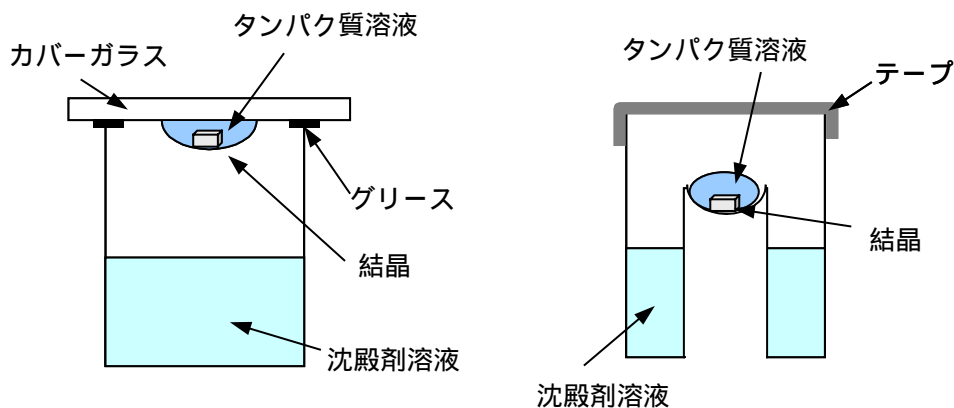


図 1 蒸気拡散法 (左)ハンギングドロップ (右)シットィングドロップ

二次スクリーニングでは、研究者の経験に基づいてタンパク質や沈殿剤濃度、溶液のpHなどを変化させてセットし、良い結晶ができるのをさらに待つ。究極的には宇宙空間での育成が理想とも言われている。時にはシーディングやリザーバー溶液の交換などの操作を行うが、基本的には結晶化中は静かにしておく。つまりタンパク質の結晶化は、「いかに数を仕込むことができるか」、「結晶ができるかどうかは運次第」、「条件の絞込みは研究者の経験と勘に依存」と言っても良いかもしれない。このような中で登場したのが、多種の沈殿剤溶液がセットになったスクリーニングキットと結晶化の自動化装置である。これらは研究者の結晶化実験の手間を大幅に省き、スピードアップをもたらした。しかしこれらは人間の作業を軽減したにすぎない。革新的な技術や新しい概念を取り込んだ手法を開発し、結晶化を飛躍的に進展させることはできないであろうか？また、タンパク質結晶は非常に脆く崩れやすいため、結晶の取り扱い方法も検討すべき問題ではなかろうか。

このような状況の中、我々バイオ系と電気系の若手異分野融合チームは新しいタンパク質結晶化技術を開発することで大学発ベンチャーの起業を目指す「大阪大学創晶プロジェクト」を始動させた。フェムト秒レーザーを用いた強制的な結晶核の生成、溶液攪拌による高品質結晶の育成や、紫外レーザーによる結晶加工など、革新的な技術や新しい概念を取り込んだ結晶化手法を世界に先駆けて開発し、平成17年7月に「株式会社創晶」を創業するに至った。本稿では、それらの報告とその意義・展望と本技術の社会的な波及効果などを述べる。

2. 背景 - 結晶化の基礎

結晶化には、分子が集合する核形成過程と出来た結晶核が成長する成長過程がある。結晶核を溶液中で析出させるためには、蒸気拡散や温度変化などにより過飽和度を高くする必要がある。しかしタンパク質のように分子量の大きい物質は、極めて過飽和度を高くしないと結晶化しない。これは準安定領域が大きいこと、つまり臨界核半径が大きいことに起因する。また、高過飽和度の溶液では、結晶の急成長や核の大量発生が生じるなど成長には適してない。例えば、タンパク質結晶を蒸気拡散法で作製したとき、多量の微結晶や多結晶が生じることがある(図2)。これは急激な蒸気拡散による高過飽和が多量の自然核を発生させている。従って、拡散速度を下げるため沈殿剤やタンパク質濃度を低くする。そうすると低過飽和となり、核の不発生や核形成・結晶成長の遅延をもたらす。これはタンパク質構造解析研究者が日常良く経験することである。これらを解決するには、低過飽和における核形成や高過飽和における高品質な成長が求められる。つまり、結晶の核形成、および成長を制御することが必要である。また、構造解析に適した形状を有する結晶の作製も必要である。

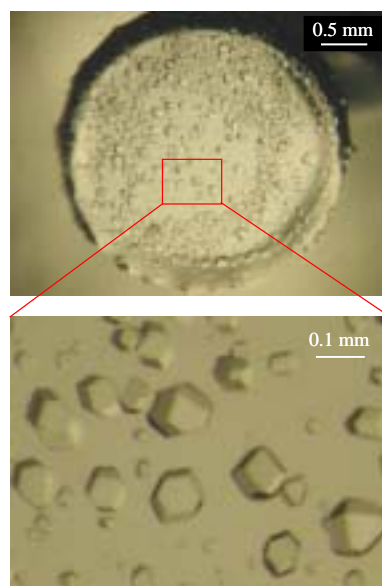


図2 タンパク質の微結晶

3. レーザー核発生 (LIGHT: Laser Irradiated Growth Technique)

タンパク質結晶の核発生を制御するために、高強度超短パルスレーザーを溶液内に集光照射することで核の生成を誘起する技術 LIGHT を開発した⁽¹⁾ (図3)。LIGHT により、通常核形成しにくい低過飽和溶液中や、これまで結晶化しなかった条件のうちの幾つかの条件で核生成がみられた(図4)。これは、核形成に必要なある一定の大きさの分子集合体(クラスター)をレーザーによる刺激によって強制的に引き起こしていると考えられる。そのため、レーザー照射の至適条件はタンパク質やその溶液状態に依存し、また至適条件でもクラスターの形成に至らない場合もある。しかし LIGHT は、低過飽和溶液中での核形成とそこから結晶成長による高品質結晶の作製を可能とした。さらに、これまで日を見なかった従来法による未結晶化条件も LIGHT の対象となり、結晶化スクリーニングのヒット率向上や結晶析出までの時間短縮を実現した。

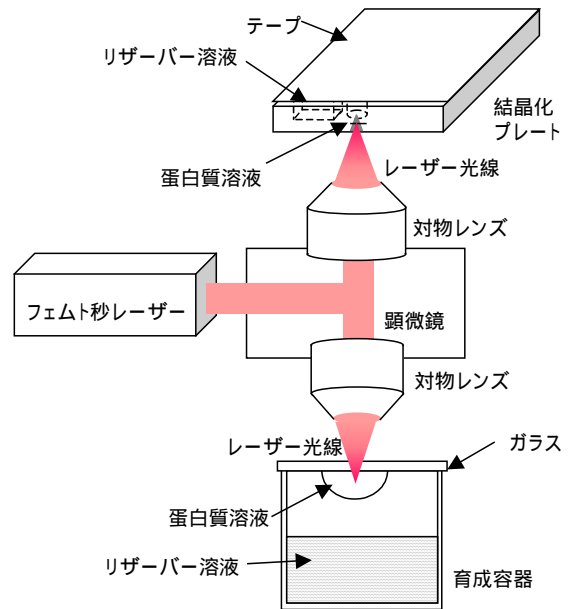


図3 レーザー核発生技術 (LIGHT)

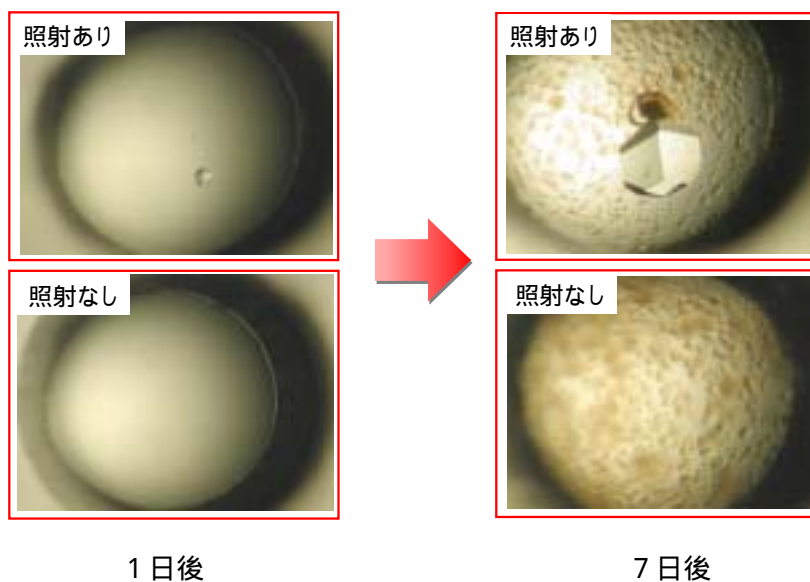


図4 レーザー核発生技術で得られたタンパク質の結晶

4. 溶液攪拌 (Solution Stirring Technique)

結晶の成長過程を制御する手法として、我々は溶液を穏やかに攪拌する溶液状態制御を提案している⁽²⁾。これはこれまでのタンパク質結晶化の概念とは反するものである。しかし連続的な溶

液攪拌では、溶質（タンパク質）を常に均一にすることで高品質な結晶が成長し（図5）、さらに不必要な二次核の形成が抑えられる。また、溶質供給による結晶成長速度の増大などの効果があることがわかってきた。

さらに、攪拌が核形成にも影響があることを見出した⁽³⁾。結晶化後数時間攪拌しその後静置することで、核形成が促進される（Pre-Stirring）。攪拌を一時的に停止させ、静置した後、再び攪拌することで、高品質な結晶が成長する（Re-Stirring）。つまり、攪拌によって結晶の核形成と成長を制御することが可能であることを発見した。また、これまで結晶が得られていなかったタンパク質においても、約2ヶ月におよぶ攪拌により初めて結晶が得られ、構造を決定することができた⁽⁴⁾。これらの結果から、溶液攪拌が核形成の刺激となっていることが示唆される。

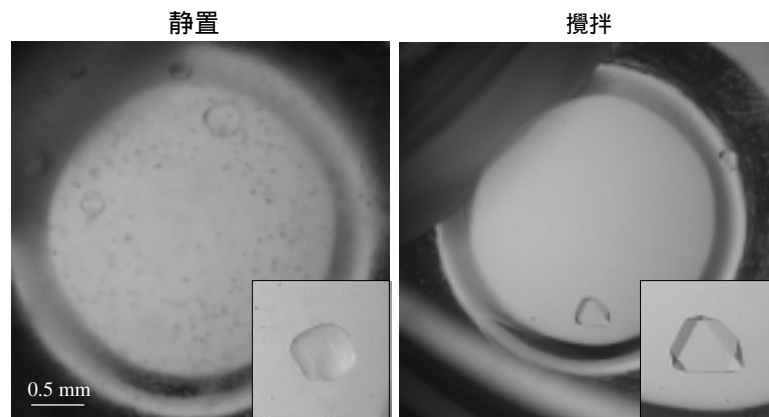


図5 攪拌により得られたタンパク質の高品質結晶（右）

5 . レーザー結晶加工（PULSA: Pulsed UV Laser Soft Ablation）

成長した結晶の回折実験に不必要な部分を切り離す作業は、これまでメスなどを用いた手動操作のみであった。これは非常に成功率および再現性の低い手法である。我々は非熱的な微細加工を可能にするニコンと大阪大学で開発した全固体193nm短パルス深紫外レーザーに注目し、個人のスキルに依存しない精密な結晶加工法 PULSA を開発した⁽⁵⁾。PULSA では、顕著な損傷を与えることなく結晶を加工することができる（図6）。さらに、手動操作では成し得なかった形状、たとえばX線回折測定の実験形状である球状への加工も可能になった⁽⁶⁾（図7）。

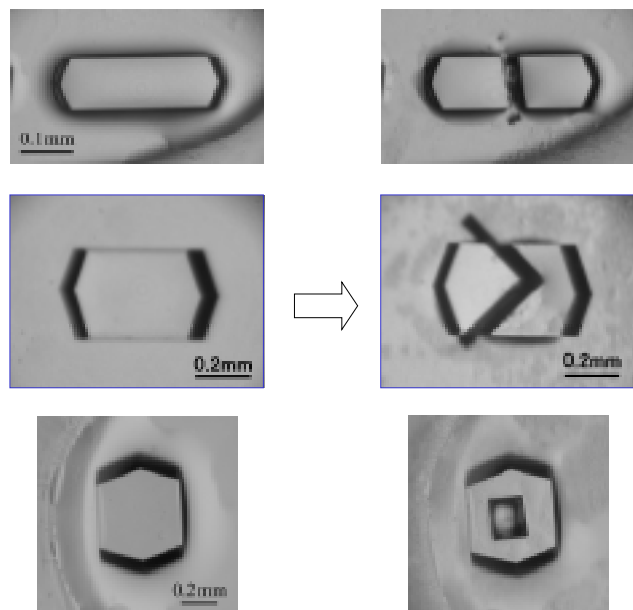


図6 レーザー加工技術（PULSA）

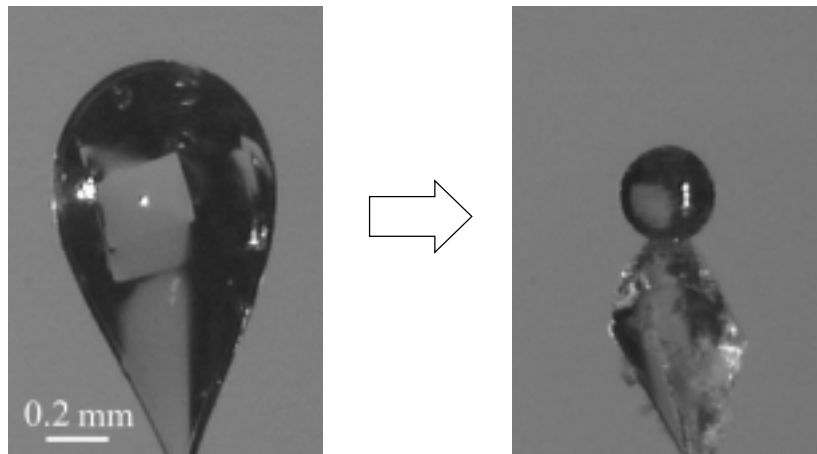


図7 レーザー加工技術による球状加工

6. 開発した技術の意義

タンパク質の結晶構造解析が、大型放射光施設、コンピュータ解析技術の飛躍的な進歩により、生命科学の強力かつ必須な手法となった今日、最重要課題である結晶化技術においては、試行錯誤から抜け出せず、未開拓領域のままである。これまでのタンパク質結晶化においては、溶液を静置することが最優先事項であり、それを徹底するために、重力による対流が除去できる宇宙空間での結晶成長が試みられている状況であった。また、ロボットの導入により、試行回数の著しい向上により、結晶化の成功率は増えている。しかし、従来法と結晶化の原理は同じであり、成功率は20%程度と低く、従来法と同程度に止まっている。我々は、結晶成長は静置状態が理想である、とされる従来の常識とは逆の発想で、レーザー照射による核発生、及び溶液攪拌による高品質化という全く新しい手法を発見した。この方法により、従来法では結晶化が不可能であったタンパク質の高分解能構造解析の成功や、低分解能であった膜タンパク質の高分解能構造解析に成功し、結晶化の成功率は大幅に向上した（約70%）。大型放射光施設とコンピュータ解析技術が飛躍的な進歩を遂げた現在では、難結晶化タンパク質の高品質結晶化技術が、タンパク質構造解析の成功率と成功率の鍵を握っており、我々が開発した結晶化技術により飛躍的に進展すると期待される。そこで新しい技術を産業利用していただくため、大学発ベンチャー「株式会社創晶」を起業し、特に創薬分野での社会貢献を進めている。

7. 研究の独創性・新規性

これまでのタンパク質結晶化においては、溶媒を蒸発させることで高過飽和状態を実現し結晶核発生を行う、育成中はできるだけ溶液を静置しておくことで高品質結晶育成を目指す、ということが指導原理であった。特に、究極の静置状態を実現するために、無重力の宇宙空間での結晶育成が理想であるとされていた。これに対して、我々は、フェムト秒レーザー照射による低過飽和度状態での結晶核発生の誘導、溶液攪拌による高品質結晶育成、という全く異なる指導原理を世界に先駆けて見出した（国際特許出願中）。実際に、従来法では結晶化が不可能であったタンパク質の高分解能構造解析の成功や、分解能3.5 Åが限界であった膜タンパク質の高分解

能構造解析（2.3）さらに結晶を得るのに6ヶ月を要したタンパク質については、レーザー照射によりわずか2日で結晶核の発生に成功するなど、原理的には未解明ではあるが、データ的には革新的成果を得ており、本手法の原理的な正当性を示している。これらデータについて発表した当初は、「溶液を攪拌するなんて非常識極まりない」、「レーザーを照射するとタンパク質が破壊される」といった批判を頂いた。これは、本手法が如何に独創的で新規的であるかを物語っている。

また、タンパク質の結晶化で隠れた問題となっていることに、多結晶化や部分的な損傷の生成がある。方位の異なる結晶が多数付着してしまうと、構造解析が不可能になるが、互いに付着した結晶を単結晶として切り離す術がこれまで無かった。そこで、我々が従来から研究してきたCLB0を用いた全固体193nm真空紫外レーザーにより、タンパク質結晶を加工したところ、任意の形状に精度良く、加工面にダメージを与えない加工が実現できることが分かった。

8. 展望

医薬品の標的分子であるタンパク質の高次構造を解析し、*in silico* に医薬品を開発する方法が提唱されている（図8）。そのためには、標的分子であるタンパク質を結晶化し立体構造を解析する必要がある。現在、タンパク質の単結晶が得られれば、X線解析装置やSPring-8やPhoton Factoryの高輝度放射光を利用して構造解析することが可能である。そのため、如何にタンパク質分子が3次元的に規則正しく配列した結晶状態にするのかが問題となってくる。すでに生化学的手法により結晶化されやすいタンパク質は結晶化され、構造解析がなされている。そのため、従来法で結晶化が困難なタンパク質を結晶化する技術開発が求められており、今後の創薬研究をはじめ、タンパク質研究の最重要課題となっている。

本研究は、光を用いたナノテクノロジーと生体分子に関するバイオテクノロジーの高度な融合を実現した。創薬分野においてめざましい発展が期待できるだけでなく、生命科学や工学分野にもたらす影響は極めて大きい。また、研究だけでなく産学連携、さらには異分野連携、融合と、社会全体が解消していかなくてはならない諸問題に、我々若手メンバーは、斬新に取り組んできた。バイオ技術の進展という学術的な意義だけでなく、研究プロジェクトのあり方、大学発ベンチャー起業による産業応用に関してもインパクトを与えたと言える（図9）。

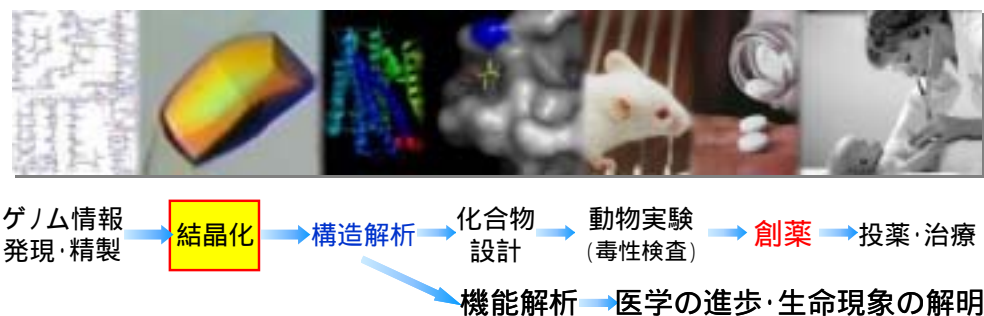


図8 タンパク質の構造に基づく薬のデザイン

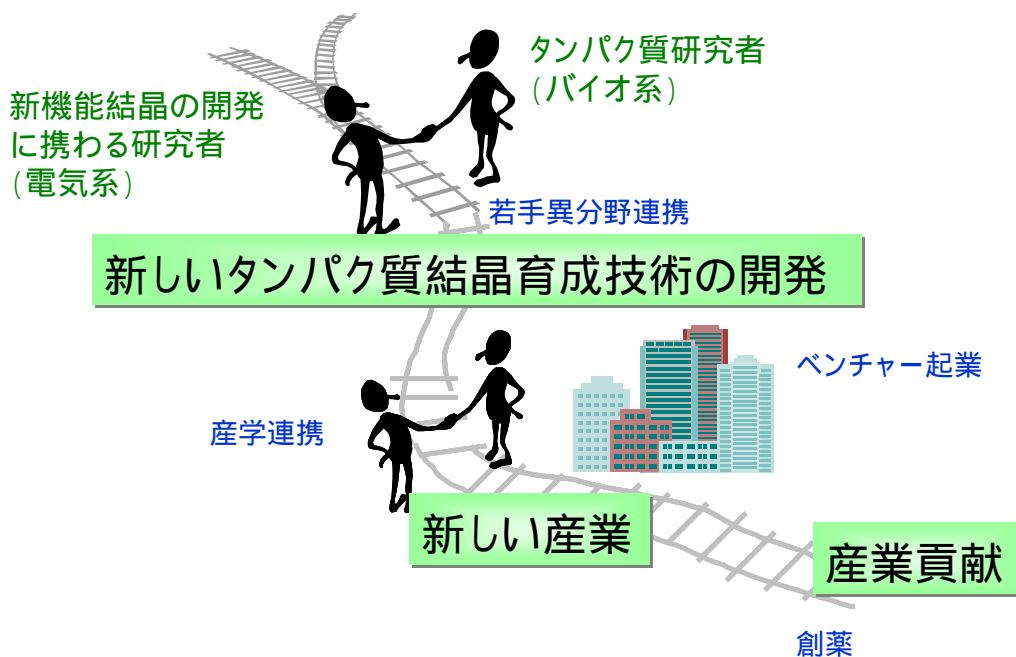


図9 大阪大学創晶プロジェクトの歩み

9 . おわりに

本研究体制は、半導体やレーザー産業に求められる結晶を育成する研究者とタンパク質研究者といった異分野の研究者を融合した横断的な新しい研究体制である。発想力に富み、迅速かつ柔軟に先駆的な研究を展開できる若手研究者からなる、柔軟な組織体系も本研究の特徴である。さらに、研究拠点が集積しており、チーム連携が強化できることと研究速度の加速化、コミュニケーションの円滑化を図れるのも利点となっている。

以上のように、タンパク質結晶化研究においては、我々の提案する技術は極めて異色であり、類似研究は存在しない。我々のように、タンパク質結晶の育成技術を従来とは異なる指導原理のもとで積極的に開発し成果を上げているプロジェクトは国内外にはなく、構造解析は従来の古典的な結晶化法を用いた試行錯誤で行われてきた。我々は積極的に結晶成長を制御して完全結晶の創成を実現する“創晶工学”を新しい学問領域として提唱し、未踏領域を開拓しながら活動していくとともに、事業化による社会貢献を進めていく。

- 参考文献 -

- (1) Adachi H, Takano K, Hosokawa Y, Inoue T, Mori Y, Matsumura H, Yoshimura M, Tsunaka Y, Morikawa M, Kanaya S, Masuhara H, Kai Y, Sasaki T. (2003) Laser irradiated growth of protein crystal, Jpn J Appl Phys. 42, L798-L800.
- (2) Adachi H, Takano K, Yoshimura M, Mori Y, Sasaki T. (2002) Promotion of large protein crystal growth with stirring solution, Jpn J Appl Phys. 41, L1025-L1027.
- (3) Adachi H, Niino A, Matsumura H, Takano K, Inoue T, Mori Y, Sasaki T. (2004) Pre-stirring

promotes nucleation of protein crystals, Jpn J Appl Phys. 43, L243-L246.

- (4) Adachi H, Niino A, Matsumura H, Takano K, Kinoshita T, Warizaya M, Inoue T, Mori Y, Sasaki T. (2004) Generation of protein crystals using a solution-stirring technique, Jpn J Appl Phys. 43, L762-L764.
- (5) Kitano H, Adachi H, Murakami A, Matsumura H, Takano K, Inoue T, Mori Y, Owa S, Sasaki T. (2004) Protein crystal processing using a deep-UV laser, Jpn J Appl Phys. 43, L73-L75.
- (6) Kitano H, Matsumura H, Adachi H, Murakami S, Takano K, Inoue T, Mori Y, Doi M, Sasaki T. (2005) Protein cryocrystallography using laser-processed crystal, Jpn J Appl Phys. 44, L54-L56.

- 関連特許 -

取得 1 件、出願 1 2 件