

集光レーザービームの光圧によるリゾチーム結晶化と X 線結晶構造解析

Lysozyme Crystallization Induced by Optical Forces with a Focused Laser Beam and X-ray Crystallography

阪公大院理[○](M1)西室 愛実, 谷本 泰士, 増井 恭子, 宮原 郁子, 細川 千絵

Osaka Metropolitan Univ.,[○]Manami Nishimuro, Yasushi Tanimoto, Kyoko Masui, Ikuko Miyahara, Chie Hosokawa

E-mail: sf24322t@st.omu.ac.jp

タンパク質溶液に近赤外レーザーを集光すると、光圧により局所的にタンパク質濃度が上昇し、タンパク質の結晶化が誘起される [1]。この手法は、結晶核生成確率の向上や結晶成長過程の時空間制御を目的とした新たなタンパク質の結晶化手法として注目を集めている。先行研究では、温度上昇が抑制される重水溶液を用いたタンパク質の結晶化が主であり、近赤外レーザーの光吸収に伴うタンパク質水溶液の温度上昇がタンパク質結晶の品質に与える影響は依然として明らかにされていない。そこで本研究では、ニワトリ卵白由来リゾチーム (HEWL)水溶液および重水溶液に近赤外レーザーを集光し、レーザー照射後に生成した HEWL 結晶の X 線結晶構造解析を行うことにより、結晶中の HEWL の分子構造を評価した。

試料として、0.28–0.50 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.7 および pD 5.1)を用いて 40 mg/mL HEWL 水溶液および重水溶液を調製した。波長 1064 nm の Nd:YVO₄ レーザーを倒立顕微鏡に導入し、100 倍油浸対物レンズ (開口数 1.3)によりガラス基板表面から 2–3 μm 上方の液中にレーザー光強度 500 mW の条件で 60 分間集光した (Fig. 1 (a))。レーザー照射中に結晶の生成は認められなかったが、レーザーオフ後 1 時間以内に集光領域近傍で HEWL 結晶が確認された。レーザー未照射溶液では 1 日後以降に HEWL 結晶が生成したことから、レーザー照射に伴い結晶が速く生成することを確認した (Fig. 1 (b))。生成された結晶を 30%(v/v) グリセロールを含むクライオプロテクトANT溶液下で抗凍結処理をした後、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーで X 線回折データを収集した。HEWL 水溶液または重水溶液中で生成したレーザーオフ後 2 日目の HEWL 結晶、およびレーザー未照射溶液から生成した結晶に対して構造解析を行った。すべての HEWL の分子構造において、主鎖を構成する原子を約 0.1 Å の標準偏差で重ね合わせることができ、生成された結晶における分子構造は同一であることが示された。レーザー照射により得られた HEWL 結晶は構造解析に十分な品質であり、HEWL 水溶液と重水溶液から生成した結晶の分子構造に差異は無く、近赤外レーザー照射による HEWL 分子の損傷は無いことが明らかとなった。

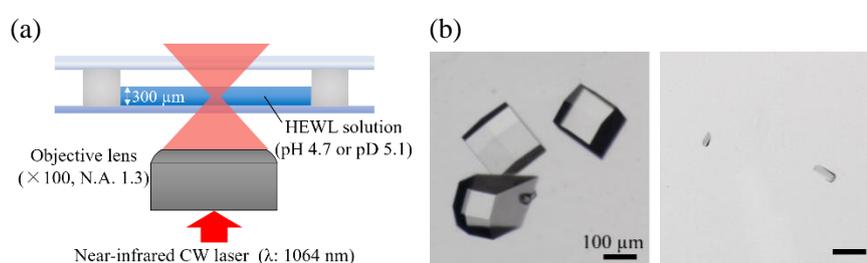


Fig. 1 (a) Schematic image of HEWL crystallization induced by near-infrared CW laser irradiation. (b) HEWL crystals 3 days after laser irradiation (left) and without laser irradiation (right). The laser power is 500 mW. The NaCl concentration is 0.46 M.

[1] T. Sugiyama, S. Wang, *J. Photochem. Photobiol. C*, 52, 100530 (2022).