

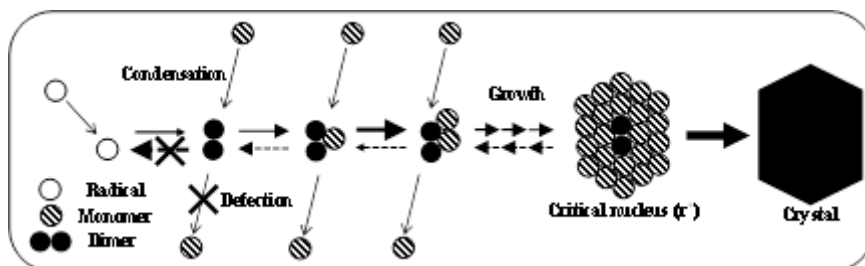
## タンパク質の光誘起結晶化

群馬大大学院工学研究科 奥津哲夫

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、この観測結果が本当であるか、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、④プラズモン共鳴を用いた光反応による結晶化、⑤膜タンパク質への展開、を進めている。以下に各項目について簡単に述べる。

### ① 光誘起結晶化の機構

タンパクの Trp, Tyr, Phe 残基が光吸収し、Trp あるいは Tyr のラジカルが反応中間体として生成する。このラジカル化したタンパクはラジカル同士で反応、あるいは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。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。臨界核の大きさは一般的なリゾチームの結晶化条件では4分子クラスターと見積もられており、モノマーから出発して臨界核を形成する場合と、安定ダイマーから出発した場合には、待ち時間が  $10^7$  倍違う。光誘起結晶化とは臨界核が形成されるまでの時間を短縮するものである。



### ② より多くのタンパク質の結晶化に適用する試み

ダイマーが核に成長する条件として、ダイマーが結晶中の隣り合う二つの分子と同じ構造を有していることが必要である。このような構造を持つ分子

をテンプレート分子と呼ぶことにする。タンパクに光を当てダイマーが形成されたからといって、必ずしもテンプレートとなるわけではない。タンパクに光を当てた場合、励起状態となるアミノ酸はタンパク内部でのエネルギー移動の結果により決まる。例えばリゾチームでは 52 番目の Trp である。このラジカルは近隣の Tyr 残基から水素原子を引き抜き、Tyr 残基は安定なフェノキシルラジカルとなり、他のタンパクと衝突しその表面の Tyr 残基と反応して Tyr-Tyr 結合によるダイマーが生じる。リゾチームの場合、表面の Tyr 残基は 3 個あり、これら同士が結合すれば 6 通りの構造が生じる。検討の結果、このうちの一つだけがテンプレートになり得ることがわかった。この事実、リゾチームでは偶然にもテンプレートが形成されたが、他のタンパクではテンプレートの形成が保証されないということである。

そこで、この問題を解決するために、多様な構造のダイマーを生成させる戦略を検討した。タンパクを直接光励起せず、溶液中のカルボニル化合物をラジカル化させタンパクと反応させて表面のアミノ酸をラジカル化させる。カルボニル化合物が多くの種類のアミノ酸をラジカル化できれば多様な構造のダイマーの生成が

期待できる。カルボニル化合物として、キノンあるいはケトンを用いた。電気泳動実験によりダイマー生成を確認し、過渡吸収実験を行い、キノンが 12 種類のアミノ酸をラジカル化することを確認した。これはリゾチーム表面の半分以上のアミノ酸をラジカル化できることになる。タンパク/キノン系の結晶化実験を行ったところ、キノンを励起したときに結晶化の促進が認められた。この方法の利点として、コンカナバリン A のように光励起でフラグメント化してしまうタンパクも、キノンのみを励起することで結晶化に成功した。

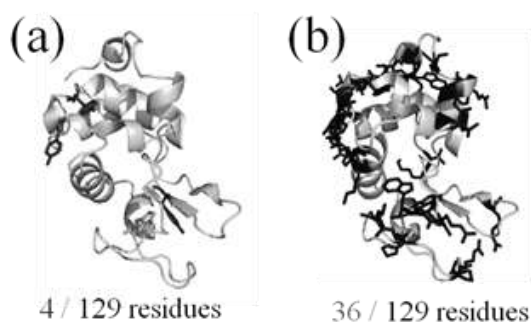
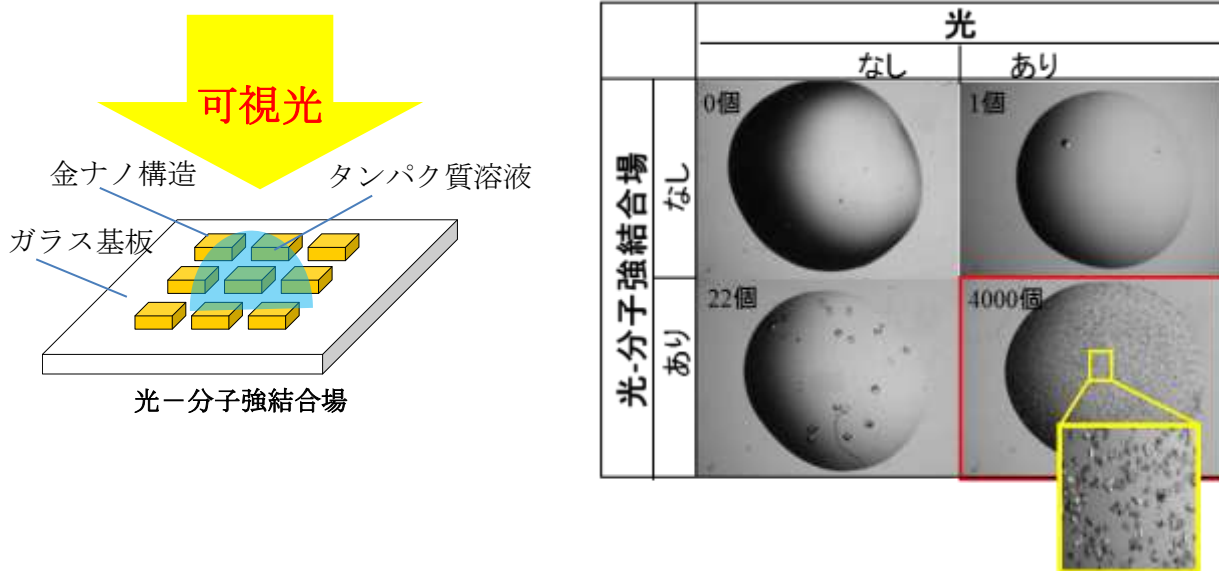


Fig. 1 Amino acid residues on lysozyme surface which become to radical by photochemical reaction (a) direct excitation (b) hydrogen abstraction reaction by PHQ

### ③ プラズモン共鳴を利用した結晶化の試み

金ナノ粒子や金ナノ構造は「光-分子強結合場」と呼ばれ、光のアンテナの作用をする。この場を用いるとタンパクをタンパクの吸収のない可視光で励起し反応させ、光誘起結晶化に導くことが期待できる。Trp や Tyr のアミノ酸は 300nm よりも短波長に吸収を持つが、この反応場を用いると、500nm の定常光を用いても光反応させることができるというものである。ただし、二光子励起なので効率はきわめて低い。実験は、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最初に確認し、次に光分子強結合場として金ナノ構造を用いて、可視の定常光励起により反応することを確認し、結晶化実験に臨んだ。



実験に用いた光-分子強結合場の構造と結晶化実験の結果を示す。光-分子強結合場が有り、光を当てた場合に液滴中に多くの結晶が出現した。この研究は光-分子強結合場の供給に時間がかかり再現性も確かではないため、他の方法で工夫し、独自の光-分子強結合場を構築して実験を進めた。その結果、実用系のプレートでいくつかのタンパクで有意な差を確認した。

1. T. Okutsu, K. Furuta, M. Terao, H. Hiratsuka, A. Yamano, N. Ferté and S. Veessler, Light-induced Nucleation of Metastable Hen-egg White Lysozyme Solutions, *Crystal Growth Des.*, **5**, 1393-1398 (2005).
2. S. Veessler, K. Furuta, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, N. Ferté and T. Okutsu, Crystals from Light: Photochemically-induced Nucleation, *Crystal Growth Des.*, **6**, 1631-1635 (2006).
3. T. Okutsu, Photochemically Induced Crystallization of Protein, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews*, **8**, 143-155 (2008).
4. T. Okutsu, Photochemically Induced Crystallization of Protein, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews*, **8**, 143-155 (2008).
5. 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).
6. 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.