

蛋白質結晶化デバイス：PCMOS について

三城 明

プロテインウエーブ株式会社

〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台1-7 けいはんなプラザ
ラボ棟5階

Email: asanjoh@pro-wave.co.jp <http://www.pro-wave.co.jp>

Abstract

Recent progress in protein structural genomics project will contribute to reveal huge number of three-dimensional molecular structures of unknown proteins. This inevitably requires development of high-throughput (HT) technologies for over expression, purification, crystallization, X-ray data collection, and structural determination of target proteins. PCMOS (Protein Crystallization Microfluidic System) is developed as novel products in protein crystallization tools, and is designed for specialized use in both of automated HT crystallization screening and optimization processing. In this issue, we introduce device specification of our PCMOS products and also show some crystallization results to demonstrate the effectiveness of our devices.

1. はじめに

蛋白質の結晶化法には大別すると蒸気拡散法、液-液拡散法、バッチ法等がある。これらの方法にはそれぞれ一長一短があることから¹⁾、それらは作業性や蛋白質の種類あるいは精製後の容量等を考慮して使い分けられているのは周知のとおりである。しかし近年、蛋白質の網羅的な構造解析研究においては結晶化のみに限れば、①結晶化スクリーニング時における分注システム²⁾、②スクリーニング後の結晶化条件の最適化、③成長した結晶の母液からの取り出しと回折計へのマウント時に高速・微量のハイスループット (HT) 化技術を導入することが必須となってきた³⁾。このことはこれまで主に手作業で進められてきた結晶化実験全般に、高速・微量で再現性良くさらには自動化にも対応した新しい“ツール”を導入しなければならないことを示している。

次にある蛋白質の結晶化スクリーニングを実施した場合、通常はスクリーニング時と同一の結晶化法 (例えば蒸気拡散法) によって引き続き結晶化条件の最適化を行うものと思われる。高分解能の結晶を得ようとすれば、結晶化スクリーニングと結晶化条件の最適化ではそれぞれ異なった方法を試みるのが有効であると考えられるが¹⁾、実際には時間やツールの制約上必ずしもそのようにはなっていないように思われる。本稿で紹介する PCMOS (Protein

Crystallization Microfluidic Systems)はナノリットルレベルの HT 結晶化スクリーニングと各種手法による結晶化条件の最適化、さらには結晶のマウントと X 線回折測定が微量の蛋白量でも簡便に行えることを念頭に開発された結晶化デバイスの総称である。これらは未だ開発途上にあり改善の余地はあるものの、その特徴、種類、使用方法などについて紹介したい。

2. PCMOS の概要

1) PCMOS とは

PCMOS の “Microfluidic System” は和訳すれば、“微量流体を扱うシステム”ということになるようである。蛋白質の結晶化に限らず、さまざまな生命科学の分野ではピペットやロボット等を操作して微量の液体サンプルを扱う。このような微量のサンプルの分注、混合、廃棄、さらには分析などを行う上でウェルや流路（チャンネル）が集積化された使い捨てのプレートあるいはデバイスがあれば非常に便利である。そして液体サンプルが通過するデバイス内の流路サイズは、サンプル量がマイクロリットルからナノリットルの領域では数 μm 程度の幅と深さになる。このため流路内を流れる液体は内壁表面の物理化学的性質（表面の親・疎水性、表面電位等）に大きく影響されることから、バルク流体の挙動とは全く異なったものとなる⁴⁾。デバイス内におけるマイクロリットルレベルの流体挙動の解析とデバイス設計とを行う分野は Microfluidics（微量流体工学）と呼ばれている。

以上のような “Microfluidic System” をデバイスとして実現するための製造方法として一般的なものは MEMS（MicroElectro-Mechanical Systems）あるいはマイクロマシンプロセス⁴⁾と呼ばれるものである。これらは半導体デバイス製造のための微細加工技術を応用して、ガラス、シリコン、プラスチック基板、フィルム等に微細な流路やセルを形成し、その後基板同士を接合することが基本となっている。PCMOS はこの Microfluidic Systems を蛋白質の結晶化、特に HT スクリーニングと条件の最適化に特化して実現したデバイスである。図 1 に PCMOS の概念図を示す。なお、近年蛋白質の結晶化用として “Microfluidic System” の考えを取り入れたデバイスが海外で発表されてきていることに注目したい^{5), 6), 7)}。

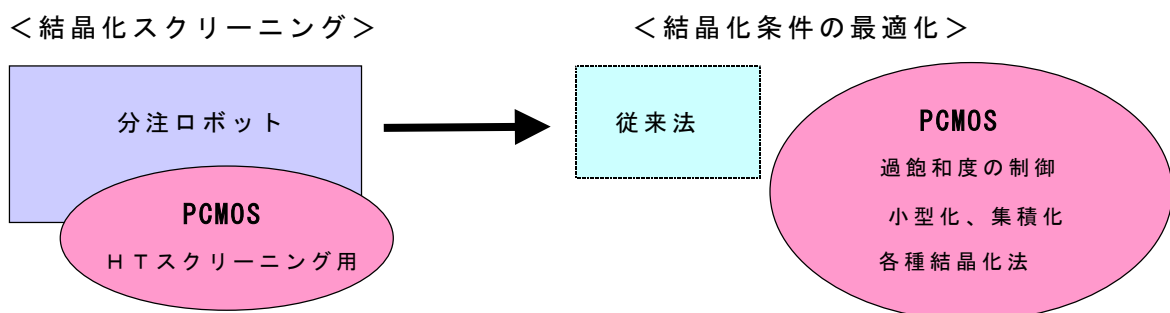


図 1 PCMOS 適用の概念図

2) 蛋白質の結晶化メカニズムと PCMOS

PCMOS 本体はガラス等の固体基板を利用しているため⁸⁾、そこを流れる蛋白質溶液は固体表面から物理化学的影響を受けることは既に述べた。そこで、このような固体表面の性質を結晶化に積極的に利用することが考えられる。一般に絶縁体や半導体のような固体物質では電解質溶液と接することでそれらの表面に固有の表面電位（ゼータ電位とも呼ばれる）が誘起される。この表面電位は水和に伴って形成された表面水酸基の解離によって主に電位が決定され、電解質溶液の pH とイオン強度により変化するが、等電点に相当する PZC（等電位点：Point of Zero Charge、 pH^0 と表記）は変化せず、各物質に固有の値を持つ⁹⁾。例えばガラス (SiO_2) の pH^0 は約 2 であり、それ以上の全 pH 域で負の電位を持つ。またアルミナ (Al_2O_3) の pH^0 は約 9 であるため、それ以下の pH 域で正の電位を持つことになる。一方、蛋白質分子も表面電位を持っておりこれはアミノ酸の NH_2 基と COOH 基の 2 種類の解離性基によるものである。この蛋白質分子の等電点は塩濃度とイオン強度によって変動する¹⁰⁾。よって pH^0 の異なる複数の固体物質表面と蛋白質溶液とを接触させて蛋白質の結晶化を行うと、溶液の塩濃度の上昇と共に蛋白質分子の等電点は低 pH 側に移動するが固体物質表面の pH^0 は変動しないため、蛋白質の表面電位が補償する (compensate) いずれかの固体表面上で結晶が成長することが期待される。この場合の蛋白質分子の固体表面への集合と結晶核の形成は電気浸透 (Electro-Osmosis) 効果によるものと考えられる。

3) ハイスループット化対応と PCMOS

蛋白質の HT 結晶化スクリーニングの一手段として、専用の分注ロボットを用いたナノリットル分注技術の開発と実験室へのシステム導入が盛んに行われている^{2), 11)}。しかし、分注ロボットは一般に高価であり、さらに 1 台で蒸気拡散法や液-液拡散法などさまざまな結晶化法に対応可能なものは存在しない。そこでこの解決策として、図 2 に示すように PCMOS を分注装置のインターポザー（介在物）として利用する方法が考えられる。この場合の PCMOS は、結晶化ウエルプレートと分注装置の両方の機能を有することになる。

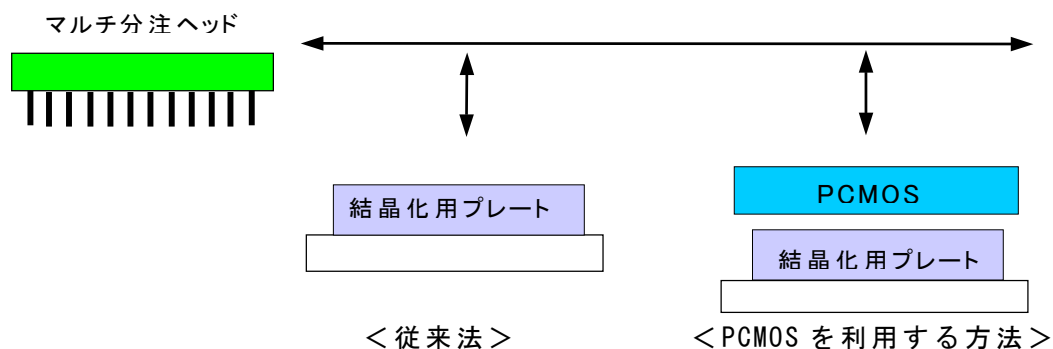


図 2 HT 対応 PCMOS の利用法

3. PCMOS の特徴

1) PCMOS の作製プロセス

PCMOS を作製するための MEMS (MicroElectro-Mechanical Systems) あるいはマイクロマシンプロセスの概要を図 3 に示す。PCMOS の素材には水溶液の濡れ性 (Wettability) が良好なガラスが多用されるが、シリコンやプラスチックも適用が可能である。また、10~20 μm 程度の厚みのポリイミドフィルムも利用できる。ガラス基板を例にとると、図 4 に示すように PCMOS を構成している基本構造は①流路、②ウエル、③スルーホール (貫通孔) である。これらはすべて原版となるホットマスクを始めに設計・作製し、次にホトリソグラフィにより所定の構造のホットレジストパターンをガラス上に形成する。最後にこのパターンを保護マスクとして、露出した部分のガラスをエッチングすることにより構造ユニットを作製する。このように作製された複数のガラス基板を接合することにより PCMOS が完成する。なお、使用するガラス等の基板は何枚でも可能である。従って接合後の基板内部に三次元的な流路や空隙を作製できることが本作製プロセスの特徴である。

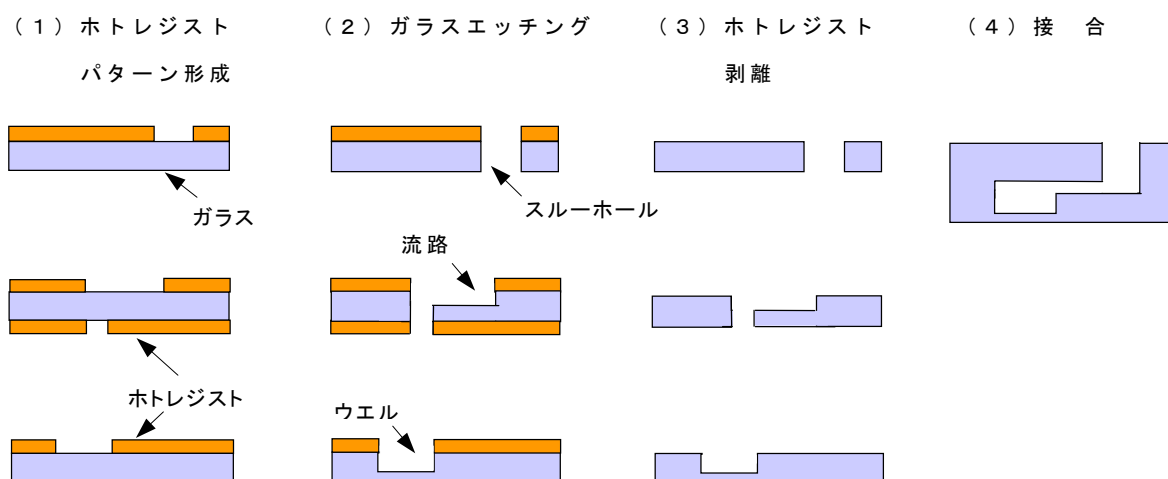


図 3 PCMOS の作製プロセス

2) PCMOS の種類と使用法

現在実用化されている PCMOS の中には蛋白質溶液のドロップを単にセットするだけのデバイスもあり、すべてが Microfluidic System にはなっていない。しかしここではすべて PCMOS と呼ぶことにする。PCMOS の種類は大別すると、以下のようなになる。

- ①蒸気拡散法による HT 結晶化スクリーニング用 ; VD-MOS、HTVD-MOS
- ②液-液拡散法による結晶化条件の最適化用 ; LLD-MOS、LGD-MOS
- ③結晶のマウントと X 線回折データ収集用 ; LithoLoops
- ④ナノリットルレベルの分注ロボット用インターポージャー ; KRAKEN

表 1 に現在開発中のものも含めた PCMOS の製品を示す。

表 1 PCMOS の製品一覧表（開発中のものを含む）

結晶化法	デバイス名	特徴・用途等
蒸気拡散法	VD-MOS	蒸気拡散法での結晶化、マウント、凍結、X線回折測定が可能。ウェルは1個 ポリイミドフィルム製、フィルム厚み=10 μm 、20 μm 。
	VD-MOS-SS	VD-MOS に不均一核形成用 Smart Sand(SS)を付加。
	3Well VD-MOS	VD-MOS を 3 ウェル構造に拡張。
	HTVD-MOS	VD-MOS を 96 ウェルプレート内に実装して、分注ロボットでの使用を可能としたもの。HT 対応。
	3Well HTVD-MOS	HTVD-MOS を 3 ウェル構造に拡張。HT 対応。
液-液拡散法	LLD-MOS	蛋白質溶液と沈殿剤とを 100 μm 幅の流路を介して拡散・混合する。流路長は 10mm, 30mm, 50mm の 3 種類。 蛋白質溶液と沈殿剤の量はそれぞれ 2 μL 程度。
ゲル拡散法	LGD-MOS	ゲル層、蛋白質溶液、および沈殿剤とをそれぞれ異なるウェルに分注する。数 μL の蛋白質量で結晶化実験が可能。デバイスはガラス製で 3 層構成。
二次元 / 三次元結晶核の分離生成法	EFAD-MOS	電場印加法による膜蛋白質の結晶化用デバイス。NEDO の委託を受けて研究開発中（H13-16 年度）。
	SFAD-MOS	溶液流れを利用した膜蛋白質の結晶化用デバイス。NEDO の委託を受けて研究開発中（H13-16 年度）。
結晶マウントと回折測定	LithoLoops	結晶のマウントと凍結、X線回折測定に適した新構造のループ。微細加工技術により作製するため、高精度で高歩留。最小ループ径は 40 μm 。それ以下も可能。

次に表 1 に示したもののうち、代表的なものについてその使用法を紹介する。

① HTVD-MOS

96 ウェルフオーマットで、蛋白質溶液と沈殿剤を各ウェル内にあるフィルム製チップのリング部に分注し、透明フィルムでシールする。分注量は 50nL ~ 2 μL の範囲で選択ができる。これはシッティングドロップ法とハンギングドロップ法の間中型と言える。結晶が得られたらピンセット等でフィルム製チップごとウェルから取出し、ピンに装着して抗凍結剤で置換する。その後ゴニオヘッドにセットして凍結させ、X線回折測定を行う。HTVD-MOS は結晶化プレートとナイロンループの機能を有していることになる（図 4）。

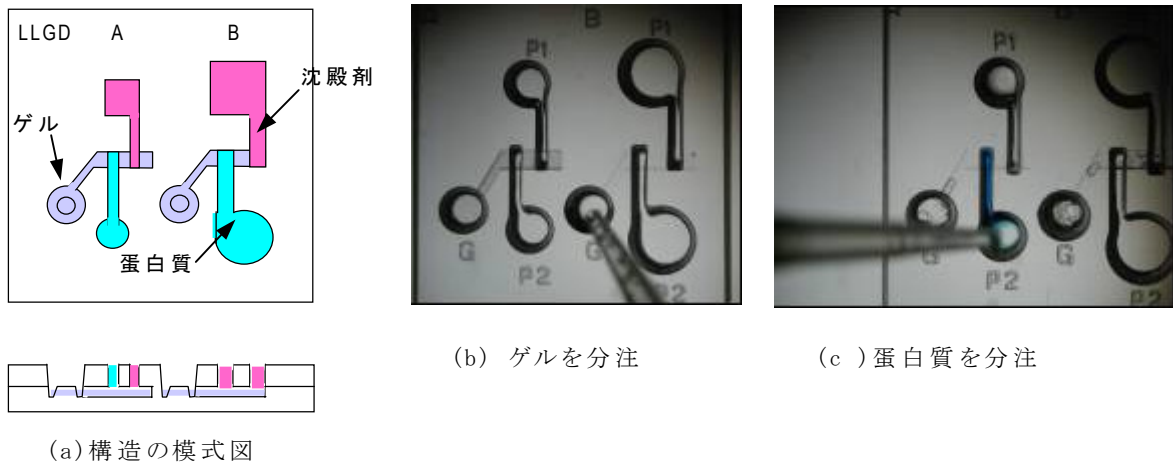


(a) 蛋白質を分注する (b) 沈殿剤をウェルから (c) 結晶化後 MOS を (d) ピンに実装する
取り出し分注する 取り出す

図 4 HTVD-MOS の使用法

②LGD-MOS

蛋白質溶液と沈殿剤との境界面にゲル層を形成し、液-液拡散法により結晶化を行うデバイスである。デバイスサイズは切手大で非常に小型である。通常のゲルを使った結晶化法¹²⁾とほぼ同様のプロトコールでしかも蛋白質量は数 μL で結晶化が行えることが特徴である。成長した結晶はデバイスの開口部から取出すことができる(図5)。



(a) 構造の模式図

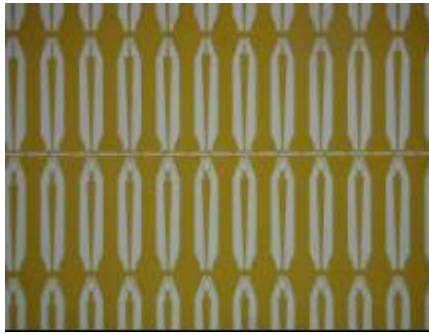
(b) ゲルを分注

(c) 蛋白質を分注

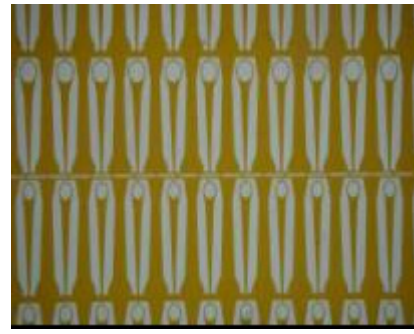
図 5 LGD-MOS の使用法

③LithoLoops

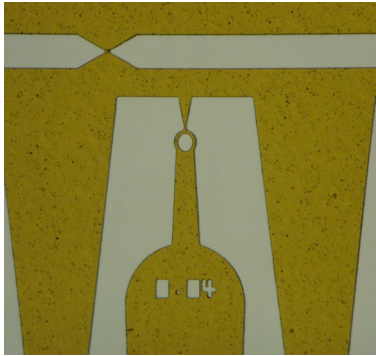
蛋白質結晶のマウントとクライオ条件下でのX線回折測定には、通常はナイロンループを用いている¹³⁾。近年回折測定に供される結晶のサイズが小型化しているため、ナイロンループのサイズも小型化されている。しかし、ループ径が $0.1\text{mm}\phi$ 以下のナイロンループは製造が容易ではない。Litholoopsはその名の通り、ホトリソグラフィーの技術により薄層フィルム(厚みは $10\sim 25\mu\text{m}$)を素材にして作製されたループであり、直径が $10\mu\text{m}\phi$ のループでも製造が可能である。ループはピンセット等で容易にシートから切り離すことができる。また放射光を用いた回折実験でも通常のナイロンループと同等のデータがLitholoopsで収集できることが確認されている¹⁴⁾(図6)。



(a) 製造後のシート（ループ径小）



(b) 製造後のシート（ループ径大）



(c) ループ部拡大（ループ径 40 $\mu\text{m}\phi$ ）



(d) マイクロチューブに実装
（ループ径 0.4mm ϕ ）

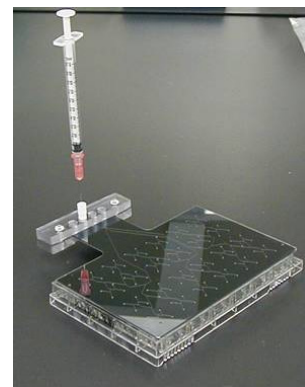
図 6 LithoLoops の使用法（フィルム厚み 25 μm ）

④ KRAKEN

ナノリットルレベルの分注量で結晶化スクリーニングを行う際に、96 フォーマットで一括して蛋白質溶液を供給するのに使われるデバイスである。50～100 μL 程度の蛋白質溶液をシリンジから本デバイスに注入する。シリンジから各開口部までは等長流路となっているため、各各開口部には同時にほぼ等量の蛋白質溶液のドロップが形成される。この各ドロップを分注装置の96本のヘッドが同時に吸引し、その後結晶化プレートに分注する。分注後にデバイス内の流路に残存する蛋白質溶液はシリンジを使って回収することができる（図7）。



(a) 分注装置



(b) KRAKEN

図 7 HT 結晶化スクリーニングシステム

4. PCMOS を用いた結晶化例

①HTVD-MOS 及び HTVD-MOS

デバイスのリング部にドロップを表面張力により保持して、蒸気拡散法により結晶化を行った結果である（図 8）。リング内に単一の結晶が成長しておれば、デバイスごと抗凍結剤に浸せきさせれば良いが、複数の結晶が成長している場合には抗凍結剤中で余分な結晶を洗い流す必要がある。

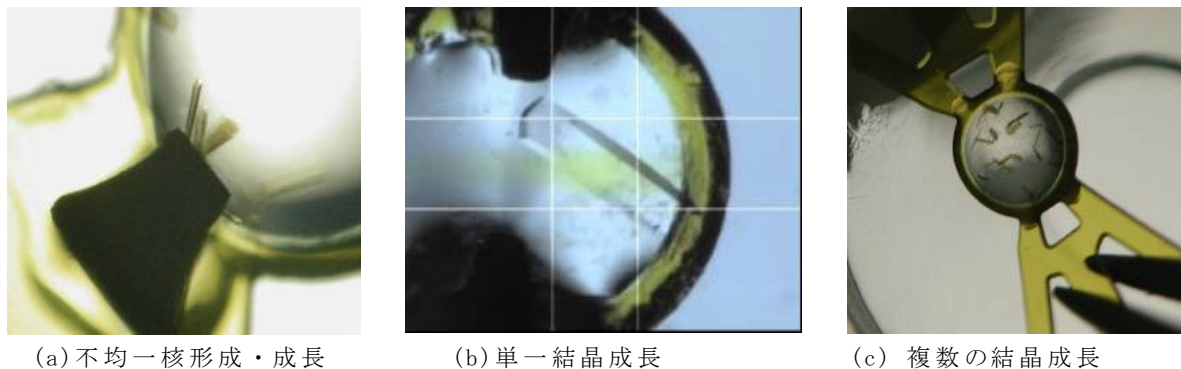


図 8 HTVD-MOS 及び HTVD-MOS を使った結晶成長

②LGD-MOS

電気泳動用アガロースゲル（1%w/v）をゲル層に用いて結晶化を行った例である（図 9）。通常の蒸気拡散法では針状結晶が多数析出するが、LGD-MOS を用いて結晶化を行うと、X線回折測定が可能な立方体状の結晶が蛋白質溶液中で成長する。

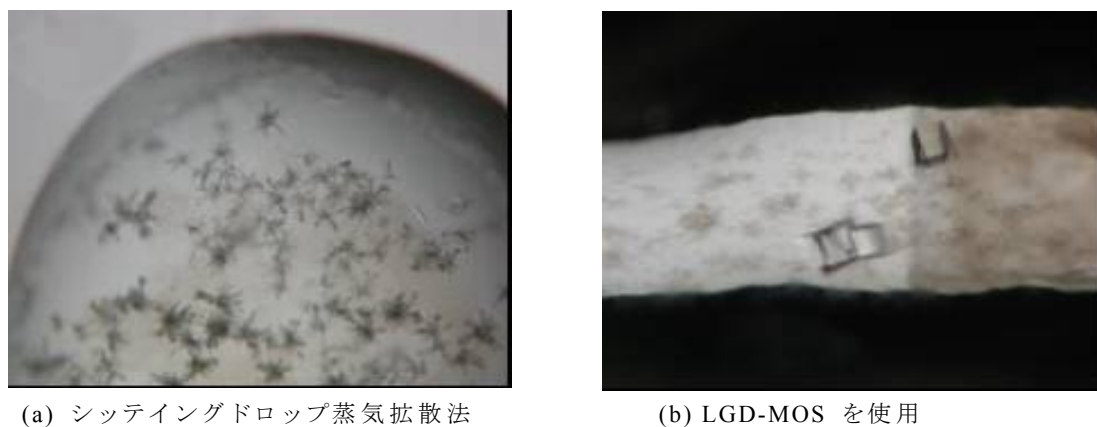


図 9 LGD-MOS を用いた結晶成長

③LithoLoops

ループ径が 0.4mmφのものを用いて結晶をマウントした時の様子を図 10 に示す。LithoLoops の素材はナイロンループと比較すると撥水性が若干低下している。さらにループの断面形状が方形である。このため LithoLoops に保持される母液の量はナイロンループより少ないようである。



図 10 LithoLoops を用いた結晶のマウント（ループ径は共に 0.4mmφ）

④KRAKEN

図 11 は専用の分注装置を用いて、蛋白質溶液と沈殿剤とをそれぞれ 60nL ずつ分注してシッティングドロップ法により結晶化スクリーニングを行った結果の一部である。ここでは 6 つの結晶化条件にて結晶が得られた。なお結晶化には Corning 社製の 96 ウエルプレート（#3773）を、沈殿剤には Hampton Research 社の Crystal Screen-1,2 を用いておりリザーバー容量は 100μL である。

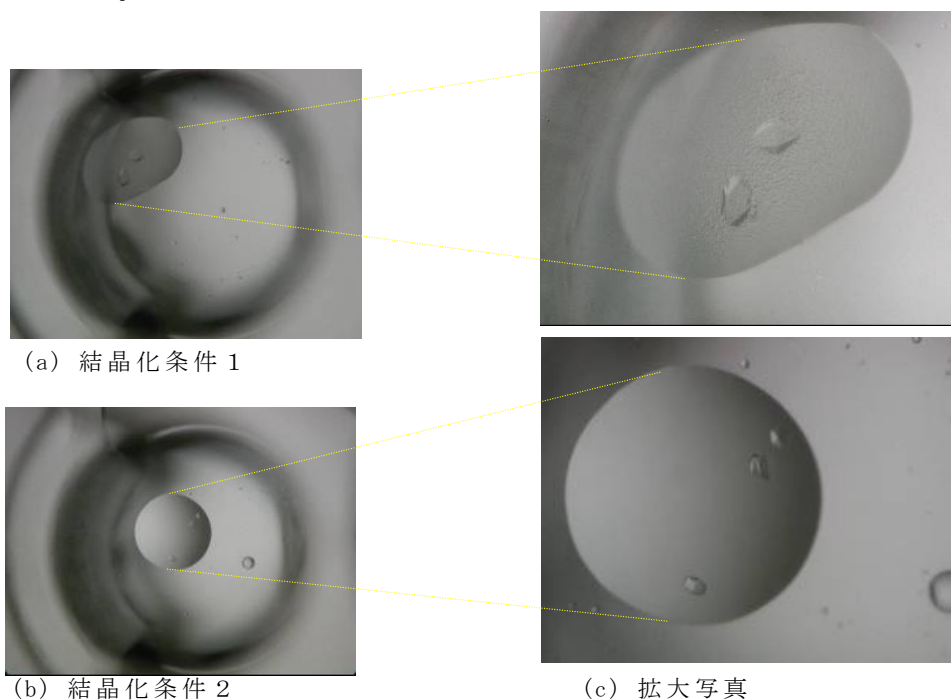


図 1 1 ナノリットル結晶化スクリーニングの結果

5. おわりに

蛋白質の結晶化デバイス PCMOS についてその特徴、種類、結晶化例を紹介した。結晶化条件の最適化を行っても薄板状あるいは針状結晶が適切な形状やサイズにまでなかなか成長してくれないケースはよく経験することである。本稿で紹介した PCMOS は開発途上にあることから、必ずしも結晶化にとって満足のゆくものではない。初期の結晶化スクリーニングで得られた沈殿剤組成等の条件を基に、少ない蛋白質量で過飽和度およびその速度を簡便に制御できる PCMOS の開発と実用化を目指したい。また、蒸気拡散法などのようなこれまでの古典的な方法にとらわれない、斬新な結晶化方法の研究とその PCMOS 化も進めてゆきたい。

参考文献

- 1) 佐崎 元、中嶋一雄 (2003) *構造生物* **8**, 34-48.
- 2) Stevens, R.C. (2000) *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 558-563.
- 3) Chayen, N.E. (2002) *TRENDS in Biotechnology* **20**, 98.
- 4) Eds. van den Berg, A. et al. (2000) *Micro Total Analysis Systems 2000*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- 5) Hansen, C., Skordalakes, E., Berger, J.M. and Quake, S.R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16531-16536.
- 6) Hansen, C. and Quake, S.R. (2003) *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 538-544.
- 7) <http://ibc.msfc.nasa.gov>.
- 8) Sanjoh, A. and Tsukihara, T.(1999) *J. Crystal Growth* **196**, 691-702.
- 9) 北原文雄他共著(1995) *ゼータ電位*、サイエンティスト社、93-96.
- 10) Sanjoh, A., Tsukihara, T, and Gorti, S.(2001) *J. Crystal Growth* **232**, 618-628.
- 11) Sulzenbacher, G. et al. (2002) *Acta Cryst. D***58**, 2109-2115.
- 12) McPherson, A.(1999) *Crystallization of Biological Macromolecules*, Edn1. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 13) Garman, E.(2003) *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 545-551.
- 14) Garman, E. Private Communication.