

RAMC'99 に参加して

日本ロシュ (株) 研究所 深海 隆明

RAMC という名前を聞いたことがない方も多いと思います。RAMC (Recent Advances in Macromolecular Crystallization) は、Bob Cudney (Hampton Research) と Allan D'Arcy (Roche Basel) が主催している、生体高分子の結晶化についての meeting です。4 回目の今年は Hampton Research のある California で、8 月 22 日から 25 日にかけて開催されました。会場は San Diego の Mission Beach にある Catamaran Resort Hotel でした。強い日差しにもかかわらず気温は 24°C くらいと心地よく、ホテルの目の前に広がる青い空、青い海、そして白い砂浜をのんびりと眺めながら、リゾート気分を味わってきました。(旅費を出してくれた会社に感謝！)

RAMC はあまり大きな meeting ではありません。今回の参加者は 99 人、その約半数が企業からの参加です。日本人は 3 人でした。また、堅苦しい雰囲気はまったくなく、むしろできるだけ楽しんでもらおうという主催者の意図が感じられました。発表時間は厳守。超過したら後ろから狙撃する。なんていう案内は普通の学会ではまず聞かれませんし、「一番時間が短かった発表者にはシャンパンが贈られる」なんてことも無いでしょう。(実際には、持ち時間 20 分に一番近かった発表者に贈られたのですが)。3 日目に催された Dinner では、ハワイアンショーまで楽しむことができました。

遊んでばかりいたわけではありません。会場は 1 つだけでしたが 16 のレクチャーがあり、およそ結晶化に関係すると思われることは網羅されていたのではないのでしょうか。また、予定にはなかったのですが、Cyberlab の結晶化ロボットを使っている(使いたいと思っている)人を対象に、Users' Group Meeting も開かれていました。昼休みだったので、筆者はビーチでローラーブレードを楽しんで...。おっと。展示していた Douglas Instruments のロボットを眺めていました。

隣の部屋はポスター会場になっていて、31 枚のポスターの他に、参加者の書いた Tips が掲示されていました。これは Hampton らしいと思ったのですが、参加者には Tips を書くための用紙が配られていて、一番良いと思ったものに投票することになっていました。最優秀賞として \$500 の現金が贈られることになっていたから、とは言いませんが、なかなか感心させられるものもありました。

そしてもう一つ特徴的なのは、最終日に行われた参加者全員での Round Table Discussion です。あらかじめ議題が決まっていたわけではなく、議論したい内容を自由に書き込めるボードが会場に置いてあって、そこに書かれたトピックについて議論するというものでした。全部で 20 くらいありましたが、どれも日頃から気になっているようなことばかりで、どこでも同じような問題を抱えているんだと改めて感じました。

ホームページ (<http://www.hamptonresearch.com/RAMC99.html>) で、レクチャーとポスターのアブストラクト、更にはハワイアンショーの写真を見ることができます。また、上記の Tips や Round Table Discussion の内容についてもまとめられていますので、この原稿ではレクチャーで話された内容などを簡単に紹介しておこうと思います。

Roche Basel の Molecular Biologist である Glenn Dale と Crystallizer である Allan D'Arcy が、結晶化に適したサンプルを得るまでの流れをまとめたので、紹介しておきます。(次表)

Protein Expression	→ Soluble?	No→	Expression system Expression temperature Buffer condition Refolding Mutagenesis
Purification	→ Pure?		
DLS measurement	→ Unimodal? (monodisperse?)	No→	Expression system Buffer condition Complex formation Limited proteolysis Mutagenesis
Crystallization (Sparse Matrix Screening)	→ Any hits?	No→	Complex formation Limited proteolysis De-glycosylation Mutagenesis

タンパク質溶液のDLS (Dynamic Light Scattering) 測定の結果が unimodal であれば、その 80% くらいは結晶化するが、良くなければ結晶化には適さないのので、まず unimodal になるような条件を探す、という strategy は既に一般的になっているようです。さらに, monodispersity が良い (分子量分布が狭い) 方が良く、これにはタンパク質の精製度はもちろん、バッファー条件や還元剤の有無などが影響するという話がありました。また, Larry Miercke (Univ. of California) は膜タンパクの結晶化への応用として界面活性剤のミセルサイズをDLSにより測定するという例を紹介していました。

Neali Armstrong (Columbia Univ.) が Refolding の条件を探す方法について講演していました。このグループが開発している方法は、Protein Folding に影響すると考えられる12の因子について、その条件を Fractional Factorial Analysis によって最適化していくというもので、このための Screening Kit が Hampton Research から FoldIt として発売されています。

結晶化条件のスクリーニングに使う Sparse Matrix は、Hampton や Emerald などの市販品の他に、自前のもので作って使っているところが多いと思います。Anna Stevens (Searle) は、自分達で使用している Matrix が変遷 (進化) してきた過程を紹介しており、沈殿剤のクラス毎に Matrix を分化させていました。スクリーニングの結果などから、どの沈殿剤クラスの Matrix を使うか、あるいは新規に作るかを定めるようです。また、これは最終日の Discussion でも話題になったのですが、スクリーニングで 400 くらいの条件を試しても (いわゆる "promising" な結果を含めても) hit が無ければ、Protein Modification を考えるべきであるというのが大方の意見でした。

スクリーニングの High Throughput 化については、Joseph Luft (Hauptman-Woodward Inst.) が、現在開発している 384 well plate を使用した Microbatch 法の装置を紹介していました。セットアップは 40 plates/day を達成しているものの、やはり結果の観測方法と判定の自動化が問題

になっているようです。

Protein Modification が結晶化の成功の秘訣です、という話はどうしてもサクセスストーリーになってしまうのですが、こんな例がありました。Protein digestion の例として、Protease で処理することによってタンパク中の flexible loop 部分が切断されて結晶化に成功したというもの。Limited proteolysis の例として、ドメインを繋いでいるヒンジ部分が切断されたので、単一のドメインだけで結晶化することにより成功したというもの。De-glycosylation の例は、タンパク質中の 3 つの N-linked glycosylation sites を全て Asn→Lys に変異させたら、問題となっていた aggregation が抑えられ結晶化に成功したというものでした。どれも、試してみたら成功したというようなものなのですが、タンパク質を Protease 処理してみるというのは意外と普通に行われているようで、Hampton Research は Protease Kit を出さないのか、とら質問も出ていました。Hampton Research のことですから、ひょっとして近いうちに出すかもしれません。

結晶化からはちょっと外れますが、基質との複合体を作る際に soaking と co-crystallization のどちらが良いかという製薬会社で働いている我々には特に興味のある話題もありました。好みは半々に別れていましたが、両方試すことによって結晶化の成功率を高めるといった意見もありました。また、基質が大きい場合には soaking よりも co-crystallization の方が良いと考えられるとか、強く結合するような化合物の場合には、その結合に際してタンパク質のコンフォメーション変化が起こり得るので soaking が不適当なことがある、といった指摘(経験談?)もありました。水に溶けにくい化合物が問題になるのはどこでも同じで、できるだけ濃い DMSO 溶液にしてタンパク質溶液と混ぜるのが一般的な方法だとか、DMSO が使えない場合にはアルコールなどを使用したらといった意見が出ていました。

この学会に参加して、RAMC は Crystallizer の集まりであるという印象を受けました。日本では、結晶化から(場合によっては精製から)構造解析までを一人でこなしていることが多いので、Crystallizer という言葉は耳慣れない言葉かも知れません。海外の企業の多くでは Biologist が精製したサンプルを、Crystallizer が構造解析に使える結晶にして、Crystallographer が構造を解くという役割分担をしています。残念ながら、日本口シユでは Crystallizer と Crystallographer は分離していませんが。創薬において構造解析から得られる情報が「役に立つ」ようにするには、素早く構造を解くことが要求されます。役割分担をして各々の expertise を高めていくことで、構造解析のスピードを上げていく、とら考えが主流であるような印象を受けました。こういった expertise に触れられたことも、RAMC に参加して良かったと思えることの一つです。



写真は、RAMC'99 に参加した Roche のメンバーで、ホテルの目の前のビーチで撮ったものです。前列中央のヒゲを生やした男性が、主催者の 1 人である Allan D'Arcy です。余談ですが、RAMC'99 には Roche の 6 つの研究所 (Basel (スイス), Welwyn (英), Penzgerg (独), Nutley (米), Palo Alto (米), Kamakura) 全てから参加者がおり Roche Internal Meeting が RAMC の後に開かれました。この写真は、その時に撮ったものです。