

蛋白質結晶化装置および結晶直接評価法の開発

北海道大学大学院理学研究科 渡邊 信久

はじめに

ポストゲノム期の現在，タンパク質結晶学には，ハイスループット化が要求されている．ハイスループット構造解析を実現するには，ターゲットとするタンパク質を迅速に大量発現させることと同時に，結晶化条件を効率的に探索することが必須である．タンパク質の結晶化は基本的に試行錯誤を要するプロセスであることから，結晶化条件の探索を効率化するためには，出来るだけ少ないタンパク質試料でより多くの結晶化条件のテストが実施でき，かつ，そうして作成した結晶の X 線回折能の評価を結晶化と連続して高効率で行えるシステムの開発が急務であった．

本開発は，結晶化ドロップを自動作成することにより必要最少限のタンパク質試料で広範囲の結晶化条件を効率的に検索することを可能とし，同時に，専用結晶化プレート（デバイス）を開発し，生成・成長した結晶の X 線回折能を結晶化条件のドロップのままに迅速に評価することを可能にすることを目的とした．今年度からは，タンパク 3000 プロジェクトもスタートし，筆者の所属研究室もその中核拠点の一つ（翻訳系）となっている．本研究課題は，実質的にはこのタンパク 3000 プロジェクトのための準備の重要なステップとなっている．

本開発の第一の成果は，比較的安価な溶液分注機を改造して，高速結晶化装置を開発したことである．従来，タンパク質の結晶化条件の検索にあたっては，10mg/ml 程度に濃縮したタンパク質溶液を 1 条件あたり 1 ~ 2 μ L 使用することが一般的であった．また，400 条件程度の異なる結晶化実験をセットアップするには，数時間から半日以上を要していた．本研究開発では 1 条件に必要なタンパク質試料ボリュームを 500nL まで減らし，かつ 96 条件の異なる結晶化実験のセットアップを，自動的に約 4 分で実施出来る装置を開発した．これによって，従来よりもより少ない蛋白質量で，より多くの結晶化条件を試すことが出来るようになった．

また，本研究の第二の成果は，成長した蛋白質結晶の結晶性，すなわち X 線

回折能を結晶化実験の条件のままに評価することの出来るデバイスを開発した
ことである。タンパク質結晶の X 線回折能は、一般に結晶の外観の美しさに比
例しない。したがって従来、生成・成長したタンパク質結晶の評価を行うため
には、結晶が成長している結晶化ドロップから任意の 1 個の結晶を取り出し、
これに X 線を照射して X 線回折能を確認するというプロセスを必要としていた。
しかし、この操作は結晶に物理的なダメージを与え易く、また、操作に熟練と
時間を要するため、多数の条件で生成した結晶の X 線回折能を迅速に評価し、そ
の結果を比較して、結晶化条件にフィードバックすることに時間がかかり過ぎ
ていた。

これらの開発による 2 つの成果により、極めて独創的な迅速結晶化・結晶評
価システムを保有することになった。これらは、今後、筆者の所属研究室で実
施されているタンパク 3000 プロジェクトの重要な要素技術として利用される。
このシステムに対しては、国内外の研究者からの問い合わせもあり、今後もさ
らに改良を進めることが望まれる。

1. 蛋白質結晶化装置の開発

今回の開発研究の第一の目標である迅速に蛋白質結晶化実験セットアップを
行う装置は、Robbins 社の Hydra-96 多連溶液分注機を改造して実現した (図
1)。Hydra-96 は、SBS 規格の標準フォーマットの各種生物学用マイクロプレー



図 1 . Hydra-96 分注機 . (左) 改造前 , (右) 改造後 .

トのための液体ハンドリングシステムであり、シリンジおよびプレートポジシ

ヨナーの動作は外部から RS-232C で制御できる。シリンジを選択することで、100nL から 1mL までの多連同時分注が可能である。Hydra-96 の分注方式は接触式であるが、96 箇所同時分注を高速かつ比較的安価で実現でき、使い捨てのピペットチップを使用しない点で優れている。Hydra-96 に 100 μ L のシリンジを選択し使用した場合、分注量 100 nL の CV 値は約 7~10 % である。

本課題では、この溶液用多連分注機である Hydra-96 を、蛋白質結晶化用装置として使用するために、96 本のシリンジを束ねているシリンジブロック部分に、さらに最大 8 本のシリンジを追加出来るように改造した(図 2)。同時にプレートポジショナー上部も改造を行い、中央に結晶化用の蛋白質溶液を 8 連 PCR チューブに 8 分注して保持できるようにした。また、結晶化プレート部(右側)の高さは、追加した 8 本のシリンジをもととの 96 本のシリンジと独立に動作させるために 15 mm 上げられている。

実際の分注操作は、まず最初に 8 本の蛋白質溶液用シリンジで PCR チューブから結晶化プレートの 96 ヶ所に蛋白質溶液を分注する。その後沈殿剤溶液を、もともとの 96 本のシリンジで、プレートポジショナー左側にセットした 2 mL 容量のストレージブロックから 96 ヶ所のリザーバー部位と結晶化部位に同時に分注する。この際、蛋白質溶液と沈殿剤溶液はピペッティング動作による混合は行わない。今回は 100 μ L 用シリンジを装着しているため、100 nL からの分注が可能であるが、分注精度および再現性の確保のため、通常は 500 nL の分注

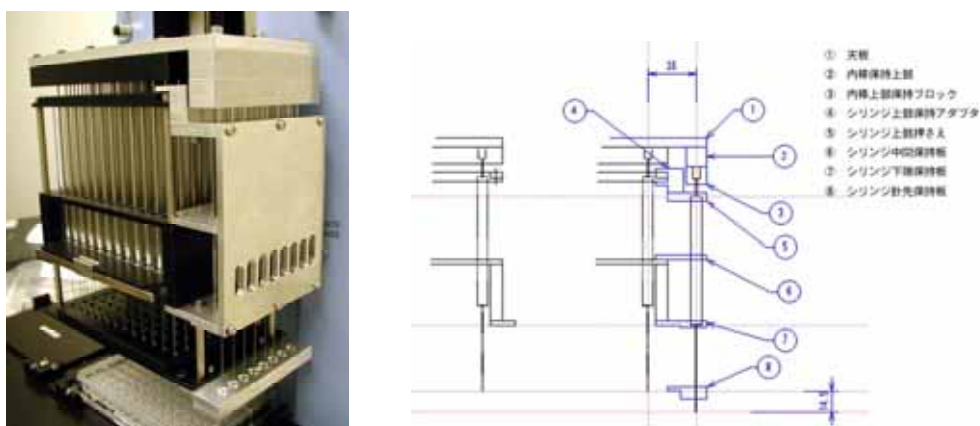


図 2 . 追加シリンジ部詳細 . (左) 拡大写真 , (右) 説明図 .

を実施している。なお、蛋白質溶液分注用の 8 本の追加シリンジは、最終的にフレキシブルな DuraFlex シリンジに交換した。

ポリエチレングリコール (PEG) 溶液のような、高粘度の液体を分注するため

には、Hydra-96 の標準のシリンジ駆動速度は高速すぎる。しかし、シリンジ速度パラメタは Hydra-96 本体の ROM に記述されており、Robbins 社のエンジニアと協議した結果、ROM 容量の制限のため、標準以外の速度パラメタを記述することが不可能と判明した。従って、本改造 Hydra-96 では、高粘度の溶液を分注する場合は、吸引のためにプランジャーを上昇させた後上端で一旦停止させ、液体が十分吸引されるまで 5 秒程度そのままの位置で待つシーケンスを採用した。(現在 Hydra-96 の後継機として Apogent Siscoveries 社が Hydra II を販売しており、Hydra II はシリンジ速度パラメタを変更できる。)

今回の改造段階で、Robbins 社の開発エンジニアに、Hydra-96 に対する追加シリンジのメリットを伝える機会があった。Robbins 社は TB Structural Genomics Consortium の Dr. B. Rupp らと共同で蛋白質溶液分注用ソレノイドバルブを追加した Hydra-Plus-One というシステムを開発した。

2. 結晶直接評価法の開発

今回の開発研究の第二の目標は、結晶化ドロップ中で生成・成長した蛋白質結晶の結晶性、すなわち X 線回折能を、そのままの状態で評価することの出来るデバイスを開発することである。従来は、ある結晶の与える回折像が良くない場合でも、結晶の本来の性質によるものか、それとも X 線照射のための操作中に結晶にダメージを与えてしまったためかが不明確であった。また、数種類の結晶化条件で結晶が得られた場合、それらの全てについて同一の条件で X 線回折実験を実施し比較することは困難であった。結晶化プレートの状態のままに結晶に直接 X 線を照射し、回折像を記録することが出来れば、それらの困難を克服することが出来る。このための結晶化プレート、すなわち Ready-to-Xray plate の開発を行った。

結晶化用分注装置に Hydra-96 を採用したことから、直接結晶評価可能結晶化プレートは SBS 規格に準拠したフォーマットを採用した。すなわち、各結晶化部位の間隔は 9 mm である。また、通常の実験室系 X 線回折装置の試料位置にマウント出来るようにするため、結晶化プレートはコンパクトに分離できるストリップ状の構造とした。図 3 にプロトタイプの結晶化プレートの写真と図面を示す。1 個のストリップには 8 ヶ所の結晶化部位があり、これを 12 本組み合わせることで 96 ウェルの結晶化プレートとして使用する(図 4)。この結晶

化プレートの試作 1 号は，形状案の正否を検討するため大量生産をせず，切削加工によって製作した．切削性および耐薬品性の観点からユニチカのユニレート（PET，グラスファイバーの複合材料）を使用した．

プレートの構造体による X 線の吸収があると，直接 X 線評価時の障害になる．

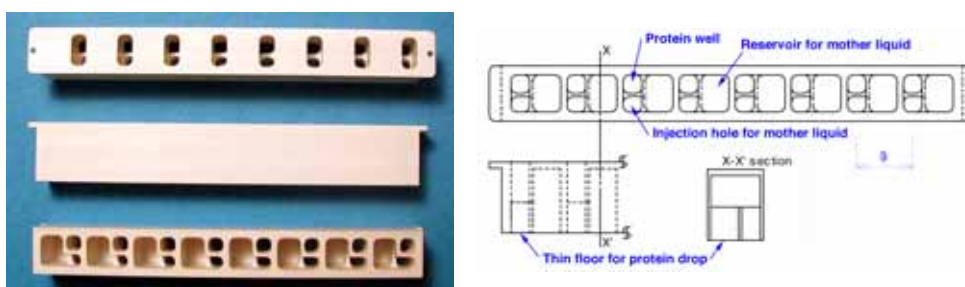


図 3．結晶化プレートの 1 個のストリップの写真（左）と図面（右）．

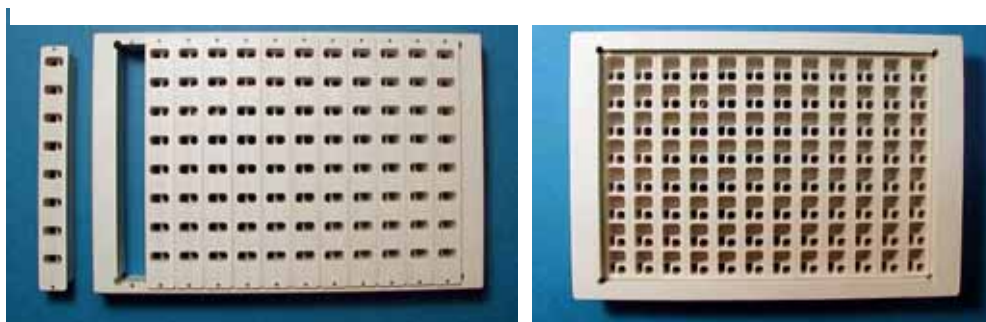


図 4．96 ウェル結晶化プレート．上面（左）および下面（右）．

今回開発した結晶化プレートは，それを避けるため，底面（結晶化ドロップ作成面）を形成せず，薄いフィルムを貼付けて底面を構成した．耐薬品性の観点から試作品では Greiner Bio-one 社の Power Seal CRISTAL VIEW を使用した．結晶化セットアップ後の上面のシールは Hampton Research 社の Crystal Clear Sealing Tape を使用している．

この結晶化プレートは，結晶化プレートの方角を任意に回転してもリザーバー溶液が結晶化ドロップ上および X 線のパス上に来ない．このためこの結晶化プレートは上下反転使用しても問題が無く，シッティングドロップ法とハンギングドロップ法の両方法に使用可能である．従って Hydra-96 改造結晶化装置で結晶化ドロップを底面に作成した後，そのままインキュベートすればシッティングドロップ法となり，結晶化プレートを上下反転してインキュベートすればハンギングドロップ法となる．図 5 にハンギングドロップ法として使用した場合の結晶化プレートの写真を示す．

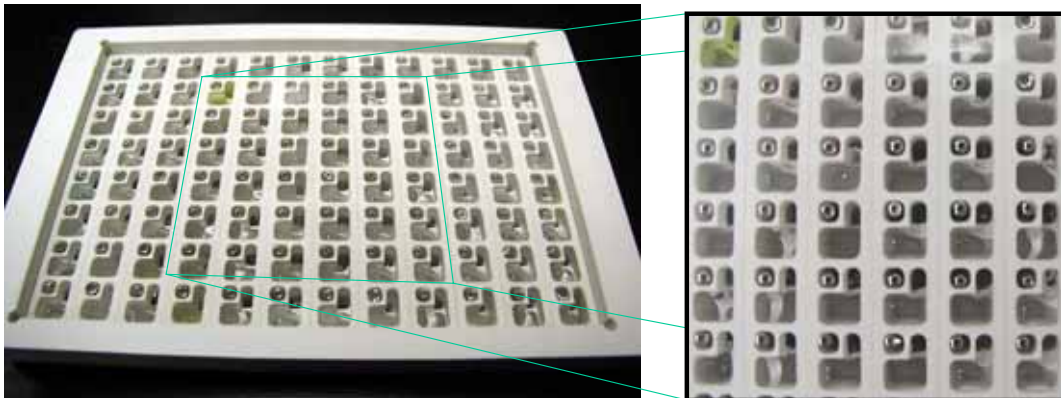


図 5 . 結晶化プレートを手懸滴法で使用した場合の写真 .

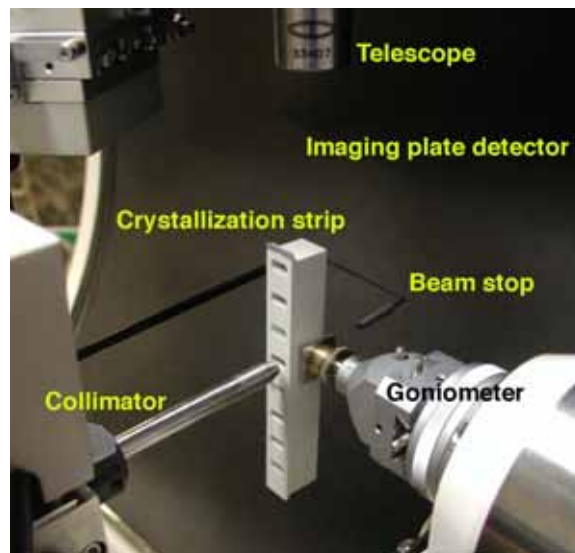


図 6 . DIP-R300 のゴニオメータヘッドに直接マウントした、結晶化プレートのストリップ .

結晶化プレートの一本のストリップは、細長い形状であるため、そのまま容易に実験室系の X 線回折装置のゴニオメータにマウントすることが出来る (図 6) . すなわち、この結晶化プレートは、Ready-to-Xray である . この結晶化プレート試作 1 号を使用して、実際に結晶化実験を実施し、概念の評価を行った . 使用した蛋白質は高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* の機能未知蛋白質 PH1136 (131 amino acid, 14,728 Da, 20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.5) である . Hampton Research 社の Crystal Screen I & II を用いて結晶化実験を実施した . 結果を図 7 に示す .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CSI-1	CSI-9	CSI-17	CSI-25	CSI-33	CSI-41	CSII-1	CSII-9	CSII-17	CSII-25	CSII-33	CSII-41
B	CSI-2	CSI-10	CSI-18	CSI-26	CSI-34	CSI-42	CSII-2	CSII-10	CSII-18	CSII-26	CSII-34	CSII-42
C	CSI-3	CSI-11	CSI-19	CSI-27	CSI-35	CSI-43	CSII-3	CSII-11	CSII-19	CSII-27	CSII-35	CSII-43
D	CSI-4	CSI-12	CSI-20	CSI-28	CSI-36	CSI-44	CSII-4	CSII-12	CSII-20	CSII-28	CSII-36	CSII-44
E	CSI-5	CSI-13	CSI-21	CSI-29	CSI-37	CSI-45	CSII-5	CSII-13	CSII-21	CSII-29	CSII-37	CSII-45
F	CSI-6	CSI-14	CSI-22	CSI-30	CSI-38	CSI-46	CSII-6	CSII-14	CSII-22	CSII-30	CSII-38	CSII-46
G	CSI-7	CSI-15	CSI-23	CSI-31	CSI-39	CSI-47	CSII-7	CSII-15	CSII-23	CSII-31	CSII-39	CSII-47
H	CSI-8	CSI-16	CSI-24	CSI-32	CSI-40	CSI-48	CSII-8	CSII-16	CSII-24	CSII-32	CSII-40	CSII-48

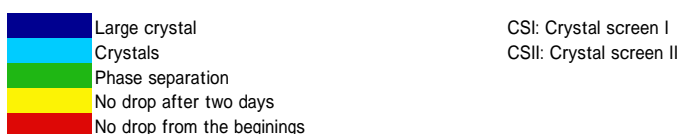


図 7 . 機能未知蛋白質 PH1136 の結晶化実験結果 .

結晶化実験はHydra-96改造結晶化装置で結晶化セットアップ後、プレート全体を上下反転し、ハンギングドロップ法として使用した。高濃度のMPD等の条件（30% MPD, 50% MPD, 30% iso-Propanol, 35% tert-Butanol；図 7 中赤で示す）では、ドロップがプレートの構造壁に接触し、ドロップ状態を維持できなかったが、その他の条件では問題なくハンギングドロップ状態を維持することが出来、Crystal Screen Iの条件4, 33, 38で、比較的良好な結晶が得られた(図 8)。

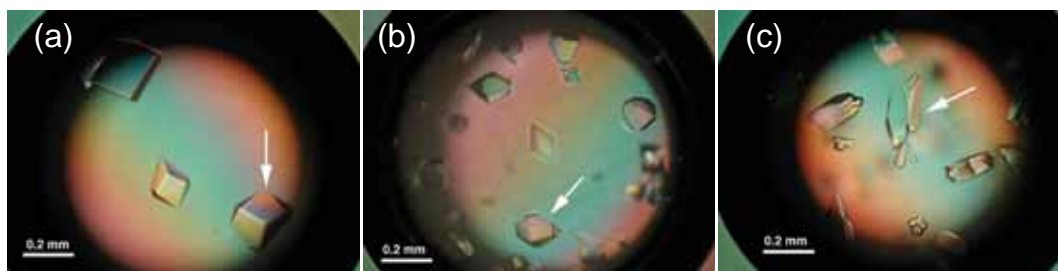


図 8 . Ready-to-Xray 結晶化プレートで生成した PH1136 の結晶の写真 .

この顕微鏡観察では、結晶の形状から(a)が最良であり、次に(b), (c)の順に結晶性が良さそうに見える。実験では、この結晶化プレートのまま、図 6 のようにして各結晶化ドロップ中の結晶の X 線回折写真を撮影した。実際に X 線を照射したのは図 8 中の矢印で示した結晶である。3つの結晶とも同一の条件で撮影した回折写真を図 9 に示す。結晶化プレートごと操作可能であるため、この操作の段階で従来のように結晶に触る必要が全くない。すなわち、撮影され

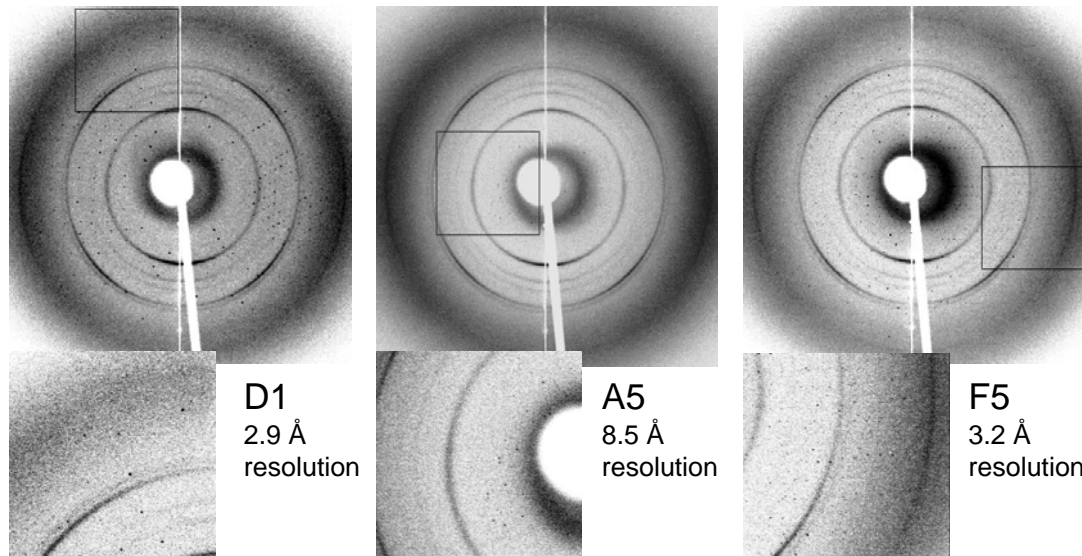


図9 . PH1136 結晶の X 線回折像と拡大図 . D1 , A5 , F5 はそれぞれ図 8 の(a),(b),(c)に対応 .

た X 線回折写真は , 操作による結晶のダメージ等の影響が無く , 結晶そのものの結晶性のみを反映している .

顕微鏡観察では見かけの結晶性は(a) , (b) , (c)の順に良いように思われたが , X 線回折実験により , 実際は (a) , (c) , (b)の順であったことが分かる . X 線結晶構造解析に必要なのは , 見かけの結晶性ではなく , X 線回折能であるから , この実験で , 今回開発した結晶化プレート (Ready-to-Xray 結晶化プレート) の有用性が示された .

このプロトタイプの結晶化プレートは , 結晶化ドロップ作成位置すなわちプレートの底面が深く , Hydra-96 改造結晶化装置によらずオートピペッターを用いて手動で結晶化実験を行うには適していない . また , 上記の予備実験の結果にもあるように , MPD 等で結晶化ドロップを維持できなかった . これらを改善するため , 結晶化プレートの改良を進めた . また , プレートの大量生産を実現するため , 金型による成型に移行した . 図 10 にユニレートを切削形成した試作 2 号プレート (上) と , 金型による試作 3 号 (中 , 下) を示す . 金型成型の場合は , 耐薬品性と硬度の観点からポリカーボネートを使用した .

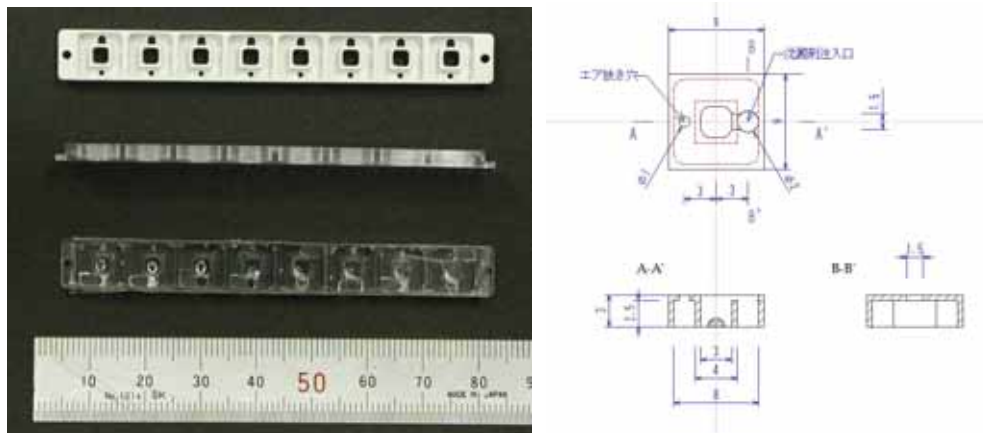


図 10 . 改良型結晶化プレートの写真と，1 区画の図面．写真上，試作 2 号；
中，下，試作 3 号．下は実際に結晶化実験を実施したもの．

試作 3 号結晶化プレートを用いて結晶化実験を実施した際の，1つのセルを拡大した写真を図 11 に示す．試作 1 号の不具合を修正したため，中央の結晶化ドロップ部分の面積が大きくなっており，また沈殿剤溶液を分注するリザーバ部分を結晶化ドロップ部分と完全に分離し，プレートの方位をどのようにしても，決して結晶化ドロップとリザーバ部の溶液が接触しない構造とした．さらに，新プレートは，全体を薄型とし，手動ピペッターによる結晶化セットアップも可能にした．また，この薄型構造により，プレートを約 53 度まで回転しても X 線照射が可能となった．この新型結晶化プレートを実験室系 X 線回折装置のゴニオメータヘッドに直接マウント出来るマウントアダプタも新規製作した(図 12)．

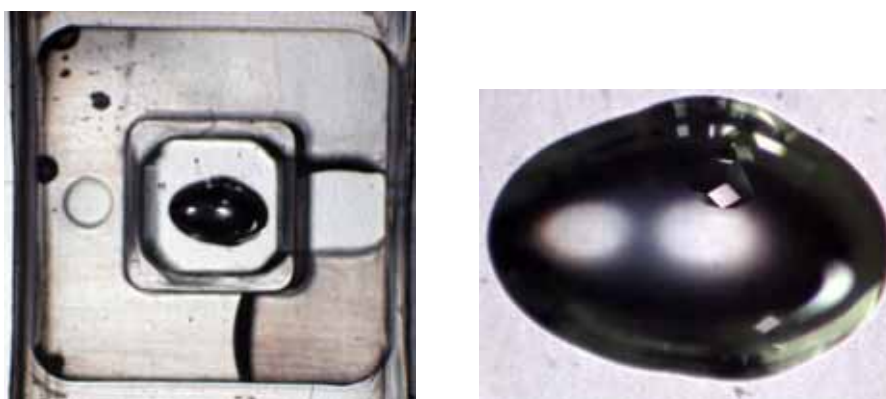


図 11 . 結晶化プレートの 1 区画の拡大写真と，結晶化ドロップの拡大写真．



図 1 2 . 新結晶化プレートをマウントアダプタでマウントした様子 .

3 . まとめ

96 条件の結晶化セットアップを約 4 分で実施できる蛋白質結晶化装置と、それと組み合わせて使用することで高効率で結晶化および結晶性の評価の可能な結晶化プレートを開発した。結晶化装置は、研究室の結晶化条件検索に使用されている。結晶化プレートは金型製作によりまとまった量の供給が可能となったため、今後はルーチンでの使用を予定している。なお、結晶化プレートは、現在底面をシール材で形成しており、手間とコストがかかっている。一般に普及することも期待し、あらかじめ底面を形成することが必要であると考えており、開発予算獲得の試みを継続している。

謝辞

Hydra-96 の改造用の部品およびプレートマウントアダプタは、渡邊の作成した部品図によって北海道大学理学部金属工作室で製作していただいた。

参考文献

- 1) Semi-automatic protein crystallization system that allows *in situ* observation of X-ray diffraction from crystals in the drop.
Watanabe, N., Murai, H., and Tanaka, I.
Acta Cryst. **D58**, 1527 - 1530 (2002).