

(様式第5号)

実施課題名※マイクロ流体デバイスを用いたタンパク質結晶の
in-situ X線結晶構造解析
In-situ X-ray crystal structure analysis of protein crystal by using Microfluidic
device

著者・共著者 氏名 山下健一
English YAMASHITA, Kenichi

著者・共著者 所属 独立行政法人 産業技術総合研究所
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

- ※1 先端創生利用（長期タイプ、長期トライアルユース、長期産学連携ユース）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の開示が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後二年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です。（トライアルユース、及び産学連携ユースを除く）

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

様々な結晶化条件をひとつのチップ内で試験することができるマイクロ流体デバイスを用いて、2種類のタンパク質の結晶化を行った。ここでは、これら2種類のタンパク質結晶を、そのチップから取り出すことなくX線回折像を得ることができるかどうかの試験を行った。その結果、室温や4℃において、良好な回折像を得ることができたものの、極低温窒素ガス吹き付け下では霜付きにより長時間の測定には適合せず、全体形状の再検討を要する結果となった。

(English)

The crystallization of two kinds of proteins was carried out using the microfluidic chip which enables the easy screening of crystallization conditions. We herein examined to obtain diffraction patterns from crystal grown in the microfluidic chip without any manipulation. At room temperature or 4 °C, the obtained several diffraction patterns were of sufficiently fine quality for the crystal structure factors to be generated. However at freezing condition, long time measurement was not able to be carried out because of frosting.

2. 背景と目的

マイクロ流体デバイスを用いたタンパク質の結晶化は、効率的な結晶化条件の探索が可能であり、様々なデバイスが開発されてきた。さらに、タンパク質の結晶は脆く壊れやすいことから、デバイスのままX線結晶構造解析が可能であり、熟練した結晶のハンドリングが不要である本手法は、結晶構造解析において大きな利点であると考えられる。このin-situのX線回折実験のためには、大きな単結晶を得ることよりも、液滴やデバイス中で良質な単結晶を1個だけ作製することが重要である。以前、我々はキャピラリー中の微小液滴内に1個だけタンパク質結晶を析出させる技術について報告し、キャピラリーのままX線回折実験を行い、クリアな回折像を得ることに成功した。しかしながら、微小液滴中の結晶化では、従来法よりも結晶化の頻度が低下するという課題があった。そこで本研究では新たに、このような問題点を改善したマイクロ流体デバイス（図1）を用いたタンパク質結晶化技術を検討した。今回、モデルタンパク質として、リゾチームと*Pseudoalteromonas* sp. AS-13由来のグルコキナーゼ (PsGK) を使い、その中に生じた結晶を取り出すことなく、そのままX線回折測定を行うことについての実験を行った。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

回転写真法によるリゾチーム結晶、および、*Pseudoalteromonas* sp. AS-13由来のグルコキナーゼ (PsGK) 結晶 (図2) の X 線回折データを収集した。当該単結晶をマイクロ流体デバイスから取り出すことなく、試料台 (ゴニオメーター) に設置し (図3)、室温、もしくはフラッシュクーラーにて冷却した。その後、X 線回折のデータを収集した。1 フレーム当たりの回転角は1度で、デバイスの片面から 90 度分で1データセットとした。使用した X 線波長は 1.5 Å、露光時間は1 フレーム 20 秒程度であった。

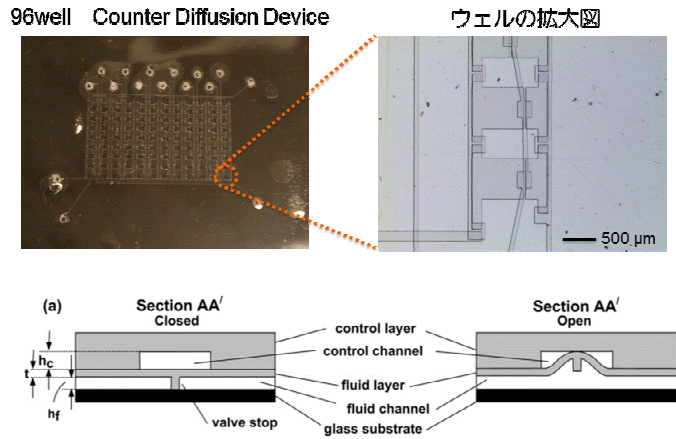


図1 本研究で使用したマイクロ流体デバイスの写真と、その動作の概略図。

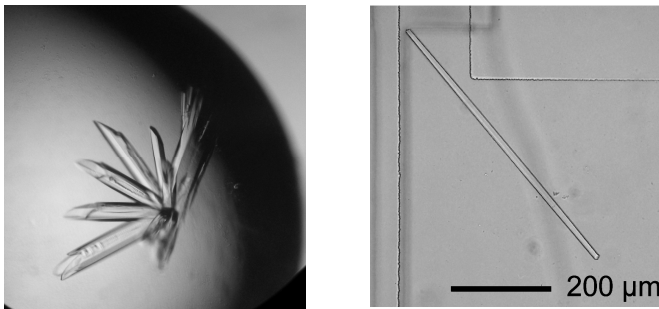


図2 バッチ中で得られる PsGK 結晶 (左) と、前記デバイスで結晶化した場合 (右) の比較写真



図3 実験の様子を示した写真

4. 実験結果と考察

リゾチームと PsGK の結晶より得られた X 線回折像の一例を図4に示す。また、後日行った解析の結果、リゾチーム結晶の単位格子は、 $a=b=79.40 \text{ \AA}$ 、 $c=37.91 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であり、 $P4_32_12$ の対称性であった。回折点から、分解能は 1.66 \AA と計算された。一方、PsGK 結晶では、 $a=b=100.01 \text{ \AA}$ 、 $c=59.84 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=\beta=90^\circ$ 、 $\gamma=120^\circ$ であり、 $P3_121$ の対称性であった。回折点から、分解能はおよそ 2.0 \AA であった。

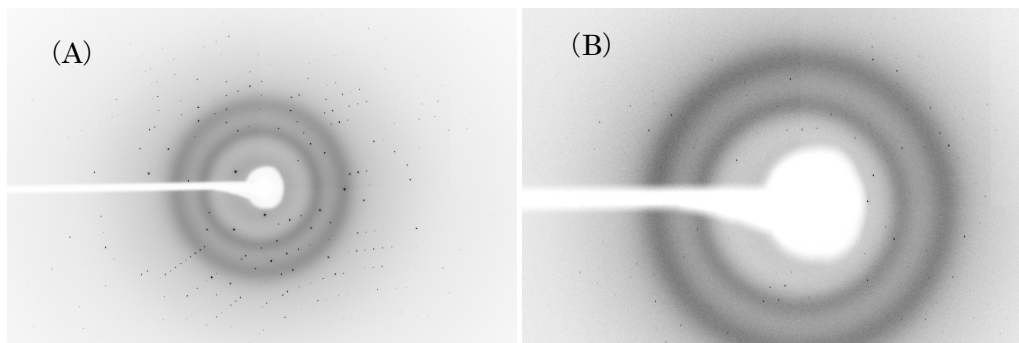


図4 得られた X 線回折像の一例。(A) がリゾチーム、(B) が PsGK である。

5. 今後の課題

前述のとおり、マイクロ流体チップから結晶を取り出すことなく X 線回折像を得ることができ、さらに単位格子の情報を得るのに十分なデータの質であることも確認できた。さらに、これらはプロテインデータバンク登録値とよく一致するものであった。一方で、これらのデータは、4℃や室温という、凍結させない状態でのみ得られることができた。フラッシュクーラーにより、極低温下における測定を試みたところ、窒素が吹き付けられている反対側の面での霜付きが生じ、さらにそれが時間とともに大きくなってしまいう問題が生じた。この理由は、今回用いたマイクロ流体チップの形状の問題であることははっきりしており、この問題を回避するための形状の再検討が必要という結論に至った。本マイクロ流体チップによる結晶化と X 線回折測定のための今後の展開を考える上で、タンパクを対象とする以上、凍結状態における測定は実現しておくことが不可欠である。

6. 参考文献

該当なし

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

- 1) Masatoshi Maeki, Hiroshi Yamaguchi, Kenichi Yamashita, Hiroyuki Nakamura, Masaya Miyazaki, Hideaki Maeda, “A method for generating single crystals that rely on internal fluid dynamics of microdroplets”, *Chemical Communications*, Vol. 48, 5037-5039 (2012)
- 2) Masatoshi Maeki, Saori Yoshizuka, Hiroshi Yamaguchi, Masahide Kawamoto, Kenichi Yamashita, Hiroyuki Nakamura, Masaya Miyazaki, Hideaki Maeda “X-ray diffraction of protein crystal grown in nano-liter scale droplet in microchannel and evaluation of its applicability”, *Analytical Sciences*, Vol. 28, 65-68 (2012)
- 3) Masatoshi Maeki, Hiroshi Yamaguchi, Kenichi Yamashita, Hiroyuki Nakamura, Masaya Miyazaki, Hideaki Maeda, “Analysis of Kinetic Behavior of Protein Crystallization in Nanodroplets”, *Chemistry Letters*, Vol. 40, 825-827 (2011)
- 4) 特願 2011-258194 「結晶成長用容器、液滴調製器具および結晶取得方法」

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を 2～3)

タンパク結晶化、結晶構造解析、X 線回折

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください(2013年度実施課題は2015年度末が期限となります。))

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文(査読付)発表の報告

(報告時期：平成 25 年 12 月)