

(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、タンパク質の結晶化を行った。ここでは、そ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、極低温窒素ガス吹き付け下においても、霜付きなどを生じることなく、約2時間の完全なデータセットを得ることに成功した。

(English)

The crystallization of a protein 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 freezing condition, the obtained several diffraction patterns were of sufficiently fine quality for the crystal structure factors to be generated.

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。モデルタンパク質として、リゾチームを用い、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。特に今回は、先月に行った実験において、極低温窒素ガス吹き付け下において霜付きが発生し、完全なデータセットの回折像写真を得ることができなかった点の改善に注力した。

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、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 \AA 、露光時間は 1 フレーム 20 秒程度であった。

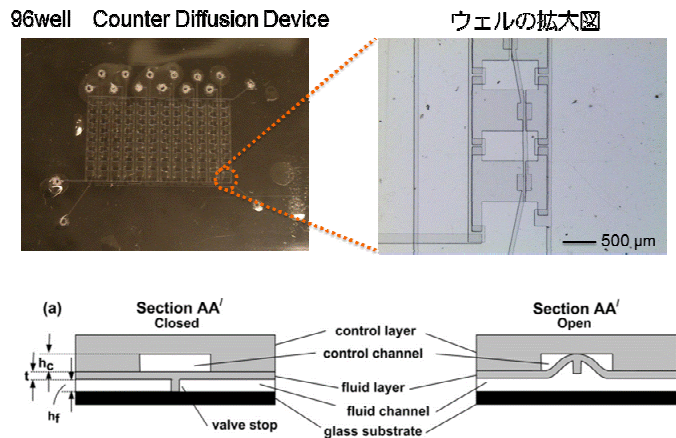


図 1 本研究で使用したマイクロ流体デバイスの写真と、その動作の概略図。

4. 実験結果と考察

リゾチームの結晶より得られた X 線回折像の一例を図 2 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、 $a=b=78.96 \text{ \AA}$ 、 $c=37.03 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であり、 $P4_32_12$ の対称性であった。分解能は 1.66 \AA と計算された。モザイク幅は 0.174° であった。これらの値はすべて、結晶を取り出して測定を行った場合と同等のものであった。

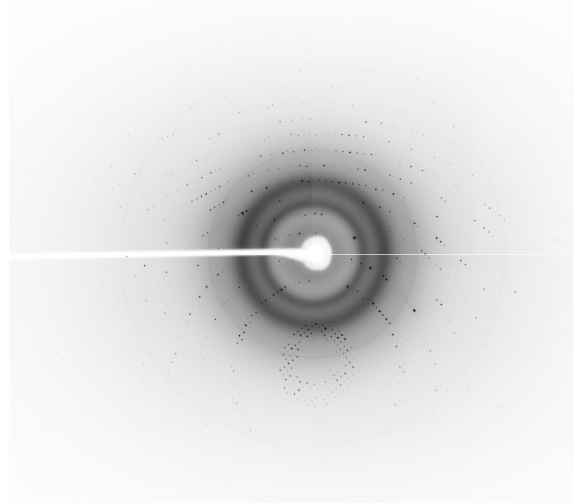


図 2 得られた X 線回折像の一例。

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。特に今回は、フラッシュクーラーにより、極低温下における測定を行うことを中心として取り組んだが、チップ全体の形状を見直すことにより、窒素が吹き付けられている反対側の面での霜付きを抑制することができた。その結果、これまでに達成されていなかった、チップの中に結晶を置いたまま、凍結条件下で、完全なデータセットの回折像を得ることができた。このような凍結条件下での測定を達成したことにより、in-situ 結晶回折像測定の検討は完了したと考えており、引き続き、これまでに測定困難であった種類のタンパク結晶を対象とした検討を行う予定である。

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 itsapplicability”, *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： 25 年 12 月）