

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15596

研究課題名(和文) マイクロデバイスによるタンパク質-リガンド複合体構造解析の高速化

研究課題名(英文) Development of a microfluidic device for protein-ligand complex structure analysis

研究代表者

真栄城 正寿 (Maeki, Masatoshi)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：40744248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質とリガンド複合体の立体構造情報は、創薬において不可欠である。タンパク質の立体構造は、おもにX線結晶構造解析で決定されている。特に、タンパク質・リガンド複合体の構造解析においては、リガンドの結合サイトまで決定できる点は、ほかの測定法にはない優れた特徴である。一方で、従来のX線結晶構造解析の測定効率はそれほど高くなく、また、タンパク質・リガンドの複合体構造解析には、煩雑な前処理が必要なため、測定スループットの改善が望まれていた。そこで本研究では、タンパク質・リガンド複合体の構造解析を高速化するためのマイクロデバイス、および、新規測定法の開発に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したマイクロデバイス、および、X線結晶構造解析法は、従来の測定法と比較して、簡便な測定操作でタンパク質・リガンド複合体の立体構造解析法を提供することができる。これによって、タンパク質・リガンド複合体の立体構造情報の取得効率を改善でき、創薬研究開発の加速に大きく貢献することができる。また、本法で決定可能な生理条件に近い室温でのタンパク質の立体構造情報は、生体内でのタンパク質の構造と機能の関係を解明するために、不可欠になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Three-dimensional (3D) protein-ligand structure analysis provides essential information for drug discovery. Generally, 3D protein structure is determined by X-ray crystallography. In particular, X-ray crystallography allows to determine the binding site of ligands. However, the conventional X-ray protein crystallography requires complicate pre-treatment for protein-ligand complex measurement. Therefore, improvement of the measurement throughput is one of the major challenges on the X-ray protein crystallography. In this research, we developed microfluidic devices for protein-ligand structure analysis.

研究分野：マイクロ化学・分析化学

キーワード：マイクロ流体デバイス タンパク質 X線結晶構造解析 立体構造 創薬

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造情報は、創薬や生命現象の解明に重要な知見をもたらしてきた。特に創薬においては、タンパク質の立体構造情報をもとにした **Structure Based Drug Design (SBDD)**、**in silico** 創薬が一般化している。創薬においては、タンパク質単体ではなく、タンパク質とリガンドの複合体構造が重要である。X線結晶構造解析では、一般的な結合試験では判断できないリガンドの結合サイトの情報を入手できる。一方で、X線結晶構造解析は測定のスループットが低く、**SBDD** 創薬のボトルネックになっている。現在の X線結晶構造解析の測定スループットが低い原因の1つは、タンパク質とリガンド複合体の構造解析においては、複合体結晶の調製(結晶をリガンド溶液に浸漬)と X線回折データ収集が1個の結晶ごとに、手作業で行われていることにある。

また、従来の X線結晶構造解析は、放射線損傷によるダメージを低減させるために、**100 K** の低温下で測定されている。最近になって、**100 K** の低温下でのタンパク質の立体構造と生理条件に近い室温条件下での立体構造の違いが指摘されはじめた。**100 K** の低温下では、室温条件とはアミノ酸側鎖の構造が異なる例が報告されている。さらに、タンパク質・リガンド複合体においては、リガンドの結合サイトが室温条件と **100 K** の低温条件で異なる可能性も指摘されており、室温条件下におけるタンパク質の立体構造解析の重要性が高まっている。一方で、室温での X線結晶構造解析によってタンパク質の立体構造を決定するためには、1個の結晶から放射線損傷しない範囲で回折データを取得し、複数個の結晶から得られた回折データ同士を統合する必要がある。したがって、低温条件よりも測定回数が増えるため、さらに測定のスループットが低下する要因となっている。

2. 研究の目的

本研究では、創薬研究で不可欠なタンパク質・リガンド複合体の立体構造解析を高速化するためのマイクロデバイスの開発を目的とする。室温条件において、タンパク質・リガンド複合体の構造を効率良く決定するためには、タンパク質とリガンド複合体の調製および X線回折実験の高速化が不可欠である。目的を実現するために、(1) 固定ターゲット型マイクロデバイスの開発と最適化、(2) データ解析法の確立とタンパク質-リガンド複合体の構造解析への応用に取り組んだ。これにより、**SBDD** 創薬・**in silico** 創薬の加速を目指し、我が国の創薬力強化に貢献するための分析手法の開発を最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 固定ターゲット型マイクロデバイスの開発と最適化

タンパク質・リガンド複合体および X線結晶構造解析を効率化するために、タンパク質の結晶をマイクロ流路の決められた位置に固定することを着想した。マイクロ流路の特定の位置に結晶を固定することで、マイクロ流路にリガンド溶液を導入するだけで、一度に複数のタンパク質・リガンド複合体の調製が可能となる。そこで、タンパク質結晶を捕捉するために、集積化したマイクロウェルとマイクロ流路を組み合わせたデバイスを設計した(図1)。結晶の捕捉や X線回折実験に適したマイクロウェルやマイクロ流路構造の解明に取り組んだ。

(2) データ解析法の確立とタンパク質-リガンド複合体の構造解析への応用

室温条件下での X線結晶構造解析では、複数の結晶から X線回折データを取得し、取得した回折データを処理・統合したあとに、立体構造解析が決定される。通常の X線結晶構造解析では、1個の結晶を回転させながら測定し、**180~360** 度分の X線回折データを取得している。一方で、複数の結晶を用いて立体構造解析を決定するためには、それぞれの結晶から得られる回折データは、**180** 度~**360** 度分の回折データを含む必要がある。そこで、(1) で開発したマイクロデバイスを用いて、X線に対する結晶の配向面について調査した。また、本デバイスを用いた測定の場合、立体構造を決定するために何個の結晶が必要となるかを明らかにした。さらに、リゾチーム、ソーマチン、トリプシンをモデルタンパク質として用いて、本デバイスによるタンパク質・リガンド複合体の立体構造解析への応用を試みた。

4. 研究成果

(1) 固定ターゲット型マイクロデバイスの開発と最適化

図1に本研究で開発したマイクロデバイスを示す。本デバイスは、結晶を捕捉するためのマイクロウェルと溶液を導入するためのマイクロ流路から構成されている。タンパク質結晶の作製には、マイクロバッチ法およびハンギングドロップ蒸気拡散法を用いた。調製した結晶懸濁液を

マイクロ流路に導入し、マイクロウェルに効率良く結晶を捕捉するためのウェル構造を検討した。タンパク質の結晶は、細胞などと比較して粒度分布が広い。しかし、理想的な X 線回折データを取得するためには、1 個のウェルに 1 個の結晶が捕捉される必要がある。一方で、1 個のウェルに複数の結晶が捕捉された場合は、複数の結晶由来の回折データが取得され、解析・データ処理が困難になる場合がある。そこで、異なる直径を有するマイクロウェルを集積化したマイクロデバイスを作製し、ウェルの直径が結晶の捕捉効率に与える影響を調査した。その結果、今回用いたモデルタンパク質においては、直径 100~150 μm のウェルが最も測定可能なウェル数が多いことが分かった。また、一度ウェルに捕捉された結晶は、洗浄操作やリガンド溶液をマイクロ流路に導入しても、ウェルから漏れ出ないことが確認された。これらの結果から、マイクロデバイスへの結晶の固定およびタンパク質・リガンド複合体の同時調製を達成することができた。

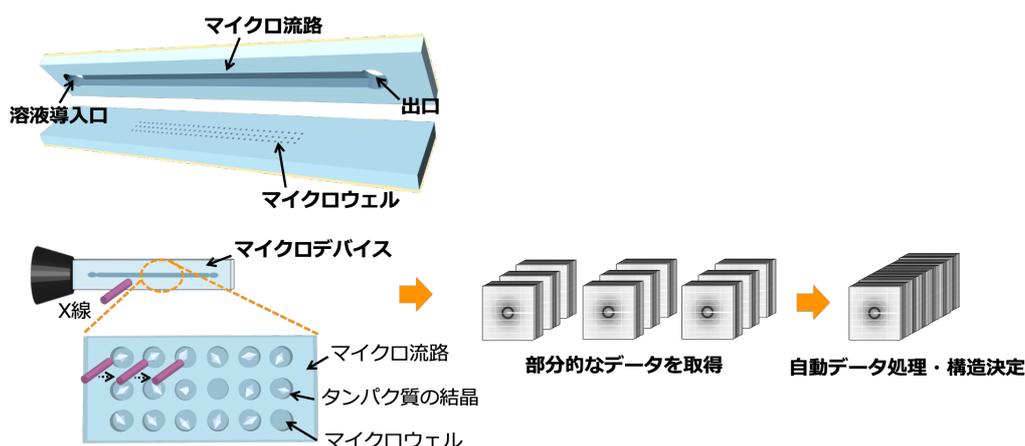


図 1 開発したマイクロデバイスと測定法の概略

(2) データ解析法の確立とタンパク質-リガンド複合体の構造解析への応用

開発したマイクロデバイスを用いて、連続的な X 線回折データの取得およびデータ解析法の確立に取り組んだ。本デバイスはマイクロウェルに結晶を固定させているため、ビームラインの制御ソフトで X 線の照射位置を変えながら測定することによって、連続的な X 線回折データの取得が可能であった。また、手動による結晶の交換作業が不要であるため、本デバイスを用いることによって、測定スループットの改善に成功した。一方で、本測定法では、1 個の結晶から 20 度分の X 線回折データを取得し、測定する結晶を変えて (X 線照射位置を変えて) さらに 20 度分の X 線回折データを取得する。そのため、何個の結晶を測定すれば、従来の 1 個の結晶から 360 度分の回折データを取得する方法と同程度の分解能・完全性でタンパク質の立体構造を決定できるかを明らかにする必要があった。また、複数の結晶から X 線回折データを取得する場合、照射される X 線に対して、理想的には結晶はランダムな配向面でデバイスに固定されている必要がある。測定原理を考えると、固定された結晶の配向面に偏りがある場合は、完全な立体構造を決定するために必要な結晶数が増加する。そこで、X 線回折実験から、本デバイスを用いた測定において、何個の結晶がタンパク質の立体構造を決定するために必要となるかを検証した。リゾチームおよびソーマチンを用いて評価した結果、10 個以上の結晶を測定すれば、2 Å 以上の高分解能で立体構造を決定することができた。また、X 線に対する結晶の配向面はランダムであり、本測定において X 線の照射角度やデータ処理は、従来の測定法と同様の条件・方法で問題ないことが確認された。さらに、リゾチーム、ソーマチンのそれぞれのタンパク質において、測定する結晶数が増えるほど、分解能および X 線回折データの完全性が向上することが分かった。これらの結果から、本測定法は、従来の測定法と同程度の分解能および精度でタンパク質の立体構造を決定できることが明らかとなった。

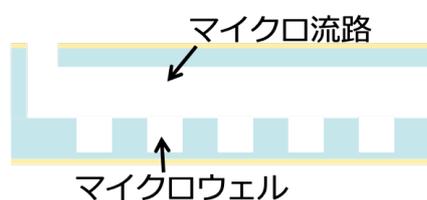
次に、本デバイスのタンパク質・リガンド複合体の立体構造解析への応用を試みた。図 2 に本デバイスを用いた、タンパク質・リガンド複合体の調製法を示す。マイクロデバイスに結晶懸濁液を導入する直前に、脱気処理を行った。PDMS は、ガス透過性が高く、空気を溜め込む性質がある。そのため、脱気処理を行うことで、結晶懸濁液のマイクロ流路への導入が容易となる。脱気処理後、マイクロ流路に沈殿剤溶液を導入した。その後、流路入口に結晶懸濁液を滴下し、流路出口からマイクロピペットを用いて、流路内の溶液を少しずつ吸引した。吸引した溶液は、再度、流路入口に戻し、この操作を複数回繰り返した。出口から流路内の溶液を吸引することによって、結晶が流路内に流入し、自然沈降によってマイクロウェルに捕捉される。結晶を捕捉後、沈殿剤を導入して、ウェル外に存在する不要な結晶を洗浄し、リガンド溶液を導入した。従来法では、1 個ずつ結晶をリガンド溶液に浸漬することで、タンパク質・リガンド複合体を調製する。そのため、タンパク質・リガンド複合体の立体構造を室温条件で測定する場合は、この調製操作

と測定を複数回行う必要があった。一方で、本法では、結晶の捕捉およびリガンド溶液の導入の操作のみで、複数の結晶に対してタンパク質・リガンド複合体の調製が可能である。モデルタンパク質として用いた、リゾチーム、ソーマチン、トリプシンのリガンド複合体構造の解析を試みた。その結果、全てのタンパク質において、リガンドとの複合体構造を室温条件下で決定することができた。得られた立体構造は、従来の測定法と同程度の分解能および精度であり、本測定法のタンパク質・リガンド複合体構造解析への応用が可能であることが実証された。トリプシンの場合は、8種類のリガンド複合体の構造を決定でき、その中で6種類のリガンドについては、これまでに報告されていない新規構造であることを確認した。

これらの結果から、本研究で開発したマイクロデバイスおよび室温条件下での X 線結晶構造解析法は、タンパク質・リガンド複合体の立体構造を迅速・簡便に決定できる新たな手法になると考えられる。今後、マイクロデバイスへのウェルの集積密度や結晶の捕捉効率をさらに向上できれば、X 線自由電子レーザーによるタンパク質の立体構造解析への応用も可能である。これによって、微小な結晶しか得られないタンパク質やタンパク質の動的な構造変化の過程を解明できる可能性があり、構造生物学分野へパラダイムシフトを起こすことで、我が国の創薬研究の加速に貢献できると考えられる。

断面図

① 脱気



② 結晶懸濁液導入



③ 流路洗浄



④ タンパク質・リガンド複合体調製

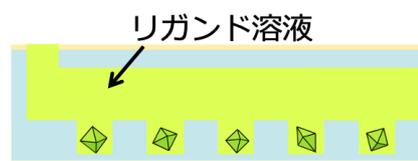


図2 マイクロデバイスを用いたタンパク質・リガンド複合体調製

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Reo Takeda, Masatoshi Maeki, Sho Ito, Go Ueno, Kunio Hirata, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Masaki Yamamoto, Manabu Tokeshi	4. 巻 2019
2. 論文標題 HIGH-THROUGHPUT X-RAY CRYSTALLOGRAPHY BASED ON THE PROTEIN CRYSTAL ARRAY	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Micro TAS 2019	6. 最初と最後の頁 191-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masatoshi Maeki, Sho Ito, Reo Takeda, Go Ueno, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Masaki Yamamoto, Manabu Tokeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Room-temperature crystallography using a microfluidic protein crystal array device and its application to protein-ligand complex structure analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9072-9087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0sc02117b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masatoshi Maeki, Shohei Yamazaki, Reo Takeda, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Real-Time Measurement of Protein Crystal Growth Rates within the Microfluidic Device to Understand the Microspace Effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 17199-17206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.0c01285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 真栄城正寿
2. 発表標題 マイクロデバイスによるタンパク質の立体構造解析
3. 学会等名 PAI-NET マーケットトレンドセミナー「マイクロフルイディクスの実用化」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真栄城正寿, 竹田怜央, 伊藤翔, 上野剛, 平田邦生, 石田晃彦, 谷博文, 山本 雅貴, 渡慶次学
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いたタンパク質-リガンド複合体構造解析
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reo Takeda, Masatoshi Maeki, Sho Ito, Go Ueno, Kunio Hirata, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Masaki Yamamoto, Manabu Tokeshi
2. 発表標題 HIGH-THROUGHPUT X-RAY CRYSTALLOGRAPHY BASED ON THE PROTEIN CRYSTAL ARRAY
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田怜央, 真栄城正寿, 伊藤翔, 上野剛, 平田邦夫, 石田晃彦, 谷博文, 山本雅貴, 渡慶次学
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いたタンパク質-リガンド複合体構造解析のハイスループット化
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2019年夏季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田怜央, 真栄城正寿, 伊藤翔, 上野剛, 平田邦夫, 石田晃彦, 谷博文, 山本雅貴, 渡慶次学
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いたX線結晶構造解析の高速化とリガンドスクリーニングへの応用
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真栄城正寿
2. 発表標題 機能集積化マイクロ化学デバイスの開発と医薬分野への展開
3. 学会等名 2020年度 日本化学会北海道支部奨励賞 受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田怜央, 真栄城正寿, 伊藤翔, 上野剛, 石田晃彦, 谷博文, 山本雅貴, 渡慶次学
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いたタンパク質結晶の室温複合体構造解析
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム学会 第42回研究会(CHEMINAS42)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 舟久保 智瑛, 真栄城 正寿, 伊藤 翔, 上野 剛, 石田 晃彦, 谷 博文, 山本 雅貴, 渡慶次 学
2. 発表標題 常温X線結晶構造解析のためのマイクロデバイスの開発
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------