

令和元年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14499

研究課題名(和文) タンパク質の微結晶アレイによる構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of Protein 3D Structure Analysis Method Using Microcrystal Array

研究代表者

真栄城 正寿(Masatoshi, Maeki)

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の立体構造情報は、タンパク質の機能解明や創薬において重要である。タンパク質の立体構造は、X線結晶構造解析によって決定されているが、結晶化制御と高品質なタンパク質結晶の作製は、立体構造解析のボトルネックである。本研究では、マイクロデバイスの微小空間がタンパク質の結晶化・結晶成長に与える影響の解明と結晶化空間による結晶化制御法の確立を行なった。結晶化空間の深さが20 μm以下の場合、タンパク質の特定の結晶面が基板に対して特異的に配向することが分かった。また、配向した結晶を用いて連続的にX線結晶構造解析を行った結果、1.5 Åの分解能で構造解析することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マイクロデバイスの結晶化空間がタンパク質の結晶化挙動、結晶成長に与える影響を明らかにし、配向制御したタンパク質による連続的なX線結晶構造解析法を開発した。本法では、10 μmの厚みの結晶から連続的にX線回折データを取得し、タンパク質の立体構造を決定することができた。これによって、膜タンパク質など結晶の大型化が困難なターゲットへの応用が期待できる。膜タンパク質は、創薬の代表的なターゲットタンパク質であり、本法によって微結晶の構造解析を加速することができれば、ライフサイエンス分野に大きな貢献を果たすことができる。

研究成果の概要(英文)：Three-dimensional (3D) protein structure analysis provides significant information for understanding the protein function and drug development. However, controlling protein crystallization process and preparation of the high-diffraction quality protein crystal are bottleneck of the 3D protein structure analysis. In this study, we investigated the effect of micro space on the protein crystallization and crystal growth behavior. In addition, we developed the methodology for controlling protein crystallization using the micro space. In the case of 20 μm depth crystallization chamber, the (1 1 0) face of lysozyme crystal was oriented parallel to the microfluidics device substrate. We carried out sequential X-ray diffraction measurement using lysozyme crystals arrayed into the microfluidics device and determined lysozyme structure at 1.5 Å resolution.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロデバイス タンパク質 立体構造解析 X線結晶構造解析 放射光

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造解析は、タンパク質の機能解明やタンパク質と基質の相互作用の解明において重要である。特に近年では、タンパク質の立体構造情報に基づく薬剤分子設計が広く利用されており、抗 HIV 薬をはじめとして、世界中で新薬の開発競争が繰り広げられている (G. Sliwoski *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, **66**, 334, 2014)。これまでに立体構造が決定されたタンパク質の約 80%は、X 線結晶構造解析によって構造決定されている。近年では、2008 年と比較して、1 年間にタンパク質構造データベース (PDB) に登録される立体構造データ数は、世界全体で 2 倍に増加している。今後、世界中で繰り広げられている研究競争で我が国が優位に立つためには、これまでの技術では構造解析が不可能であったタンパク質の結晶であっても立体構造を決定できる、より高度な測定技術の開発が不可欠である。

タンパク質の立体構造は、主に X 線結晶構造解析によって決定されているが、タンパク質の結晶化には、膨大な数の結晶化条件スクリーニングが不可欠であり、立体構造解析のボトルネックとなっている。この課題を解決するために、マイクロデバイスを用いたタンパク質の結晶化条件スクリーニングに関する研究が報告されている (L. Li and R. F. Ismagilov, *Annu Rev Biophys*, **39**, 139, 2010.)。マイクロデバイスは、1 条件あたり数~数十 nL のサンプル消費量で、ハイスループットに結晶化条件の探索が可能であり、さらに、析出した結晶をデバイスから取り出すことなく、オンデバイスで X 線結晶構造解析することができる (M. Maeki *et al.*, *Anal Chem.*, **87**, 4194, 2015)。

これまでに申請者は、マイクロデバイスの微小な結晶化空間がタンパク質の結晶化・結晶成長挙動に影響を与えることを見出した (M. Maeki *et al.*, *Chem Eur J*, **20**, 1049, 2014; M. Maeki *et al.*, *CrystEngComm*, **18**, 7722, 2016.)。結晶化空間の深さが 50 μm のマイクロデバイスでは、従来法と同様な結晶成長挙動であったのに対し、深さが 10 μm の結晶化空間では、得られる結晶の結晶成長挙動や結晶形状が変化する現象が見られた。特に、従来法や 50 μm の結晶化空間では針状結晶が得られるタンパク質であっても、深さが 10 μm のマイクロデバイスでは、X 線を照射しやすいプレート状の結晶が得られており、X 線結晶構造解析の高速化が期待された。一方で、どの程度の結晶化空間サイズが、タンパク質の結晶化制御に必要となるかは明らかになっていない。また、マイクロデバイス中の結晶成長プロセスを測定する方法が限られているため、空間サイズによる結晶成長の違いは未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、微小な結晶化空間がタンパク質の結晶化・結晶成長に与える影響の解明を目的とした。また、微小空間での結晶化挙動、結晶成長プロセスを制御し、数十 μm の微結晶を用いたタンパク質立体構造解析への応用に取り組んだ。これまでに報告されているタンパク質の結晶化制御法としては、宇宙空間のような微小重力場、磁場などの特殊な環境を利用した研究がある (A. Nakamura *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 22127, 2016.)。このような結晶化挙動の変化は、対流の抑制効果や磁場配向効果などが要因として考えられているが、詳細なメカニズムは解明されていない。また、前述した結晶化環境は、容易に実現できるものではなく、汎用性は高くない。そのため、空間サイズだけでタンパク質の結晶化制御を行い、微結晶によるタンパク質の立体構造解析法が確立できれば、創薬分野で重要な膜タンパク質のように、微結晶しか得られないタンパク質であっても X 線結晶構造解析が可能となり、タンパク質の立体構造情報を利用した創薬や難病の治療法の確立など、幅広いライフサイエンス分野に大きく貢献できる。

3. 研究の方法

(1) 空間サイズによる結晶化・配向制御効果の解明

申請者らは、空間サイズによって、結晶化・配向性制御ができることを報告したが、どの程度の空間サイズが結晶化制御に必要となるかは明らかになっていない。そこで、結晶化空間を 10~50 μm まで、10 μm ずつ変えたデバイスを作製した。作製したデバイスを用いて結晶化実験を行い、結晶化挙動が変化する結晶化空間のサイズの解明に取り組んだ。また、結晶成長に影響を与える結晶化空間サイズを明らかにしたあと、顕微ラマン分光法、および、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡法を用いた結晶成長のその場観察を行った。

(2) オンデバイス X 線結晶構造解析系の確立と微結晶を用いた X 線結晶構造解析

オンデバイス測定では、デバイス部材からの散乱がバックグラウンドとして検出される。そこで、低バックグラウンドなマイクロデバイスを作製する。X 線透過率が高く散乱が少ないシクロオレフィンポリマー (COP) とポリジメチルシロキサン (PDMS) を部材としたマイクロデバイスを作製した。デバイスの厚みは、X 線透過率に影響をあたえるため、厚みを変えたマイクロデバイスを作製し、高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリー (PF) で評価を行った。デバイスの最適化後、10~50 μm の結晶化空間で作製したタンパク質結晶の X 線結晶構造解析を行った。

(3) デバイスに集積化した結晶化ウェルによる X 線結晶構造解析法の検証

(1) と (2) の結果をもとに、空間を精密に制御したマイクロデバイスによる微結晶のための X 線結晶構造解析法について検証した。1 個のマイクロデバイスに 20 個以上のウェルを集積化・アレイ化した。集積化したウェル中にタンパク質結晶を用いて、連続的・ハイスループットに X 線結晶構造解析するためのデバイス設計を行った。

4. 研究成果

(1) 結晶化空間がタンパク質の結晶化・結晶成長に与える影響の解明

モデルタンパク質としてリゾチームを用いて、結晶化空間がタンパク質の結晶成長に与える影響の解明に取り組んだ。マイクロデバイスは、一般的なソフトリソグラフィーによって作製した。作製したマイクロデバイスを図 1 に示す。まず、従来法であるマイクロバッチ法で結晶化を行った結果、ウェル底面への結晶面の配向など、微小空間で観察されている現象は生じないことを確認した (サンプル体積: 2 μL)。また、深さが 50 μm の結晶化ウェルでも同様に基板底面へのリゾチーム結晶の配向は確認されず、以前の報告した結果の再現性を確認した (サンプル体積: 20~30 nL)。一方で、結晶化空間の深さが 10 μm の場合、リゾチーム結晶の (1 1 0) 面がマイクロデバイスの基板に対してほぼ 100% の確率で配向した。そこで、結晶が配向する空間条件を明らかにするために、20、40 μm の深さの結晶化ウェルを有するマイクロデバイスを用いてリゾチームの結晶化実験を行った。その結果、深さ 20 μm の結晶化空間においてリゾチームの (1 1 0) 面が基盤に配向する確率は、90% 以上となった。一方で、深さ 30 μm の結晶化空間では、約 60% の (1 1 0) 面の配向率であり、これは深さ 50 μm の結晶化空間の結果とほぼ同じ値であった。これらの結果から、20 μm より狭い結晶化空間であれば、結晶化挙動・結晶成長を空間サイズのみで制御できることが明らかとなった。

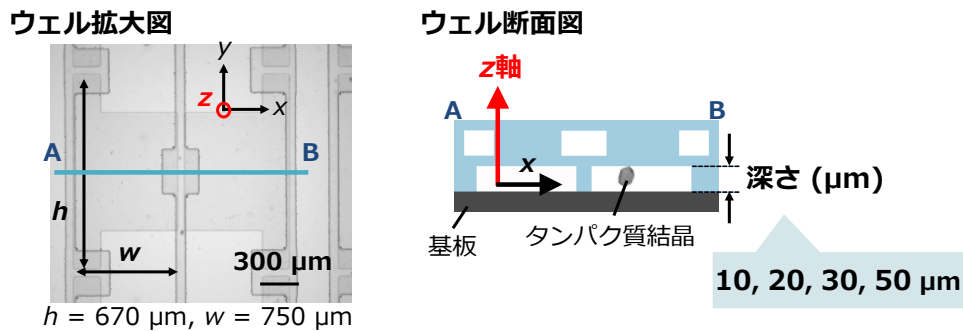


図 1 作製したマイクロデバイス

(2) マイクロデバイス内の結晶成長の実時間測定

微小空間でのリゾチームの結晶成長挙動の違いを定量的かつ詳細に解析するため、顕微ラマン分光、および、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡法による実時間測定系を確立した。リゾチームは、1550 cm^{-1} 付近 (アミド基由来)、および、2900 cm^{-1} 付近 (C-H 結合由来) にのラマンピーク

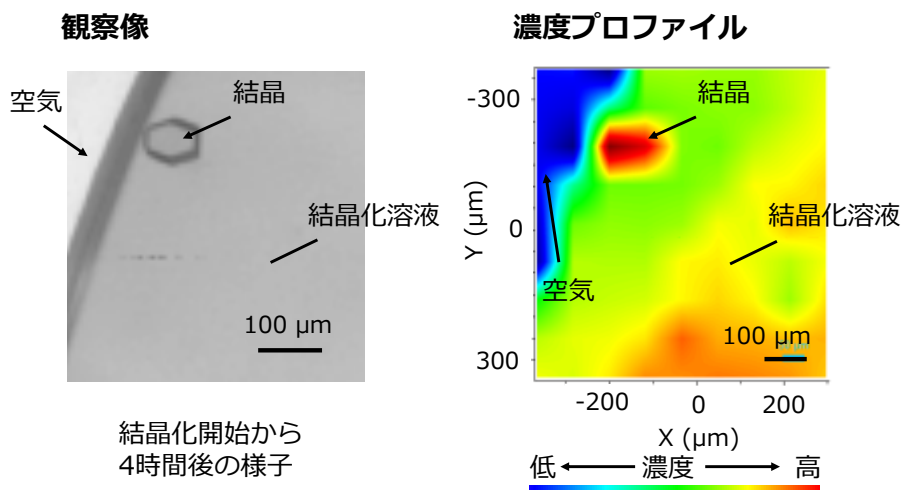


図 2 マイクロデバイスの結晶化ウェル中のタンパク質濃度プロファイル

を示す。最もシャープなピークは、 2900 cm^{-1} 付近であるが、PDMSのラマンピークと重なってしまうため、本測定系ではデバイスの部材をガラスに変更し、結晶成長過程のマイクロデバイスのウェル中の濃度プロファイルを作成した。図2に顕微ラマン分光によるリゾチームの濃度プロファイルを示す。

図2の濃度プロファイルから、結晶近傍はリゾチームの濃度が低濃度（緑色）であり、結晶から離れるにつれて高濃度領域（黄色→橙色→赤色）に変化していることが分かった。この濃度勾配領域が、リゾチームが希薄な枯渇層と考えられ、枯渇層は少なくとも結晶周辺 $300\text{ }\mu\text{m}$ 地点まで拡大していた。この結果から、結晶化から数時間で結晶近傍は低過飽和状態になっていることが明らかになった。次に、マイクロデバイスの深さが異なる結晶化ウェル中のリゾチーム結晶の成長速度の違いを定量化するために、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡法によって、深さ方向の結晶成長速度を測定した。測定の結果、深さ $30\text{ }\mu\text{m}$ の結晶化ウェル内でのリゾチームの結晶成長速度は、 536 nm/min であった。一方で、深さ $20\text{ }\mu\text{m}$ の結晶化ウェル内の結晶成長速度は、 42.2 nm/min であり、 $30\text{ }\mu\text{m}$ の結晶化ウェルの10分の1の成長速度であることが明らかになった。この結果から、深さ $20\text{ }\mu\text{m}$ の結晶化空間では、低下飽和状態で結晶成長していることが定量的に示された。これらの結果から、深さ $20\text{ }\mu\text{m}$ の結晶化空間では、空間場が狭いため自然対流が抑制された環境であり、結晶成長において結晶近傍に枯渇層が広がる。その結果、生成した結晶は、低過飽和状態で穏やかに結晶成長すると考えられる。

(3) オンデバイス X 線結晶構造解析と集積化マイクロウェルによる X 線結晶構造解析の検証

マイクロデバイスに配向したタンパク質の単結晶による連続的な X 線結晶構造解析法の確立に取り組んだ。1 個のマイクロデバイスに 6 個～24 個のウェルを集積化した結晶化デバイスを作製した。結晶化・抗凍結処理を行った後に、PF の BL17A で X 線回折実験を行なった。その結果、ウェルの深さに関わらず、集積化したウェル中のリゾチーム結晶を連続して、 1.5 \AA 程度の分解能で構造解析することができた。この結果から、ウェルを集積化したマイクロデバイスによって、 $10\text{ }\mu\text{m}$ の厚みのタンパク質結晶を連続して測定可能な解析法を確立することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. M. Maeki, S. Yamazaki, A. Ishida, H. Tani, and M. Tokeshi, Microscopic Real-time Measurement of Protein Crystal Growth in Microfluidic Devices, *Micro Total Analysis Systems* 2018, 査読あり, (2018) 1279-1280.
2. 真栄城正寿, 宮崎真佐也, 渡慶次学, マイクロデバイスを用いたタンパク質の立体構造解析, *ぶんせき*, 査読なし, 12, (2017) 575-580.

〔学会発表〕（計 10 件）

1. Masatoshi Maeki, Shohei Yamazaki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, Microscopic Real-time Measurement of Protein Crystal Growth in Microfluidic Devices, 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018), Kaohsiung (Taiwan), 2018 年 11 月 14 日
2. 竹田怜央, 山崎翔平, 真栄城正寿, 石田晃彦, 谷博文, 渡慶次学, 微小空間におけるタンパク質結晶成長のリアルタイム計測, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 38 回研究会, 札幌市民交流プラザ, 2018 年 10 月 31 日
3. Yuri Moratelli Piske, Masatoshi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, Development of DLD devices for Serial Femtosecond crystallography, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 38 回研究会, 札幌市民交流プラザ, 2018 年 10 月 31 日
4. Masatoshi Maeki, Shohei Yamazaki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, In-situ Measurement of Growth Rate of Protein Crystal in Microfluidic Devices, ISMM 2018 (The 10th International Symposium on Microchemistry and Microsystems), Busan (Korea), 2018 年 6 月 20 日 (
5. 招待講演) 真栄城正寿, マイクロデバイスを用いたタンパク質の結晶化と構造解析への応用, 第 21 回 XFEL 構造生物ミーティング, 理化学研究所, 2018 年 3 月 22 日
6. 山崎翔平, 真栄城正寿, 石田晃彦, 谷博文, 渡慶次学, 微小空間内におけるリゾチームの結晶化制御および晶析挙動解析, 化学系学協会北海道支部 2018 年冬季研究発表会, 2018 年 1 月 16 日
7. (招待講演) 真栄城正寿, マイクロデバイスによるタンパク質の結晶化制御と構造解析への応用, 2017 年 第 1 回水和ナノ構造研究会, 2017 年 10 月 11 日
8. 山崎翔平, 真栄城正寿, 石田晃彦, 谷博文, 渡慶次学, 微小空間によるタンパク質結晶化制

御と分光法を用いた晶析挙動解析，化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 36 回研究会，
桐生市市民文化会館，2017 年 10 月 4 日

9. (招待講演) 真栄城正寿, マイクロ・ナノデバイスによる生体分子のオンチップ測定, 第 10 回レーザー学会「レーザーバイオ医療」技術委員会, 北海道大学, 2017 年 9 月 8 日
10. (招待講演) 真栄城正寿, マイクロ・ナノデバイスを用いた生体分子測定法の開発と応用, 第 35 回九州分析化学会若手の会 夏季セミナー, 2017 年 7 月 29 日

〔図書〕(計 1 件)

1. M. Maeki and M. Tokeshi, 2019. Medical and Biological Applications Using Microfluidic Devices, Chapter2: Microfluidics Technologies and Platforms for Protein Crystallography, 27-51, Springer-Nature.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。