

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650015

研究課題名(和文) X線結晶構造解析による阻害剤探索を自動化するためのゲルコーティング技術の開発

研究課題名(英文) Development of the gel coating technique for the automation of the inhibitor search by the X-ray crystal structure analysis

研究代表者

田中 勲 (TANAKA, Isao)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：70093052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：X線結晶学は、リガンド結合の詳細を観察できることから、構造に基づく薬剤探索にとって非常に重要な技術となっている。しかしながら、X線によるリガンドスクリーニングでは、通常、ソーキング実験をマニュアルで行うので、非常に多くのリガンドをスクリーニングする程のスループット性はない。本研究では、ゲルとインクジェット技術を使ってタンパク質結晶をマウントループに固定する技術を開発し、ループにマウントした結晶をそのままリガンドの含まれる溶液に浸けることを可能にした。この新しい技術は薬剤探索の自動化に使うことができる。

研究成果の概要(英文)：X-ray crystallography is an important technique for structure based drug discovery, mainly because it is the only technique that can reveal whether a ligand binds to the target protein as well as where and how it binds. However, ligand screening by X-ray crystallography involves a crystal-soaking experiment, which is usually performed manually. Thus, the throughput is not satisfactory for screening large numbers of candidate ligands. In this study, a technique to anchor protein crystals to mounting loops by using gel and inkjet technology has been developed; the method allows soaking of the mounted crystals in ligand-containing solution. This new technique may assist in the design of a fully automated drug-screening pipeline.

研究分野：X線結晶学，構造生物学

キーワード：X線結晶解析 創薬 ゲル リガンドソーキング SBDD

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析プロジェクトの進展により、遺伝子情報をもとにした創薬に世界的な期待が集まっている。中でも創薬ターゲットの立体構造をもとに、それを阻害する薬剤を開発する SBDD (Structure Based Drug Discovery) 法は、従来の方法と比べ、構造を見ながらの合理的な薬剤設計が可能であることから、ガン、生活習慣病、感染症、ウイルス病などに対処する新規薬剤の迅速な開発につながると期待されている。X線結晶構造解析法は、SBDD法のための中心的な研究手段であるが、数十万を超えるリガンドをスクリーニングするためのハイスループット性は十分ではない。したがって、創薬スクリーニングのための X線結晶構造解析法のさらなるハイスループット化が切望されている。

我々は、X線結晶構造解析の長い複雑な工程を全自動化することを最終目標として研究を続けている。これまでに実現した主な技術には、非修飾蛋白質結晶を使った構造解析 (S-SAD法) のためのマウント法 (*Acta Cryst. D61*, 1013-1021 (2005)), 全自動精密化プログラム (LAFIRE) (*Acta Cryst. D62*, 189-196 (2006)) などがある。近年は、産業用ロボットを用いた結晶凍結システムを構築して、放射光施設の回折データ収集につなげることも成功している。数年前からは、開発した技術を創薬に応用するための技術開発を開始し、薬剤候補化合物の結合した蛋白質の構造を全自動で決定するソフトウェアシステム LAFIRE_FBDD を開発すると共に、構造をもとに、より機能の高い阻害剤を設計するために、蛋白質結晶を反応場とした合成展開 (*In-crystal Chemical Ligation*) 技術を開発した (*J. Appl. Cryst.* **43**, 1329-1337 (2010))。しかし、リガンドスクリーニング工程の中で最も時間のかかるソーキング実験については、これまで手つかずであったが、後述するようにゲルを利用することで自動化が可能ではないかとの発想から、本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、リガンドソーキング実験の自動化を可能にするための必須の技術として、結晶を結晶マウント治具 (通称ループ) に固定するための技術を開発し、それを利用して、リガンドソーキング実験を、ロボットアームを利用した自動化過程に組み込む。

リガンドソーキング実験が自動化されることにより、全自動リガンドスクリーニングが可能になり、創薬スクリーニングが飛躍的に加速される。当然ながら、この手法は、生化学的な阻害剤結合実験、抗凍結剤の探索、重原子置換体の探索にも利用できる。

リガンドソーキングは、X線回折実験に使う小さな結晶 (0.1mm 程度) を結晶化ディッシュから拾い出し、リガンドの入った結晶化溶液に一定時間浸す工程である。一定時間浸

した後に再度取り出して回折実験に使用する (図 1)。この精妙な作業は、通常、すべて手作業で行われる。本研究はこの工程をロボット化するための研究である。ループで拾った結晶をロボットアームに固定し、それ以後は、回折データを収集するまで、すべて自動的に行うことを計画している。この場合の難関は、「いかにして結晶を落とすことなく、リガンド溶液に浸漬するか」である。我々のアイデアは、ゲルを使って結晶をループに固定するというものである。ゲルは、結晶を固定することができるだけでなく、同時に、リガンドを含む溶液を自由に浸透させる。しかし、小さな結晶に影響を与えることなく、ゲルコーティングすることは容易ではない。蛋白質結晶は物理的な衝撃や化学的な変化によって簡単に崩壊する。さらに蛋白質結晶は、乾燥によっても崩壊するので、それを防ぐためにすべての実験は穏やかな条件で短時間に行う必要がある。

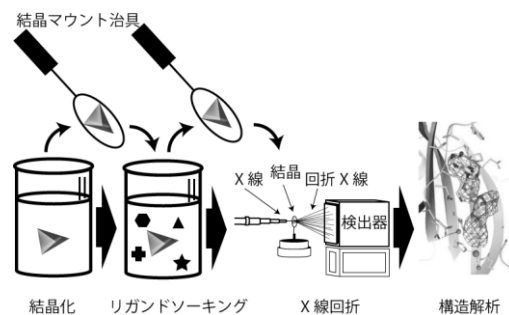


図 1. X線によるリガンドソーキング実験

蛋白質の結晶は、pH、塩濃度、沈殿剤濃度、温度の変化によって容易に崩壊する。そのため結晶化に使用した溶液を結晶の周りに保持したまま結晶を固定する必要がある。ゲルを用いることで結晶周りの緩衝溶液を保持したまま、物理的な衝撃を与えずに結晶を扱う事が可能となる。しかし、ゲル固定剤の組成が結晶に影響を与えてはならない。更に、乾燥を防ぐためにゲル化は数十秒以内に完結させる必要がある。この厳しい条件の全てに適合するゲルとして、Tetra-PEG ゲルの利用を計画している。このゲルは PEG 骨格で末端に官能基を持った構造のゲル素材であり、結晶に損傷を与えにくい。

ゲル化による結晶への影響を限りなく軽減するためのアイデアとして、結晶化溶液に増粘剤を添加して結晶を保護する手法を考えている。増粘剤は、塗布直後のゲル溶液の混合による結晶化溶液の濃度変化を抑制する事で、結晶を保護する効果が期待される。

ゲルを用いて結晶を結晶化治具 (ループ) に固定するためには、ゲル溶液を薄く均一に結晶の周りに塗布する必要がある。また、塗布する液量も非常に少量 (0.1µl 程度) であることから分注器による扱いは非常に困難である。そこで、本研究では、少量の溶液を正

確に飛翔させる事が出来るインクジェット技術を用いたゲル溶液の扱いに関する手法を開発する。

結晶の乾燥を防ぐために、すべての操作は数十秒以内に終了させる必要がある。そのために結晶と治具の位置を画像認識技術により把握し、XYZ ステージを制御して適切な位置へ移動させた後に、インクジェットによって結晶を治具ごとゲルで覆う。この一連の作業を完成させるためには、ゲルの調製、蛋白質試料の調製、X線結晶構造解析実験、ハードウェア開発、ソフトウェア開発と幅広い技術を必要とする。我々の研究室は、この全てに答えることができる。

ゲルによる結晶の固定化が成功した場合に期待できる成果は、リガンドソーキングの自動化に留まらない。重原子置換体のスクリーニングや、クライオ（極低温）環境で水の結晶の成長を防ぎ良質な測定を行うための抗凍結溶液の条件検討の効率化、ゲルで覆われている事から DMSO 等による結晶にダメージを与えやすい試薬からのダメージの軽減、脱水による結晶の質の改良など、様々な局面での活用を期待できる。

3. 研究の方法

(1)ゲル素材の検討

我々は既にアルギン酸ナトリウムをはじめ、数々のゲル素材を検討してきた。その中で本実験の用途に最も適したゲル素材（ゲル化反応が結晶に影響を与えず、かつ数十秒以内でゲル化するもの）として、Tetra-PEG ゲルを見出している。Tetra-PEG ゲルは四股の PEG 骨格の末端に官能基を付加した構成のゲルである。末端の官能基が異なる 2 種類のゲル素材を混合する事で自発的に重合しゲルを形成する（図 2）。

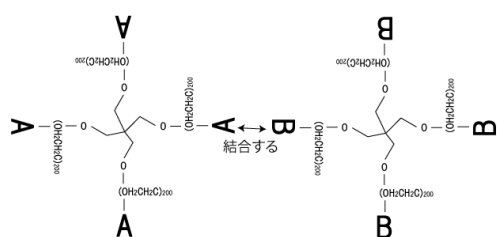


図2. Tetra-PEG ゲルの構成

この Tetra-PEG ゲルの骨格長、骨格形状、官能基、ゲル溶液濃度の最適な組み合わせを検討する。官能基 A, B には幾つかの組み合わせがあり、現在有力視している組み合わせは、「マレイミドとチオール」及び「カルボキシル基とアミン基」の組み合わせである。これらの組み合わせの中から、蛋白質や結晶化溶液との相互作用を検討して、最適な組み合わせを選択し、利用する。

(2)インクジェット技術の確立

結晶とマウント治具（ループ）をゲルで固

定するためにはゲル溶液で結晶と治具の周りを均一に覆う必要がある。しかし、この時に扱うゲル溶液の量は非常に少量（0.1 μ l 程度）である。強い表面張力を持つ微量のゲル化溶液を正確に扱うのは、通常に分注器を使った操作では非常に困難である。そのため少量の溶液を正確に飛翔させる事が可能なインクジェット技術を応用する。インクジェットにより結晶に接触することなくゲル溶液を噴きかける事が可能である事から、物理的な衝撃を与えずに正確なコーティングができる。

これまでの研究で、インクジェット技術を用いて Tetra-PEG ゲル溶液の結晶への噴き付けが可能である事を確認している（図 3）。今後、結晶への影響を最小限に抑えるように最適化したゲル素材で、安定してゲル溶液の吐出ができるように各種パラメータの検討を行う。

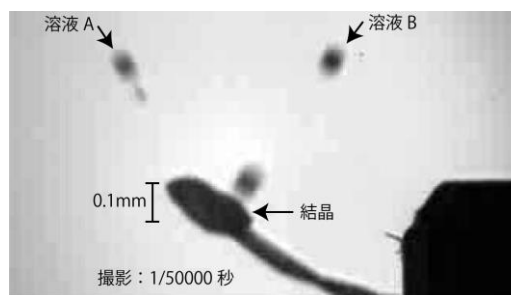


図3. インクジェットによるゲル溶液の添加

(3)増粘剤の素材検討

ゲル溶液による結晶損傷の可能性を軽減するために、結晶化溶液に増粘剤を添加する事で結晶を保護する手法を開発する。増粘剤を加えることで、ゲル化前のゲル溶液が結晶化溶液と混合し難くなるため、結晶化溶液の濃度変化が抑制される。増粘剤としては、例えば、ポリエチレンオキシド（PEO）などを検討する。PEO は蛋白質結晶作製時の沈殿剤や安定剤として頻りに利用される PEG と基本構造が同じであり、また、緩衝溶液に利用される多くの試薬とも干渉が少ない。PEO の他にポリビニルや多糖類の増粘剤も考慮し、結晶によって使い分ける。この増粘剤の適切な濃度と添加するタイミングの検討を行う。

(4)XYZ ステージの構築

インクジェット技術を用いて結晶周りにゲル溶液を噴き付けるためには、結晶を最適な位置に移動および回転させる必要がある。移動には XYZ ステージを利用する。回転機構は既に開発済みであり、パソコンからの命令でループを自由に回転することが可能になっている。この位置調整は、結晶サイズが 0.1mm 程度と小さい事から、非常に正確に行う必要がある。そのために XYZ ステージには高精度なものが求められる。

(5)画像認識プログラムの作成

結晶とマウント治具（ループ）の位置を自動的に認識して、正確な位置にゲルを吐出するためには画像認識技術を用いる。顕微鏡カメラによりループにマウントした結晶を撮影した画像が図4である。背景環境と照明のあて方の工夫により明瞭な画像を得ることが可能である。画像処理速度を高速化するために NVIDIA が提供するグラフィックボードを用いた並列性の高い演算処理を行う CUDA 技術を用いる。これにより瞬時に画像認識を行い、処理時間中に結晶が乾燥する事を防ぐ。

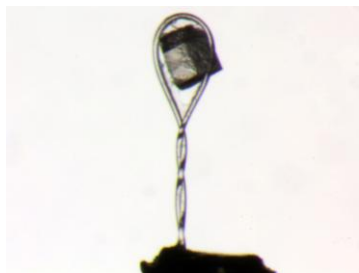


図4. 結晶と結晶マウント治具（ループ）

(6)システムの全体の組立

インクジェットによるゲルの吐出機構と、画像認識プログラム、XYZ ステージ、回転機構を連動させ、一つのシステムとして組み立てる（図5）。機械部品とソフトウェアを結合させるために中間部品としての制御回路やミドルウェアと呼ばれるソフトウェア群が必要となる。ハードウェア開発からソフトウェア開発まで、基本的に本研究室で一貫した開発を行い、必要に応じて外注する事で開発時間の短縮を計る。

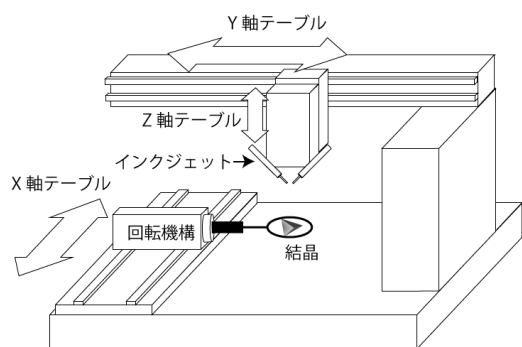


図5. システムの全体構成

(7)蛋白質結晶の作製

汎用性を高めるためには、多くの蛋白質結晶を使って検討する必要がある。標準試料としては、結晶化条件が確立しているニワトリ卵白リゾチーム、ウシ膵臓トリプシン、甘味蛋白質ソーマチン、放線菌由来糖異性化酵素、ウシ由来インスリン、木材腐朽菌由来キシラン分解酵素等の結晶の利用を予定している。また、本研究室において過去に構造解析した蛋白質の中から適当なものを選んで利用する。

(8)産業用ロボットへの組み込みとシステムの有用性の検証

本研究室では既に、産業用ロボットを使った結晶凍結システムを作製して利用している。構築したゲルによる結晶固定化装置は、このロボットシステムにつなぎ、実際に、自動的なリガンドソーキング実験を実施する。リガンドソーキングを行った結晶については、SPring-8 や Photon Factory などの大型放射光施設で回折データを収集して構造解析を行い、リガンドが結合した蛋白質の構造を見ることが可能であることを確認する。確認作業は可能な限り多くの蛋白質結晶において実施し、幅広い条件下で利用可能なシステムとなるよう調整を行う。

4. 研究成果

平成 25 年度は、Tetra-PEG ゲルの骨格長、官能基、ゲル溶液濃度の最適な組み合わせを検討し、官能基については、「マレイミドとチオール」の組み合わせ、骨格長は、粘度とゲル強度から判断して、繰り返し数にして 100 が最適であると決定した。インクジェットによるゲルの吐出機構と、画像認識プログラム、XYZ ステージ、回転機構を連動させ、一つのシステムとして組み立てた。この装置は、結晶を自動観察しながら XYZ ステージで最適な位置に動かして、インクジェット技術を用いて結晶周りにゲル溶液を吹き付ける機能を持っている。結晶とマウント治具の正確な位置にゲルを吐出するためには画像認識技術を用い、画像処理速度を高速化するためには、グラフィックボードを用いた並列性の高い演算処理を行った。

ゲル化を促進する触媒を使うことによって、ゲル化速度を上げてゲル化前の溶液による結晶のダメージを抑え、グラフィックスボードを使った高速演算処理によって結晶の形を認識するソフトを作り、ゲルを吹き付けるために結晶を空气中にさらす時間を 10 秒以内に抑えるなど、さまざまな困難に対処して、予定通りの装置を組み立てることができた。

平成 26 年度は、平成 25 年度に作製した結晶固定化装置を実際の結晶に適用して、結晶の安定性確認とリガンドソーキング実験を行った。汎用性を高めるためには、できるだけ多くの蛋白質結晶を使って検討する必要があるが、標準試料として結晶化条件が確立しているニワトリ卵白リゾチーム、ウシ膵臓トリプシンを利用し、さらに本研究室において過去に構造解析した CesZ、GatCAB を使用した（図6）。すべての結晶について、SPring-8 あるいは Photon Factory で回折データを収集して構造解析を行い、ゲル固定によるダメージが無い事を確認した。さらに、ニワトリ卵白リゾチーム、ウシ膵臓トリプシンについては、既知阻害剤がソーキングできることを確認した（図7）。その実験結果をまとめて論文として発表し、また SPring-8 に技術提供した。

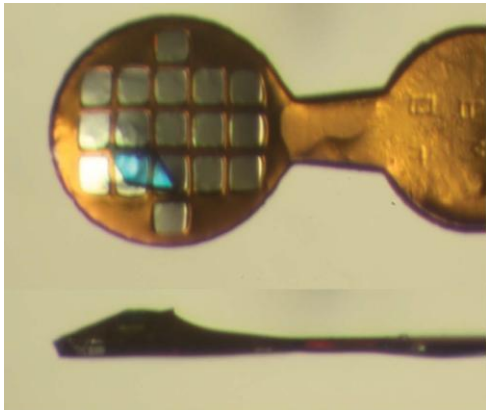


図6. 結晶マウントツールにゲルで固定した CesZ 結晶(結晶は染料 (Izit) で青色に染色してある)

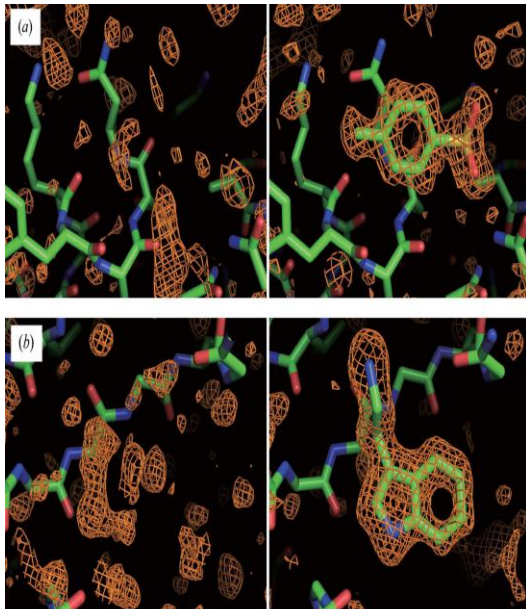


図7. ゲルで固定した結晶を使ったリガンドソーキングの結果. リガンド結合部位近傍の電子密度とリガンドの構造を示す. 左はソーキング前, 右はソーキング後, (a) リゾチーム結晶に p-トルエンスルホン酸を結合させたもの, (b) トリプシン結晶にトリプタミンを結合させたもの.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Akira Shinoda, Yoshikazu Tanaka, Min Yao and Isao Tanaka, Anchoring protein crystals to mounting loops with hydrogel using inkjet technology, *Acta Cryst.* **D70**, 2794-2799 (2014) 査読有
DOI: 10.1107/S139900471401476X

[学会発表] (計 2 件)

1. 篠田晃, 田中良和, 姚閔, 田中勲, インクジェットと親水性ゲルを用いた結晶固定法の開発, 平成 26 年度日本結晶学会年会, 2014 年 11 月 1-3 日, 東京大学農学部 (東京都文京区)
2. Akira Shinoda, Yoshikazu Tanaka, Min Yao, Isao Tanaka, Inkjet technology to anchor protein crystals to mounting loop with hydro-gel, 15th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM15), 2014 年 9 月 17-20 日, Universitat Hamburg (Hamburg, Germany)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法及びそのための装置

発明者: 田中勲, 篠田晃, 姚閔, 田中良和
(国立大学法人 北海道大学)

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許出願 PCT/JP2015/059332

出願年月日: 2015 年 3 月 26 日

国内外の別: 国外

[その他]

北海道大学 X 線構造生物学研究室

ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 勲 (TANAKA, Isao)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任教授

研究者番号: 70093052

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

姚 閔 (YAO, Min)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 40311518

(4)研究協力者

篠田 晃 (SHINODA, Akira)