

タンパク質 X 線構造解析の自動化

永井稔^{A)}、舟橋義聖^{A)}、平木雅彦^{B)}、渡部正景^{B)}、加藤龍一^{B)}、若槻壮市^{B)}

高エネルギー加速器研究機構

^{A)}技術部工作課、^{B)}物質構造科学研究所構造生物学研究センター

概要

近年、生体の最小単位であるタンパク質の機能と構造を解明するポストゲノムプロジェクトが活発化している。日本は DNA で 5.3% (2001/2/12 現在) [1] の貢献しかできなかった反省から、タンパク質では 30% を目標に、理化学研究所と関係大学研究機関等で解析を進めている。高エネルギー加速器研究機構 (KEK) は、後者の拠点としてタンパク質 X 線構造解析のための大学共同利用設備の基盤整備を実施しており、特に自動化に力を入れている。工作センターは結晶化システムと結晶装填システムの開発に参画しており、後者の一部であるクライオプロテクトン作製装置の開発では中心的な役割を果たしている。

1 緒言

1.1 背景

ポストゲノムプロジェクトに向け、2000 年 5 月高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 物質構造科学研究所に構造生物学グループが発足し、科学技術振興調整費「蛋白質 X 線結晶構造解析の高度化に資する基盤整備」が 2001 年より 3 年間で行なわれることになった。さらに 2002 年より、5 年間で 3000 種類の構造を解明する「タンパク 3000」プロジェクトがスタートし、2003 年 5 月には構造生物学研究センターが発足した。

これらの計画を実現するため、2001 年 10 月工作センターに自動化設備開発のための協力が依頼された。

1.2 開発要素

KEK で行なわれるタンパク質の構造解析は、タンパク質の発現、精製、結晶化、X 線回折データの取得、データ解析の 5 つの工程からなり、後者の 3 工程が大学共同利用設備の対象となる。データ解析については他大学で開発中であり、KEK は結晶化から X 線回折データの取得までの自動化設備を開発している。

自動化の実現には、結晶化システム、結晶装填システム、ビームラインシステム等の開発要素があり、工作センターは前者の 2 つのシステムに関わり、その中でも特に結晶装填システムの開発に参画している。

1.3 結晶装填システム

結晶装填システムは、大小 2 つの穴のペア (ウェル) を 96 個持ち、上面をプラスチックシールで密封された結晶化プレート (図 1) 上のウェル中の結晶化溶液に析出した数十~数十 μm の大きさのタンパク質の結晶を、サンプルホルダー (図 2) 先端の糸の輪 (ループ) に溶液の膜を張り、その中に移し、ループ

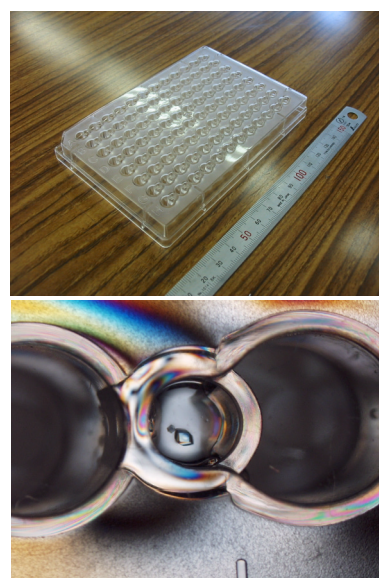


図 1. 結晶化プレート (上) とウェル中の溶液に析出したタンパク質の結晶 (下)

中の溶液を液体窒素温度で非晶質の固体となる溶液（クライオプロテクタント）に置換した後、液体窒素温度で凍らせ、液体窒素中の容器に保存するまでの作業を自動的にこなすシステムである。このシステムはシールカット装置、結晶ピックアップ装置、クライオプロテクタント作製装置、液体窒素温度保存装置、消耗品供給装置、各装置間の搬送装置からなる。

工作センターは、これら全ての装置の開発に参画しているが、本報告書においては工作センターが主体的に行なっているクライオプロテクタント作製装置の開発について報告する。

2 クライオプロテクタント作製装置

2.1 必要とされる機能の決定

結晶化システムと結晶装填システムは密接な関係（図3）にあり、この2つのシステムは近接した場所に設置する必要がある。また、その運用を検討する際は相互の関係を把握しておくことが必要である。

図3のような全体像とその中でクライオプロテクタント作製装置が担う作業内容を立案し、必要とされる4つの機能を定めた。

結晶化溶液はタンパク質溶液と沈殿剤の混合溶液であり、析出したタンパク質の結晶は沈殿剤の濃度変化に非常に敏感である。結晶化溶液の体積が $1\mu\text{l}$ と少ないため、室温の大気中では水や有機溶媒が蒸発し、濃度が高くなり、結晶が壊れてしまう可能性が高い。溶液の蒸発による濃度変化を緩和させるため、結晶化溶液からサンプルホルダーに結晶を装填する作業に入る前に、結晶化溶液に含まれる沈殿剤と同じ濃度の沈殿剤を追加する必要がある。これが1つ目の必要機能である。

X線回折実験の際、タンパク質の結晶はX線による励起で壊れるため、励起を抑える目的で液体窒素温度下で実験が行なわれる。結晶の存在条件としてその周囲には溶液が必要であるが、液体窒素温度下でこの溶液が結晶性の固体となると、X線回折の測定結果にこの溶液の結晶の回折パターンがノイズとして入ってしまい、タンパク質の結晶のデータと分離できない。また、結晶の3次元形状を得るため、結晶を1度づつ数時間かけて180度回転させた時のX線回折データを測定する

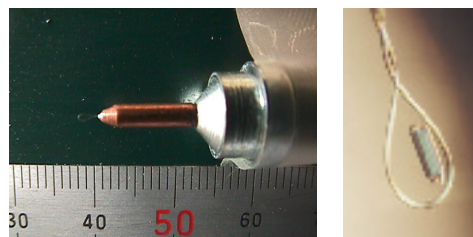


図2. サンプルホルダー（左）とループ中に装填された結晶（右）

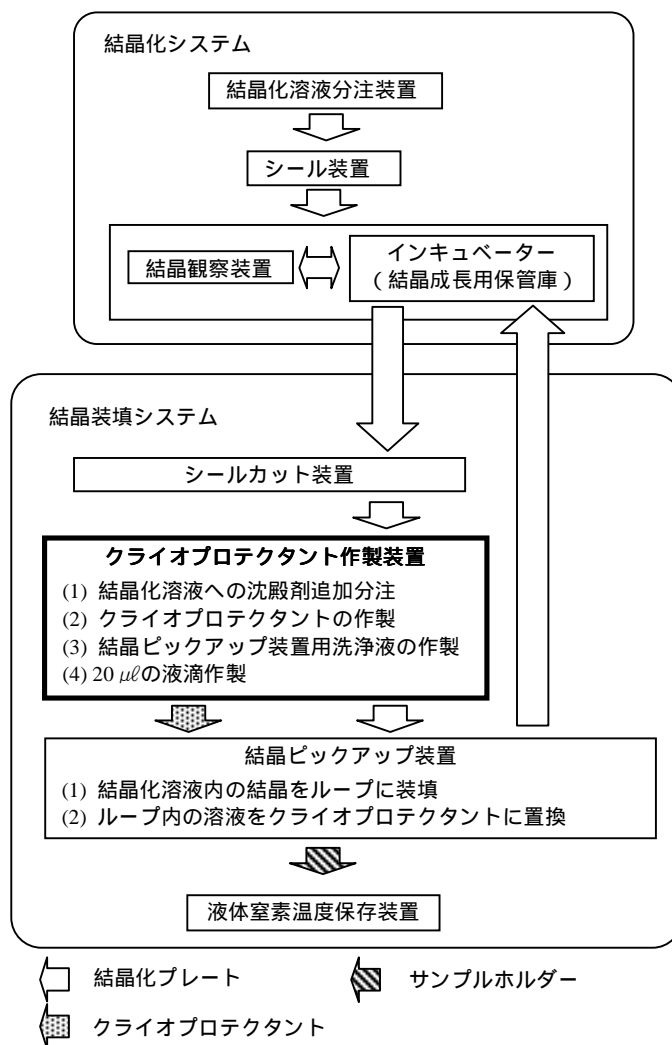


図3. 結晶化システムと結晶装填システムの関係

が、周囲の溶液が液体であった場合、重力により回転させている間に結晶の位置がずれてしまう可能性があるため、周囲の溶液は固体である必要がある。このため、結晶周囲の溶液には、液体窒素温度下で非晶質の固体であること、という条件が必要となる。さらに、結晶周囲の溶液を結晶化溶液からクライオプロテクタントに置換した際、結晶に壊れる・溶ける等の影響が出ないこと、という条件が必要とされる。このような条件を持つクライオプロテクタントと呼ばれる溶液を作製することが2つ目の必要機能である。

3つ目の必要機能は結晶ピックアップ装置のマニピュレータ洗浄溶液の準備である。

4つ目の必要機能は結晶ピックアップ装置内での作業を容易にするため、平板上にクライオプロテクタントと洗浄溶液の20 μ lの液滴を作製することである。

2.2 具体的手法の検討

クライオプロテクタント作製装置に必要な条件を明確にし、詳細な運用についての検討を行ない、結晶装填システム全体の運用方法を提案した。表1にはクライオプロテクタント作製装置から見て定義した4つのパターン(モード1~4)を示してある。

次に各動作モードにおける詳細な作業工程案を作成し、要求される機能と性能、使用する消耗品の量と時間を明確にし、最適な装置構成について検討した。中心となる機構は、溶液を分注、混合し、新たな溶液を作製するための分注器である。時間や結晶ピックアップ装置との関係から必要とされる機能の内、20 μ lの液滴の作製機能だけを別にし、分注器を2台とした。この結果、各装置での作業内容の単純化、溶液の蒸発による濃度変化、クライオプロテクタントを準備する時間、結晶装填システム全体のレイアウト等の点が改善できた。

表1. 運用方法のパターン

名称	対象結晶化法	運転状態	沈殿剤の準備形態	結晶化ドロップ追加沈殿剤	結晶1個に対するクライオプロテクタント作製数	対象結晶の最大数	最大連続処理ウェル数	沈殿剤の使用可能容量
モード1	Sitting Drop	自動	なし	結晶化プレート内母液	非凍結最低濃度1個	3	96	80 μ l
モード2	Sitting Drop	自動	96 ディープウェルプレート	別途用意したもの	任意濃度5段階5個以下	5	96	1000 μ l
モード3	Sitting Drop	手動	エッペンドルフチューブ1個	別途用意したもの	任意濃度5段階5個以下	5	1	1000 μ l
モード4	Hanging Drop	手動	エッペンドルフチューブ1個	別途用意したもの	任意濃度5段階5個以下	5	1	1000 μ l

結晶化法には Sitting Drop 法と Hanging Drop 法がある。

2.3 クライオプロテクタント作製のための分注器

通常分注器の性能は分注した溶液の量の再現性で評価され、カタログの仕様にはこの値が記載されている。しかし、タンパク質の結晶への影響面から、クライオプロテクタント作製装置の場合は作製された溶液の濃度が重要であり、分注量の絶対値の公差がどれだけの範囲に収まっているかの情報が必要となった。分注する溶液には水、水よりも粘度の低いアルコール、粘度の高いグリセリン等がある。したがって、粘度の違う溶液に対して、絶対量を正確に分注できることが課題であった。

粘度の異なる溶液の分注において、絶対量の精度を上げるためには、個々の溶液の粘度に応じた吸引排出スピードの制御とその分注方法が要求される。しかし、市販品では、これらを溶液に応じて変化させることができない。したがって、上記の要求に応じる国内メーカーを調査した。

分注器には溶液に接触する先端部分(チップ)が交換可能なディスプレイチップ方式と交換できないものがある。前者は種々の溶液を扱う時、チップを交換することで溶液の純度を保つことができる利点を持

つ。しかし、分注精度がプラスチック成型製品であるチップ形状の精度に大きく依存するため、微量において精度を出すことが難しい。後者は溶液に接触する部分の形状が常に一定であるため、分注精度が良い利点を持つ。しかし、種々の溶液を扱う場合、先端を洗浄して使用するため、溶液の純度と洗浄する時間の点で問題がある。クライオプロテクタント作製装置では、種々の溶液を使用するため、前者を採用することとした。

国内のディスポーザブルチップ方式の分注器を製造しているメーカーで 1 μl の分注が可能であるメーカー数社に、水 19 μl とグリセリン 1 μl を混合して 20 μl の溶液を作製する実験を、実験手順を指定して依頼し、各工程での重さの変化により作製された溶液の濃度を評価した。実験は 10 回行ない、その結果必要とされる性能を満足する可能性のあるメーカーに

分注作業の詳細を伝え、各メーカーから作製可能な分注装置についての案を入手した。メーカーの提案と必要な条件、作業工程を検討し、機能と性能の仕様を確定した。また、全体的なレイアウトと搬送装置の関係から装置の外形を決定した。

2.4 20 μl の液滴作製用分注器

溶液の蒸発による濃度変化の問題から、20 μl の液滴作製用分注器は独立して存在せず、結晶ピックアップ装置に付属する形で作製することになった。

分注器を搬送するアクチュエータは種々のものが市販されており、利用することが可能である。しかし、パーソナルコンピュータを使用し、ユーザーが作成したソフトウェア上から遠隔操作が可能な状態で分注器のみを製造し、販売するメーカーは国内にはなく、外国資本のメーカーである D 社が販売しているのみであった。この製品を試して見た結果、粘度が水レベルの溶液であれば問題なく分注できるが、粘度の高いグリセリンは分注することができず、改造等の対応には応じて頂けなかった。また、結晶化システムとは異なるチップを使用するため、消耗品の統一の点でも問題があった。

この課題解決の目的で E 社に KEK からニーズを申し入れ、E 社が商品として開発を行なうことになった。現在までに 2 度デモ機を使用した実験を行ない、粘度の高いグリセリンでも問題なく分注できる良い結果を得ている。20 μl の分注作業には容量 200 μl のチップを使用するが、空きスペースが大きく、空気が時間的な遅延要素として働く。このため、このスペースが小さくなる特別なアダプタを開発し、改善した。

3 結言

構造生物学研究センターの行なっている自動化設備の開発は開発途中であり、上記に述べたクライオプロテクタント作製装置に使用する分注器も 2004 年 2 月末にメーカーから納められる予定である。納入後は計画案に基づいて検収のための基本項目試験を行なう。

参考文献

- [1] 理化学研究所, “ヒトゲノムのドラフトシーケンス解析結果を公表”, Press Release Homepage (<http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/press/2001/010212/>), 2001 年 2 月 12 日.

表 2. 分注実験結果

	水 [μl]	混合液 [μl]	グリセリン 濃度 [%]	濃度の幅 [%]
A 社	18.76 ~ 18.93	19.766 ~ 20.164	4.683 ~ 6.121	1.438
B 社	18.474 ~ 19.356	19.708 ~ 20.518	4.497 ~ 6.335	1.837
C 社	測定せず	19.791 ~ 20.187	3.997 ~ 5.879	1.881

C 社のグリセリン濃度は水を 19 μl と仮定して算出。