

結晶のハンドリングの実例

千田美紀

高エネルギー加速器研究機構

近年では Uni-puck などのカセットを用いてあらかじめ結晶を凍結し、ロボットで結晶をマウントして回折データ収集を行うケースが多くなってきた。その理由としては、検出器の読み取りスピードが以前より格段に早くなり手動での結晶マウントがデータ収集の律速段階になってしまうこと、ロボットの使用により自動測定やリモートアクセスが行える利点が出てきたこと、Photon Factory の BL-1A のようにゴニオメーター周りが He チャンバーで覆われたため人がアクセスできなくなったことなどが挙げられる。以前は結晶化プレートをビームラインに持ち込んで手動で結晶をマウントしデータ収集を行いながらソーキング条件を最適化することも多かったが、ロボットを用いた測定が主流となった現在では効率良く各々の結晶の持つ可能性（回折能）を最大限に引き出し、良いデータを収集するために昔とは異なる工夫が必要になってきた。凍結した結晶は元には戻せず条件をその場で変えられないため、クライオプロテクトANTや化合物などへのソーキング条件のスクリーニングや最適化を行う場合にはソーキング条件にバリエーションを持たせて結晶を用意すべきである。グリセロールなどの最も一般的なクライオプロテクトANTを用いて目標とする分解能までの回折が得られない場合には 10–20 種類程度のクライオプロテクトANTから各々のタンパク質結晶に最適なものを探索し、時には良いものを組み合わせて用いることが有効である(1–3)。結晶を手動でマウントするしかなかった時代と比較してロボットによる結晶マウントにより迅速に多くの条件を試せるようになったため積極的にロボットを利用したい。しかしながら、ロボットを利用するためには結晶をあらかじめ Uni-puck に詰めておく必要があり、Uni-puck に結晶を詰める段階から保管してデータ測定を行うまでのどこかの過程で結晶に霜が付着してしまう可能性があるという問題が残されている。最近、我々は様々な条件で Uni-puck に詰めた結晶を用意し、どのような場合に霜が付着する傾向が高いかを調べるための実験を行った。また、良いデータを収集するには結晶を凍結する段階での結晶のハンドリング（ループの選択、すくい方、ループに触れないように中央にのせる等）に細心の注意を払う必要がある。結晶のハンドリング一つで結晶から生じる分解能が大きく変わってしまうため、初心者はビームタイム以外の時にも結晶のハンドリングを練習すべきであると考えている。（私も新たな結晶のハンドリングを行う場合には、1 日目は腕慣らし（練習）、2 日目から本調子でというように各々の結晶に慣れる努力をしています。）また、ソーキング実験の基本となる標準母液を作成して、その溶液をベースにクライオプロテクトANTや化合物を加えることでできる限り結晶にダメージを与えないことも必要である。本発表では、結晶をハンドリングする際に注意すべき点とあわせてクライオプロテクトANTへのソーキング条件を最適化することで結晶の質を大きく改善し結晶構造解析に成功したいいくつかの実例についても紹介したい。

References

1. M. Sendat *et al.* Screening of cryoprotectants and the multistep soaking method. *Advanced methods in Structural Biology*. Springer in press.
2. M. Senda *et al.* Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality fro protein crystals. (2016) *Crystal growth & Design* 16, 1565–1571.
3. K. Sumita *et al.* The Lipid Kinase PI5P4K β is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis. (2016) *Molecular Cell* 61, 1–12.