

新規タンパク質結晶マウント法の開発

北谷友也^{1,4}, 杉山成^{1,4}, 松村浩由^{1,3,4}, 吉川洋史^{1,4}, 牧祥^{1,4}, 村上聡^{2,3,4},
安達宏昭^{1,3,4}, 井上豪^{1,3,4}, 高野和文^{1,3,4}, 森勇介^{1,3,4}

¹大阪大学 大学院工学研究科, ²大阪大学 産業科学研究所, ³株式会社創晶, ⁴JST-CREST



www.so-sho.jp

Introduction

X線結晶構造解析において、タンパク質結晶の品質は、回折反射の分解能や強度に大きく影響する。しかし、タンパク質結晶はその含水率の高さ（通常40～70%）などから、構造的に非常に脆く、物理的接触によって品質の劣化を生じやすい。



タンパク質結晶の取り扱いについては現在、ループ状のマウント器具を用いた移動および測定が主流である。この方式では左図の様にタンパク質結晶を周囲の溶液ごと掬い取り、表面張力でループ内に結晶を保持した状態に出来ることから

脆いタンパク質結晶に対する非接触での保持が利点として挙げられる。しかし、その一方で、ループ内の溶液の非弾性散乱によるバックグラウンドの上昇や結晶にダメージを与えずに取り出すには熟練の技術が要求されるなどの不都合な点も存在する。

そこで我々は、より簡便かつ安定して結晶の取り出し、および保持が可能な新規マウント法として、**粘着剤で直接結晶を捕獲するマウントデバイス**を開発した。

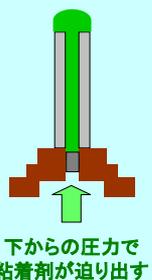
粘着剤によるタンパク質結晶のマウント法



チップ

本体

製造：(有)シバタシステムサービス



下からの圧力で粘着剤が迫り出す



*先端径 0.2 mm

Experiments

粘着剤で直接結晶を捕獲するにあたり、接触および粘着剤成分による結晶へのダメージを考慮しなくてはならない。そこで、**Lysozyme**, **Thaumatococcus**, **Elastase**, **Glucose Isomerase (GI)**, **Trypsin**, **Family 1.3 lipase from Pseudomonas sp. MIS38 (PML)** の結晶を用いて、粘着剤の結晶に対する影響を、X線回折測定(XRD測定)から得られたデータの統計値より確認した。

<測定装置> X線源 : Ultrax-18 (Cu対陰極)
検出器 : R-AXIS IV++
測定電圧、電流 : 50 kV, 100 mA
ビーム径 : 0.3mm

<測定条件> 距離 : 75 mm
振動角 : 1°
温度 : 100 K

Acknowledgement

・宇治市
・京都府(京都府中小企業研究開発等
応援事業費補助金)
・京都リサーチパーク株式会社
・NEDO(産業技術研究助成事業)

Results and Discussion

【新手法】

<Lysozyme>

沈殿剤 : 1.0 M Sodium chloride, 抗凍結剤 : 25% glycerol

$P4_32_12$
Resolution 50.00 – 1.46
(1.51 – 1.46)
a = b = 78.7 Å, c = 36.7 Å
I/σ(I) 61.2 (7.14)
 R_{merge} 4.6 (31.8)
Mosaicity 0.32°



【従来法】

$P4_32_12$
Resolution 50.00 – 1.68
(1.74 – 1.68)
a = b = 78.5 Å, c = 37.0 Å
I/σ(I) 17.4 (1.81)
 R_{merge} 3.6 (30.2)
Mosaicity 0.64°



<Thaumatococcus>

沈殿剤 : 1.0 M Potassium Sodium tartrate, 抗凍結剤 : 15% (v/v) ethylene glycol

$P4_12_12$
Resolution 50.00 – 1.50
(1.55 – 1.50)
a = b = 57.9 Å, c = 150.2 Å
I/σ(I) 36.3 (6.7)
 R_{merge} 7.2 (35.5)
Mosaicity 0.43°



$P4_12_12$
Resolution 50.00 – 1.43
(1.48 – 1.43)
a = b = 57.9 Å, c = 150.2 Å
I/σ(I) 16.7 (1.6)
 R_{merge} 4.9 (30.6)
Mosaicity 0.46°

<Elastase>

沈殿剤 : 0.05 M Sodium sulfate, 抗凍結剤 : 30% glycerol

$P2_12_12_1$
Resolution 50.00 – 1.43
(1.48 – 1.43)
a = 50.0 Å, b = 57.7 Å, c = 74.4 Å
I/σ(I) 56.2 (13.4)
 R_{merge} 2.9 (9.7)
Mosaicity 0.32°



$P2_12_12_1$
Resolution 50.00 – 1.43
(1.48 – 1.43)
a = 50.0 Å, b = 57.7 Å, c = 74.4 Å
I/σ(I) 30.1 (11.2)
 R_{merge} 1.6 (6.0)
Mosaicity 0.32°

<GI>

沈殿剤 : 22% (v/v) MPD, 0.2M Magnesium chloride

$I222$
Resolution 50.0 – 1.43
(1.48 – 1.43)
a = 92.8 Å, b = 98.8 Å, c = 102.6 Å
I/σ(I) 54.0 (7.4)
 R_{merge} 3.1 (19.8)
Mosaicity 0.33°



$I222$
Resolution 50.00 – 1.43
(1.48 – 1.43)
a = 92.7 Å, b = 98.4 Å, c = 102.6 Å
I/σ(I) 27.1 (5.2)
 R_{merge} 2.1 (10.2)
Mosaicity 0.29°

<Trypsin>

沈殿剤 : 30% (w/v) PEG4000, 0.2M Ammonium sulfate

$P2_12_12_1$
Resolution 50.00 – 1.48
(1.53 – 1.48)
a = 54.7 Å, b = 58.3 Å, c = 66.6 Å
I/σ(I) 19.8 (1.9)
 R_{merge} 2.9 (26.5)
Mosaicity 0.50°



$P2_12_12_1$
Resolution 50.00 – 1.43
(1.48 – 1.43)
a = 54.7 Å, b = 58.3 Å, c = 66.6 Å
I/σ(I) 27.8 (3.13)
 R_{merge} 2.2 (17.5)
Mosaicity 0.48°

<PML>

沈殿剤 : 10% (w/v) PEG20000, 0.2M Calcium acetate, 抗凍結剤 : 20% (v/v) ethylene glycol

$P2_1$
Resolution 50.00 – 2.1
(2.18 – 2.1)
a = 49.0 Å, b = 84.1 Å, c = 87.0 Å
β = 96.1°
I/σ(I) 20.7 (6.9)
 R_{merge} 9.6 (27.4)
Mosaicity 0.60°



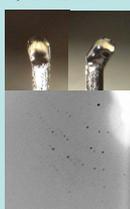
$P2_1$
Resolution 50.00 – 2.15
(2.23 – 2.15)
a = 49.4 Å, b = 84.3 Å, c = 87.1 Å
β = 96.3°
I/σ(I) 8.9 (2.7)
 R_{merge} 8.2 (32.0)
Mosaicity 0.65°

上記の結果より、分解能および Mosaicity において、ループと粘着剤の間に大きな差が見れないことから、**接触及び粘着剤成分によるタンパク質結晶の大きな品質劣化は発生していない**と考えられる。また、本実験ではサイズが 0.1 ~ 1.0 mm 内の結晶に対して 溶液からの取り出しとXRD測定中の保持が可能であった。



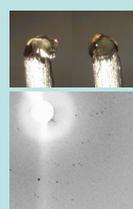
* 現在、以下のサンプルをはじめとして種々のタンパク質結晶に対して粘着剤の影響を確認中である。

1) 多剤性排出トランスポーター AcrB



$R32$
Resolution 50.0 – 7.55
a = b = 142.4 Å, c = 517.3 Å
I/σ(I) 12.6
 R_{merge} 9.9
Mosaicity 0.840°

2) 炭酸固定酵素 PEPK



$P2_12_12_1$
Resolution 50.0 – 8.9
a = 154.7 Å, b = 167.6 Å, c = 243.4 Å
I/σ(I) 6.5
 R_{merge} 21.3
Mosaicity 0.736°