HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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 ： リガンドスクリーニングの自動化へ向けた取り組み [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	篠田, 晃
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11551号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57299
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Akira_Shinoda_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　審　査　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏　名　　篠　田　晃

	主　査	教　授	姚　閔
審査担当者	副　査	教　授	龔　剣萍
	副　査	特任教授	佐々木　直樹
	副　査	特任教授	田　中　勲
	副　査	准教授	田中　良和

学　位　論　文　題　名

Anchoring protein crystal to mounting loop with hydro-gel by inkjet technology
-An approach toward automated ligand screening-
（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
−リガンドスクリーニングの自動化へ向けた取り組み−）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

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、構造を見ながらの合理的な薬剤設計が可能になることから，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線結晶構造解析は, SBDD 法を実施する上での中心的技術である．ターゲットタンパク質の結晶にリガンド候補化合物を結合させ，その構造解析を行うことでリガンド候補化合物をスクリーニングすることができる．X線結晶構造解析法では候補化合物がターゲットタンパク質に結合するか否かだけでなく，結合の詳細を原子分解能で可視化できることから，合理的な薬剤設計が可能になる．

タンパク質結晶にリガンド候補化合物を浸透させる実験（通称ソーキング実験）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．しかし，放射光技術の発展により X 線回折データは分単位で収集できるようにな

ったのに対し，リガンドソーキングは、未だ手作業で行われており，多種類の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．このため数十万を超えるような多種類のリガンド候補化合物の X 線によるスクリーニングは実現しておらず，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．

リガンドソーキングのハイスループット化にはタンパク質結晶の扱いを自動化する事が不可欠である．そのために本研究ではタンパク質結晶を結晶マウント治具に固定し、治具ごとロボットアームで扱う方法による自動化を試みた．結晶を一度治具に固定する事により多数の結晶のソーキング実験もロボットを用いて同時に管理する事が可能になるため，大規模なスクリーニングパイプラインの構築への道が開ける．

結晶の固定には結晶への影響が少なく，かつ結晶へのリガンドの浸透を妨げない素材が必要である．この条件を満たす素材として本研究では親水性のゲルを選択した．しかし，小さなタンパク質結晶に影響を与えることなく，結晶を固定化してロボットアームでの取り扱いを可能にする事は容易ではない．なぜなら，タンパク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ためである．さらにタンパク質結晶の約５０％（体積比）は，結晶化溶液によって占められているために，結晶を空気中に晒すと乾燥が進み，結晶は速やかに崩壊する．これらを防ぐために，すべての実験は穏やかな条件でかつ短時間（十数秒以内）に行う必要がある．そのために本研究では，結晶と治具の位置を画像認識技術により瞬時に把握し，XYZ ステージを制御して適切な位置へ移動させた後に，結晶の周りにインクジェットを用いてゲル溶液を塗布する事で結晶保持治具に結晶を固定する技術を開発した． またインクジェットでの吐出が可能な固定素材として Tetra-PEG ゲルが有効である事を見いだした．さらに Tetra-PEG ゲルのうちマイケル付加反応を利用した素材はゲル化速度が非常に早く、結晶の乾燥を招く前に結晶を器具に固定する事が可能である事を実証した．

以上，本研究では，ソーキングから X 線回折データ収集までを全自動ロボット化し，真にハイスループットなリガンドスクリーニングを実現するための技術，すなわち回折実験に使われる 0.1mm のタンパク質結晶を固定してロボットアームで取り扱うことができるようにするための技術の開発に成功した．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，結晶性を上げるための結晶脱水実験にも利用できる．

本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり，よって審査員一同は，申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認めた．