



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11551
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59842
Type	doctoral thesis
File Information	Akira_Shinoda.pdf



博士論文

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
ーリガンドスクリーニングの自動化へ向けた取り組みー

篠田 晃

北海道大学大学院理学院 生命科学専攻

2014 年 9 月

目次

1	概要	4
2	序論	5
2.1	創薬	7
2.2	X線結晶構造解析	8
2.2.1	タンパク質結晶	9
2.2.2	ソーキング実験	10
2.3	本研究の目標	11
2.3.1	結晶固定に伴う困難	11
2.4	本研究の応用範囲	11
2.5	参考文献 1	12
3	実験	13
3.1	タンパク質の結晶化	13
3.1.1	蒸気拡散法による結晶化	13
3.1.2	LYSOZYME の結晶化	13
3.1.3	TRYPSIN の結晶化	14
3.1.4	GATCAB の結晶化	14
3.1.5	CESZ の結晶化	15
3.1.6	EF2D2 の結晶化	15
3.2	結晶の保持手段の検討	16
3.2.1	既存の結晶保持及び移動手段	16
3.2.2	親水性ゲルによる固定	16
3.3	結晶固定に利用出来るゲル素材の検討	17
3.3.1	各種のゲル素材とタンパク質結晶	17
3.3.2	TETRA-PEG ゲル	19
3.3.2.1	Tetra-PEG ゲルへの pH の影響	21
3.3.2.2	手動での結晶固定	22
3.3.2.3	増粘材による保護	23
3.3.2.4	増粘材の結晶化に及ぼす影響	29

3.4	ゲル溶液塗布の自動化の検討	31
3.4.1	超音波加湿器を利用したゲル溶液の霧散	31
3.4.2	噴霧器を利用したゲル溶液の散布	31
3.4.3	インクジェットを用いたゲル溶液の塗布	32
3.4.3.1	結晶の位置調整装置	34
3.5	インクジェットを利用した結晶固定試験	36
3.5.1	インクジェットでのゲル溶液の吐出と結晶の固定	40
3.5.2	インクジェット利用時の課題	43
3.6	インクジェットの安定動作条件の検討	43
3.6.1	インクジェットヘッドへの溶液の充填	45
3.6.2	インクジェット先端の溶液の乾燥対策	45
3.6.3	液滴の運動エネルギーと空気抵抗	46
3.7	結晶のソーキング用器具の開発	46
3.7.1	プレートを用いたソーキング器具	46
3.7.2	チップを用いたソーキング器具	48
3.8	結晶をゲルで固定するシステムの開発	50
3.8.1	システム構成	50
3.9	機械機構	53
3.9.1	制御回路	53
3.9.1.1	パソコンと制御回路間の通信	54
3.9.1.2	マイコンのプログラム	55
3.9.1.3	インクジェットの制御	62
3.10	ソフトウェア構成	64
3.10.1	画像処理による結晶の3次元認識	64
3.10.1.1	照明の調整	64
3.10.1.2	2D画像から3Dモデルの構築	66
3.10.1.3	CUDAによる高速化	67
3.10.2	画像処理により構成されたモデル	68
3.10.1	複数のプログラム言語間の融合	68
3.11	完成したシステム	70
4	結果	71
4.1	結晶の固定	71

4.1.1	LYSOZYME 結晶の固定	73
4.1.2	TRYPSIN 結晶の固定	74
4.1.3	GATCAB 結晶の固定	75
4.1.4	CESZ 結晶の固定	75
4.1.5	結晶固定の結晶性への影響	77
4.2	固定結晶のソーキング	79
4.2.1	LYSOZYME 結晶のソーキング	79
4.2.2	TRYPSIN 結晶のソーキング	80
4.2.3	ゲル固定とソーキングへの影響	80
5	考察	81
5.1	結晶固定法の重要性	81
5.2	結晶の損傷	82
5.3	インクジェットでの吐出	83
5.4	リガンドソーキングパイプラインへの応用と今後の展開	84
5.5	参考文献 2	85
6	結論	86

1 概要

タンパク質の活性を阻害または促進する化合物の設計は、X 線結晶構造解析で求められる立体構造情報を利用する事で効率的に進める事が出来る。その過程では候補化合物の結合したタンパク質結晶の回折データ測定を行ない、化合物とタンパク質の結合状態を見ながら化合物の改良と測定を何度も繰り返し行う。これにより創薬候補となりうるリガンド化合物を得る。

しかし、放射光施設の発展により X 線回折データを分単位で収集できるようになったが、結晶にリガンド候補化合物を結合させる実験（通称ソーキング実験）は未だ手作業で行われており、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いない。

本研究では、回折実験に使われる 0.1mm サイズのタンパク質結晶を親水性ゲルによりマウントループに固定する技術を開発した。これにより溶液中でも結晶を治具に保持したまま扱う事が可能となり、ソーキング実験を自動化する道が開けた。開発した技術ではマウントした結晶の顕微鏡 CCD カメラ画像から結晶の 3 次元形状を瞬時に求め、インクジェット装置を用いて、結晶固定のための最適な位置に約 0.2nl のゲル溶液を吐出する。高速な制御システムを約 1 秒でゲル化する 2 液混合型の親水性ゲルの組み合わせにより 5 種類のタンパク質の固定を達成した。また、トリプシンとリゾチーム結晶については既知の阻害剤を使ったソーキング実験にも成功した。

2 序論

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である。

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。

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。それは、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、結晶を空气中に晒すと乾燥が進み、僅かな乾燥によっても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に行う必要がある。結晶に損傷を与えない固定素材を見つけ出す事が最初の課題であり、次に結晶が乾燥しない短時間のうちに結晶の固定に必要な箇所を認識し、固定素材を塗布する手法の考案が必要であった。

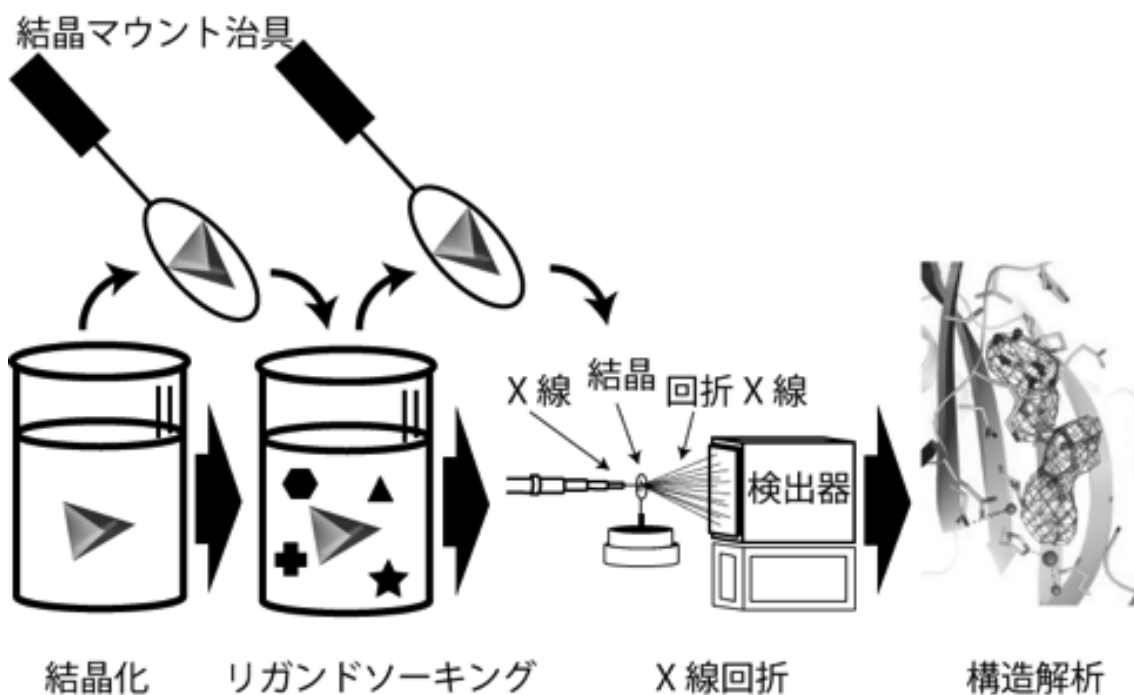


図 1 X線によるリガンドソーキング実験の概要

結晶化溶液から取り出した結晶をリガンドが含まれるソーキング溶液に一定の時間浸した後に結晶を凍結し X 線回折データを取得する。取得した回折データを計算処理することでタンパク質とリガンドの立体構造を得る。

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に、回折実験に使われる 0.1mm のタンパク質結晶を固定し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開発を行った。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(Harold W. Wyckoff et al.,1967; M. Sugahara et al.,2010)、結晶性を上げるための結晶脱水実験(Seiki Baba et al.,2013)にも利用できる。

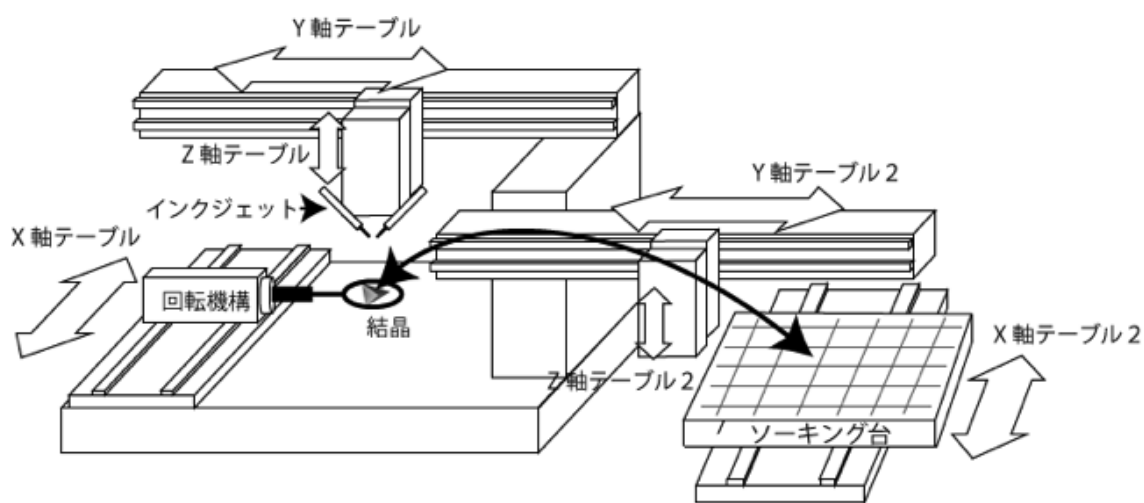


図 2 目標とするシステムの全体像

結晶の任意の位置にゲル溶液を塗布するための XYZ 軸ステージと固定素材の塗布装置

2.1 創薬

現在、ガン、生活習慣病、感染症、ウイルス病などの各種の病気に対する治療手法の一つに低分子化合物が利用されている。特にターゲットとする部位（多くの場合はタンパク質の活性部位）に強く特異的に結合する化合物は薬剤の有用な候補となりうる。

この化合物の発見方法には大きく分類して二つのアプローチがある。一つ目に多種の化合物を一つ一つ生体試料（細胞や個体）に作用させ、その効果や活性を測定しながら化合物を選別する方法である。この手法では大量の化合物候補および生体試料に対し自動化されたシステムで次々に測定を行うことから high

throughput screening 法 (HTS 法) と呼ばれている。二つ目にターゲットとするタンパク質と化合物の立体構造から理論的に化合物を設計していく手法がある。この手法は structure based drug design 法 (SBDD 法) と呼ばれている。

HTS 法は従来から行われており、特に製薬会社では大規模なスクリーニングパイプラインを用いて網羅的に測定が行われている。しかし、コストの高さとヒット率が非常に低い事が課題である。また、用意した化合物ライブラリの中に有用な化合物が必ずあるとは限らず、確率的な要素が高いため安定した創薬候補化合物の検出を行えない問題がある。

SBDD 法では標的タンパク質と結合する化合物 (リードフラグメント) を探索する事から始まる。リードフラグメント化合物の検出は比較的ヒット率が高く、複数のリードフラグメントを検出する事が期待される。HTS との違いはリードフラグメントの構造情報から理論的に化合物の改良を行える点にある。

本研究は SBDD 法の化合物検出のハイスループット化を実現するために手法の開発を行った。

2.2 X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析では測定対象であるタンパク質サンプルに強力な X 線を照射し、回折 X 線を測定する。測定した回折 X 線の強度を元にタンパク質の電子密度を計算する事が可能であり、それによりタンパク質の立体的な形を内部に至るまで高い分解能で得る事が可能である。この時に測定すべき回折 X 線の強度は微弱であるためサンプルを結晶状態にしてそれを測定する。結晶内で配置の揃った無数のタンパク質分子の回折 X 線が合成される事で測定可能な強度にまで達する。

近年ではシンクロトロン放射光施設の目覚ましい発展により、より強力な X 線の使用が可能となった。これは実験室 (通称インハウス) で使われる X 線と比べ桁違いの強度を有する。この強力な X 線により、これまで数日単位または数十時間単位で取得していた回折データが数十分ないしは数分で取得可能となっている。

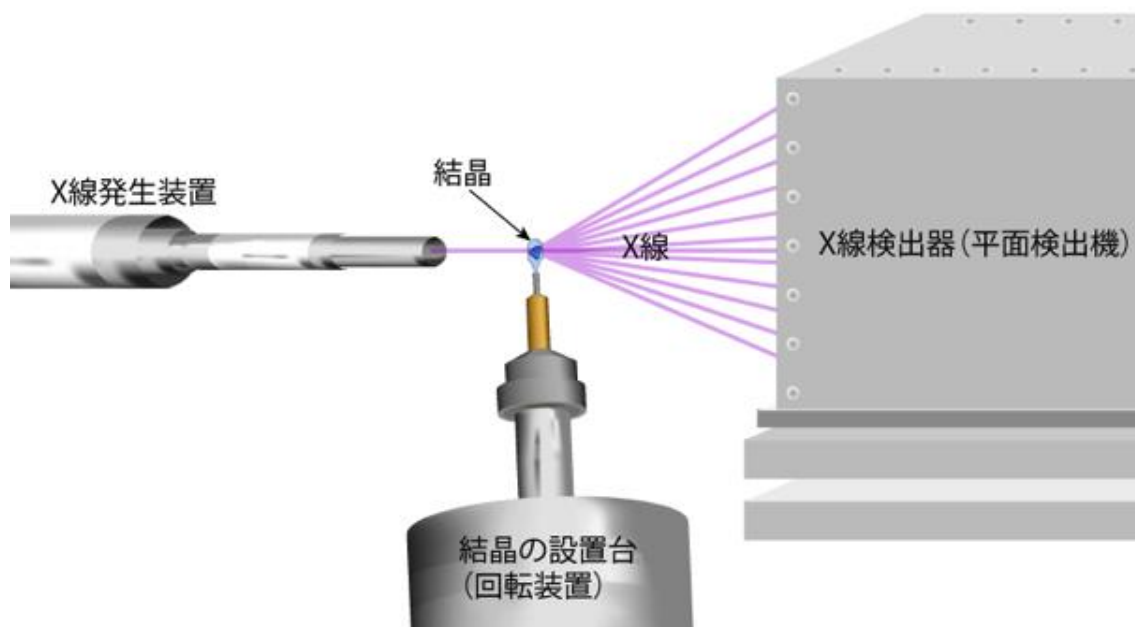


図 3 X線回折実験

2.2.1 タンパク質結晶

タンパク質を結晶化させる方法にはいくつかの方法があるが、最も一般的に利用されている方法が蒸気拡散法である。この方法では十分な量の沈殿剤溶液とタンパク質溶液を混合した少量の液滴を同じ空間に密閉し、蒸気拡散により時間をかけてゆっくりとタンパク質溶液中の沈殿剤の濃度を上げて行く手法である。溶液の成分や濃度がタンパク質の結晶化に適している時にタンパク質が結晶化する。

通常は初めて結晶化するタンパク質の結晶化条件は分からず、また予測も難しい。このため考えられるあらゆる組成の溶液で結晶化を試みる事になる。この網羅的な試行には多くの時間がかかる事が多く、結晶構造解析の難関の一つである。近年では統計的に結晶化の実績の高い組成の溶液を集めた結晶化スクリーニングキットがいくつか販売されており、初期のタンパク質の結晶化はそのキットを利用したスクリーニングが行われる。

結晶化スクリーニングキットの条件の中からタンパク質を結晶化させる事が

出来る条件が見つかったあとは結晶化条件の最適化を行う。同じ様な結晶が出来る条件のなかでも僅かな条件の違いにより結晶性に違いがでる。結晶性が良いほど回折 X 線の位相がそろっており良質なデータを取得できる。特に結晶性の善し悪しによって取得出来る X 線回折データの最大分解能が大きく影響を受け、詳細な立体構造を解析出来る分解能のデータを取得出来る様に結晶化条件を最適化する。この過程では結晶化と X 線回折実験による分解能の確認を合わせて行う。

こうして得られた良質なタンパク質結晶を利用して構造解析を行う。

2.2.2 ソーキング実験

タンパク質結晶の体積の約 50%は溶媒が占めており結晶内に化合物が浸透する事が可能である。この性質を利用してタンパク質結晶を化合物の溶解した緩衝溶液に浸ける事で、結晶中のタンパク質にリガンドを結合させる。この方法は化合物を結合させたタンパク質を結晶化させる方法と比較して結晶化条件の再検討の手間が省ける利点がある。結晶化条件は少しの条件の変化により容易に変化してしまい、結合状態を調べたい化合物ごとにその条件検討を行う事は大変な労力を要する。これに比べて一度求めた結晶化条件で結晶を多数用意し次々と異なる化合物の入った溶液にソーキングを行う事は非常に効率的であり、本研究ではこのソーキング実験の更なる効率化をはかる。

2.3 本研究の目標

タンパク質結晶を、溶液に浸けた状態でも落下しないように、治具に固定する事で、ソーキング実験の際にもロボットで扱えることを可能にする。これにより熟練の研究者を必要としていたソーキング実験を自動化する事が可能になりリガンドソーキングのパイプラインの構築への道を開く。

2.3.1 結晶固定に伴う困難

結晶は非常に脆く壊れ易いため取扱いが困難である。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。結晶を固定する素材もまた結晶へのダメージを与えない素材である必要がある。このため固定素材に利用出来る素材は非常に限られる。

また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。そのため固定素材の固定化速度も短時間である必要があり、これらの条件を満たす固定素材を見つける事は非常に困難である。

また、見つけた固定素材を短時間で結晶の周りに配置する必要もあるため、自動化機械の制作も必要になる。

2.4 本研究の応用範囲

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に、回折実験に使われる0.1mmのタンパク質結晶を結晶マウント治具に固定し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開発を行った。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(Seiki Baba et al., 2013)にも利用できる。

2.5 参考文献 1

Seiki Baba et al.(2013).J.Biol.Cryst., 69,9,September, 1839-1849

Humidity control and hydrophilic glue coating applied to mounted protein crystals improves X-ray diffraction experiments

Harold W. Wyckoff et al.(1967). J. Mol. Biol., 27,3,14,August, 563–578

Design of a diffractometer and flow cell system for X-ray analysis of crystalline proteins with applications to the crystal chemistry of ribonuclease-S

M. Sugahara et al.(2010).J. Appl. Cryst., 43, 940-944

Autolabo: an automated system for ligand-soaking experiments with protein crystals

3 実験

本研究ではタンパク質の結晶をマウント治具に固定する手法の考案を行った。次に考案した手法を利用して様々な種類のタンパク質結晶の固定を実際に行える装置の制作を行った。考案した手法を用いた装置により固定した結晶がダメージなく固定されているか、また固定された結晶はソーキングに影響を与えないかを X 線回折実験により評価した。

3.1 タンパク質の結晶化

タンパク質の結晶化は精製方法および結晶化条件が既知の Lysozyme, Trypsin, GatCAB, CesZ, DusC, EF2D2 の計 6 種類のタンパク質について行った。このうち Lysozyme, Trypsin は市販のタンパク質を購入して利用した。GatCAB, CesZ, DusC, EF2D2 については本研究室内で田中 深雪、藤原 孝彰、朝野 希美、丹澤 豪人の協力を得て精製して利用した。

3.1.1 蒸気拡散法による結晶化

蒸気拡散によりタンパク質溶液は濃縮される。濃縮されたタンパク質溶液の中では核形成がおこり、形成された核を元に結晶が成長する。結晶の成長とともにタンパク質濃度は徐々に低下し、蒸気拡散が平衡に達した時には結晶の溶解と成長の速度も平衡に達する。この手法によりタンパク質の結晶化を行う事が出来る。

3.1.2 Lysozyme の結晶化

下記の結晶化条件で結晶化を行った。

結晶化条件

タンパク質溶液

30mg/ml

リザーバー溶液

100mM sodium acetate pH 4.6

1.25M NaCl

結晶化方法

24 穴プレートでシットティングドロップ蒸気拡散法により 20℃で結晶化を行った。

ドロップはタンパク溶液 5 μ l とリザーバー溶液 5 μ l を混ぜ合わせた。

リザーバーは 0.5ml を用いた。

3.1.3 Trypsin の結晶化

下記の結晶化条件で結晶化を行った。

結晶化条件

タンパク溶液

30mg/ml

リザーバー溶液

30% PEG3350

0.2M Lithium sulfate

0.1M Tris-HCl pH 8.5

結晶化方法

24 穴プレートでシットティングドロップ蒸気拡散法により 4℃で結晶化を行った。

ドロップはタンパク溶液 5 μ l とリザーバー溶液 5 μ l を混ぜ合わせた。

リザーバーは 0.5ml を用いた。

3.1.4 GatCAB の結晶化

下記の結晶化条件で結晶化を行った。

結晶化条件

25% PEG600

5mM MgCl₂

50mM HEPES-NaOH pH7.2

2% MPD

結晶化方法

24 穴プレートでシットティングドロップ蒸気拡散法により 20℃で結晶化を行った。

ドロップはタンパク溶液 2 μ l とリザーバー溶液 2 μ l を混ぜ合わせた。

リザーバーは 0.5ml を用いた。

そして、一度作成した結晶を粉砕し再度上記の結晶化法のドロップに加えたシーディング法により大きなサイズの結晶を得た。

3.1.5 CesZ の結晶化

下記の結晶化条件で結晶化を行った。

結晶化条件

20% PEG3350

20% Glycerol

0.2M di-sodium tartrate

結晶化方法

96 穴プレートでシットティングドロップ蒸気拡散法により 20℃で結晶化を行った。

ドロップはタンパク溶液 2 μ l とリザーバー溶液 2 μ l を混ぜ合わせた。

リザーバーは 30 μ l を用いた。

3.1.6 EF2D2 の結晶化

下記の結晶化条件で結晶化を行った。

結晶化条件

25% PEG600

5mM MgCl₂

50mM HEPES-NaOH pH7.2

2% MPD

結晶化方法

24 穴プレートでシットティングドロップ蒸気拡散法により 20℃で結晶化を行った。

ドロップはタンパク溶液 2 μ l とリザーバー溶液 2 μ l を混ぜ合わせた。

リザーバーは 30 μ ml を用いた。

3.2 結晶の保持手段の検討

結晶にダメージを与えずにかつ自動化パイプラインでの利用に現実的な機構を有する結晶の保持手段の検討を行った。

3.2.1 既存の結晶保持及び移動手段

既存の結晶保持手段としてはマイクロピンセットを利用した方法及び粘着材を利用した方法、固定部材内での結晶成長の3種類の方法がある。

マイクロピンセットを利用した方法では結晶と同じスケールの小さなロボットアームを利用して直接結晶を掴む事で結晶を移動する。しかし、常に実験者が操作をする必要があり動作も遅いためソーキング実験のハイスループット化には不向きである。

粘着剤を利用した方法としては創晶社の **Crystal Catcher** がある。これはピンの先端に粘着剤を取り付けた器具を利用して結晶を軽く接着する方法である。一部の結晶に対して利用出来るが、粘着剤との相性の問題があり一部の結晶にしか利用出来ない問題がある。また、利用出来る結晶でもソーキングの様な長時間の結晶の維持は想定していないため、長時間は結晶を保持し続けられずにソーキングへの応用に難がある。

固定部材内で結晶を成長させる方法についてはピンの先端にゲルを固定した器具の先端で結晶を成長させる手法がある。この手法の試行は本研究でも実際に行ったが安定して利用できる方法ではない。タンパク質の結晶成長は微細な条件の変化によって変化するためゲルの存在により結晶の形成及び成長に影響を与える。また、結晶形成は確率的な要素があり意図する位置に対して自由に結晶を形成できる物ではない。そのため多数の結晶を扱うパイプラインに利用出来る物では到底無い。

この様に既存の手段で結晶を保持及び移動させる現実的な手段は存在しなかった。

3.2.2 親水性ゲルによる固定

既存の手法でリガンドスクリーニングパイプラインに利用できる結晶保持手段は無かった。この様な状況の中で打開策を開発すべく親水性ゲルの利用を発

案した。親水性のゲルを何らかの手段で結晶の周りに配置する事で結晶をマウント治具に固定できれば、親水性ゲル内に結晶保護用の溶媒も保持する事ができるため結晶への影響を最小限にとどめつつ、リガンドの浸透も可能である。また親水性ゲルは使用する量がごく微量であるため価格面でも実用的であると考えた。

3.3 結晶固定に利用出来るゲル素材の検討

ゲルにはイオンを用いるゲル、ラジカルを用いるゲル、高温を利用するゲル、化学結合を利用するゲルなどがある。これらのゲルの中からタンパク質結晶の固定に適したゲルの検討を行った。

3.3.1 各種のゲル素材とタンパク質結晶

イオンにより形成するゲルにはアルギン酸ナトリウムをはじめ様々なゲルが存在する。しかしゲルの形成には塩濃度を一定以上の濃度に保つ必要があり、塩濃度の変化に敏感なタンパク質結晶との相性は良くない。

ラジカルにより形成するゲルにはポリアクリルアミドを代表とするゲルが存在する。強度が強いゲルが多く、種類も多彩であるため、例えばコンタクトレンズ用のゲルとしてなど、工業的によく利用される。ゲル化時間も高濃度のラジカルを短時間で発生させる技術により数十秒と比較的短時間でゲル化するゲルが存在する。しかしラジカルが損傷を与えるためタンパク質結晶との相性は良くない。

高温により形成するゲルにはアガロースゲルを代表とするゲルが存在する。多糖で成っているゲルが多く、ゼラチンを代表に食品にも多く存在する。しかし高温がタンパク質結晶に良くない。

振動により形成するゲルには PEO ゲルなどのゲルが存在する。超音波振動などにより長いポリマーの骨格を絡まらせる事でゲルを形成する。形成したゲルはタンパク質結晶に優しいゲル素材の物もあるが、ゲルの形成過程である振動がタンパク質結晶に損傷を与えるため相性が良くない。

化学結合により形成するゲルにはメシチレン (Benzene 1,3,5 triacetic acid) などのゲルが存在する。均一性が非常に高く品質の良いゲルを形成できる事が知られている。ゲルの均一性が高いと強度の高いゲルになる事が知られている。

ゲル骨格と化学結合の種類によってはタンパク質結晶に損傷を与えない物も存在する。しかし、ゲルの均一性を作り出すためにゲル化時間が長い傾向がある。

名称	構造	備考
アルギン酸ナトリウム		ゲル化時間は瞬時。 Ca イオン濃度が低下するとゲルが溶解する。 PEG と混ざると沈殿を生じる。
ヒアルロン酸ゲル		ゲル化時間は数十分。 酸素に極端に弱い。 容器を開封後 2 時間以内に全て使い切る必要がある。
Tetra-PEG gel		ゲル化時間は 10 秒から 1 分 有力候補
アクリルアミド		ゲル化時間数秒から数十分（ラジカル剤の濃度に左右される） ラジカルが結晶に与える影響が心配される
アガロース		ゲル化に温度変化が必要なので結晶はの影響が心配される

表 1 代表的なゲル素材

アルギン酸ナトリウム

よく知られているゲルの中で本研究にも有用と思われたゲルの中にアルギン酸ナトリウムがある。アルギン酸ナトリウムは人工イクラ用のゲルとして広く知られており、非常に短時間でゲル化する。アルギン酸ナトリウムは高濃度の塩、特に高濃度のカルシウムイオン水溶液の中では非常に短時間（1 秒以下）でゲル化する事が知られている。このゲル化時間の短さは結晶の固定に大変有利であるためこのゲル素材の利用を検討した。タンパク質結晶の中には高濃度

のカルシウムイオン環境中でも損傷を受けないものがあり、それらのタンパク質の固定に利用できると考えられた。しかし、限られたタンパク質結晶にしか利用できない難点がある。また、ゲルは形成後も塩濃度の低い溶液中で分解する可逆的な物であるため化合物のソーキング中も常に塩濃度を高く保つ必要がありリガンドの結合に影響を及ぼす可能性がある。さらに自身以外の高分子ポリマーと混ざり合う事で凝集体を形成してしまうため上手くゲル化しないという問題もある。特にタンパク質結晶化溶液の多くに含まれる PEG とも凝集体を形成してしまう事が利用できる範囲を非常に狭めてしまう欠点がある。

アルギン酸ナトリウムは褐藻から抽出される天然素材であるためそのゲル化前の骨格長を自由に制御できない。長いゲル骨格を持つアルギン酸ナトリウム溶液は高い粘性を持つ。粘性の高い溶液の扱いは困難である。粘性を下げるにはゲル骨格を短くするか、ゲル溶液の濃度を低く抑える事が有効である。しかし、そのどちらを実践した時も結晶の固定に必要なゲル強度を保てない事が実験により判明した。

このためアルギン酸ナトリウムによる結晶の固定は汎用性が無く、このゲルは最適な素材ではないと結論づけた。

3.3.2 Tetra-PEG ゲル

化学ゲルの一つで比較的ゲル化速度の早い素材の中に Tetra-PEG ゲルがある。このゲルは骨格が PEG であり、末端に官能基がついた構成をしている。Tetra-PEG ゲルは2種類のそれぞれ異なる官能基の付いたゲル素材を混ぜ合わせる事で自発的に共有結合を形成してゲル化する。

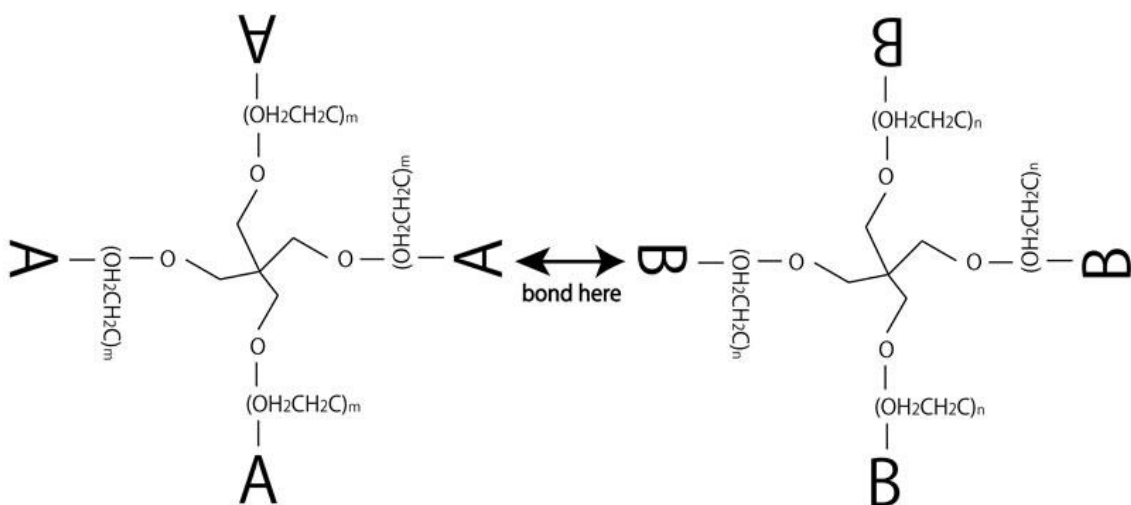


図 4 Tetra-PEG ゲルの構成

一般的に化学ゲルはゲル化時間が長い代わりに均一なゲルを形成できる特徴を持つ。しかし、Tetra-PEG ゲルの中には比較的ゲル化時間の短い官能基の組み合わせが存在する。その官能基の組み合わせが活性化カルボキシル基 ($-\text{COO}-\text{NHS}$) とアミノ基 ($-\text{NH}_2$) の組み合わせ、およびマレイミド基 ($-\text{Maleimide}$) とチオール基 ($-\text{SH}$) の組み合わせである。純水に 10%(w/v)の濃度で溶かした状態で前者は 30 秒程度、後者は 1 分程度の時間でゲル化する。Tetra-PEG ゲルは骨格が結晶化バッファの多くに含まれる PEG であるため結晶に損傷を与えにくく凝集体も形成しない。利用する官能基も比較的結晶には優しく、実験で利用した結晶には観測できる悪影響は無い。

官能基 (A)	官能基 (B)
$-\text{COO}-\text{NHS}$	$-\text{NH}_2$
$-\text{COO}-\text{NHS}$	$-\text{SH}$
$-\text{CO}_2\text{-phenyl-NO}_2$	$-\text{NH}_2$
$-\text{SH}$	$-\text{Maleimide}$
$-\text{SH}$	$-\text{COOH}$
$-\text{SH}$	$-\text{SH}$

表 2 Tetra-PEG ゲルに利用できる官能基の組み合わせ

様々な官能基の組み合わせについてゲル化時間の測定を行ったが官能基が活性カルボキシル基とアミノ基の組み合わせ、およびマレイミド基とチオール基の組み合わせ以外のものについては1分以内にゲル化する組み合わせは確認出来なかった。

3.3.2.1 Tetra-PEG ゲルへの pH の影響

タンパク質の結晶化は幅広い範囲の pH で行われる。そのためゲルの形成もあらゆる pH 範囲で行える事が理想的である。そのため Tetra-PEG ゲルがゲル化できる pH の範囲をゲル化速度の比較的早いカルボキシル基とアミノ基の組み合わせの Tetra-PEG ゲルについて確認した。ゲルのモノマーを pH の異なるバッファーと混合した後に、バッファーと混合したモノマー溶液同士を混合しゲル化の進行を観察した。

pH	Buffer	Gelation
1	HCl (0.5M)	negative
3.8	Citric Acid (0.5M)	negative
4	Sodium Acetate (0.5M)	negative
4.2	Sodium Acetate (0.5M)	negative
4.8	Sodium Acetate (0.5M)	negative
6.8	Sodium Cacodylate (0.5M)	negative
7	Sodium HEPES (0.5M)	positive
7.8	Sodium HEPES (0.5M)	positive
8	Tris Hydrochloride (0.5M)	positive
8.8	Tris Hydrochloride (0.5M)	positive
9	CAPSO (0.25M)	positive
9.8	CAPSO (0.25M)	positive
10	CAPS (0.25M)	positive
11.6	CAPS (0.25M)	positive

表 3 Tetra-PEG ゲルの pH によるゲル化への影響。「Gelation」は negative がゲル化しなく、positive がゲル化する事を表す。

このとき pH が 7.0 より低い時にはゲル化しない事が分かった。これは N-ヒ

ドロキシスクシンイミドにより活性化させたカルボキシル基が酸条件により不活性化されるためだと考えられる。結晶化条件が pH7.0 以下の条件は珍しく無く、利用範囲が限定される可能性があり対策を講じる必要がある事が分かった。

3.3.2.2 手動での結晶固定

Tetra-PEG ゲルによるループへの固定が可能であるか否かピペットを用いて手動で結晶の周りにゲルを配置する実験で確認を行った。実験は下記の手順で行った。

器具

ナイロンループ (HAMPTON Research 社製 サイズ : 0.3-0.4)

ピペッター

チップ 20 μ l

試薬

A 液 : 官能基がカルボキシル基の Tetra-PEG ゲルのモノマー溶液 20%(w/v)

B 液 : 官能基がアミノ基の Tetra-PEG ゲルのモノマー溶液 20%(w/v)

タンパク質結晶

Lysozyme 結晶

結晶化条件 : NaCl 1.25M, Sodium Acetate buffer pH 4.6

結晶化法 : シッティングドロップ蒸気拡散法

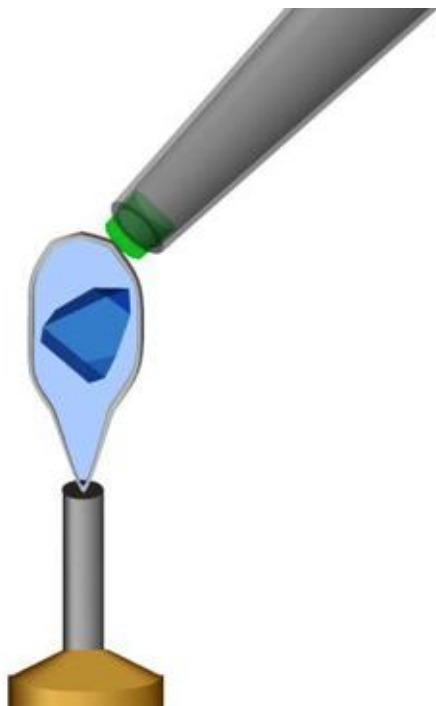


図 5 ピペットを用いたゲル溶液の配置の様子

手順

1. ループを用いて結晶を結晶化溶液の中から拾い上げる
2. ピペッターで A 液を $1\mu\text{l}$ 吸い取り、結晶の周りにかける
3. ピペッターで B 液を $1\mu\text{l}$ 吸い取り、結晶の周りにかける

この結果、結晶周りの結晶化溶液に接した大半のゲル溶液はゲル化せずに一部のゲル溶液のみがゲル化したが生結晶の固定には至らなかった。また、ピペッターで最小量のゲル溶液をかけるように努めたが、ゲル溶液による結晶化溶液の希釈が結晶の崩壊をもたらした。このため結晶をゲル溶液による濃度変化から守ると共に、ゲル溶液を結晶化溶液からも守る必要がある事が判明した。

また、微少量の粘性の高いゲル溶液を任意の位置にピペッターで配置する作業の難易度が高く、職人技の様な作業でありこの時点では実用的な手法とは程遠い状態であったためこれらの課題を解決する必要がある事が判明した。

3.3.2.3 増粘材による保護

これまでの実験で結晶をゲルで固定する際に結晶化溶液とゲル溶液が混ざり

合う状況が結晶とゲルの双方に影響を与える事が分かり、その対策を行う必要があった。直接接し合う二つの溶液が完全に混ざり合わない様にする方法は存在しないが、混ざり合う速度を遅らせることでゲル化が完了するまでの数十秒間は二つの溶液が混ざり合わない様に保つ方法があると考えた。それが増粘剤による結晶の保護である。

結晶化溶液に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直ぐには混ざり合わず結晶化溶液の濃度変化が抑制され、またゲル溶液も結晶化溶液から守られる。

ゲル化が完了した後はゲルごと結晶を十分な量の結晶化溶液に浸す事でゲル内の溶液を結晶化溶液に置換し、結晶内の溶液の組成変化を防ぐ。これはゲル内の溶液の置換速度が結晶内の溶液の置換速度に比べて早いために、結晶内の溶液がゲル溶液で希釈される前にゲル内の溶液が結晶化溶液で置換されるので有効な方法である。

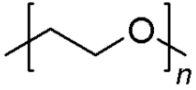
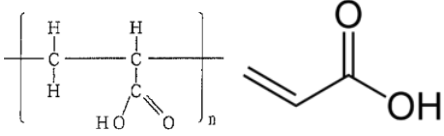
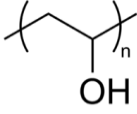
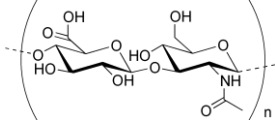
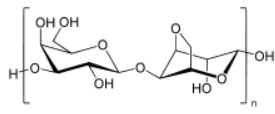
ポリマー名	化学式	PEG との相性
PEG、PEO		良好
カルボキシビニルポリマー (アクリル酸)		凝集体を生じる
ポリ ビニルアルコール (PVA)		PVA が主成分の液体のりで沈殿を生じた
アルギン酸ナトリウム		沈殿を生じる
アガロース		沈殿を生じる

表 4 増粘剤候補

PEO 以外の増粘材を利用する場合は結晶化溶液の多くに含まれる PEG と混合すると沈殿を生じるため利用しにくい。

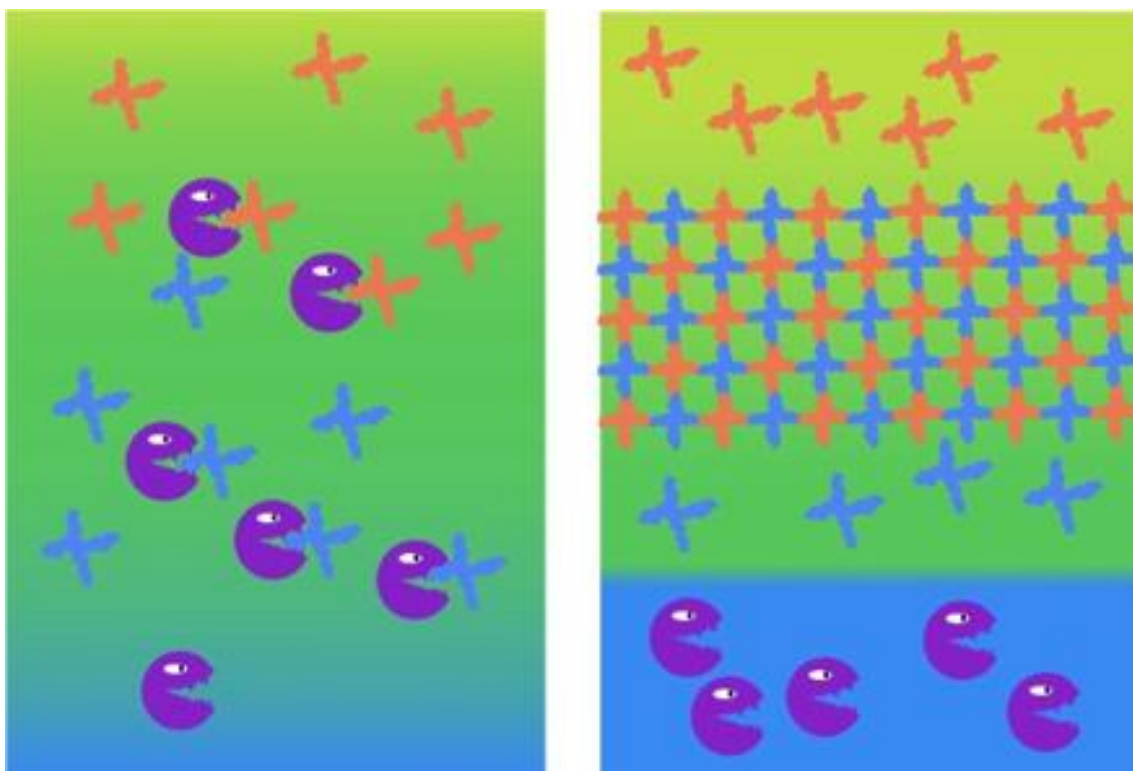


図 6 増粘剤によるゲルと結晶の保護の模式図。左の図は増粘材が結晶化溶液に含まれない場合の様子で酸により Tetra-PEG ゲルが不活化されている。右の図は増粘材により酸の含まれる溶液と Tetra-PEG ゲルの溶液が混ざり合わずにゲルが形成されている。オレンジ色及び水色の 4 分岐は Tetra-PEG ゲルのモノマーを表す。紫は Tetra-PEG ゲルを不活化させる物質（特に酸）を表す。

増粘剤としては、ポリエチレンオキシド（PEO）を利用した。PEO はタンパク質結晶作製時の沈殿剤や安定剤として頻繁に利用される 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しなく利用しやすい。

器具

ナイロンループ（HAMPTON Research 社製 サイズ：0.3-0.4）

ピペッター

チップ 20 μ l

試薬

A 液：官能基がカルボキシル基の Tetra-PEG ゲルのモノマー溶液 20%(w/v)

B 液：官能基がアミノ基の Tetra-PEG ゲルのモノマー溶液 20%(w/v)

増粘材溶液：NaCl 1.25M, Sodium Acetate buffer pH 4.6, PEO2,000,000,000 1%(w/v)

タンパク質結晶

Lysozyme 結晶

結晶化条件：NaCl 1.25M, Sodium Acetate buffer pH 4.6

結晶化法：シットティングドロップ蒸気拡散法

手順

1. ループを用いて結晶を結晶化溶液の中から拾い上げる
2. 増粘材溶液に結晶を浸す
3. ループを用いて結晶を増粘材溶液の中から拾い上げる
4. ピペッターで A 液を $1\mu\text{l}$ 吸取り、結晶の周りにかける
5. ピペッターで B 液を $1\mu\text{l}$ 吸取り、結晶の周りにかける

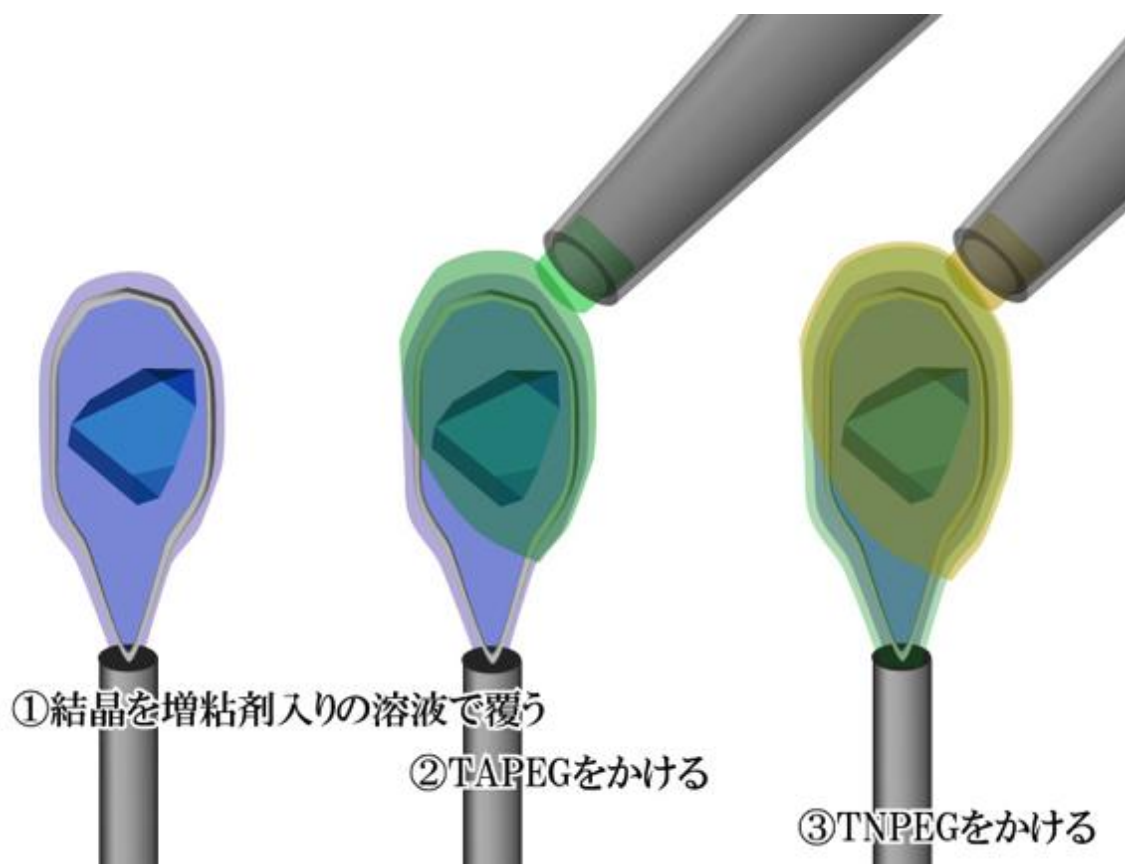


図 7 ゲル溶液を結晶にかける様子。TAPEG および TNPEG は Tetra-PEG ゲル溶液の A 液および B 液を表す。

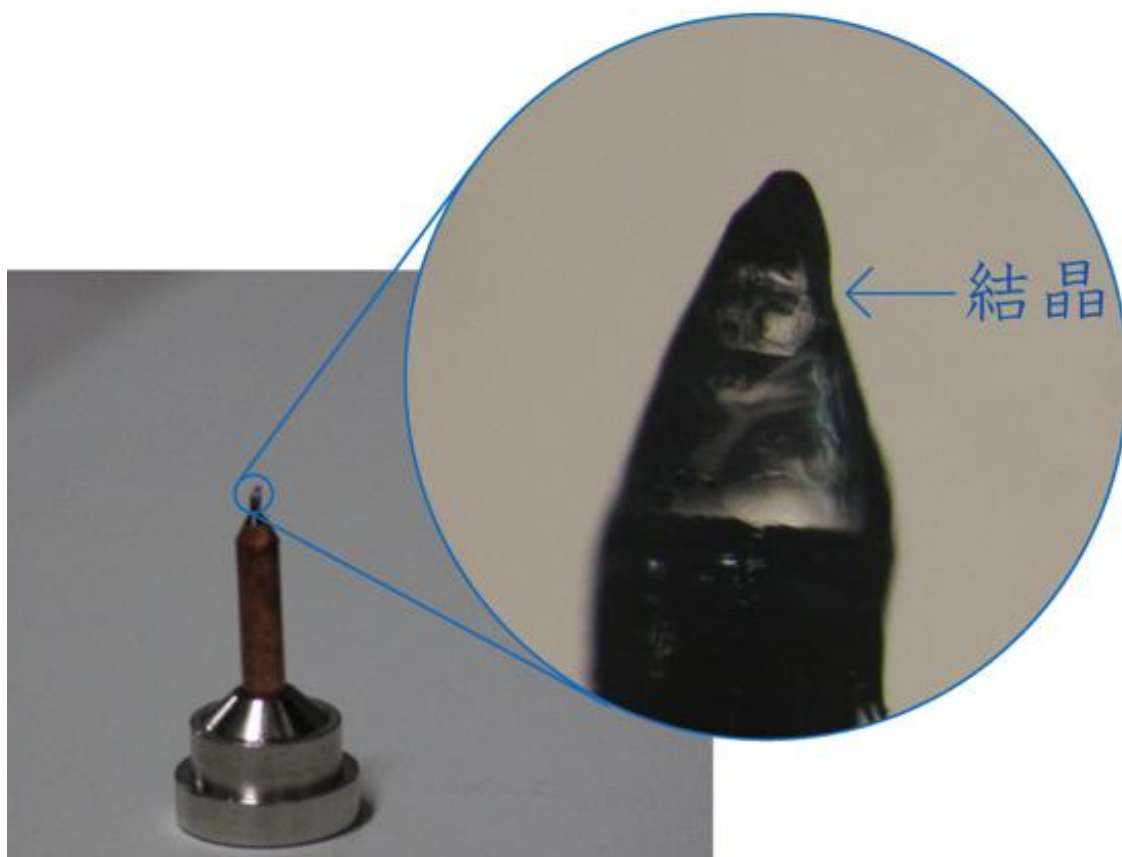


図 8 増粘材で保護された結晶のゲルでの固定

増粘材と Tetra-PEG ゲルの組み合わせを用いる事により結晶をゲルで固定する事に成功した。しかし、ゲルの量が多く結晶を完全に覆い隠してしまい X 線回折実験のデータの質を低下させる。また、大量のゲルによりタンパク質結晶も損傷を受けてひび割れを起こしている。親水性ゲルによる結晶の固定の可能性を示せたがゲル溶液を自由に配置するための手段の必要性が浮き彫りとなった。

3.3.2.4 増粘材の結晶化に及ぼす影響

タンパク質結晶とゲル溶液を増粘材により保護できる事が分かったが、壊れやすい結晶を増粘材の含まれる溶液に浸す行程が増加した。この行程を無くするためにはタンパク質結晶の作成時から溶液に増粘材を混ぜておく事が考えられる。しかし、タンパク質の結晶化は微妙な環境の変化で大きな影響を受けるため、増粘材が結晶化に悪影響を与えないかどうかを確認した。そのために結晶化溶

液に増粘材を混ぜた状態で結晶化を行った。

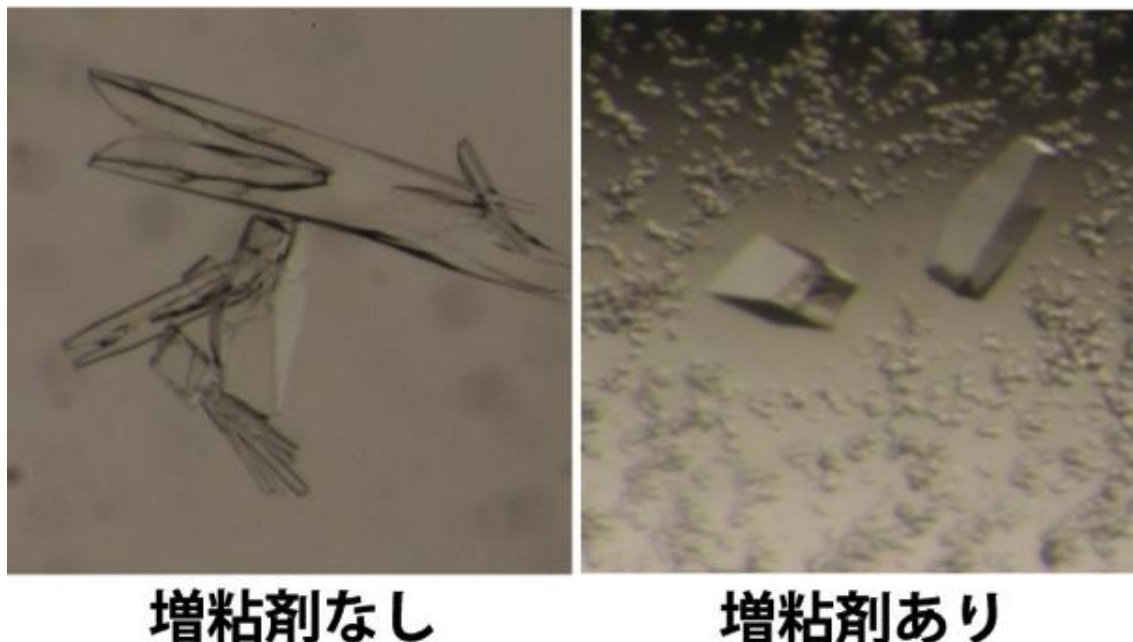


図 9 増粘材の含まれる結晶化溶液と結晶への影響。増粘材の含まれない通常の結晶化条件（左）では多結晶が出来てしまうタンパク質結晶も増粘材を混ぜる条件（右）では綺麗な単結晶が成長した。結晶は Lysozyme を 50mM Tris pH 8.0, 70%(v/v) MPD で結晶化した（増粘材の含まれる溶液はこれに加え PEO 増粘材を 1%(w/v)加えている）

Lysozyme、Trypsine、FtsZ で増粘材を添加した状態での結晶化を試み、結晶の質の向上が見られた。結晶化はタンパク質により状況が大きく異なるため一般化は出来ないが一部のタンパク質の結晶には有効である事が分かった。それらのタンパク質については PEO 増粘材を結晶化の時から結晶化溶液と混合しておく事が出来るため、結晶を結晶化溶液から拾い増粘材の含まれた溶液に浸す作業を省略出来る。

3.4 ゲル溶液塗布の自動化の検討

ゲル溶液を結晶の固定に有利な任意の位置に塗布する方法には大きく分けて接触方式と非接触方式がある。接触型ではマイクロインジェクターなどの分注用の機械を利用できるが、接触時にタンパク質結晶に物理的応力を与える危険性がある。また、ゲル溶液の様な粘性の高い溶液を微量だけ任意の位置に配置するには粘性と溶液に表面張力によりマイクロインジェクターからゲル溶液が離れずに上手く配置できない。

非接触方式では上記の問題点を回避できる可能性が高い。非接触型として噴霧器とインクジェットの利用を検討した。最初に検討した噴霧器では広範囲にかつ大量にしかゲル溶液を飛ばす事が出来ず、ゲルを任意の位置に塗布する事とはほど遠い状況であった。したがって次にインクジェットを利用する方法を検討した。

3.4.1 超音波加湿器を利用したゲル溶液の霧散

超音波加湿器を利用してゲル溶液を霧散させる方法を考えた。しかし、ゲル溶液の様な粘性の高い溶液は超音波式の装置では霧散させる事が出来なかった。

3.4.2 噴霧器を利用したゲル溶液の散布

噴霧器の中には高粘度の溶液を微小な液滴の霧状にする事が可能なものがある。これがゲル溶液の噴霧にも利用出来ないか実験を行った。その結果、ゲル溶液の噴霧は可能ではあったが液滴サイズが、小さいものでも、結晶と同じかそれ以上であるため結晶の固定に利用するには不向きであった。また噴霧の際に高圧の空気も噴霧口から排出され、この気流により結晶が瞬く間に乾燥してしまう事も分かった。

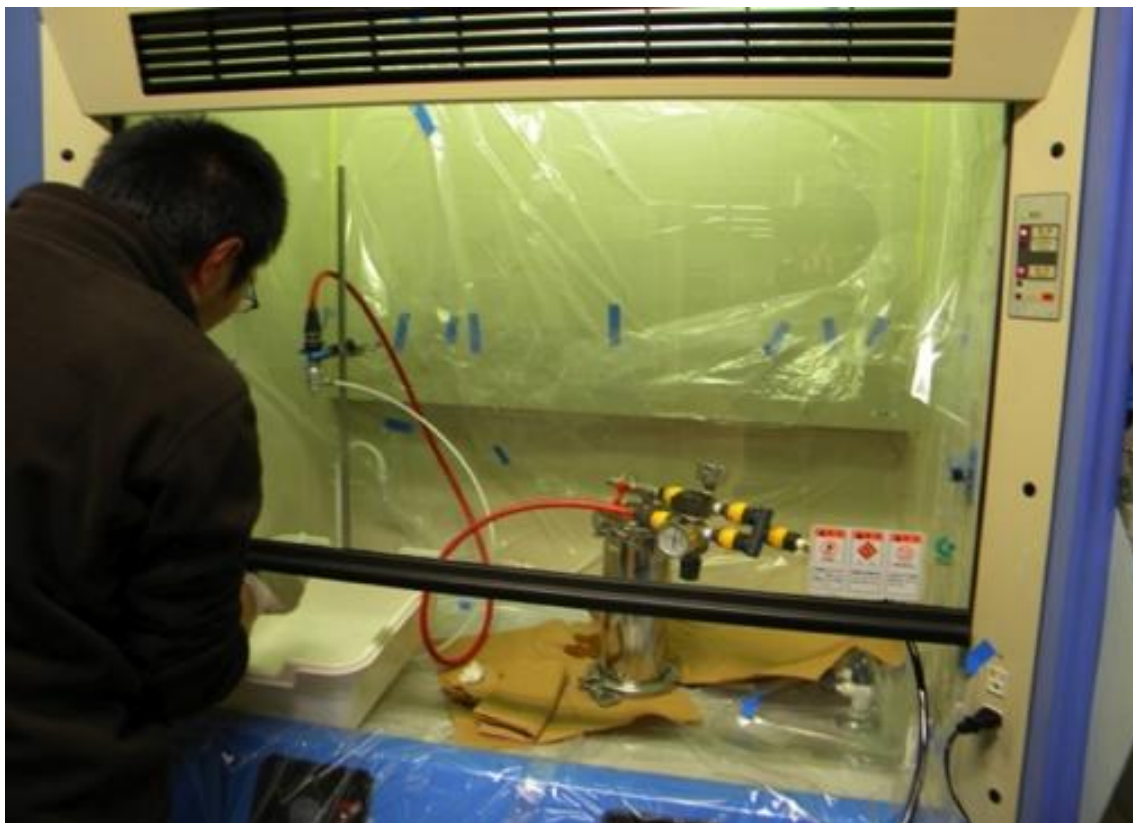


図 10 噴霧器によるゲル溶液塗布の様子

3.4.3 インクジェットを用いたゲル溶液の塗布

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 $0.1\mu\text{l}$ 程度と非常に少量であることから分注器等の接触式の器具を使った扱いは非常に困難である。そこで、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てゲル溶液を塗布することを検討した。



図 11 インクジェットを用いたゲル溶液の配置の模式図。TAPEG および TNPEG は Tetra-PEG ゲルの A 液および B 液を表す。

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。

インクジェットには大きく分けてサーマル型とピエゾ型の 2 種類がある。サーマル型のインクジェットでは溶液の一部を加熱し、気泡を発生させる事により溶液を押し出す力を得る。構成機構がシンプルであるため安価である事が特徴のインクジェットである。ゲル溶液を扱う場合には高温の熱を加える際にゲル化能力を失う可能性がある事と、熱が結晶に損傷を与える事から今回の結晶固定の用途には相性が良くないと判断した。

ピエゾ型のインクジェットでは電圧を加えると形状の変化するピエゾ素子を利用する。ピエゾ素子の変形により、溶液を押し出す力を得る。溶液に対しては熱を加えないためゲル溶液も安定して吐出可能であり、結晶にも悪影響を与えない。

インクジェットによりゲル溶液を扱うには吐出できる溶液の粘度に限界があるためゲル溶液の粘性を抑える必要がある。多くのインクジェットの中から高粘性の溶液の吐出も行えるインクジェットを開発しているマイクロジェット社のインクジェット (IJHD-100 及び IJHD-300) を購入し利用した。

3.4.3.1 結晶の位置調整装置

インクジェットを用いたゲルの塗布では狭い範囲にゲル溶液が飛翔する。そのため、結晶を正確にゲル溶液の飛翔位置に配置する必要があり、そのための装置を用意した。100 μm 程度の小さな結晶上の任意の位置にゲル溶液をかける必要があり、精密な制御を行う必要があったことからステッピングモーターを利用した。

結晶の回転機構 (試作機 1)

廃棄されたプリンタのステッピングモーターを利用した試作機を作成し課題点の洗い出しを行った。

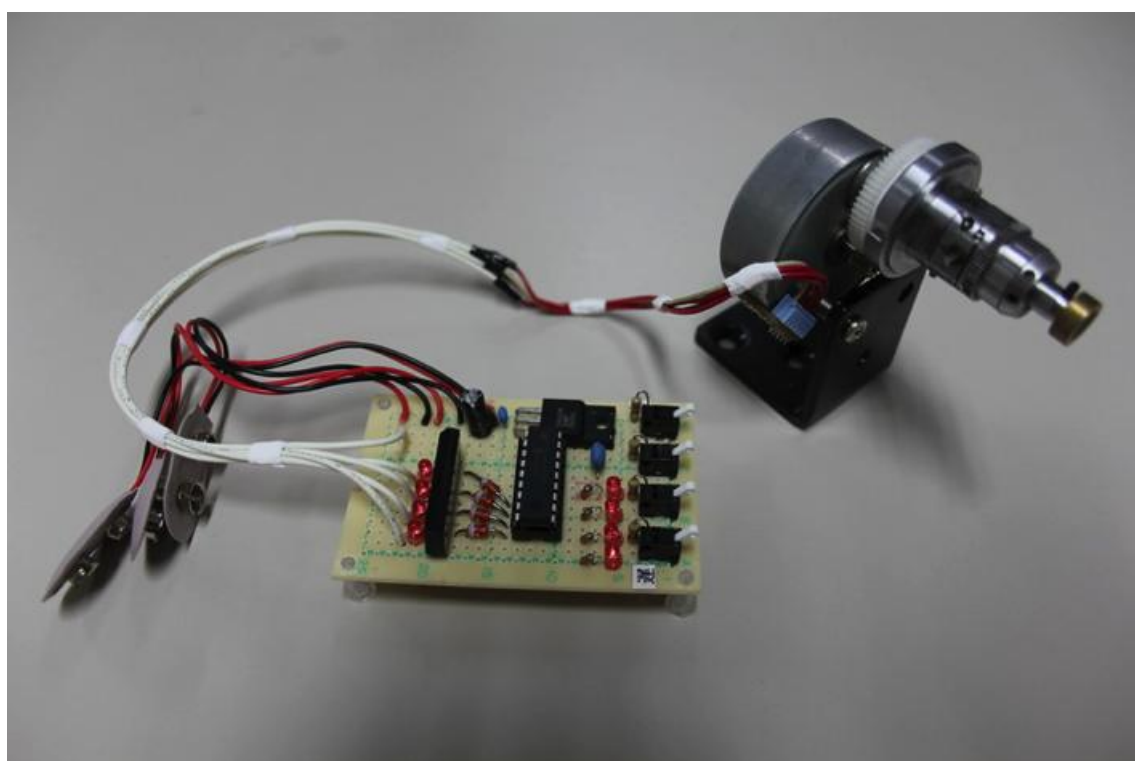


図 12 プリンタのステッピングモーターを利用した試作機

この試作機ではまず軸が不安定で必要な精度で結晶を回転させることが出来なかった。また、回転速度が遅く結晶が損傷を受ける前に動作を完了する事が難しかった。そのためより高精度な回転軸を持つ機構と動作速度の早いモーターが必要な事が分かった。

改良した結晶の回転機構（試作機2）

より高精度なステッピングモーターを用いた試作品を作成し実験を行った。ステッピングモーターは研究室内で壊れて廃棄された装置から取り外したものである。



図 13 試作機2号の写真

出力の高いモーターを利用する事で回転速度が向上した。また、モーターの回転軸に直接固定器具を装着する事で軸の精度が大幅に改善した。これにより実験に利用出来るレベルの装置が出来た。

3.5 インクジェットを利用した結晶固定試験

塩尻市のインクジェットを扱う会社、マイクロジェット社の本社で実験を実施。汎用のインクジェット装置にセットして実験を行った。

試作機をマイクロジェット社の汎用装置に取り付けインクジェットを用いた結晶の固定実験を行った。

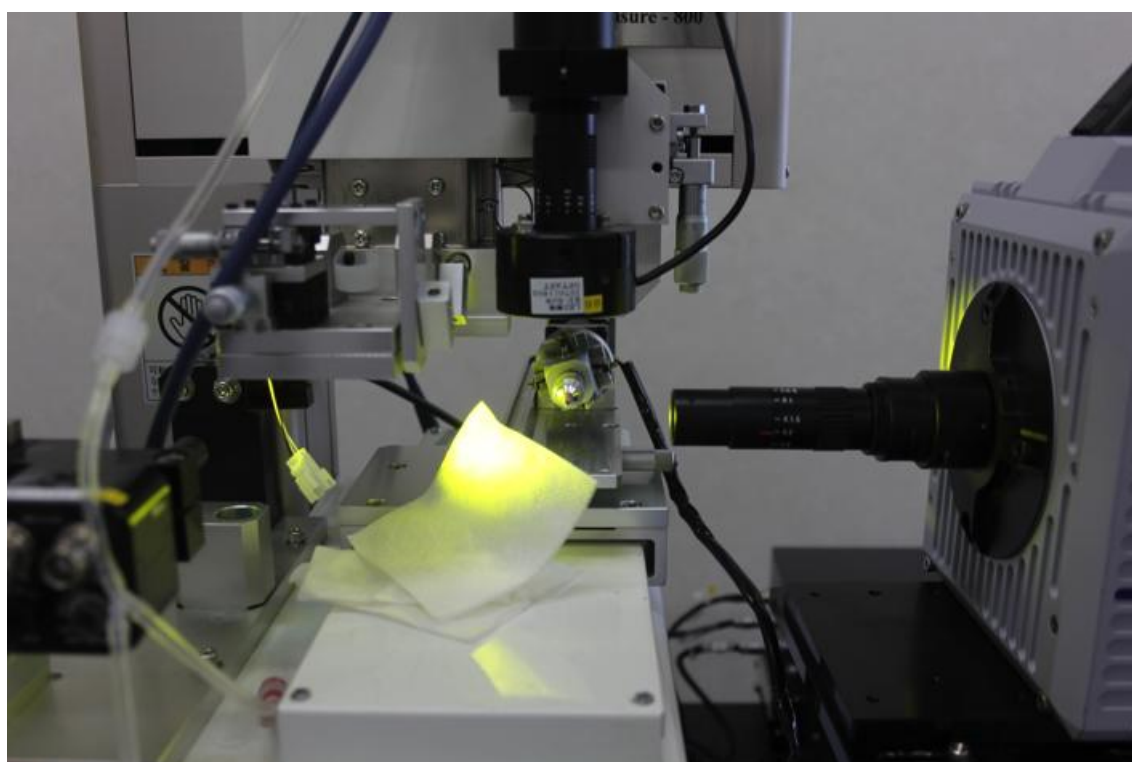


図 14 汎用装置に取り付けられた回転機構の様子

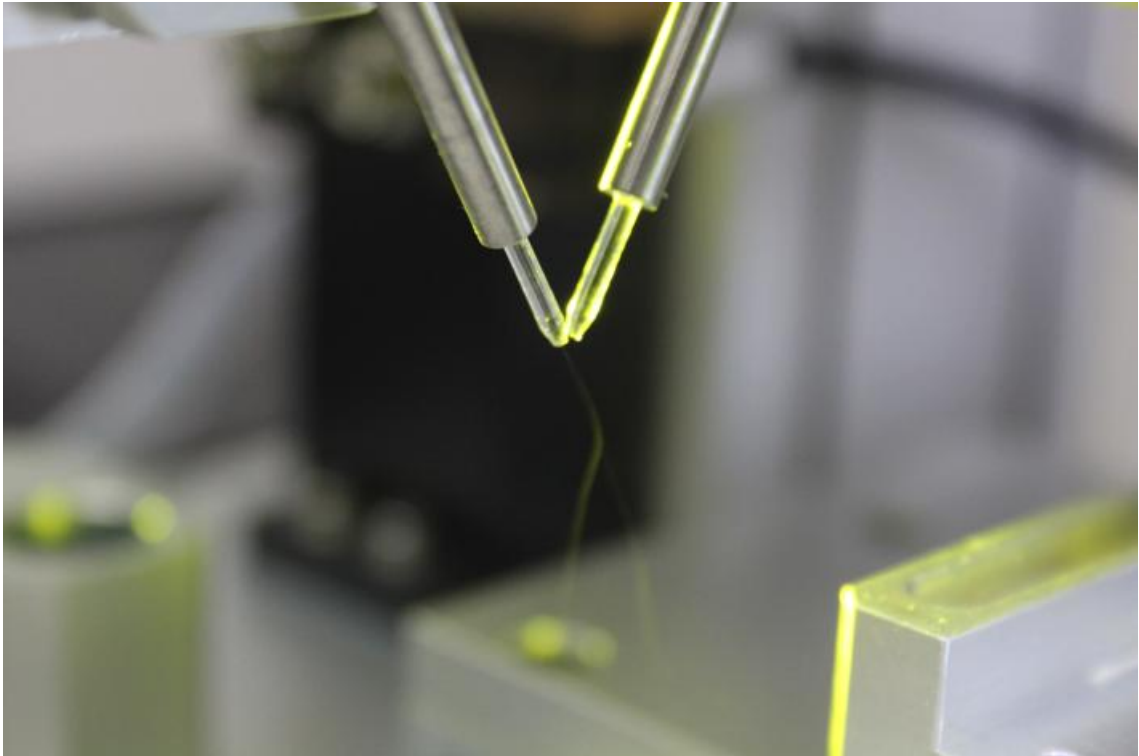


図 15 インクジェットにより吐出されたゲル溶液の様子。インクジェットから吐出されたゲル溶液の液滴のサイズが非常に小さいため室内の僅かな風により吐出したゲル溶液が流される事が分かった。

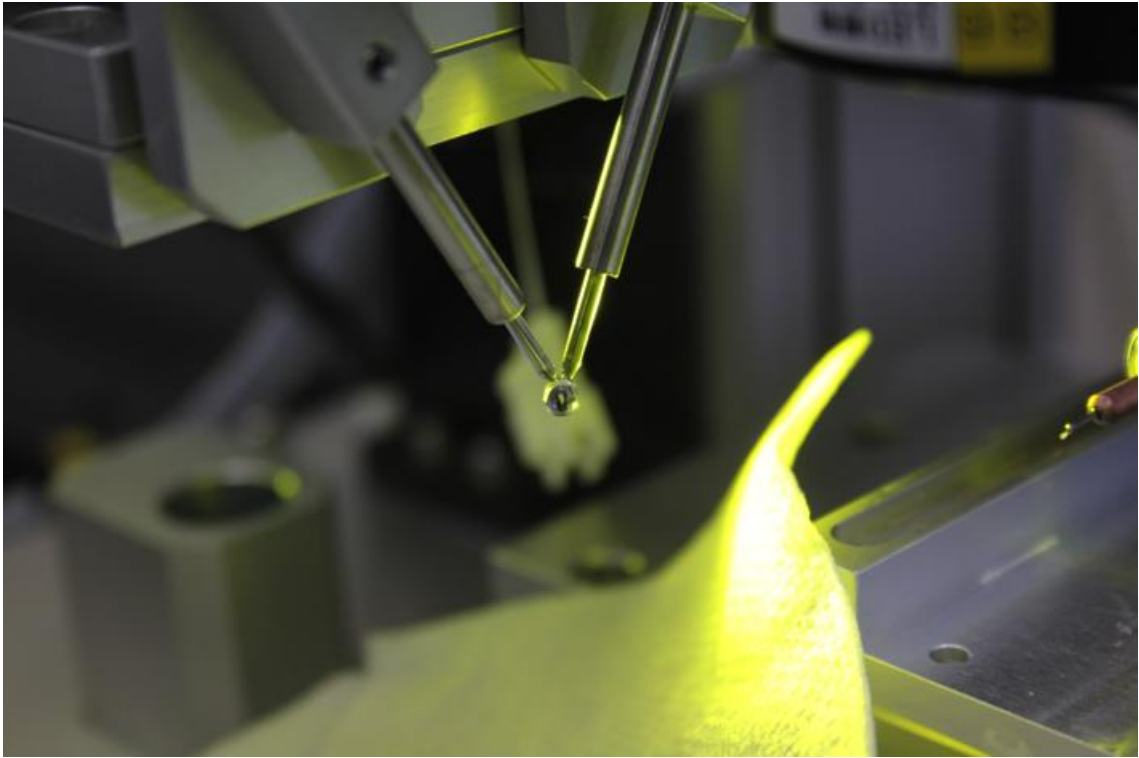


図 16 インクジェット先端でのゲル化の様子。風に流されない様にインクジェット缶の距離を近づけたためちょっとしたはずみにインクジェット先端で2種類のゲル溶液が混ざり、インクジェットの先端でゲル化がおこり詰まらせた。



図 17 インクジェットでのゲル溶液の塗布後の様子

インクジェットを用いたゲルの塗布で正確な量のゲル溶液を吐出することが出来たため少量でのゲルコートを達成できた。ゲルで固定した結晶は結晶化溶

液の入った密閉用の蓋で乾燥から防いだ状態でマイクロジェット社の実験室から北大の研究室へ運搬して結晶の状態の確認を行った。

結晶の損傷

インクジェットにより固定した結晶の損傷を X 線回折実験によって確かめた。創薬のためのリガンドソーキングでは $2.5\text{\AA}$ 以上の分解能が望ましいが、18 個の結晶を固定し、固定後もこの条件を満足しているのは Lysozyme 結晶のみであった。その Lysozyme 結晶も損傷を受けており全体的に低い分解能に留まった。

結晶の種類	無損傷での分解能	ゲル固定時の分解能
Lysozyme 結晶	$1.4\text{\AA}$ 程度	$2.0\text{\AA}$
Trypsin 結晶	$1.4\text{\AA}$ 程度	$7.0\text{\AA}$
FtsZ 結晶	$2.4\text{\AA}$ 程度	$8.2\text{\AA}$

表 5 ゲルで固定した結晶と固定しない結晶の分解能の比較

この事から結晶への損傷を最小限に抑えた状態でゲルコートを行なう方法を検討する事が課題として残った。

3.5.1 インクジェットでのゲル溶液の吐出と結晶の固定

No	溶質濃度	吐出条件	着液位置	塗布面	発数	結果	備考	結晶	X線回折
1	5%	小滴条件	ナイロンループの根本	片面	600	×	着滴位置がずれる	Lysozyme	結晶破棄
2	5%	大滴条件	ナイロンループの根本	片面	200	×	着滴位置がずれる	Lysozyme	結晶破棄
3	5%	大滴条件	結晶	片面	200	△	着滴量が多く、結晶を液が覆う	Lysozyme	反射なし
4	5%	大滴条件	結晶	片面	10	△		Lysozyme	3.1Å
5	5%	大滴条件	結晶	両面	10x2	○		Lysozyme	2.2Å
6	5%	大滴条件	結晶	両面	10x2	○		Trypsin	7.0Å
7	5%	大滴条件	ナイロンループの根本	両面	10x6	×	液滴が結晶まで広がらない	Trypsin	反射なし
8	5%	大滴条件	結晶	片面	10	○	動画用	なし	
9	2%	小滴条件	結晶	片面	30	×	着滴位置がずれる	Lysozyme	2.7Å
10	2%	小滴条件	結晶	両面	30x2	○		Lysozyme	2.0Å
11	2%	小滴条件	結晶	片面	30	×	着滴位置がずれる	Lysozyme	結晶破棄
12	2%	小滴条件	結晶	片面	30	-	位置調節確認に使用	Lysozyme	結晶破棄
13	2%	小滴条件	結晶	両面	30x2	○		Lysozyme	2.2Å
14	2%	小滴条件	結晶	両面	30x2	○		Trypsin	8.6Å
15	2%	小滴条件	結晶	両面	30x2	○		Trypsin	反射なし
16	2%	小滴条件	接点 2箇所	両面	10x2	×	着滴位置がずれる	FtsZ	反射なし
17	2%	小滴条件	接点 2箇所	両面	10x2	○		FtsZ	8.2Å
18	2%	小滴条件	結晶	回転塗布	30	○	回転させながら、手動で1発 x30回	Trypsin	反射なし

表 6 ゲル吐出結果

結晶 No.4

インクジェットでの吐出条件

ゲル濃度：5%

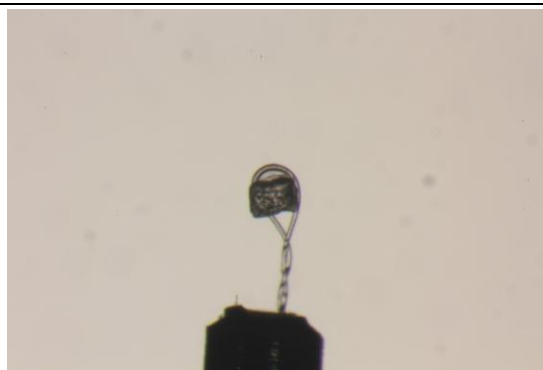
吐出条件：大滴

着液位置：結晶

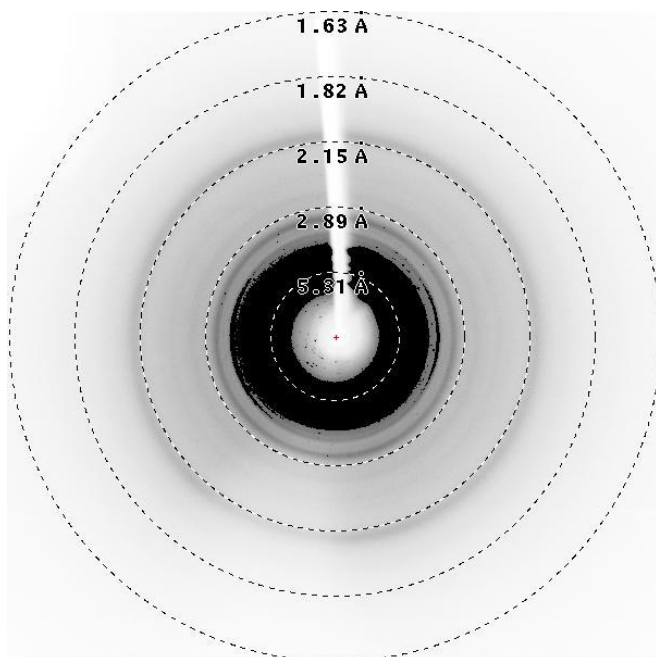
塗布面：片面

発数：10

結晶：Lysozyme



結晶の状態



X線回折写真

X線回折条件

露光時間：1min

測定距離：100mm

X線波長：1.54Å

振動角：0.5°

測定条件：乾燥防止用チップを被せた状態

X線回折結果

分解能：3.1Å

結晶 No.13

インクジェットでの吐出条件

ゲル濃度：2%

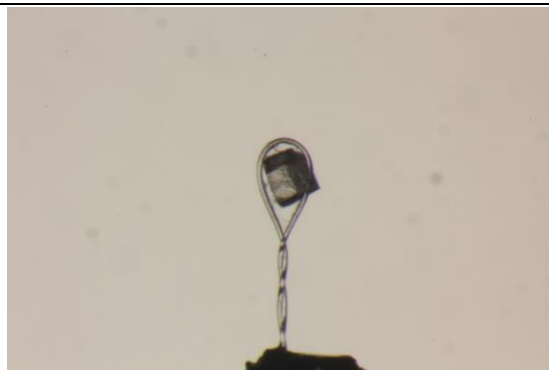
吐出条件：小滴

着液位置：結晶

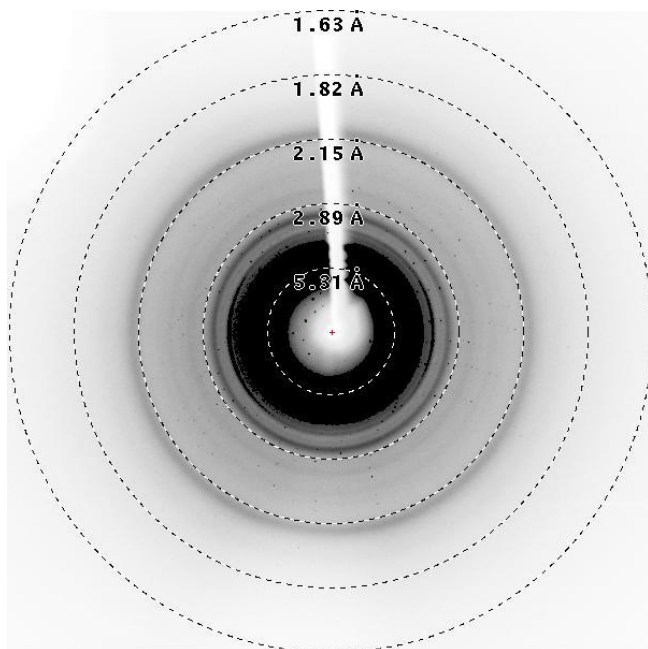
塗布面：片面

発数：30x2

結晶：Lysozyme



結晶の状態



X線回折写真

X線回折条件

露光時間：1min

測定距離：100mm

X線波長：1.54Å

振動角：0.5°

測定条件：乾燥防止用チップを被せた状態

X線回折結果

分解能：2.2Å

3.5.2 インクジェット利用時の課題

インクジェットを用いてゲル溶液を結晶に塗布する事が可能である事が判明したが、いくつかの課題が浮かび上がった。まず結晶の位置の調整が手作業で行われており作業に時間がかかる問題がある。作業中に結晶が乾燥してしまい結晶が損傷を受けていた可能性がある。また、結晶の形状や位置など異なる状況に合わせてゲル溶液を吐出させる事が出来ずに結晶に満遍なくゲル溶液を塗布させる状況であったため結晶にかけるゲル溶液の量が多く、結晶の溶媒濃度を変化させてしまい結晶に損傷を与え易い状況であった。また、ゲル溶液の吐出をインクジェットで行わせるためにゲル溶液の粘性を抑える必要があり、そのためゲル溶液の濃度が薄い状態で利用せざるを得なかった。しかし、低い濃度のゲル溶液ではゲル化に時間がかかり結晶へ損傷を与える可能性が高くなる。

3.6 インクジェットの安定動作条件の検討

マイクロジェット社の IJHD-100 及び IJHD-300 で吐出可能な溶液の最大粘度はおおよそ $40\text{mPa} \cdot \text{s}$ である。これはインクジェットとしてはかなり高い粘度の溶液を扱えるインクジェットノズルであるが、ゲル溶液の粘性は元々非常に高い。吐出可能な粘性に下げるために二つの対応が可能である。一つはゲル骨格の骨格長を短くする事、もう一つはゲル濃度を低く抑える事である。どちらの対応もゲル化速度を低下させてしまうデメリットがあるが、マイケル付加反応により短時間でゲル化する官能基の組み合わせの Tetra-PEG ゲルはインクジェットに適したゲル濃度及び骨格長の中でも十分なゲル化速度を実現した。

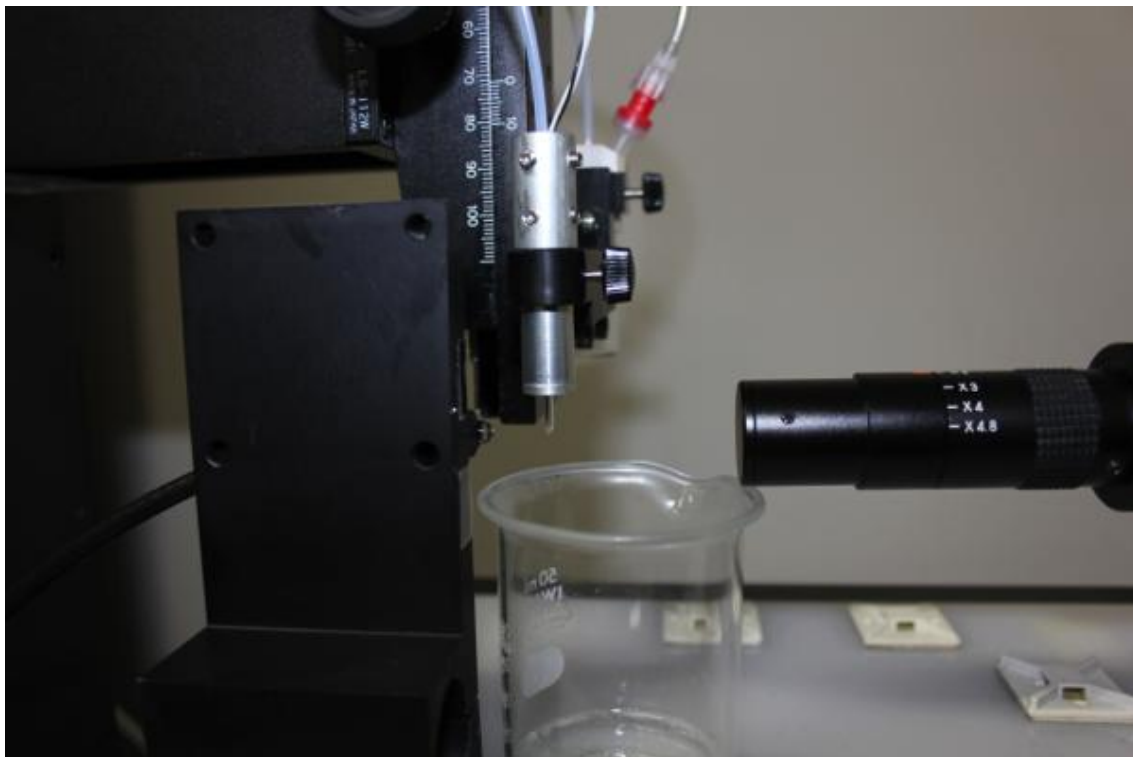


図 18 吐出実験の様子の特写図

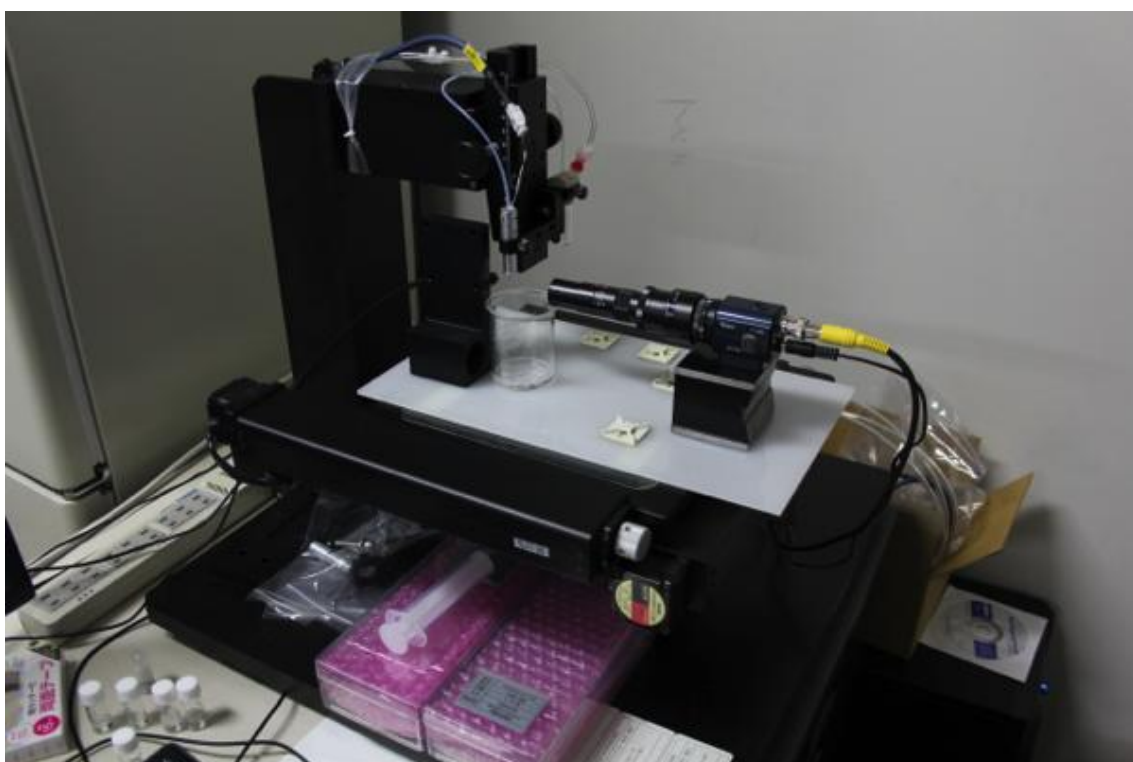


図 19 インクジェットの吐出条件の検討実験の様子

インクジェットでゲル溶液を吐出する時のパラメータは以下の通りである。

IJHD-100 駆動電圧 60.0V, 初期パルス幅 130 μ 秒, 2 次パルスなし

IJHD-300 駆動電圧 40.0V, 初期パルス幅 70 μ 秒, 2 次パルスなし

3.6.1 インクジェットヘッドへの溶液の充填

溶液の充填にはノズル先端からの吸い上げ方式を採用した。これには3つの理由がある。

一つ目はゲル溶液中に存在する不純物がインクジェットを詰まらせないようにするためである。ゲル溶液をフィルターなどで取り除こうとするとゲル濃度が低下してしまう。また、フィルターにゲル溶液がトラップされ有効利用できない溶液が出来てしまう。そのため流路の狭いノズル先端からゲル溶液を吸い上げる事で不純物がノズル内に進入することを防ぐ。

2つ目にインクジェットノズルは流路が狭く、少量の気泡が入るだけでも吐出が不安定になってしまう問題がある。これは粘性の高いゲル溶液を扱う時には更に顕著な問題として現れる。この問題はゆっくりとノズル先端からゲル溶液を吸い上げる事で解決できる。約 5kPa の負圧をノズルに加え 20～40 分程度の時間をかけゆっくりと 150 μ l のゲル溶液をノズル内に吸い上げて設置した。

3つ目の理由は利用する溶液量の削減のためである。一つの結晶固定に利用する溶液量は 1 μ l 以下である。しかし、ノズル上部から通常の方法でゲル溶液を充填した場合は 1000 μ l 程度の溶液を必要とする。一方ノズル先端からゲル溶液を充填する場合には最小で 150 μ l と少量の溶液から利用できる。そのため固定する結晶の数に合わせて無駄なく利用するゲル溶液量を最少に保つ事が出来る。

3.6.2 インクジェット先端の溶液の乾燥対策

インクジェットに充填したゲル溶液はノズル先端から徐々に水分の蒸発が進み濃縮される。濃縮が進むと上手くゲル溶液を吐出出来ない時や、場合によってはノズルが詰まってしまう事がある。そのためノズル先端の乾燥の進んだゲル溶液は定期的に捨てる必要がある。開発したシステムでは装置に設置される結晶を常に自動で認識を行い、結晶が装置に設置されていない時には3秒に一度の頻度でゲル溶液を捨てている。また、結晶へゲルを塗布する直前にも、結

晶に当たらない位置にゲル溶液を捨ててゲルの吐出動作の安定性を確保している。

3.6.3 液滴の運動エネルギーと空気抵抗

扱う液滴の大きさは雲を構成する水滴の大きさに相当するほど小さい。この大きさの水滴になると僅かな気流によって流されてしまう。そのため装置には覆いを取り付けてある。また、インクジェットにより与えられた速度（約 6m/秒）が空気抵抗により減速する前に結晶に到達する距離をシステムにより保っている。

塗布するゲル溶液の液滴 直径 5～20 μm	雲を構成する液滴 直径 3～10 μm	雨の液滴 直径 100～2000 μm
--------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

表 7 液滴の大きさ

3.7 結晶のソーキング用器具の開発

ゲルにより固定された状態の結晶のソーキングを行うためには既存のソーキング器具を利用出来なかったため新しく器具の制作を行った。

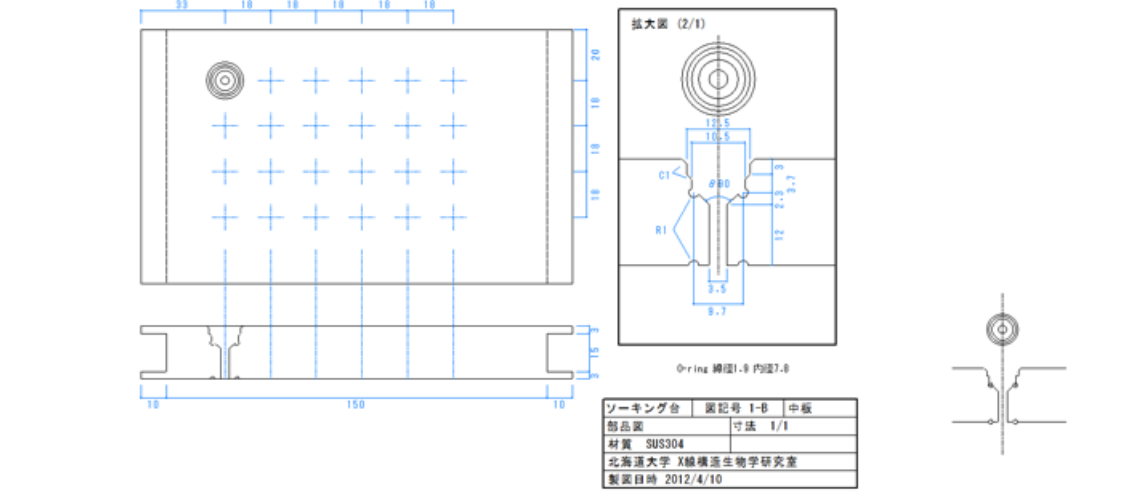
3.7.1 プレートを用いたソーキング器具



図 20 ソーキングの様子（模式図）

Technical drawing of a plate with dimensions and a grid of holes. The plate has a total width of 32 and a total height of 47. The width is divided into segments of 18, 18, 18, 18, 18, and 18. The height is divided into segments of 18, 18, 18, and 18. A grid of 5x5 holes is shown, with a central hole. The holes are spaced at intervals of 18 units. The plate is labeled 'ソーキング台' (Soaking Stand) and '図記号 1-A' (Diagram Symbol 1-A). The material is SUS304 and the thickness is 2t. The drawing is dated 2012/4/10.

ソーキング台	図記号 1-A	天板
部品図	寸法	1/1
材質 SUS304	厚さ	2t
北海道大学 X線構造生物学研究室		
製図日時 2012/4/10		



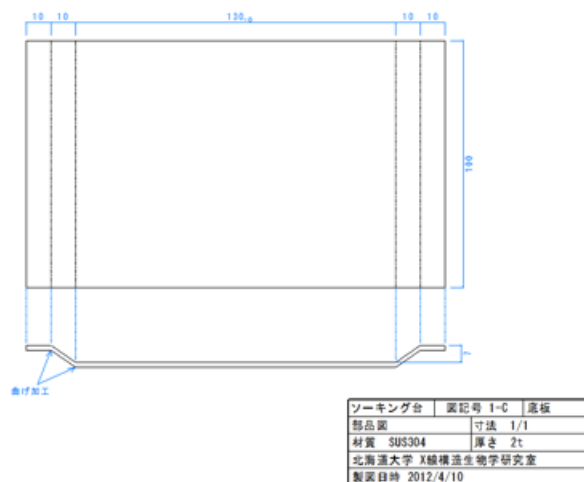


図 23 ソーキング器具の底板

3.7.2 チップを用いたソーキング器具

結晶のソーキングにはピンに対し覆いかぶせることで密閉できる器具を用い、結晶のみがリガンド入のバッファーに浸かる様にした。これにより結晶を最小量のバッファーに効率よくソーキングする事ができ、かつ密閉されているためバッファーの乾燥がなく長時間のソーキング作業にも対応できる。リガンドは物によって非常に高価なため最小量のバッファーでソーキングを行える事は重要である。また、この方法により実際に 1 週間のソーキングを行いバッファーの乾燥が観測出来る範囲では無く有用である事が判明した。

ピンを覆いかぶせる器具にはピペットチップ（WATSON 社製 120-204C）を利用した。この事により既存の器具であるピペットを用いて溶液を扱える利点がある。18mm のピンを用いた場合は約 $17\mu\text{l}$ のバッファーを計り採ると結晶のみを綺麗に浸すことができる。バッファーの測量後にチップの先端を半田ゴテにより軽く溶解して密封した。このチップをピンに被せる事で結晶のみをソーキングした状態で密閉できる。チップは柔軟性がありチップに密着するため完全に密閉が可能である。

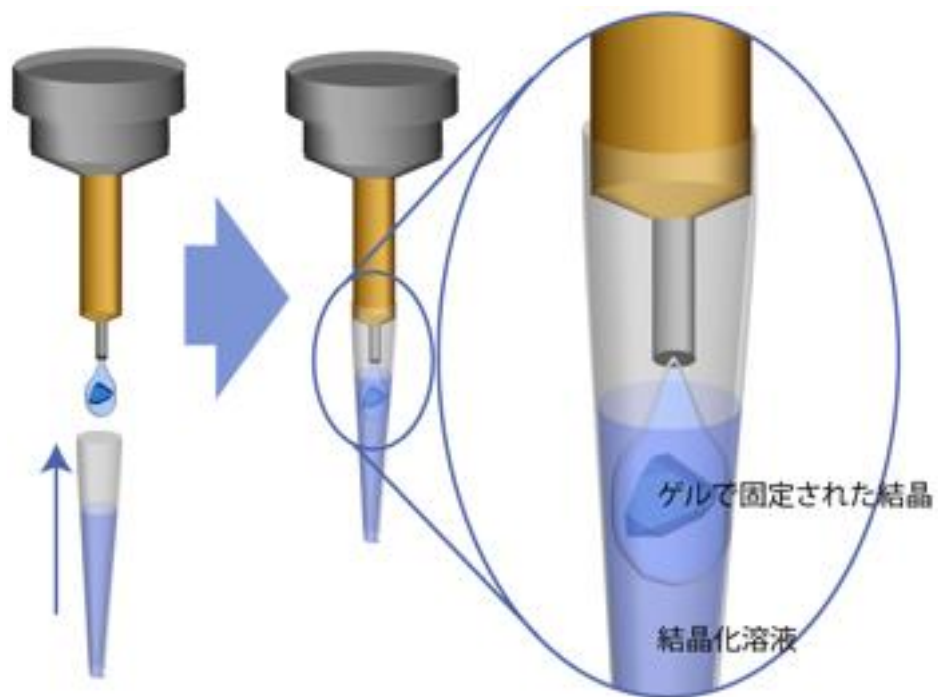


図 24 結晶ソーキングの模式図



図 25 左：ソーキング中の様子 右：ソーキング前の様子

3.8 結晶をゲルで固定するシステムの開発

インクジェットを利用した場合でも手作業による結晶の位置調整を行っている場合には作業時間が長く結晶の乾燥が進んでしまう問題があったため、全ての作業を自動化させる事で解決を図った。

3.8.1 システム構成

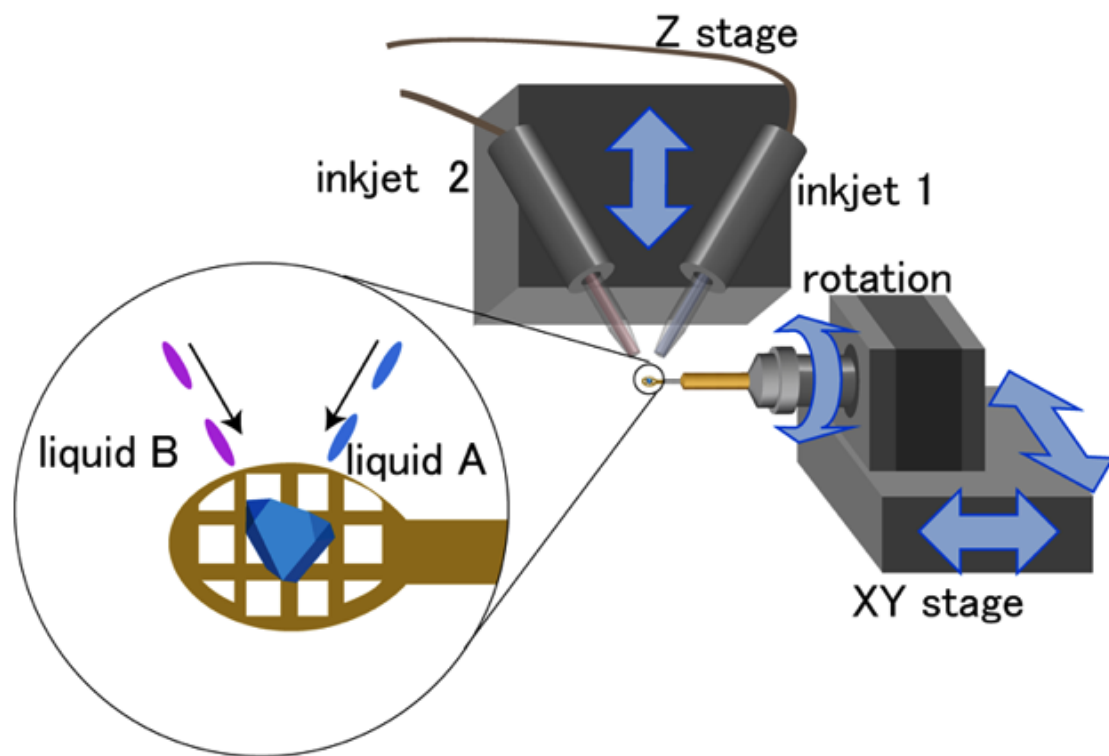


図 26 システムのモデル図

システムの全体の構成

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構成している。ステージと回転モーターは制御回路を介し、パソコンにより制御されている。

システムの機械構成

システムはインクジェットと 3 個の移動ステージ、1 個の回転モータ、CCD カメラ、情報を処理するパソコンから成っている。

結晶固定装置に必要な機能

結晶固定システムに必要とする機能は以下の通りである。

1. 結晶の形状を高速に自動認識する機能
2. 結晶の形状から自動的にゲルを塗布するストラテジの構築
3. 精密に目的の位置へゲルを塗布する機能

システムの動作

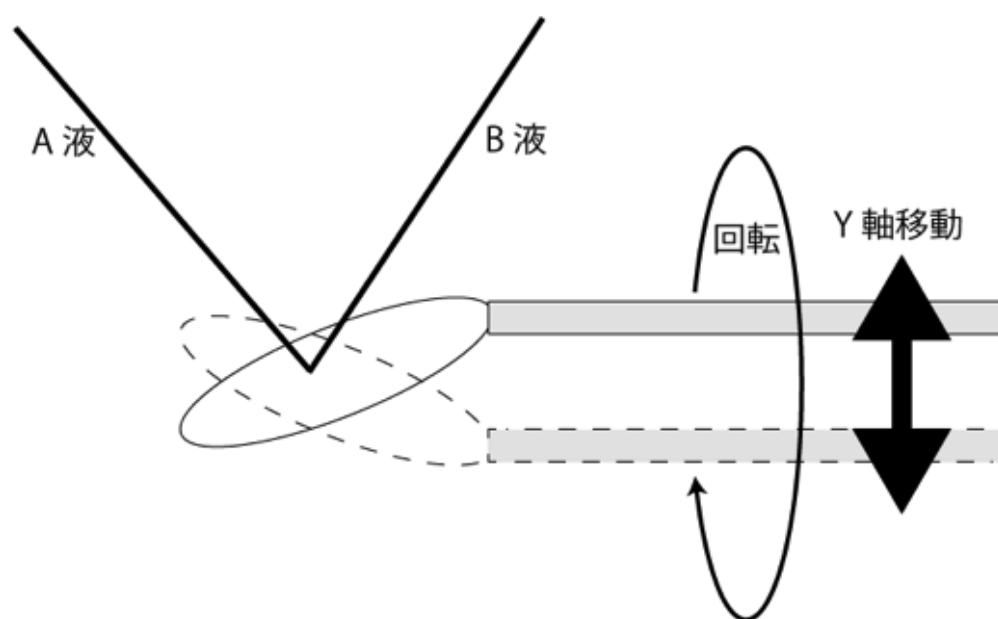


図 27 床に対し水平方向の位置は結晶を移動させる事で補正する

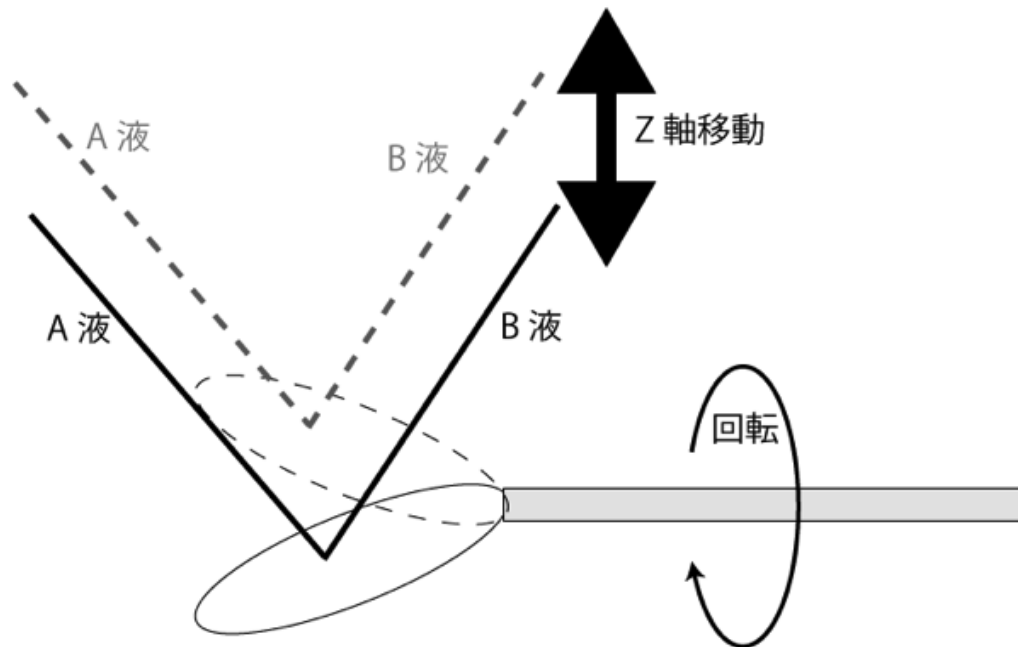


図 28 床に対し垂直方向の位置はインクジェットノズルを移動させる事で補正する

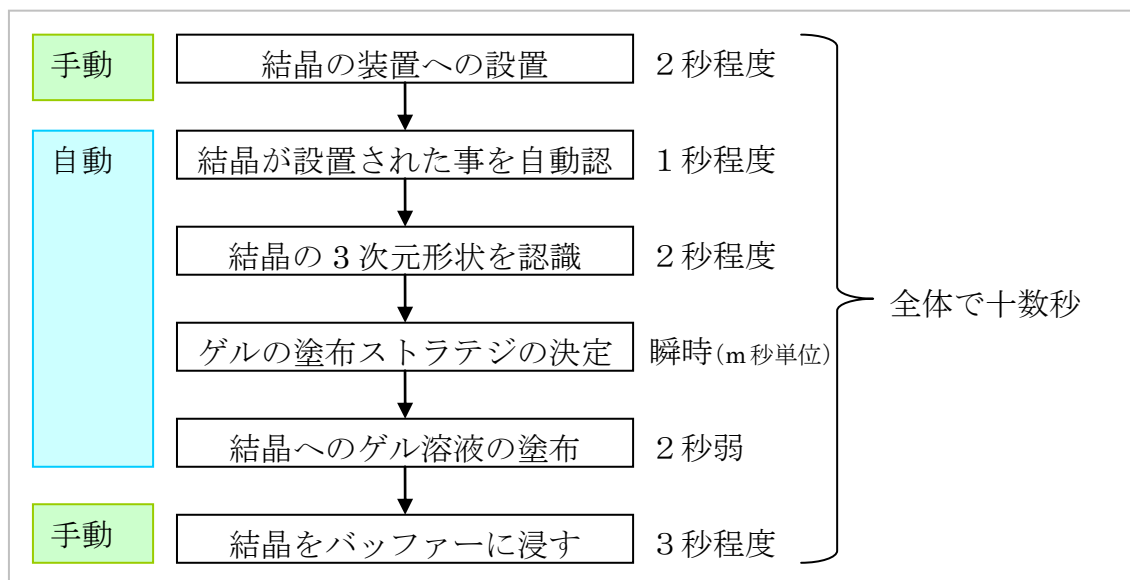


図 29 システムの全体の流れ

3.9 機械機構

システムの機械部分で制御する必要がある箇所は XYZ ステージ、回転ステージ、インクジェットの吐出制御の 3 カ所である。それぞれパソコンからの命令により動作する様に回路を作成した。

3.9.1 制御回路

回転機構および移動ステージ、インクジェットの吐出の制御のために専用の制御回路を作成した。制御回路はパソコンとの通信の必要性和回路の簡略化のため PIC マイコンを搭載している。PIC マイコンは主に 8bit（近年は 16bit 以上の物も販売されている）の小型プロセッサであり安価かつ小型でありながら演算回路からメモリ、多数の I/O を有するマイクロチップ社が販売するマイコンである。同様のマイコンの中に ARV マイコンや H8 マイコン、SuperH マイコン等が存在する。その中でも PIC マイコンは数百円と安価であるため試行錯誤に困らない。また、情報もインターネット上で豊富に存在するため本研究でも利用した。

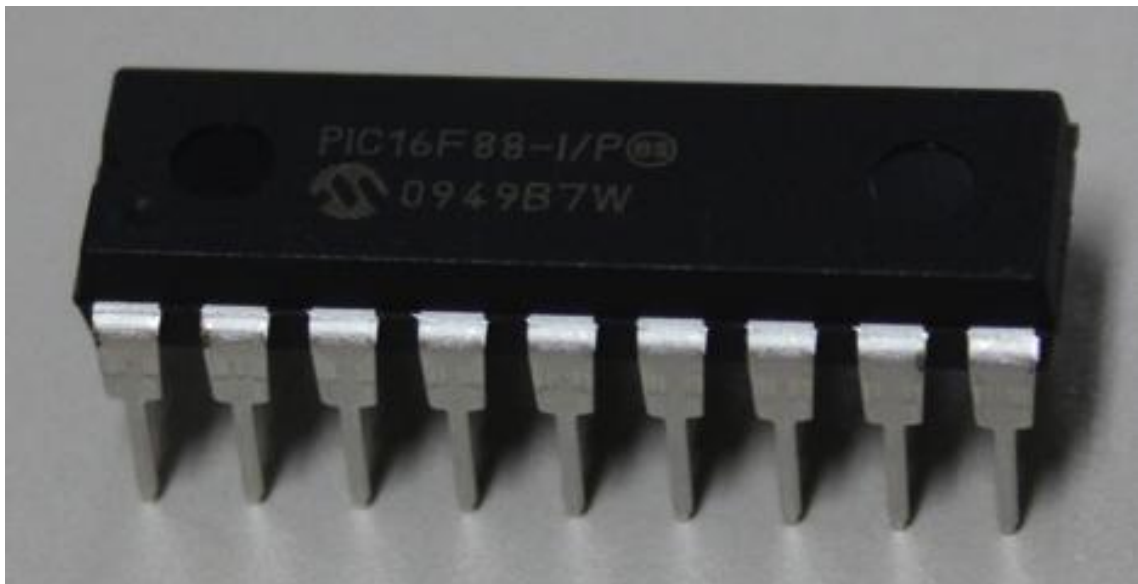


図 30 PIC マイコン

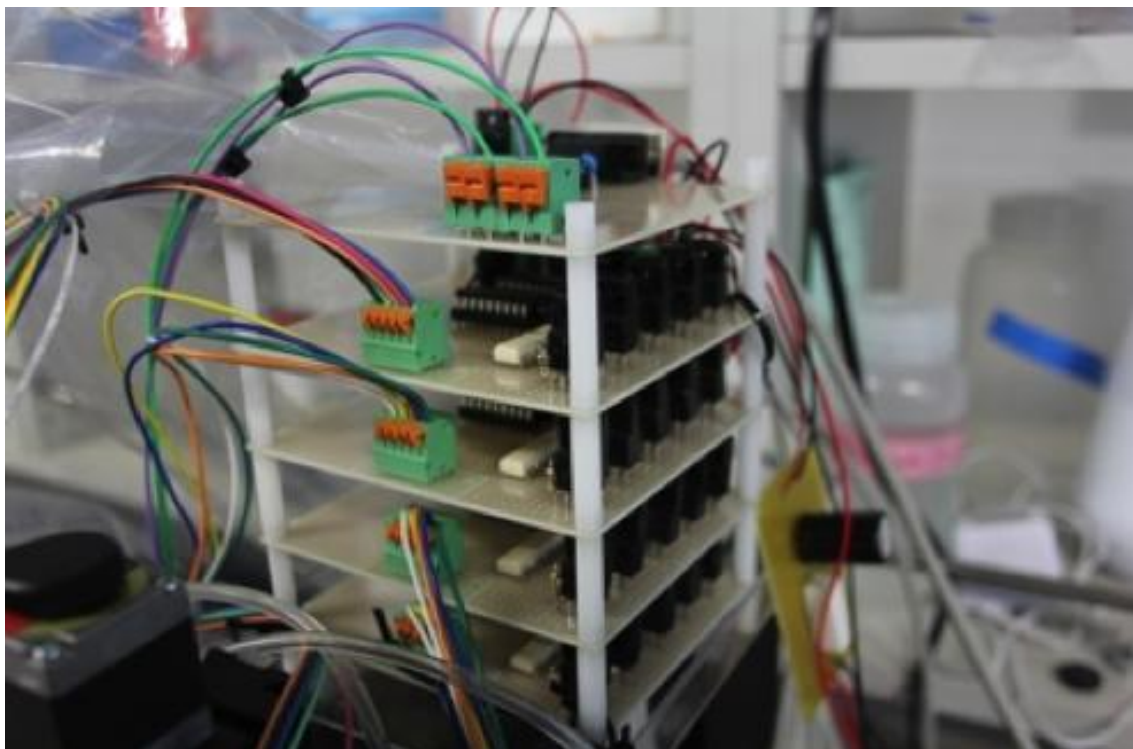


図 31 制作した制御回路

3.9.1.1 パソコンと制御回路間の通信

現代のパソコンには直接 ON/OFF の制御を行えるパラレル通信端子（通称プリンタ端子）を備えていない。そのため多くのパソコンに搭載されている USB 端子を介して通信を行なう必要がある。USB による PIC マイコンの直接制御も可能であるが、今回はより普及している RS-232 通信端子（通称モデム端子）を利用した。PIC マイコンには RS-232 通信と互換性のある USART 通信モジュールを搭載している。RS-232 通信と USART の違いは主に通信信号の電圧の差にある。そのため PIC のマイコンと電圧変換回路を繋ぐ事で仲介した。また、RS-232 ケーブルは USB・RS-232 変換コネクタを利用しパソコンの USB 端子につなげている。これによりパソコン側からのシリアル通信で回路を制御する事が出来るようになっている。

3.9.1.2 マイコンのプログラム

アセンブリ言語

アセンブリ言語とは機械を動作させるための言語で人間にも可読な形式で記述した低水準言語である。ここで言う低水準とはハードウェアに近いという意味である。対応表があればアセンブリ言語はおおよそそのまま 0 と 1 の羅列に変換でき、そのまま機械を動作させることが出来る。

パソコンと異なりマイコンでは計算速度もメモリも非常に限られているため、最大限に有効活用するためにアセンブリ言語でプログラミングを行っている。

下記はパソコンと RS-232 通信を行いインクジェットの吐出信号を制御するプログラムの部分である。

プログラムは下記の URL のサイトを参考にした。

http://homepage3.nifty.com/mitt/pic/pic88_07.html

```

LIST      P=16F88

INCLUDE  P16F88.INC
ERRORLEVEL  -302,-306

__CONFIG __CONFIG1,  _INTRC_IO & _WDT_OFF & _PWRTE_ON & _CP_OFF & _BODEN_OFF
& _LVP_OFF & _CPD_OFF & _DEBUG_OFF & _MCLR_OFF


CBLOCK    021h          ;GPR(汎用 RAM)定義
POI
WK
TM1
TM2
TM3
INT_RIGHT
INT_LEFT
PA
PB
CNT50us
CNT05ms
CNT1ms
CNT5ms
CNT01s
CNT1s
snd_IX      ;送信文字列インデックス
rcv_char    ;RS232C 受信文字
work
TMP
TMP2
ENDC


ORG        0x0000
GOTO       START


ORG        0x0004
GOTO       START


START

BSF        STATUS,RP0
CLRF       ANSEL
CLRF       TRISA      ;全て出力に設定
MOVLW     H'04'
TRIS       PORTB
;
<<オシレータ設定>>
MOVLW     074h
MOVWF     OSCCON      ;CLOCK=8MHz
;
<<TMR0 割込み設定>>
MOVLW     80h          ;TMR0 プリスケール : 2 (0.5  $\mu$  S*2=1.0  $\mu$  S)
MOVWF     OPTION_REG  ;
;
<<RS232C 設定>>
MOVLW     024h
MOVWF     TXSTA        ;送信有効,非同期,8bit,高速

```

```

    MOVLW    d'51'
    MOVWF    SPBRG        ; 9600bps
    BCF      STATUS,RP0    ; ■バンク 0 に切替え

    MOVLW    H'00'
    MOVWF    PORTA
    MOVWF    PORTB
    MOVLW    D'01'
    MOVWF    INT_LEFT
    MOVWF    INT_RIGHT

    MOVLW    2
    MOVWF    WK

    MOVLW    090h
    MOVWF    RCSTA        ; シリアルポート有効,8bit,連続受信可

MAIN
    MOVLW    H'00'
    MOVWF    PORTA
    CALL     wait1ms
    CALL     wait1ms
    CALL     RECEVE        ; 232 から受信
    CALL     RIGHT_START
    CALL     LEFT_START
    CALL     wait50us
GOTO    MAIN

RIGHT_START
    DECFSZ   INT_RIGHT,W
    GOTO     RIGHT_CONTENT
    RETURN

RIGHT_CONTENT
    DECF     INT_RIGHT,F

    DECFSZ   INT_RIGHT,W
    GOTO     RIGHT_CONTENT3
    GOTO     RIGHT_CONTENT2

RIGHT_CONTENT2
    MOVLW    "R"            ; 回転終了時に R を送信
    MOVWF    TXREG          ; 送信バッファにデータ格納
RIGHT_CONTENT3

    BSF      PORTA, 1
    RETURN

LEFT_START
    DECFSZ   INT_LEFT,W
    GOTO     LEFT_CONTENT
    RETURN

LEFT_CONTENT
    DECF     INT_LEFT,F

```

```

        DECFSZ    INT_LEFT,W
        GOTO     LEFT_CONTENT3
        GOTO     LEFT_CONTENT2
LEFT_CONTENT2
        MOVLW     "R"                ;回転終了時に R を送信
        MOVWF     TXREG              ; 送信バッファにデータ格納
LEFT_CONTENT3

        BSF       PORTA, 0
        RETURN

RECEIVE
        BCF       STATUS,RP0        ;■バンク 0 に切替え
        BTFS      PIR1,RCIF ; 受信データあり？
        RETURN      ;NO
        MOVF      RCREG,W           ; 受信データ取り出し
        MOVWF     TMP
        BTFS      TMP,7             ;127 より大きい時右回転
        GOTO      SAVE_RIGHT

        MOVWF     INT_LEFT
        RETURN

SAVE_RIGHT
        MOVWF     INT_RIGHT
        BCF       INT_RIGHT,7
        RETURN

;***** タイマルーチン *****

;***** 1s タイマ *****
wait1s
        MOVLW     d'10'
        MOVWF     CNT1s

wait1sL
        CALL      wait01s
        DECFSZ    CNT1s,F
        GOTO      wait1sL
        RETURN

;***** 100ms タイマ *****
wait01s
        MOVLW     d'200'
        MOVWF     CNT01s

wait01sL
        CALL      wait05ms
        DECFSZ    CNT01s,F
        GOTO      wait01sL
        RETURN

;***** 5ms タイマ *****
wait5ms
        MOVLW     d'10'

```

```

        MOVWF    CNT5ms
wait5msL
        CALL     wait05ms
        DECFSZ   CNT5ms,F
        GOTO     wait5msL
        RETURN

;***** 1ms タイマ *****
wait1ms
        MOVLW    d'2'
        MOVWF    CNT1ms
wait1msL
        CALL     wait05ms
        DECFSZ   CNT1ms,F
        GOTO     wait1msL
        RETURN

;***** 0.5ms タイマ *****
wait05ms
        MOVLW    d'249'
        MOVWF    CNT05ms
wait05msL
        NOP
        DECFSZ   CNT05ms,F
        GOTO     wait05msL
        RETURN

;***** 50us タイマ *****
wait50us
        MOVLW    d'25'
        MOVWF    CNT50us
wait50usL
        NOP
        DECFSZ   CNT50us,F
        GOTO     wait50usL
        RETURN

END

```

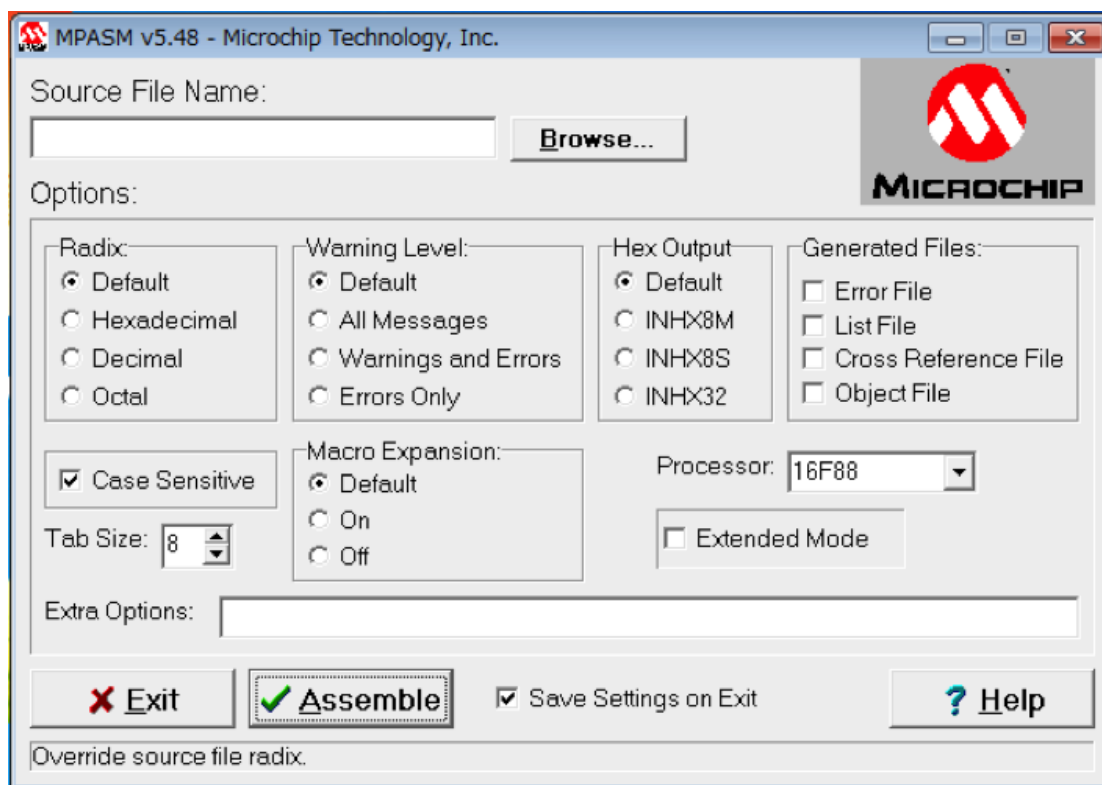


図 32 PIC マイコンのマシン言語用コンパイラ

アセンブリ言語で書かれたプログラムは Microchip 社製の MPASM アセンブラでマシン語に変換した。

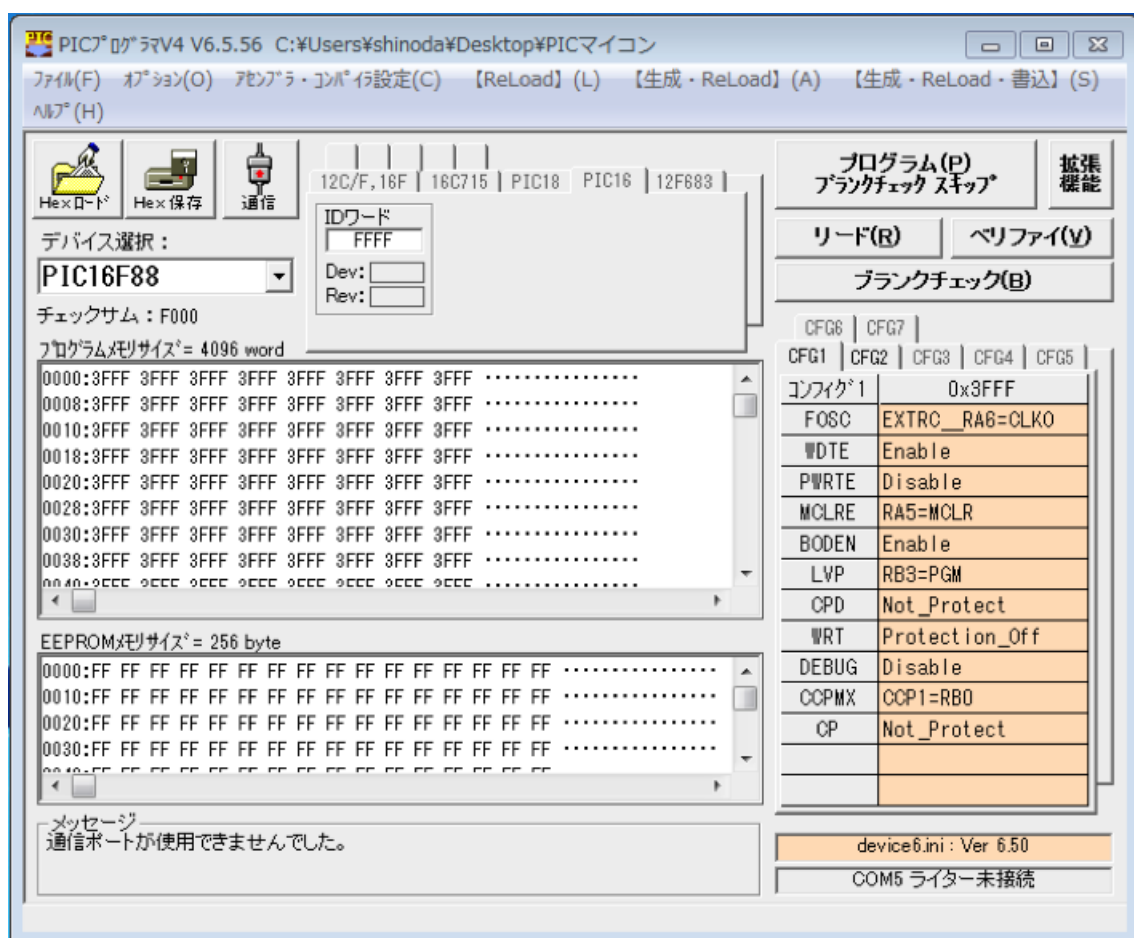


図 33 コンパイルされたプログラムを PIC マイコンに書き込むためのソフトウェア

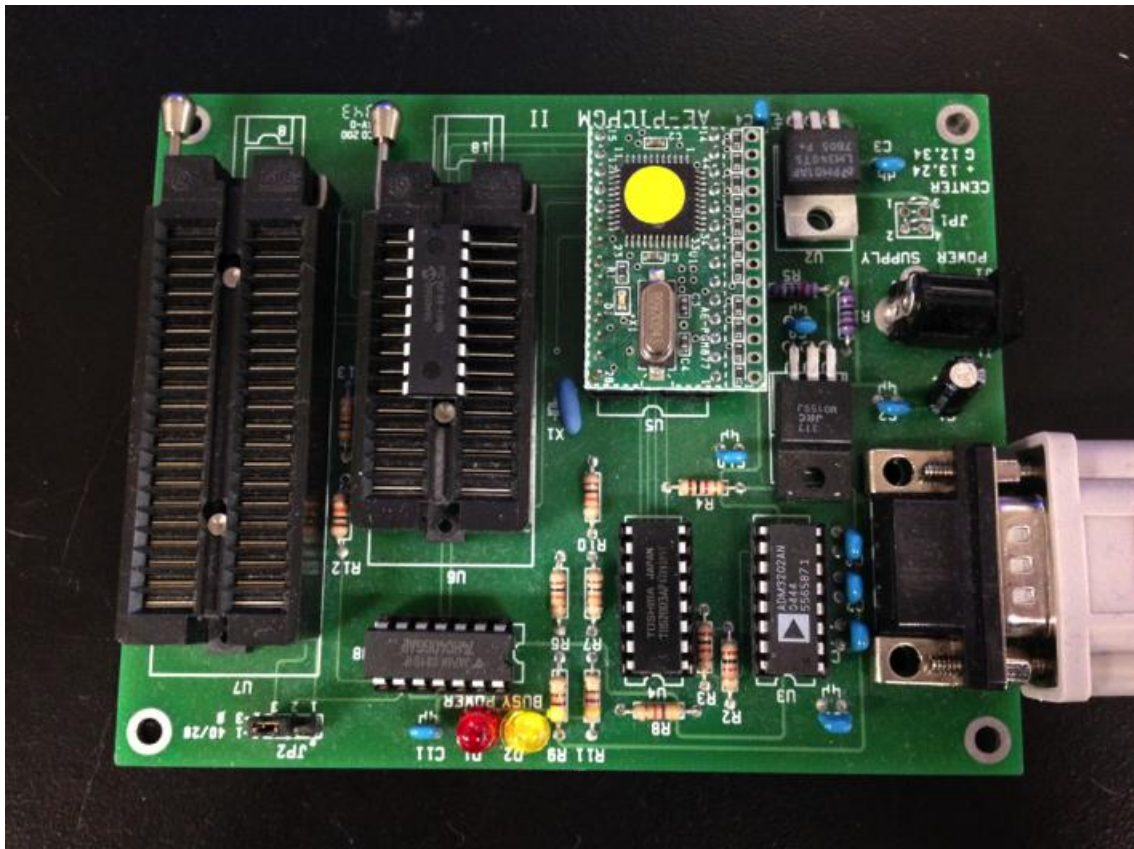


図 34 PIC マイコンにプログラムを書き込む様子（秋月電子通称社の AKI-PIC プログラマ Ver4 を利用）

3.9.1.3 インクジェットの制御

インクジェット装置にはTTLレベルのトリガ信号により吐出を制御出来る仕組みが取り付けられている。制御回路からこのトリガ信号を指定したタイミングで指定回数の送信を行なうことで制御した。

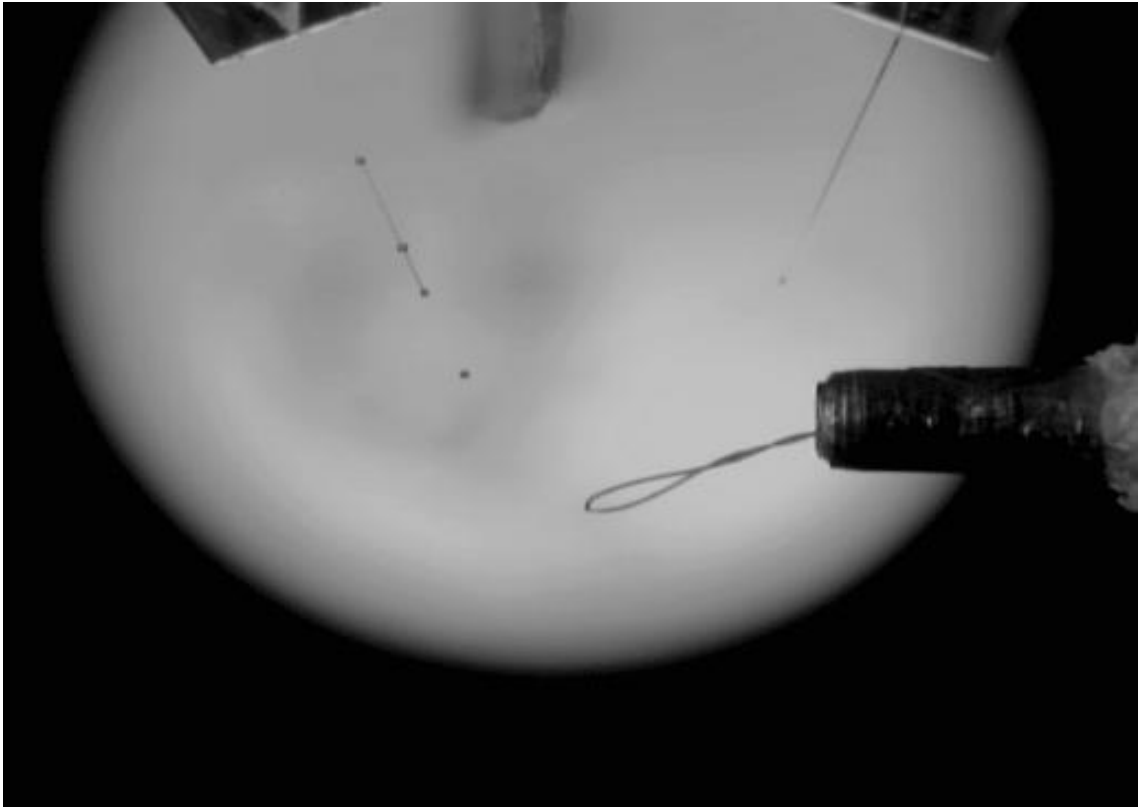


図 35 装置に設置されたインクジェットによるゲル溶液の吐出の様子

3.10 ソフトウェア構成

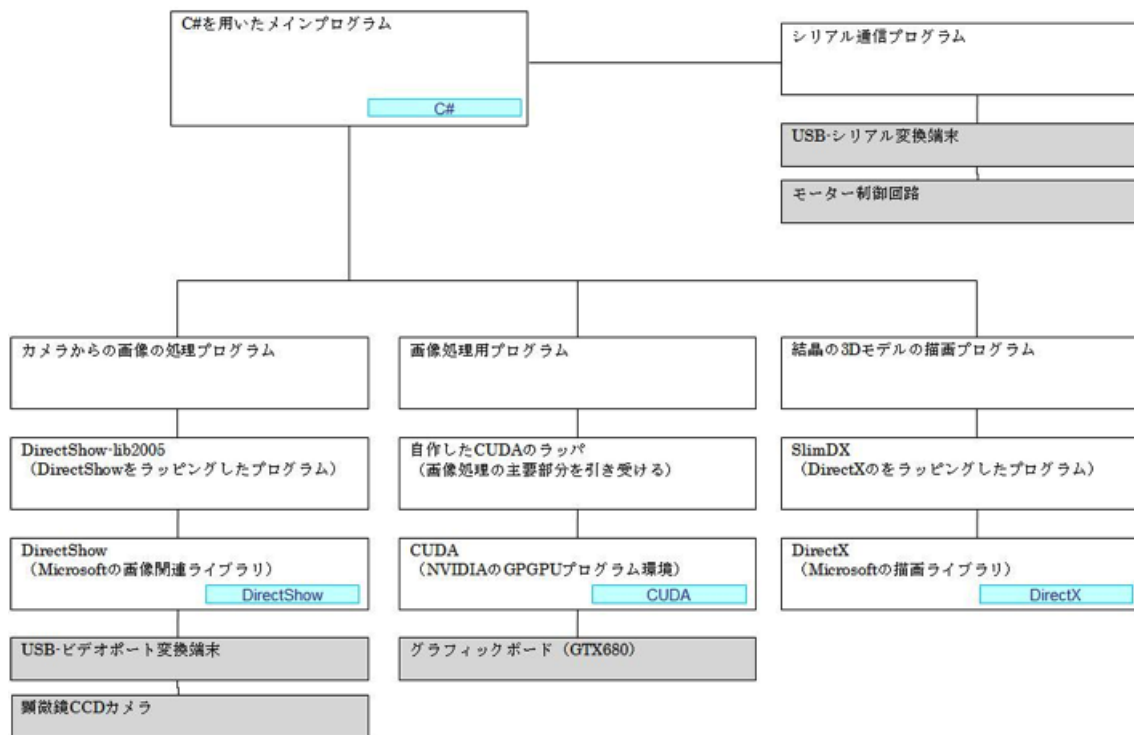


図 36 ソフトウェア構成

3.10.1 画像処理による結晶の3次元認識

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た。

3.10.1.1 照明の調整

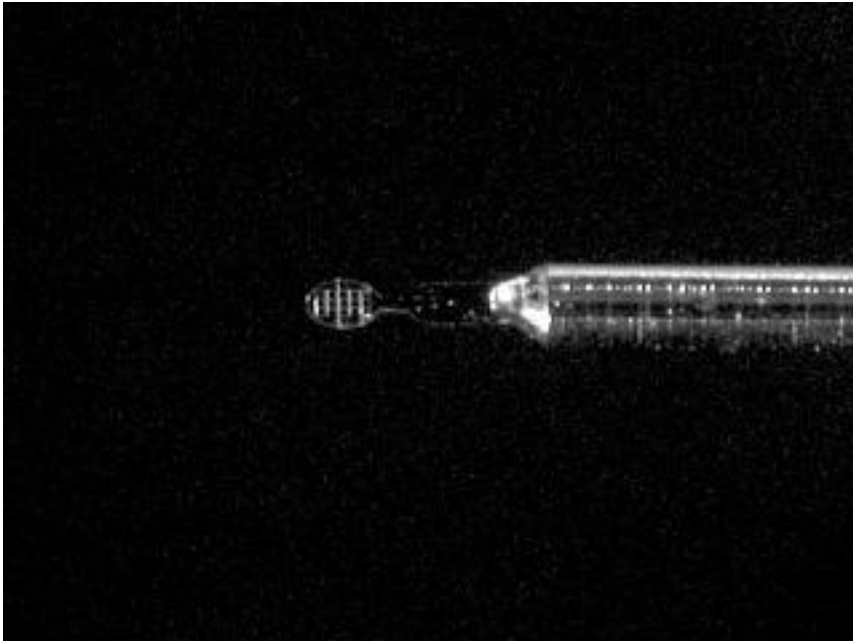


図 37 前面からの照明

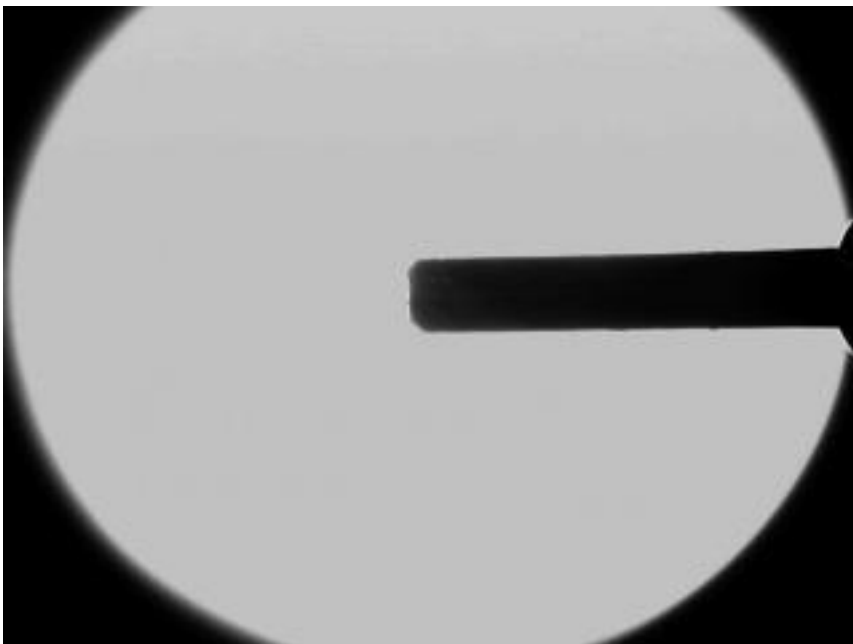


図 38 背面からの照明

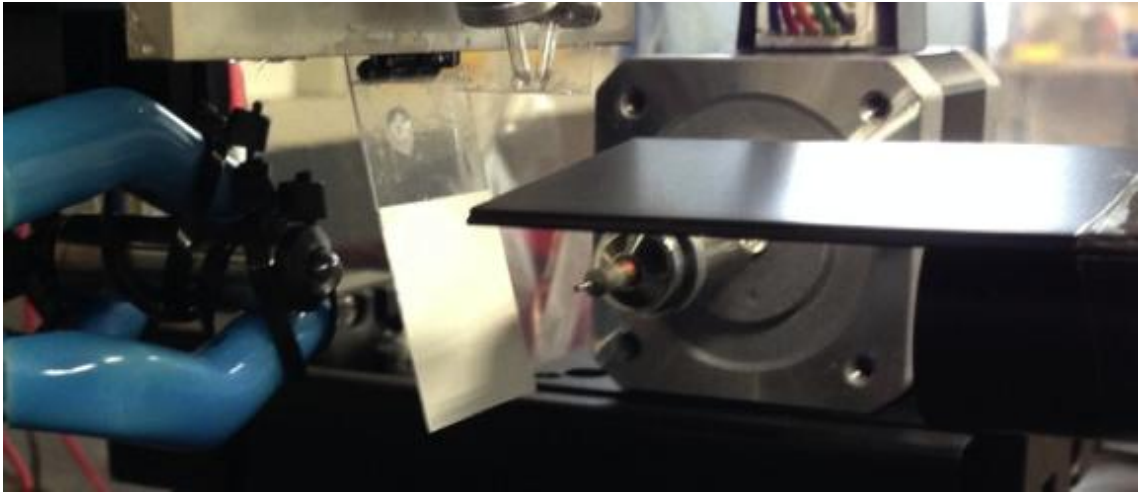


図 39 照明の配置の写真

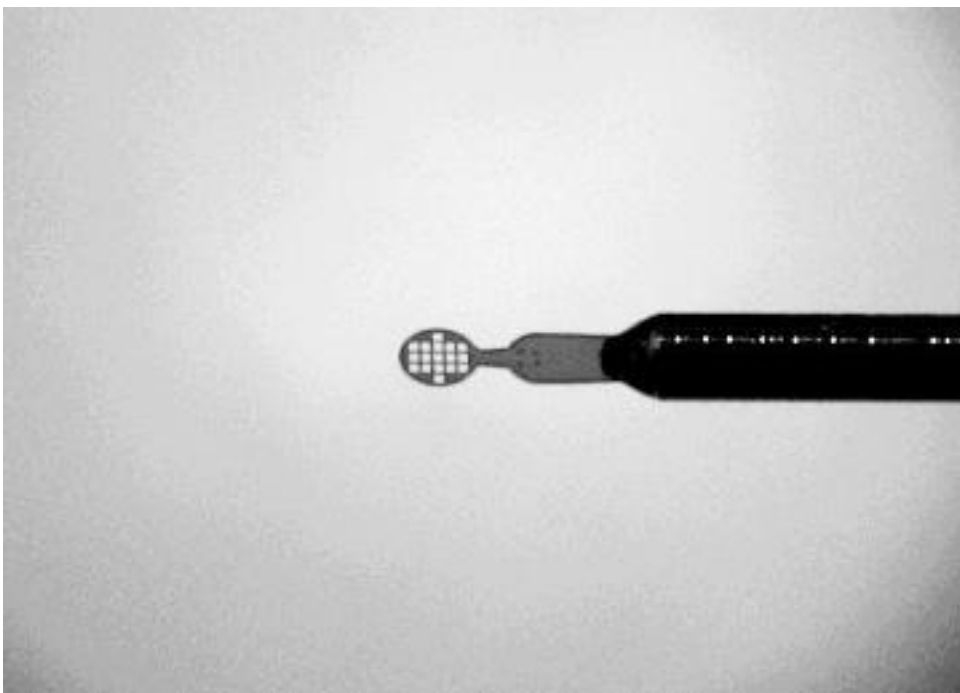


図 40 拡散板を配置した背面からの照明

3.10.1.2 2D 画像から 3D モデルの構築

回転させる物体の側面からその形状を撮影した映像は、その物体のラドン変換になる。また、撮影した画像のラドン逆変換により元の物体の形状を得ることが出来る。

ラドン変換はある関数 $\mu(x, y)$ に対して下記のように定義される。

$$p(s, q) = - \int_0^\infty (s \cos q - t \sin q, s \sin q - t \cos q) dt$$

数式 1

3.10.1.3 CUDA による高速化

パソコンに搭載されている主演算回路である CPU は、演算コアの数が最新の物でもせいぜい 8 個しか搭載されていない。しかし、グラフィック専用の演算回路である GPU（グラフィックボード）には最新のもので 2688 個（NVIDIA 社の GeForce GTX TITAN の場合）も搭載されている。この大量の演算回路を利用して並列演算を行なうことで高速な演算を行なおうとする試みが GPGPU である。その一つの環境に NVIDIA 社の提唱する CUDA がある。CUDA では C++ に似た CUDA 言語により記述されたプログラムを GPU 上で超並列演算を行なう。この CUDA 技術により数倍から数万倍の高速化を行なうことが出来る（プログラムの相性により高速化の度合いは異なる）。

3.10.2 画像処理により構成されたモデル

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。



図 41 結晶の顕微鏡カメラ画像



図 42 画像認識により構築したモデル（左）同じモデルを 90 度回転させた図（右）

3.10.1 複数のプログラム言語間の融合

システムの制御用ソフトウェアはカメラの制御からユーザーインターフェイス、3DCG の描画、CUDA による並列計算と複数の機能を備えており、それらの全てが同一プログラミング言語で実装されていない。そのため、異なるプログラム言語間の仲介を行なう必要がある。この機能を実現するために個々の機

能のラッピングを行った。これにより全ての機能を C#から制御する事が可能になった。

3.11 完成したシステム

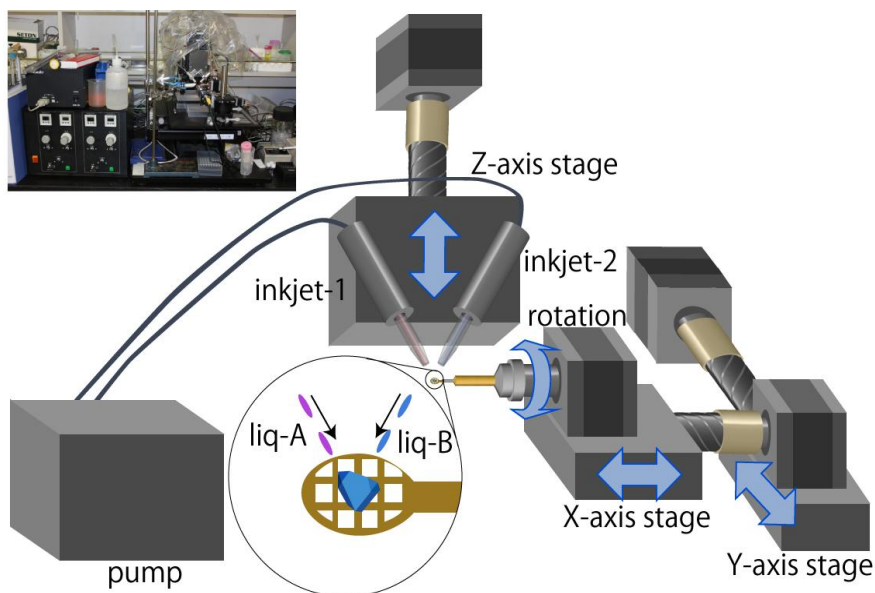


図 43 システムの概略図

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 技術を用いた。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事が可能となった。

4 結果

結晶のゲル固定システムを用いて $100\text{ }\mu\text{m}$ ~ $1000\text{ }\mu\text{m}$ サイズの各種のタンパク質の結晶をループに固定出来た。これにより創薬スクリーニングで利用される大多数の結晶に対して本システムを利用できると考えられる。また、一度ゲルで固定した結晶は 1 週間以上の時間を置いてもループから外れることなく安定していたため長時間のソーキングも行なう事ができる。

結晶を固定する際にゲルにより結晶が損傷を受けることもなく、またゲルの量もデータの質を低下させない範囲で十分に少なく出来た。

固定に用いたループは Protein Wave 社の Mounted LithoLoops 0.4 Φ Mesh Type であり HAMPTON の 16mm Copper ベースに取り付けて利用した。メッシュ状のループを利用した時にはナイロンループを用いた時に比べ、安定して結晶をループに固定できる事が経験的に判明している。

4.1 結晶の固定

開発したシステムを用いて Trypsin 結晶をゲルで固定した。Trypsin 結晶の大きさは $100\text{ }\mu\text{m}$ 程度である。

結晶をループで拾った後、ゲル固定システムにループを設置した。システムは設置した結晶の 3 次元モデルを自動的に作成し、認識した結晶の位置にゲル溶液を塗布する。



図 44 ゲルを結晶にかける様子。(左) 顕微鏡カメラの画像 (右側) 構築した 3 次元モデルであり、灰色の部分がループ、緑色の部分が結晶として認識された部分である。また、赤及び青のマーカーはゲルをかける位置として決定した場所である。

認識した結晶のモデルに付けられたマーカーのそれぞれに Tetra-PEG ゲルの A 液および B 液を合わせて 0.8nl 塗布する事で結晶を固定する。A 液は PTE-100MA 10%(w/v) に TEMED 2mM を加えた溶液であり B 液は PTE-100SH 10%(w/v)である。TEMED は A 液のゲルの官能基 (マレイミド) と B 液の官能基 (チオール) のマイケル付加反応の触媒である。

結晶にゲルをかけた後はゲルが結晶周りに綺麗に薄く覆っている。ゲルによる結晶の固定は北海道大学で行い、乾燥防止用の結晶化バッファにソーキングした状態で Photon Factory まで運搬した。結晶の固定から 3 日後に BL5A でデータ測定を行った。

ゲルに固定された結晶は、DMSO に 100mM の濃度で溶かしたりガンド (Tryptamine) を 10%の濃度で Trypsin の結晶化溶液に混ぜた溶液に対し、20 分間ソーキングを行った。ソーキング後に 100K の窒素気流で凍結を行い、デ

ータの測定を行った。データは XDS を用いて積分を行い、phenix.refine を用いて精密化を行った。

4.1.1 Lysozyme 結晶の固定

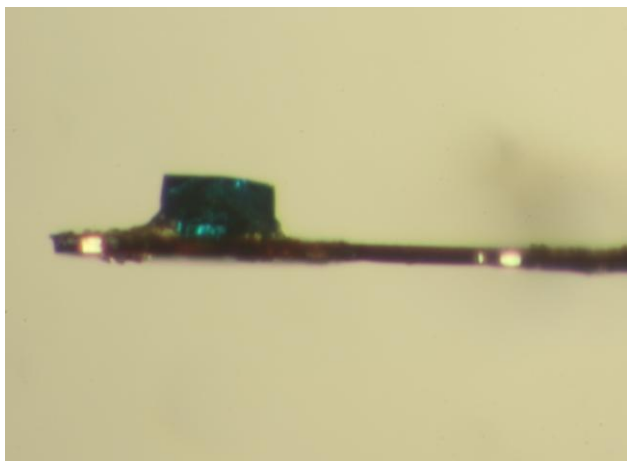


図 45 ゲルで固定した Lysozyme 結晶の側面写真。結晶は HAMPTON 社の Izit で染めている。

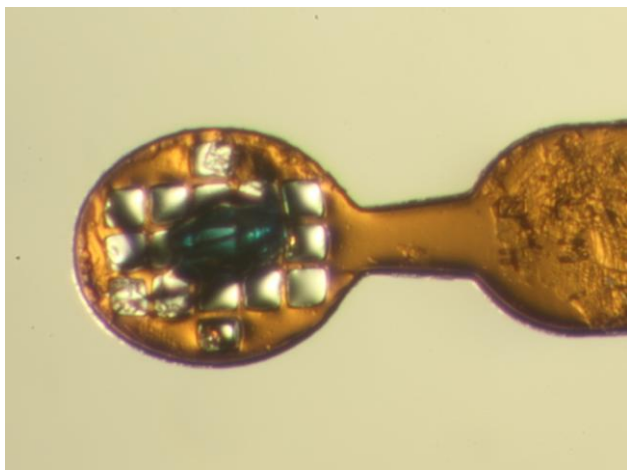


図 46 ゲルで固定した Lysozyme 結晶の正面写真。結晶は HAMPTON 社の Izit で染めている。

4.1.2 Trypsin 結晶の固定

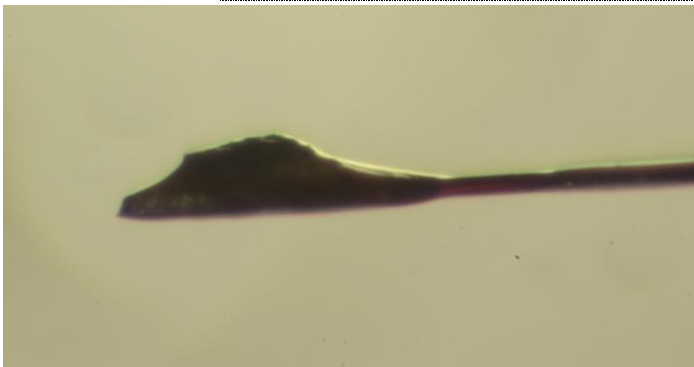


図 47 ゲルで固定した Trypsin 結晶の側面写真。結晶は HAMPTON 社の Izit で染めている。

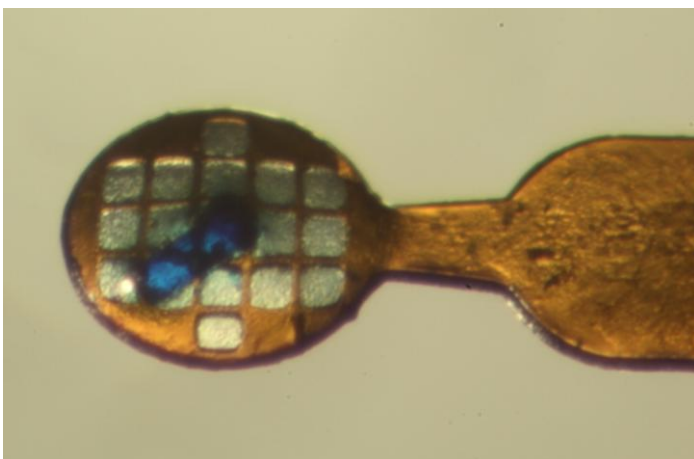


図 48 ゲルで固定した Trypsin 結晶の正面写真。結晶は HAMPTON 社の Izit で染めている。

4.1.3 GatCAB 結晶の固定

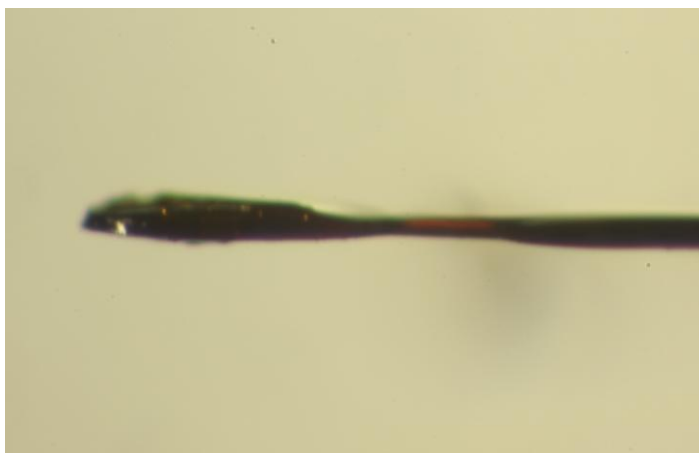


図 49 ゲルで固定した GatCAB 結晶の側面写真。結晶は HAMPTON 社の Izit で染めている。

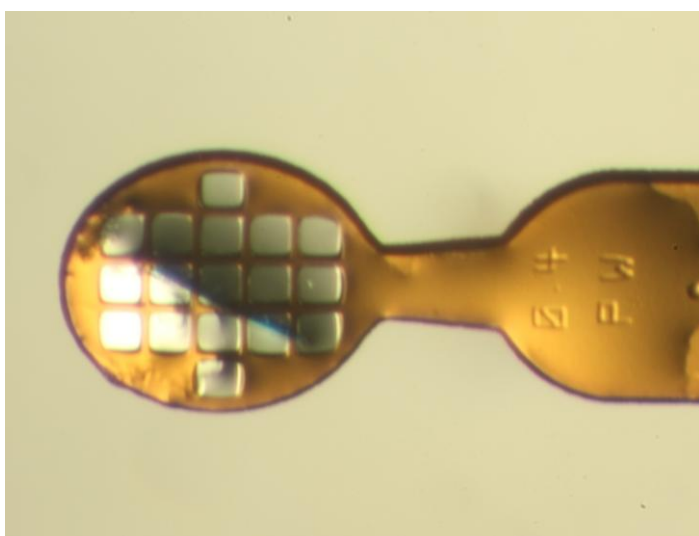


図 50 ゲルで固定した GatCAB 結晶の正面写真。結晶は HAMPTON 社の Izit で染めている。

4.1.4 CesZ 結晶の固定

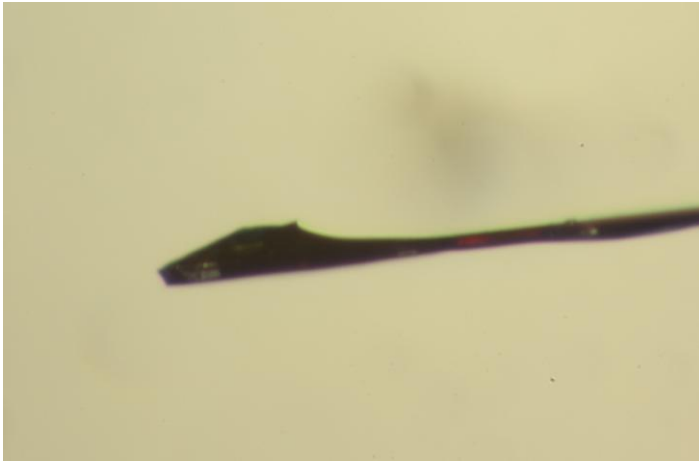


図 51 ゲルで固定した CesZ 結晶の側面写真。結晶は HAMPTON 社の Izip で染めている。

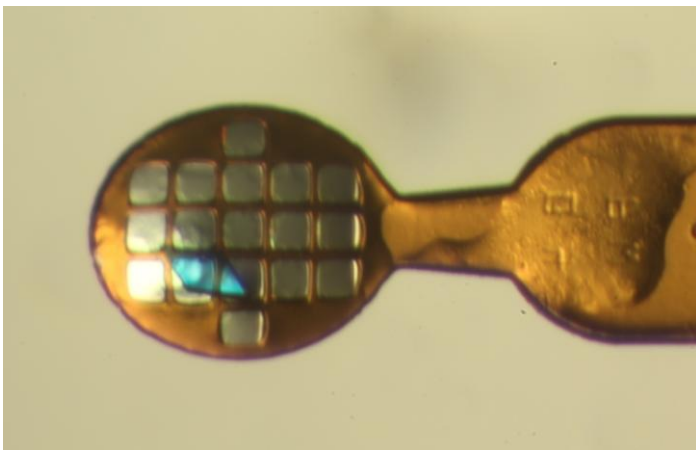


図 52 ゲルで固定した CesZ 結晶の側面写真。結晶は HAMPTON 社の Izip で染めている。

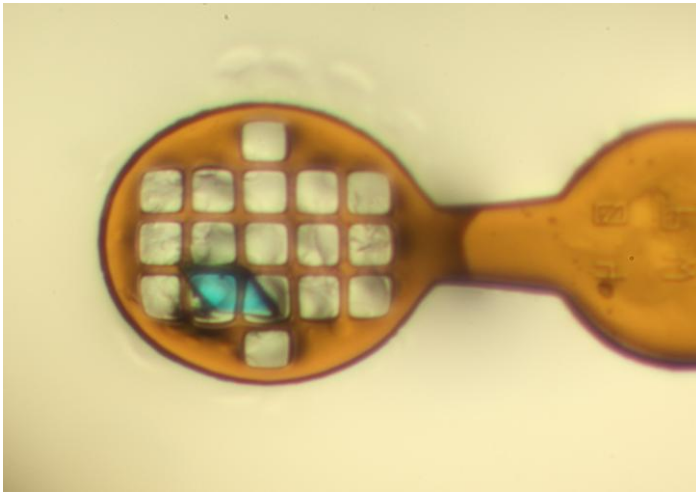


図 53 ゲルで固定した CesZ 結晶をバッファー内で撮影した正面写真。薄いゲルの層が結晶を覆っている。結晶は HAMPTON 社の Izipit で染めている。

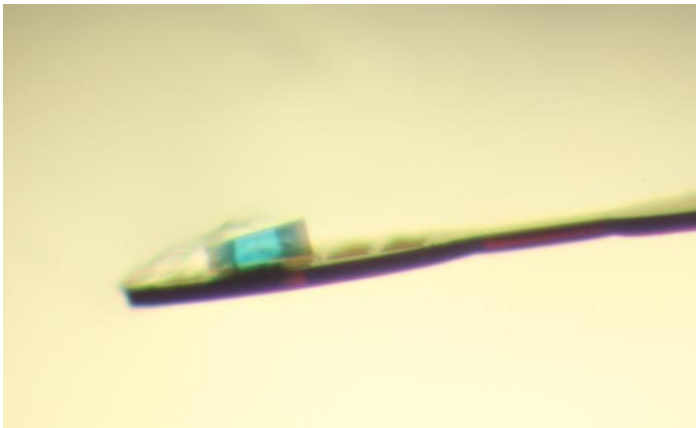


図 54 ゲルで固定した CesZ 結晶をバッファー内で撮影した側面写真。薄いゲルの層が結晶を覆っている。結晶は HAMPTON 社の Izipit で染めている。

4.1.5 結晶固定の結晶性への影響

結晶のゲルを用いた結晶の固定による悪影響は観測されなかった。

Protein	Trypsin ¹⁾	Trypsin ²⁾	Lysozyme ³⁾	Lysozyme ⁴⁾	EF2D2 ⁵⁾	GatCAB ⁵⁾	CesZ ⁵⁾
Crystallization conditions	30% PEG3350 0.2M Lithium sulfate 0.1M Tris-HCl pH 8.5	30% PEG3350 0.2M Lithium sulfate 0.1M Tris-HCl pH 8.5	100mM sodium acetate pH 4.6 1.25M NaCl	100mM sodium acetate pH 4.6 1.25M NaCl	10% PEG1000 100mM MES pH6.0	25% PEG600 5mM MgCl ₂ 50mM HEPES-NaOH pH7.2 2% MPD	20% PEG3350 20% Glycerol 0.2M di-sodium tartrate
Ligand	None	Tryptamine (soaked)	None	p-toluene sulfonic acid (soaked)	GMPPCP	None	None
Data collection beam line	PF BL5A	PF BL5A	PF BL5A	PF BL5A	PF BL5A	SPring-8 BL38B1	SPring-8 BL38B1
Wavelength (Å)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Unit-cell parameters(Å)	a=54.64, b=58.46, c=66.28	a=54.58, b=58.33, c=66.69	a=78.58, b=36.90	a=78.28, b=37.69	a=50.1, b=85.5, c=114.4	a=71.4, b=92.1, c=181.9	a=89.1, b=91.4, c=89.8
Resolution(Å)	50-1.7	50-1.7	50-1.6	50-1.6	50-1.8	50-3.6	50-2.3
Resolution range(Å)	50-1.7(1.8-1.7)	50-1.7(1.8-1.7)	50-1.6(1.7-1.6)	50-1.6(1.7-1.6)	50-1.8(1.91-1.80)	50-3.6(3.82-3.60)	50-2.3(2.44-2.30)
Completeness(%)	99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.9(99.4)	99.9(99.7)	99.8(99.6)	99.8(99.7)	98.0(96.9)
<I/σ(I)>	26.4(8.0)	19.0(4.0)	26.7(5.8)	41.0(10.1)	18.6(4.0)	14.6(4.2)	15.8(2.9)
R _{meas} (%)	4.8(18.2)	7.2(36.4)	5.9(34.6)	3.8(21.4)	6.3(35.7)	13.9(47.2)	5.7(41.1)
Multiplicity	3.8(3.7)	3.8(3.7)	7.4(7.3)	7.5(7.4)	3.8(3.7)	3.8(3.8)	1.9(1.9)
No. of observed reflections	171331	171898	215938	224119	3354451	103826	236055
No. of unique reflections	45084	45205	29121	29552	87993	26864	121777
Refinement							
Resolution range(Å)	50-1.7	50-1.7	50-1.6	50-1.6	50-1.8	50-3.6	50-2.3
Overall R _{free} (%)	14.8	16.2	15.8	18.0	24.2	20.9	15.6
Overall R _{work} (%)	18.8	18.6	19.4	21.8	27.5	28.3	21.9

表 8 . Summary of crystallization conditions, data-collection and refinement statistics

$R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} (n_h/(n_h-1))^{1/2} \sum_{nh} |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of symmetry-equivalent reflections and n_h is multiplicity.

$R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, where F_{obs} and F_{calc} are observed and calculated structure-factor amplitudes, respectively.

The R_{free} value was calculated as for R_{work} but using only an unrefined subset of reflection data.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

- 1) Bovine pancreatic trypsin, 2) Hen egg white lysozyme, 3) Translation elongation factor EF2 domain I-II from *Pyrococcus horikoshii*,
- 4) GatCAB from *Staphylococcus aureus* (Nakamura A., et al., 2006), 5) Bacterial cellulose synthase subunit Z from *Enterobacter sp.*

CJF002

4.2 固定結晶のソーキング

結晶の反射は $1.26\text{\AA}$ と高分解能まで確認でき、ゲルでの固定による悪影響は見られなかった。

4.2.1 Lysozyme 結晶のソーキング

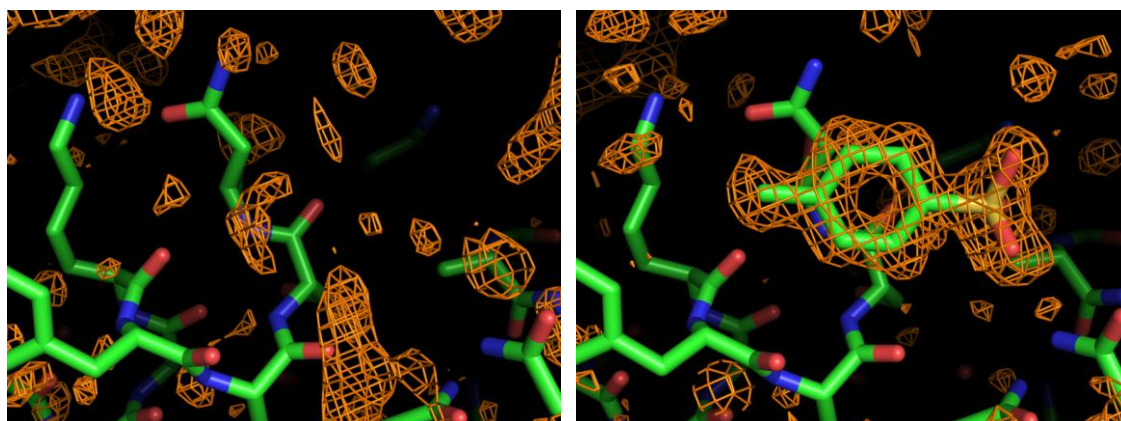


図 55 Lysozyme 結晶の電子密度。(左) ソーキングなしの結晶。(右) p-トルエンスルホン酸のソーキングを行った結晶。

電子密度マップとタンパク質のモデルは pymol を用いて描いた。電子密度は $F_o - F_c$ ($\sigma = 2.0$) の正の領域を示している。ソーキングで入れたリガンドの電子密度がはっきりと見て取れる。

4.2.2 Trypsin 結晶のソーキング

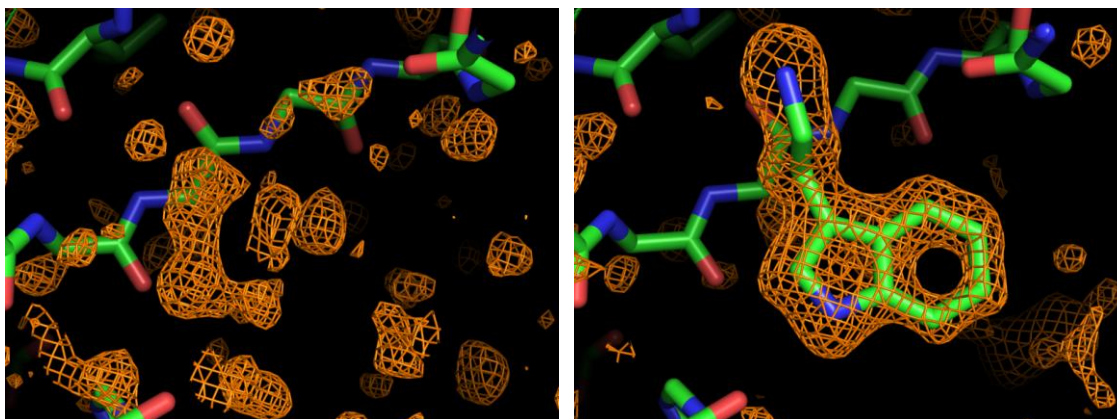


図 56 Trypsin 結晶の電子密度。(左) ソーキングなしの結晶。(右) トリプタミンのソーキングを行った結晶。

4.2.3 ゲル固定とソーキングへの影響

ゲルで固定した場合にもリガンドの浸透に悪影響はみられなかった。

5 考察

5.1 結晶固定法の重要性

結晶の固定法が実現する事によって以下の事が可能となる。

- ・ 結晶の扱いを全自動化する事
- ・ ソーキング時間を秒単位で厳密にコントロールする事
- ・ 多段階のソーキング作業が安定かつ容易に行えるようになる

タンパク質の結晶はその体積の半分程度を水が占めており非常に脆く扱いが難しい。回折データ測定には、通常、直径 $20\mu\text{m}$ 程度の細いナイロン素材で作られたループがピンの先端に取り付けられた器具（通称ループ）を用いて結晶を結晶化溶液ごとすくいとり、溶媒の表面張力により結晶をループに保持して扱っている。しかし、表面張力による固定法はバッファ中では使えない。空気中でもバッファ中でも環境を問わずにかつ結晶に損傷を与えずに器具に固定し続ける方法はこれまでに無かった。

環境を問わずに結晶をループに固定出来る事でタンパク質結晶の扱いをロボットにより自動化できる。これまで練習を積んだ研究者によって手作業で扱うしか無かったタンパク質結晶を自動で何百、何千個と扱えるようになる事で X 線結晶構造解析のハイスループット化を強力に後押しする事となる。

また、結晶が治具に固定される事で結晶の移動を自由にかつ厳密に管理する事が容易となる。結晶にリガンドをソーキングする実験ではこれまで結晶をバッファから取り出す作業が手作業でありかつその難易度が高かったためソーキング時間を正確に管理する事が不可能であった。手作業時には数十秒から数分の誤差がつきものであったが、結晶を固定する事で秒単位の厳密なソーキング時間の管理が可能となる。

またタンパク質結晶へのソーキングはたびたびソーキング時間とのトレードオフに陥る事がある。ソーキング時間が短いと結晶にリガンドが十分に浸透せず、

ソーキング時間が長いと結晶の崩壊が起こる事がある。このためソーキング時間を最適な時間に管理する必要があるが、結晶のループへの固定によってこれが可能となる。さらに厳密なソーキング時間の管理が行える事からこれまで不可能であった数秒ないし十数秒のソーキングも行えるようになると考えられる。また、ソーキング時間の与える影響を時分解で調べる事も可能である。これは例えばソーキング時間を 10 秒、20 秒、30 秒・・・数分と段階的に振り、各段階でのリガンドの結晶への浸透の度合いと結晶状態を観測する実験である。これにより、これまで実験者の感覚のみに頼ってきたソーキング時間の決定に対し、実験的な情報を元にした論理的な検討を行えるようになる。

ソーキングには物によって 2 段階以上のソーキングを必要とする場合がある (Yamane J. *et al.*, 2010)。一段階のソーキングの時にも手作業では時間の管理が難しく、さらに結晶を拾い直す度に結晶に損傷を与える確率が非常に高かった。しかし、結晶が固定される事で多段階のソーキングでも全てのソーキング時間を厳密に管理する事が可能となるのみに留まらず、結晶を拾い直す行程が無くなるため結晶に損傷を与える可能性が大幅に軽減される。これにより多段階のソーキングが非常に難易度の高かった実験から、容易に行える安全な実験になる。

5.2 結晶の損傷

タンパク質結晶は非常に脆く以下の要因によって簡単に損傷を受ける。

- ・結晶の乾燥
- ・結晶への物理的応力
- ・バッファの塩濃度の変化
- ・バッファの pH の変化
- ・バッファの温度変化
- ・ラジカルによる影響

タンパク質結晶はその体積の半分程度を水が占めており、乾燥に弱く、また物理的な強度が非常に低い。そのため僅かな物理的応力によって簡単に結晶の

崩壊を招く。このため結晶を扱う時は細心の注意を払いながら最小限の応力で対応する必要がある。

バッファの塩濃度によっても結晶内の水の量が変わるため結晶が維持できなくなり崩壊する。また、イオン濃度によってタンパク質間の相互作用が変化する場合もあり、その場合も結晶の崩壊を招く。

タンパク質間の相互作用に多くの場合 pH は大きく寄与している。そのため僅かな pH の変化によってタンパク質間の相互作用が変化して結晶の崩壊を招く。

タンパク質結晶は絶妙なバランスの上に構成されているため温度の変化、特に温度の上昇に敏感で簡単に結晶が崩壊する。

ラジカルなどの反応物がタンパク質結晶に作用する場合はタンパク質間の相互作用部位にラジカルが反応して結晶の崩壊を招く事がある。またタンパク質自身にラジカルが作用してタンパク質の構造変化を招く事により結晶の崩壊や測定対象であるタンパク質の変化により X 線構造解析により正しい構造を得られない事がある。

結晶の固定はこれら全ての厳しい条件を満たしながら行う必要があり、非常に難易度が高いものである。

5.3 インクジェットでの吐出

インクジェットを用いたゲル溶液の吐出により二つの利点が存在する。一つ目に正確に目的の位置に必要な量のゲル溶液を非接触で配置する事が可能となった。これにより結晶の固定に必要な最小量のゲル溶液で装置を用いて自動的に結晶を固定する事が可能となった。また、非接触である事から溶液のコンタミネーションのリスクも大幅に減る。二つ目に微量の液滴が瞬時に混合されるため混合時間が律速であるゲル化速度が上がる。損傷を受け易い結晶を扱うため短時間で固定作業を完了させる必要があるが、高速なゲル化はそれを助ける事が出来る。

5.4 リガンドソーキングパイプラインへの応用と 今後の展開

タンパク質結晶に化合物を結合させ、その構造を解析する事で化合物の結合様式を解明し創薬を後押しするリガンドソーキングパイプラインには3つのシステムが必要だと考えている。一つ目は「タンパク質結晶の固定システム」、二つ目は「結晶の自動ソーキング・システム」、三つ目は「結晶の凍結システム」である。一つ目の「タンパク質結晶の固定システム」は本研究で開発した物である。二つ目の自動ソーキング・システムは移動ステージによるシステムで開発に当たり技術的な課題はなく容易に作成が可能である。また、三つ目の結晶凍結システムは本研究室で既に開発済で現在も利用しているシステムである。このため本研究の成果によってリガンドソーキングパイプラインに必要な技術的な課題を全て解決したと考えられる。

今後、実際のリガンドソーキングパイプラインを作成するにあたりユーザーにとって使い易いデザインを検討していく必要がある。また、現在の実験装置を大規模なスクリーニングにも耐えられる堅固なシステムにするには産業界との連携や実際にパイプラインの運用を行いながらの調整が必要になってくると考えられる。

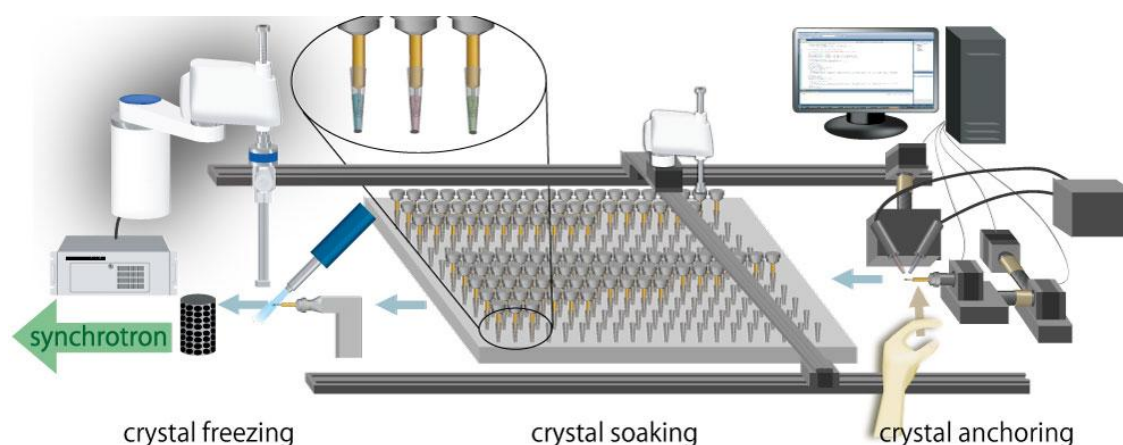


図 57 リガンドソーキングパイプラインの模式図

5.5 参考文献 2

Yamane J., Ohyabu N., Yao M., Takemoto H. and Tanaka I. (2010) J. Appl. Cryst., 43, 1329-1337

6 結論

本研究により物理的な応力や溶媒の僅かな変化によっても損傷をうける取り扱いの難しいタンパク質結晶を器具に固定する事が可能となった。これによりこれまで熟練した研究者が手作業で一つ一つのタンパク質結晶を取り扱うしか方法が無かったものが、機械による取り扱いが可能となり自動化されたシステムでのタンパク質の取り扱いが可能となった。またタンパク質結晶の化合物ライブラリへのソーキングによる創薬パイプラインの構築の技術的なボトルネックが取り除かれ、パイプラインの構築が可能となった事でリガンドソーキングのより一層のハイスループット化が可能となった。

謝辞

本研究に際して多大なご指導を頂きました田中勲名誉教授に深く感謝します。研究でも生活面での取り組みでも熱心に関わり頂けなければ最後まで達成出来なかったことでしょう。また、先攻研究のほぼ存在しない研究であり、何度も行き詰まり研究の難易度に苦悩している私の話を丁寧に聞いて頂き励まして頂きましたおかげです。

そして、指導教員としてご指導頂きました姚関教授に感謝します。広い分野を横断する研究でありましたが専門外の内容にも丁寧に耳を傾けて頂けた事があり難くまた大変助かりました。また、大型放射光施設での出張実験にも何度もお足路頂きご助力頂きました。

また本研究で重要な固定素材の相談に快く応じて頂いた龔劍萍教授および黒川孝幸准教授に感謝申し上げます。

そして、研究環境に多くの協力を頂きました田中良和准教授と田中深雪さんに感謝します。広い研究場所を用意頂けなければ装置の組み立てもままならずに研究は完成出来なかったことだと思います。

また、物品購入や様々な書類手続きで助力頂いた工藤淑永さんに感謝します。研究室で普段利用しない特殊な物品や試薬ばかりを利用する研究であったため手続きに大変苦勞をおかけしました。