

「マイクロ・ナノの分析化学」

2 応用 (タンパク質結晶構造解析)

3 1 はじめに

4 マイクロ流体デバイスを用いた生体関連分子の分析
5 は、サンプル消費量の削減、前処理を含む測定 of 簡略化
6 など、多くの利点をもたらしている。生体関連分子の中
7 でもタンパク質は、生命現象に深く関わっている。我々
8 の体内には約 10 万種類ものタンパク質が存在するとい
9 われており、それぞれのタンパク質が正しく機能する
10 ことで生命活動が維持されている。特に、細胞表面に存
11 在する膜タンパク質は、細胞膜を介した情報伝達を担
12 っており、生命現象に深く関わっているため、代表的な
13 創薬ターゲットとして研究が進められている。そのため、
14 タンパク質の立体構造情報を基にした薬剤設計が創薬
15 において利用されており、抗インフルエンザ薬である
16 oseltamivir (商品名: タミフル) が開発された。本稿で
17 は、創薬分野への応用に向けたマイクロ流体デバイス
18 を用いたタンパク質の結晶構造解析について概説する。
19

20 2 タンパク質の結晶構造解析

21 タンパク質の立体構造解析法としては、X 線結晶構造
22 解析、NMR、クライオ電子顕微鏡などの手法がある。ま
23 た、近年では人工知能プログラムである AlphaFold 2 に
24 よる立体構造予測も導入が進んでいる。この中で X 線
25 結晶構造解析は、原子レベルでタンパク質の立体構造
26 を決定できる強力な手法である。タンパク質の X 線結
27 晶構造解析は、(1) タンパク質の発現・精製、(2) タ
28 ンパク質の結晶化、(3) X 線回折実験、(4) データ処
29 理・構造決定、の 4 つのプロセスに大別されている。こ
30 れまでに、(2) タンパク質の結晶化および(3) X 線回
31 折実験のためのマイクロ流体デバイスが報告された。ま
32 た、(2) ~ (4) までのプロセスをシームレスに実現可
33 能なマイクロ流体デバイスも開発されている。
34

35 3 タンパク質の結晶化

36 タンパク質の結晶構造解析において、高品質な(高分
37 解能で構造決定可能な X 線回折データを提供できる)
38 タンパク質の単結晶の作製は極めて重要である。タン
39 パク質の結晶は、タンパク質溶液と結晶化剤(塩やポリ
40 エチレングリコールなど)を混合し、タンパク質の溶解
41 度を低下させることで生成する。しかし、結晶化剤の種
42 類や濃度、pH などを最適化する必要があり、結晶構造解
43 析のボトルネックとなっている。この課題を解決する

44 ために、(1) 微小液滴および(2) マイクロウェルを用
45 いた結晶化条件の最適化が報告された^{1,2)}。(1) 微小液
46 滴を用いた結晶化条件スクリーニングでは¹⁾、ポリジメ
47 チルシロキサン (PDMS) 製のマイクロ流体デバイスに
48 タンパク質溶液、結晶化剤、緩衝液を水相(分散相)と
49 して導入し、油相(連続相)としてフッ素化不活性液体
50 であるフッロリナート FC-40[®]を導入する。水相の各溶液
51 の流量比を変えることによって、各成分の比率を制御
52 することができる。また、事前に複数の種類の結晶化剤
53 や緩衝液を準備することで、網羅的に結晶化条件を探
54 索することが可能である。生成した液滴は、PDMS デバ
55 イス、あるいはガラスやパーフルオロアルコキシアル
56 カン (PFA) 製キャピラリーに回収され、結晶が析出す
57 るまで静置される。微小液滴やマイクロウェルのよう
58 な制限された空間では、分子拡散が拡散律速となるた
59 め、従来のバルク系とは異なる結晶化挙動が報告され
60 ている。微小空間では、タンパク質分子の結晶核への輸
61 送が遅くなるため、系内に 1 個の単結晶を析出させたり、
62 結晶の晶癖を制御することができる³⁾。また、最近では
63 深層学習と微小液滴を組み合わせた結晶化条件最適化
64 法も報告されている⁴⁾。

65 (2) マイクロウェルを用いたスクリーニング法とし
66 ては²⁾、バルブ構造を用いたデバイスや SlipChip など
67 が開発された⁵⁾。バルブ構造を用いたデバイスでは、タ
68 ンパク質溶液および結晶化剤をそれぞれ別々のマイク
69 ロウェルに導入する。各ウェルは、マイクロ流路で接続
70 されているが、通常はバルブによって流路が閉鎖され
71 ており、ウェル同士は独立している。各ウェルに溶液を
72 導入後、バルブを開放することによって、マイクロ流路
73 を介して溶液同士を相互拡散させることで結晶化を行
74 う。この時、タンパク質溶液ウェルと結晶化剤ウェルの
75 サイズを変えておくことで、濃度条件のスクリーニン
76 グが可能となる。また、Ismagilov らが開発した SlipChip
77 は、上下の基板に、タンパク質溶液用および結晶化剤溶
78 液用のウェルがそれぞれ構築されており、名前のとお
79 り基板を "Slip" させることで溶液同士を混合させる⁵⁾。
80 SlipChip は、シリンジポンプなどが不要であり、容易に
81 使用できる。マイクロ流体デバイスを用いることで、1 条
82 件あたり数 ~ 数十 nL で結晶化条件探索が可能であり、
83 これは従来法の 1/10 ~ 1/100 のサンプル消費量である。

85 4 X 線結晶構造解析

86 マイクロ流体デバイスを用いた結晶構造解析法の大
87 きな利点の 1 つは、デバイス内で作製した結晶をそのま
88 ま測定できる点である。タンパク質の結晶は、約 50% 程

1 度の水を含有しており、もろくて壊れやすい。また、通
2 常は 100 K で測定するため、抗凍結剤に結晶を浸漬する
3 など、X 線回折実験の前処理が必要である。従来の結晶
4 構造解析では、結晶が析出した溶液から、結晶を 1 個取
5 り出して抗凍結剤に浸漬し、X 線回折計に設置・冷却・
6 測定の手順で回折データを取得する。結晶の回収には、
7 ループ（ナイロンの輪）という器具を使用するが、結晶
8 の取り扱いには熟練した手技が必要である。

9 微小液滴を用いる場合、液滴を回収したデバイスあ
10 りはキャピラリーを X 線回折計に設置するだけで測
11 定可能である。しかし、デバイス部材の種類および厚み
12 は、X 線回折データのシグナル/ノイズに大きく影響す
13 る。PDMS は X 線の減衰が比較的大きい。また、減衰を
14 低減するために厚みを薄くすると、デバイス作製だけ
15 ではなく、X 線回折計に自立させることが困難となる。
16 一方で、シクロオレフィンコポリマー（COC）やシクロ
17 オレフィンポリマー（COP）は、小角側での散乱は観測
18 されるが、広角側ではタンパク質結晶からの回折を十
19 分に検出することができる。キャピラリーの場合は、市
20 販の X 線回折実験用の肉厚が薄いガラスキャピラリー
21 に液滴を回収・測定されることが多い。また、リゾチー
22 ムなどの対称性が高いタンパク質の場合は、PFA などの
23 キャピラリーでも測定に問題がない場合が多い。

24 PDMS は、ソフトリソグラフィによって簡便にデバ
25 イス作製が可能である。さらに、バルブ構造などを集積
26 化できるため、タンパク質の結晶構造解析には魅力的
27 なデバイス部材である。一方で、前述のとおり、X 線回
28 折実験には不向きであった。Kenis らは、マイクロ流路
29 やバルブ構造を構築した 70 μm の PDMS 薄膜に、50 ~
30 100 μm の COC フィルムを張り合わせたマイクロ流体デ
31 バイスを開発した⁶⁾。PDMS 薄膜に COC フィルムを張
32 り合わせることで、デバイスを X 線回折計に自立させ
33 ることができ、さらに X 線の減衰を抑制することがで
34 きる。デバイスに常閉型バルブ（Normally closed valve）
35 を組み込むことで、3・(2)で紹介したマイクロウェルに
36 よる結晶化条件スクリーニング後、結晶をデバイスか
37 ら取り出すことなく、X 線回折実験が可能であった。

38 5 近年の研究および応用例

39 創薬研究では、標的とするタンパク質とリガンドあ
40 りいは小さな化合物群であるフラグメントとの複合体
41 の構造情報が必須である。リガンドあるいはフラグメ
42 ントスクリーニングでは、タンパク質の結晶作製後、結
43 晶をループで回収し、創薬候補化合物を含有する結晶
44 化剤に浸漬させる。その後、抗凍結処理、X 線回折実験、
45 構造解析などのプロセスを経て、立体構造が決定され
46 る。しかし、創薬研究では、数万種類以上のフラグメン
47 ト化合物を測定する必要があり、従来の X 線結晶構造
48 解析のスループットには課題があった。

50 この課題を解決するために、マイクロウェルを集積
51 化した基板にマイクロ流路を張り合わせたデバイスに
52 よるタンパク質・リガンド複合体の構造解析法が開発さ
53 れた⁷⁾。これまでのデバイスと異なり、結晶は従来法で
54 作製している。回収した結晶をマイクロ流体デバイスに
55 導入し、ウェルに結晶を捕捉させる。その後、マイクロ
56 流体デバイスにリガンド溶液を導入することで、簡便
57 かつ短時間に多数のタンパク質・リガンド複合体結晶を
58 調製することができる。また本法では、従来の測定条件
59（100 K）よりも生体に近い、室温での結晶構造解析が
60 可能である。放射線損傷が生じない範囲で 1 個の結晶か
61 ら回折データを取得し、さらにデバイス内の多数の結
62 晶から構造決定に必要な回折データを収集する。収集
63 した回折データは、SPring-8 で開発された自動処理シス
64 テム KAMO によって処理される。マイクロ流体デバイ
65 ス、放射光、自動処理システムを組み合わせることによ
66 って、結晶調製後のプロセスのハイスループット化お
67 よび半自動化が実現した。

68 6 おわりに

69 これまでに、タンパク質の結晶構造解析における
70 様々な課題を解決するためのマイクロ流体デバイスが
71 開発されてきた。一方で、結晶構造解析が行われる放射
72 光施設との連携およびデバイス開発は十分に進んでい
73 ない。近年では、X 線自由電子レーザー施設 SACLA で
74 のシリアルフェムト秒結晶構造解析によるタンパク質
75 の動的構造解析や SPring-8-II に向けた開発など、放射
76 光科学の発展は目覚ましい。今後、マイクロ分析、放射
77 光科学、構造生物学、薬学など、分野横断的な連携が、
78 タンパク質の結晶構造解析および創薬研究において、
79 さらに重要になると考えられる。

80 文献

- 81 1) B. Zheng, L. S. Roach, R. F. Ismagilov: *J. Am. Chem.*
82 *Soc.*, **125**, 11170 (2003).
- 83 2) C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger, S. R. Quake:
84 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 16531 (2002).
- 85 3) M. Maeki, Y. Teshima, S. Yoshizuka, H. Yamaguchi, K.
86 Yamashita, M. Miyazaki: *Chem. Eur. J.*, **20**, 1049 (2014).
- 87 4) L. Huang, D. Yang, Z. Yu, J. He, Y. Chen, J. Zhou: *Chem.*
88 *Eng. J.*, **450**, 138267 (2022).
- 89 5) L. Li, W. Du, R. F. Ismagilov: *J. Am. Chem. Soc.*, **132**,
90 112 (2010).
- 91 6) S. L. Perry, S. Guha, A. S. Pawate, A. Bhaskarla, V.
92 Agarwal, S. K. Nair, P. J. Kenis, *Lab Chip*: **13**, 3183 (2013).
- 93 7) M. Maeki, S. Ito, R. Takeda, G. Ueno, A. Ishida, H. Tani,
94 M. Yamamoto, M. Tokeshi: *Chem. Sci.*, **11**, 9072 (2020).