

タンパク質の生成結晶核数の 制御を可能とする 微小流路デバイス

茨城大学 工学部 物質科学工学科
教授 田中 伊知朗

2021年9月14日

タンパク質の原子分子レベルの構造解析

- X線回折を中心に近年、タンパク質等の生体高分子の結晶構造解析は生命科学や創薬に非常に大きな寄与を果たしてきた。
- 生体高分子の原子レベルの構造情報が、機能解明に役立ったからである。
- その約9割を占めるX線回折法に対して、1/1000の寄与しかない中性子回折法は、生体高分子の機能に直結する水素原子の位置情報が得られ、かつエネルギーが小さいので放射線損傷がほとんどなく、ビームをあてる量に寄らず、室温での測定という特長を持っている。

中性子の生体高分子結晶構造解析

- しかしながら、中性子の強度がX線に比べて小さいため、大形結晶を作成する必要がある。
- このためには、一般に生体高分子試料は大量に準備することが困難なため、少ない試料量から少ない結晶核を生成させて成長させる必要がある。
- この結晶化において、生成結晶核の数の制御は非常に難しく、試行錯誤によるところが多かったが、本発明による装置により、その制御が可能となり、中性子回折用の試結晶の準備が容易になった。

従来技術とその問題点

既にタンパク質の結晶核を1つまたは少数生成することに関して実用化されているものには、微小液滴による結晶化法等があるが、

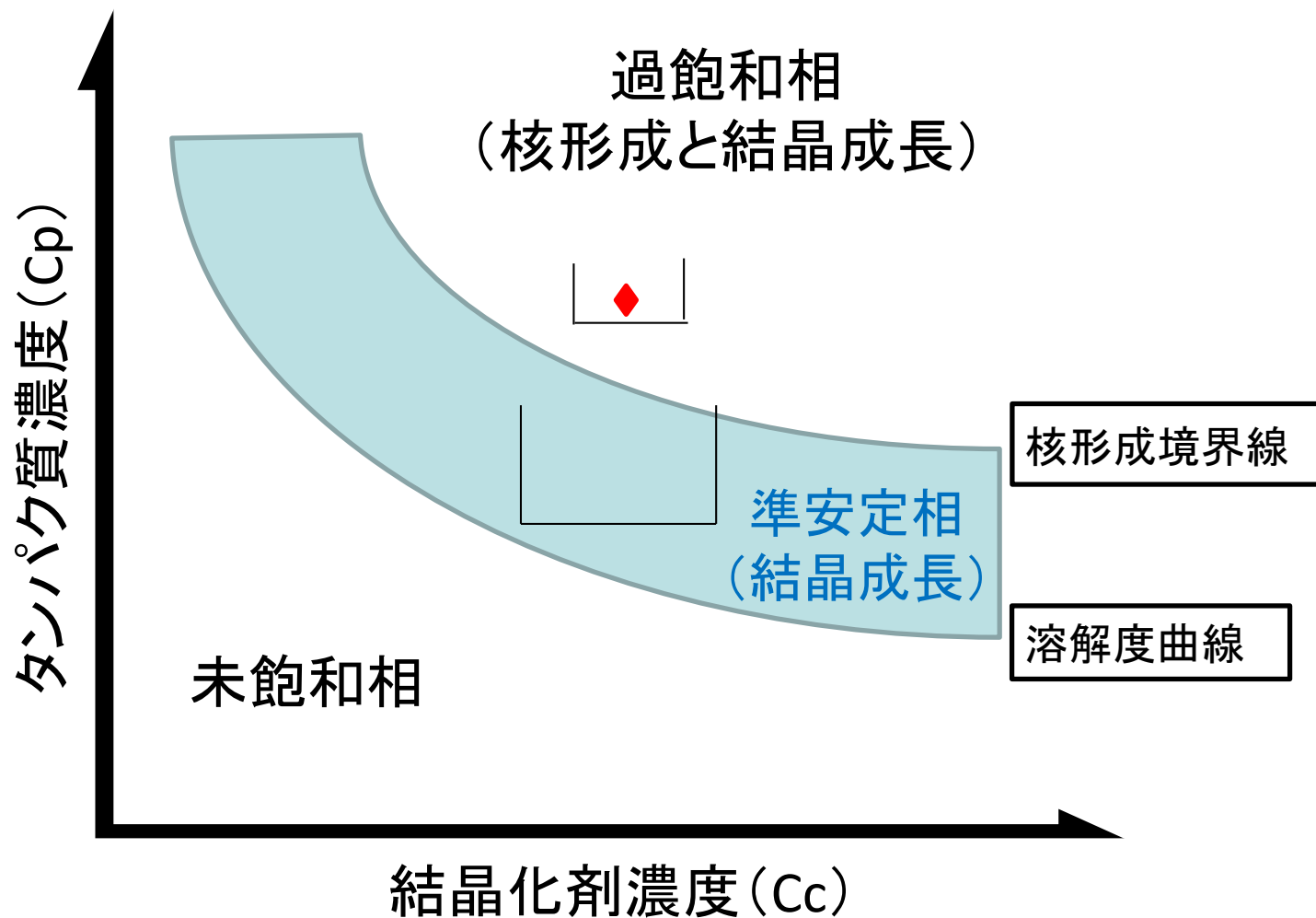
非水溶性のオイルに満たされた微小流路での結晶核生成であり、

その後の結晶育成の方法が未提示等の問題があり、中性子用試料結晶育成に広く利用されるまでには至っていない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、結晶育成に向けた手法を示すことに成功した。
- 従来は少数の結晶核を取り出す点で、複数の微小液滴がランダムに結晶核を含んでいることが障害になっていたが、結晶育成の手法提示とともに、少数の結晶核を取り出す条件も予測できることになり、的確な結晶育成を実現することが可能となった。
- 貴重な生体高分子試料を効率よく結晶育成できることが期待される。

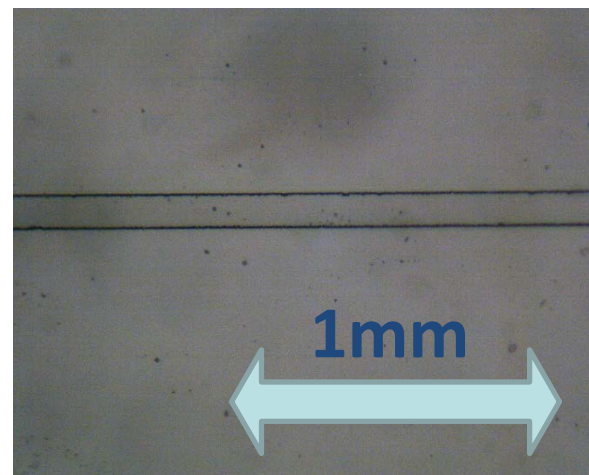
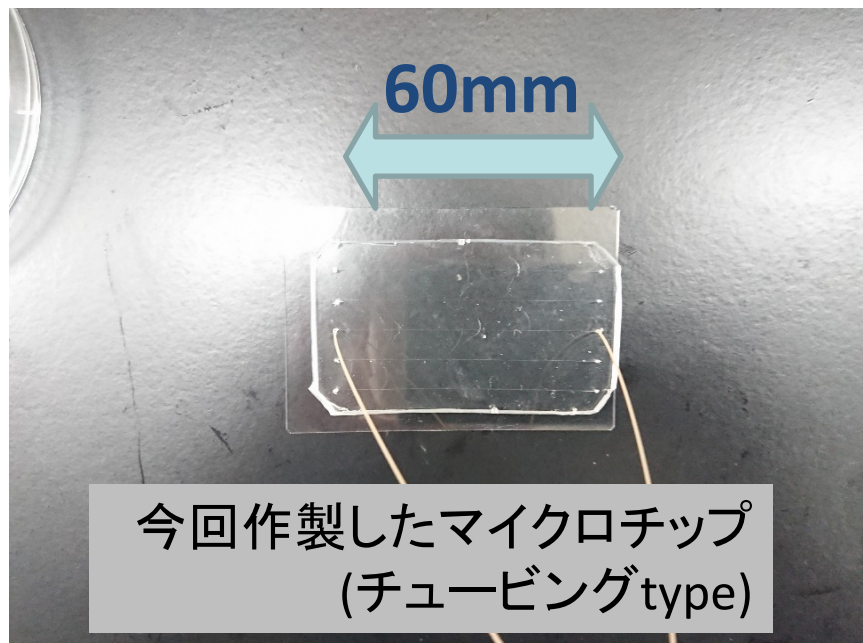
新技術の原理：結晶化相図



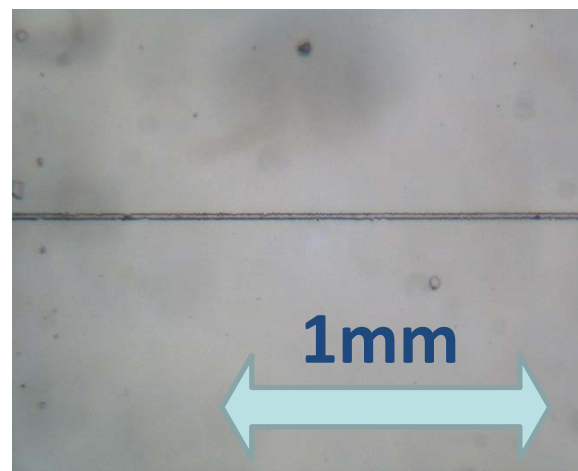
過飽和相でインキュベートした結晶核を準安定相へ移動させて結晶育成する。

Niimura & Podjarny, "Neutron Protein Crystallography", Oxford University Press (2011)

作成した微小流路デバイス



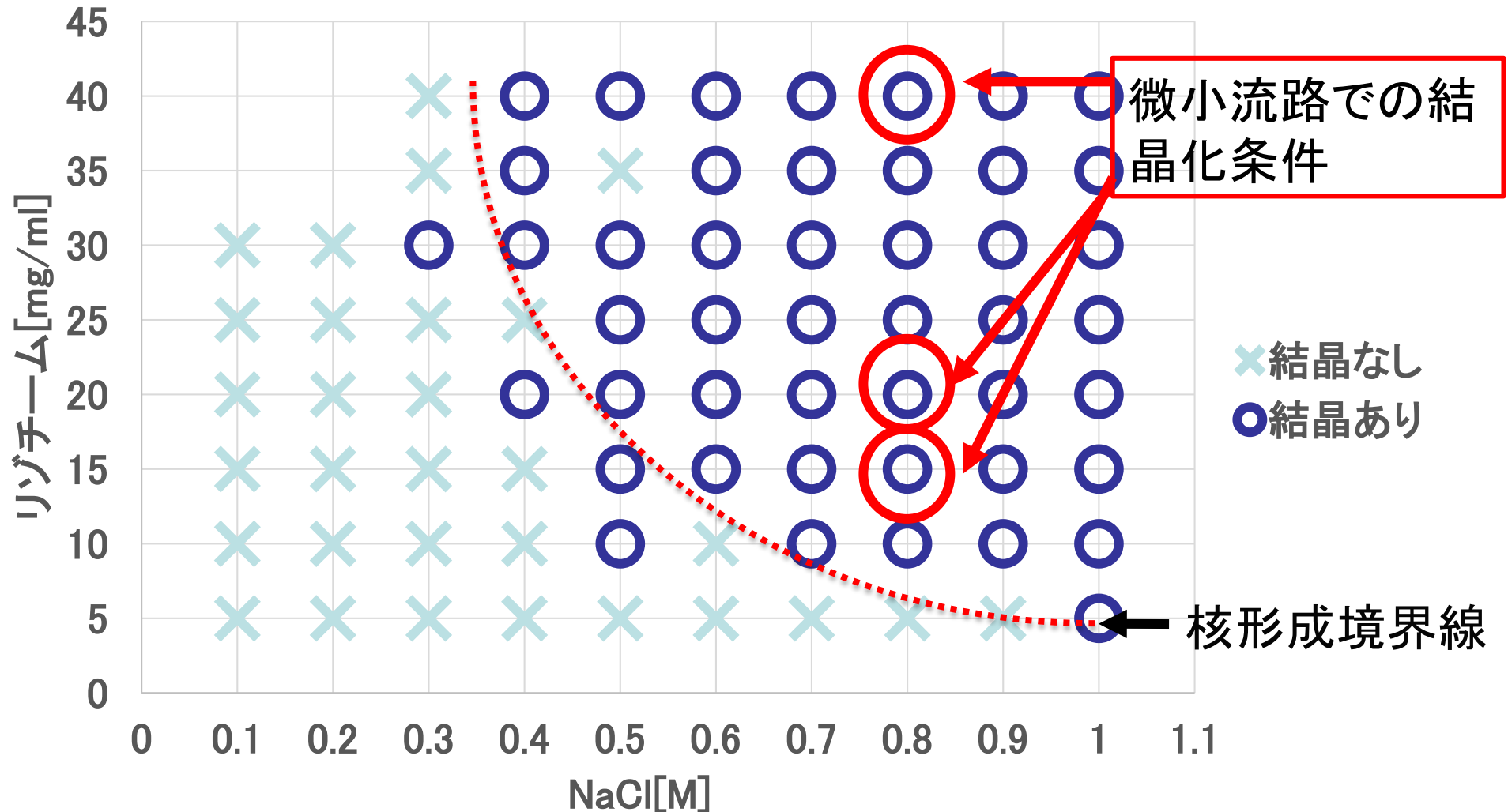
流路深さ30 μ m 幅100 μ m



流路深さ14 μ m 幅18 μ m

深さ幅とも約20~100 μ mの5段階の矩形の組み合わせの断面になるように作成。PDMS(ポリジメチルシロキサン)とガラス板をプラズマクリーナーで接着し、流路をはさみこんで作成。

マイクロバッチ法による結晶化相図

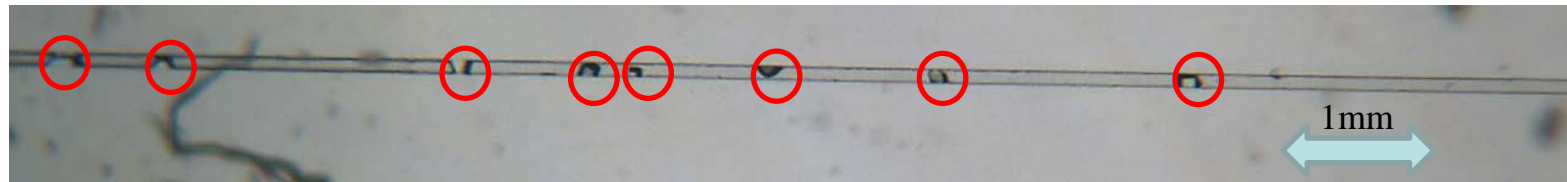


微小流路における結晶化条件

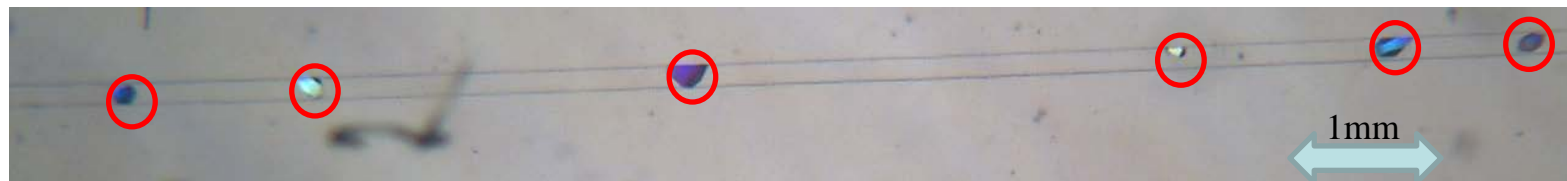
タンパク質	Lysozyme 40[mg/ml]	Lysozyme 20[mg/ml]	Lysozyme 15[mg/ml]
結晶化剤	NaCl 0.8[M]		
緩衝液	CH ₃ COONa(pH=4.5)		
温度	293[K]		
流路深さ, 流路幅[μm]	30 × 38/49 × 60/ 67 × 63/95 × 94	67 × 37/ 67 × 100	95 × 64/ 67 × 100
インキュベート 時間	72時間	72時間	26時間

微小流路における結晶化の様子

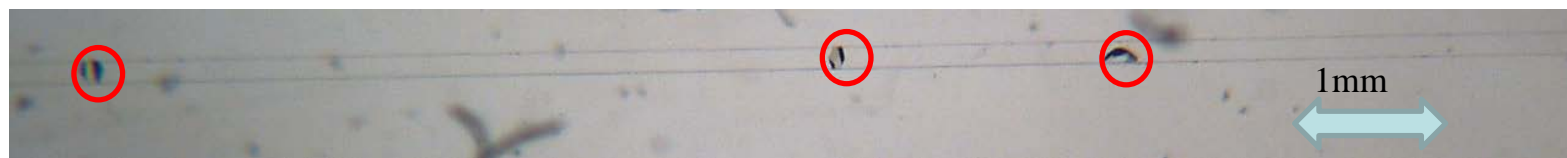
○ 生成した結晶



リゾチーム:40[mg/ml] NaCl:0.8[M] 深さ67 μ m 幅63 μ m

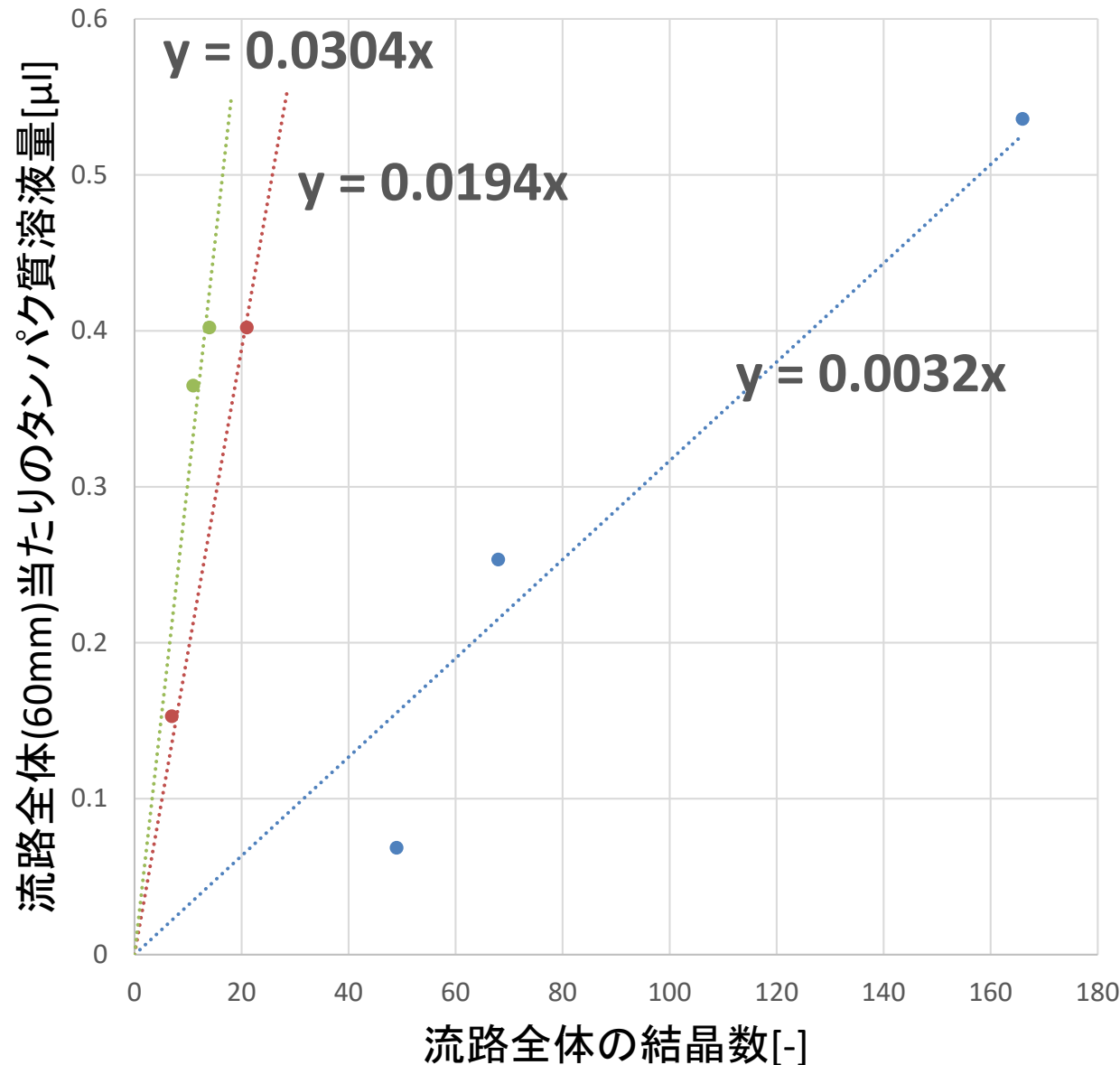


リゾチーム:20[mg/ml] NaCl:0.8[M] 深さ67 μ m 幅100 μ m



リゾチーム:15[mg/ml] NaCl:0.8[M] 深さ67 μ m 幅100 μ m

生成結晶数と溶液量との関係図



結晶化条件が決まれば微小流路断面積から流路全体の結晶(核)数が予測できる。つまり、結晶核の平均距離が予測可能。

想定される用途

- 本技術は、中性子結晶構造解析用試料結晶育成に適用することで大形結晶育成へのメリットが大きいと考えられる。
- 特に宇宙空間を利用した微小重力結晶育成に適用することが効果的である。
- 上記以外に、X線解析用の結晶にも良質の結晶育成効果が得られることも期待される。

実用化に向けた課題

- 現在、一定のインキュベーション時間後に小数の生成結晶核をリザーバーに注入し結晶育成が可能なところまで開発済み。しかし、最適なインキュベーション時間の確定が未解決である。
- 今後、最適なインキュベーション時間についての実験データを取得し、精度を上げた生成結晶核の数の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、装置のコンパクト化ができるよう技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- 未解決の装置のコンパクト化については、MEMSの技術により克服できると考えている。
- MEMSの技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、宇宙空間等の微小重力利用分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : マイクロ流路デバイスを用いた結晶製造方法および装置
- 出願番号 : 特願2020-198815
- 出願人 : 茨城大学、宇宙航空研究開発機構(JAXA)、株式会社化研、北海道大学
- 発明者 : 田中 伊知朗、長谷川 智紀、新村 信雄、山田 貢、石田 卓也、吉崎 泉、皆川 由貴、伊藤 剛士、真栄城 正寿

お問い合わせ先

茨城大学

研究・産学官連携機構（日立オフィス）

- TEL 0294-38-7281
- FAX 0294-38-5240
- e-mail chizai-cd@ml.ibaraki.ac.jp