

タンパク質の凝集・結晶化の 促進技術と分析技術

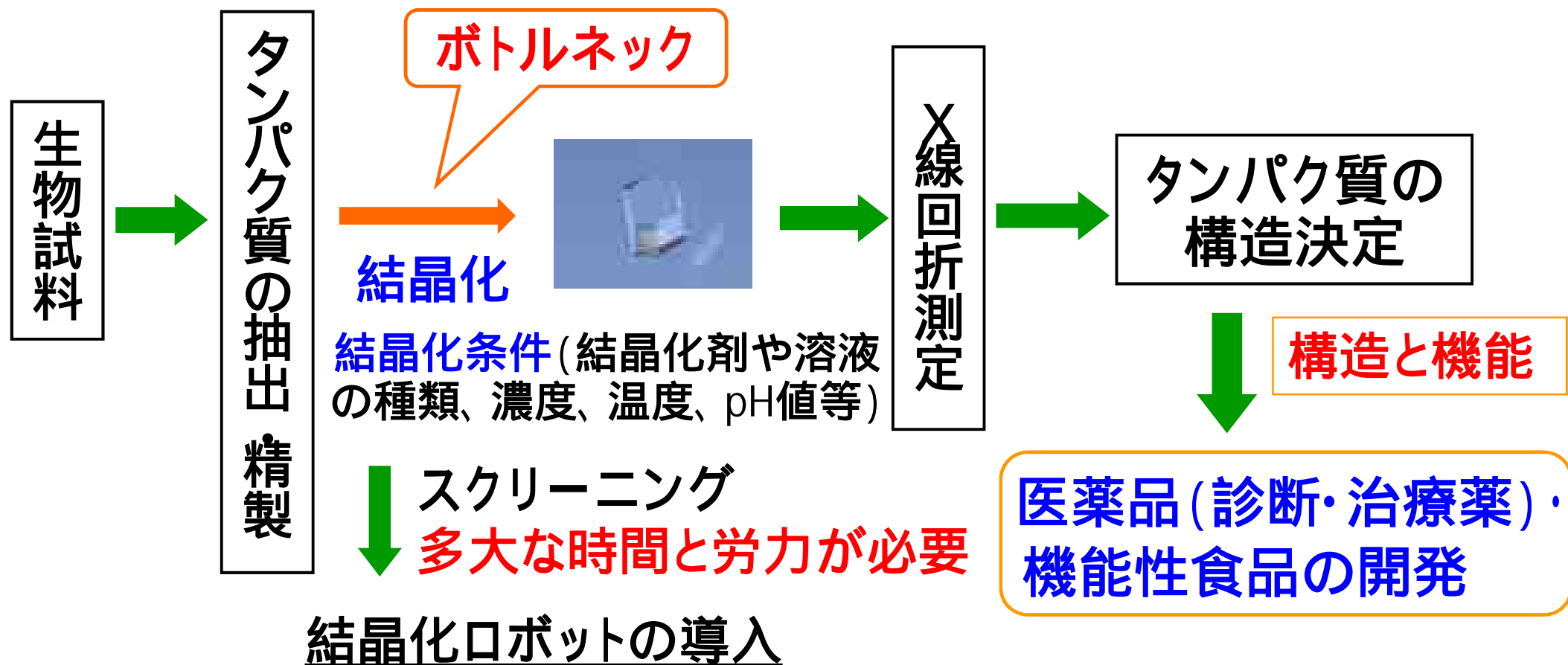
福島工業高等専門学校・電気工学科

教授 若松 孝

(H28. 3月まで 茨城工業高等専門学校・電気電子システム工学科)

技術開発の背景

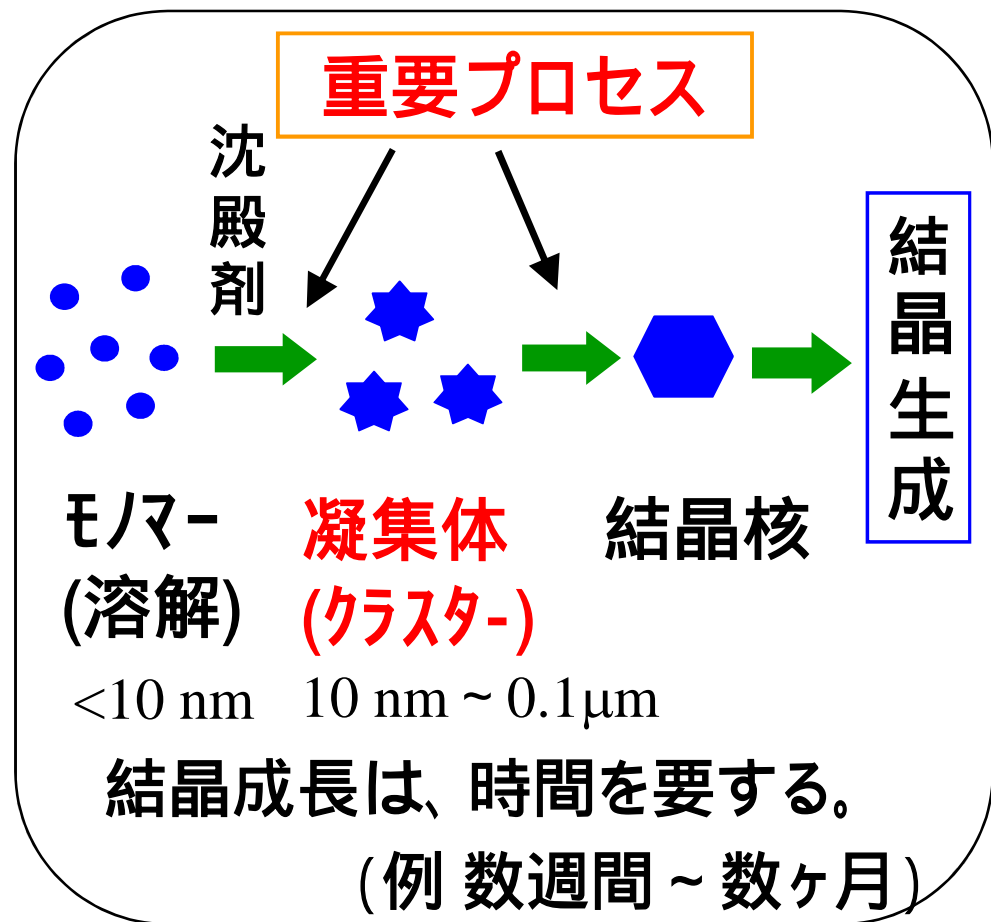
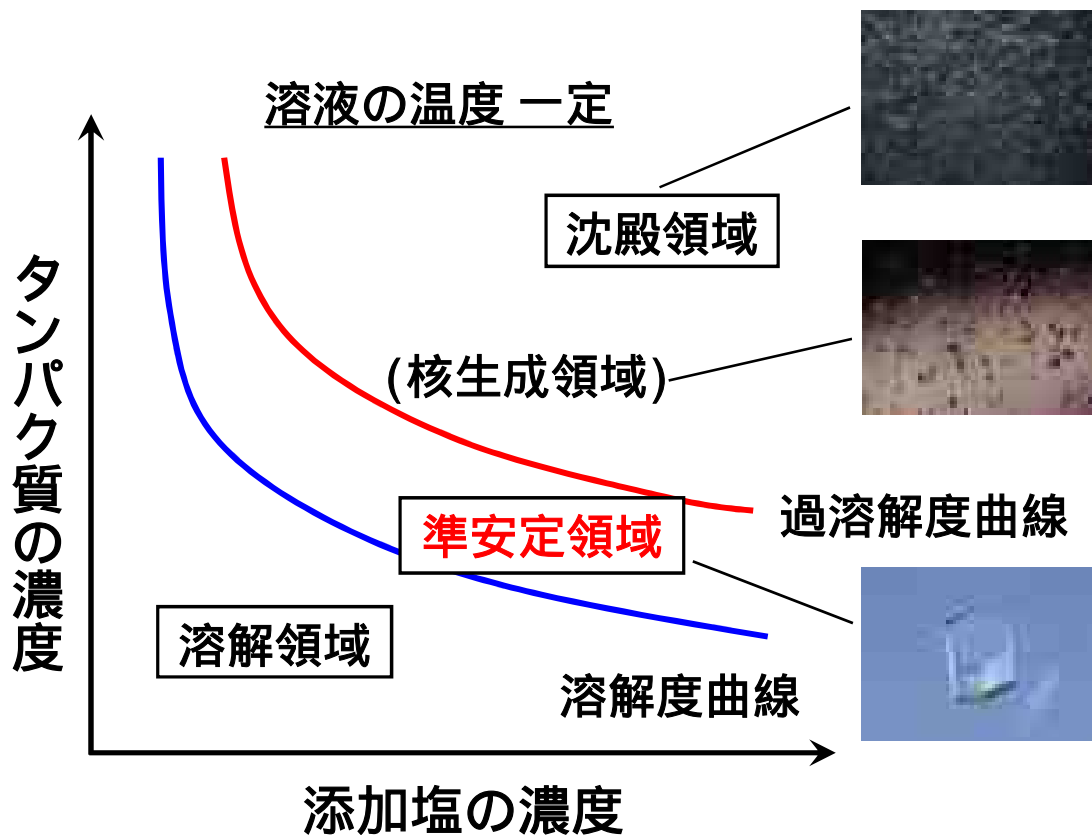
タンパク質の構造解析と創薬等の応用への流れ



* タンパク質の結晶作製が、**ボトルネック**である。

タンパク質の結晶化

塩添加によるタンパク質の凝集と結晶化



結晶化条件(相図)

タンパク質の結晶化プロセス(想定)

* タンパク質の結晶化は、**準安定領域**が適する。

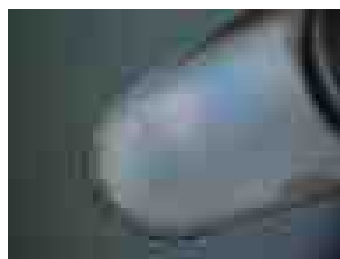
タンパク質結晶化の例

NaCl添加によるニワトリ卵白リゾチ - ム (HEWL) の結晶化

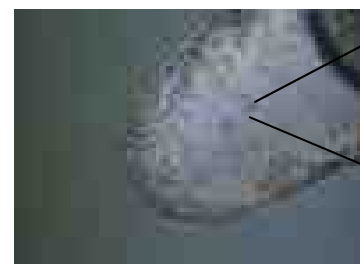
○結晶化 - 非結晶化 結晶化/非結晶化

<i>NaCl</i> (%W/V)		0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
<i>HEWL</i> (mg/mL)	30	-	-	-	-	○	○	○	○
	20	-	-	-	-		○	○	○
	10	-	-	-	-	-		○	○

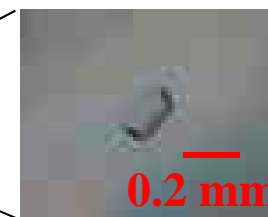
酢酸-酢酸Naバッファー
(pH 4.6)
20 静置



[未飽和領域]



[準安定領域]



HEWL結晶
(2日後)

* タンパク質結晶化の境界付近が、結晶成長に適する。

研究開発課題

タンパク質結晶作製技術の開発

現状は、**ロボットによる結晶化条件の探索、結晶作製**


効率的に結晶作製できる、タンパク質結晶作製装置
{

 低コスト化
 小型化 必要

タンパク質結晶化分析技術の開発

対応できる市販の装置が無い


タンパク質結晶化分析装置

結晶核生成前の凝集体を高精度に分析できることが必要

研究開発の経緯

年度	課題名	助成事業	機関
2007	タンパク質結晶化と結晶化分析技術に関する研究調査	茨城県中性子技術産業利用事業 [J-PARC]	茨城高専, 地域企業, 県技術センター, 茨城大
2008	タンパク質結晶化分析装置の開発	JST シズ発掘試験	茨城高専
2010	タンパク質結晶化技術の研究開発	JST A-STEP FS	茨城高専, 福島高専
2012	塩類のタンパク質結晶化作用に関する研究	研究財団助成	茨城高専
2012 ~ 2013	電場印加によるタンパク質結晶化促進技術の開発	JST A-STEP FS	茨城高専
2013 ~ 2014	タンパク質アミロイド線維の形成とその分析	高専 長岡技科大・共同研究	茨城高専, 長岡技科大
2014 ~ 2016	低電圧印加によるタンパク質凝集・結晶化促進の分析技術開発と促進機構の解明	科研費基盤研究C	茨城高専 福島高専
2015	蛋白質の凝集・結晶化における塩効果	研究財団助成	茨城高専, 大分高専, 長岡技科大

開発技術

(A) タンパク質の結晶化促進技術

電場印加による結晶化促進効果

(B) タンパク質の凝集・結晶化分析技術

凝集体に対し高感度な前方光散乱の計測

(C) AとBの複合技術




電場印加における前方光散乱の計測

(A) タンパク質の結晶化促進技術

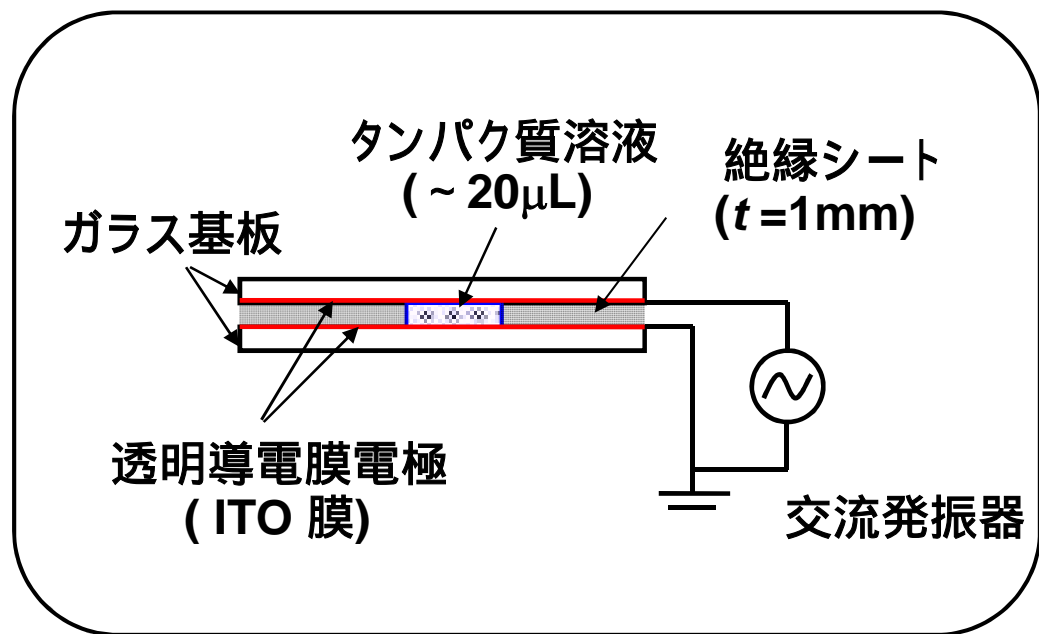
従来技術とその問題点

タンパク質結晶化条件の探索(スクリーニング)

結晶化条件:対象タンパク質の濃度、結晶化剤の種類や濃度、
溶液の種類やpH値、温度など多種・多数

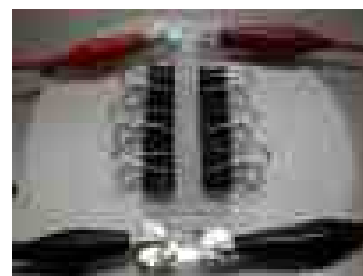
- 結晶化ロボットの導入 **大型装置、高コスト**
(大量の原料も必要)
 - 外部刺激による結晶化促進法 デメリット
 - ・ UV光照射  **タンパク質へのダメージ(変性)**
 - ・ パルスレーザー光照射 
 - ・ 強磁場印加 
- 大型装置、高コスト**

電場印加によるタンパク質結晶化促進技術

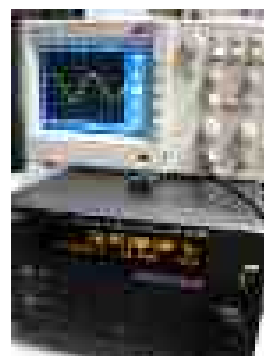


電場印加用の結晶化溶液セル

特許第5626914号(2014.10)
US20110308948



結晶化溶液セル



交流発振器

透明導電膜電極

ITO ($\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$)
 $d = 140 \text{ nm}$
 $R_s = 10 \Omega/\text{cm}^2$
 $T > 83 \%$

電場印加条件(例)

交流電圧: $f = 20 \text{ Hz}$
 $2.0 \text{ V}_{\text{p-p}}$
 $(E_{\text{eff.}} = 7.07 \times 10^2 \text{ V/m})$
 印加時間: 6 ~ 9 hr
 20 静置

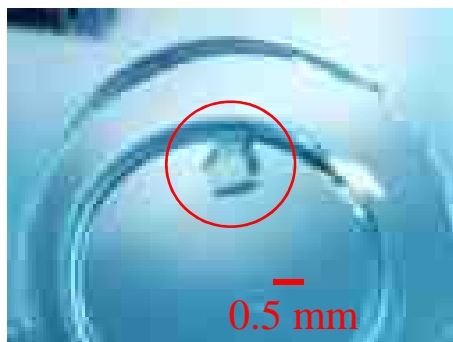
* 低周波・低電圧の印加

実証例 (タンパク質結晶化促進)

2種類のタンパク質 (リゾチーム, ソーマチン) について

電場印加条件

$f=20$ Hz
 $V=2.0$ V_{p-p}
9 hr



生成したリゾチーム結晶 (電場印加)

溶液条件

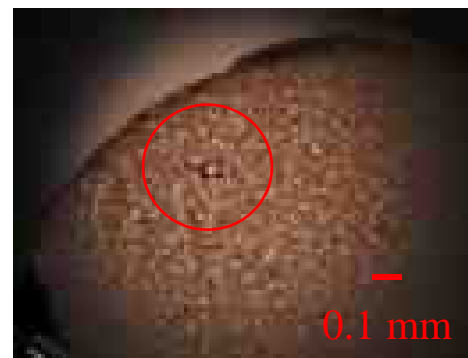
30 mg/ml
3% (w/v) NaCl
(5日後)



リゾチーム溶液 (電場印加無し)

電場印加条件

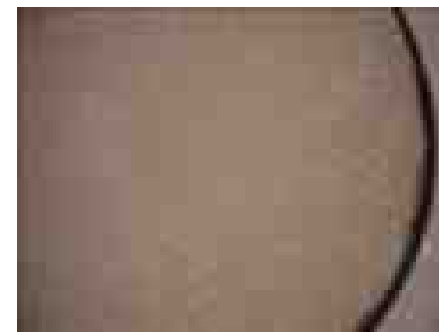
$f=20$ Hz
 $V=3.0$ V_{p-p}
10 hr



生成したソーマチン結晶 (電場印加)

溶液条件

20 mg/ml
1.5% (w/v) PST
(4日後)



ソーマチン溶液 (電場印加無し)

T. Wakamatsu and Y. Ohnishi, *Jpn. J. Appl. Phys.* 50, 048003 (2011).
T. Wakamatsu, *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 41, 13 (2016).

新技術の特徴

電場印加によるタンパク質結晶化促進技術

透明導電膜の使用により、電極を通してタンパク質結晶成長が観察できる。

溶液セルの構造がシンプル



小型化・低コスト化が可能

他の装置(結晶観察・分析装置)への組み込みが容易



光学顕微鏡、光散乱測定装置など、装置の複合化に対応可

(B) タンパク質の凝集・結晶化分析技術

従来技術とその問題点

- 溶液X線散乱法(小角X線散乱法) X線波長 < 0.2 nm
 - ・溶液中のタンパク質の状態観察 (数nm ~ 数十nm サイズ)
 - ・モノマーや少数会合体(ダイマ - 等)の分析に適応

大型装置、高コスト

凝集体(クラスタ -)等の複雑構造体の分析には、**不向き**

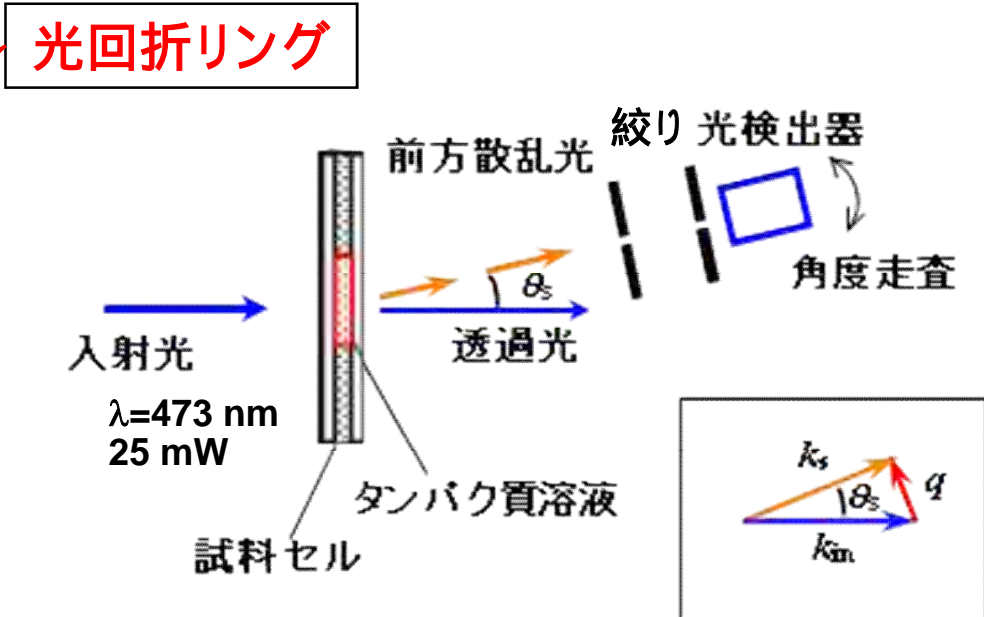


市販装置でタンパク質の凝集・結晶化を分析できる装置は、**未だ無い!**

タンパク質凝集体の光散乱と開発装置

シリカ微粒子の光散乱 (0.5 μm , 水中分散) リゾチーム微結晶の光回折パターン

[遠方スクリーン上]



微弱な前方散乱光

リゾチーム凝集体の前方光散乱 (結晶化前)

[遠方スクリーン上]

前方散乱光の測定系

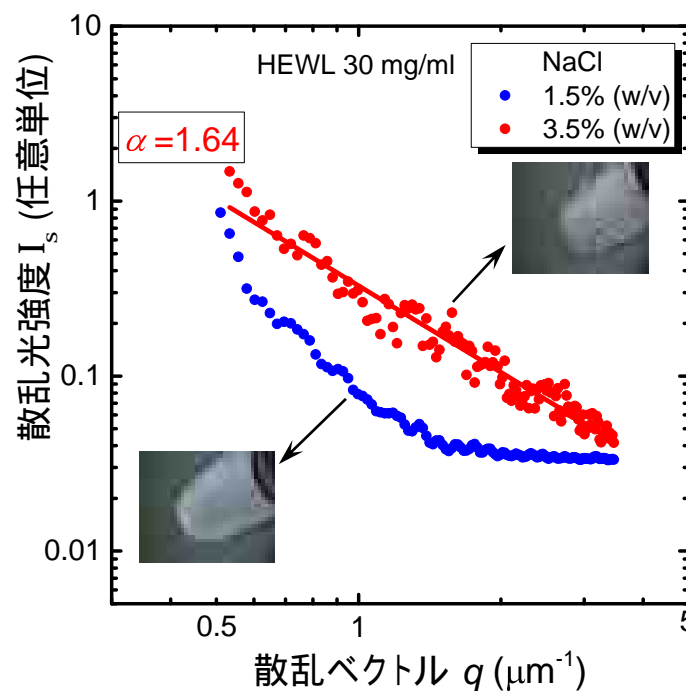
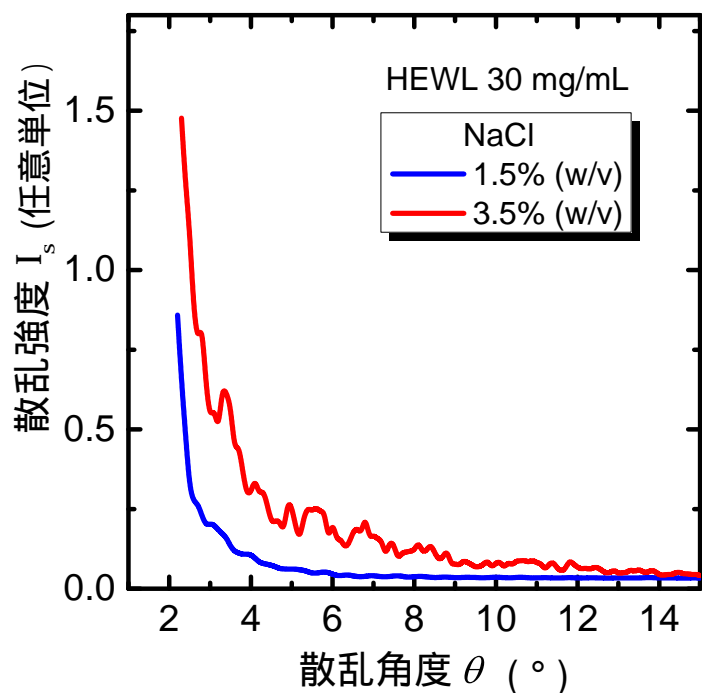


特許第5821127号(2015.10)

開発の結晶化分析装置(プロトタイプ)

適用事例 (タンパク質凝集・結晶化分析)

T. Wakamatsu, *Appl. Phys. Lett.* 98, 263701 (2011).
T. Wakamatsu, *Am. J. Anal. Chem.* 5, 581 (2014).

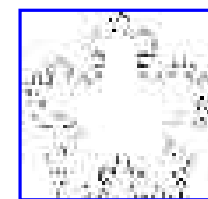


べき関数

$$I_s(q) \propto q^{-\alpha}$$



フラクタル凝集体



フラクタル次元 $d_f = \alpha$

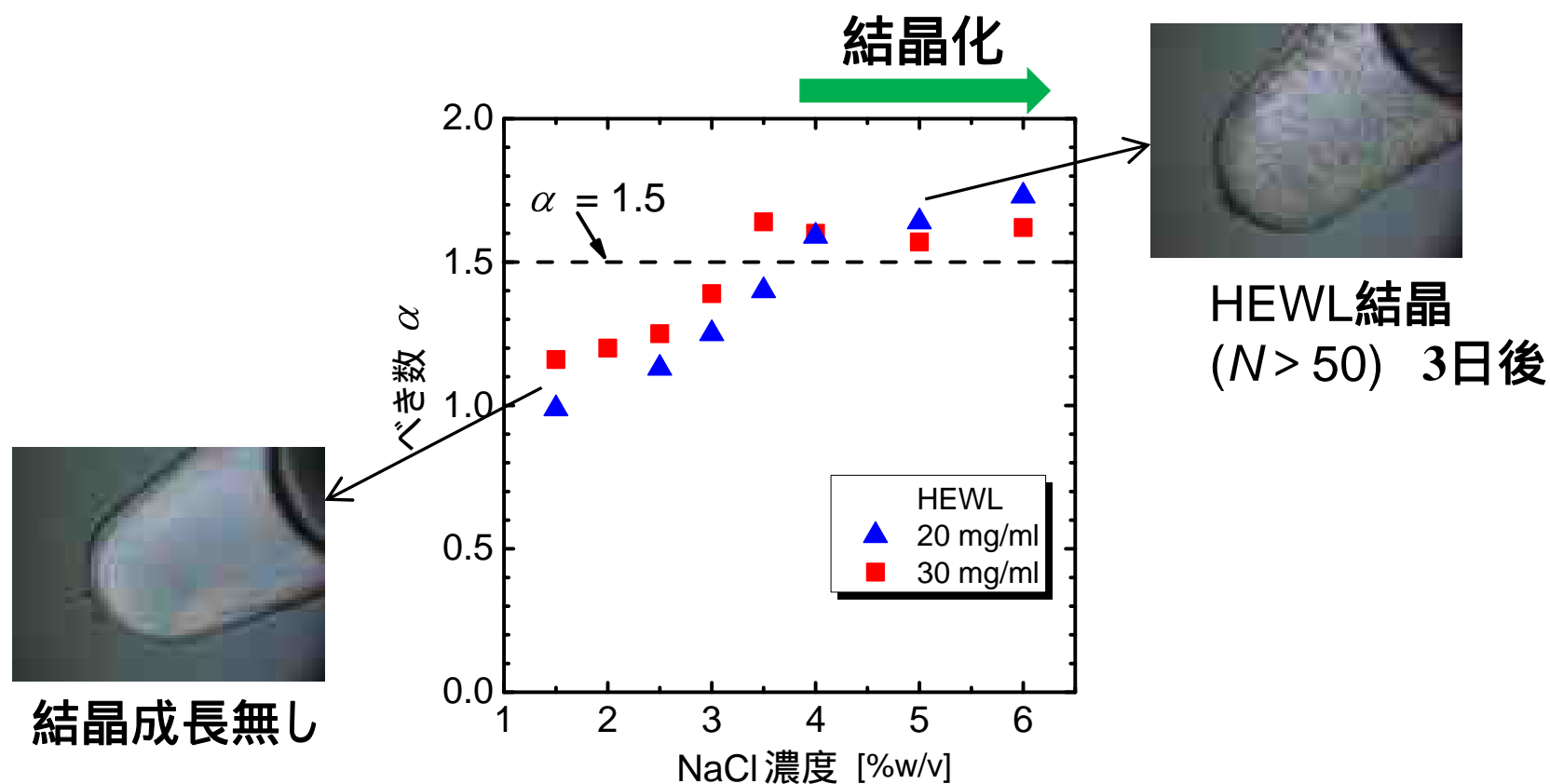
(a) リゾチ-ム溶液の前方光散乱 (b) 前方光散乱 (両対数表示)

* 結晶化するタンパク質溶液の前方光散乱は、べき乗のパターンを示す。

フラクタル凝集体の形成 → 結晶核へ

リゾチームの凝集・結晶化の評価例

T. Wakamatsu, *Am. J. Anal. Chem.* 5, 581 (2014).



* 結晶化するリゾチーム溶液では、**密な構造**のフラクタル凝集体 ($D_f > 1.5$) が形成される。

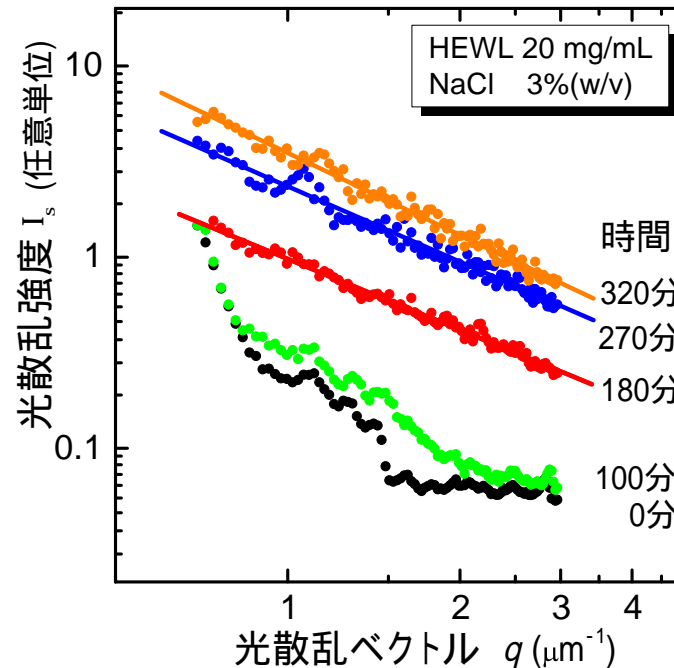
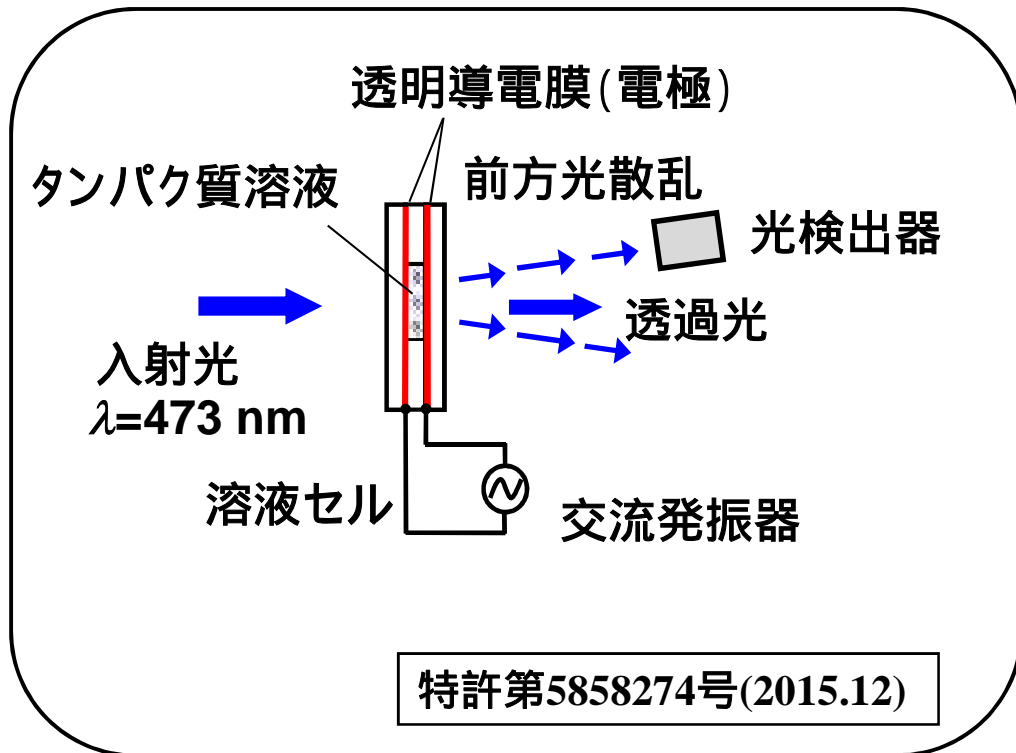
新技術の特徴・従来技術との比較

市販の分析装置との比較

比較項目	粒度計測装置(市販)	当分析技術	備考
分析方法	光回折測定法 動的光散乱法(DLS)	溶液の前方光散乱法 静的光散乱法(SLS)	低散乱角度で DLS計測も可能 光回折法にも 適用可
分析対象	・溶媒中の分散微粒子・凝集体 (溶媒との結合が弱い) ・溶媒との屈折率差の大きな 微粒子・凝集体	溶媒との結合が強く、 光散乱が微弱である凝集体	タンパク質以外の 溶液中の凝集体 も分析可
微粒子・凝 集体サイズ	10 nm ~ 10 μ m程度	10 nm ~ 10 μ m程度	測定光波長に依存 (可視光 0.4 ~ 0.8 μ m)
タンパク質 凝集体に対 する感度	感度が低い (モノマー等の一部測定可)	高感度	タンパク質結晶化 スクリーニングへ の応用可

(C) 複合技術 (開発技術A & B)

T. Wakamatsu, *et al*, *Appl. Phys. Lett.* 99, 153701 (2011).
T. Wakamatsu, *Rev. Sci. Inst.* 86, 015112 (2015).



べき乗則

$$I_s(q) \propto q^{-\alpha}$$

↑ フラクタル凝集体の形成

電場印加下での前方光散乱測定系

電場印加におけるリゾチーム溶液の
前方散乱光の時間変化 (両対数表示)

* 電場印加には、タンパク質の凝集化を促進させる効果がある。

想定される用途

- (1) **科学分野 (バイオ・ライフサイエンス)** :
タンパク質等の結晶作製, 凝集・結晶化の分析など
- (2) **医薬品分野** :
診断薬や治療薬の研究開発, 製造管理など
- (3) **食品・工業分野** :
機能性食品、化粧品、及び機能性微粒子の開発,
分析、品質管理など

実用化に向けた課題

(A) タンパク質の結晶化促進技術

- ・ 代表的な2種類のタンパク質に対して、電場印加による結晶化促進効果を検証

(課題) マルチタイプのタンパク質結晶作製装置の開発

例えば、20～50個程度の溶液セル(各10～30 μ l)対応

(B) タンパク質の凝集・結晶化分析技術

- ・ プロトタイプ機を製作

(課題) 溶液セルの温度調節機能の追加

(例 試料温度 4 ～ 50)

企業へ期待すること

(A) タンパク質の結晶化促進技術について

- 下記テーマの**共同研究**をお願いしたい！
タンパク質結晶作製装置(**多数セル対応**)の開発

(B) タンパク質の凝集・結晶化分析技術について

- 開発のプロトタイプ機をベースに
分析装置の早期実用化をお願いしたい！

『実用化装置を使用したい！』
という**ユーザの要望あり**



装置実用化の必要性

本技術に関する知的財産権 (1)

(A) タンパク質の結晶化促進技術

- ・ 特許第 5626914号 (2014.10)
「生体高分子の結晶化装置、生体高分子の結晶化溶液セル、生体高分子の配向制御方法、生体高分子の結晶化方法、及び生体高分子の結晶」、国立高等専門学校機構、若松 孝、大西 裕季 / USA 特許 (US20110308948)

(B) タンパク質の凝集・結晶化分析技術

- ・ 特許第5821127号 (2015.10)
「タンパク質結晶化分析装置及びタンパク質結晶化分析方法」、国立高等専門学校機構、若松 孝、丸山 智章、大西 裕季
- ・ 特願2015-198366 (2015.10)
「結晶化分析装置及び結晶化分析方法」、国立高等専門学校機構、若松 孝

本技術に関する知的財産権 (2)

(C) 複合技術A & B

- ・ 特許第5858274号 (2015.12)

「結晶化促進方法、結晶化解析方法、結晶の製造方法、結晶化装置の制御プログラム、記憶媒体、及び結晶化装置」、
国立高等専門学校機構、若松 孝、豊島 晋

お問い合わせ先

- 開発技術の内容、共同研究に関すること

福島工業高等専門学校

総務課 地域連携係

T E L : 0246 - 46 - 0738 / F A X : 0246 - 46 - 0713

e - mail : liaison_office@fukushima - nct.ac.jp

- 技術移転(特許ライセンス)に関すること

茨城工業高等専門学校

総務課 研究協力・地域連携係

T E L : 029 - 271 - 2952 / F A X : 029 - 271 - 2813

e - mail : kenkyo@sec.ibaraki - ct.ac.jp