

タンパク質結晶構造解析への マイクロ流体デバイスの応用

1 はじめに

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

2 タンパク質の結晶構造解析

タンパク質の立体構造解析法としては、X線結晶構造解析、NMR、クライオ電子顕微鏡などの手法がある。また、近年では人工知能プログラムである AlphaFold 2 による立体構造予測も導入が進んでいる。この中でX線結晶構造解析は、原子レベルでタンパク質の立体構造を決定できる強力な手法である。タンパク質のX線結晶構造解析は、(1) タンパク質の発現・精製、(2) タンパク質の結晶化、(3) X線回折実験、(4) データ処理・構造決定、の四つのプロセスに大別されている。これまでに、(2) タンパク質の結晶化および (3) X線回折実験のためのマイクロ流体デバイスが報告された。また、(2)~(4) までのプロセスをシームレスに実現可能なマイクロ流体デバイスも開発されている。

3 タンパク質の結晶化

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

めに、(1) 微小液滴および(2) マイクロウェルを用いた結晶化条件の最適化が報告された¹⁾²⁾。

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

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

4 X線結晶構造解析

マイクロ流体デバイスを用いた結晶構造解析法の大きな利点の一つは、デバイス内で作製した結晶をそのまま

測定できる点である。タンパク質の結晶は、約 50% 程度の水を含み、もろくて壊れやすい。また、通常は 100 K で測定するため、抗凍結剤に結晶を浸漬するなど、X 線回折実験の前処理が必要である。従来の結晶構造解析では、結晶が析出した溶液から、結晶を 1 個取り出して抗凍結剤に浸漬し、X 線回折計に設置・冷却・測定の手順で回折データを取得する。結晶の回収には、ループ（ナイロンの輪）という器具を使用するが、結晶の取り扱いには熟練した手技が必要である。

微小液滴を用いる場合、液滴を回収したデバイスあるいはキャピラリーを X 線回折計に設置するだけで測定可能である。しかし、デバイス部材の種類および厚みは、X 線回折データのシグナル/ノイズに大きく影響する。PDMS は X 線の減衰が比較的大きい。また、減衰を低減するために厚みを薄くすると、デバイス作製だけではなく、X 線回折計に自立させることが困難となる。一方で、シクロオレフィンコポリマー (COC) やシクロオレフィンポリマー (COP) は、小角側での散乱は観測されるが、広角側ではタンパク質結晶からの回折を十分に検出することができる。キャピラリーの場合は、市販の X 線回折実験用の肉厚が薄いガラスキャピラリーに液滴を回収・測定されることが多い。また、リゾチームなどの対称性が高いタンパク質の場合は、PFA などのキャピラリーでも測定に問題がない場合が多い。

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

5 近年の研究および応用例

創薬研究では、標的とするタンパク質とリガンドあるいは小さな化合物群であるフラグメントとの複合体の構造情報が必須である。リガンドあるいはフラグメントスクリーニングでは、タンパク質の結晶作製後、結晶をループで回収し、創薬候補化合物を含有する結晶化剤に浸漬させる。その後、抗凍結処理、X 線回折実験、構造解析などのプロセスを経て、立体構造が決定される。しかし、創薬研究では、数万種類以上のフラグメント化合

物を測定する必要がある。従来の X 線結晶構造解析のスループットには課題があった。

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

6 おわりに

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

文 献

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

[北海道大学大学院工学研究院 真栄城 正寿]