

第2回タンパク質構造解析BL講習会：  
スクリーニングで析出した結晶をうまく回折実験にもって行こう

# 測定に向けた結晶の取り扱いについて

## JAXAおよびDiamond Light Sourceの取り組みと現状

宇宙航空研究開発機構 (JAXA)  
きぼう利用センター  
岩田茂美

○きぼう利用PCG実験の最近の進展

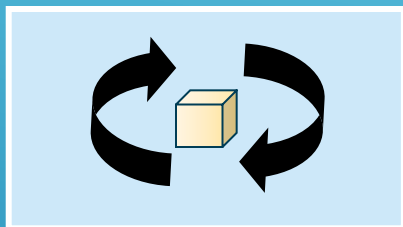
○Diamond Light Sourceの*In situ*測定



# 宇宙での結晶生成の特徴

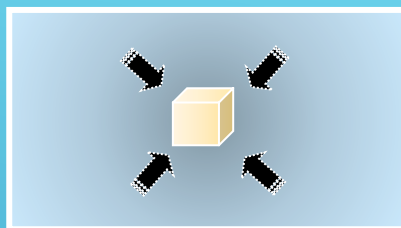


## 地上



密度差対流により  
濃度が均一化（乱れ）

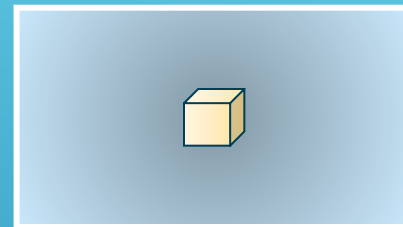
- ・ 分子配列の乱れ
- ・ クラスタ状（小さな結晶が多数集まった塊）に成長



周囲のタンパク質分子を取り込みながら結晶が成長  
→ 結晶周囲のタンパク質濃度が部分的に低下



## 宇宙(微小重力)



密度差対流抑制により  
濃度勾配が維持

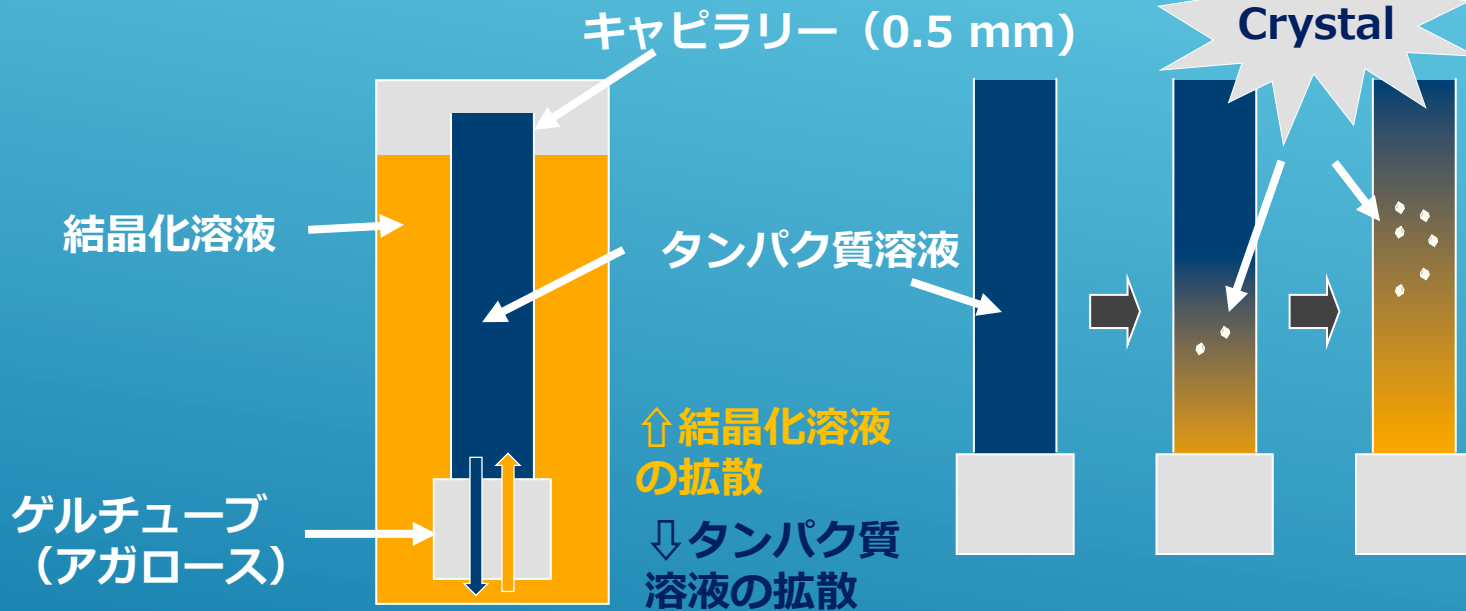
- ・ 結晶品質の向上（不純物の取り込み抑制など）
- ・ 単結晶の生成

宇宙では、地上よりも不純物が少なく、  
分子配列の揃った高品質の結晶が生成

# タンパク質結晶生成の原理

## -カウンターディフュージョン法-

### ゲルチューブ法



# JAXA-PCG実験

ゲルチューブ法：液-液拡散法を用いた結晶化  
結晶化温度：20°C(ロシア便)

温度

搭載試料の種類・結晶化手法の充実

浸透チューブ法、透析法、サンドイッチプレート(LCP)

嫌気条件下での結晶化、  
結晶化開始コントロール

運用面の改善：打ち上げ機会増、搭載量増など

# SpaceXを利用したPCG4°C実験

## ✓4°Cでの結晶化

×スケジュールが不安定で延期が多い

→**実験開始のタイミングをコントロール**する仕掛けを導入

## 結晶化実験開始コントロール

沈殿材とたんぱく溶液を仕切るアガロース部分を圧迫して溶液を隔離する



宇宙ステーションの「きぼう」まで輸送



「きぼう」でクレーが圧迫を解除して結晶化開始



国内へ輸送後結晶観察・取り出し・回折実験

温度は全行程で4°C

# JAXA-PCG実験の選択肢

軌道上結晶化実験	結晶化温度	20℃および4℃
	結晶化法	ゲルチューブ法 浸透チューブ法（蒸気拡散法に相当） 透析法
	その他	・ 嫌気条件下での結晶化 ・ 大型結晶作成（検証中） ・ LCP法、20℃のみ（検証中）
軌道上結晶化実験へ向けた検討		

## 簡易結晶化診断

- ・ 提供していただいた試料について、基本的な性状確認と各種結晶化スクリーニング、結晶が得られた場合回折計での回折実験を実施します。  
（結果にかかわらず最長6か月）

問い合わせ：PCGメンバーまたはメール（Z-CRYSTAL@ml.jaxa.jp）まで

○ *in situ* Experiment at  
Diamond Light Source





# DLSの*in situ*測定

Membrane Protein Laboratory (MPL) 2007~

膜たんぱく質の構造解析

膜たんぱく質に適した回折データ収集システムの開発  
(+124ビームライン)

得られた技術の普及 (オープンラボ)

微小・回折強度の弱い結晶からのデータ収集システム  
(単結晶 & 複数結晶)

迅速な結晶評価

(プレートスクリーニング) による結晶化条件の最適化

# DLSの*in situ*データ測定

現在*in situ*実験ができるビームライン：I24・I03

Beamline	I24 Micro-focus	I03 P2/P3 containment
Plate	All SBS format LCP sandwich plate	All SBS format
Plate Storage	×	5 plates
Plate mounting	Manually	Manually/Robot
Rotation Range	-10 ~+38	-20~+20
Goniometer change	2 min	
Remote access	測定可,ただしプレートマウントは手動	

建設中：VMXi (*in situ*専用)

自動プレート測定、4℃実験が可能に

## DLSの*in situ*データ測定の流れ (I24)

課題がある：結晶とプレート用のゴニオはすぐに切り替わるので  
自分のビームタイム内で自由にやる

課題がない：通常のビームタイム申請（採択まで6か月）  
ラピッドアクセス（ビームラインスタッフに相談）  
MPLのユーザはMPLのビームタイムも利用可  
誰か課題のある人に頼む

以前はゴニオの取り換えはスタッフがやり、時間もかかっていたため

- ・プレート用ビームタイムが定期的にあった。
- ・プレートモードでスクリーニング→ゴニオ交換→凍結して単結晶測定

# *In situ*測定のアプリケーション

結晶化条件最適化：

Additive/Ligand/Detergent Screen

結晶取り出し・凍結時のばらつきを  
抑えることができるので比較しやすい

# データ測定

Structure determination of an integral membrane protein at room temperature from crystals in situ

D. Axford et.al. Acta Cryst. (2015). D71, 1228–1237

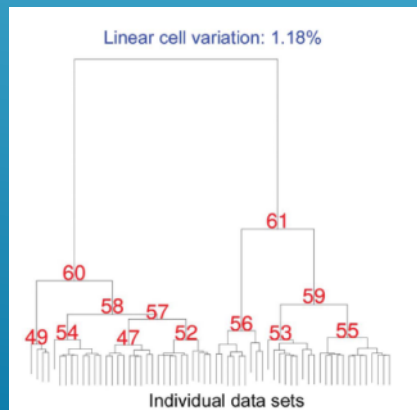
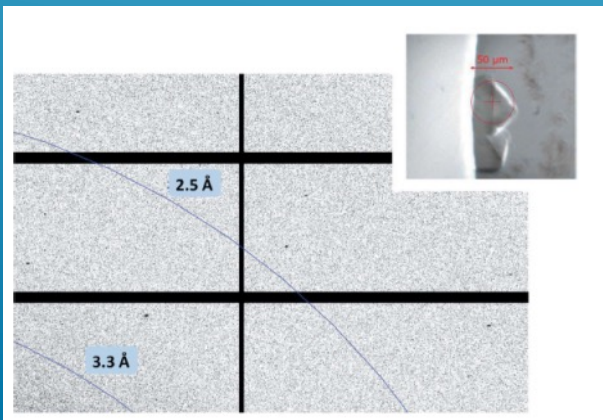
TehA : インフルエンザウイルス由来イオンチャンネル

凍結条件が見つからない、取り出し困難な結晶でもデータを取ることができる。

マイクロビームなら1ドロップ中の複数の結晶を1結晶ずつ測定できる。

多数の結晶から集めた部分データをBLENDでマージ・解析してよいデータを抽出

凍結していないので結晶間のデータのばらつきは小さい。

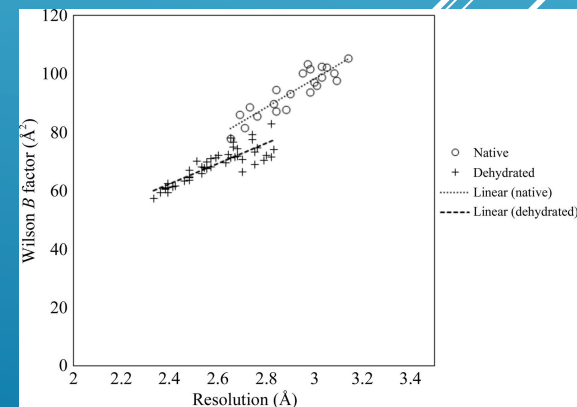
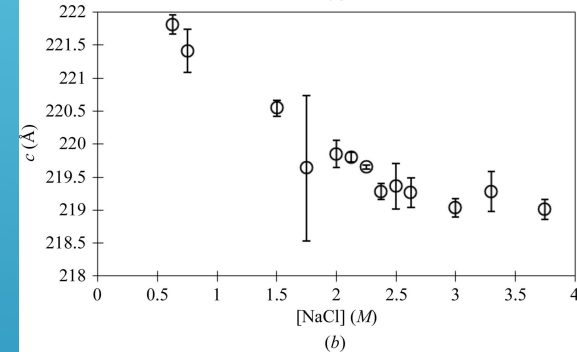
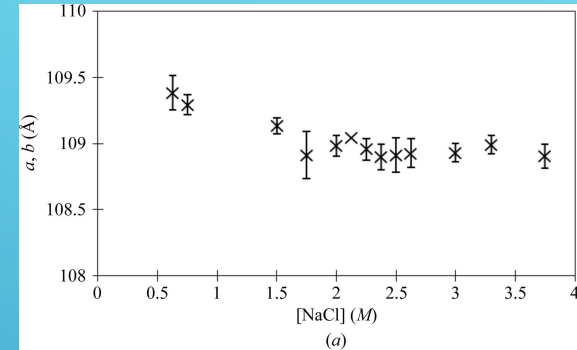
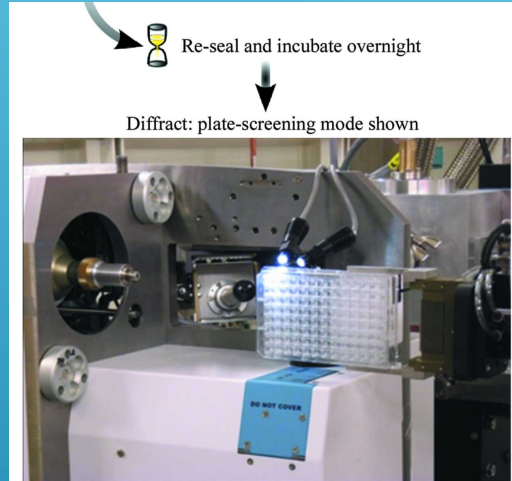
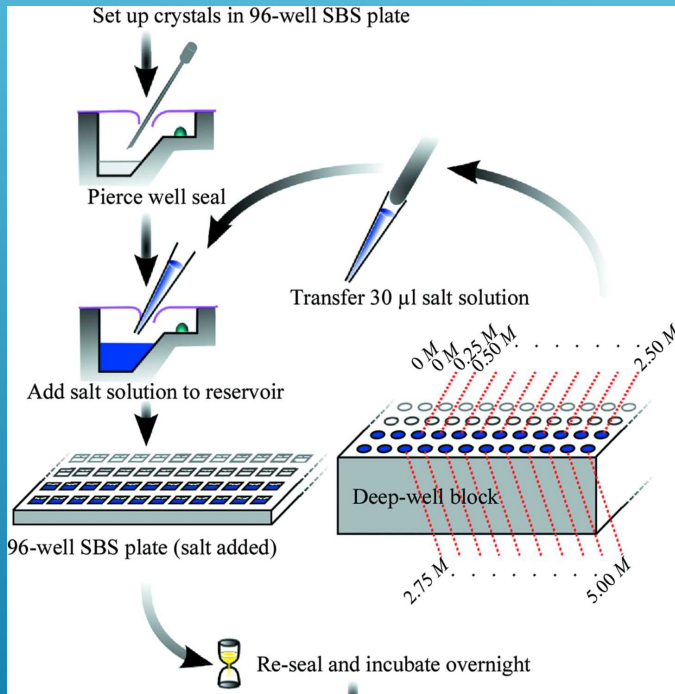


	100 K (one crystal)	RT (56 crystals)
<b>Data collection</b>		
Space group	<i>H3</i>	<i>H3</i>
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = b = 97.03, c = 136.76, \alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	$a = b = 98.60, c = 136.38, \alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Resolution (Å)	50.0–1.5 (1.54–1.50)	50.0–2.3 (2.38–2.30)
$R_{\text{merge}}$	0.035 (0.506)	0.096 (0.513)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	14.5 (2.4)	13.6 (3.7)
Completeness (%)	98.6 (98.3)	92.9 (90.5)
Multiplicity	3.3 (3.1)	4.9 (3.6)
CC <sub>1/2</sub>	0.998 (0.843)	0.996 (0.747)
<b>Refinement</b>		
Resolution (Å)	50.0–1.5 (1.55–1.50)	50.0–2.3 (2.38–2.30)
No. of reflections	267005	99220
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	13.6/16.9 (21.7/22.7)	15.6/20.01 (23.3/28.2)
No. of atoms		
Protein	2461	2413
Ligand/ion	140	40
Water	158	71
$B$ factors (Å <sup>2</sup> )		
Protein	24.4	28.9
Ligand/ion	59.0	50.8
Water	42.0	34.7
<b>R.m.s. deviations</b>		
Bond lengths (Å)	0.006	0.01
Bond angles (°)	0.936	1.364

# デハイドレーション実験

Using high-throughput in situ plate screening to evaluate the effect of dehydration on protein crystals

A. Douangamath et. al., Acta Cryst. (2013). D69, 920-923



# XFEL HubとしてのDLS

- XFELハード・ソフト開発
- インジェクションシステムを用いた試料調整・試料評価の最適化
- 世界のXFELへのインターフェース
- データ処理のサポート
- European XFELへの旅費サポート

## *In situ*測定のプロス & コンズ

- ✓ハンドリングエラーやクライオ条件を気にしなくてよい
- ✓塩や低分子であれば微結晶からでも回折点が測定できる
- ✓格子定数や対称から目的物かどうかある程度推測できる
- ✓多数の条件を迅速に評価できる→結晶化条件の最適化を加速
- ✓データ収集も可能
- ✗どこでもいつでもできるわけではない
- ✗プレートをマウントできるセットアップが必要
- ✗ビームサイズ、プレートの形状・素材に制約がある





# PCG4°C実験の意義

PDBに登録されているタンパク質結晶構造の約13%の結晶化温度は低温(<10°C)

- 20°Cで徹底的にスクリーニングすれば4°C実験はいらぬか？  
--おそらくNo
- 変性しやすいたんぱく質に有利
- 低温で結晶化することは意味がある
  - 4°Cでないと結晶化しない
  - 20°C条件より良質
  - 結晶性や空間群が違ふ結晶になる

## ☆スクリーニング（キット）で結晶がでた

◎時間や試料を無駄にしないために、目的の結晶かどうかすぐ確認する。

低分子：キットや溶液中の成分、精製からの持込み

- ・溶液中に疑わしい成分がないか？
- ・リザーバーに同じ結晶が出ていないか？
- ・偏光や蛍光は見えるか（参考程度）

たんぱく：コンタミ、サブユニット、部分構造

- ・色付きでも確認したほうがよい

◎再現するか？

同一精製ロットの試料から結晶が再現するか

別の精製ロットの試料から結晶が再現するか

再現する→複数の結晶で検討できるので落ち着いて試せる

再現しない場合、コンタミや分解物かも。目的物だったとしても後々まで苦勞することになるので別条件を探すか精製までのステップを見直すことも考慮。

◎X線に照射する→回折像が得られれば確実。

すぐにX線に当てられない。

待っていると結晶がだめになってしまうかも

1個（1ドロップ）しかないので取り出し時に

ダメになってしまうかも

微結晶や反射強度の弱い結晶だとわからない時もある

どうしても  
X線で確認したい

プレートのまま  
放射光でチェック  
できたら...