

PF-UA PX-UG 第9回中級者講習会

タンパク質結晶化の方法と実践 ～私独自のアプローチ～

高知大学工学部化学生命理工学科

杉山 成

タンパク質結晶化条件の探索

➤ ランダムスクリーニング

市販のランダムスクリーニングキット

➤ システマチックスクリーニング

市販のGridスクリーニングキット

“Protein Crystallization and Dumb Luck”

「 We might back up and wrap the dumb luck in an elegant idea.」

Dr. Bob Cudney (Hampton Research), *Rigaku Journal*, 16, 1999

結晶化に適したサンプルであることの確認

タンパク質試料の性状確認

純 度： 高純度であること

SDS-pageで単一バンド

濃 度： 高濃度まで濃縮できること

10～20 mg/mL

分散状態： 溶液中において均一な粒系分布を示すこと

動的光散乱でmonomodal

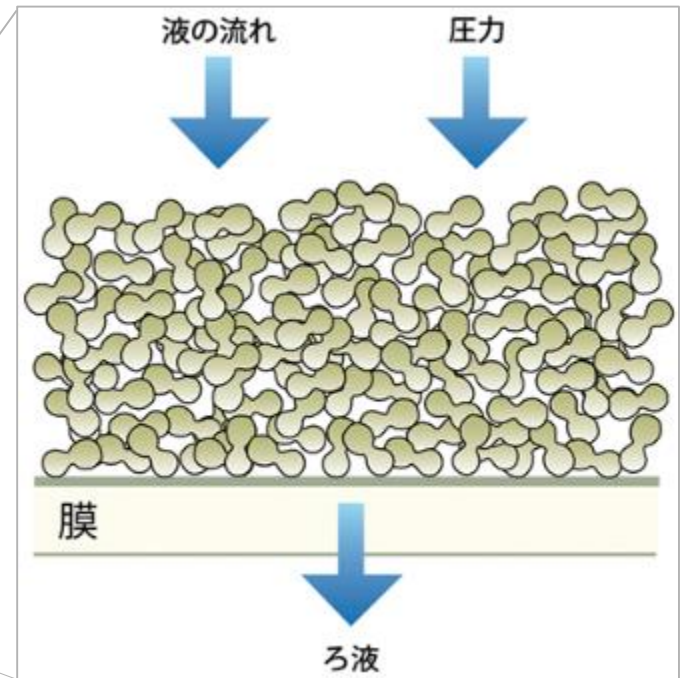
例外が少なくない

タンパク質の濃縮操作



限外ろ過膜

濃度分極



<https://m-hub.jp/analysis/705/basic-of-ultrafiltration>



シュリーレン現象の観察

https://www.merckmillipore.com/JP/ja/20140428_103131

沈殿テスト

「新生化学実験講座タンパク質I」

日本生化学会編 1990年 東京化学同人

14・2・2 透析法

パッチ法の欠点には塩濃度の微妙な調節が困難なこと以外に pH の調節が困難なことがある。(緩衝化したタンパク質溶液から出発しても、硫酸粉末を加えると pH は下がる。ときには pH 変化を見込んだ高 pH から出発する必要も生じる。) 透析法では透析外液の pH は連続的に容易に調節できるので pH 変化に対する結晶化状態を観察でき都合がよい。また透析法は塩濃度変化も任意の速さで調節できる上、内外液の塩濃度差が小さくなるにつれ濃度変化が緩やかになり、平衡へゆっくりと到達できる。

透析法を含め後記の諸方法に共通な重要な点は、非晶質を生じる塩(沈殿試薬)濃度をあらかじめ知っておくことである。これにはホールスライドガラス上に試料 10 μ l をとり、顕微鏡下で濃度既知の高濃度塩溶液を加えて析出非晶質の様子をみて知ることができる。

「蛋白質・酵素の基礎実験法」

編集 堀尾武一(大阪大学) 1994年 南江堂

3) 系の沈殿剤量を増加させることによる結晶化

現在でも最も頻繁に行われている古典的な蛋白の結晶化法である。これは、蛋白水溶液へ、細かく磨砕した固体の沈殿剤(硫酸など)の粉末、その高濃度溶液、あるいは、液体の沈殿剤(ポリエチレングリコール、アセトンなど)を、直接に、しかも、徐々に、加える方法である。蛋白の結晶化に適した沈殿剤濃度の判定には、しばしば、“僅かな濁りが生じる程度”が用いられる。

「結晶成長ハンドブック」

日本結晶成長学会編 1995年 共立出版

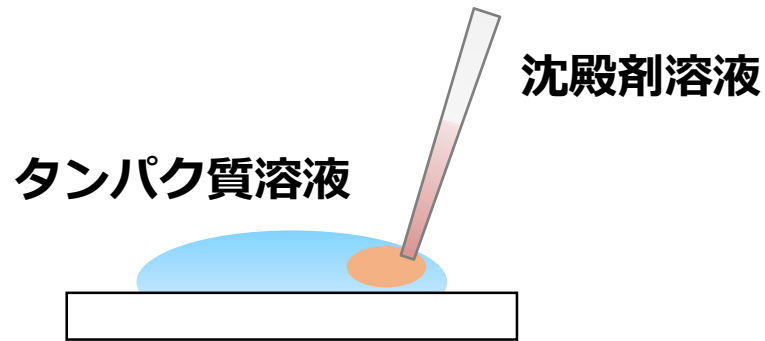
C. 結晶化の実際

結晶解析の対象とする新規の蛋白質は、ほとんどの場合まだどこでも結晶化されたことのないものであり、結晶化条件をサーチするところから始めなければならない。また最近では試料量が少ないものも多く、初め 10 mg 程度の量で結晶化条件を検討するのが普通である。結晶化に用いる蛋白質溶液は通常 1~2% の濃度にするから、0.5~1 ml の溶液を手にすることになる。表 6.3.1 に掲げたような物質のなかから適当なものを選び、実体顕微鏡でスライドガラスの上に 5 μ l 位の蛋白質溶液を載せ、濃い沈殿剤溶液を少しずつ定量的に加えてゆき、蛋白質の沈殿が析出し始めるのを観察する。このようにして目的の蛋白質を沈殿させる物質と大体の濃度を知ることができる。結晶化には、見つかった沈



沈殿ポイントの把握

沈殿テストの操作方法



実体顕微鏡下にて操作

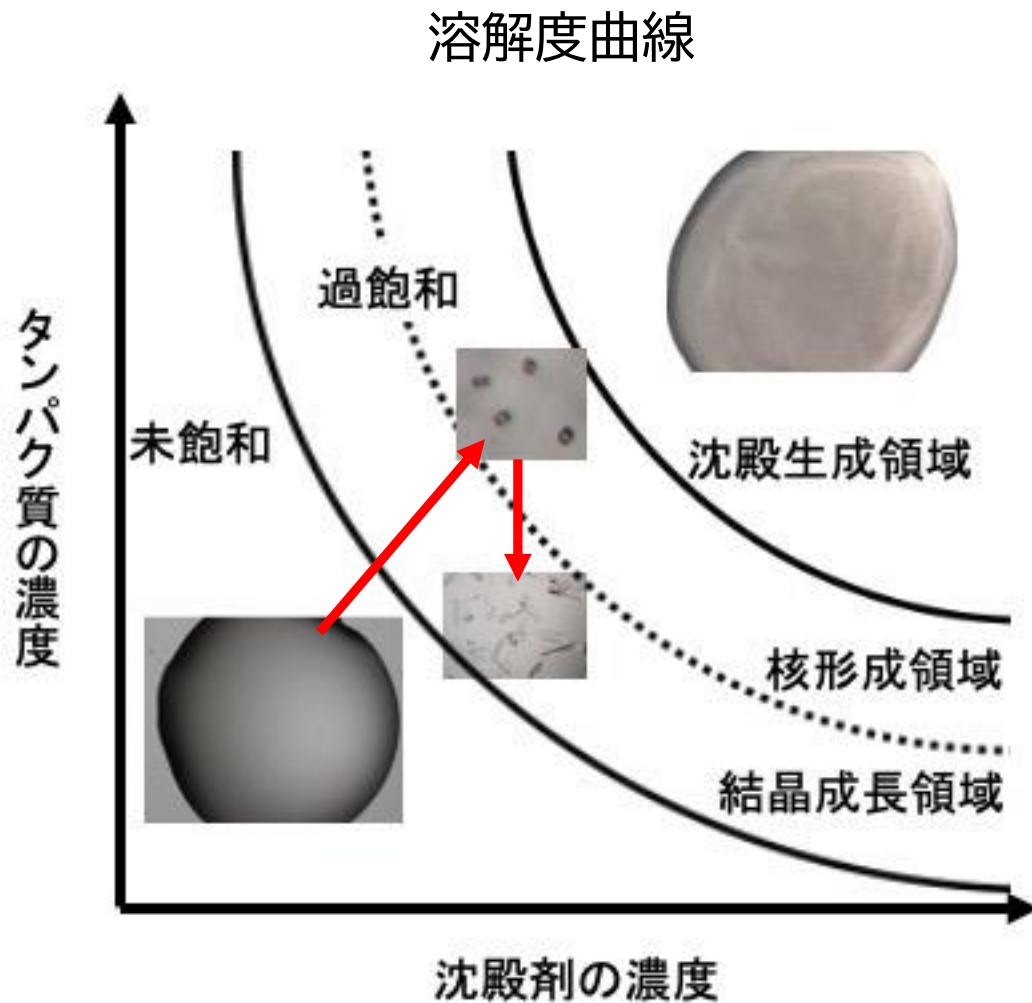
- 1) スライドガラス上にタンパク質溶液5 μL をのせる
- 2) 高濃度の沈殿剤を0.5~1.0 μL ずつ加える
- 3) タンパク質の沈殿が析出するのを観察する



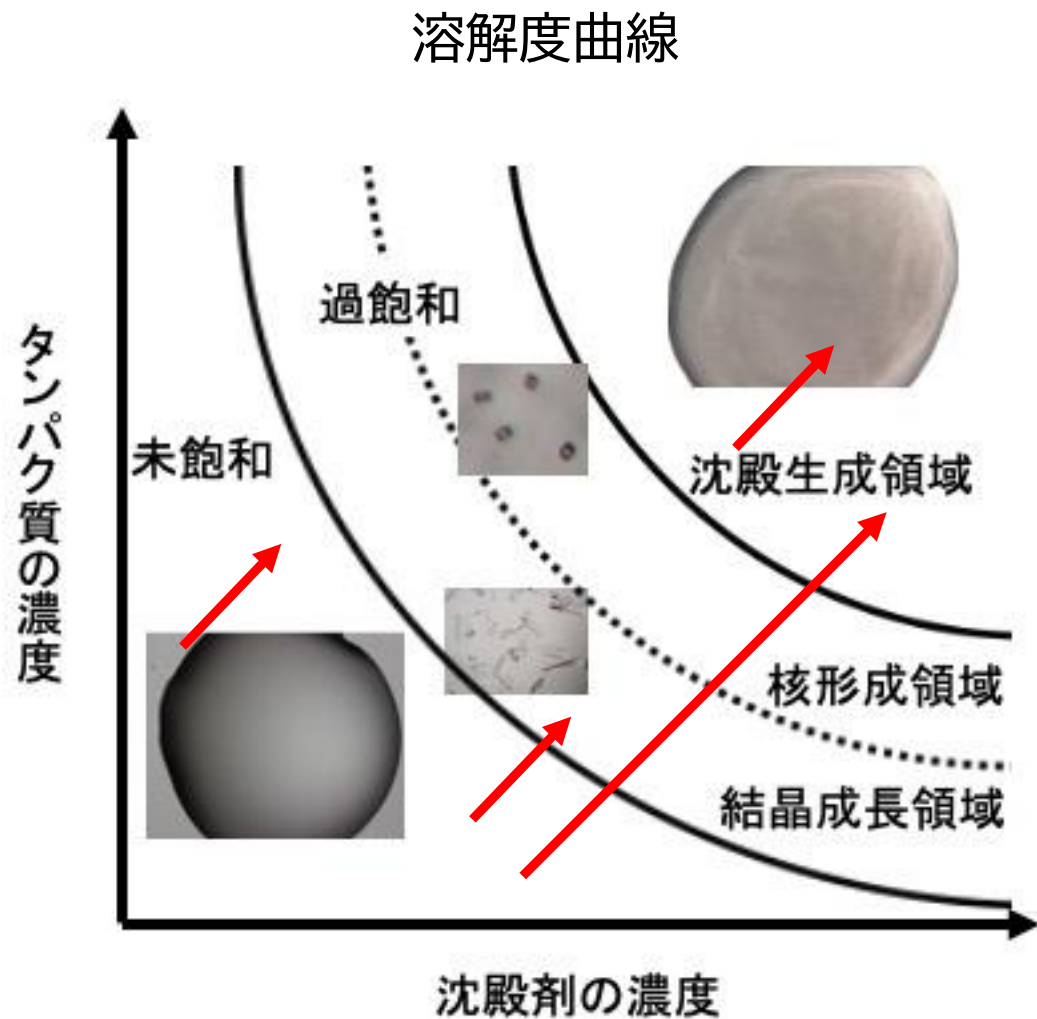
沈殿が生じた**沈殿剤濃度**を把握

沈殿ポイントの把握

結晶化は過飽和状態での核形成と結晶成長からなる



沈殿ポイントの把握

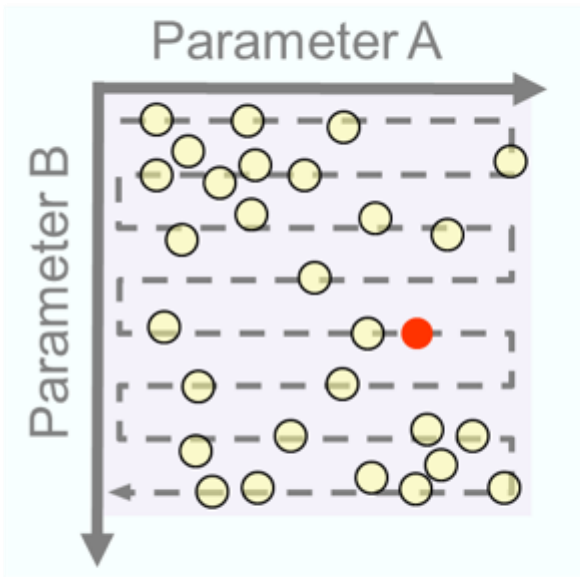


外液の沈殿剤濃度の決定

沈殿テストの目的

What is High Confidence Crystallization ?

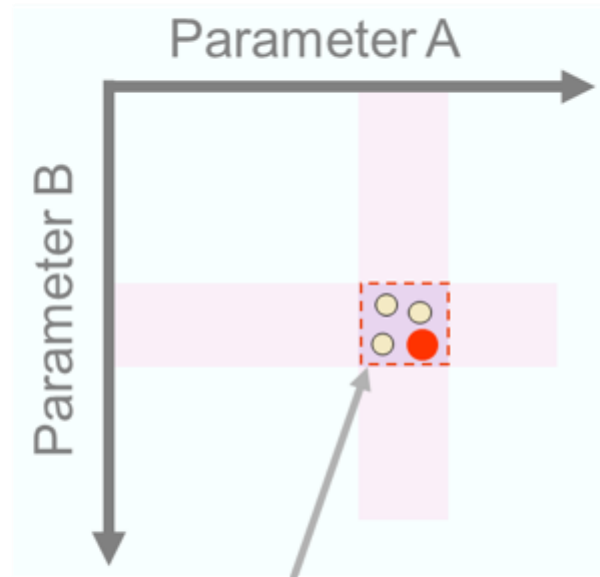
Random



Long journey

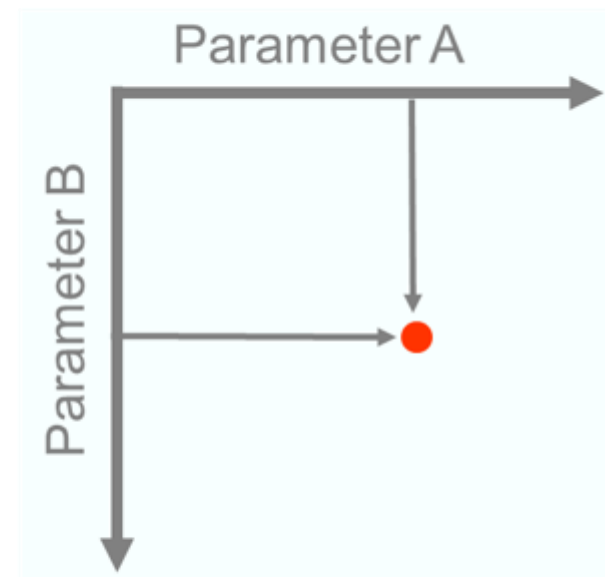
Dumb Luck

High Confidence



Short trip

Ideal



Warp ?!

スクリーニングの**効率化**

沈殿テストの改良

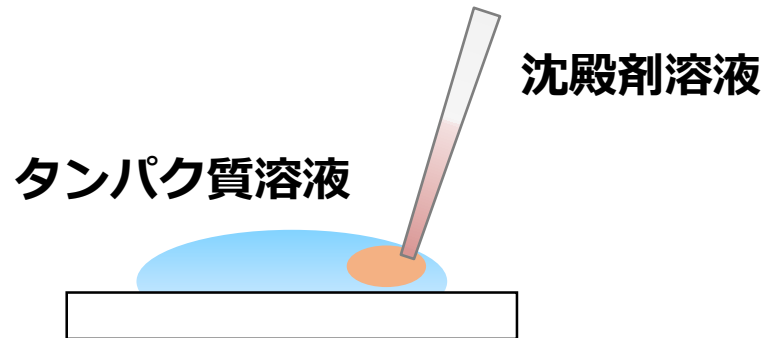
Salts	Polymers	Organic solvent
3.5M ammonium sulfate	50% (w/v) PEG4000	99% MPD

日本結晶学会誌 1996年 38巻 p.2-7



沈殿剤の**種類と濃度の関係**を把握

沈殿テストの操作方法



実体顕微鏡下にて操作

- 1) スライドガラス上にタンパク質溶液5 μL をのせる
- 2) 高濃度の沈殿剤を0.5~1.0 μL ずつ加える
- 3) タンパク質の沈殿が析出するのを観察する
- 4) 沈殿へ0.5~1.0 μL ずつ緩衝液を加える
- 5) 沈殿の溶解の有無を観察する



タンパク質溶液の**状態変化**の確認

沈殿テストの改良

Salts	Polymers	Organic solvent
3.5M ammonium sulfate	50% (w/v) PEG4000	99% MPD

日本結晶学会誌 1996年 38巻 p.2-7

沈殿剤の**種類と濃度の関係**を把握

タンパク質溶液の状態変化の確認

- **可逆的沈殿と不可逆的沈殿**
- **沈殿の析出と溶解速度**
- **沈殿の種類**

各種タンパク質の凝集性と生命機能にはLLPS以外にも多くの関連性が見い出せる可能性が有り。

タンパク質結晶化

➤ ランダムスクリーニング

市販のランダムスクリーニングキット

➤ システマチックスクリーニング

市販のGridスクリーニングキット

“Protein Crystallization and Dumb Luck”

「 We might back up and wrap the dumb luck in an elegant idea.」

Dr. Bob Cudney (Hampton Research)

**システマチックスクリーニングを中心に
ランダムスクリーニングで補完**

沈殿テストを用いた結晶化の例

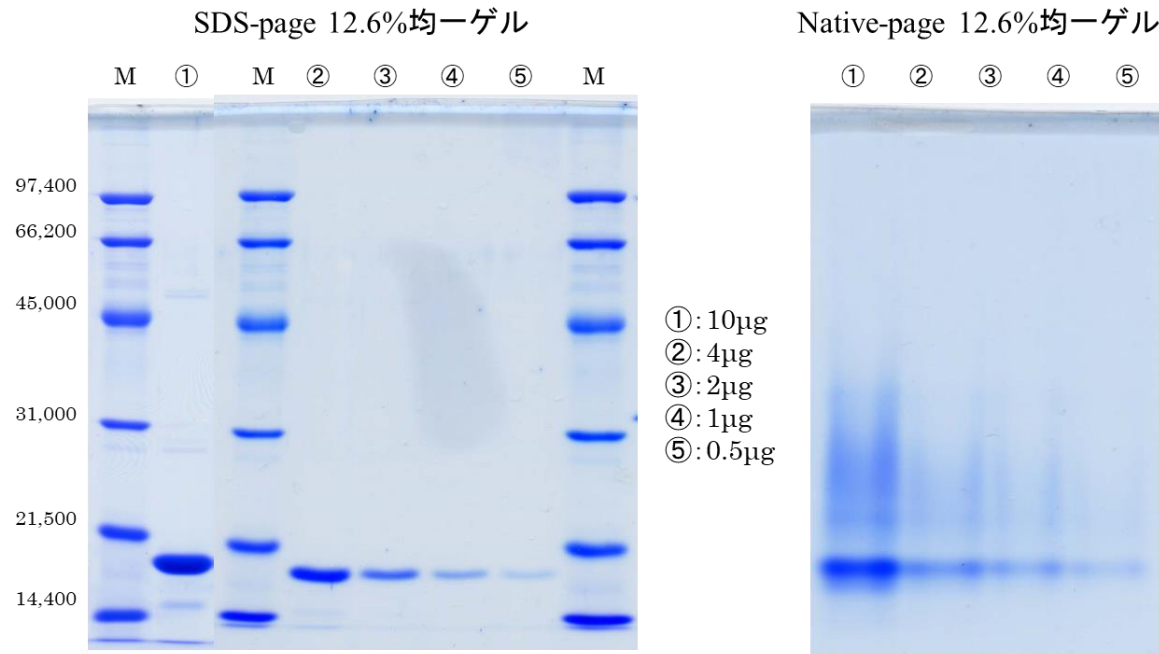
結晶化の例：性状確認

サンプルについて

濃度 : 8 mg/ml (無色透明)

緩衝液 : 20mM K-Phosphate pH6.0, 150mM KCl

動的光散乱 : 単分散



サンプルは結晶化に適している

結晶化の例

沈殿剤	サンプル量	沈殿剤添加量	沈殿ポイント	備考
3.5M Ammonium sulfate	5 μ L	11 μ L	> 2.4 M	可逆的、沈殿ポイントは不明瞭、2.4Mで数分間静置後、ドロップ全体が沈殿
50% PEG4000	5 μ L	3 μ L	15~19%	可逆的、沈殿ポイントは明瞭
99% MPD	5 μ L	4 μ L	28.5~45%	可逆的、沈殿ポイントは明瞭



スクリーニング225条件で結晶化実験(1回目)

実験結果

ほぼ全ての条件でタンパク質由来と考えられる沈殿が観察されたが、目的タンパク質の結晶は観察されなかった。



イメージ写真

結晶化の例

目的タンパク質とその関連タンパク質に関する情報収集

関連タンパク質の論文:

Materials and methodsのPurificationとAssayにおいて、
0.1% CHAPSが添加されていた



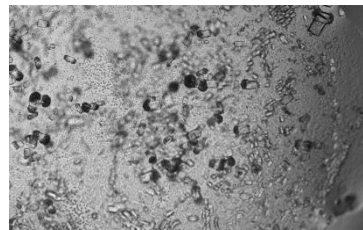
スクリーニング156条件で結晶化実験(2回目)

添加剤として β -OGとCHAPSを使用

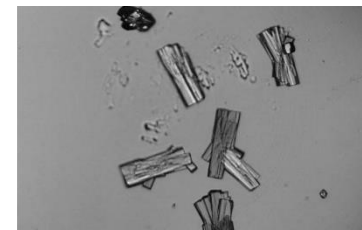
実験結果



0.1M HEPES-NaOH (pH7.5),
2.5M NH₄-Sulfate, β -OG



0.1M Na-Citrate (pH5.6),
2.5M NH₄-Sulfate, CHAPS



0.1M HEPES-NaOH (pH7.5),
2.5M NH₄-Sulfate, CHAPS

結晶化の例

2回目結晶化実験結果のまとめ

緩衝液: Hepes-NaOH (pH7.5), Bistris-HCl (pH7.0), Mes-NaOH (pH6.5), Na-Citrate (pH5.6), Na-Acetate (pH4.6)

沈殿剤: NH_4 -sulfate, PEG4000 & Li-Sulfate

添加剤: β -OG, CHAPS



スクリーニング94条件で結晶化条件の精密化(3回目) 主に界面活性剤の濃度を精密化

実験結果

ドロップ溶液

沈殿剤: 40mM Bistris-HCl (pH7.0)
1.0M NH_4 -Sulfate

添加剤: 0.05% CHAPS

外液

沈殿剤: 100mM Bistris-HCl (pH7.0)
2.5M NH_4 -Sulfate

