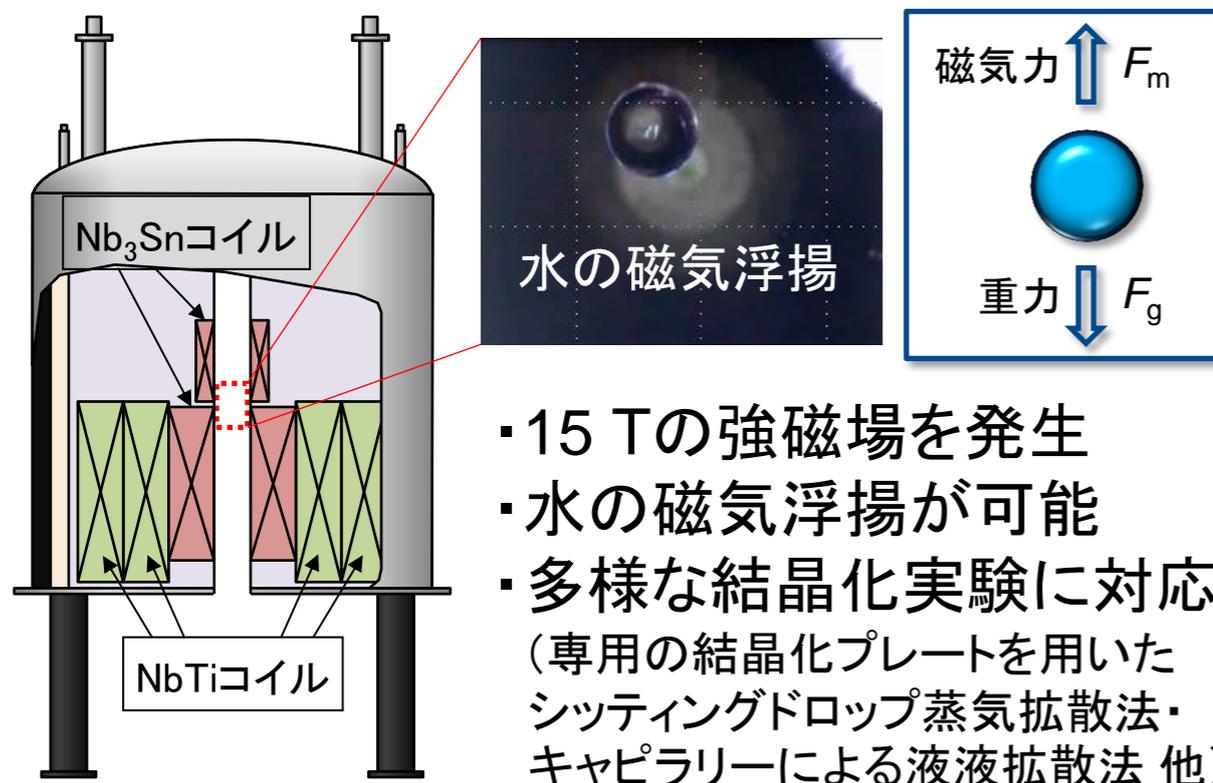


磁気力場中での結晶化

[技術の概要]

磁気力場とは、超伝導磁石などによる強磁場 (B) とその磁場勾配 ($\text{grad}B$) の積に比例した磁気力が発生している空間のことを指します。本支援に供する装置では、水に対する重力を相殺するほどの強い磁気力を発生させることができ、自然対流が抑えられる擬似微小重力環境を各種実験に利用することが可能です。



[技術の利用例]

- 擬似微小重力環境を利用した高品質タンパク質結晶の取得
 - 用途
 - ・ 初期条件スクリーニング
 - ・ 結晶化条件最適化
 - 手法
 - ・ シッティングドロップ蒸気拡散法
 - ・ バッチ法
 - ・ 液液拡散法
- 強磁場を利用した磁場配向結晶の取得

連絡先

[所属] 東京大学大学院農学生命科学研究科

[名前] 田之倉 優

[E-mail] amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

タンパク質の大規模結晶化スクリーニング

[技術の概要]

タンパク質の結晶構造解析を行うには、結晶化条件を見出すことが必須である。現在のところ、数多くの条件を試してみるしか有効な方法はなく、少しでも少ないサンプルを少しでも多くの結晶化条件で試すことが求められている。

本課題では、大規模全自動結晶化観察システムを開発しこれを支援に供する。本システムは、0.1-0.5 μL の分注が可能で、必要なサンプル量を減らすことを可能にしている。結晶化沈殿剤は、現在1056種類を常備している。

結晶化ドロップの観察はスケジュールに従って全自動で行われ、複数のスライス画像から自動生成される観察画像はネットワーク経由で所外からもアクセス可能である。また、通常の可視光観察に加え、紫外線蛍光および第2次高調波による観察も可能である。

[技術の利用例]

[右図] 全自動結晶化観察システム

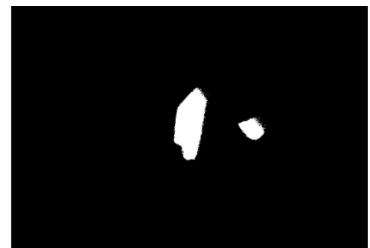
[下図] 3つの観察モードによるタンパク質結晶の画像。UV蛍光および第2次高調波により、タンパク質と塩の結晶を簡易判別することができる。



可視光



UVによる蛍光



第2次高調波

連絡先

[所属] 高エネルギー加速器研究機構

[名前] 加藤龍一

[E-mail] ryuichi.kato@kek.jp

高分解能結晶取得システム

[技術の概要]

結晶の品質が低い原因のひとつとして、タンパク質分子表面の結晶パッキング部位におけるリジン残基の存在が挙げられます。タンパク質分子表面のリジン残基を実験的に検出できればタンパク質結晶の高品質化につながります(図1)。我々は化学修飾によるタンパク質の分子表面リジン残基の簡便な検出法を開発しています(図2)。

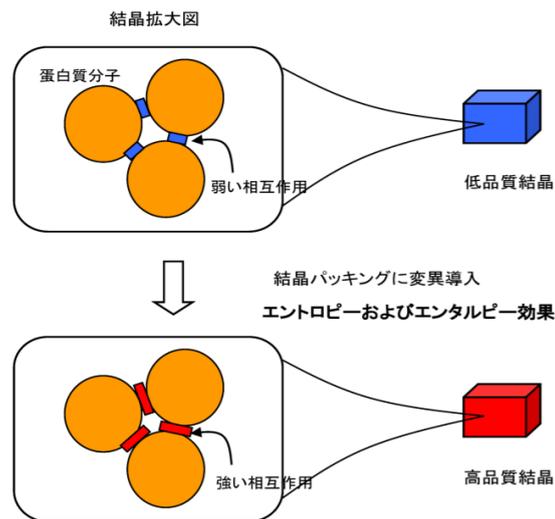


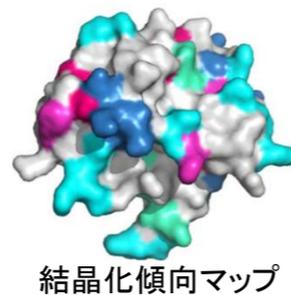
図1 結晶パッキング部位への変異導入による結晶品質の向上

パッキング部位の表面リジン残基は弱い相互作用の原因となるので、そこに変異導入を行う。

図2 分子表面リジン残基の特定手順

最終的にペプチドマッピングを行って、標識された分子表面リジン残基を特定する。

実験的に検出された分子表面リジン残基を結晶化傾向の高いアミノ酸残基に置換する変異体設計を行い、解析目的タンパク質の初期結晶を取得します。



[技術の利用例]

左記の技術で得られた変異体の初期結晶に当グループで開発した下記の要素技術を適用することで、解析目的タンパク質の高分解能結晶を効率的に取得できます。

1. ゼオライトによるタンパク質の結晶化制御
ヘテロエピタキシャル成長を促進する鉱物を用いてタンパク質を結晶化します。



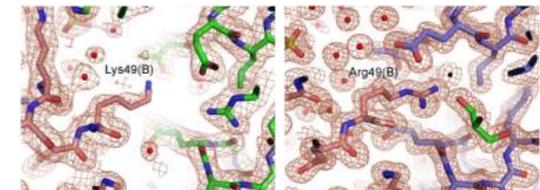
ゼオライト表面に析出したタンパク質結晶

Sugahara *et al.* (2008) *Acta Cryst. D* **64**, 686-695

Sugahara *et al.* (2011) *Crystal Growth & Design* **11**, 110-120

2. 変異導入によるタンパク質結晶の品質改善

結晶パッキングを強化する変異導入によりタンパク質結晶のX線回折能を改善します。



野生型

変異型

Mizutani *et al.* (2008) *Acta Cryst. D* **64**, 1020-1033

連絡先

[所属] 理化学研究所

放射光科学総合研究センター

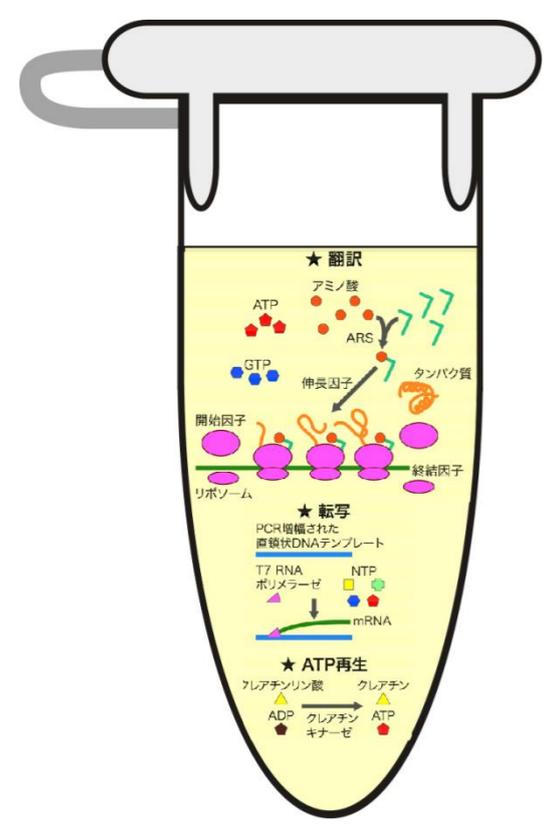
[名前] 国島直樹

[E-mail] kunisima@spring8.or.jp

無細胞タンパク質合成技術 (膜タンパク質、高分子量複合体の調製を含む)

[技術の概要]

試験管の中でタンパク質を合成する技術



本技術の優位性

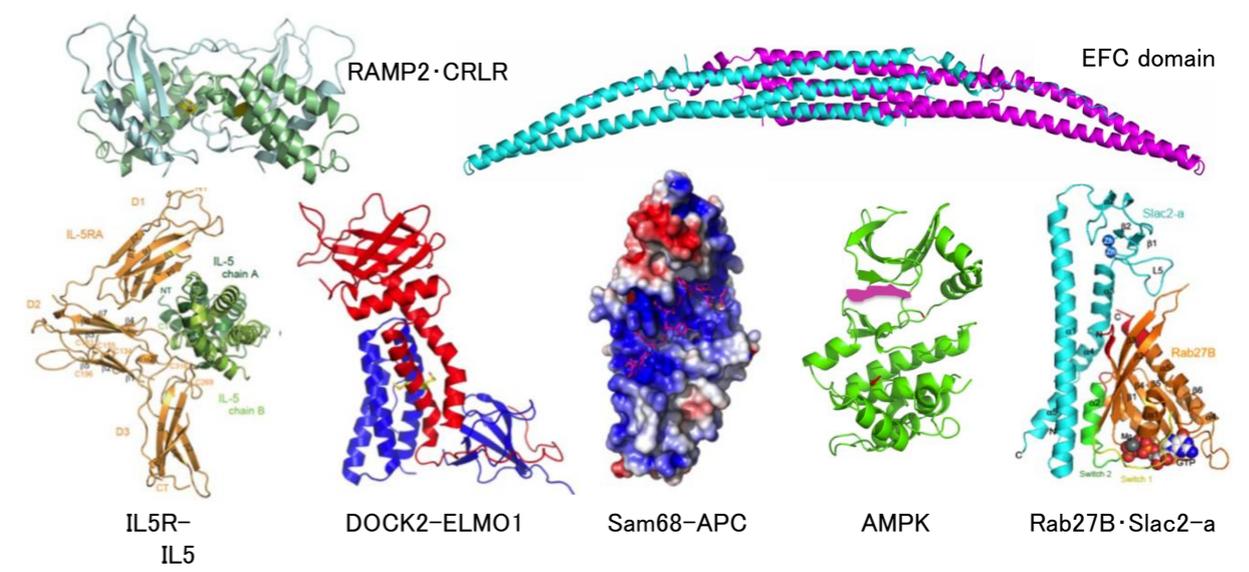
- 1) PCR増幅DNAからのタンパク質発現が可能 (ハイスループット)
- 2) タンパク質合成条件の変更・最適化が可能 (ハイスループット)
- 3) 細胞毒性を示すタンパク質の合成が可能 (非細胞毒性)
- 4) 高速タンパク質合成 (~3-6 hrs.)
- 5) 高収率 (>3-5mg / 9mL reaction)
- 6) 代謝による変換がない (Uniform)
- 7) タンパク質分解を防げる (Stable)
- 8) ロボット化が可能 (HTP)

本技術の適用・応用

- 1) 微生物、ヒト及び動物細胞由来の無細胞系を用いるタンパク質合成
- 2) 天然構造を保持した膜タンパク質の調製
- 3) エピジェネティック修飾を有するヌクレオソームの再構築
- 4) 多種類の構成要素からなる高分子量複合体の調製

[技術の利用例]

本技術により合成され、構造解析されたタンパク質の例



結晶構造解析可能な品質のタンパク質が調製可能

連絡先

[所属] 理化学研究所横山構造生物学研究室

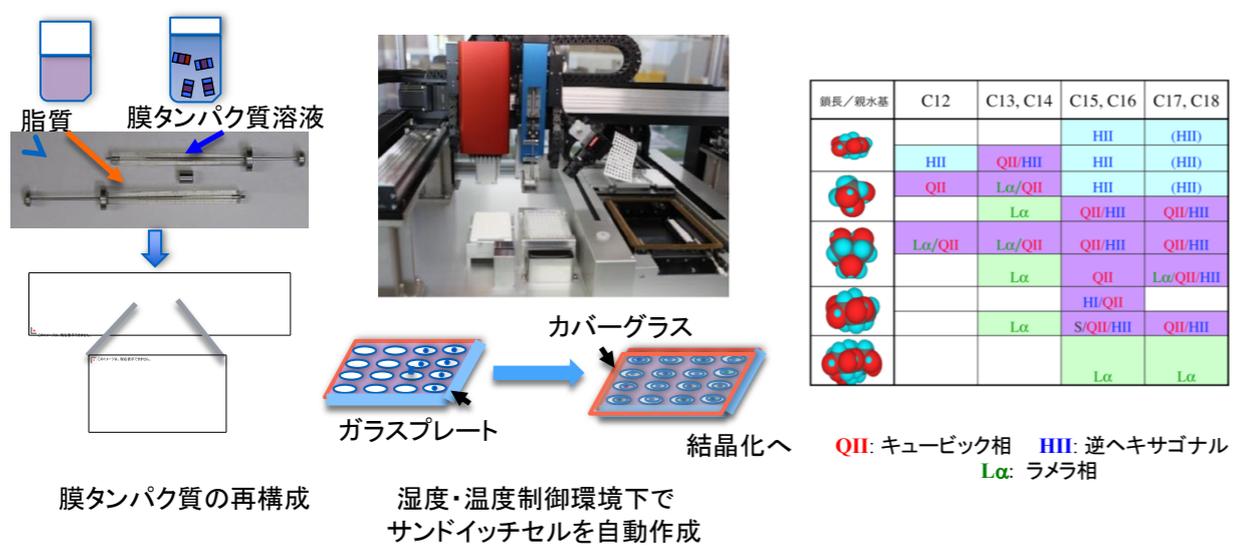
[名前] 横山茂之

[E-mail] TPPT.ssbc@riken.jp

膜タンパク質結晶化技術 (脂質メソフェーズ結晶化法)

[技術の概要]

脂質二重膜環境下で膜タンパク質を結晶化する技術



脂質メソフェーズ結晶化法による結晶化技術 新規マトリクス脂質ライブラリの構築

膜タンパク質の結晶化技術

- 「脂質メソフェーズ結晶化法」に関わる技術開発を行い、膜タンパク質結晶化の成功率を飛躍的に上げる技術の確立

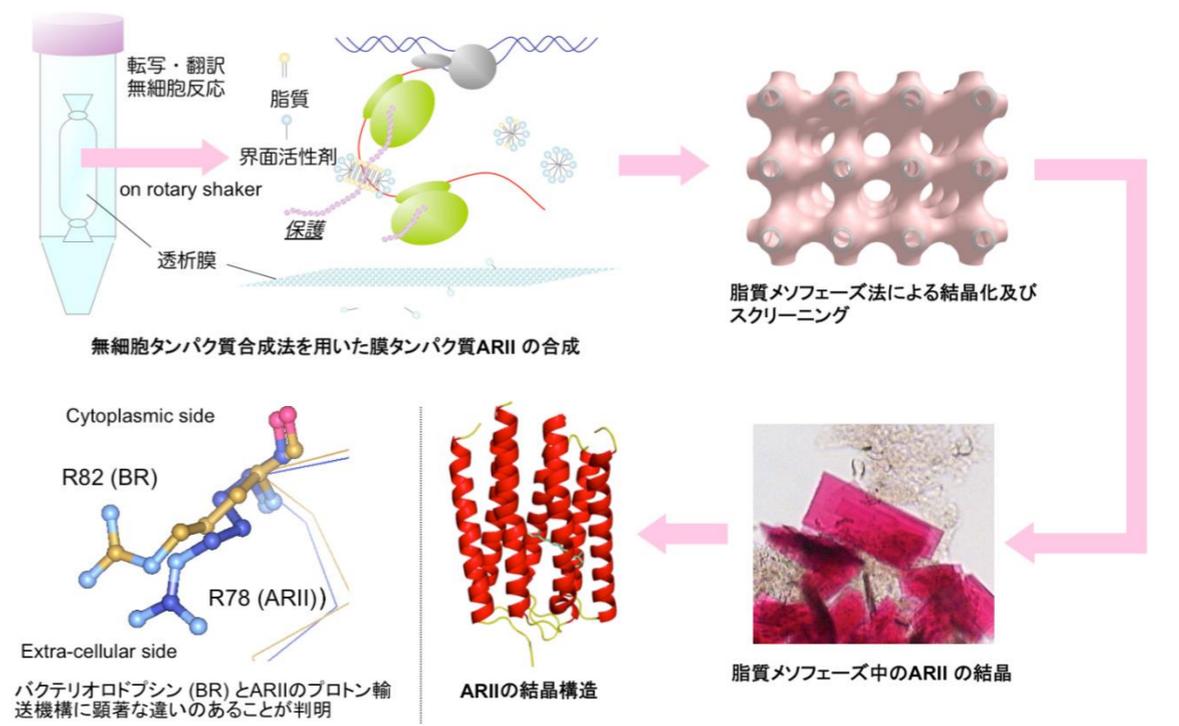
不可能を可能にした「脂質メソフェーズ結晶化法」

- 脂質二重膜を保持したまま結晶化することで活性を保持した状態の膜タンパク質結晶が得られる
- 結晶化の成功率の向上を目指した新規脂質ライブラリの開発

(膜タンパク質構造研究(羊土社)第15章 図15.3より一部改変)

[技術の利用例]

本技術を用い解析した真核生物膜タンパク質 ARII



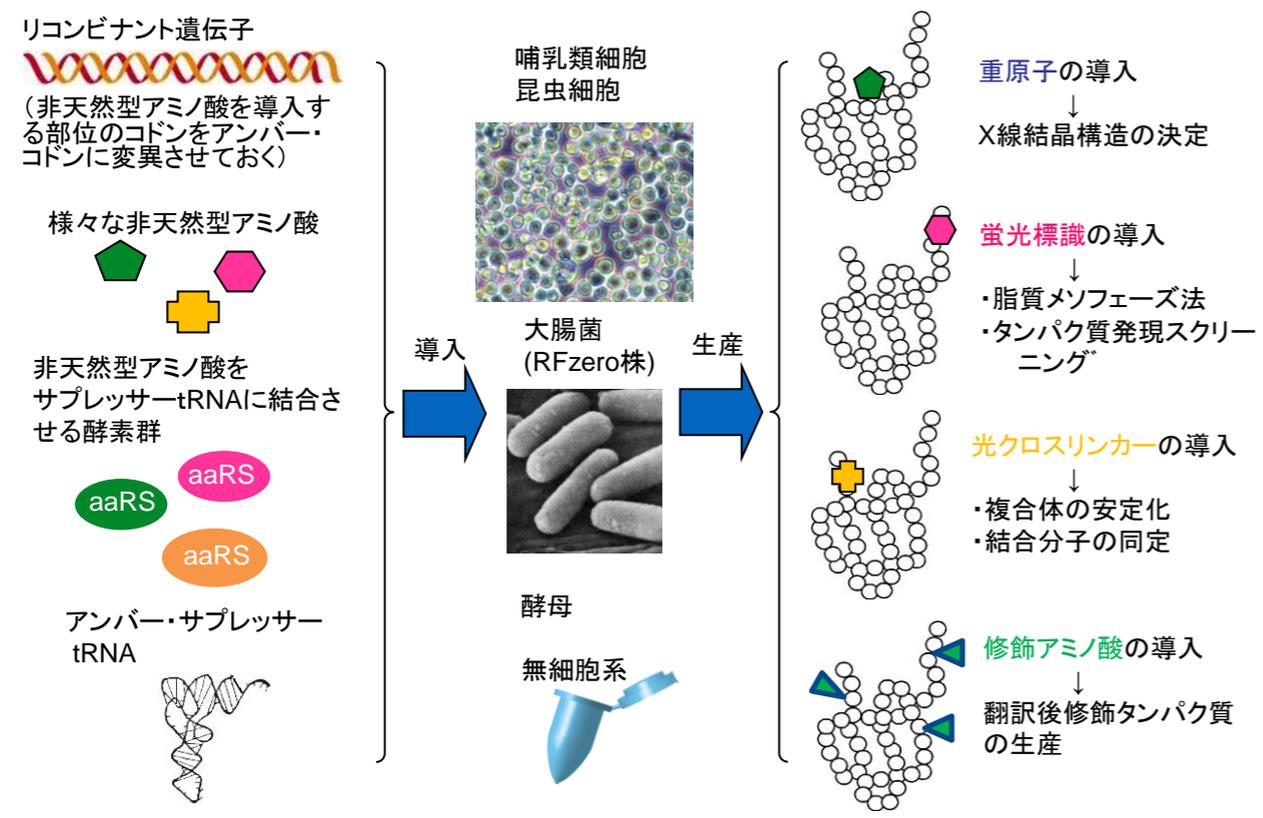
連絡先

[所属] 理化学研究所横山構造生物学研究室
 [名前] 横山茂之
 [E-mail] TPPT.ssbc@riken.jp

非天然型アミノ酸導入技術 (翻訳後修飾タンパク質の生産を含む)

[技術の概要]

機能性のある非天然型アミノ酸を部位特異的にタンパク質に導入する技術

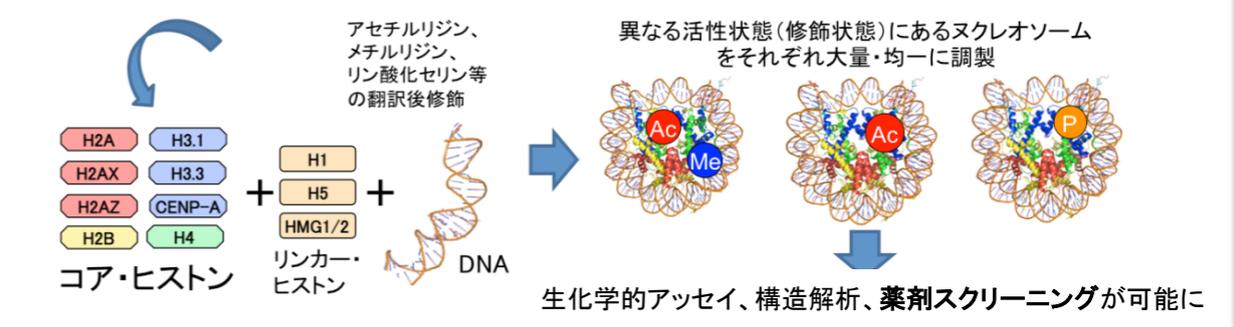


本技術の特徴

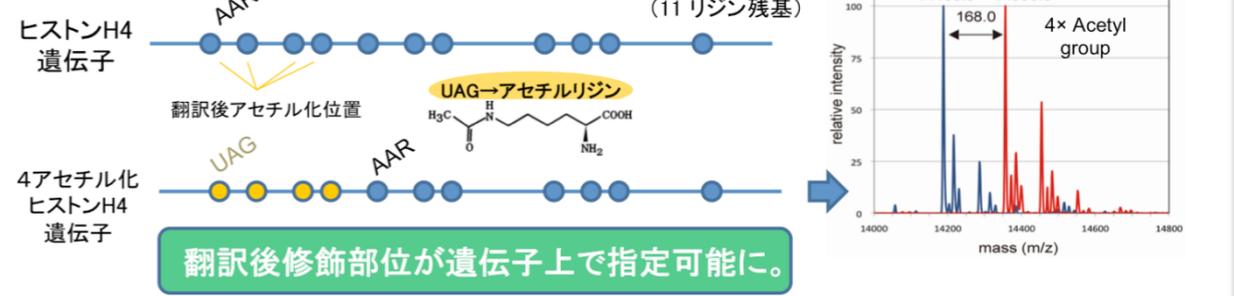
- ・ 部位特異性: 狙った部位に非天然型アミノ酸を導入することが可能
- ・ タンパク質の改変: 非天然型アミノ酸導入により、タンパク質に新たな特性や機能を付与する
- ・ 生物細胞の種類: タンパク質の生産細胞として、大腸菌、培養細胞等の生細胞及び無細胞タンパク質合成系も利用可能

[技術の利用例]

本技術を用いた修飾ヌクレオソームの再構成



4アセチル化ヒストンH4(11kDa)の生産



連絡先

[所属] 理化学研究所横山構造生物学研究室

[名前] 横山茂之

[E-mail] TPPT.ssbc@riken.jp

タンパク質結晶の品質改善及びDNA配列に依存した動構造解析

[技術の概要]

1. タンパク質結晶の品質改善とパッキング改変

構造エネルギー計算にもとづき、結晶内分子パッキングを安定化及び、不安定化している残基を推定します。その部分に変異を入れることによって結晶の分子パッキングの安定性を大きく変える残基を推定することにより、結晶の品質改善及び分子パッキング改変を提案します。

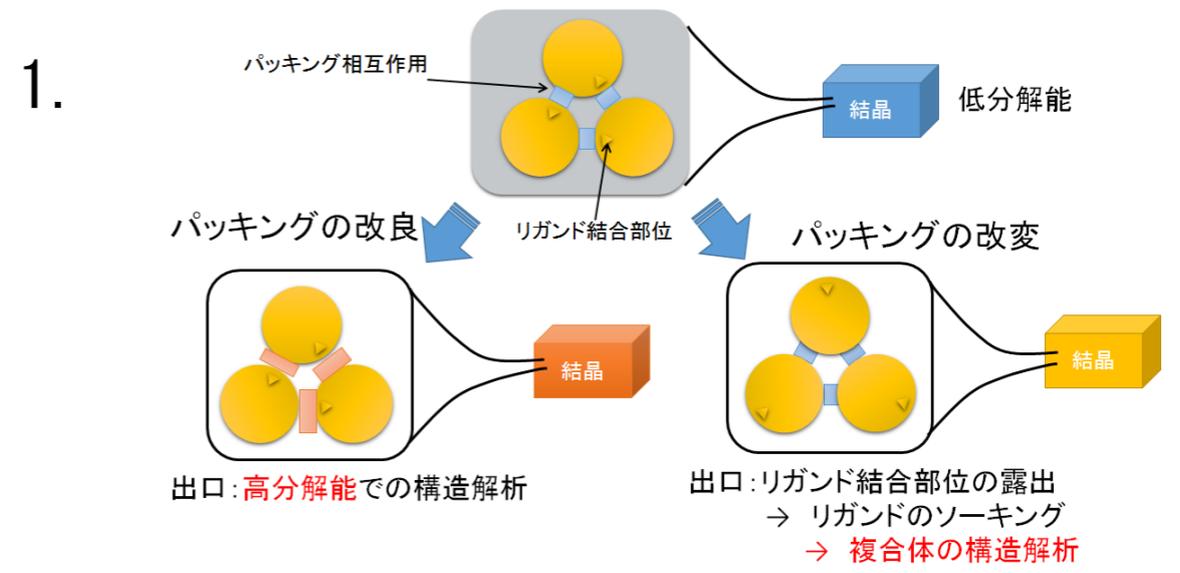
2. 塩基配列依存的な構造・ダイナミクス解析

構造インフォマティクス、機械学習、分子動力学計算を駆使して、DNAの配列に依存した構造・ダイナミクス特性の解析結果を提供します。

支援に供する設備

日本原子力研究開発機構・関西光科学研究所にある計算機クラスター

[技術の利用例]



連絡先

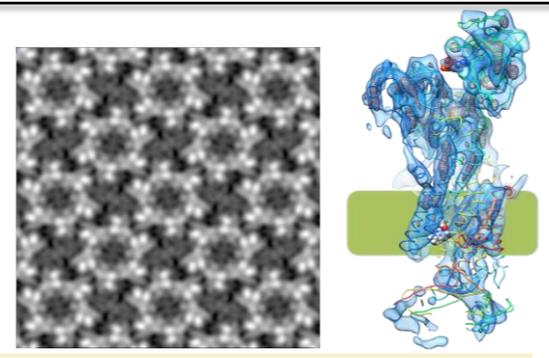
[所属] 日本原子力研究開発機構
 [名前] 河野秀俊
 [E-mail] kono.hidetoshi@jaea.go.jp

多様な顕微鏡技術による膜タンパク質複合体の多階層での機能構造研究

[技術の概要]

電子線結晶学

- 二次元結晶及び氷包埋サンプル作製の技術支援
- 電子線結晶学による構造解析支援

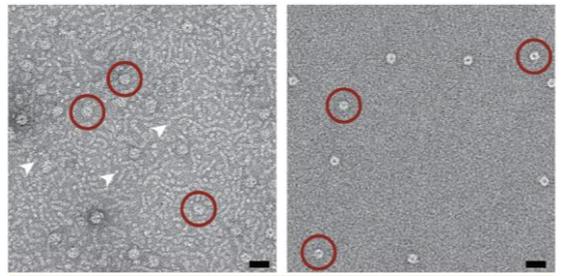
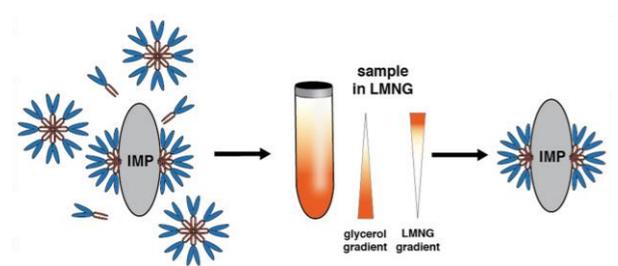


Gap Junction Channelの二次元投影像(左)とH⁺、K⁺-ATPaseの立体構造(右)

単粒子解析

- 膜タンパク質単粒子解析の為の界面活性剤除去法による技術支援

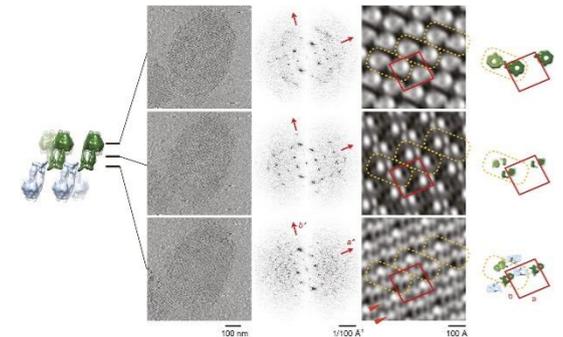
GraDeR: Gradient-based Detergent Removal for single particle cryo-EM



Gap Junction Channel (○) の負染色像。GraDeR処理前(左) 処理後(右)においてミセル(矢尻)が除去できていることが分かる。

電子線トモグラフィー

- TomeX: トモグラフィーを利用した電子線結晶構造解析による支援



ウシ心筋ATP合成酵素の脂質膜再構成ベシクルのトモグラフから、厚さ方向を含めた興味領域を切り出し、電子線結晶学により解析することで、定法では解析できない小さな二次元結晶であっても構造解析が可能になる。

[技術の利用例]

電子線結晶学

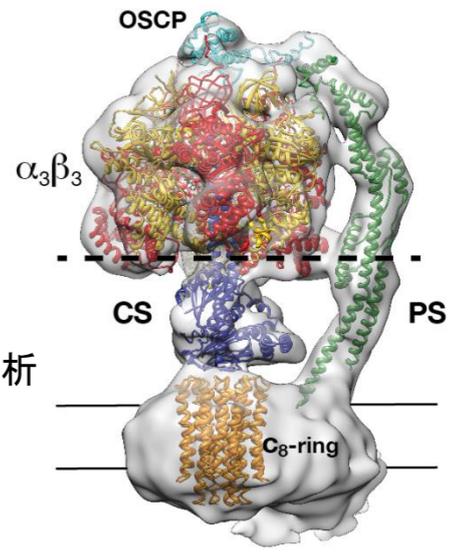
- H⁺、K⁺-ATPaseの構造解析 (Abe et al., 2012, PNAS 他)
- Gap Junction Channelの構造解析 (Oshima et al., 2007, PNAS 他)
- カーボンサンドウィッチ法による二次元結晶の分解能向上 (Yan and Abe et al., 2013, Microscopy)

単粒子解析

- ウシ心筋F-ATPaseの立体構造解析
- GraDeR法の確立 (Hauer and Gerle et al., 2015, Structure)

電子線トモグラフィー

- TomeXによる脂質再構成F-ATPaseの構造解析 (Jiko et al. and Gerle, 2015, eLife)



連絡先

- [所属] 1. 兵庫県立大学
2. 名古屋大学

[名前] Christoph Gerle¹、大嶋篤典²、阿部一啓²

[E-mail] gerle.christoph@gmail.com
atsu@cespi.nagoya-u.ac.jp
kabe@cespi.nagoya-u.ac.jp

創薬コンサルティング

[技術の概要]

専門家との創薬ブレインストーミング

最初から出口を踏まえて創薬開発を行うため、北大病院臨床開発研究センターとの連携による製薬企業OB等の専門家が加わったディスカッション、Brain storming (BS)ミーティング、創薬シーズ発掘を進めている。

- ・創薬標的とその競合状況等に関するアドバイス
- ・ハイスループット化に関するアドバイス



シーズ探索・ 創薬BSミーティング

標的タンパク質発現系と結晶化の相談

糖鎖修飾が不要な場合

糖鎖修飾が必要な場合

発現系



大腸菌



HEK293S GnTI-細胞



カイコ
バキュロウイルス

結晶化

細胞表面受容体・高等動物由来標的タンパク質・
化合物複合体の結晶構造解析の実績あり

発現系構築・結晶化技術指導

[技術の利用例]

➤ スクリーニングへの展開

2015年3月までに38件の相談会を実施し、12件がスクリーニングを実施。3件は評価系構築中。
このうち、北大病院との連携による事前評価を受けた4件について、全てスクリーニングを展開している。

➤ タンパク質発現と結晶化

- 大腸菌封入体発現およびリフォールディング、ヒト培養細胞、カイコバキュロウイルス発現系など複数の技術を使い、標的タンパク質を調製した。
- 基質・細胞表面受容体の共結晶解析から、その阻害剤化合物合成の方針を決定した。

連絡先

[所属] 北海道大学薬学研究院
創薬科学研究教育センター

[名前] 前仲勝実

[E-mail] machine_info@pharm.hokudai.ac.jp