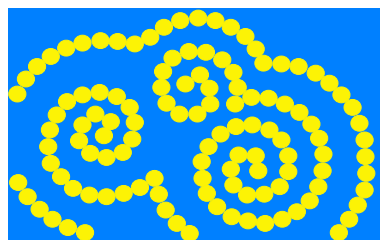


受託研究サービス

受託研究サービスの詳細

「蛋白質のX線結晶構造解析の基礎と実際」

プロテインウェーブ株式会社



protein wave

内 容

1. 組み換え蛋白質の調整
 - ◆発現系の構築
 - ◆精製
2. 結晶化/共結晶化
 - ◆結晶化スクリーニングと最適化
 - ◆複合体の結晶化
3. X線回折データ収集
 - ◆クライオ(抗凍結)条件の決定
 - ◆データ収集
4. 最新の動向等

1. 組み換え蛋白質の調整

(1) 発現系の構築 ～新規蛋白質の場合～

新規の
蛋白質



宿主: 大腸菌

- ・低コスト
- ・短培養時間

発現ベクター:

- (1) GST, TRX等の融合蛋白質
 - ・SolubleなGSTの効果を期待
 - ・精製時に切断, 除去が必要
- (2) His-Tag付加
 - ・簡便で低コスト

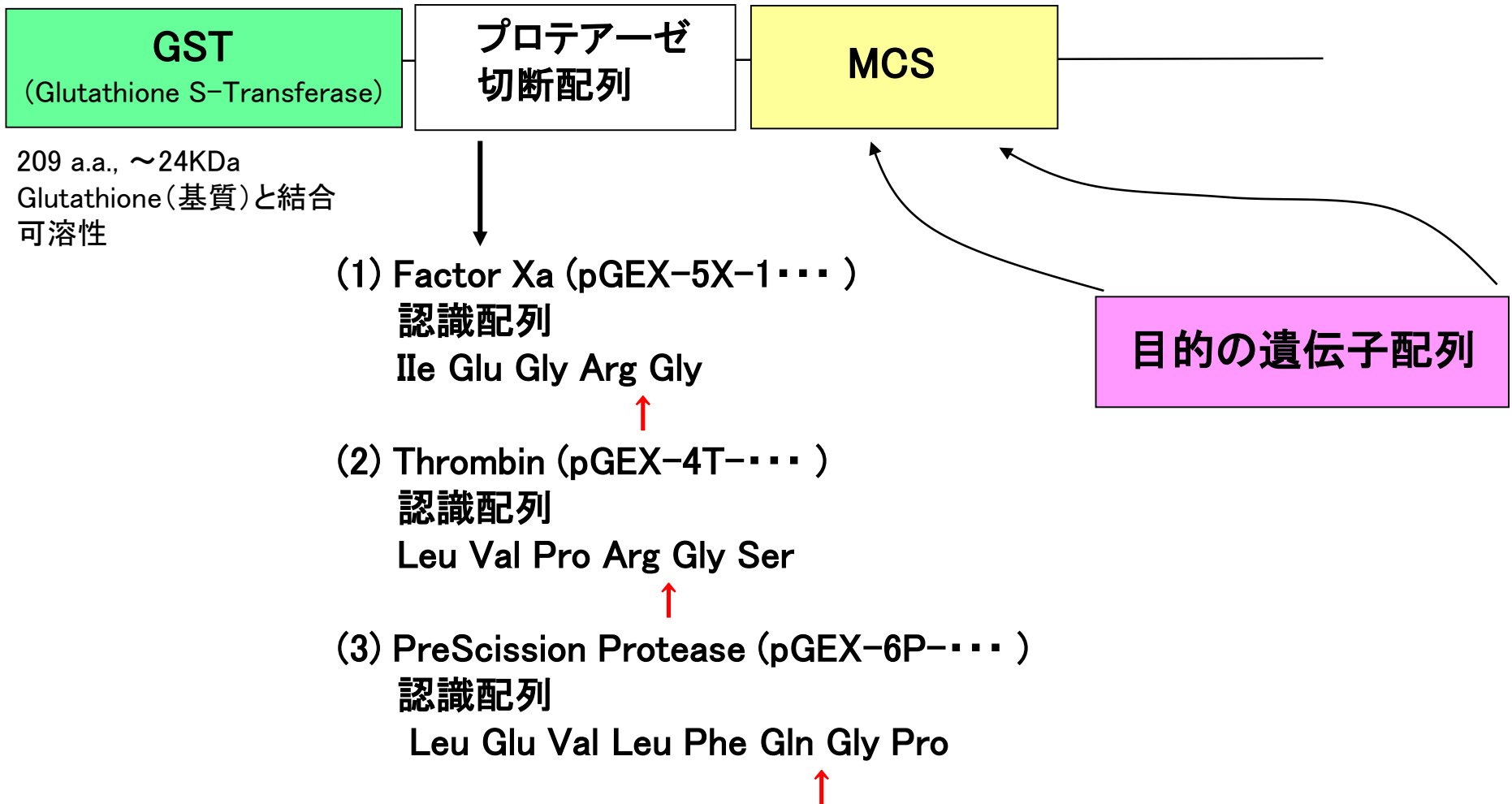
・発現するが不溶性

- ① 培養条件の変更(大腸菌)
- ② Point Mutation の導入
- ③ GST.....GST(GFP)コンストラクト
- ④ 変性→リフォールディング
- ⑤ 他の宿主(昆虫細胞等)に変更
(糖鎖修飾あり)

・発現量極少
・発現しない

- ① N末端のアミノ酸配列を変更(大腸菌)
- ② 他の宿主(昆虫細胞等)に変更
(糖鎖修飾あり)

(1) 発現系の構築 ～GST等の融合蛋白質～



★切断後にN末端側に2～5残基が残るのみ

(1) 発現系の構築 ～His-Tag付き蛋白質～

◆市販の発現ベクターを用いる場合の欠点

(例) Novagen pET-15b の場合: cloning/expression region

```

                                     Xba I
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
Nco I      His-Tag      Nde I  Xho I  BamH I
TATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTCGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGA
MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHisMetLeuGluAspProAlaAlaAsnLysAlaArg
      thrombin
AAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
LysGluAlaGluLeuAlaAlaAlaAlaThrAlaGluGlnEnd

```



- ・ pET-15b を用いた場合, 6 × His-Tagを付けたままでは結晶化は難しい
- ・ Thrombin Protease で Cleavage Site を切断する必要あり
- ・ 精製工程が増え, コストが増す



- ・ 遺伝子配列の5'端あるいは3'端に制限酵素サイトと 6 × His を付加して人工合成し, その後 pET-15bにサブクローニングすると切断不要になる。結晶化も可能。

人工合成の例) *NcoI* – 6 × His – 目的遺伝子配列 – *NdeI* – stop codon

(1) 発現系の構築 ～発現量の改善例～

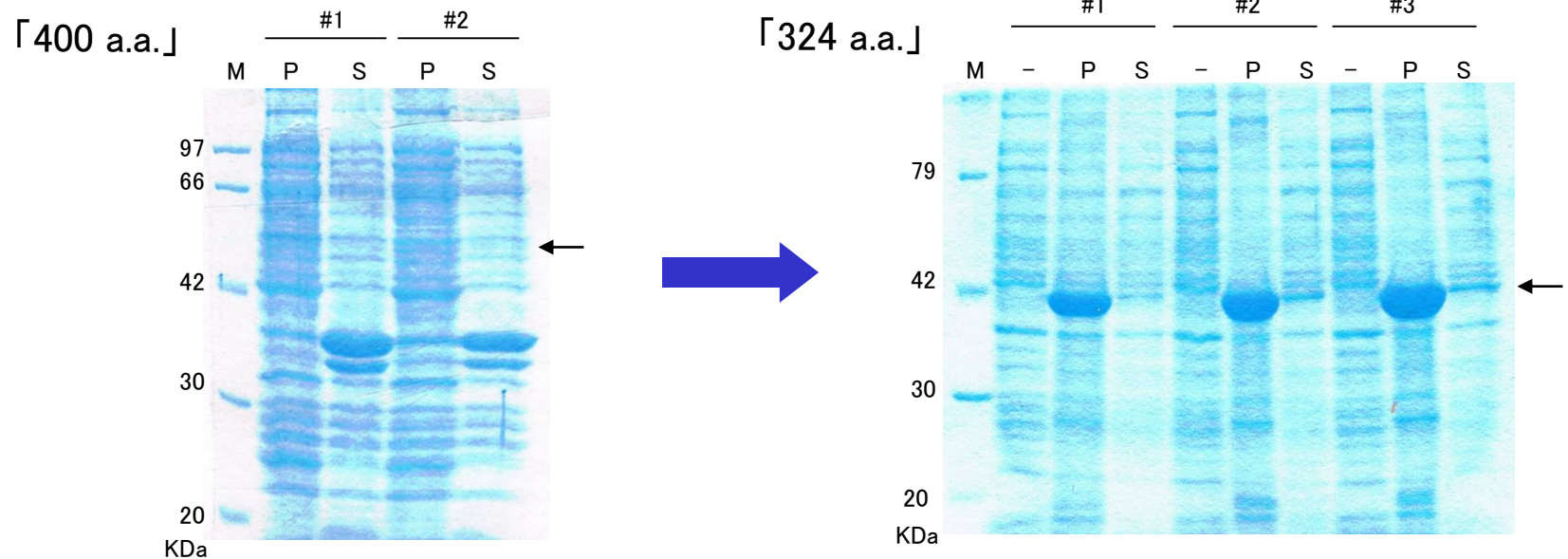
「蛋白質Mのアミノ酸配列:400 a.a.」→pET-30a/*E.Coli* BL21(DE3) で発現しない

1 **MLSNSQGQSPVPFPAPAPPPQPPTPALPHPPAQPPPPP**QQFPQFHVKSGLQIKKNAII
61 DDYKVT SQVLGLGLINGKVLQIFNKRTQEFALKMLQDCPKARREVELHWRASQCPHIVRI
121 VDVYENLYAGRKCLLIVMECLDGGELFSRIQDRGDQAFTEREASEIMKSIGEAIQYLHSI
181 NIAHRDVKPENLLYTSKRPNAILKLTDGFGAKETTSHNSLTTPCYTPYYVAPEVLGPEKY
241 DKSCDMWSLGVIMYILLCGYPPFYSNHGLAISPGMKTRIRMGQYEFNPPEWSEVSEEVKM
301 LIRNLLKTEPTQRMTITEFMNHPWIMQSTKVPQTPLHTSRVLKEDKERWEDVKEEMTSAL
361 ATMR**VDYEQIKIKKIEDASNPLLLKRRKKARALEAAALAH**

★以下の配列を除去した蛋白質M「41-364」/pET-30a/BL21(DE3) → 発現する(培養温度は37°C)

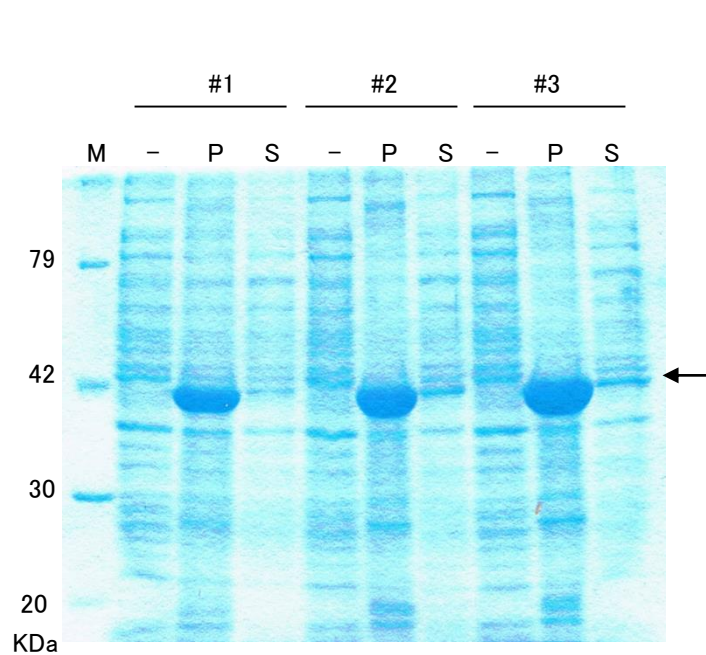
N末端側のプロリンリッチな配列:1~40

C末端側の機能を持たない配列:365~400



(1) 発現系の構築 ～発現量の改善例(続き)～

「蛋白質M:41-364」/pET-30a/BL21(DE3) の低温培養

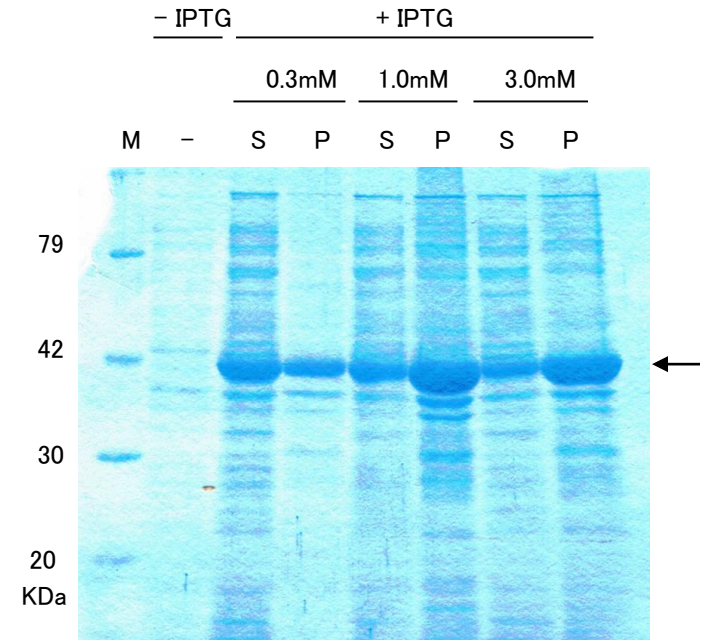


培養条件:

LB-Kan: 100mL

37°C, 3時間

IPTG添加濃度: 1mM



培養条件:

LB-Kan: 100mL

18°C, 24時間

IPTG添加濃度: 0.3mM, 1mM, 3mM

1. 組み換え蛋白質の調整

(2) 精製

「基本的な精製フロー」

粗精製

高純度
精製

菌体(細胞)破碎

↓
遠心分離

↓
上清(Sup)

↓
Ni²⁺ カラムクロマト
GSTカラムクロマト

↓
溶出画分

↓
プロテアーゼ処理
(Ni²⁺, GST 除去)

↓
Passive カラムクロマト

↓
イオン交換カラムクロマト

↓
ゲルろ過カラムクロマト

↓
濃 縮

「HTで低コストな精製フロー」

6 × His-Tag は残す
pGEX-4T- を使用する

溶出画分の分取に注意

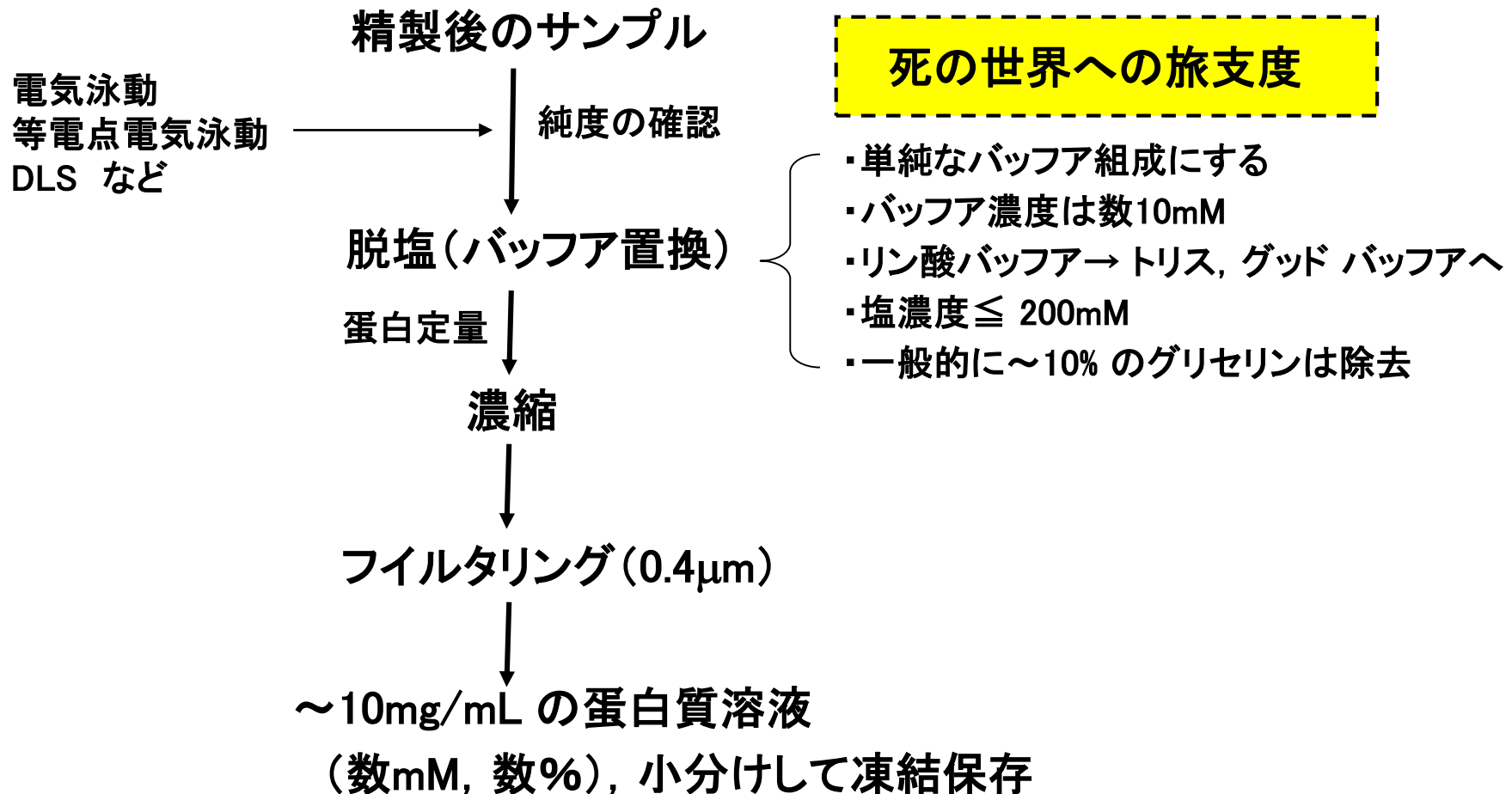
実施しないこともある

DLSの結果および結晶の成長に
差がないことを確認済み

2. 結晶化/共結晶化

(1) 結晶化スクリーニングと最適化

結晶化に適したサンプル調整

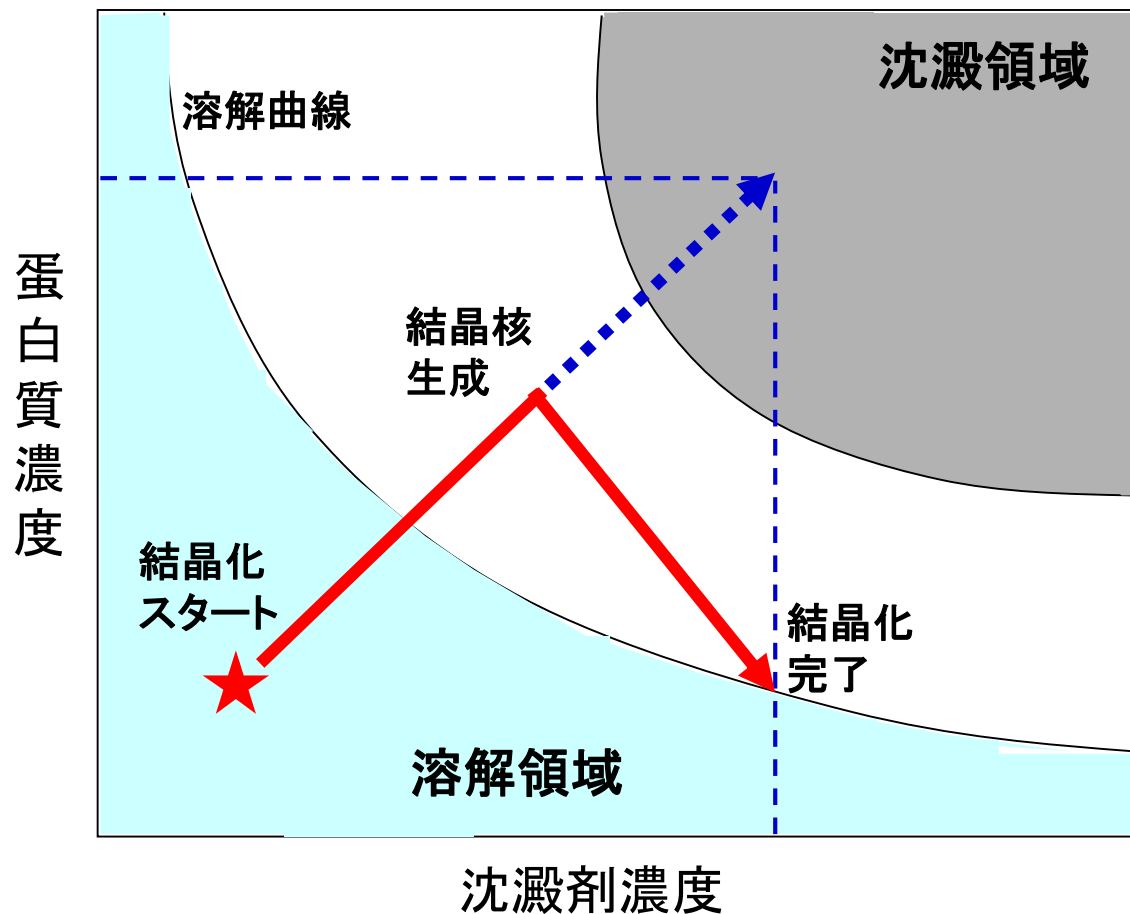




I'm happy

2. 結晶化/共結晶化

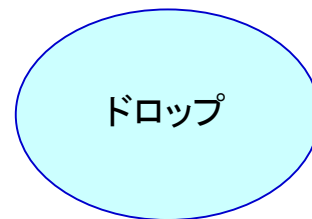
蒸気拡散法による結晶化



蛋白溶液: 沈澱剤 = 1:1 で混合

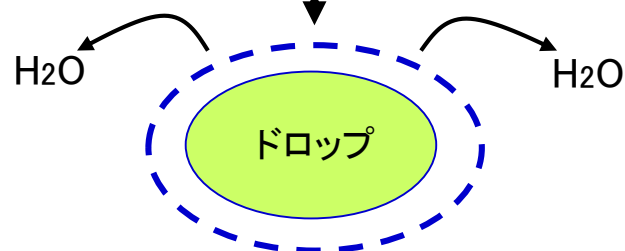


結晶化スタート



$$\text{ドロップの沈澱剤濃度} = \frac{\text{リザーバーの沈澱剤濃度}}{2}$$

蒸気平衡



$$\text{ドロップの沈澱剤濃度} = \text{リザーバーの沈澱剤濃度}$$

蛋白質濃度 ↗
沈澱剤濃度 ↗

2. 結晶化/共結晶化

結晶化用沈澱剤溶液の組成

沈澱剤: 結晶化の主たる駆動力

- ◆無機塩類: 蛋白質分子表面に結合している水を取り除く(数モル)
硫酸アンモニウム, 塩化ナトリウム, クエン酸ナトリウム等
- ◆水溶性高分子: 水和水を取り除き溶液の誘電率を下げる(数10%)
PEG, PEG MME 等
- ◆有機溶媒: 蛋白質溶液の誘電率を下げる(数10%)
エタノール, メタノール, イソプロパノール, MPD 等

緩衝液: 蛋白質の特性維持

- ◆グッドバッファ系が主流, 結晶化への影響少(100mM 程度)

添加剤: 結晶成長の促進, 結晶性を向上させる

- ◆基質, 阻害剤, 多価金属イオン, 界面活性剤, 有機溶媒, 還元剤等(数10mM, 1%以下)

2. 結晶化/共結晶化

結晶化スクリーニング試薬/キットの変遷

「現在のキット」

- ◆古典的なキット類の組成の見直し
 - ・冗長性が高く、重複している組成を見直し
 - ↓
 - ・スクリーニング性能を高めた新規組成のキット
- ◆複合体結晶用のスクリーニングキット
(データベースに基づいた組成)
- ◆低分子化合物を含んだスクリーニングキット

構造ゲノム
P/J

「古典的なキット」

- ◆データベースに基づく試薬調整
 - ・網羅的な試薬組成
 - ・水溶性蛋白質
 - ・膜蛋白質
- ◆PEG, 硫安等のグリッドスクリーン
- ◆カコジル酸ナトリウムの使用

- ◆新規な物質を沈澱剤に適用 (PEGの代替え)
 - ・PGA (poly-Glutamic acid)
 - ・pentaerythritol
 - ・Jeffamine polyetheramines
 - ・propoxylate 等
- ◆カコジル酸ナトリウムフリー キット
- ◆Cubic Phase→Lipidic-Sponge Phase キット
(膜蛋白質用スクリーニングキット)

2. 結晶化/共結晶化

(2) 複合体の結晶化

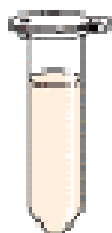
共結晶化の方法

(1) Co-Crystallization

蛋白質溶液に

- ・化合物の粉末あるいは
- ・ストック溶液 (DMSOで溶解)

を過剰量 (モル比で1:3程度)
加える



オンアイスで1時間
から一晩インキュベート
(わずかに化合物は溶ける)

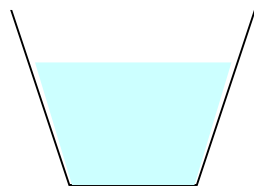
フィルタリング
(沈澱を除去)

共結晶化

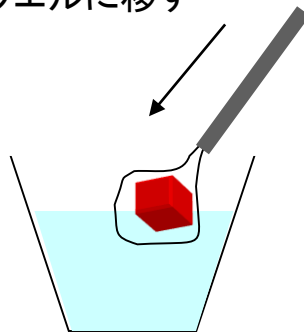
ストック溶液を添加する場合には
DMSOの最終濃度に注意する。
通常は約10%まで。それ以上で
は結晶化条件が変化する

(2) Soaking

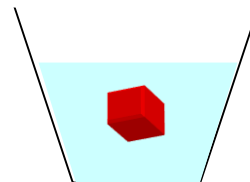
結晶が得られた沈澱剤溶液
に化合物を過剰量加えた
溶液を準備する。
結晶化プレート of ウェルなど
に分注する



ループで結晶を取り出して
ウェルに移す



ソーキング



ソーキング時間に注意する。
結晶の取扱いに注意する。

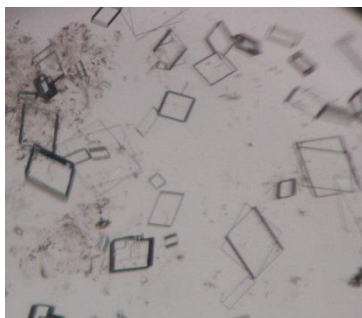
2. 結晶化/共結晶化

共結晶化の例

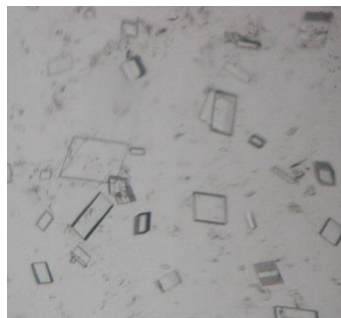
(1) Co-Crystallization



Native体
結晶化温度: 4°C



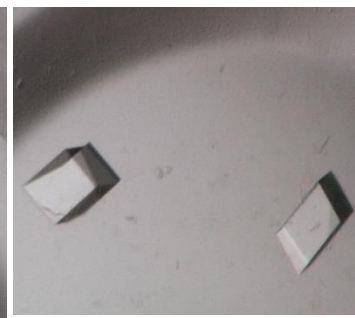
化合物 A
final 1mM,
10% DMSO



化合物 B
同左



化合物 D
同左

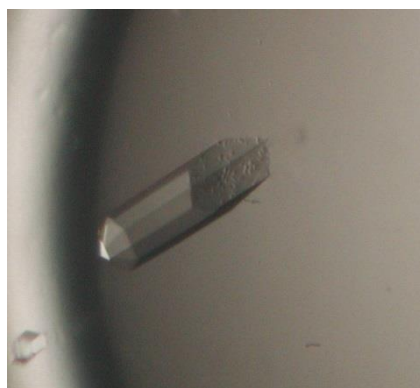


化合物 C: soaking
24hr

(2) Soaking



PWP105-Native体



化合物1
soaking 24hr



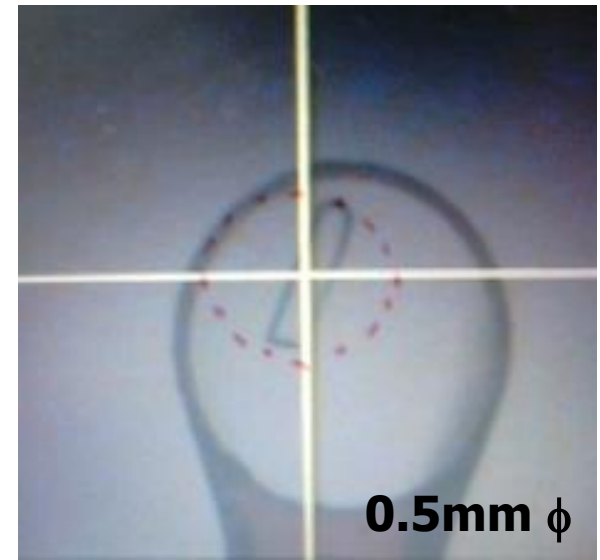
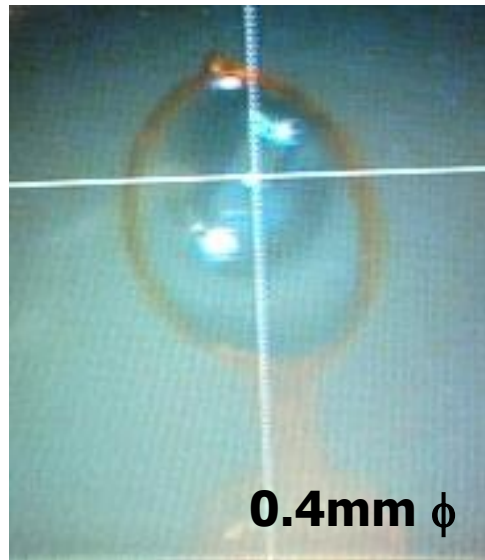
化合物2
soaking 24hr



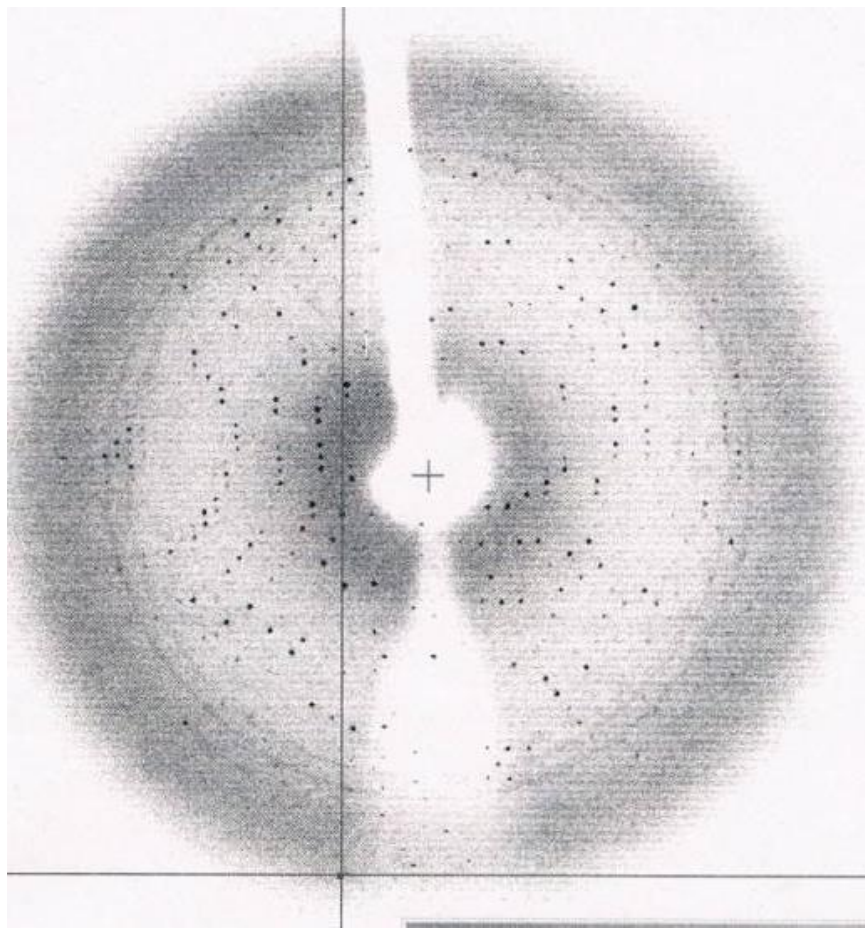
化合物4
soaking 96hr

3. X線回折データ収集

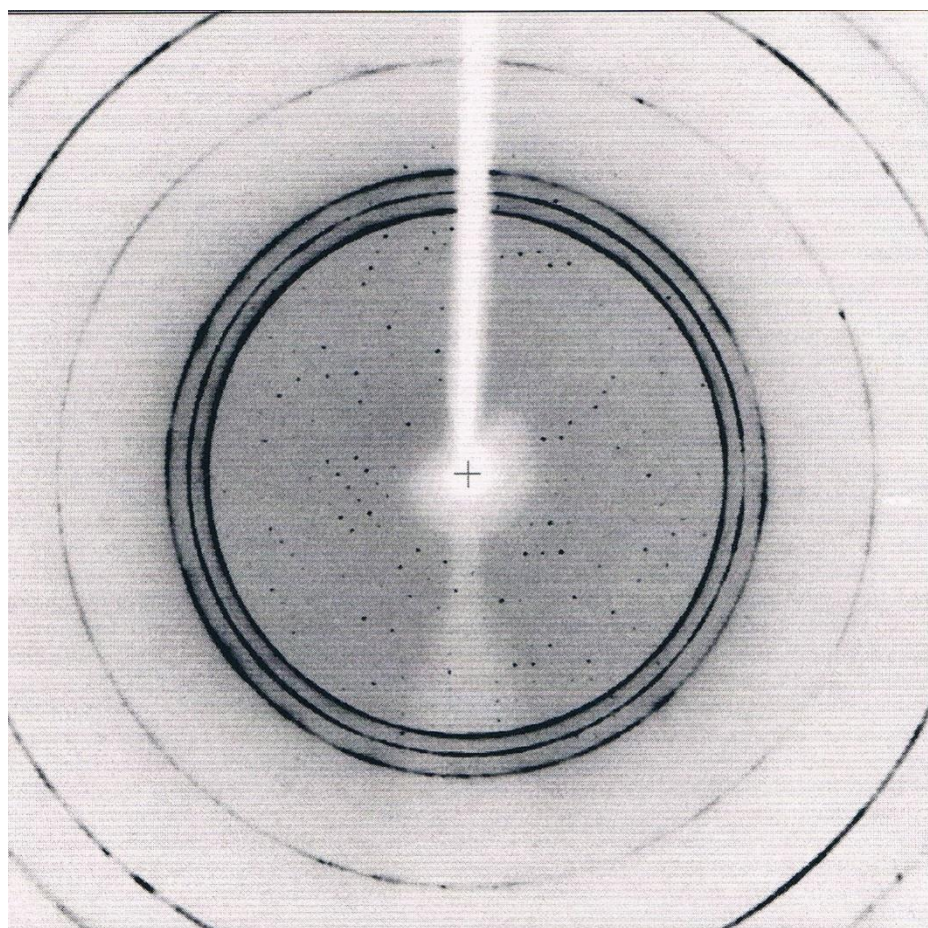
(1) クライオ(抗凍結)条件の決定



3. X線回折データ収集



クライオ条件が適切な場合



クライオ条件が不適切な場合

3. X線回折データ収集

(1) クライオ(抗凍結)条件の決定

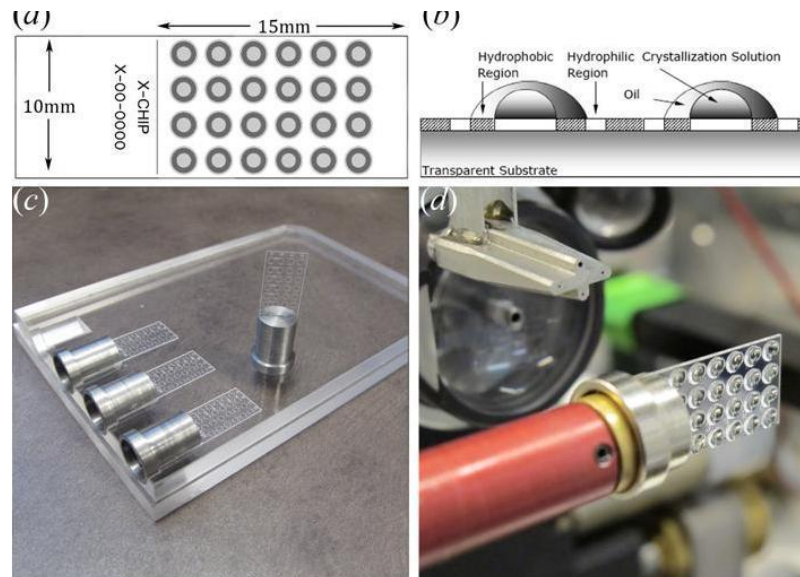
沈澱剤の主成分	抗凍結剤の組成
PEG 8,000 まで	・沈澱剤の組成をそのまま使用できる ・PEGの組成を少し増やす(例:18%→25%)
PEG 8,000以上 (PEG 10,000) (PEG 20,000)	・グリセロール, エチレングリコール等を5%~20%含有する抗凍結剤を調整する
無機塩	・グリセロール, エチレングリコール等を5%~20%含有する抗凍結剤を調整する

4. 最新の動向等

X-CHIP Technology

カナダ トロント大学

結晶化とX線回折データ収集
のHT化, 低コスト化



(a) Top-view schematic of the 24-drop format chip, hydrophilic and hydrophobic areas are shown in light and dark grey, respectively (b) Cross-section of the chip (c) X-CHIP on a base and a 4-chip receptacle frame device (d) X-CHIP with crystallization drops, mounted on a goniometer.

