

Thermus thermophilus HB8 のシステム生物学へ向けて：

蒸気拡散法、マイクロバッチ法、FID 法におけるタンパク質結晶化実験の比較

A comparative study of protein crystallization in sitting- and hanging-drop vapor-diffusion, modified microbatch, and microfluidic free-interface diffusion

飯野均¹, 内藤久志¹, 仲村勇樹², 海老原章郎¹, 広津健^{1,3}

Hitoshi Iino¹, Hisashi Naitow¹, Yuki Nakamura², Akio Ebihara¹, Ken Hirotsu^{1,3}

(¹理研・播磨研, ²ファルマ・アクセス, ³大市大・院理)

(¹RIKEN/Harima Inst., ²PharmAxess, Inc., ³Osaka City Univ., ⁴Osaka Univ.)

e-mail: iino-h@spring8.or.jp

我々はシステム生物学研究を目的として、数多くの高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来タンパク質の X 線結晶構造解析を進めてきた。現時点で 2213 の ORF のうち 944 について精製が成功し、360 について構造解析が終了している。これらの結晶化実験を推進する過程の 1 つとして、実際にどのような実験系が「実用的な意味で」優れた実験系であるのか詳細な比較調査を行った。

20 種類の *Thermus thermophilus* HB8 由来タンパク質、384 成分のスクリーニング溶液を用いて、シットイングドロップ蒸気拡散法、ハンギングドロップ蒸気拡散法、マイクロバッチ法、FID (自由界面拡散) 法の 4 つの実験系について、一般的な条件の下これら実験系の比較検討を行った。近年開発された新しいタイプの FID 法では、数 μ L のサンプルで数百条件のスクリーニングができるという特徴がある。

FID 法は他の実験系に比べ、有意に多く (約 2 倍) の結晶化条件を見つけることが出来た。マイクロバッチ法は蒸気拡散法と比較し結晶化条件の数はほぼ同等であったが、その中で「良質な結晶」の得られた割合は 3~4 倍も高かった。蒸気拡散法は十分な時間 (2 ヶ月間) が経過しても塩結晶の出現が無視できる程度 (3%以下) と推測された。また、結晶が出現するまでの時間がマイクロバッチ法に比べ短かった。シットイングドロップ法、ハンギングドロップ法それぞれの結晶化条件の 90%が、それぞれ実験開始から 24 日以内もしくは 38 日以内に見いだされた。

結晶が出現しにくいタンパク質においては、異なった実験系どうしで結晶化条件が一致するものは非常に少なかった。また、このようなタンパク質は実験系が異なると結晶化のしやすさが大きく変わる場合があった。

本実験で用いた結晶化方法、温度、スクリーニング溶液成分などは、一般に広く使用されている条件である。その結果次のことが言える。精製したタンパク質が豊富にあり多くの実験ができる場合は、蒸気拡散法とマイクロバッチ法の両方で初期スクリーニングをするべきである。もしそれほど多くない場合は、マイクロバッチ法のみで初期スクリーニングをするべきである。タンパク質がごくわずかしか精製できない非常に貴重なものである場合は、FID 法によって初期スクリーニングするべきである。