S1S01

タンパク質結晶解析の迅速化、高精度化

○三木 邦夫^{1,2}（¹京大・院理、²理研・播磨）

X線結晶学はタンパク質の構造決定法として、構造生物学、構造ゲノム科学への貢献を続けている。最近その推進に注目が集まっている構造ゲノム科学においては、結晶構造解析の迅速化が強く求められている。一方、迅速化のみならず、構造を基盤とする反応機構の解明などには、より高精度、高分解能の構造解析が求められており、膜タンパク質を含む巨大超分子複合体の高分解能構造決定は、構造生物学の最重要課題の一つである。いずれの場合も、タンパク質結晶構造解析の各段階において先端的な技術革新を行うことが急務となる。結晶化は結晶構造解析の最も根元的な問題であるが、試行錯誤的な実験過程を避けて通れない。そのため、結晶化の自動化（結晶化スクリーニングの自動セッティングおよび自動観察）による省力化・迅速化は重要な課題である。回折データ測定においては、主に放射光施設の各ビームラインにおいて、測定自動化（結晶マウンティング、測定無人化）、高精度回折データ測定（目的特化ビームライン建設、多波長測定、X線ダメージの回避）などへの取り組みがなされている。SPring-8（西播磨）、Photon Factory（つくば）ともに、ロボティクス技術を積極的に導入しようとしている。位相決定から精密化への構造解析の過程では、多波長異常分散法による位相決定の汎用化、分子モデル構築および精密化の自動化などをあげることができる。本シンポジウムでは、そのようなタンパク質結晶解析における先端的技術開発について、実際に開発に携わっている研究者がその現状を提示し、将来の方向性を議論することを目的としている。

K. Miki : High-throughput and high-precision structure determination in protein crystallography

S1S03

PFにおけるタンパク質結晶構造解析の自動化

○平木 雅彦¹、渡部 正景¹、永井 稔²、谷川 民生³、大場 光太郎³、加藤 龍一¹、若槻 壮市¹（¹KEK・PF、²KEK・工作センター、³産総研）

タンパク質の結晶構造解析はタンパク質の発現・精製、結晶化、X線回折実験、データ処理という手順で行われているが、結晶の有無を判断し、ループですくい、凍らせる作業など、その手順の多くは未だ人間の手によるところが大きい。放射光ビームラインでのX線回折実験においては、実験者がそれぞれのタンパク質結晶を液体窒素デューワーから取り出し、回転軸にマウントし、結晶のセンタリングや実験ハッチからの退室操作等を行っており、X線露光以外にかかる時間がビームタイムの大半を占める。特に今春PF-ARで運転を開始した構造生物学研究用ビームラインNW12は挿入光源を用いた高輝度ビームラインで、かつ高速に回折データが読み出し可能なCCD検出器を備えているため、露光時間とデータの読み出し時間が大幅に短縮できるようになった。その結果、X線露光以外にかかる時間のビームタイムに対する割合はますます増加している。

したがって、膨大な数のタンパク質の構造解析を効率的に行うためには、それぞれの手順の自動化が必要不可欠である。そこで我々は、ビームラインを有効利用し、膨大な数のタンパク質の回折実験を行うために、全自動X線タンパク質結晶構造解析システムの開発を行っている。一方、現在、各国で進められている構造ゲノムプロジェクトでは、大量発現された蛋白質の自動結晶化システム、結晶の成長過程を画像データとして自動的に取り込むシステムの開発などが行われているが、我々はこれらのハイスループット化技術の中で最も遅れている結晶化プレート内の結晶をループで捕捉し液体窒素温度で保存する技術の開発も行っている。本講演では、現在開発中のタンパク質結晶捕捉システムおよびハイスループットタンパク質結晶化システムについて発表する予定である。

M.Hiraki, S.Watanabe, M.Nagai, T.Tanikawa, K.Ohba, R.Kato and S.Wakatsuki : Automated System for Protein Crystallography at KEK-PF

S1S02

構造ゲノム時代の実験室レベル迅速結晶化

○渡邊 信久（北大院理）

蛋白質X線結晶構造解析にとって、結晶化は依然としてボトルネックである。とりわけ、タンパク500プロジェクトのように、大学でも構造ゲノム科学を意識する場合には、結晶化のプロセスにも迅速性や高効率性が要求されることになる。我々は、特に大学の実験室レベルでの迅速化、高効率化を目指していくつかの試みを続けており、特に他のグループと異なる独自のアプローチとして、

- 1.Ready to X-ray 結晶化プレートの開発
- 2.結晶化マイクロアレイチップの開発

を行っている。

構造解析を目的としているため、最終的に結晶を評価する指標はX線回折能である。これまでの方法では、スクリーニングで得られた結晶を結晶化ドロップから取り出してX線照射をする必要があった。それは手間であり迅速性に欠けると同時に、X線照射前に結晶に触ってしまうため、得られた回折像が結晶本来の回折能を見ているのだろうかという疑問が常につきまとっていた。我々のReady toX-ray 結晶化プレートは、蒸気拡散法で結晶化した後、そのままプレートごと普通の実験室系のX線回折装置にマウントし、結晶化ドロップ中の結晶に直接X線を照射し、成長した結晶の回折能そのものの評価をすることが出来る。一方、マイクロアレイチップは、結晶化初期スクリーニングに要する蛋白質の少量化と、簡便化を目標として開発を進めているものである。これはマイクロアレイ状に結晶化条件を初めから保持した状態で供給するチップであり、1条件50nL程度の少量の蛋白質でスクリーニングを実施することを目指している。シンポジウムでは、これらを中心に、実験室レベルでの迅速結晶化の可能性を議論する。

N.Watanabe : Laboratory scale high-throughput protein crystallization at a structural genomic era

S1S04

SPring-8におけるハイスループットタンパク質結晶構造解析

○山本 雅貴（SPring-8/理研/JASRI）

構造ゲノム研究では、多くのタンパク質についてその立体構造を蓄積することにより、タンパク質の機能発現の基本原理を明らかにすることを目的としている。また、タンパク質立体構造の蓄積は合理的な医薬品開発への応用も期待されている。このような膨大なタンパク質立体構造の蓄積のためには、放射光ビームラインのハイスループット化が重要である。SPring-8では、理研・構造ゲノムビームライン(BL26B1&B2)、JASRI共用ビームライン（BL38B1）について、迅速かつ簡単な蛋白質結晶の回折強度測定を目指して放射光ビームラインのハイスループット化を進めている。理研・構造ゲノムビームラインでは、膨大な数の結晶サンプルを、最も効率の良いかたちで取り扱うため、大量の結晶サンプルをハンドリングする大量サンプル管理システムを設置した。大量サンプル管理システムの主要コンポーネントとして凍結試料サンプルチェンジャーを開発して、実験ハッチの入退室を行うことなくビームラインにおいて大量の結晶サンプル評価を効率的に行うことができる。また、データベースシステムと連携した制御システムにより、複数の結晶を自動交換しながら自動回折強度データ測定が可能である。これにより、ビームライン実験時の実験者負担が軽減され、ビームライン実験の効率を最適・最大化する。理研・構造ゲノムビームラインは平成14年度に試験調整運転を終了して、現在BL26B2ではサンプルチェンジャーによる自動運転のテストを行っている。また、JASRI共用ビームライン（BL38B1）も回折計および制御システムを更新して今秋よりビームラインのハイスループット化を進める。

M.Yamamoto : High Throughput Protein Crystallography at SPring-8