

# マイクロ流体デバイスを用いたタンパク質の結晶化と取り出し

Protein crystallization using microfluidic devices



## 技術支援貢献賞 / Best Technical Support Contribution Award

受賞者：田中 大器

Awardee : Daiki Tanaka

**KEY WORDS** マイクロ流体デバイス、微小液滴、タンパク質、結晶化、Microfluidic device, microdroplet, protein, crystallization

## 概要 / Overview

タンパク質の立体構造を明らかにするためにはX線結晶構造解析が広く使われている。X線構造解析を行うには、目的タンパク質からなる数十 $\mu\text{m}$ 以上の単結晶が必要である。しかし、タンパク質の種類によっては結晶化の手法が確立しておらず大きな結晶を生成することが難しい。一方、マイクロ流体デバイス中ではタンパク質の良質な単結晶が生成することが知られているが、生成した結晶は壊れやすいためデバイスから取り出さずにX線分析を実施していた。マイクロ流体デバイス内でのX線分析は、デバイスの材料や流体材料の影響を受けて分解能が低い問題がある。そこで本支援では、マイクロ流体デバイス内で結晶を生成し効率よく取り出すデバイスの開発支援を行なった。

X-ray structural analysis is widely used to clarify the three-dimensional structure of proteins. X-ray structural analysis requires single crystals of the target protein that are several tens of micrometers or larger. However, crystallization methods have not been established for certain proteins, making it difficult to generate large crystals. On the other hand, it is known that good quality single crystals can be generated in microfluidic devices, but the generated protein crystals are fragile, so X-ray analysis was performed without removing them from the device. However, X-ray analysis within the device has the problem of low resolution, as it is affected by the material of the device and the fluid. This support assisted in the development of a device that generates crystals within a microfluidic device and can efficiently remove them.

## 従来のマイクロ流体デバイスを利用した結晶化

Conventional crystallization using microfluidic devices

### ● 微小液滴の生成とタンパク質の結晶化

マイクロ液滴などの微小中では良質なタンパク質結晶が生成できることが知られている。従来のマイクロ流体デバイスを利用したタンパク質の結晶化では良質な結晶を生成することは可能であったがマイクロ流体デバイスから取り出せない欠点があった。

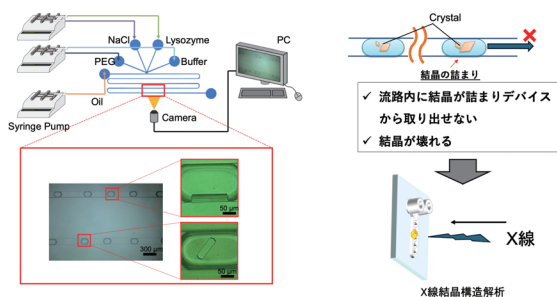


図1. 従来のタンパク質の結晶化手法と分析

## 本支援で開発したマイクロ流体デバイス

Microfluidic devices developed with this support

### ● 微小液滴でのタンパク質の結晶化と取り出し

図2(a)に本支援で開発したマイクロ流体デバイスデザインを示す。流路の高さは100 $\mu\text{m}$ である。デバイスの構造は液滴生成部、結晶生成部、結晶取り出し部の3つの部位から構成されている。結晶生成部で生成された結晶は結晶生成部左側にある流路出口に溜まったオイルを逆流させることで結晶取り出し部へ流し込んだ。図2(b)の結晶取り出し部は、デバイス上部のPDMSを外すことで直接マイクロ流体デバイスから結晶を取り出すことが可能である。

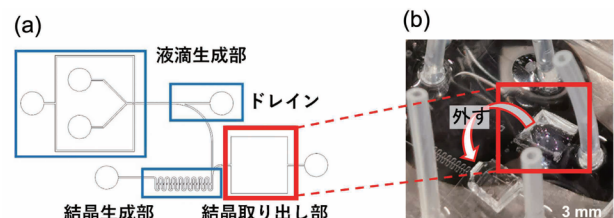


図2. (a)デバイスデザイン (b)結晶取り出し部

## 微小液滴の生成とタンパク質の結晶化実験

Microdroplet generation and protein crystallization

### ● 微小液滴の生成・トラップと結晶化

結晶化実験はリゾチームを用いて実施した。図3(a)(b)に生成された微小液滴と結晶生成部へトラップした液滴の様子を示す。液滴をトラップ後、常温でデバイスを静置させ1分ごとに同じ液滴の様子をタイムラプスで撮影した。顕微鏡で目視できるサイズの結晶は125分後に生成した。図3(c)は結晶が生成された後10分間隔で撮影した光学顕微鏡像である。時間経過と共に結晶が成長している様子が確認できる。生成したタンパク質の結晶は結晶取り出し部に流し込みマイクロルーブですくい上げた。

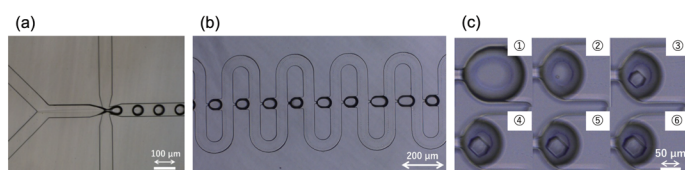


図3. (a)微小液滴の生成 (b)微小液滴のトラップ  
(c)タンパク質の結晶化 ①トラップ0分後、②125分後、③135分後、④145分後、⑤155分後、⑥165分後

## タンパク質結晶の取り出しと分析

Protein crystal extraction and analysis

### ● リゾチーム結晶の観察と成分分析

マイクロ流体デバイスから取り出したタンパク質の結晶は顕微鏡を用いた観察とEDXによる成分分析を実施した。図4(a)は光学顕微鏡によるタンパク質結晶の観察結果である。単結晶のタンパク質結晶が生成していることが確認できる。図4(b)は走査型電子顕微鏡(SEM)による観察結果である。100 $\mu\text{m}$ 程度の結晶が生成している。図4(c)はEDXによる元素分析結果である。タンパク質由来のピークがありリゾチームの良質な単結晶が生成していることを確認した。

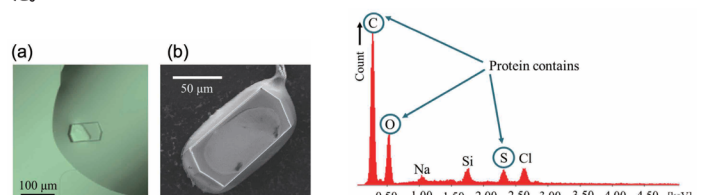


図4. (a)マイクロ流体デバイスから取り出したタンパク質の結晶  
(b)SEMを用いたタンパク質結晶の観察 (c)EDXを用いたタンパク質結晶の成分分析

CONTACT

田中大器 / Daiki Tanaka  
早稲田大学ナノ・ライフ創研研究機構 / Research Organization for Nano & Life Innovation  
URL : <https://www.waseda.jp/inst/nanolife/>