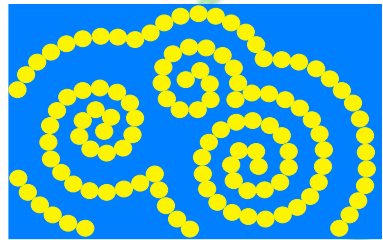
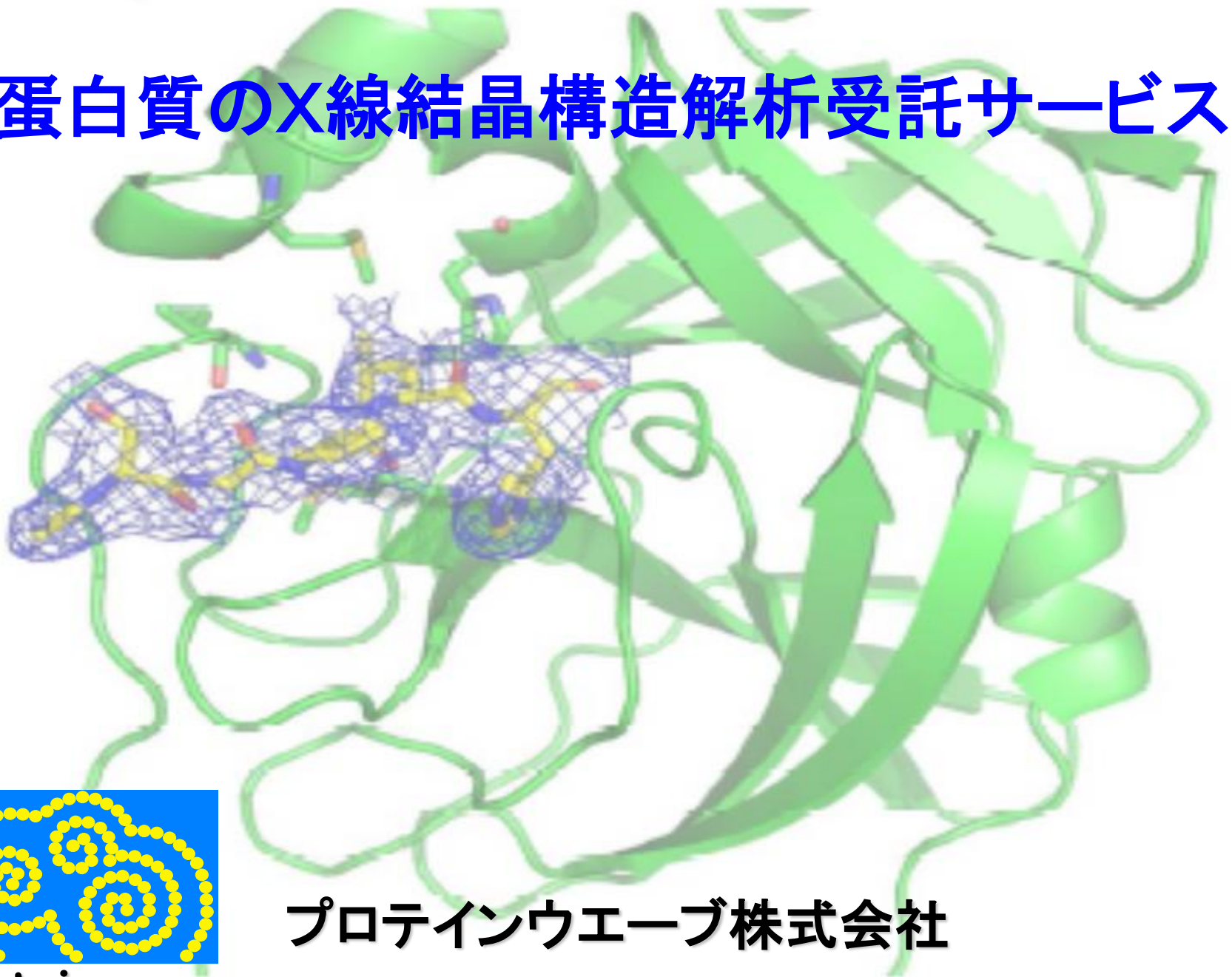


受託研究サービス

受託研究サービスの概要

蛋白質のX線結晶構造解析受託サービス



protein wave

プロテインウェーブ株式会社

■ X線結晶構造解析受託サービスの概要

1. 目的蛋白質

・水溶性蛋白質、膜蛋白質



2. 発現ベクターの構築
と大量培養

・発現系:大腸菌、昆虫細胞、動物細胞
・アミノ酸配列、ドメイン領域の最適化
・コドンの最適化、変異の導入



3. 蛋白質の精製

・Ni²⁺、GST等のアフィニティークロマト
・イオン交換クロマト
・ゲルろ過クロマト
・動的光散乱による評価



4. 結晶化/共結晶化

・蒸気拡散法、マイクロバッチ法
・結晶化スクリーニング(~1,000 条件)
・条件の最適化(分解能>3オングストローム)
・共結晶化:Co-Crystallization法、Soaking法
・抗凍結(クライオ)条件の決定



5. X線回折データの収集

・放射光:あいちSR光, SPring-8, SLS(スイス)
・インハウスX線回折装置:RAXIS-7/FR-E



6. データ処理

・XDS, HKL2000



7. 立体構造解析

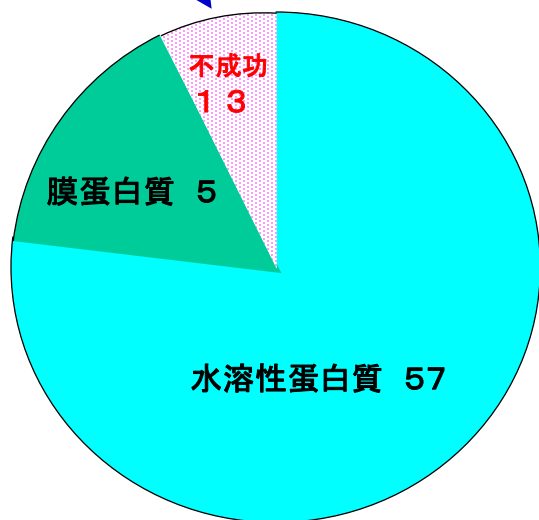
・分子置換:Molrep
・蛋白質および複合体構造のモデリング:Coot
・精密化:CCP4-Refmac

■ 当社の受託サービス事業の実績（H13年～H24年）

発現ベクター構築、大量発現、精製、結晶化
を実施した全蛋白質数：75蛋白質の内訳

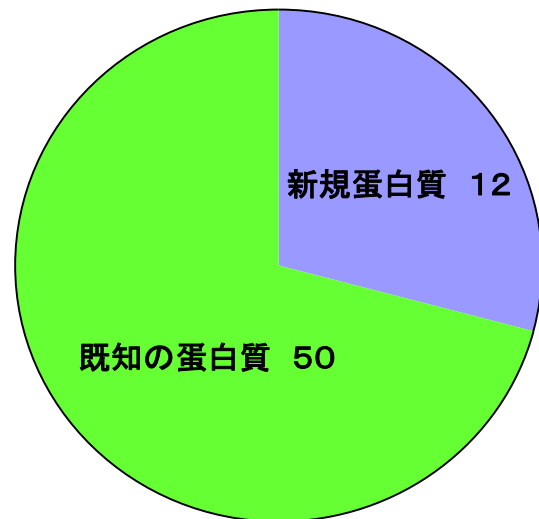
成功した62蛋白質の内訳

水溶性 11
膜蛋白質 2



結晶化に成功

62 蛋白質
(83%)



発現系：昆虫細胞 8 カイコ 4 大腸菌 50

既知の蛋白質：論文等で既に立体構造などが発表されている蛋白質

新規蛋白質：論文等での発表がまったくされていない蛋白質

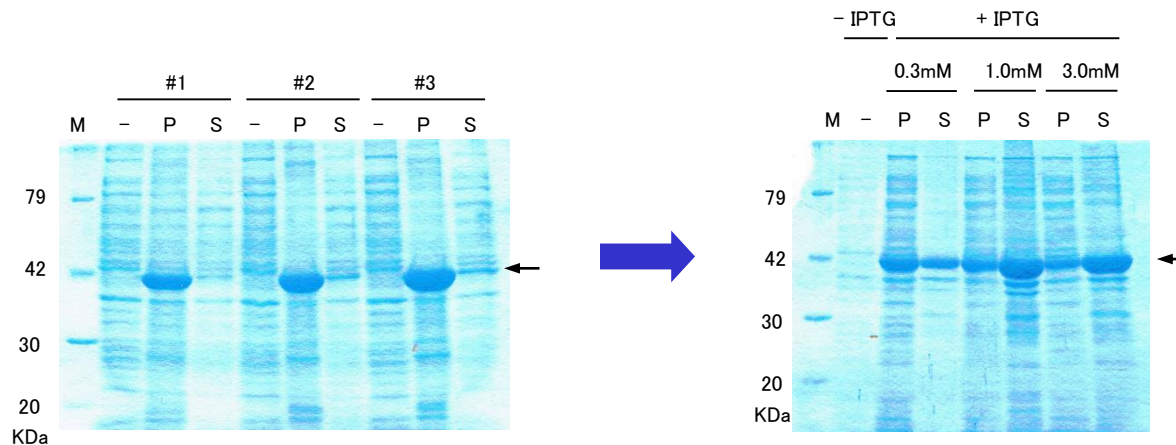
■ 当社の受託サービス事業の進め方

- ・個別の業務単独あるいは発現から結晶構造解析まで対応可能です。
- ・補密保持契約を締結後、業務の詳細、納期、お見積もり等につきまして協議させていただきます。
- ・その後、委託業務契約を締結させていただきます。
- ・業務が成功しなかった場合でも実費をお支払いいただきます。
（お見積り額の約50%）
- ・定期、不定期の進捗報告、業務報告、データ類の提出を致します。
- ・最終の業務報告書を提出致します。
その後、納品書および御請求書を発行させていただきます。

発現系の構築 ～発現量の改善例～

1) 培養条件の変更

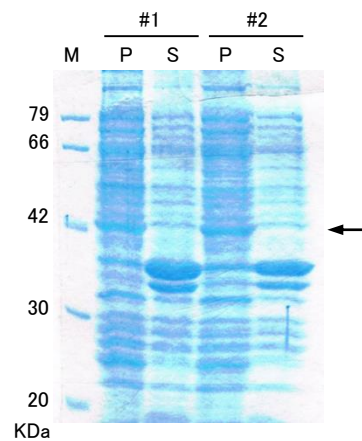
★培養温度を変更することによって可溶性画分(S)の発現量を改善



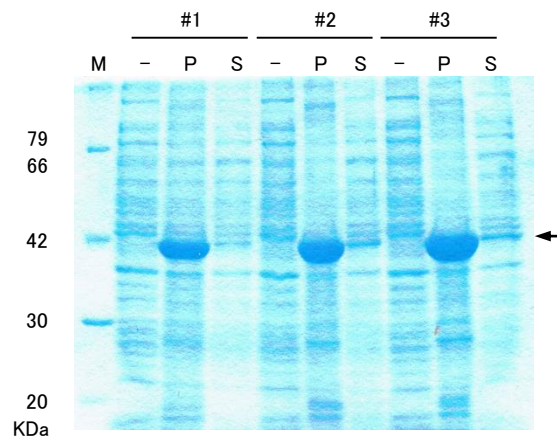
2) アミノ酸配列の変更

★N末端側のプロリンリッチな配列とC末端側の機能を持たない配列を除去

「400 a.a.」



「324 a.a.」

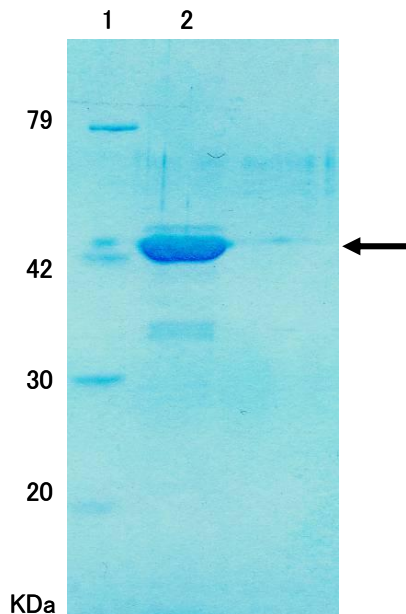


封入体の精製と結晶化 ~リフォールディングの成功例~

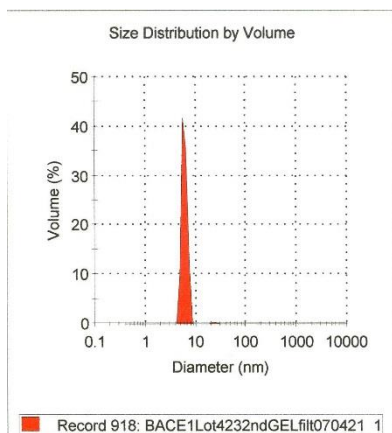
◆大腸菌で発現 → 変性 → リフォールディング

◆ 阻害剤との共結晶化

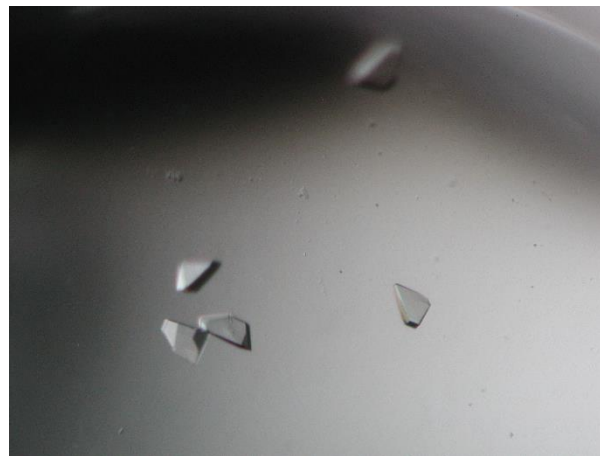
12.5%
SDS-PAGE
最終ゲルろ過後



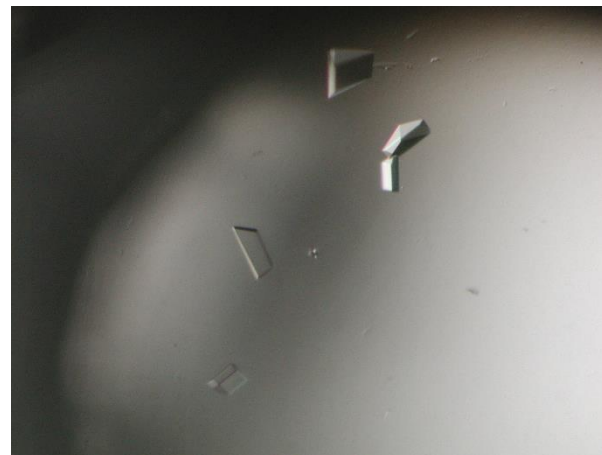
動的光散乱
の結果



	Diam.(nm)	% Int.	Est. MW(kDa)	%Pd
Peak1:	6.09	99.38	45.58	12.1
Peak2:	23.61	0.61	-	-



化合物 1
最終濃度 1.3mM
(3% DMSO)



化合物 2
最終濃度 1.3mM
(3% DMSO)

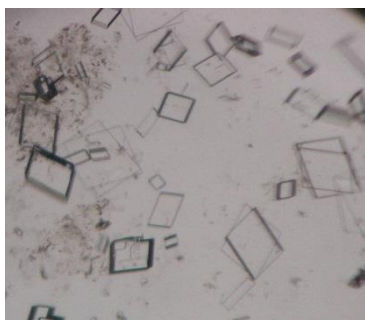
■発現→精製→結晶化・共結晶化の実施例

(1) 蛋白質A : Co-Crystallization法

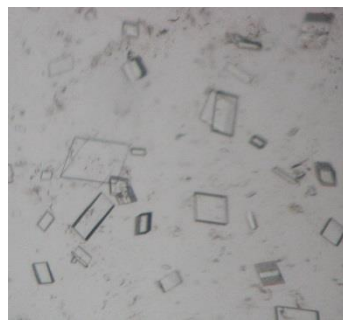
あらかじめ精製された蛋白質溶液に化合物を添加・溶解させておき共結晶化を行う



Native体
結晶化温度:4°C



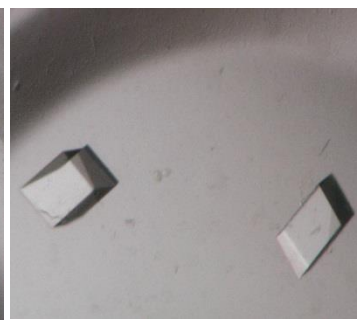
化合物 1
最終濃度 1mM
(10% DMSO)



化合物 2
同左



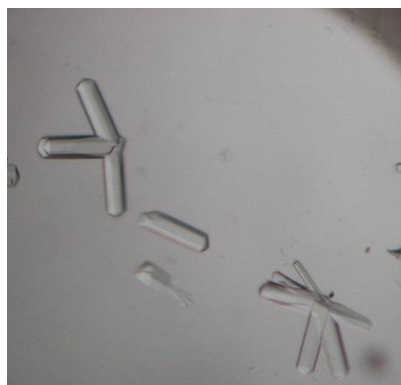
化合物 3
同左



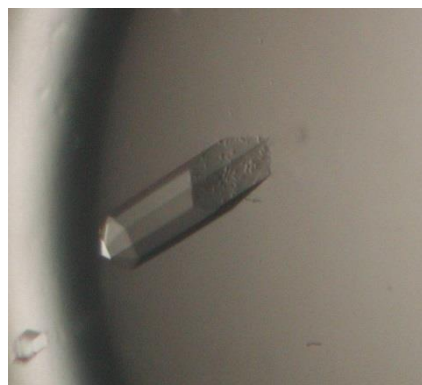
化合物 4
Soaking 24hr

(2) 蛋白質B : Soaking 法

Native体の結晶を作製しておき、この結晶を化合物を添加した溶液に浸せきさせて共結晶化を行う



Native体
結晶化温度:20°C



化合物 1
Soaking 24hr

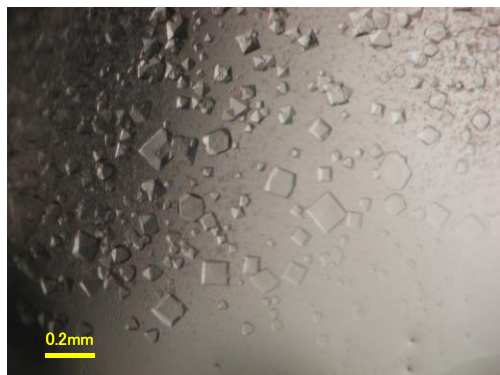


化合物 2
Soaking 24hr

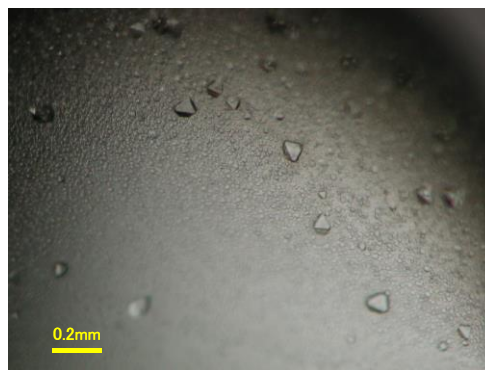


化合物 3
Soaking 96hr

(3) 蛋白質C : Co-Crystallization法

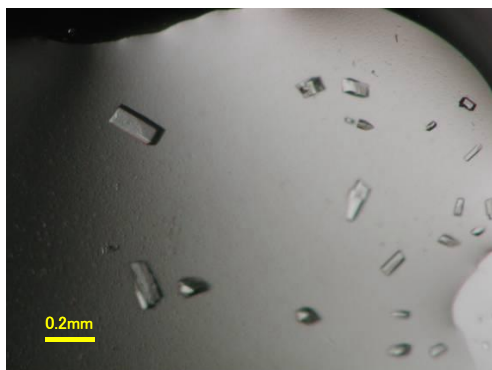


Native体
結晶化温度:20°C



化合物 1
最終濃度 2mM
(3% DMSO)

(4) 蛋白質D : Co-Crystallization 法



Native体
結晶化温度:20°C



化合物 1 (難溶性)
最終濃度 5mM
(10% DMSO)