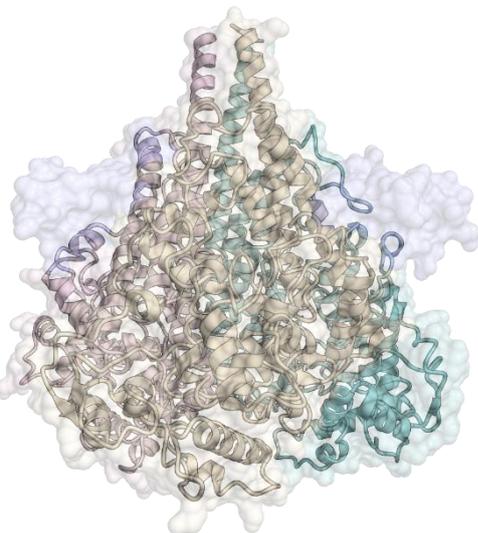


# Agro Box

構造ベース創薬 (SBDD) のための

タンパク質/核酸の構造解析



# AgroDesign Studios®について

きっかけは分子標的『農薬』のためのタンパク質構造解析株式会社アグロデザイン・スタジオは、構造ベース創薬法（Structure-Based Drug Design: SBDD）を中心に、タンパク質構造解析のトータルソリューションを提供する会社です。当社は、2018年3月に茨城県つくば市で創業されました。現在は、千葉県柏市の東京大学柏IIキャンパス内のベンチャー・インキュベーション施設内に自社ラボを備えております。創業時から続く当社の主力事業は、SBDDによる分子標的『農薬』の創薬になります。創業者である当社代表取締役社長の西ヶ谷有輝は、構造生物学者として溶液NMR法およびX線結晶回折法によるタンパク質立体構造解析を活用した農薬の開発を行ってまいりました。農薬は、環境中の多種多様な防除対象生物に効く必要があるため、ヒトという生物1種を対象にすればよい医薬品開発と比べ、構造解析が必要なタンパク質（ホモログ）の数が格段に多いという特徴があります。そのため、当社はタンパク質構造解析に力を入れて参りました。その結果、国内でもトップクラスの構造生物学研究者チームと構造解析数を誇る会社となりました。

## AgroBox®で誰でも手軽に構造解析を

タンパク質の構造解析は、医薬・農薬の創薬や酵素の改変などにおいてパワフルなツールです。しかし、解析を行うためには高度な専門知識を必要とし、熟練の構造生物学者の職人芸に頼る必要があります。当社では、誰でも手軽に構造解析をしていただきたいという思いから、構造解析に必要な測定や作業をパッケージ化（Box化）し、必要サンプルや情報を送るだけでタンパク質の構造解析ができるAgroBox®をリリースいたしました。

## 自社創薬で培われた技術をみなさまに

当社では、日々自社の創薬パイプラインとして農薬のSBDDを行っています。農薬SBDDは、医薬よりも格段に難しく、まだ始まったばかりの分野であることから、世界中のどこにも十分なノウハウがありません。当社では、医

薬の創薬で用いられるタンパク質構造解析の最新の知見（クライオ電子顕微鏡、AI創薬など）を導入すると同時に、自ら構造解析の技術開発も行っています。これら技術やノウハウをAgroBox®として提供いたします。

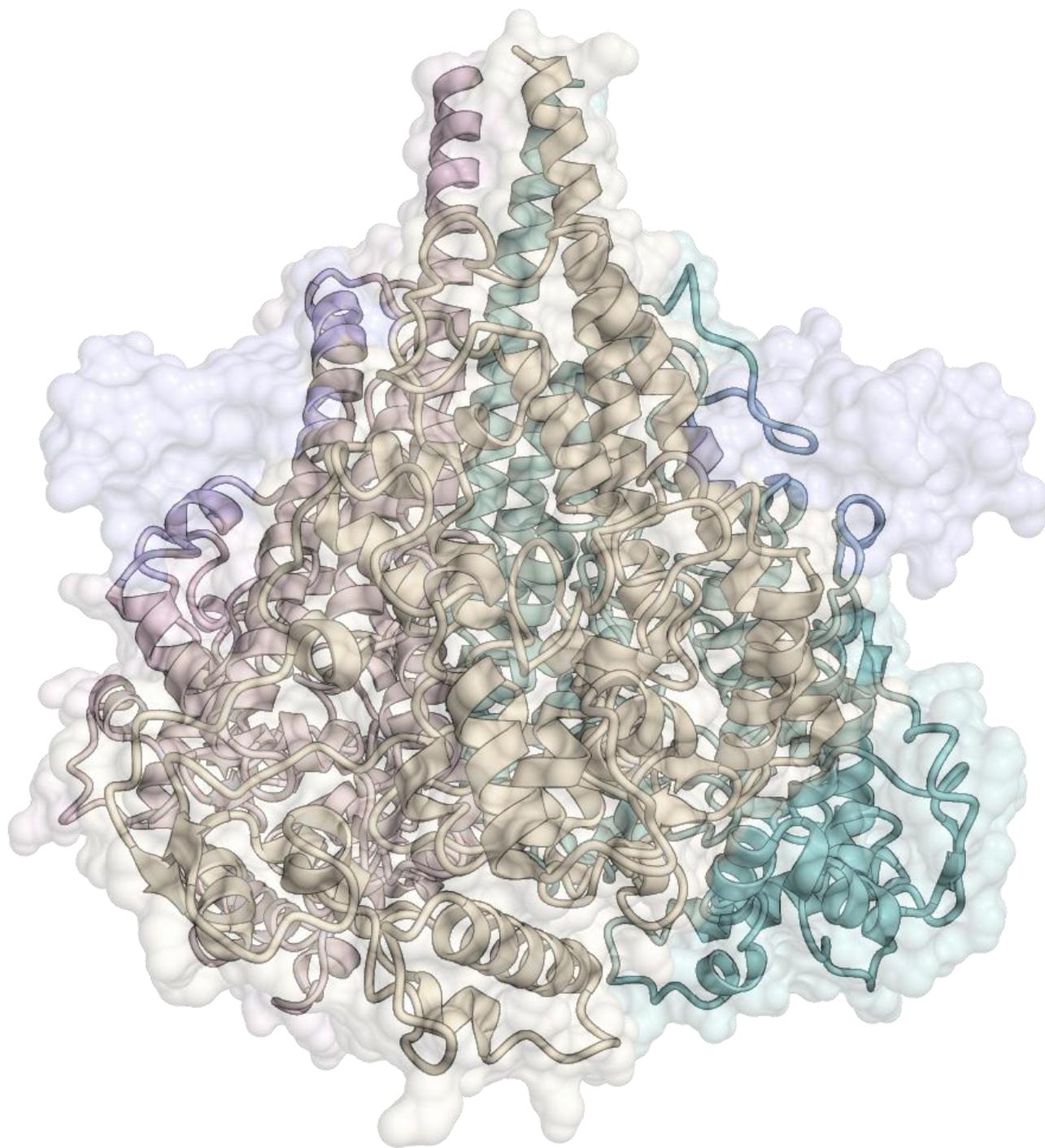
## タンパク質/核酸構造データで産業にイノベーションを

タンパク質や核酸の構造データは、これまでに医薬・農薬・工業用酵素産業などに活用されてきました。Protein Data Bank (PDB) にはアカデミアを中心に構造解析されたタンパク質などの構造が約20万種以上も登録されています。しかし、まだまだ自社で構造解析を実施できる会社や、構造情報を活用できる会社は限られており、PDBのデータが十分に産業応用されているとは言えません。当社では、タンパク質構造データを活用した産業イノベーションのお手伝いをさせていただきます。



# 目次

<b>AgroDesign Studios®</b> について.....	<b>2</b>
<b>Biology by 3D Design ～タンパク質構造データを活用し新たなイノベーションを～</b> .....	<b>5</b>
1. タンパク質構造解析が活躍する産業領域.....	6
2. タンパク質構造解析の3つの手法.....	7
3. 核酸の構造解析が活躍する領域.....	8
4. 構造ベース創薬に必要な分解能.....	10
5. アグロデザイン・スタジオの構造活用例.....	12
6. アグロデザイン・スタジオの構造解析実績.....	14
<b>AgroBox® タンパク質/核酸の結晶構造解析 フルサービス</b> .....	<b>17</b>
1. AgroBox®フルサービス 構造解析をパッケージ化.....	18
2. AgroBox®フルサービスファミリー.....	19
3. おすすめセット（タンパク質の構造解析）.....	22
4. おすすめセット（核酸の構造解析）.....	24
5. AgroBox®フルサービスご利用方法.....	26
6. サンプルの安全性をご確認ください.....	28
<b>AgroBox®結晶構造解析 タンパク質結晶化/核酸結晶化 フルサービス内容詳細</b> .....	<b>31</b>
AgroBox® No.1 改 結晶化スクリーニング.....	32
AgroBox® No.2 改 結晶化条件の最適化.....	36
AgroBox® No.3 フルデータ測定用結晶の準備.....	38
AgroBox® No.4 フルデータ測定.....	40
AgroBox® No.5 X線回折データ処理.....	42
AgroBox® No.6 構造モデリング.....	44
AgroBox® No.7 リガンド複合体解析.....	46
<b>AgroBox® Professional</b> .....	<b>49</b>
AgroBox® Pro Phase 実験位相決定.....	50
AgroBox® Pro FBDD フラグメント化合物スクリーニング.....	52
AgroBox® Pro FSEC ① GFP融合タンパク質の蛍光ゲルろ過分析.....	54
AgroBox® Pro FSEC ② トリプトファン蛍光ゲルろ過分析.....	58
<b>AgroDesign × BioStartup Collaboration</b> .....	<b>61</b>
AgroDesign Studios × ANPLAT.....	62
<b>AgroDesign.SHOP</b> .....	<b>65</b>
DIY ラボオートメーションに“ちょうどいい” UFACTORY ロボットアーム xArm シリーズ.....	66
シロイヌナズナ野生型 Col-1 種子.....	67
シロイヌナズナ種子採取キット (AgroBox®PlantTools ミニコンテナ栽培シリーズ).....	68
<b>今後販売予定の AgroBox®</b> .....	<b>70</b>
<b>会社概要</b> .....	<b>71</b>



研究写真ギャラリー：農薬ターゲットタンパク質のX線結晶構造解析

# Biology by 3D Design

～タンパク質構造データを活用し新たなイノベーションを～



# 1. タンパク質構造解析が活躍する産業領域

## Biology by 3D Design

タンパク質の機能制御技術（機能阻害や活性向上）は、医薬・農業（農薬）・食品産業・製造業（酵素的物質生産）などにおいて多様な貢献をしています。タンパク質は、DNA 配列に基づいて数十～数百個のアミノ酸が直鎖状に繋がった物質ですが、この鎖が折りたたまれて三次元の立体構造を形成します。タンパク質構造解析によって三次元立体構造が判ると、タンパク質に結合することで活性や相互作用を制御する物質（低分子化合物、中分子のペプチド/核酸、高分子の抗体など）の設計や、タンパク質自身のアミノ酸配列を変異させることによる機能改変が可能になります。

## 医薬市場：低分子薬

タンパク質立体構造の代表的な活用例が、医薬における分子標的薬（低分子化合物）の探索や設計です。タンパク質立体構造情報を活用した薬剤の探索や設計は、構造ベース創薬（Structure-Based Drug Design：SBDD）と呼ばれています。

SBDD は、新規化合物の探索と、化合物の最適化で力を発揮する手法です。新規化合物の探索では、まず標的タンパク質の構造解析を行い、そのデータを用いて化合物データライブラリ（市販化合物ライブラリ、各社の社内ライブラリなど）に対し、ドッキング・シミュレーションなどの *in silico* スクリーニングを行います。化合物の最適化の段階では、*in silico* スクリーニングでヒットした化合物と標的タンパク質の複合体の構造解析を行い、その構造情報をもとに化合物の改良を行います。このとき、合成する前に計算機シミュレーションにより活性の有無がある程度予測できるため、無駄な合成を削減できる利点があります。

## 医薬市場：新規モダリティ・酵素

医薬研究における SBDD は、低分子化合物だけではなく、中分子（ペプチド・核酸など）、高分子（抗体など）など

の新規モダリティにおけるアフィニティー向上に役立てられています。また、精製された酵素を直接患者に投与する酵素製剤においては、構造ベースでの酵素の活性改良なども行われています。



## 農薬業界：低分子創薬（構造ベース創農薬 SBDD）

SBDD は、9 兆円産業である農薬にも適用可能です。当社は農薬 SBDD に最も積極的に取り組んでいる会社の一つですが、農薬には医薬とは異なった難しさがあります。医薬ではヒトという1種の生物に対して作用すればよいですが、農薬は農地の多種多様な防除対象生物に効く必要があります。生物種が違えば、標的タンパク質の構造も異なるため、多数のホモログタンパク質の構造をもとに化合物設計を行う必要があり、構造解析力が試される分野です。



## 工業用酵素市場（食品用、洗剤用など）

工業用酵素市場は、7 千億円の市場規模があり、成長産業です。なかにはアミノ酸配列を改変した遺伝子組換え酵素もあり（国内登録数 59 種類、令和 3 年度 厚生労働省）、洗剤や食品の加工、工業用原料の製造などに活用されています。酵素の立体構造情報があれば、効率的な機能の改良が可能です。



## 2. タンパク質構造解析の3つの手法

### タンパク質構造解析に利用される3つの手法

タンパク質の立体構造解析法は、主に X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡解析、核磁気共鳴法 (NMR) の3種類があります。それぞれに一長一短があるため、各手法の特徴を理解したうえで、利用する必要があります。

### X 線結晶構造解析の特徴

X 線結晶構造解析は、創薬で最も使われている手法です。この手法では、タンパク質を結晶化した後に、X線を照射し、その回折像から構造解析を行います。結晶化が可能なタンパク質のみに適用可能な手法ですが、分子量の制限が無いことや、高いスループット性など他の手法より優れた点があります。

創薬用途での X 線結晶構造解析の最も大きな利点は、やはり高いスループット性です。X 線回折測定に必要な時間は5分程度であり、データ処理も数分で完了する場合があります。結晶化条件が決まれば、そこに化合物を添加することより、多数のタンパク質-化合物複合体の測定実験が容易に実施可能です。そのため、多数の化合物とタンパク質複合体の測定が必要な創薬にとって大きな利点です。さらに近年、放射光ビームライン、X 線検出器、解析ソフトウェアなどの高度化や自動化が進んでおります。これにより、X 線結晶測定や解析にかかる時間がより短縮されており、ますます便利になっています。当社では、豊富なビームタイムを確保し、農薬開発や AgroBox®においてルーチ的に利用しています (図 1)。

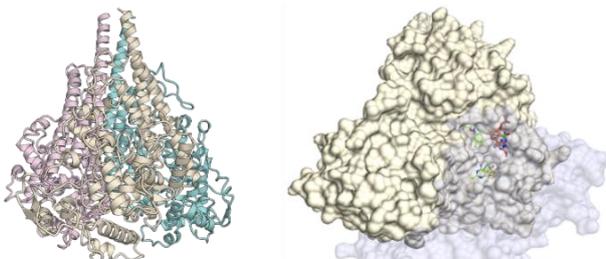


図 1 X 線結晶構造解析法で決定した酵素の構造

### クライオ電子顕微鏡の特徴

クライオ電顕解析は、近年の装置や解析技術の発展に伴い、爆発的に普及した手法です。この手法は、比較的大きな分子量 (100 kDa 以上程度) の対称性のあるタンパク質の構造解析に向いています。また、結晶化が不要であるため、膜タンパク質をはじめとする結晶化が困難なタンパク質でも構造解析が可能です。一方、測定に半日以上かかることも多いため、多数の化合物とタンパク質の複合体構造解析を行う用途にはあまり向きません。そのため、*in silico* スクリーニング目的で結晶化が困難なタンパク質の構造解析を行う場合や、非 SBDD 手法で最適化された化合物の結合様式の確認などに適しています。当社では、これまでに可溶性の農薬ターゲットタンパク質の解析実績があり、クライオ電顕解析例の中では高分解能の 1.7 Å 程度の構造を取得し、創農薬に生かしています。

※クライオ電顕の AgroBox®については別途お問合せ下さい。

### 溶液 NMR の特徴

NMR 法は、高感度な相互作用解析や構造変化の解析を得意としています。2000 年代頃までは、NMR を用いたタンパク質の構造解析も盛んに行われてきました。しかし、おおよそ 30 kDa 以下の分子量のタンパク質にしか適用できないこと、薬剤が結合した複合体構造を直接得ることが困難であること、測定に時間を要することから、次第に結晶構造解析やクライオ電顕解析が主流となってきました。

一方で創薬においては、感度と再現性の高さから、タンパク質-リガンド相互作用解析に活用されています。特に <sup>19</sup>F-NMR と呼ばれるフッ素含有化合物に対するライブラリースクリーニングや相互作用解析は、他のアッセイや物理化学的手法より高感度で信頼性の高い手法として用いられています。当社においても、等温滴定カロリーメトリー (ITC) や表面プラズモン共鳴 (SPR) に適さないサンプルの相互作用解析などに利用しています。

## 3. 核酸の構造解析が活躍する領域

### 核酸の立体構造決定の重要性

核酸の構造解析は、核酸そのものを投与する核酸医薬品（アンチセンス核酸、siRNA、アプタマー）や、核酸を創薬標的とする低分子化合物の創薬などにおいて重要です。例えばアプタマーは、特定の立体構造を形成し、標的タンパク質に結合してその機能を阻害するため、立体構造を考慮した配列設計が必要です。また近年 mRNA は、塩基配列という一次元情報だけでなく、部分的に立体構造をとることが明らかになり、構造ベース創薬法（SBDD）の標的分子として注目されています。このように、タンパク質を標的とする低分子薬や抗体医薬と同様に、核酸医薬の合理的設計を行う上で、核酸の立体構造情報は重要です。

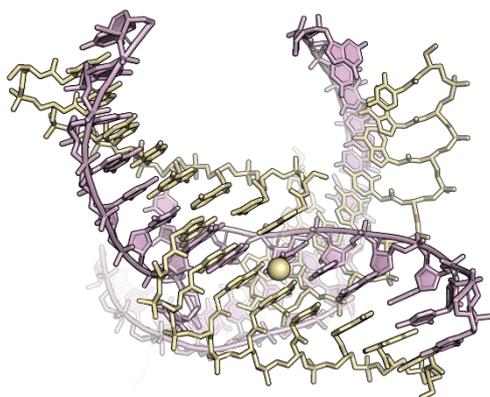


図 2 RNA 人工核酸複合体の構造例（PDB: 7BPG）  
※弊社研究者がアカデミア在籍時に解析した例

### 核酸の立体構造予測および構造解析の現状

核酸医薬品や核酸を標的とした低分子化合物等の創薬では、立体構造決定がボトルネックのひとつとなっています。タンパク質と比較して核酸では、配列から立体構造を精度よく予測することが困難であるという問題があります。2本鎖 DNA のような単純な核酸であれば比較的精度よく立体構造を予測することが可能ですが、特殊な立体構造を持つ RNA や G4（グアニン四重鎖）などの核酸の立体構造を予測することは一般的に困難です。さらに、同じ配列を持

つ核酸であっても結合する物質の有無などで容易に大きな構造変化を引き起こして異なる立体構造をとるようになるため、さらに予測が困難になります。

この予測の困難さは、現在 PDB に登録されている核酸データの少なさに起因します。近年開発されたタンパク質の立体構造予測プログラムでは、PDB に登録された膨大なタンパク質構造データを用いることにより高精度な予測を可能にしていますが、核酸の立体構造データはわずか全体の 8%程度でしかなく、圧倒的にデータが少ないために予測が困難であると考えられます。こうしたことから、核酸分子の立体構造解析の実験は、タンパク質よりも更に重要になります。事実、新たな創薬モダリティとして注目が高まったこともあり、PDB への登録数が近年増加する傾向にあります（図 3）。

### 核酸に適した結晶化実験方法

核酸の X 線結晶構造解析では、10 塩基前後の小さな核酸（DNA2 重鎖、DNA/RNA2 重鎖、グアニン 4 重鎖など）から 100 塩基を超える様な RNA アプタマーなど、様々なサイズの核酸の立体構造解析が実施可能です。核酸単独の結晶化実験では、PEG や MPD 等を沈殿剤とする生体高分子用の結晶化スクリーニングキットが使えますが、本サービスでは核酸専用のスクリーニングキットも多数取り揃えています（追加 Box 1E 計 480 条件）。また結晶化作業は、20°C で長期間（数日～1 ヶ月）のインキュベーションを行うため、RNase がコンタミすると RNA が分解する可能性があります。そこで当社では RNase Free 環境を整えています（追加 Box 1, 2, 3, 7RF/RNase Free 作業オプション）。さらに、核酸の立体構造解析ではモデル分子構造を使わない実験的位相決定法（AgroBox® Pro  $\alpha$  でサービス提供中）を用いる必要が出てくる場合があるため、より専門的な結晶構造解析の知識が必要です。当社では、核酸の構造解析経験のある研究者が在籍しておりますので、そのノウハウを活用して核酸の構造解析サービスを提供します。

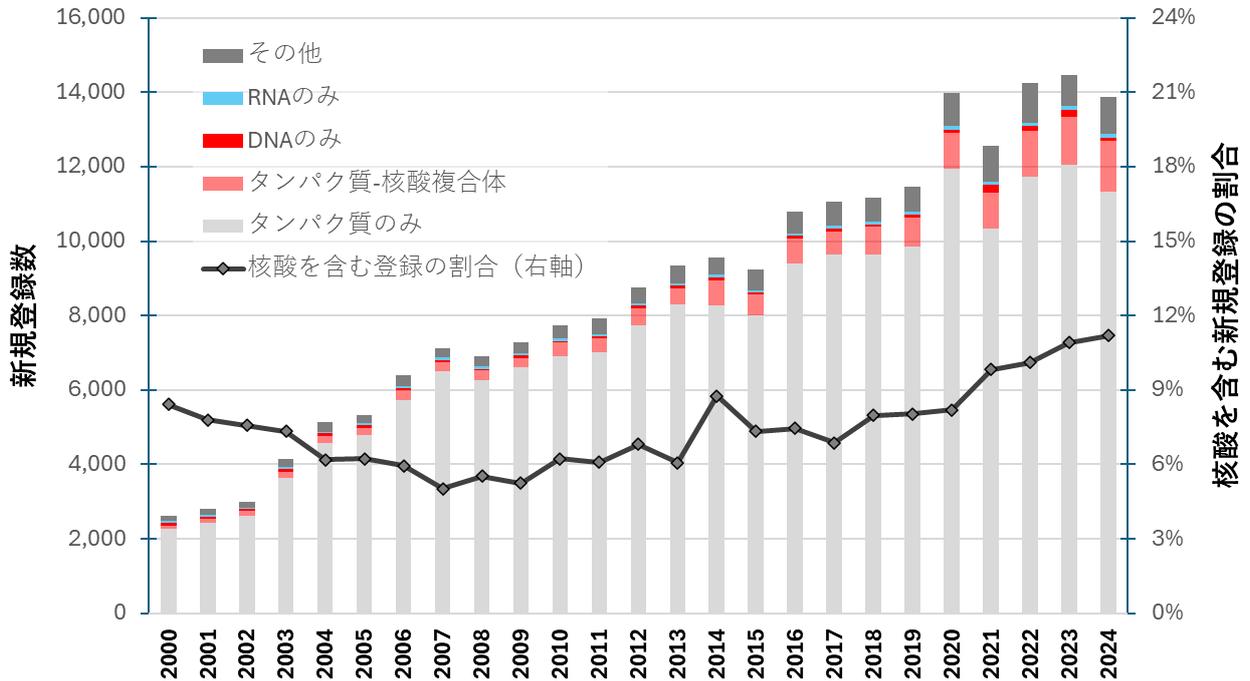


図3 PDBにおける年ごとの新規登録数と核酸を含む新規登録の割合 (2024年11月末時点)

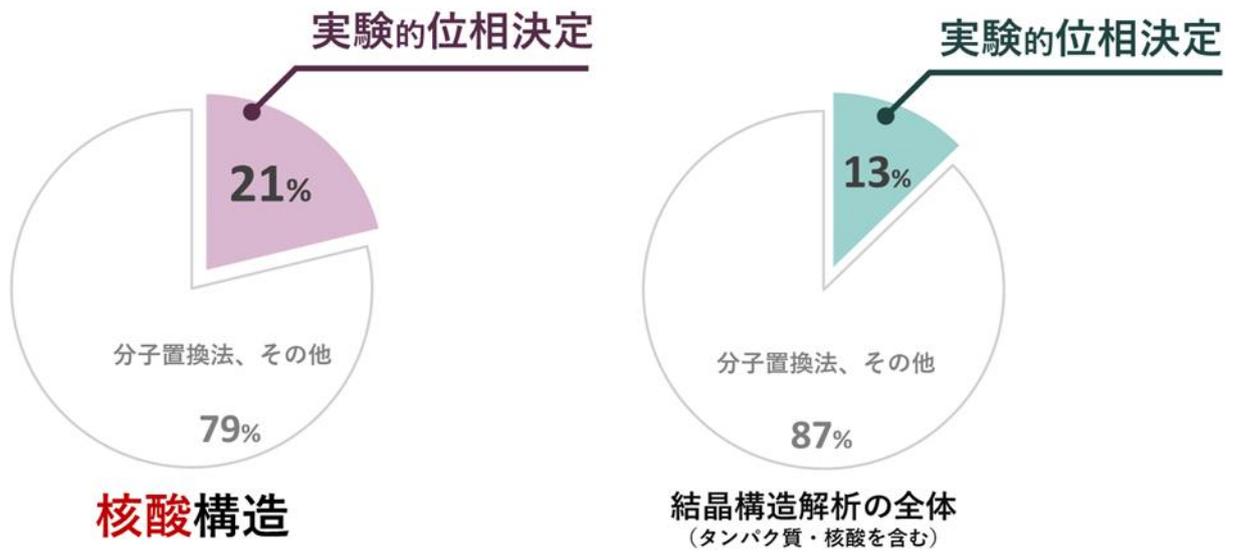


図4 PDB登録データのうち実験的位相決定が使われた割合 (2024年11月末時点)

## 4. 構造ベース創薬に必要な分解能

### X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡の分解能

現在 PDB に登録されている X 線結晶構造とクライオ電子顕微鏡構造の分解能の分布をみると、X 線結晶構造の 85% 以上は 2.5 Å よりも高分解能(良い分解能/数値が小さい)であることがわかります。一般的に 2.7 Å 程度の分解能があれば創薬に利用できることが多いため、多くの PDB 構

造は創薬に十分な分解能の構造が登録されていると言えます。なお、分解能の定義は異なりますが、クライオ電子顕微鏡構造では、2.5 Å 分解能よりも高分解能な構造は、PDB 登録構造のうち約 10% となっています。

※クライオ電子顕微鏡が得意とする膜タンパク質の解析では、X 線結晶構造解析においても高分解能を得るのが難しいことには留意が必要です。

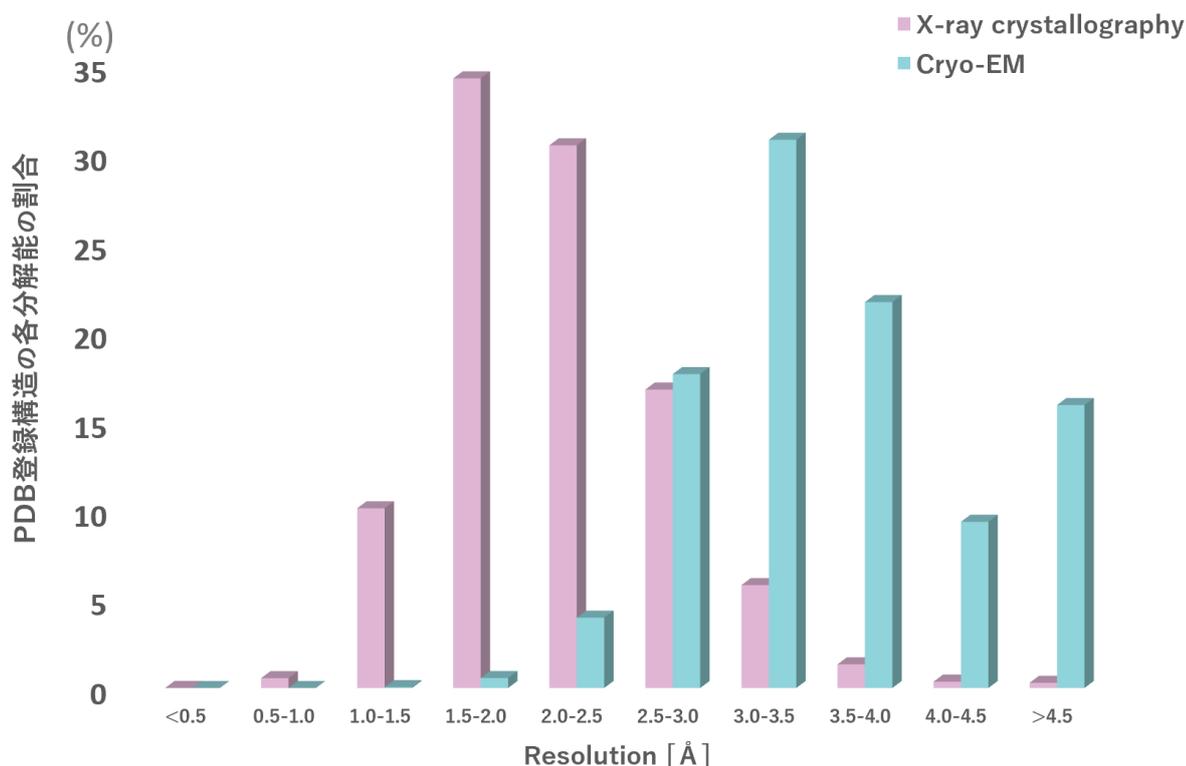


図 5 PDB 登録された X 線結晶構造およびクライオ電子顕微鏡構造の分解能の分布 (注: 縦軸は相対値です)。

### 結晶構造の分解能と電子密度の見え方

X 線結晶構造解析では、高分解能データを用いることにより、より高い精度と信頼性のある結果が得られます。例えば HIV-1 protease は、複数の研究グループから様々な分解能の結晶構造が登録されているため、各分解能における電子密度マップを比較するには最適の対象です。

図 6 では右側ほど高分解能(良い分解能/数値が小さい)となるよう電子密度マップを並べてあります。図の左側の低分解能(悪い分解能/数値が大きいの)の電子密度マップを使用して分子モデルを構築する場合、その位置情報に不確

かさが生じ、モデル構築に研究者のバイアスが影響する可能性があります。一方で、高分解能の電子密度マップを使用すれば、研究者のバイアスのない確定的な分子モデルの構築ができると考えられます。そのため、構造ベース創薬では、2.5~2.7 Å 分解能のデータを取得することが一つの目安と考えることができます。一方で、酵素の反応機構解析が必要なときなどは、水分子の位置や水素原子の位置までも決定できるような高分解能データを求めることになります。

## HIV-1 protease structure

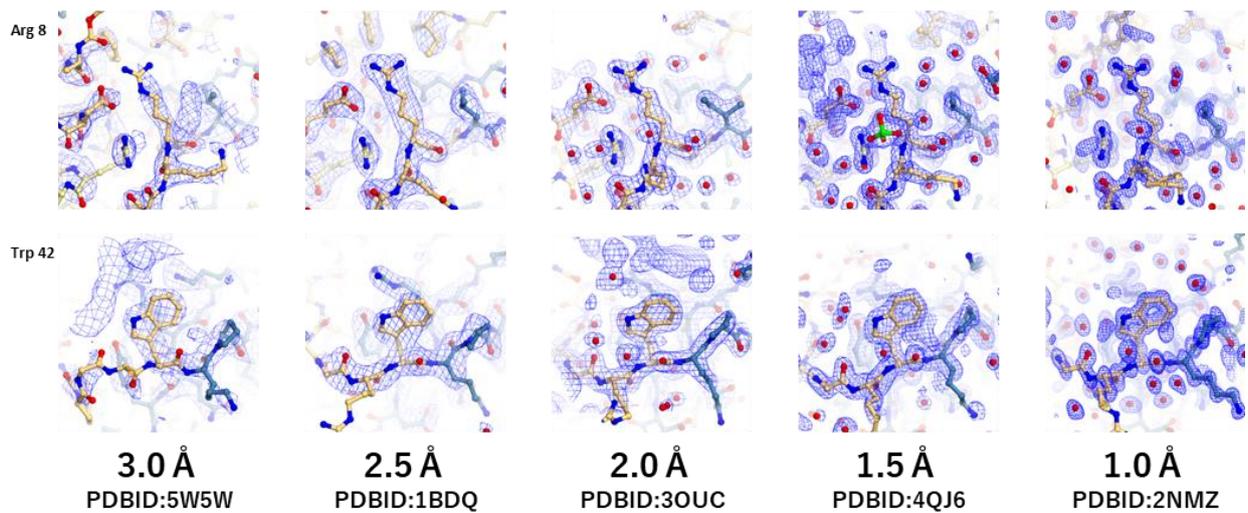


図 6 PDB HIV-1 protease X線結晶構造の電子密度マップの比較（右側が良い分解能）

### 化合物の結合能と電子密度の明瞭さ

十分な分解能の結晶構造が得られた場合でも、低分子化合物などのリガンドの結合様式が決定できるかどうかはまた別の問題となります。当社が構造解析を実施した農薬標的タンパク質と低分子化合物（既存薬及び非上市薬）との複合体結晶構造解析の実例を示します。これらは、どれも同程度の分解能（2.5~2.7 Å 付近）の結晶であるため、これらを比較することで標的タンパク質に対する阻害能が強い化合物では明瞭な電子密度が観測できることがわかります（生化学アッセイは当社実施）。左側ふたつの高結合能（高阻害能： $IC_{50}$  値が小さい）化合物は SBDD によって設計されたものではありませんが、その複合体構造は化合物全体に相当する電子密度マップが明瞭に確認できます。

一方で低結合能（低阻害能）化合物との複合体構造解析では、部分的な化合物の電子密度しか確認できません。

SBDD 初期においては、このような不明瞭な化合物の電子密度が観測されることはよくあります。このような電子密度であると、化合物の結合構造を決定するのが困難ですが、これはタンパク質の結合ポケット中で化合物が揺らいているためだと考えられます。このことは、SBDD を行う上で重要な情報となります。ドッキング・シミュレーションや分子動力学計算 (MD)、生化学アッセイも併用しながら、周辺化合物の複合体結晶構造解析を繰り返すことにより、どの官能基が結合の安定に重要な電子密度から割り出す作業を行います。この SBDD サイクルにより、効率的に結合能の良い化合物に改良します。

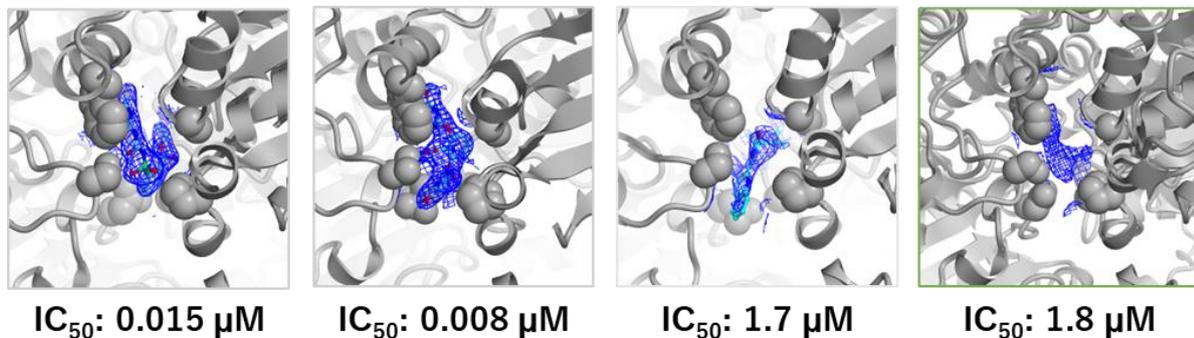


図 7 阻害活性の異なる化合物の電子密度マップの比較

## 5. アグロデザイン・スタジオの構造活用例

### 農薬①: HAO 阻害型の硝化抑制剤の創薬

～構造ベース創農薬で地球環境を守る～

**硝化抑制剤標的ヒドロキシルアミン酸化還元酵素 (HAO)**  
 現代の農業において、窒素肥料は不可欠な農業資材ですが、ハーバーボッシュ法によって大量の化石燃料を消費して合成されており、低窒素農業が持続的社会的のために期待されています。硝化抑制剤は、窒素肥料を栄養源とする土壌菌である硝化菌を殺菌するための薬剤です。この菌によって窒素肥料投与量の半分程度が消費されてしまい、作物に肥料がいきわたりません。そこで当社では、硝化菌だけがもつ酵素である HAO を標的とすることで、効果が強く、安全性の高い薬剤を目指して研究開発を行っています。

#### 結晶構造を利用した *in silico* スクリーニング

HAO は、これまでに農薬標的として利用されたことのない酵素です。HAO はヘムが 24 個結合するヘムタンパク質であり（うち 3 個は Tyr と共有結合する特殊なヘム）、力場パラメーターの設定が困難であるため、ドッキング・シミュレーションで薬剤探索を行うことが困難でした。一方で、研究をはじめた当時は、リガンドが結合していない状態（アポ酵素）の構造のみが論文発表されており、リガンドが結合した状態（ホロ酵素）の構造はありませんでした。そのため、基質-HAO 複合体構造から阻害剤を設計することも難しい状況でした。

そこで、まず X 線結晶構造解析法により、基質であるヒドロキシルアミンおよび基質ミミック型の阻害剤 2 種と HAO との複合体の立体構造を決定しました。その構造情報をもとに力場パラメーターの設定が不要な *in silico* スクリーニング法の一つであるファーマコフォアサーチを行いました。このとき結晶構造が得られていた 2 種の化合物のファーマコフォアと化合物が結合するタンパク質のポケ

ット形状を利用することで、約 600 万種の市販化合物から 77 化合物を選抜・購入しました（図 8）。それら化合物の HAO 酵素に対する阻害活性を調べたところ、22 種の化合物から活性が検出されました。最も活性の高いヒット化合物と HAO の複合体結晶構造を解析したところ、狙っていた位置に化合物が結合していることが明らかになりました。その後、複合体結晶構造をもとに、化合物の改良を行い、 $IC_{50}$  が 10 nM 程度の活性の強い化合物の創出に成功しました。このようにタンパク質のリガンドポケットの構造情報に基づくファーマコフォアサーチを利用することで、高確率のスクリーニングを実施することができました。

#### ファーマコフォアサーチの有用性

HAO のような特殊な補欠分子を持つタンパク質に対して、ファーマコフォアサーチは有効なアプローチになります。また、ドッキング・シミュレーションと比較して、計算時間が半日から 1 日と短いことも特徴として挙げられ、構造が類似した化合物の網羅的探索や化合物の母核構造を置換するスキファールド・ホッピングが短時間に実施可能です。

（本研究は、(国研)農業・食品産業技術総合研究機構様との共同研究として行われました）

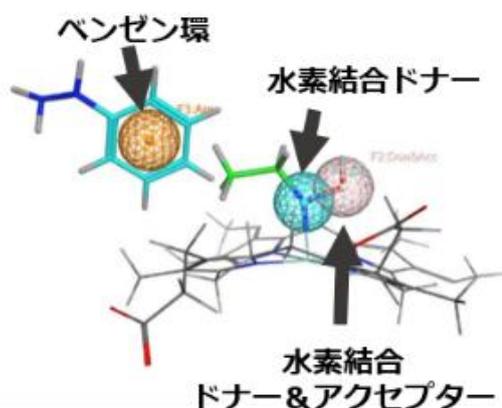


図 8 *in silico* スクリーニング（ファーマコフォアサーチ）に用いた HAO の基質結合ポケット

## 農薬②: ALS 阻害型の除草剤の創薬

### ～構造解析で抵抗性変異を回避する～

#### 除草剤標的タンパク質 アセト乳酸合成酵素 (ALS)

ALS は、ロイシンなどの分岐鎖アミノ酸の生合成経路においてアセト乳酸を合成する植物に必須の酵素です。また、この酵素自体が動物には存在しないため、この酵素を標的とした農薬は安全性の高い農薬となりえます。実際、1970年代からスルホニルウレア系除草剤をはじめとする ALS を標的とした除草剤は 40 種以上開発されており、除草剤の中では大部分を占めています。一方、これら既存薬に対する抵抗性雑草の出現が深刻となっており、その原因は ALS を構成するアミノ酸残基の点変異とされています。そのため抵抗性雑草対策剤として、変異型 ALS に効果のある新規化合物が望まれています。

#### 結晶構造を利用した *in silico* スクリーニング

本研究では既存薬とは異なる化合物骨格を持つ新規ケモタイプの化合物創出を目指し、効率的に薬剤探索を行う *in silico* スクリーニングとして、市販化合物データベース約 1000 万種に対するドッキング・シミュレーションを実施しました。このシミュレーションに先立ち、既知農薬-ALS 複合体結晶の情報を利用しました。既に Protein Data Bank (PDB) 登録されている ALS 構造はありましたが、まだ 30 種類以上の市販剤との複合体構造が決定されていませんでした。ドッキング・シミュレーションの精度向上のためには、より多くの複合体構造が必要であると考え、まず ALS-リガンド複合体の構造解析を行うことにしました。複合体構造の解析実験には、自動化により迅速なタンパク質結晶化・X線回折実験・データ解析処理が可能な『SPRing-8 リガンドスクリーニングパイプライン (理化学研究所 放射光科学研究センター)』を活用し、一挙に 15 種類の新規複合体構造を決定しました (図 9)。これら構造データをもとに *in silico* スクリーニングの条件検討を行い、各剤の結合様式を再現することに成功しました。こ

のようにして確立した条件を用い、約 1,000 万化合物に対する大規模スクリーニングを実行しました。

#### 酵素及び植物を使用した試験

*in silico* スクリーニングの結果から実際に化合物を約 300 種用意し、酵素に対する阻害活性と植物に対する生育阻害活性を確認しました。その結果、酵素と植物の両方に効果を示す新規の農薬リード化合物を複数見出すことに成功しました。また、変異型 ALS を使用した試験により、重要な抵抗性変異型 ALS にも野生型と同等の阻害活性を示すことが分かりました。

#### 新規リード化合物との複合体結晶構造解析

酵素に対して高い阻害活性を示す新規化合物が得られたため、ALS との複合体結晶構造解析を実施しました。その結果、既存薬とは異なる結合様式であることが明らかになり、そのことが抵抗性変異型 ALS に対しても効果を示す要因であることが判明いたしました。これにより、さらなる合成展開の方向性が明確になりました。

(本研究は、株式会社 Preferred Networks 様、理化学研究所 放射光科学研究センター様との共同研究として行われました)

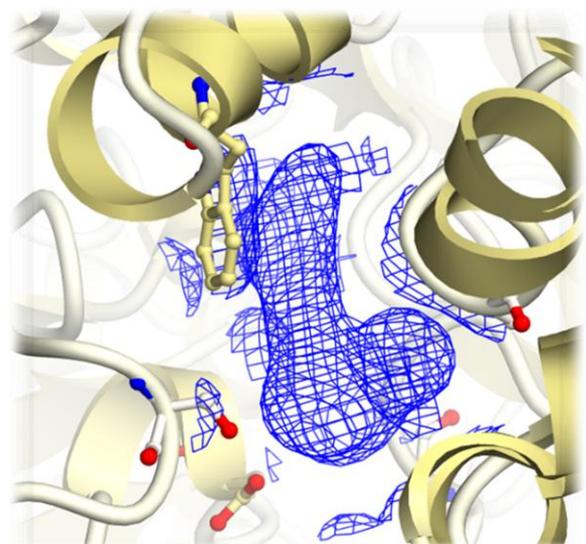


図 9 X線結晶構造解析法により決定した ALS と阻害剤の複合体結晶構造 スティックモデル：除草剤抵抗性に関わるアミノ酸残基側鎖、電子密度マップ：阻害剤

# 6. アグロデザイン・スタジオの構造解析実績

## 豊富なビームタイム

当社は自社創農薬のために放射光施設での豊富なビームタイム（測定時間）を利用してきました（図 10）。また、放射光施設の SPring-8、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (PF)、あいちシンクロトロン光センター（AichiSR）を日常的に利用しており、（図 11）お客様のご要望に応じてスイス国 Swiss Light Source (SLS)、フランス国 European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) のビームタイムも手配することが可能です。さらに当社

は AgroBox®用（受託サンプル）の測定だけではなく、自社創農薬用にも多くのビームタイムを確保しています。そのため、柔軟なビームタイム分配が可能となり、測定スケジュールの変更や急な測定需要増などのニーズにも柔軟にご対応可能です。当社では様々な測定プランを通じて、お客様のご要望にお応えします。

## 構造解析実績（すべて自社創農薬用）

### 【X線結晶構造解析】

期間：2022年4月～2023年3月

測定時間：334時間

（別途PFで229枚の *in situ* プレート測定）

Pin数（結晶数）：2219本

新規構造：163（変異体、ligand 違い含む）

最高分解能：0.83 Å（SP8 BL41XU）

使用施設：SPring-8、KEK/PF、AichiSR

### 【クライオ電子顕微鏡構造解析】

期間：2022年4月～2023年3月

構造決定数：2

最高分解能：1.7 Å（岡崎生理研 TITAN Krios G4）

使用施設：岡崎生理研、KEK、SPring-8

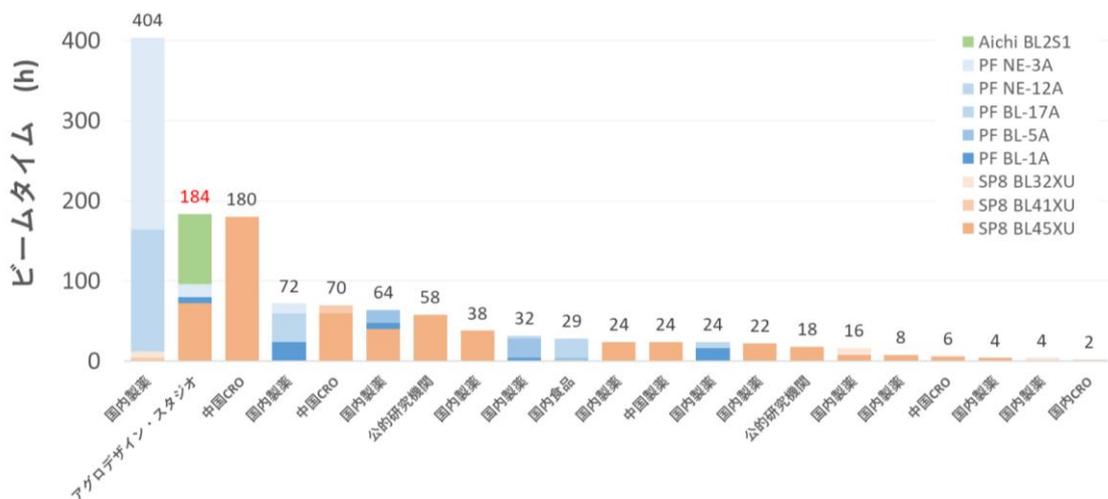


図 10 国内放射光ビームライン成果占有(商用)測定時間数（2022年8月～12月）※公知情報より当社調べ

**利用可能な放射光施設**

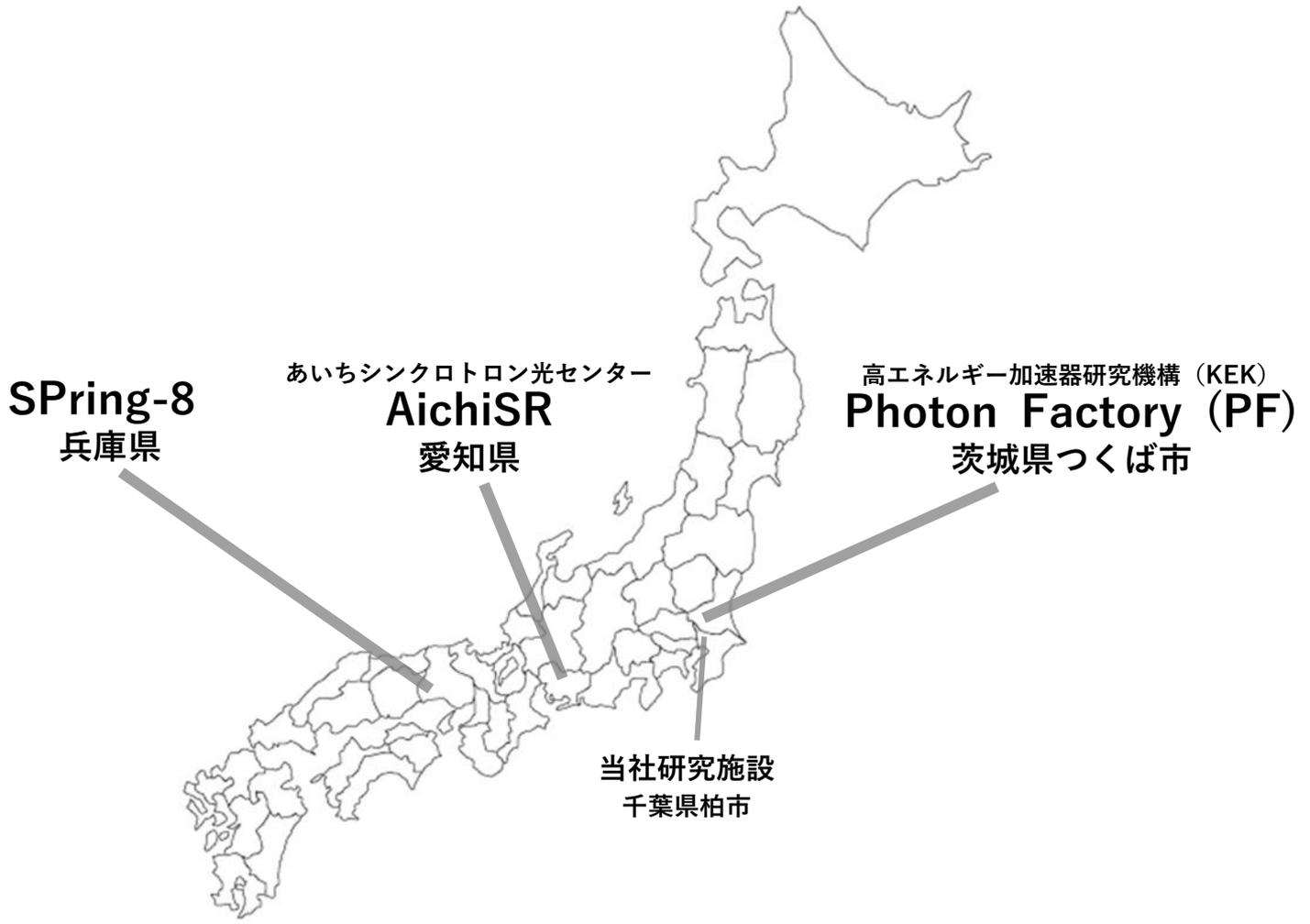


図 11 利用可能な放射光施設 (国内 3 施設)

## 豊富な構造解析の実績とノウハウ

当社には複数の構造生物学研究者が在籍しており、多岐に渡るタンパク質の結晶構造解析のノウハウを有しております。当社研究者には、放射光施設での研究経験を有する者も在籍しており、各放射光施設との共同研究も盛んに行っております。こうした豊富な実績とノウハウにより、X線結晶構造解析のあらゆるトラブルシューティングに対応することが可能です。

さらに当社の特徴として、農薬（分子標的農薬）の自社創薬を構造ベース創薬手法（SBDD）で行っていることがあげられます。医薬も農薬もSBDDにおいて同様なことが実施されるため、自社創薬の経験をもとに、創薬に適した構造解析の方法をご提案できます。

### 当社の特徴

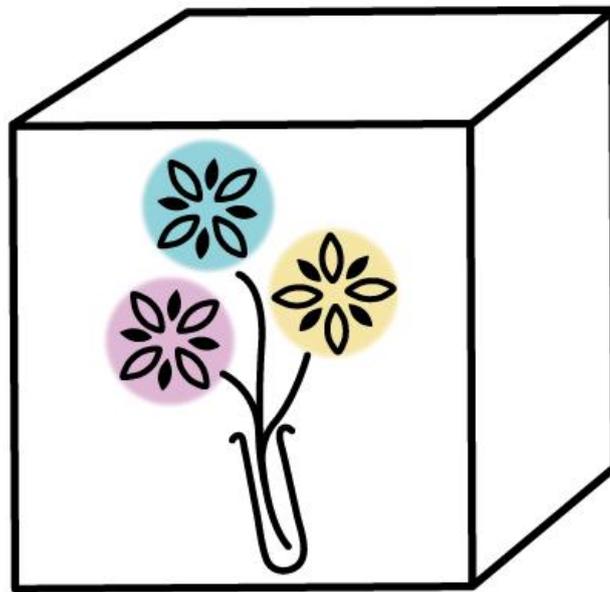
- 自社創薬研究としてSBDDを実施  
タンパク質発現から構造解析、薬剤設計、相互作用解析まで可能（※現在、構造解析のみサービス提供中です）
- 自社創薬の経験から、創薬に適した構造解析手法をご提案可能
- 多様なタンパク質などに対応可能
  - ✓ 可溶性タンパク質
  - ✓ 抗体
  - ✓ 膜タンパク質（LCP結晶化は別途お問合せ）
  - ✓ 糖タンパク質
  - ✓ 核酸-低分子複合体
- 当社で実施実績のあるタンパク質構造解析手法
  - ✓ X線結晶構造解析
  - ✓ クライオ電顕解析（別途お問合せ）



研究画像ギャラリー：SPring-8の上空からの写真（羽田⇒岡山便）2024年4月当社撮影

# AgroBox<sup>®</sup>

タンパク質/核酸の結晶構造解析  
フルサービス



# I. AgroBox®フルサービス 構造解析をパッケージ化

## スタンダードなタンパク質構造解析作業をパッケージ化

AgroBox®は、タンパク質/核酸の X 線結晶構造解析に必要な作業をパッケージ化したサービス（受託解析）です。AgroBox®は、定められたプロトコールに従って実験作業を進め、データを返送いたします。AgroBox®の手法は、当社が自社創農業用に行っている構造解析の最もスタンダードな（成功率の高い）方法になります。AgroBox®は定額料金となっており、遭遇することの多いトラブルにも追加料金なしでご対応いたします。ご要望が多い解析目的に合わせたセットも用意しております。そのため、お客様側での細かいオプションの指定や、事前の研究計画策定や個別見積が不要となります。また AgroBox®は、個別 Box（作業内容）ごとに分割されており、ポジティブな結果が得られない場合は、途中で中止することも可能です。そのため、お客様は精製したタンパク質/核酸サンプルを当社に送るだけで構造解析が手軽に始められます。

## 構造生物学者を雑用から解放

AgroBox®は、当社の構造生物学者が日々悩まされ、そして効率化してきた書類仕事やルーチンワークのノウハウの塊です。タンパク質構造解析のために必要な作業として、放射光施設への課題申請、放射光施設との契約、ビームタ

イムの確保、測定日に合わせた実験スケジュール調整など、専門家でなければできない煩雑な仕事が山ほどあります。これら作業が、本来の仕事であるクリエイティブな研究活動への専念を難しくしています。AgroBox®ならサンプルを送るだけ。煩雑な仕事は当社にお任せください。AgroBox®は、煩わしい書類仕事やルーチンワークから構造生物学者を解放します。

## 国内で完結

AgroBox®でご提供する作業は、一部測定を除き、すべて日本国内で実施しています。構造解析を行う CRO(受託会社)は海外にも存在しますが、海外 CRO の利用には、サンプル受渡しの困難さ、言語の壁、時差によるオンラインミーティングの難しさ、契約作業の難しさ、商習慣の違い、情報漏洩の懸念、為替変動リスクなど様々な困難があります。AgroBox®をご利用いただければ、すべての作業が国内で完結します。実験作業は、千葉県柏市の当社ラボおよび当社が直接契約している日本国内の放射光施設 [ 兵庫県 SPring-8、愛知県 AichiSR、茨城県つくば市高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (KEK PF) ] にて実施します。

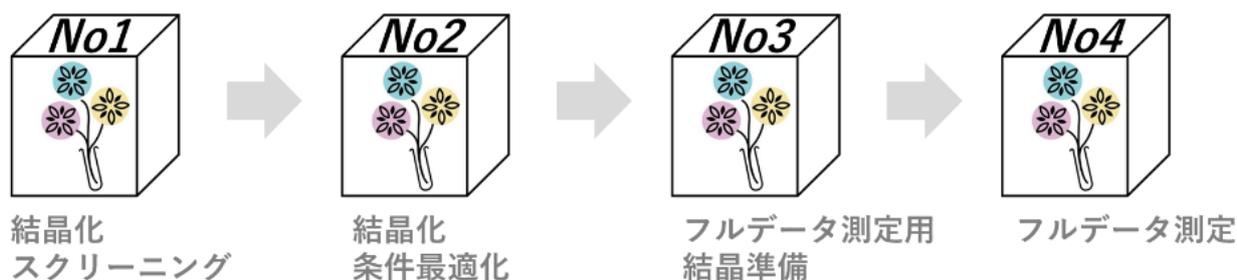


図 12 AgroBox®フルサービス概説

### 知財はすべてお客様に帰属

AgroBox®は、あらかじめ定められたプロトコールに従い、作業を行うサービスになります。よって、当社が知財を主張することはなく、得られた成果は、お客様に帰属します。

※注：タンパク質立体構造情報そのものは単なるデータであるため、特許法上の発明に該当しないとの見解が日・米・欧の三極特許当局から出ております。

参考文献1 特許庁 特許・実用新案審査基準 第七部 特定技術分野の審査基準  
参考文献2 最近の日米欧の三極比較研究とタンパク質 立体構造関連発明の審査運用  
[https://system.jpaa.or.jp/patents\\_files\\_old/200304/jpaapatent200304\\_028-038.pdf](https://system.jpaa.or.jp/patents_files_old/200304/jpaapatent200304_028-038.pdf)

(なお、当社がお客様のために発明の考案を行うことは、AgroBox®のサービス内容に含まれておりません。AgroBox®はタンパク質構造解析におけるルーチンワークを受託サービス化したものであり、当社が納品するのはデータそのものです。一方で、お客様に納品したデータはお客様単独で帰属

されるため、そのデータをもとに発明を行うことが可能です。もちろん、当社がお客様の情報を無断で利用して発明を行うことはございません。)

### 決して安くはないかもしれません

AgroBox®は、タンパク質構造解析の最安価格ではないでしょう。しかし、データの質、早さ、そして手続きの簡便さには自信があります。お客様の手間が最小限になるように設計しておりますので、浮いた時間でよりクリエイティブな仕事に専念していただけます。

## 2. AgroBox®フルサービスファミリー

AgroBox®の基本パッケージは、以下から構成されます。AgroBox®をセットでご購入いただく事で、一連の構造解析が実施可能です(次ページ参照)。さらに各 AgroBox®には、基本 Box に加え追加 Box もあり、お客様のニーズに合わせて、ご選択が可能です(通常は基本 Box のみで十

分です)。各 AgroBox®の基本 Box は同料金(1box 料金単位)であり、追加 Box はその半額(0.5box 料金単位)に設定されています。ただし、一部例外もありますので、詳しくは、本パンフレットの各 AgroBox®の詳細説明ページや別紙の料金表をご覧ください。

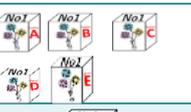
## 現在販売中の AgroBox®

### 【AgroBox®結晶構造解析】

- AgroBox® No.1 結晶化スクリーニング
- AgroBox® No.2 結晶化条件最適化
- AgroBox® No.3 結晶作成、クライオ条件検討
- AgroBox® No.4 フルデータ測定
- AgroBox® No.5 X線回折データ処理&データの質判定
- AgroBox® No.6 分子モデリング
- AgroBox® No.7 リガンド複合体構造解析(2box 料金単位が必要)
- [AgroBox® Pro α 実験位相決定]



## ・AgroBox<sup>®</sup> 結晶構造解析フルサービス 一覧 (タンパク質)

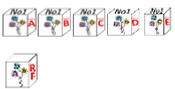
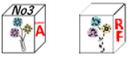
AgroBox <sup>®</sup> 結晶構造解析		内容	必要 Box 単位	お客様にご用意いただくもの	
				タンパク質溶液 (10 mg/mL 推奨)	その他
No.1	基本	 結晶化スクリーニング 960 条件 (基本 10 キット)	1box	125 μL	
	追加	 [選択 Box A~E] 各 480 溶液条件 (480 条件=96 条件×5 結晶化キット)	0.5box	125 μL (追加 Box 毎)	
No.2	基本	 結晶化条件最適化 溶液条件 96 種	1box	30 μL	
	追加	 [A] 溶液条件 96 種追加毎 (プレート 1 枚分)	0.5box	30 μL	
No.3	基本	 フルデータ測定用結晶準備 結晶 32 個まで凍結保存	1box	50 μL	
	追加	 [A] 結晶 16 個追加 (Uni-Puck 1 個)	0.5box	50 μL	
No.4	基本	 フルデータ測定 結晶 32 個まで測定	1box		
	追加	 [A] 結晶 16 個追加 (Uni-Puck 1 個)	0.5box		
No.5	基本	 X 線回折データ処理 結晶 32 個まで処理	1box		
	追加	 [A] 結晶 16 個追加毎 (Uni-Puck 1 個)	0.5box		
No.6	基本	 構造モデリング 創薬グレード (活性部位周辺残基の精密化)	1box		【データ】 ・配列情報
	追加	 [A] 論文グレード (すべてのアミノ酸残基の精密化) PDB 登録もサポート	2box		
No.7 ※No.3-5 実施済 対象	基本	 リガンド複合体構造解析 2 化合物 結晶化からモデリングまで 共結晶とソーキングの両方検討含む (96 穴プレート 1 つ、Uni-Puck 1 個)	2box	30 μL	【データ】 ・配列情報 ・化合物情報 (SMILES 形式) 【物品】 ・DMSO 溶解化合物 (20 mM 以上推奨)
	追加	 [A] 追加複合体解析 4 化合物 共結晶またはソーキングのどちらかの手法 (96 穴プレート 1 つ、Uni-Puck 1 個)	2box	30 μL	
Pro α	-	 実験位相決定 (新規フォールド)	個別 見積	事前確認が必要になります。	
Pro FBDD	-	 フラグメント化合物スクリーニング	価格表 参照	事前確認が必要になります。	
Pro FSEC	① ②	 FSEC 8 種分析	価格表 参照	細胞ペレットのご送付の場合は、 別途膜画分抽出オプションが必要です	

・ AgroBox<sup>®</sup> No.7 の化合物情報の提供を望まない場合は、タンパク質モデリングまで当社で行い、化合物モデリングをお客様で行っていただく事も可能です。

・ AgroBox<sup>®</sup> No.7 の追加 Box B (96 穴プレート)、追加 Box C (384 穴プレート) のご購入を希望されるお客様は、個別対応いたします。お問い合わせください。

・ 1box あたりの金額は、別途 Web 掲載の価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)

# ・AgroBox® 結晶構造解析フルサービス 一覧 (核酸)

AgroBox® 結晶構造解析		内容	必要 Box 単位	お客様にご用意いただくもの	
				核酸溶液	その他
No.1	基本	 結晶化スクリーニング 960 条件 (基本 10 キット)	1box	※要相談	
	追加	 [選択 A~E]溶液条件 480 種 (結晶化キット 5 種追加) [RF]RNase Free 対応	0.5box	※要相談	
No.2	基本	 結晶化条件最適化 溶液条件 96 種	1box	※要相談	
	追加	 [A]溶液条件 96 種追加毎 (プレート 1 枚分) [RF]RNase Free 対応	0.5box	※要相談	
No.3	基本	 フルデータ測定用結晶準備 結晶 32 個まで凍結保存	1box	※要相談	
	追加	 [A]結晶 16 個追加毎 (Uni-Puck 1 個) [RF]RNase Free 対応	0.5box	※要相談	
No.4	基本	 フルデータ測定 結晶 32 個まで測定	1box	※要相談	
	追加	 [A]結晶 16 個追加毎 (Uni-Puck 1 個)	0.5box	※要相談	
No.5	基本	 X 線回折データ処理 結晶 32 個まで処理	1box	※要相談	
	追加	 [A]結晶 16 個追加毎 (Uni-Puck 1 個)	0.5box	※要相談	
No.6	基本	 構造モデリング 創薬グレード (活性部位の塩基/アミノ酸残基の精密化)	1box	※要相談	【データ】 ・配列情報
	追加	 [A]論文グレード (すべての塩基/アミノ酸残基精密化) PDB 登録もサポート	2box	※要相談	
No.7 ※No.3~5 実施済 対象	基本	 リガンド複合体構造解析 2 化合物(条件検討含む) 結晶化からモデリングまで	2box	※要相談	【データ】 ・配列情報 ・化合物情報 (SMILES 形式) 【物品】 ・DMSO 溶解化合物 (20 mM 以上推奨)
	追加	 [A]追加 4 化合物毎 (Uni-Puck 1 個) [RF]RNase Free 対応	2box	※要相談	
Pro Phase	-	 実験位相決定 (新規フォールド)	個別 見積	事前確認が必要になります。	

- ・ AgroBox® No.7 の化合物情報の提供を望まない場合は、核酸モデリングまで当社で行い、化合物モデリングをお客様で行っていただく事も可能です。
- ・ AgroBox® No.7 の追加 Box B (96 穴プレート)、追加 Box C (384 穴プレート) のご購入を希望されるお客様は、個別対応いたします。お問い合わせください。
- ・ 1box あたりの金額は、別途 Web 掲載の価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)

### 3. おすすめセット (タンパク質の構造解析)

#### おすすめセット蛋白①~③ (タンパク質のみの構造解析/アポ酵素)

##### BoxSet 蛋① 新規の構造解析セット (合計 6 box 料金単位) ※新規リガンド複合体解析にも

これまで構造解析が行われたことのないタンパク質の新規構造解析や、構造既知タンパク質の場合でもリガンドが新規ケモタイプのためインデュードフィットの可能性がある場合に推奨されるセットです。構造未知のタンパク質の場合は、結晶化条件も一切不明であるため、結晶化条件のスクリーニング (AgroBox® No.1) から行う必要があります。このセットでは、AgroBox® No.1~6 をセットにしており、結晶化条件スクリーニング(10キット/960条件)

から構造モデリングまで一連の作業を行います。

##### 基本 Box1~6

要ご準備：タンパク質溶液

要情報提供：タンパク質のアミノ酸配列 (No.6 において)

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



##### BoxSet 蛋② 文献構造再現セット改 (合計 5box 料金単位)

論文で構造が報告されているタンパク質で、AgroBox® またはお客様側で再現性の確認がとっていない場合は、こちらのセットをご使用ください。当社にて論文情報を確認し、それに従い結晶化およびモデリングを行います。なお、以前の文献再現セットには、『No.2 結晶化条件最適化』は入っていませんでしたが、文献記載の結晶化溶液条件そのままでは良好な結晶が出ないことが多く見られたため、現在では pH や塩濃度を調整する No.2 を含めたものを文献再

現セット改としてご提供しております。

##### 基本 Box2~6

要ご準備：タンパク質溶液

要情報提供：文献情報 (アミノ酸配列、結晶化条件)

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



##### BoxSet 蛋③ 既知構造タンパク質の点変異体解析セット (合計 4 box 料金単位)

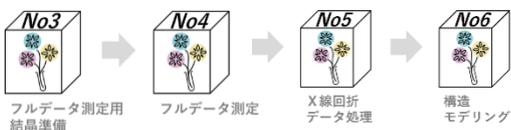
構造既知タンパク質の点変異体の構造解析をしたい場合は、このセットをご使用ください。お客様からご提供いただいた情報をもとに、結晶化およびモデリングを行います。

##### 基本 Box3~6

要ご準備：タンパク質溶液

要情報提供：タンパク質のアミノ酸配列、結晶化条件

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



## おすすめセット蛋白④～⑥ (タンパク質-リガンド複合体の構造解析)

### BoxSet 蛋④ 新規タンパク質構造+リガンドスクリーニング[6化合物分]セット (合計 10 box)

構造解析例がないタンパク質に対して、リガンドとの結合構造解析をしたい場合にご利用ください。まず、新規タンパク質の構造解析を行います。その後に低分子化合物のリガンド (阻害剤など) を添加することにより、タンパク質とリガンドの複合体構造 (リガンドが結合した状態のタンパク質構造) を解析いたします。

基本 Box1~7+追加 Box No.7A

(※BoxSet 蛋①+BoxSet 蛋⑥と同等)

要ご準備: タンパク質溶液、低分子化合物 (阻害剤など)

要情報提供: タンパク質のアミノ酸配列、化合物情報

納品物: 報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



### BoxSet 蛋⑤ 文献タンパク質構造再現+リガンドスクリーニング[6化合物分]セット (合計 9 box 料金単位)

文献などで構造解析例があるタンパク質に対して、リガンドとの結合構造解析をしたい場合にご利用ください。まず、文献情報をもとにタンパク質構造解析を行います。その後に低分子化合物のリガンド (阻害剤など) を添加することにより、タンパク質とリガンドの複合体構造 (リガンドが結合した状態のタンパク質構造) を解析いたします。

基本 Box2~7+No.7 追加 Box A

(※BoxSet 蛋②+BoxSet 蛋⑥と同等)

要ご準備: タンパク質溶液、低分子化合物 (阻害剤など)

要情報提供: タンパク質のアミノ酸配列、化合物情報

納品物: 報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



### BoxSet 蛋⑥ 構造解析済みタンパク質-リガンドスクリーニング[6化合物分]セット (合計 4 box 料金単位)

既に AgroBox®サービス内またはお客様側にて構造解析の経験があるタンパク質に対して、リガンドとの結合構造解析をしたい場合にご利用ください。タンパク質に対して、低分子化合物のリガンド (阻害剤など) を添加することにより、タンパク質とリガンドの複合体構造 (リガンドが結合した状態のタンパク質構造) を解析いたします。

基本 Box7+追加 Box 7A

要ご準備: タンパク質溶液、低分子化合物 (阻害剤など)

要情報提供: タンパク質のアミノ酸配列、化合物情報

納品物: 報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



## 4. おすすめセット (核酸の構造解析)

### おすすめセット 核酸①～④

#### BoxSet 核① 核酸の新規構造解析セット (合計 6.5 box 料金単位)

核酸の新規構造解析を実施します。AgroBox® No.1 の結晶化スクリーニング時に基本 Box の 10 キット加え、核酸に適した追加 Box 1E での結晶化を行います。その後、結晶化条件最適化から構造モデリングまで行います。

**基本 Box No.1~6 + 追加 Box 1E**

要ご準備：核酸、化合物 (ある場合)

要情報提供：核酸配列

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



#### BoxSet 核② 核酸の文献構造再現セット (合計 5 box 料金単位)

構造既知で結晶化条件が論文などで公知な核酸で、AgroBox®またはお客様側で再現性の確認がとれていない場合は、このセットをご使用ください。当社にて論文情報を確認し、結晶化およびモデリングを行います。

**基本 Box No.2~6**

要ご準備：核酸、化合物 (ある場合)

要情報提供：文献情報 (核酸配列、結晶化条件)

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



#### BoxSet 核③ 核酸の新規構造解析+リガンドスクリーニング[6化合物分]セット (合計 10.5 box 料金単位)

構造解析例がない核酸に対して、リガンドとの結合構造解析をしたい場合にご利用ください。最初に1つ構造解析を行った後、最大6個の追加リガンドの構造解析を行います。

**基本 Box 1~7 + 追加 Box 1E, 7A**

要ご準備：核酸、化合物

要情報提供：核酸配列、化合物情報

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



#### BoxSet 核④ 核酸の文献構造再現+リガンドスクリーニング[6化合物分]セット (合計 9 box 料金単位)

文献などで構造解析例がある核酸に対して、リガンドとの結合構造解析をしたい場合にご利用ください。

**基本 Box 2~7 + 追加 Box 7A**

要ご準備：核酸、化合物

要情報提供：核酸配列、化合物情報

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



## おすすめセット 核酸④～⑧ (RNase Free 対応)

### BoxSet 核⑤ RNA の新規構造解析セット (合計 8 box 料金単位)

RNA を含む核酸の新規構造解析を実施します。BoxSet 核①を RNase Free 対応で実施します。

**基本 Box No.1~6 + 追加 Box 1E, 1~3RF**

要ご準備：核酸、化合物 (ある場合)

要情報提供：核酸配列

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



### BoxSet 核⑥ RNA の文献構造再現セット (合計 6 box 料金単位)

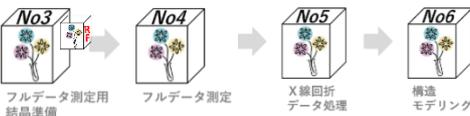
構造既知で結晶化条件が論文などで公知な RNA を含む核酸で、AgroBox®またはお客様側で再現性の確認がとれていない場合は、このセットをご使用ください。BoxSet 核②を RNase Free 対応で実施します。

**基本 Box No.2~6, 追加 Box 2~3RF**

要ご準備：核酸、化合物 (ある場合)

要情報提供：文献情報 (核酸配列、結晶化条件)

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



### BoxSet 核⑦ RNA の新規構造解析+リガンドスクリーニング[6 化合物分]セット (合計 12.5 box 料金単位)

構造解析例がない RNA を含む核酸に対して、リガンドとの結合構造解析をしたい場合にご利用ください。BoxSet 核③を RNase Free 対応で実施します。

**基本 Box No.1~7, 追加 Box 1E, 7A, 1~3RF, 7RF**

要ご準備：核酸、化合物 (ある場合)

要情報提供：核酸配列、化合物情報

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



### BoxSet 核⑧ RNA の文献構造再現+リガンドスクリーニング[6 化合物分]セット (合計 10 box 料金単位)

文献などで構造解析例がある RNA を含む核酸に対して、リガンドとの結合構造解析をしたい場合にご利用ください。BoxSet 核④を RNase Free 対応で実施します。

**基本 Box No.2~7, 追加 Box 7A, 3,7RF**

要ご準備：核酸、化合物 (ある場合)

要情報提供：核酸配列、化合物情報

納品物：報告書、測定データ、MTZ 及び PDB ファイル



## 5. AgroBox®フルサービスご利用方法

### ご依頼から納品までの手順

#### ① 簡易見積り/無料コンサルジュサーサービスご依頼

AgroBox®の必要なサービス (Box セット) をご選択の上、お見積りをご依頼ください。最初の簡易見積書を発行いたします (見積価格は価格表記載の料金と同じです)。

適切な AgroBox®が分からない場合は、当社研究者がサポートさせていただきますので、お気軽にご連絡ください (無料コンサルジュサーサービス)。特に初回ご利用の場合や構造解析に慣れていらっしゃらない場合は、ご利用いただくことを推奨いたします (NDA 締結の上でのご相談も可能です)。コンサルジュサーサービスでは、「できるだけ価格を抑えたい」、「早急にデータが必要なので、スピード重視でできる方法でやってほしい」、「タンパク情報や化合物情報が出せないが、どこまで依頼可能か?」、「海外にサンプルを送ることができないので国内で完結させたい」などの様々なご相談にご対応可能です。また、当社には抗体、低分子医薬との複合体、膜タンパク質、糖タンパク質

など多様なタンパク質や核酸などの構造解析経験のある研究者が在籍しておりますので、構造解析の成功可能性も含めてお答えさせていただきます。

#### ② 実験計画策定 + 基本契約締結

簡易見積書内容とお客様のご要望もとにご相談しながら、実験計画書の策定を行います。基本的に予め定められた実験内容から選択いただけますが、いくつかのオプションがございますので、お客様のご要望 (スピード重視、費用重視など) をもとに、実施する実験を決定いたします。実験計画書の策定が完了いたしましたら、確定版の見積書を発行いたします。

同時に基本契約書の締結を行います。基本契約書は、今後の再発注の際に毎回契約書全文のレビューを行わなくて良いよう、契約の基本部分をまとめたものです。当社にてひな形をご用意しておりますので、ひな形を基にお客様側で修正案をご提示いただき、最終的に合意いたしましたら、契約を締結いたします。

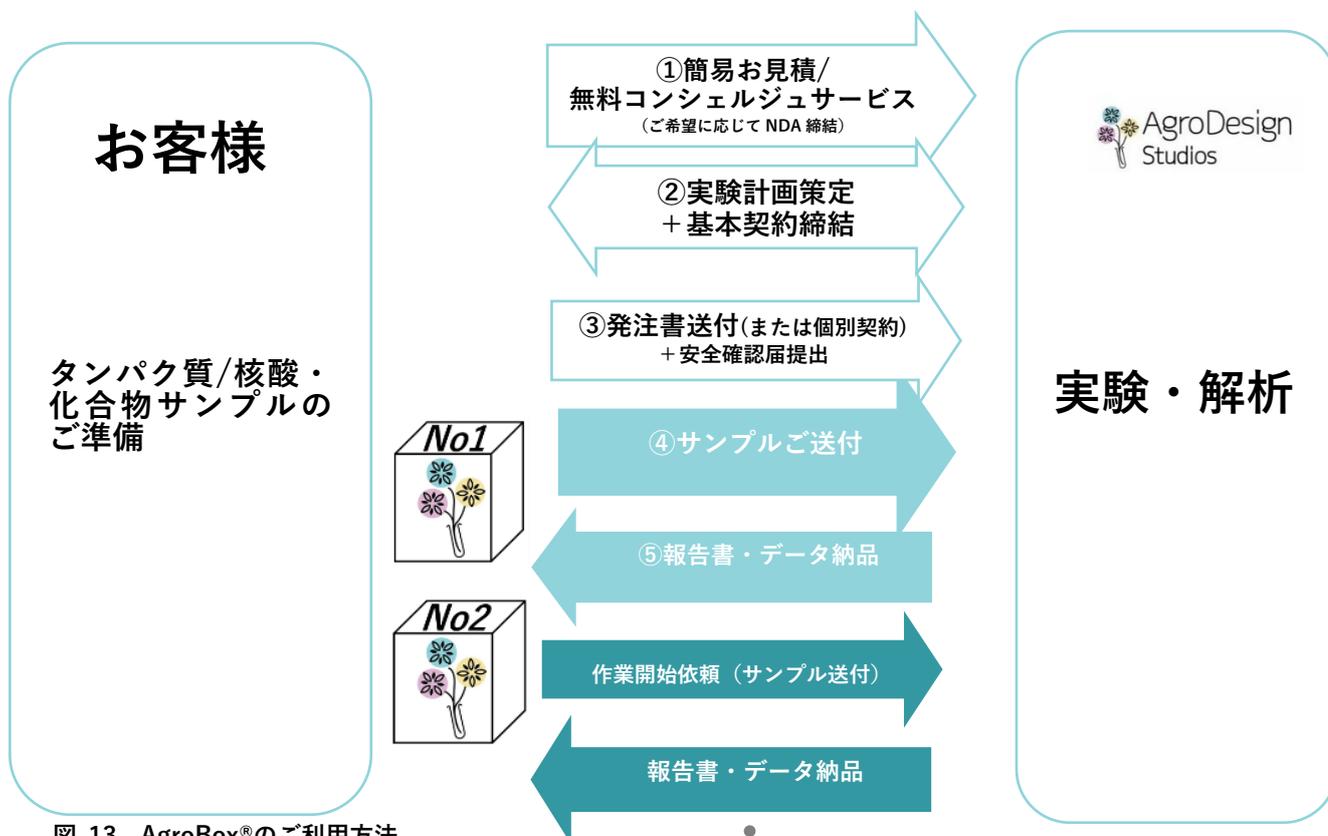


図 13 AgroBox®のご利用方法



### ③発注書送付（または個別契約締結）

発注することが決まりましたら、発注書をご送付ください（ご送付はPDFをメールでお送りいただければ結構です）。当社が発注書受領後、請書（受注確認書）を返送した時点で、発注確定（個別契約締結）となります。なお、お客様のご要望により、個別契約書形式でのご発注も可能です（製本した契約書を2部作り、両当事者が押印するタイプ。または、契約書に両当事者が電子署名をするタイプ）。

### ③ サンプルご送付

タンパク質/核酸溶液は、冷蔵または冷凍にて郵送ください。可能であれば、精製直後のタンパク質/核酸サンプルをすぐに冷蔵にてお送りいただく事をお勧めしております。冷凍する場合は、凍結融解によってアグリゲーションし、沈殿物が生じないか予めご確認ください。送付の際は、一般的な冷蔵または冷凍の宅配便をご利用ください（当社着払いでお送りください）。冷蔵の場合は、保冷剤を入れた発泡スチロールにてお送りください。冷凍の場合は、ドライアイスを入れた発泡スチロールにてご送付ください。タンパク質の濃度は、お客様側で指定の濃度（推奨値 10 mg/mL）まで濃縮していただく事を基本としておりますが、サンプルの性状によっては、低濃度でお送りいただき、当社で限外ろ過濃縮することも可能です。

化合物は、基本的に DMSO に溶解させたものを冷凍で

お送りいただくか、タンパク質/核酸溶液に予め添加した状態でお送りください。複合体構造解析の際には、化合物の濃度が重要になりますので、化合物の性状に関しては事前にご相談ください。

### ④ 報告書・データ納品

各 AgroBox®の作業が終わるごとに報告書、データの分割納品をいたします。実験結果によっては、次の AgroBox® ナンバーには進まずに中止することも可能です（中止した AgroBox®の費用は掛かりません）。

データは、まず報告書 PDF および確認用データ（PDB ファイルなど）を電子メールまたはクラウドストレージ経由で送付いたします。その後、最終納品として、製本された報告書およびすべての電子データを送付いたします。電子データ（測定データは 100 GB 近い容量になります）は、報告書などの PDF および全ての測定生データを新品の記憶媒体（USB メモリ、Solid State Disk (SSD)、ハードディスク (HDD)）に格納して郵送いたします。送付の際には、記憶媒体のデータは暗号化し、解凍パスワードは別送いたします。記憶媒体は、すべて当社で新品のものをご用意し、基本的に日本、韓国、台湾の有名メーカーのものを利用しております。お客様のご希望によっては、任意の形式（CD や DVD など）での納品も可能です。

## 【必要書類一覧】

ご発注に際し、当社がひな形等をご用意し、お客様にご確認（記入または修正）いただく必要がある書類になります。※契約書の締結は、基本的に電子署名とさせていただいておりますが、ご希望により紙（押印）でも可能です。

- (1) 秘密保持契約（事前の無料コンサルジュ時に必要な場合。基本委受託契約を締結している場合は不要です。）
- (2) 見積書
- (3) 実験計画書
- (4) 基本委受託契約書
- (5) 発注書（個別委受託契約書）
- (6) 安全確認届（※次ページ参照）

## 6. サンプルの安全性をご確認ください

ご依頼前にサンプルの安全情報をご確認のうえ、発注時に安全確認届をご提出ください。書類に記載の情報は、必要に応じて実験に利用する放射光施設などへ提供します（お客様の社名、サンプル名が特定できる情報は提供いたしません）。

### 遺伝子組換え生物等（カルタヘナ法）の非該当の確認

カルタヘナ法における「遺伝子組み換え生物等」が含まれないことをご確認ください。カルタヘナ法における「生物等」は、一般的な生物の概念と異なり、ウイルスも含まれます<sup>※1</sup>。バキュロウイルス-Sf9 昆虫細胞発現系などをご利用の場合は、お客様側で遺伝子組換え生物の混入が無いことをご確認ください。確認手法の例として、経産省指針の方法などがあります<sup>※2</sup>（膜タンパク質でない場合、アフィニティー精製を行えば、ウイルスが除去されるため、非該当とみなすと指針が出されております。詳しくは経産省指針によりご確認ください）。

※1 根拠条文

平成十五年法律第九十七号 【遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律】

第二条第一項 この法律において「生物」とは、一の細胞（細胞群を構成しているものを除く。）又は細胞群であって核酸を移転し又は複製する能力を有するものとして主務省令で定めるもの、ウイルス及びウイロイドをいう。』

第二条第二項 この法律において「遺伝子組換え生物等」とは、次に掲げる技術の利用により得られた核酸又はその複製物を有する生物をいう。

第二条第二項一号 細胞外において核酸を加工する技術であって主務省令で定めるもの

第二条第二項二号 異なる分類学上の科に属する生物の細胞を融合する技術であって主務省令で定めるもの

※2 経済産業省指針 バキュロウイルス生産系を用いて生産された試薬の取扱い見直し（2020年11月）

[https://www.meti.go.jp/policy/mono\\_info\\_service/mono/bio/cartagena/detailed\\_info/201200\\_baculo-clarification.html](https://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/mono/bio/cartagena/detailed_info/201200_baculo-clarification.html)

### 病原性サンプル非該当の確認（該当物はお受けできません）

ヒトを含む動物、植物に対する病原性が無いことをご確認ください。病原性サンプルの場合は、AgroBox®をご利用いただく事ができません。

### 放射性物質保有サンプル非該当の確認（該当物はお受けできません）

ラジオアイソトープなどの放射性物質が含まれないことをご確認ください。放射性物質が含まれる場合は、AgroBox®をご利用いただく事はできません。

### 水銀保有の確認

サンプルに水銀/水銀化合物が含まれる場合は、ご申告ください。水銀/水銀化合物の種類や量によってはお受けできない場合がございます。

### 毒劇物の確認

サンプルに毒劇物が含まれる場合は、ご申告ください。毒劇物の種類や量によってはお受けできない場合がございます。毒劇物の一覧は、以下の公的機関のウェブサイトなどをご確認ください。

※参考：国立医薬品食品衛生研究所ウェブサイト

毒物および劇物取締法(毒劇法)トップページ <https://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/dokugeki.html>

毒劇物化合物一覧ページ <http://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/kennsaku.html>

## 安全確認届

株式会社アグロデザイン・スタジオ宛

届出日：202〇年〇月〇日  
対応実験計画書 ID: 〇〇〇

**【届出人】**

住所：  
会社名： (お客様 ID：〇〇)  
担当者：

AgroBox®サービスを依頼するにあたり、提供する実験試料の安全情報を以下に開示します。また、必要に応じて当情報を実験計画書に記載する放射光施設などに提供することを了承します。 ※お客様名やサンプル名が特定可能な情報は提供いたしません。

●提供試料について、以下事項を確認しました。

【以下ご確認の上、チェックをお願いします。チェックが無い場合はお取り扱いできません】

- カルタヘナ法に該当する「遺伝子組換え生物等」(バキュロウイルスなど) は含まれていません
- 病原性サンプルではありません
- 放射性物質は含まれていません

●提供試料中の『水銀 (水銀化合物を含む)』の有無。

【該当する場合は、内容物もご記載下さい。秘密情報に該当する場合は、ひとまず『アルキル水銀化合物』、『新規合成低分子』などご記入ください】

- 水銀を含まない
- 水銀を含む (以下に詳細を記述)

物質名	水銀を含む試料名 (結晶の場合は Uni-Puck 番号)	数量 または Pin 数	備考
例) HgCl <sub>2</sub>	Uni-Puck AGG0001	1 本	5 mM 溶液をソーキング

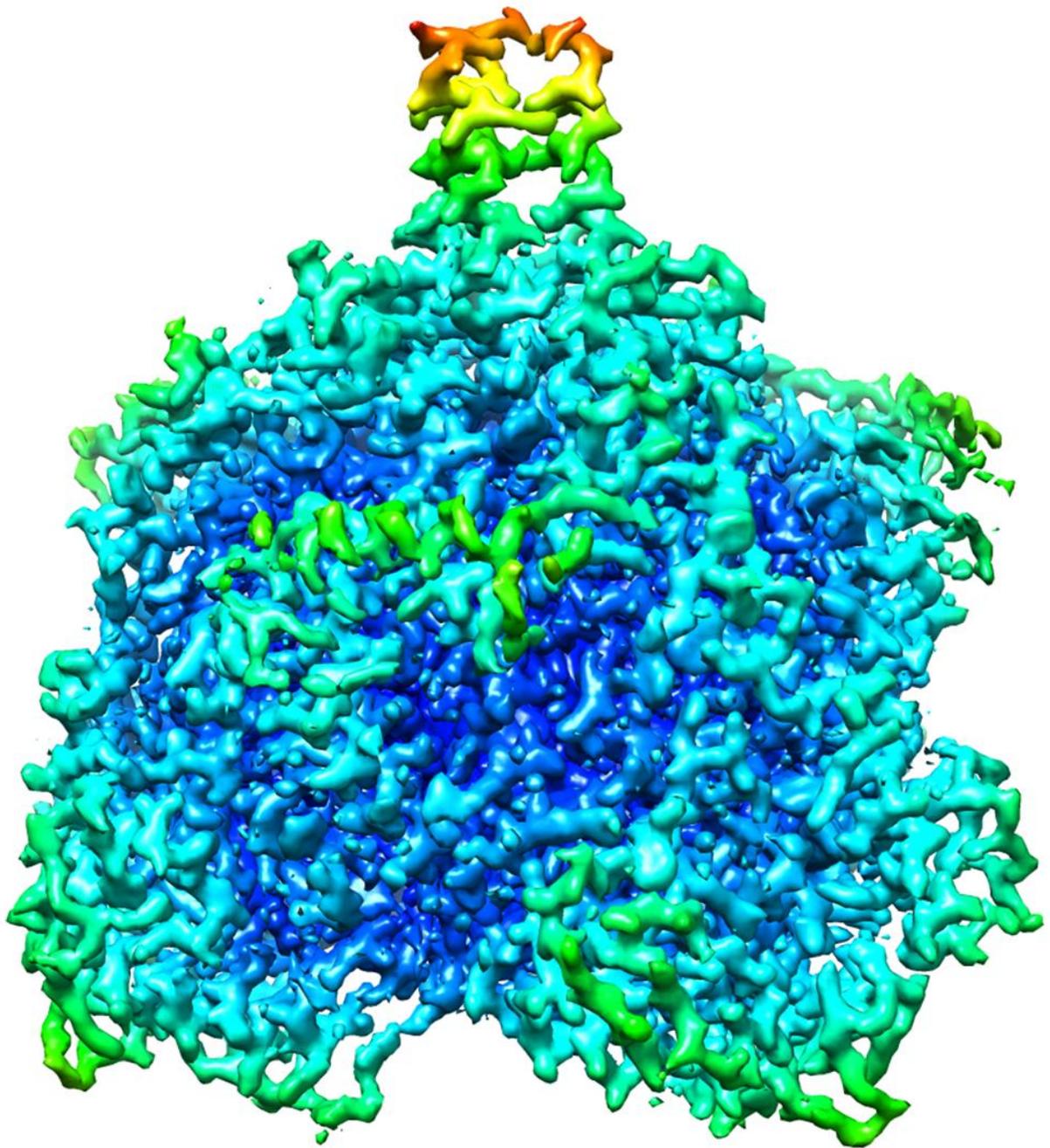
●提供試料中の『毒物及び劇物取締法 (毒劇法)』に該当する毒物、劇物、特定毒物 (以下『毒劇物』と略す) の有無。

【該当する場合は、内容物もご記載下さい】 毒劇物一覧：<http://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/kennsaku.html>

- 劇毒物を含まない
- 劇毒物を含む (以下に詳細を記述)

物質名	毒劇を含む試料名 (結晶の場合は Uni-Puck 番号)	数量 または Pin 数	備考
例) カコジル酸 Na	Uni-Puck AGG0002	1 本	結晶化バッファーを含む

図 14 安全確認届 ひな形

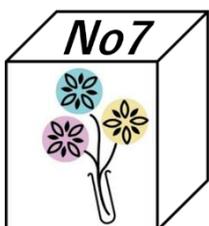
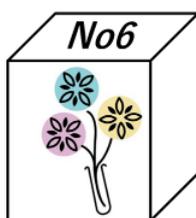
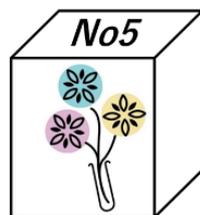
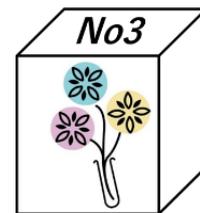
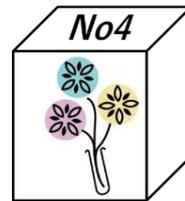
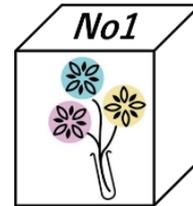


研究画像ギャラリー：農薬ターゲットタンパク質の高分解能クライオ電子顕微鏡構造（1.7 Å）

# AgroBox<sup>®</sup>結晶構造解析

タンパク質結晶化/核酸結晶化

フルサービス内容詳細



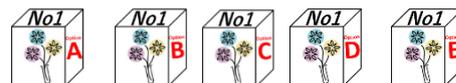
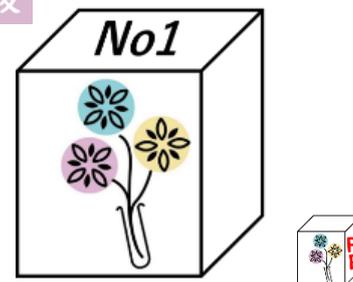
# AgroBox® No.1 改 結晶化スクリーニング

タンパク質 核酸

まずは結晶を見出す

※精製されたタンパク質が必要です。

※核酸 (DNA/RNA) の結晶化も同様に可能です。



## 1. サンプル品質チェック (タンパク質のみ)

結晶化できるかどうかは、サンプルの純度、濃度、性質に大きく依存します。AgroBox® No.1 では、まず簡易かつ重要なチェックとして、UV 計測および SDS-PAGE 解析により、お客様にご提供していただいたタンパク質の純度および濃度の確認を行います (図 15)。この段階でアミノ酸配列情報をご提供頂く必要はありません。純度または濃度が不十分であった場合、直ちにお客様にデータと共にご連絡いたします。本データは、結晶化スクリーニングおよび X 線回折実験の結果の参考データとしても用います。

この段階で結晶化に適さない可能性があるかと判明した場合、結晶化に進むか中止にするか、お客様が選択可能です。中止した場合は、AgroBox® No.1 の見積額の 1/10 の金額の請求となります。なお、単純な濃度不足は十分なサンプル量があれば、当社で濃縮作業 (遠心式限外ろ過フィル

ター)を実施することも可能です (★無料:ただしサンプルロス時の保証はございません)。

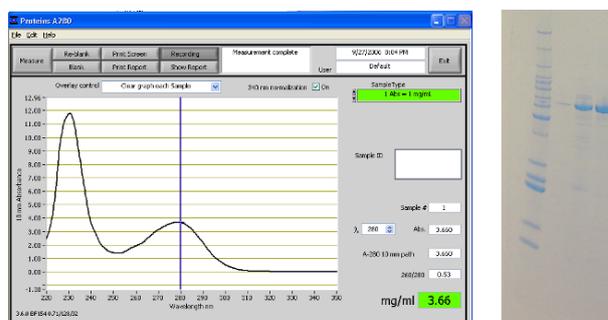


図 15 UV 計測と SDS-PAGE によるタンパク質サンプルの品質チェック

タンパク質はペプチド結合由来の 200 nm 前後と芳香族アミノ酸側鎖由来の 280 nm で吸光度を有する。核酸が夾雑物として存在する場合 260 nm 吸光を示すため、スペクトルから推定できる。

## 2. 一次結晶化スクリーニング

結晶化条件探索実験として、様々な条件の結晶化溶液と高濃度タンパク質/核酸溶液を混合させて、数日から数週間静置します。結晶化溶液は、レポートリー豊富にご用意した市販のスクリーニングキット (表 1) の中から、基本 Box および追加 Box A~E から選択いただきます。20°C、シッピングドロップ蒸気拡散法で結晶化スクリーニング 10 キット分を行います (96×10=960 条件) (※4°Cまたは任意の温度をご希望の方は、別途ご相談ください)。結晶化には結晶化ロボット (SPT Labtech 社製 mosquito) を用います (図 16)。960 条件のスクリーニングには、10 mg/mL

以上の濃度のタンパク質溶液が 125 μL 必要になります (0.20 μL 分注)。※脂質キュービックフェーズ (LCP) 法による膜タンパク質結晶化をご希望の方は別途ご相談ください (別料金)。



図 16 タンパク質結晶化用ナノリッター分注機 mosquito Xtal 3 (SPT Labtech 社製) を用いた結晶化スクリーニング

## 一次結晶化で利用可能なスクリーニング溶液セット一覧（表 1）

	結晶化スクリーニングキット名	サプライヤー	溶液数	製品 No
1	Index	HAMPTON RESEARCH	96 条件	<b>基本 Box (960 条件)</b> 
2	Crystal Screen および 2	HAMPTON RESEARCH	96 条件	
3	PEG/Ion および 2	HAMPTON RESEARCH	96 条件	
4	Wizard Classic 1 および 2	Emerald Bio (RIGAKU)	96 条件	
5	JCSG-plus	Molecular Dimensions	96 条件	
6	MembFac	HAMPTON RESEARCH	合わせて	
	Stura FootPrint Screens	Molecular Dimensions	96 条件	
7	Wizard Cryo 1 および Cryo 2	Emerald Bio (RIGAKU)	96 条件	
8	Protein Complex Suite	NeXtal Biotechnologies	96 条件	
9	PEGs II Suite	NeXtal Biotechnologies	96 条件	
10	MIDASplus	Molecular Dimensions	96 条件	<b>追加 Box A (膜タンパク質の場合利用推奨)</b> 
11	MemGold Eco Screen	Molecular Dimensions	96 条件	
12	MemGold 2	Molecular Dimensions	96 条件	
13	MemStart & MemSys	Molecular Dimensions	96 条件	
14	MemPlus & MultiXtal	Molecular Dimensions	96 条件	
15	JBScreen Membrane 1-4	Jena BioScience	96 条件	<b>追加 Box B (膜タンパク質の場合利用推奨)</b> 
16	MemChannel	Molecular Dimensions	96 条件	
17	MemTrans	Molecular Dimensions	96 条件	
18	PACT Premier	Molecular Dimensions	96 条件	
19	Morpheus	Molecular Dimensions	96 条件	
20	Morpheus II	Molecular Dimensions	96 条件	<b>追加 Box C</b> 
21	Shotgun 2 (SG2)	Molecular Dimensions	96 条件	
22	The BCS Screen	Molecular Dimensions	96 条件	
23	ProPlex Screen	Molecular Dimensions	96 条件	
24	LMB Crystallization Screen	Molecular Dimensions	96 条件	
25	The PGA Screen	Molecular Dimensions	96 条件	<b>追加 Box D (核酸の場合利用推奨)</b> 
26	JBScreen Pentaerythritol 1-4	Jena BioScience	96 条件	
27	HELIX	Molecular Dimensions	96 条件	
28	Natrix & Natrix 2	HAMPTON RESEARCH	96 条件	
29	Nucleix Suite	NeXtal Biotechnologies	96 条件	
30	JBScreen Nuc-Pro 1-4	Jena Bioscience	96 条件	<b>追加 Box E</b> 
31	JBScreen Basic 1-4	Jena Bioscience	96 条件	
32	JBScreen Classic 1-4	Jena Bioscience	96 条件	
33	JBScreen Classic 5-8	Jena Bioscience	96 条件	
34	MPD Suite	NeXtal Biotechnologies	96 条件	
35	The Ligand-Friendly Screen	Molecular Dimensions	96 条件	

※任意のスクリーニングキットをご選択いただくことも可能です（別途ご相談：追加料金）。

### 【スクリーニング溶液おすすめ組み合わせ】

- 可溶性タンパク質通常推奨セット（基本 Box、@20°C）[10 プレート/960 条件]
- 膜タンパク質推奨セット（基本 Box+追加 Box A & B、@20°C）[20 プレート/1920 条件]
- 核酸推奨セット（基本 Box+追加 Box D、@20°C）[15 プレート/960 条件]
- 全部入りセット（基本 Box+追加 Box A & B & C & D & E、@20°C）[35 プレート/3360 条件]
- 温度もパーフェクトセット（基本 Box+追加 Box A & B & C & D & E、@20°C+4°C）[70 プレート/6720 条件]

### 3. 結晶観察

結晶化プレート上の結晶の発生を確認するため、顕微鏡を用いて定期的に観察します。結晶発生は、早くても数日、遅いものでは1か月以上の時間が必要です。また結晶化プレート上には、タンパク質/核酸の結晶だけではなく、結晶と見間違ふ沈殿や、沈殿剤などに含まれる塩の結晶が生じる

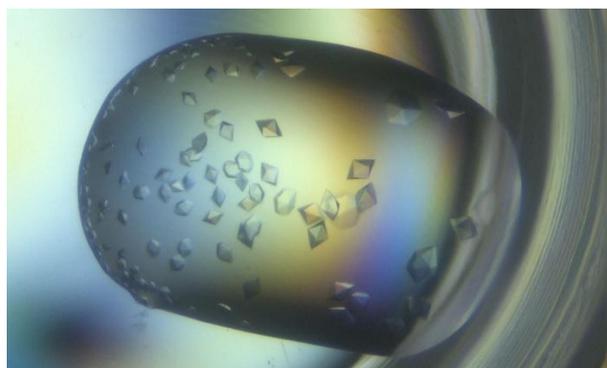


図 17 結晶観察

ことも珍しくありません。当社では、定期的に結晶を写真撮影し、研究者が結晶の判定を行います(図 17)。創薬用の複合体結晶の作成が目的だった場合、結晶の発生に数か月以上かかるような条件は実用的でないため、結晶化のインキュベート時間は最大2か月としております。

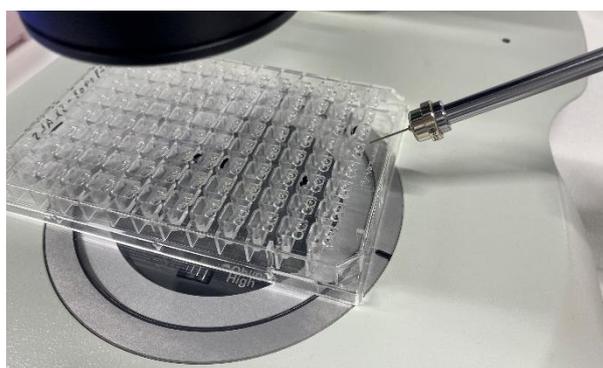
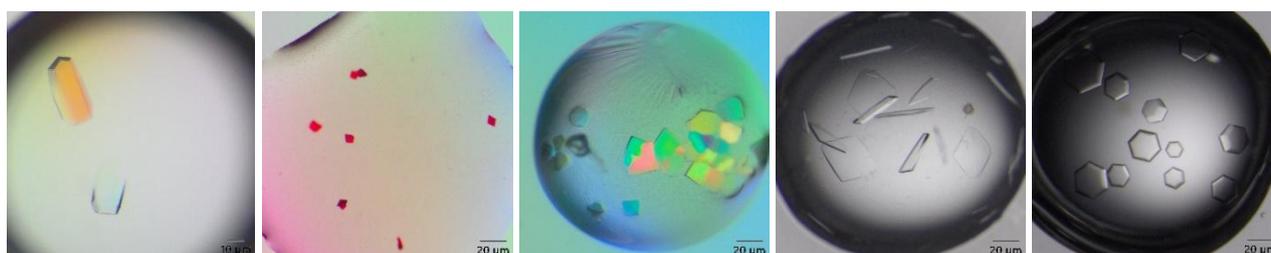


図 18 ループを用いた結晶回収



[タンパク質 A・化合物 A 共結晶] [タンパク質 B・化合物 B 共結晶] [タンパク質 C・化合物 C 共結晶] [タンパク質 D・化合物 D 共結晶] [タンパク質 E・アポ型結晶]

図 19 当社で構造解析に成功したタンパク質結晶

### 4. 結晶が出なかった場合のオプション(別料金)

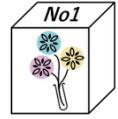
スクリーニングキット 10 種類 (960 条件) の一次スクリーニングで全く結晶が得られなかった場合、スクリーニングキットを追加することも有効です。結晶化プレート上のタンパク質の沈殿状況などから、当社よりどのキットが有望であるかなど、実験計画の提案をさせていただきます。

結晶は生体高分子が規則的に整列して成長するものであるため、結晶化に影響を与える因子として重要なのが構造均一性です。構造均一性においては純度だけでなく、会合状態やフレキシブル領域の影響も考慮に入れる必要があります。アミノ酸配列の情報が必要となりますが、当社研究者の経験と各種ツールによる分析に基づいて安定構

造を得るためのコンストラクションの変更、構造安定化に寄与する低分子リガンドや金属イオンを添加した状態でのスクリーニングなどの提案を行います。タンパク質の濃度設定についても結晶化ドロップ全体の非結晶沈殿の傾向を分析して調整案を出します。また、事前確認の SDS-PAGE で夾雑物や分解物が見当たらなかった場合でも、精製法やタンパク質によっては夾雑物が残って結晶化を阻害している可能性があるため、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーによる追加精製を加え、純度を上げての再スクリーニングで解決する場合があります。



## AgroBox® No.1 サービス内容



### 基本 Box (960 条件) 【1 box 料金単位必要】

結晶化ロボット (Mosquito) を用いて、結晶化実績が豊富な 10 キット (96 ウェルプレート 10 枚分、表 1 参照) による計 960 条件の結晶化スクリーニングを行います。その後、経時的な結晶観察を実施し、良好な結晶を当社研究者が判定します。

#### ご用意いただくもの：

・10 キット (10 プレート) 分の結晶化には、2.5 mg 以上のタンパク質溶液をご用意ください (10 mg/mL を 250  $\mu$ L 推奨) をご用意ください。核酸の場合は別途ご相談ください。  
※ご用意可能なタンパク量が上記条件に足りない場合は、ご相談ください。この半分量でも実施できる可能性があります。

#### 納品物：

・レポート  
結晶観察の結果：生成した結晶の写真データ、詳細な結晶化条件

### 追加 Box A, B, C, D, E (各 480 条件以上追加) 【0.5 box 料金単位必要】

基本 Box に加えて、追加 Box 1 つにつき 480 条件 (9 6 穴プレート 5 枚) の結晶化スクリーニングを追加することができます。結晶化の温度を 4°C に変えることもできます。

#### ご用意いただくもの：

・タンパク質溶液 (10 mg/mL 以上推奨) を 1 プレートあたり 25  $\mu$ L (0.25 mg)。核酸の場合は別途ご相談ください。

#### 納品物：

・レポート  
結晶観察の結果：生成した結晶の写真データ、詳細な結晶化条件

### 追加 Box RF (RNase Free 作業オプション) 【0.5 box 料金単位必要】

RNA を含むサンプルの結晶化には、追加 Box RF (RNase Free 作業オプション) をご利用ください。結晶化は、20°C で長期間 (数日 ~ 2 ヶ月) の長期間のインキュベーションを行うため、RNase がコンタミすると RNA が分解する可能性があります。本追加 Box は RNase Free 条件で結晶化を行うことにより、RNA の分解を防止します。

#### 内容

- ・RNase Free 区画で実験を実施
- ・RNase Free 器具を利用
- ・未開封の結晶化試薬を利用

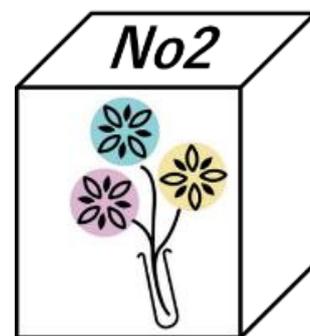
※価格は、別途価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)。

## AgroBox® No.1 タンパク質 2.5 mg 以上 ご用意ください

※ご用意が難しい場合はご相談ください。※核酸はお問合せ下さい

# AgroBox® No.2 改 結晶化条件の最適化

タンパク質 核酸



## 結晶の質を向上させる

※精製されたタンパク質・核酸 (DNA/RNA) が必要です。

### 1. 二次結晶化スクリーニング

一般的に一次結晶化スクリーニング (AgroBox® No.1) だけでは、質の良い結晶を得ることは困難です。そのため、より詳細な結晶化条件を検討する二次結晶化スクリーニングを行います。AgroBox® No.2 では、当社研究者が豊富な経験に基づいて結晶化溶液マトリックス溶液をデザインし、バッファー自動調製システム Dragonfly にて溶液を調整し、結晶化条件探索を行います。

具体的には、一次結晶化スクリーニングの結果に基づき、当社研究者が二次スクリーニングプレートに使用する1プレート分の 96 条件の結晶化溶液マトリックス溶液をデザイン (pH、沈殿剤、塩濃度のパラメーターを細かく変更)

します。その後、結晶化作業と定期的な結晶観察を行います (図 20)。この二次結晶化スクリーニングでは、一次結晶化スクリーニングで見つかった元の結晶化溶液条件 (元溶液) のうち、最大で 4 種類に対して条件最適化を行います (24~96 種の周辺条件/1 種類の元溶液)。結晶化は基本的にシットティングドロップ法で行いますが、当社研究者の判断でハンギングドロップ法を行う場合もあります。結晶化は、通常 20°Cで行います (温度変更は AgroBox® No.3 にて実施)。96 条件のスクリーニングを行うためには、10 mg/mL 以上の濃度のタンパク質溶液が 30  $\mu$ L 必要になります (0.20  $\mu$ L 分注)。

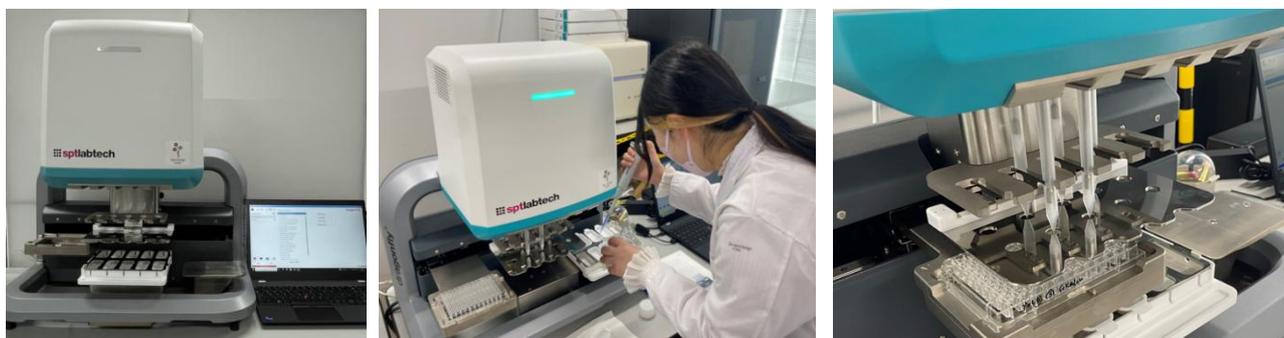


図 20 バッファー自動調製システム dragonfly discovery (SPT Labtech 社製) を用いた結晶マトリックス溶液調製

### 2. 結晶品質チェック (結晶凍結・スナップショット X 回折測定)

一次、二次スクリーニングで結晶が得られても、結晶の「見た目 (大きさや形)」と「質 (分解能や結晶性)」が必ずしも関連しないため、結晶の見た目だけから良い条件を絞ることはできません。もし一次結晶化スクリーニングで結晶が生成した条件が多数あると、条件を絞ることができず、二次結晶化スクリーニングも多くの条件を試す必要があります。そのため、間違った選択をすると、三次、四

次…とスクリーニングのやり直しを繰り返すことになります。外見では困難な結晶の判断の最も確実な方法は、X 線を照射して回折像を確認することです。AgroBox® No.2 では初期スクリーニングの段階で得られた結晶で X 線回折実験を行い、結晶の取舍選択をします。

また、X 線回折実験を行うためには液体窒素による結晶の凍結が必要ですが、このとき問題になるのが氷の結晶で

す。氷の結晶の成長がタンパク質結晶を壊す上、氷結晶由来の回折像が本来のタンパク質結晶回折と重なって解析の妨げとなります。そのため、氷が生じない（非晶質状になる）ように抗凍結剤を添加したクライオプロテクト溶液を作る必要があります。結晶化溶液から異なる溶液に結晶を移動させると、結晶が割れたり、溶けたりすることもあり得るため、できるだけ元の環境に合わせたクライオプロテクト溶液を用意します。結晶を浸潤させたとき、見た目に変化がない場合であっても回折に影響を及ぼすこともあります。そのため、凍結条件をX線回折により確認することは質の良い回折データを得るには重要であり、本番のデータ収集前に行う必要があります。高濃度のPEGが含まれるような結晶化条件では、特別な操作をせずに結

晶凍結へと進みますが、結晶品質チェックに影響があると当社研究者が判断した場合は、結晶化溶液組成を参考に、代表的な抗凍結剤を含むクライオプロテクト溶液へ結晶を浸します。結晶化条件の溶液組成に応じて2-3種類のクライオプロテクト溶液を選択、ループを用いて結晶を浸潤後、回収し、結晶を凍結します。凍結結晶は、SP ring-8、PF、AichiSRの各放射光施設を用いて、クライオ条件下でのスナップショット(0度と90度の2点で測定)により結晶の評価を行います。**※AgroBox® No.2~4をご購入の場合は、スナップショットの回折点検出と同時にフルデータ測定を行うこともあります。**

二次結晶化スクリーニングで得られた結晶は、X線照射にて結晶の質（分解能、回折点の形状、モザイク性など）を確認し、結晶化条件と凍結条件の適否判定をします。

試薬	種別	使用濃度	備考
グリセロール	Polyol	30%程度	
エチレングリコール	Polyol	20%程度	
MPD	Organic, Non-volatile	30%程度	
各種分子量 PEG	Polymer	15-30%程度	結晶化条件に含まれている濃度を上げる
Sodium malonate	Salt	1 M 程度	pH を結晶化条件に合わせて調製
スクロース	Sugar	20%程度	

表 2 抗凍結剤に用いる試薬 結晶化条件に応じてこの中から3種類選びクライオプロテクト溶液を調製します。

## AgroBox® No.2 サービス内容



### 基本 Box (96 条件) 【1 box 料金単位必要】

1プレート(96条件)分の結晶化マトリックス溶液を調製し、一連の条件最適化を行います。本サービスでは、結晶化プレート1枚(96条件)あたり、最大16個の結晶品質チェックを行います。

### 追加 Box A (96 条件追加) 【0.5 box 料金単位必要】

追加で1プレート分(96条件)の結晶化マトリックス溶液を追加することも可能です。本サービスでは、結晶化プレート1枚(96条件)あたり、最大16個の結晶の品質チェックを行います。

### 追加 Box RF (RNase Free 作業オプション) 【0.5 box 料金単位必要】

RNAを含むサンプルの結晶化には、追加 Box RF (RNase Free 作業オプション)をご利用ください。結晶化は、20°Cで長期間(数日~2ヶ月)の長期間のインキュベーションを行うため、RNaseがコンタミするとRNAが分解する可能性があります。本追加 BoxはRNase Free条件下の実験により、RNAの分解を防止します。

#### ご用意いただくもの：

・基本 Box(1プレート)の結晶化のためには、0.3 mg以上のタンパク質をご用意ください(10 mg/mLで30 μL推奨)。核酸の場合は別途ご相談ください。

#### 納品物：

- ・レポート  
結晶観察の結果：結晶が生成したドロップの写真データ  
結晶品質チェック：X線回折写真およびオリジナルデータ

#### 内容

- ・RNase Free 区画で実験を実施
- ・RNase Free 器具を利用
- ・未開封の結晶化試薬を利用

**※価格は、別途価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)。**

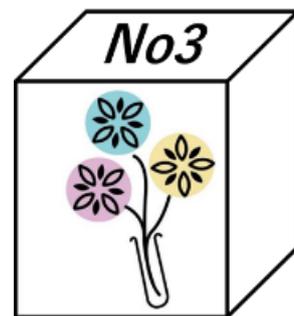
**AgroBox® No.2  
タンパク質 0.3 mg 以上 ご用意ください**

※ご用意が難しい場合はご相談ください。※核酸はお問合せ下さい

# AgroBox® No.3

## フルデータ測定用結晶の準備

タンパク質 核酸



## 測定用結晶の凍結

※精製されたタンパク質が必要です。※核酸 (DNA/RNA) の結晶化も可能です。

※AgroBox® No.3~6 を合わせてご購入することをお勧めします。

AgroBox® No.2 の結果に基づき、測定に必要な良質結晶の量産と凍結保存を行います。

### 1. 三次結晶化スクリーニング

AgroBox® No.2 (二次結晶化スクリーニングおよび結晶品質チェック)の結果に基づいて、本番のフルデータ測定用の結晶を複数個作成します。AgroBox® No.2 の品質チェックにて良い回折像が得られた溶液条件について、最大4条件まで選択します。それらの条件に基づき96ドロップ(合計1プレート分)の結晶化作業および観察を行います。AgroBox® No.3 での結晶化実験は回折フルデータ収集を目的とした結晶の量産を目的としており、二次スクリーニ

ングで得られた結晶をさらに改善させつつ確実に結晶を得る条件の微調整を行います。分解能やモザイク性は結晶の外見からは判断できないため、多めの結晶を用意する必要があります。また本Boxでは、沈殿剤濃度およびpHの勾配やadditive、温度、結晶化ドロップサイズの変更などを最終的な最適化も同時に行います。一般にドロップサイズを大きくすることで結晶サイズも大きくなりますが、それによってまた微妙な条件最適化が必要になるためです。

### 2. 結晶凍結

AgroBox No.3 の基本 Box では、96ドロップ分の結晶を仕込み、そこから生じた結晶最大32個(Uni-Puck 2個分)を測定用に回収します。具体的にはまずAgroBox® No.2の結果をもとに結晶化プレートに沈殿剤条件を調製します。そして、タンパク質と沈殿剤を混合して結晶化ドロップを作製します。その後、定温環境でインキュベートしていきます。インキュベート中は、数日おきに顕微鏡を用いて結晶発生の有無を観察します。十分な大きさの単結晶が生じたら、ループがついたピンで結晶を拾うフィッシング作業に移ります。結晶を成長後も必要以上に長時間インキュベートしていると徐々に劣化していくため、当社研究者の判断で結晶を適切な時期に回収し凍結いたします。凍結作業は、結晶サイズに合わせて適切なサイズのループを用いて顕微鏡下で結晶化を拾い、液体窒素に漬ける作業です。AgroBox® No.2 の結果をもとに最適な抗凍結剤を用いてクライオプロテクト溶液を調製します。結晶を結晶化

溶液からクライオプロテクト溶液に移した後、液体窒素に漬けて瞬間凍結します。

この一連の作業は、熟練の技術と回折実験の知識が必要であり、作業者の経験によって測定結果が変わってきます。タンパク質結晶も一つのドロップに一つ生成するとは限らず、形も様々です。結晶同士が張り合わせる、沈殿の中に生じるなど、回収することが困難なものも頻繁にあります。良質な結晶への物理的なダメージを最小限にしつつ、X線回折測定時に重要な結晶マウント(結晶の向き・数)を考慮して回収する必要もあります。結晶の形状とサイズを考慮して、フルデータ測定 AgroBox® No.4 におけるヘリカルモード測定・マルチモード測定の適用も想定した回収を行います。凍結した結晶は、サンプルピン保管容器(Uni-Puck)に入れた上で、凍結試料搬送容器(ドライシッパー)内で冷凍保存します。



図 21 結晶サンプリング

試薬	種別	使用濃度
MgCl <sub>2</sub>	Multivalent	10 mM
ZnCl <sub>2</sub>	Multivalent	10 mM
Ammonium sulfate	Salt	100 mM
Glycine	Amino Acid	10 mM
L-Proline	Amino Acid	10 mM
Spermidine	Polyamine	10 mM
Urea	Chaotrope	10 mM
ATP	Co-factor	10 mM
TCEP	Reducing Agent	10 mM
Glycerol	Polyol	3%
Trehalose	Sugar	3%
n-Dodecyl-β-D-maltoside	Detergent	0.5%

表 3 Additive に用いる化合物一覧

## AgroBox® No.3 サービス内容



### 基本 Box (96 条件) 【1box 料金単位必要】

1 プレート分 (96 ウェル) の結晶化を行います。(例)結晶化条件数(4 条件) × クライオ条件数(3 種) × 同条件の結晶回数 = 結晶 32 個 (Uni-Puck 2 個分) まで結晶の凍結を行います。

### 追加 Box A (96 条件追加) 【0.5box 料金単位必要】

基本 Box と同様のサービス内容で、結晶 16 個(Uni-Puck 1 個分) の追加準備が可能です。

### 追加 Box RF (RNase Free 作業オプション) 【0.5box 料金単位必要】

RNA を含むサンプルの結晶化には、追加 Box RF (RNase Free 作業オプション)をご利用ください。結晶化は、20°Cで長期間(数日~2 ヶ月)の長期間のインキュベーションを行うため、RNase がコンタミすると RNA が分解する可能性があります。本追加 Box は RNase Free 条件で結晶化を行い、RNA の分解を防止します。

### ご用意いただくもの：

・基本 Box(1 プレート)の結晶化のためには、0.5 mg 以上のタンパク質をご用意ください (10 mg/mL で 50 μL 推奨)。核酸の場合は別途ご相談ください。

### 納品物：

・結晶観察結果のレポート  
サンプリングおよび凍結を行った結晶化ドロップの写真データ

### 内容

- ・ RNase Free 区画で実験を実施
- ・ RNase Free 器具を利用
- ・ 未開封の結晶化試薬を利用

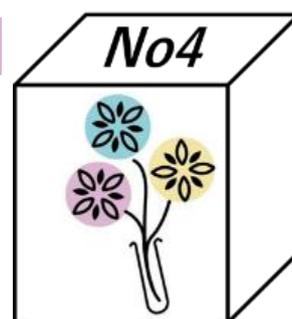
※価格は、別途価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)。

**AgroBox® No.3**  
**タンパク質 0.5 mg 以上 ご用意ください**

※ご用意が難しい場合はご相談ください。※核酸はお問合せ下さい

# AgroBox® No.4 フルデータ測定

タンパク質 核酸



## 放射光施設で回折実験

※必ず AgroBox® No.3 と併せてご利用ください (No3 で準備した結晶が必要です)

※AgroBox® No.3~6 を合わせてご購入することをお勧めします。

※データ測定のみご希望のお客様は、放射光測定サービスをご利用ください (別料金体系)。

AgroBox® No.3 で凍結保存した結晶を使用し、放射光施設での X 線回折実験を行います。回折像の生データをご提供いたします。

### 1. 結晶データ自動測定 (SPring-8、PF)

作成したタンパク質/核酸の結晶は、構造解析のために放射光施設において X 線結晶回折実験を行います。利用可能な放射光施設として、国内の SPring-8 および高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (PF) を主に使用します。また、これら施設の休止期間 (夏期) は、お客様のご要望に応じて AichiSR や海外の放射光施設も利用可能です (別料金)。当社研究者が各サンプルに最適な施設や測定手法を選択します。基本 Box 1 つに対し、結晶保存用カートリ

ッジである Uni-Puck 2 個分 (32 サンプル) の単結晶 X 線回折フルデータの測定を行います。結晶のサイズや数に応じて、通常のシングルモード以外に、放射線損傷を軽減したヘリカルモード (SPring-8 のみ)、複数の結晶を用いたマルチモード (SPring-8 のみ) での測定を実施します。基本的に自動測定モードで行いますが、測定が難しい結晶の場合は、当社研究者の判断でマニュアル操作での測定を実施いたします。

### 2. 夏期期間 AichiSR で測定 (有料オプション)

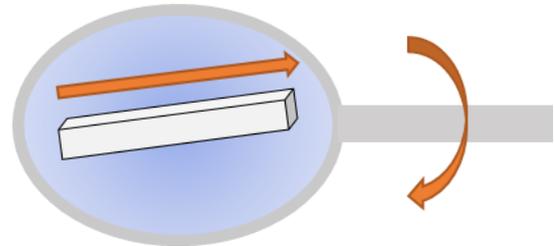
SPring-8 や PF は、夏期期間の長期運転休止期間 (通常 8~10 月上旬) があります。この期間は、お客様のご要望に応じて海外放射光も手配可能ですが、『海外へのサンプル送付は避けたい』という場合は、AichiSR での測定が可能です。SPring-8、PF に比べるとビーム強度は落ちますが、当社実績として  $1.15 \text{ \AA}$  という高分解能での構造決定実績があります (同結晶の SPring-8 での最も良い分解能は  $0.83 \text{ \AA}$ )。創薬用であれば  $2.0 \text{ \AA}$  は十分な分解能と言えますので、AichiSR でも十分に創薬用の構造解析が可能です。既にアポ酵素や他のリガンド結合状態の構造が他放射光施設で解析済みで、その分解能が  $2.0 \text{ \AA}$  を切るような場合は、ご選択ください。



### 3. 大きな結晶：ヘリカルモード測定（無料オプション：SPring-8 のみ可）

結晶サイズが 200  $\mu\text{m}$  以上の場合は、ヘリカルモードでの測定がデータの質向上に有効です。X 線の照射位置を移動させながら測定を行うことで、放射線損傷を軽減させます。これにより、1 か所に X 線を当てて回転測定を行うシングルモードでの測定よりも質の高いデータが期待できます。

通常の測定より時間はかかりますが、追加料金なしでご利用可能です。有効であると当社研究者が判断した場合、このモードを積極的に利用します。

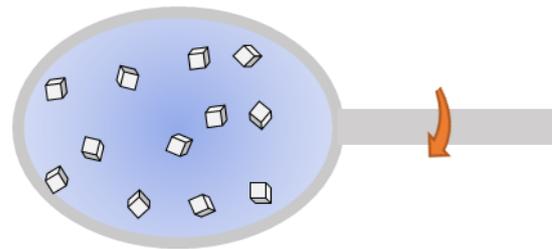


### 4. 小さな結晶：マルチモード測定（無料オプション：SPring-8 のみ可）

結晶サイズが 50  $\mu\text{m}$  未満または複数の結晶がループに回収された場合には、マルチモードでの測定が有効です。ループ 1 つあたり 10~50 個の結晶を乗せた状態で凍結し、各結晶から 10° 分の回折データ収集を行います。その後に各データを統合することで構造解析が可能なフルデータが得られます。この手法を使うことで、従来のシングルモードでは不可能だった小さな結晶からも構造解析が可能です。

SPring-8 では自動測定でも利用が可能です。通常の測定

より時間はかかりますが、追加料金なしでご利用可能です。有効であると当社研究者が判断した場合、このモードを積極的に利用します。



## AgroBox® No.4 サービス内容



#### 基本 Box（結晶 32 個まで）【1box 料金単位必要】

結晶（ループ）32 個まで測定を実施します。測定手法は、結晶に合わせて最適な手法を選択します。

#### 追加 Box A（結晶 16 個追加）【0.5box 料金単位必要】

基本 Box と同様のサービス内容で、結晶（ループ）16 個の追加測定をします。※結晶の準備およびデータ処理のために AgroBox® No.3、AgroBox® No.5 の追加 Box も同数ご購入下さい。

#### ご用意いただくもの：

特にありません（本 Box は、AgroBox® No.3 をご利用いただいた方限定です）

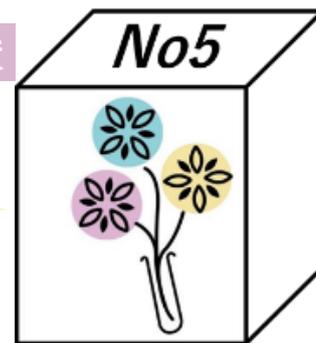
#### 納品物：

- ・ X 線回折実験フルデータ測定のレポート
- ・ 測定に供したループの写真の画像データ
- ・ 測定ループの X 線スキャンのヒートマップ画像データおよび生データ
- ・ X 線回折像フルデータセットの生データ

※価格は、別途価格表をご覧ください（<https://agrobox.jp>）。

# AgroBox® No.5 X線回折データ処理

タンパク質 核酸



データ処理して結晶の質を確認

※AgroBox® No.4 で測定した回折データの処理のための Box です。

※AgroBox® No.3~6 を合わせてご購入することをお勧めします。



放射光施設にて測定した X 線回折データの処理を行い、どの結晶がモデリングに適しているかを報告いたします。各結晶のデータの質について解説した報告書と構造因子 F データ（mtz ファイル形式）をご提供します。

## 1. 自動データ処理

測定した X 線回折データは、各放射光施設に適した方法でのデータ処理が必要です（図 22）。SPRing-8 ビームラインで取得したデータの処理は、自動データ処理ソフトウェア KAMO (ZOO システム内) を利用します。高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (KEK PF) にて取得したデータは、PReMo に内蔵された自動データ処理ソフトウェアを用いて X 線回折データの自動処理を行います。得られた結晶学的パラメータ統計値を当社研究者がチェックし、適切な空間群・分解能での処理結果をご提供します。※自動データ処理ソフトウェアの利用には、各種ソフトウェアライセンスが必要になりますが、当社がソフトウェア

提供組織と契約しており、そのライセンス料相当分は当 Box の価格に含まれます。

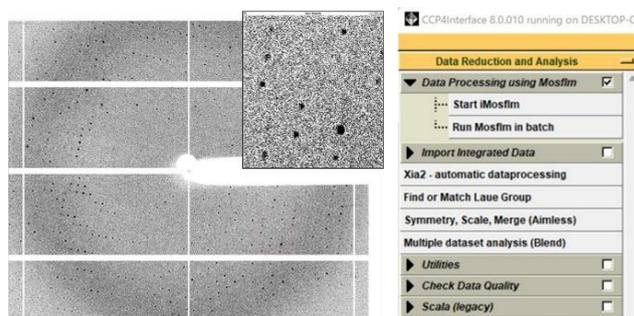


図 22 XDS、CCP4 を用いた X 線回折像のデータ処理

## 2. マニュアルデータ処理

各ビームラインに搭載された自動処理ではうまく処理できない難しい結晶の場合や、さらに高度な処理が必要な場合、XDS、Xia2 などの X 線回折データ処理ソフトウェアを利用し、回折データの選択、同サンプルデータのマージなど、当社研究者によるマニュアル処理を行います。これに

より最も統計値が優れた構造因子 F データをご提供することが可能です。

マニュアルデータ処理が必要な結晶かどうかは実際に測定してみるまで分かりません。そのため、マニュアルデータ処理が必要になっても、追加料金は必要ございません。

### 3. モデリングに適した回折データを選択

最終的に、得られた全データに関して、空間群・分解能などをリスト化及び整理し、各データの質を解説するとともに、どの測定データがモデリング (AgroBox® No.6) を実施するのに適しているかについての見解を述べる報告書

を作成いたします。AgroBox® No.6 もご注文のお客様に対しては、この報告をもとにしてお客様とご相談し、AgroBox® No.6 においてモデリングを行うデータを決定いたします。

## AgroBox® No.5 サービス内容



#### 基本 Box (結晶 32 個まで) 【1box 料金単位必要】

AgroBox® No.4 にて測定した結晶 32 個分まで (Uni-Puck 2 個分) についてデータ処理を実施し、得られた構造因子データをご提供します。結晶 32 個分までは、すべて基本 Box 内でデータ処理します (回折点が現れなかったデータ処理不能な結晶についても 1 個にカウントされます)。

#### 追加 Box A (結晶 16 個まで) 【0.5box 料金単位必要】

基本 Box と同様のサービス内容で、結晶 16 個の追加データ処理を行います。※結晶の準備および測定のために AgroBox® No.3、AgroBox® No.4 の追加 Box も同数ご購入下さい

#### ご用意いただくもの：

- ・特に必要ございません。

#### 納品物：

- ・ X 線回折データ処理の報告書
- ・ 構造因子データ (mtz 形式)
- ・ 回折データ処理のログなど全ファイル

※価格は、別途価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)。



研究写真ギャラリー：ハスモンヨトウ幼虫 (蛾の仲間：重要な農業害虫)

# AgroBox® No.6 構造モデリング

タンパク質 核酸



## 構造を見える形へ

※タンパク質のアミノ酸配列・核酸配列の情報提供が必須になります。

※AgroBox® No.3~6 を合わせてご購入することをお勧めします。

X 線回折データは構造モデリングを行うことで、初めてその立体構造を人が見ることができるようになります。分子置換法により決定した立体構造モデルと電子密度マップをご提供します。

## 1. 分子置換法のためのサーチモデルの準備

タンパク質の立体構造を人の目に見えるようにするためには、位相決定、構造モデリングという作業が必須です。本 Box では、位相決定のために分子置換法を用います。分子置換法は、サーチモデル（類似タンパク質の立体構造情報がある場合や、高精度な構造予測モデル）がある場合に利用可能な方法です。分子置換をするためには、最初に類似タンパク質の構造を用意する必要があります。本 Box では、Protein Data Bank (PDB)に登録されている類似のタンパク質/核酸構造データを探します。この際にお客様よ

りご提供いただいたアミノ酸配列をもとに、PDB データに対して BLAST などを行います（※探索はセキュアな社内サーバにて行います）。分子置換法に利用可能な構造が PDB にない場合は、当社で予測構造を構築いたします。類似構造が全く存在せず、分子置換ができない場合は、実験的な位相決定が必要となり、多大なコストがかかります（AgroBox® Pro Phase で実施が可能です）。もし、お客様で構造決定された類似タンパク質/核酸構造がある場合、必要に応じ、ご提供いただくこともございます。

## 2. 分子置換法による初期位相決定とモデリング

次にサーチモデルを利用して初期位相を決定した後、電子密度マップにアミノ酸などをはめ込んでいきます（構造モデリングおよび構造精密化）。この作業では、CCP4 ソフトウェアスイートを利用します。この作業の後、構造が分子ビューワーにて表示可能となります（図 24）。モデル精密化は手動で調整するため、必要に応じて2つのグレード（創薬グレード、論文グレード）を用意しております。

### 創薬グレード（基本 Box）

基本 Box の分子モデリングでは、薬剤デザインに十分な情報が得られる化合物結合部位周辺（約 15 Å 以内）に絞った構造精密化を行います。結合することが判明している補酵

素や金属イオンなどについては、それらを含めて構造精密化することも可能です（結合部位の情報提供が必要です）。

### 論文グレード（追加 Box A）

論文執筆用（Protein Data Bank 登録用）にタンパク質/核酸全体を含めた高クオリティーな構造精密化を実施します。具体的には、豊富な論文発表経験をもつ研究者が分子全体をモデリングし、ラマチャンドラプロット、MolProbity スコア、*R/R* free 値、Bond length/angle の rmsd 値などの総合的なバリデーションを行います。これにより、論文投稿および PDB 登録が可能なクオリティーのデータをご提供します。PDB 登録サポートも致します。



図 23 当社の構造生物学研究者による構造モデリング

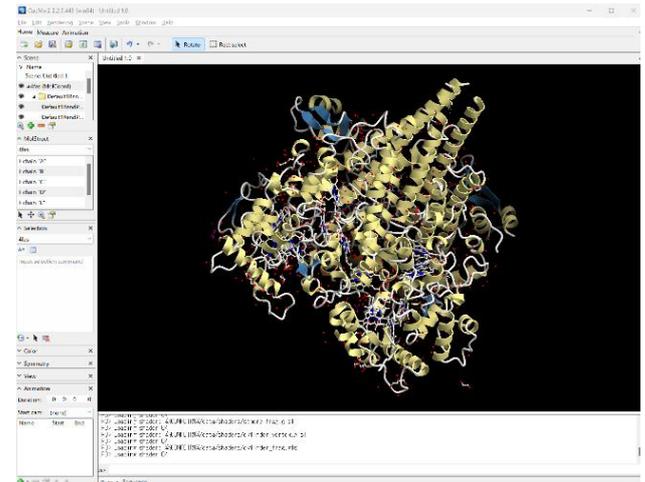


図 24 タンパク質構造の CueMol (<http://www.cuemol.org>) による表示。構造モデリングが完了すると分子ビューワーにて表示可能なファイル形式となる。

## AgroBox® No.6 サービス内容



### 基本 Box（創薬グレード）【1box 料金単位必要】

基本 Box は「創薬グレード」の分子モデリングとして、薬剤デザインに十分な情報を得ることができる化合物の結合部位周辺（約 15 Å 以内）のアミノ酸/核酸の構造精密化を行います。補酵素や低分子化合物が入った構造の場合、これらを含めた構造精密化を行うことも可能です。

ご用意いただくもの：

- ・タンパク質のアミノ酸配列情報/核酸の配列情報

納品物：

- ・構造モデリングのレポート
- ・立体構造モデル（PDB 形式）※活性中心付近を精密化
- ・構造精密化後の構造因子データ（mtz 形式）

### 追加 Box A（論文グレード）【2box 料金単位必要】

「論文グレード」では、豊富な論文発表経験をもつ研究者が分子全体をモデリングし、ラマチャンドラプロット、MolProbity スコア、 $R/R_{free}$  値、Bond length/angle の rmsd 値などの総合的なバリデーションを行い、論文投稿および PDB 登録が可能なクオリティーのデータをご提供いたします。分子全体について構造精密化を進めることで、電子密度マップの改善が期待できます。

注：タンパク質サイズの制限は特に設けておりませんが、超高分子量のタンパク質/核酸に関しては追加料金が発生する可能性があります。

追加サポート内容

- ・構造全体の精密化
- ・PDB 登録サポート

※本 Box は、2 box 料金単位分の料金になります（基本 Box と併せて 3 box 料金単位分の料金が必要です）。

※価格は、別途価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)。

# AgroBox® No.7 リガンド複合体解析

タンパク質 核酸

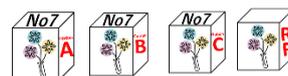


## 創薬に必要なデータ収集

※精製されたタンパク質、およびリガンドとなる化合物の準備が必要です。

※AgroBox® No.1~6 (またはお客様側で同様な解析) 実施済みの場合にご利用可能です。

構造ベース創薬のために、タンパク質-リガンド複合体構造を多数収集します。



## 1. 複合体形成方法の探索(共結晶化&ソーキング)

タンパク質結晶構造を利用した薬剤デザイン(構造ベース創薬:SBDD)を行うための、タンパク質-リガンド複合体構造を取得します。1種類のタンパク質に対し、多種の薬剤候補の低分子化合物を結合させて、各化合物とタンパク質の複合体結晶構造解析を行い、構造モデルおよび電子密度マップをご提供します。基本Boxには複合体結晶の調製条件の探索作業からフルセットで含まれています。複合体結晶構造解析を行うためには化合物が結合した状態の結晶を調製する必要があります。基本Boxでは、まず複合体形成方法の検討から行います。この方法として、①『共結晶化法:先にタンパク質と化合物を混合してから結晶化を行う』と、②『ソーキング法:タンパク質のみの結晶を先に成長させ、後から化合物溶液に浸すことで複合体結晶を得る』の2種類があります。どちらの手法が適切かはタ

ンパク質・化合物によって異なります。①の共結晶化法では、化合物の性質によっては、結晶が形成しない(結晶化条件の再探索が必要)というリスクがあります。また、長時間の結晶化インキュベートをするため、水溶媒中で壊れやすい化合物は、共結晶化ができません。②のソーキング法では、予め作成した結晶に化合物を添加した後、比較的短時間で凍結保存を行います。そのため、結晶化条件の再探索は不要であり、分解しやすい化合物にも適用可能です。しかし、結晶パッキングによっては、化合物がリガンドポケットに届かない(結合しない)可能性があります。

そこで、基本Boxではそれぞれの複合体形成法を試し、どちらが適しているか探索します。追加Boxでは、基本Boxの条件をもとに、ソーキングまたは共結晶構造のどちらかを実施します。

## 2. フルデータ測定からモデリングまで

結晶を作成した後、放射光施設に確保している当社ビームタイムを利用して、複合体結晶のX線回折フルデータ測定を行った後、構造モデリングまで行います(AgroBox No.4~6相当)。当社研究者が結晶のサイズや数に応じて、放射光施設、ビームライン、測定モードの適切な選択を行い、測定を行います。測定後は、AgroBox® No.5, No.6と同様にデータ処理および化合物結合部位周辺(約15Å以内)の構造精密化を行います。なお、ヒット化合物やリード最適

化中の低分子化合物では、電子密度が明瞭に見えない場合も珍しくありません(p11 図7)。そのため、低分子化合物の配置が複数考えられる場合が多々ありますが、当社がご提出する結合モデルは、電子密度のみに基づいて、当社基準に基づいてご提案いたします(※構造活性相関やMDなどの他の情報を加えて複合体モデル構造を考察する場合は、別途コンサルティングプランとしてご提供が可能です。お問合せ下さい)。

## AgroBox® No.7 サービス内容



### 基本 Box (2 化合物まで) 【2 box 料金単位必要】

化合物とタンパク質の複合体結晶の結晶化 (96 穴プレート 2 枚分)、結晶凍結 (例: 2 化合物×4 結晶×2 条件[共結晶またはソーキング]=16 条件)、フルデータ測定、X 線回折データ処理、構造モデリングをフルセットで行います。この際に、複合体結晶条件の探索 (共結晶およびソーキング) も併せて行います。Uni-Puck1 個分 (結晶 16 個) の測定をいたします。

- ・化合物数: 2 種
- ・結晶化手法: 2 手法 (ソーキングおよび共結晶化)
- ・結晶化: 96 穴プレート 2 枚分  
※ハンギングドロップの場合は 48 穴プレートを利用します。
- ・測定: Uni-Puck1 個分 (16 結晶)

**この基本 Box は、2 box 料金単位分の料金になります。**

### 追加 Box A (4 化合物まで) 【2 box 料金単位必要】

共結晶またはソーキングのどちらかの方法で追加化合物最大 4 種の複合体結晶の結晶化 (96 穴プレート 2 枚)、X 線回折実験 (4 化合物×4 結晶=16 個)、モデリングを行います。

- ・化合物数: 4 種
- ・結晶化手法: 1 手法 (ソーキングまたは共結晶化)
- ・結晶化ウェル数: 96 穴プレート 2 枚分  
※ハンギングドロップの場合は 48 穴プレートを利用します。
- ・測定: Uni-Puck1 個分 (16 結晶)

**この追加 Box は、2 box 料金単位分の料金になります。**

### 追加 Box RF (RNase Free 作業オプション) 【0.5box 料金単位必要】

RNA を含むサンプルの結晶化には、追加 Box RF (RNase Free 作業オプション) をご利用ください。結晶化は、20°C で長期間 (数日~2 ヶ月) の長期間のインキュベーションを行うため、RNase がコンタミすると RNA が分解する可能性があります。本追加 Box は RNase Free 条件で結晶化を行

### ご用意いただくもの

- ・タンパク質溶液 (濃度 10 mg/mL 以上推奨)  
基本 Box: タンパク溶液 30  $\mu$ L (タンパク質 0.3 mg)  
追加 Box A: タンパク溶液 30  $\mu$ L (タンパク質 0.3 mg)
- ・DMSO 溶解化合物 10~100  $\mu$ L (20 mM 以上推奨)
- ・タンパク質のアミノ酸配列情報
- ・化合物情報 (SMILES 形式)  
※化合物情報の提供を望まれない場合は、タンパク質モデリングまで当社で行い、化合物モデリングをお客様で行っていただく事も可能です。

### 納品物

- ・結晶調製から構造モデリングまでのフルセットのレポート
- ・立体構造モデル (PDB 形式)
- ・構造精密化後の構造因子データ (mtz 形式)

## ボリュームディスカウント

### 追加 Box B (96 穴プレート)

最大 96 化合物に対して複合体構造解析を行います。対象となるタンパク質は 1 種です。96 穴プレート等に DMSO 溶解化合物をご用意ください。※個別お見積りします。お問合せ下さい

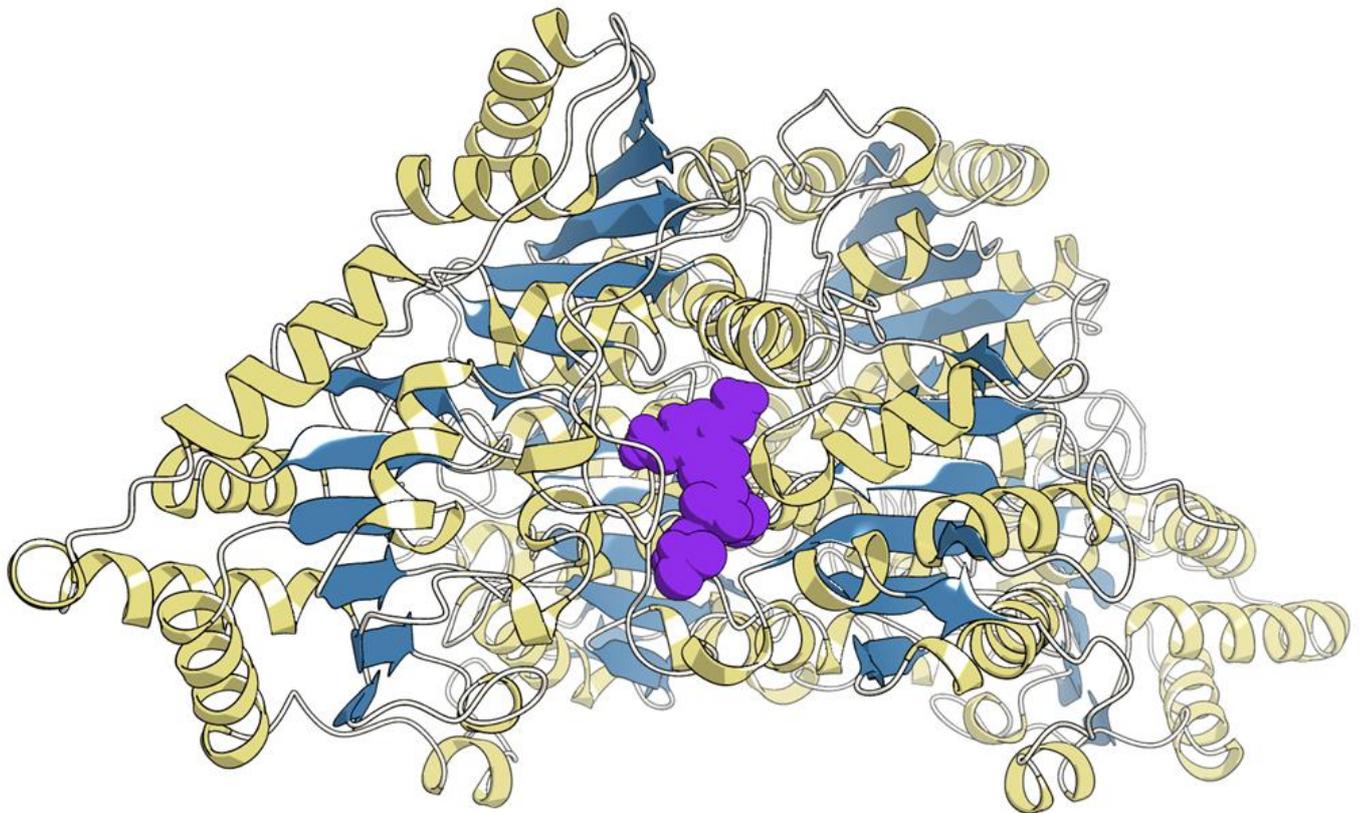
**※価格は、別途価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)。**

### 追加 Box C (384 穴プレート)

最大 384 化合物に対して複合体構造解析を行います。対象となるタンパク質は 1 種です。96 穴プレート等に DMSO 溶解化合物をご用意ください。※個別お見積りします。お問合せ下さい

**AgroBox® No.7  
タンパク質 0.3 mg 以上 ご用意ください**

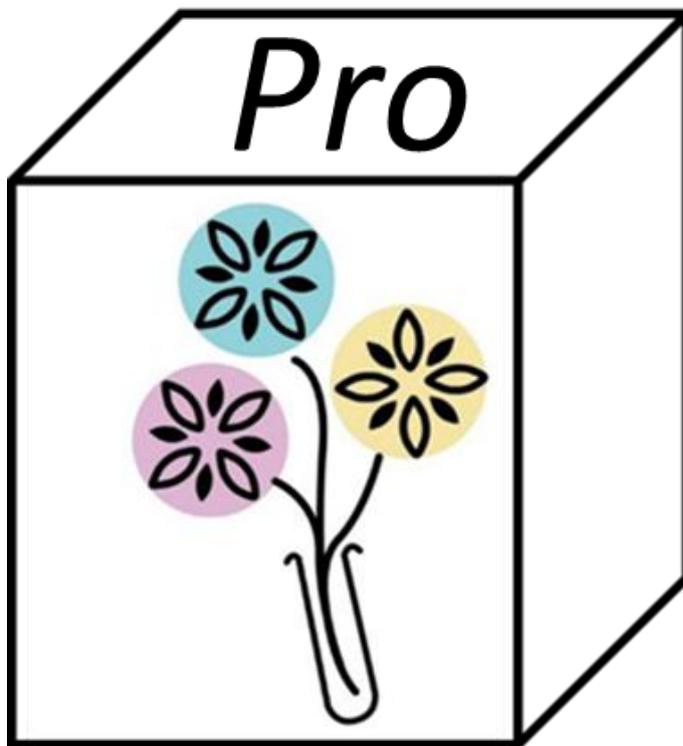
※ご用意が難しい場合はご相談ください。※核酸はお問合せ下さい



研究画像ギャラリー：農薬ターゲットタンパク質と阻害剤

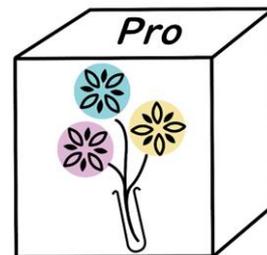
# AgroBox® Professional

(高難度実験用 AgroBox®)



# AgroBox® Pro Phase 実験位相決定

核酸  
タンパク質



## 新規フォールドの決定

※本 Box をご利用希望のお客様は、事前確認と個別のお見積りが必要になります。

Protein Data Bank (PDB) に類似構造が登録されていないような完全に新規フォールドの立体構造の場合、AgroBox® No.6 で実施する分子置換法では構造決定が出来ません。そのため、金属などの異常散乱原子を含んだ結晶から回折データを収集し、実験的に位相決定を行う必要があります。

### 1. 位相問題

モデル構築のために必要な電子密度マップを得るためには、構造因子(位相情報)が必要です。これは位相問題と呼ばれます。分子置換法では、適当な参考構造を元に比較的容易に位相情報を計算することが出来ます。参考構造と実構造が近い場合は、構造モデリング (AgroBox® No.6) が可能な電子密度マップを得ることが出来ますが、2つの構

造(フォールド)が大きく異なる場合は、解釈可能な電子密度マップを得ることが出来ません。この場合、実験的に位相情報を得る必要があります。実験位相決定実験では様々な試行錯誤が伴い、高い技術と豊富なノウハウが必要になります。

### 2. 実験的位相決定手法

新規フォールドの X 線結晶構造解析には、実験的に位相情報を得る必要があります。位相決定には、X 線の異常散乱を利用した複数の手法があり、多波長異常分散法 (Multi-wavelength Anomalous Diffraction method、MAD 法)、単波長異常分散法 (Single-wavelength Anomalous Diffraction method、SAD 法)、Sulfur (Native)-SAD (S-SAD) 法などが代表的な方法です。いずれも結晶中の特定の位置に異常散乱原子が存在していることが必要です。どの手法が適しているかはタンパク質によって異なるため、ご相談しながら検討を行います。当社には、新規フォールドのタンパク質構造の解析実績を有する研究者が複数在籍しており、様々なトラブルに対処可能です。

#### 金属タンパク質の場合 (MAD 法、SAD 法)

鉛・銅・鉄などの金属を含むタンパク質結晶の場合、そのまま MAD 法や SAD 法が適用可能です。

#### 金属タンパク質ではない場合①(結晶に金属を導入)

金属を保有しないタンパク質の場合は、結晶を金・白金・水銀などと共結晶化またソーキングして重金属誘導体結晶を作成することができます。ただし、この手法では多数の良質の結晶が必要です。理由として、回折実験で得られる異常散乱シグナルは小さく、位相決定に十分なデータを得るためには多重度 Multiplicity を大きくとる、つまり多くのデータを同型性が高い複数の結晶もしくは一つの結晶から測定する必要があります。さらに実験位相決定には、金、白金、水銀等の重原子化合物がよく用いられますが、利用可能な重原子化合物は 30 種以上あります。そのため、どの化合物が目的タンパク質に結合するのか確かめるスクリーニングを異常散乱シグナル解析や蛍光 X 線計測などと共に行う必要があります。

#### 金属タンパク質ではない場合②(セレノメチオニン置換体)

金属を保有しないタンパク質に使える2番目の方法として、タンパク質発現時にセレン置換アミノ酸（メチオニンやシステインの硫黄をセレンに置換したアミノ酸）を導入した非天然タンパク質を用いて結晶を作成する方法もあります。この場合、セレンを含むアミノ酸位置を特定できるため、構造モデリングにも有用な情報を得ることができます。

### 3. サンプルの準備

#### 金属タンパク質の場合（MAD法、SAD法）

通常通りの結晶化を行います。

#### 金属タンパク質ではない場合①（結晶に金属を導入）

結晶の重原子溶液ソーキングや重金属原子との共結晶化を行い、異常散乱原子を導入した多数の良質の結晶を得ます。導入する重原子として、使われる頻度の高い、金、白金、水銀から試みます。重原子の導入には出来るだけ高濃度の溶液条件が望ましいですが、結晶破壊やタンパク質変性などの問題が多くあるため、サンプル毎にソーキング条件を調整します。

### 4. 回折実験

導入した異常散乱原子に対応した波長を用いたシンクロトロン放射光での回折実験を行います。MAD法では複数（通常2波長から3波長）の、SAD法では単一の波長（吸収端の波長）での測定を、波長が変更できるシンクロトロン放射光施設にて実施します。どの手法においても異常散乱シグナルを解析し、位相を決定するには通常の測定より

### 5. データ処理からモデリングまで

取得した異常散乱シグナルを含むデータセットを、各種解析ソフトウェア（CCP4、Phenixなど）を用いて処理し、初期位相を決定することで、電子密度マップを描画します。得られた電子密度マップに対して、アミノ酸配列、 $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどの二次構造、重原子の電子密度など

#### 金属タンパク質ではない場合③（S-SAD法）

金属を保有しないタンパク質に使える3番目の方法として、S-SAD法があります。この方法は、天然のタンパク質に含まれるメチオニンやシステインの硫黄原子の異常散乱を利用することで位相決定を行う方法です。ただし、十分な結晶サイズ、高い分解能、対称性が高い空間群など、良い条件が揃った場合に限られます。

#### 金属タンパク質ではない場合②（セレノメチオニン置換体）

セレノメチオニン置換体タンパク質結晶の作成は、確実な異常散乱原子導入手法です。一方、タンパク質の大量発現時で非天然アミノ酸をタンパク質合成系に取り込ませるため、タンパク質の性質が変化することがあります。その場合、発現・精製や結晶化の条件の再探索を行います。  
※セレノメチオニン置換体タンパク質発現を含めたタンパク質発現・精製用 AgroBox®は、別途お問い合わせください。

#### 金属タンパク質ではない場合③（S-SAD法）

通常通りの結晶化を行います。

も多くのデータセットが必要となるため、測定時間も長くなります。また、特に長波長X線を使用した測定が必須のS-SAD法を行う際には、ノイズを軽減するための特別なセットアップが必要となります。結晶のソーキングで異常散乱原子の導入を行った場合、必要に応じて各重原子の吸収端波長を用いた蛍光X線の測定を行います。

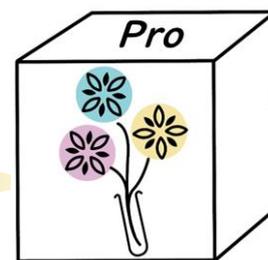
の情報をもとにして、ゼロからのタンパク質モデル構築を行います。類似構造を用いる分子置換法による構造解析に比べ、モデリングの難易度は格段に高くなりますが、経験豊富な当社研究者にお任せください

# AgroBox® Pro FBDD

タンパク質

## フラグメント化合物スクリーニング

### フラグメント分子の結合構造を得る



※本 Box をご利用希望のお客様は、事前確認が必要になります(要:結晶化条件が最適化されたサンプル)。

フラグメントスクリーニングは、新規のリード化合物創出や、新規の化合物結合サイト発見に威力を発揮する方法です。この手法では、分子質量 100~300 Da 程度の低分子化合物（フラグメント分子）をタンパク質結晶にソーキングした後に X 線回折測定することで、標的タンパク質とフラグメント分子との複合体結晶構造解析を行います。

## 1. FBDD (Fragment-Based Drug Design/Discovery)

フラグメントベース創薬 (FBDD) は、100~300 Da 付近という一般の薬剤よりも小さい化合物（フラグメント分子）を創薬の出発化合物として使い、そこから合成展開することで、効率的に新規かつ高アフィニティーのリード化合物を創出する戦略です。この手法は、タンパク質の立体構造情報をもとにした創薬手法（構造ベース創薬/Structure - Based Drug Design : SBDD）と組み合わせると威力を発揮します。通常の SBDD では、ハイスループットスクリーニング（生化学アッセイなど）やドッキング・シミュレーションなどのスクリーニングでヒット化合物が発見され、その後にヒットバリデーション（精密な生化学アッセイなど）で確実な活性が確認されたのちに、ヒット化合物-タンパク質の複合体構造の解析を行うことが一般的です。一方 FBDD の考え方をもとにした SBDD では、活性不明なフラグメント分子を数百種類、最初から標的タンパク質結晶に

添加（ソーキング）し、複合体構造解析を行います。フラグメント分子は、分子量が小さいため、弱いアフィニティーでポケットの特定部位に特異的に結合しやすいという性質があります。高濃度の低分子化合物のソーキングで、この弱く結合するフラグメント分子を複数見つけることができれば、そこから効率的に合成展開（化合物の拡張・結合・最適化）が可能です。

この方法には、タンパク質上の未知の結合部位を発見できる可能性もあります。フラグメント分子のセットは、既知のポケット以外にも結合する可能性があり、実際に新規な結合サイトが発見された例も多々あります。

以上のように、「結合するフラグメント分子の発見」と「新規ポケットの発見」の二つを同時に行うことが可能な点がフラグメントスクリーニングの強みと言えます。

## 2. フラグメントスクリーニングに適した結晶

当社では、FBDD 用に低分子フラグメントのライブラリ（第一弾 LIFE CHEMICALS 社販売のフラグメントスクリーニングセット：320 化合物、平均分子量約 200）をご用意しています。各フラグメント分子と標的タンパク質との複合体結晶は基本的にソーキング法で調製します（※お客様ご提供のライブラリでも実施可能）。この作業には結晶を数多く使用しますので、高い再現性で標的タンパク質の結晶が得られる条件の結晶化条件が決定されている必

要があります。また、電子密度から低分子の結合を確認するためには 2.5 Å 分解能よりも高分解能の結晶であることが望ましいです。これより分解能が低い場合は結合力の弱いフラグメント分子配向の正確な決定が難しくなり、リード設計の情報が不足する可能性があります。高分解能の結晶が安定して得られる条件が未確定の場合は、AgroBox® No.2（結晶化条件最適化）をご利用いただけます。

また、フラグメント分子のソーキング前の作業として、結

晶の DMSO (ジメチルスルホキシド) 耐性を確認します。当社で用いるフラグメント分子ライブラリは、DMSO に溶解させているため、ソーキング及びクライオプロテクトタンク溶液には DMSO が含まれます。一般的にソーキング溶液中に 5-10% 程度の DMSO は許容されますが、結晶化溶液の組成からのわずかな変化で崩れてしまう弱い結晶もあります。本 Box では、結晶化溶液に対して最終濃度 5%

の DMSO を加えた溶液に標的タンパク質結晶を移し、結晶の外見の変化や分解能低下がないかを調べます。

なお、リガンド結合状態のみで結晶が得られる場合は、リガンド添加状態で結晶を作成し、そこにフラグメント化合物を添加することになります。この場合は、当該リガンドを伸長させたい場合のヒントとして活用するなど想定されます。

### 3. 実験作業

#### 3.1 結晶の調製とソーキング

お客様提供の標的タンパク質と結晶化溶液を使用して、96 ウェルプレートに結晶を調製します。結晶への化合物の添加は、結晶ドロップに高濃度のフラグメント分子溶液を添加するか、フラグメント化合物を含むソーキング溶液に結晶を移動させて数分から 1 時間程度静置することで行います。その後、ループで結晶を回収して液体窒素で凍結保存します。その際、必要に応じて抗凍結剤を用います。

#### 3.2 X線回折データ自動測定および自動データ処理

凍結した結晶は、放射光施設において X 線結晶回折実験に供します。原則として自動モードで測定を行い、得られた回折強度データは放射光施設の自動データ処理ソフトウェアによって処理します。当社による、分子置換法での構造決定やフラグメント分子の電子密度確認が不要な場合は、回折画像と自動処理済みデータのみを納品します。

#### 3.3 電子密度の確認

次にお客様よりご提供いただいた立体構造情報を用い、位相決定とモデリングを行います。まず、分子置換法による位相決定を行い、その妥当性を当社の構造生物学研究者が専門的な知見に基づき判断します。その後、あらかじめ想定される化合物結合サイトだけでなく、標的タンパク質全体を網羅的に観察し、フラグメント分子由来の電子密度が存在するか確認します。電子密度が発見された場合、マップ画像を添付した報告書とフラグメント分子を当てはめた立体構造モデルを作成して納品します。320 化合物に対して結晶ソーキング、データ収集、電子密度確認にかかる期間は 3~5 ヶ月程度です。

このような数百化合物の電子密度を同定する作業は、多大な時間と労力を必要とします。当社にご依頼いただければ、専門知識を持つ構造生物学研究者がこの煩雑な作業を効率的に行い、お客様の負担を大幅に軽減いたします。

## AgroBox® Pro FBDD サービス内容

#### ご用意いただくもの

- ・タンパク質溶液 (結晶化に使用する濃度)
  - ※ 高い再現性で結晶化可能な試料であること
  - ※ 結晶が 2.5 Å 分解能以上の回折分解能を有すること
- ・フラグメント分子 96 種類あたり: 50 μL (0.5 mg) 以上
- ・上記タンパク質用の結晶化溶液: 20 mL 以上

#### 【フラグメント分子の電子密度確認を当社に依頼される場合】

- ・上記タンパク質のアミノ酸配列情報
- ・上記タンパク質の三次元立体構造情報 (PDB 形式)

※価格は、別途価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)。

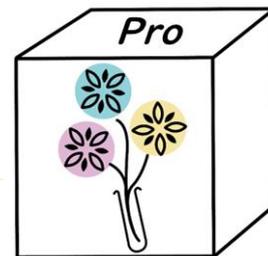
#### 納品物

- ・使用したフラグメント分子リスト (sdf 形式)
- ・結晶準備から自動データ処理までの報告書
- ・構造因子データ (mtz 形式)
- ・回折データ処理のログなど全ファイル

#### 【電子密度確認をご依頼の場合の追加納品】

- ・電子密度確認の報告書
- ・立体構造モデル (PDB 形式)
- ・位相情報付き構造因子データ (mtz 形式)

# AgroBox® Pro FSEC ① タンパク質 GFP 融合タンパク質の蛍光ゲルろ過分析



## 膜タンパク質の界面活性剤チェック

※本 Box をご利用希望のお客様は、事前確認と個別のお見積りが必要になります。

FSEC (Fluorescence-detection Size-Exclusion Chromatography: 蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー) 法は、蛍光検出器が備わったクロマト装置を用いることで、タンパク質の発現量・単分散性・安定性を迅速かつ高感度に評価できる手法です。本 Box (FSEC①) では、蛍光標識した目的タンパク質が含まれるサンプルを FSEC 法で分析し、評価結果をご提供します。

## 1. FSEC 法とは

### FSEC 法の 2 つの利用目的

AgroBox® Pro で提供する **蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー (Fluorescence-detection Size-Exclusion Chromatography/FSEC)** 法は、タンパク質のゲルろ過クロマトグラフィーを実施した際の検出法として、蛍光測定を行う方法です。タンパク質のゲルろ過分析で多く使われる吸光法より感度が高いため、微量なサンプルでも分析が可能になる方法です。さらに蛍光検出法であれば、予め目的タンパク質を蛍光タンパク質などで標識することで、夾雑物が多い場合でもクロマトチャート(クロマトグラム)の検出が可能です。微量なサンプルあるいは夾雑物の多いサン

プルからクロマトチャートが測定できれば、そのピークの形から最適な条件を求めることが可能です。

本法は、主に 2 通りの使い方ができます。蛍光標識した未精製タンパク質に対するゲルろ過分析 (本 Box : AgroBox® Pro FSEC①) と、ノンラベル精製タンパク質に対するトリプトファン蛍光による微量ゲルろ過分析 (次の Box : AgroBox® Pro FSEC②) に対して利用されます。当社では、蛍光検出器とオートサンプラーを備えた FSEC システムを導入しているため、ハイスループットにゲルろ過発現条件やバッファー条件の検討が可能です。



図 26 蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー (FSEC) システム(島津製作所製)

(左) 4°Cチャンバー内に設置し、不安定なタンパク質にも対応。(中央) ゲルろ過カラム (Superdex™ 200 In crease 5/150 GL, Cytiva 社)。(右) オートサンプラーによるハイスループット条件測定に対応。

### 蛍光タンパク質を用いた未精製サンプルの FSEC 法

本 Box は、GFP タグなどで蛍光標識されたタンパク質のゲルろ過クロマトグラフィー中の挙動を蛍光検出することで、未精製試料から直接も目的タンパク質の性質が分析できることが大きな特徴です。

蛍光標識として、一般的に Green Fluorescent Protein (GFP)などの蛍光タンパク質タグが付加されます(図 28)。蛍光標識により、他タンパク質が混在している未精製サンプルのゲルろ過分析でも、目的タンパク質のみを選択的に検出できます。このため、複雑な精製作業を行わなくても、溶液中での標的タンパク質の性質を評価することが可能になります(図 27)。また蛍光測定の検出感度は、タンパク質の検出によく使われる A280 吸光度測定の数倍から千倍以上高いため、より少ないサンプルでの測定を可能にします。

さらに当社では、蛍光検出器とオートサンプラーを組み合わせた FSEC システム(図 26)を用いることで、ハイスループットかつ高感度にサンプル評価を素早く実施できます。

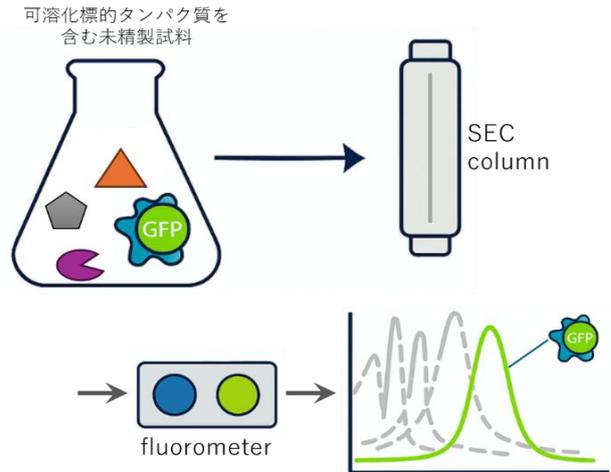


図 27 GFP を用いた FSEC 法の概略

GFP を用いることで、未精製サンプル中の目的タンパク質の挙動を検出することができる。



GFPタグ付加膜タンパク質を  
発現させた細胞の膜画分

精製後のGFPタグ付加膜タンパク質

図 28 GFP タグ付きタンパク質の精製例

発現量が多いと肉眼でも蛍光が確認できる。

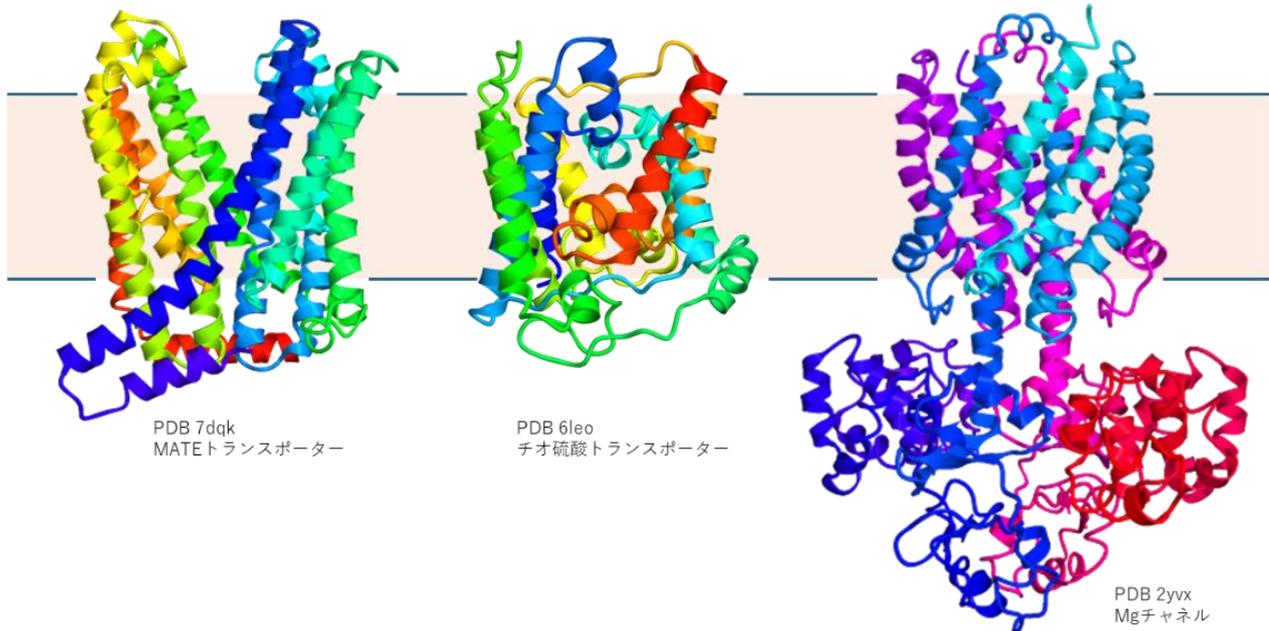


図 29 FSEC 法 (GFP 標識) を用いて結晶構造解析された膜タンパク質の例。

(左) MATE トランスポーター(PDBID:7DQK)。 (中央) チオ硫酸トランスポーター (PDBID: 6LEO)。 (右) Mg チャンネル (PDBID:2YVX)。 (当社研究者がアカデミア在籍時に行ったタンパク質)

## 2. 膜タンパク質の発現・可溶化条件の最適化に

FSEC 法は、膜タンパク質の精製条件最適化において特に威力を発揮します。タンパク質の構造解析を成功させるためには、そのタンパク質が溶液中で均一な状態、すなわち単分散性を保っていることが極めて重要です。標的タンパク質を大腸菌や昆虫細胞などに過剰発現させる場合、コンストラクト設計や培養時間、温度などがフォールディングの成否、発現量に影響を及ぼします。最適な発現条件を見出すためにも、スモールスケールかつハイスループットな条件最適化が必要です。通常、初期段階での確認では、セルライゼットや粗精製サンプル中のタンパク質量を SDS-PAGE によって定量する簡易的な方法が取られます。しか

しこの方法では、発現タンパク質が正しくフォールドしているかまでは判別できません。判別にはアフィニティー精製などである程度精製を行った後に、ゲルろ過分析などを行う必要がありました。そのため、多数の発現系についての比較検討には時間がかかります。一方で GFP 融合タンパク質として発現コンストラクトを構築すれば、FSEC 法により精製工程を経ない（セルライゼットのままの）微量な試料から、ゲルろ過ピーク形状を高感度に確認することが可能です。これにより、ハイスループットに発現量および単分散性、凝集の有無を迅速かつ正確に確認でき、各種条件の最適化を格段に効率化できます。

## 3. 提供サービス内容：界面活性剤スクリーニング/発現チェック

### ①界面活性剤スクリーニング

膜タンパク質（**図 29**）の精製に最も重要なことは、可溶化に用いる界面活性剤の選択です。界面活性剤は、膜タンパク質が安定した構造を保ちながら可溶化され、単分散性を示すようなものを選ぶ必要があります。その選択のため手法として、膜タンパク質に GFP タグを付加して実施する FSEC 法は最適です。

界面活性剤スクリーニングのためには、まず GFP 標識付き膜タンパク質を発現させた細胞から膜画分を抽出し、これに各種界面活性剤溶液（**表 4**）を加えて可溶化します（**図 29**）。スクリーニングに用いる界面活性剤は、膜タンパク質の結晶構造解析に頻繁に用いられる非イオン系界面活性剤から選択しています。また、真核生物由来の膜タンパク質はコレステロールの存在下で安定性を増すことがあるため、GDN や CHS も候補にいれています。お客様は抽出した膜画分をお送りいただくか、細胞ペレットをお送りください（膜タンパク質を可溶化は、オプションで承ります）。界面活性剤による可溶化後に遠心上清をオートサンプラー付き FSEC システムにて連続分析を行い、得られるゲルろ過クロマトグラフから発現量と単分散性について評価します。

### ②発現チェック

発現コンストラクトの最適化検討も可能です。末端の不安定領域、タグとのスペーサー長の数残基の違いでフォールディング効率や膜挿入に影響が出ることがあり、複数のコンストラクトを比較するのが一般的です。ご依頼の場合、各発現細胞試料をご送付ください。各試料を界面活性剤にて可溶化して FSEC 法で比較します。この際、発現系と界面活性剤種の組み合わせの数により価格が決まります。

### ③FSEC-TS（要お問合せ）

さらに詳細な熱安定性の確認を行いたいお客様向けに FSEC-based Thermostability Assay (FSEC-TS) 法<sup>\*</sup>も提供可能です。FSEC-TS 法では、可溶化試料を複数の温度で加熱後、遠心上清を FSEC 分析し、グラフ化して解析することにより、熱安定性の定量的評価が可能です。通常の FSEC では差がないサンプル同士でも、FSEC-TS では差がはっきりと見えることがあり、最終的な条件選択に有効です。<sup>\*</sup>Hattori, M., *et al.*, *Structure.*, (2012)

界面活性剤	略称	可溶化濃度
1 n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside	DDM	1%
2 Lauryl Maltose Neopentyl Glycol	L-MNG	1%
3 Glyco-Diosgenin	GDN	0.1%
4 n-Decyl- $\beta$ -D-maltoside	DM	2%
5 n-Undecyl- $\beta$ -D-maltoside	UDM	1%
6 Octyl- $\beta$ -D-glucoside	OG	2%
7 DDM + Cholesteryl hemisuccinate	DDM+CHS	1% + 0.2%
8 L-MNG + Cholesteryl hemisuccinate	L-MNG+CHS	1% + 0.2%

表 4 可溶化 Detergent screening に用いる界面活性剤

可溶化バッファーには上記界面活性剤の他に塩と緩衝剤を適宜加える（例：300 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM 2-Mercaptoethanol）

## AgroBox® Pro FSEC ① サービス内容

### 作業内容

#### ① 界面活性剤スクリーニング

標的タンパク質の発現細胞を 8 種の界面活性剤入り可溶化溶液に懸濁し、遠心上清で FSEC を行います。ゲルろ過カラムには Superdex™ 200 Increase 5/150 GL を用い、FSEC クロマトグラムデータを納品します。

#### ② 発現チェック

お客様よりご提供の最大 8 種類のコンストラクトを実施することも可能です。

（その後、通常の界面活性剤スクリーニングを実施することも可能です：別料金）

#### ③ FSEC-TS

別途お問合せ下さい。（料金形体が異なります。）

### ご用意いただくもの

・数 ml 程度の小スケール培養蛍光タグ付加未精製試料（蛍光タグ付加必須、蛍光検出器の対応波長：200-650 nm）

膜画分の状態もしくは細胞ペレットを凍結状態でご送付ください（細胞ペレットでの送付の場合、膜画分抽出オプションをご購入ください）

・候補バッファーの組成情報

・標的タンパク質の分子量、アミノ酸配列等の情報

※基本的な塩（NaCl, KCl 等）および緩衝剤（HEPES, MES 等）については当社でご用意しております。

※表にない界面活性剤やその他高額試薬が必要な場合はお問い合わせください。

※リガンド等をお送りいただければ、候補バッファーに添加したものを調製いたします。

### 納品物

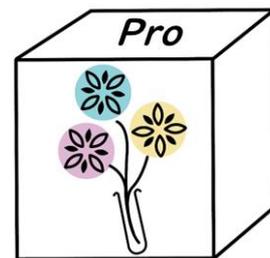
・FSEC 評価データ（蛍光検出したゲルろ過クロマトグラフ）

※価格は、別途価格表をご覧ください（<https://agrobox.jp>）。

# AgroBox<sup>®</sup> Pro FSEC ② タンパク質

## トリプトファン蛍光ゲルろ過分析

### 安定性評価と溶液条件最適化

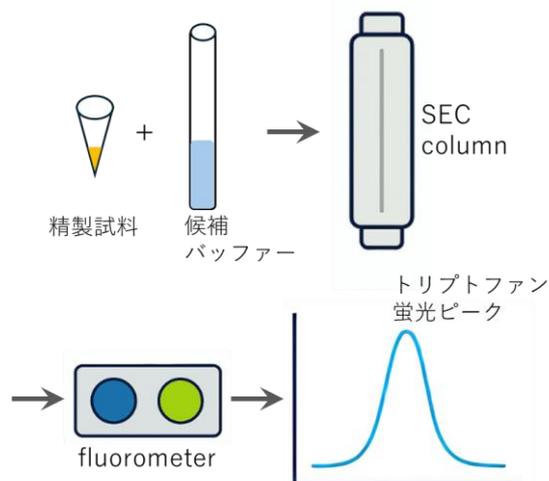


※本 Box をご利用希望のお客様は、事前確認と個別のお見積りが必要になります。

タンパク質の溶液中での状態の評価方法の一つがゲルろ過クロマトグラフィーです。通常、検出感度の制限から複数条件のゲルろ過結果を比較するのは困難が伴いますが、タンパク質の自家蛍光を利用する FSEC 法により少ない消費量で多条件の分析が可能です。本サービスでは、送付いただいた試料を FSEC 法で解析し、安定性・単分散性についての評価結果をご提供します。本 Box はタンパク質研究における条件検討工程を効率化する解析支援サービスです。

## 1. トリプトファン蛍光による FSEC 分析

FSEC 法は、精製後のタンパク質の各種溶液中での安定性を評価するためにも有用です (図 30)。この目的では、GFP 標識を行っていないサンプルであっても、タンパク質の自家蛍光を利用することで高感度検出が可能です。特にトリプトファン残基の蛍光 (励起波長 280 nm / 蛍光波長 350 nm) が最も強いいためよく使われます。トリプトファン蛍光を用いると、吸光測定よりも高感度な検出が可能になるため、測定に必要なタンパク質の量を大幅に削減できるため、多様なバッファーにおける安定性をハイスループットに検出することが可能になります。



## 2. 安定化バッファー条件の探索

不安定なタンパク質を扱う場合、どのようなバッファー組成でタンパク質が安定か評価をすることは重要です。タンパク質は、精製中や精製後に短時間で沈殿が生じることが多々あり、安定なバッファー条件の探索が必要になることが良くあります。また、タンパク質の結晶化や NMR 測定では、常温で数時間から数日にかけてタンパク質の構造と機能が維持される必要があるため、事前に安定な条件の探索が必要です。トリプトファン蛍光を用いた FSEC 法を使えば、少ないタンパク質で、緩衝液の pH や塩濃度、補因子 (Cofactors) などの条件検討がハイスループットで可能です (図 30)。

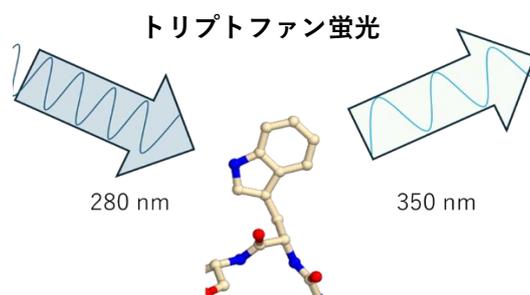


図 30 トリプトファン蛍光を用いた FSEC の概略  
精製タンパク質と相性を確認したい候補バッファー溶液を用意してゲルろ過クロマトグラフィーを行います。タンパク質中に含まれるトリプトファンを蛍光検出することで高感度検出が可能です。

種別	添加物	濃度・pH	備考
1 塩	NaCl, KCl 等	0, 20, 50, 100, 300 mM	高濃度は結晶化には向かない
2 緩衝剤	MES, HEPES 等	pH 6 ~ 8	タンパク質の pI ± 0.5 程度の範囲
3 金属イオン	MgCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub>	1, 10 mM	金属結合タンパク質の場合
4 還元剤	TCEP	1 mM	酸化しやすいタンパク質の場合
5 界面活性剤	DDM	0.005%	低濃度添加して非特異的相互作用を低減
6 両親媒性低分子	NDSB-195	0.5 M	非界面活性剤型スルホベタイン
7 糖アルコール	グリセロール	1 ~ 5%	高濃度は結晶化には向かない

表 5 バッファー成分検討例

## AgroBox<sup>®</sup> Pro FSEC ② サービス内容

### 作業内容

- ①提供いただいたタンパク質情報を考慮し、安定性向上を目標としたバッファーを調製します。
- ②濃縮した精製試料を各候補バッファーに混合し、インキュベートします。
- ③候補バッファーでゲルろ過カラムを平衡化します。
- ④遠心上清を用いて FSEC を行います。

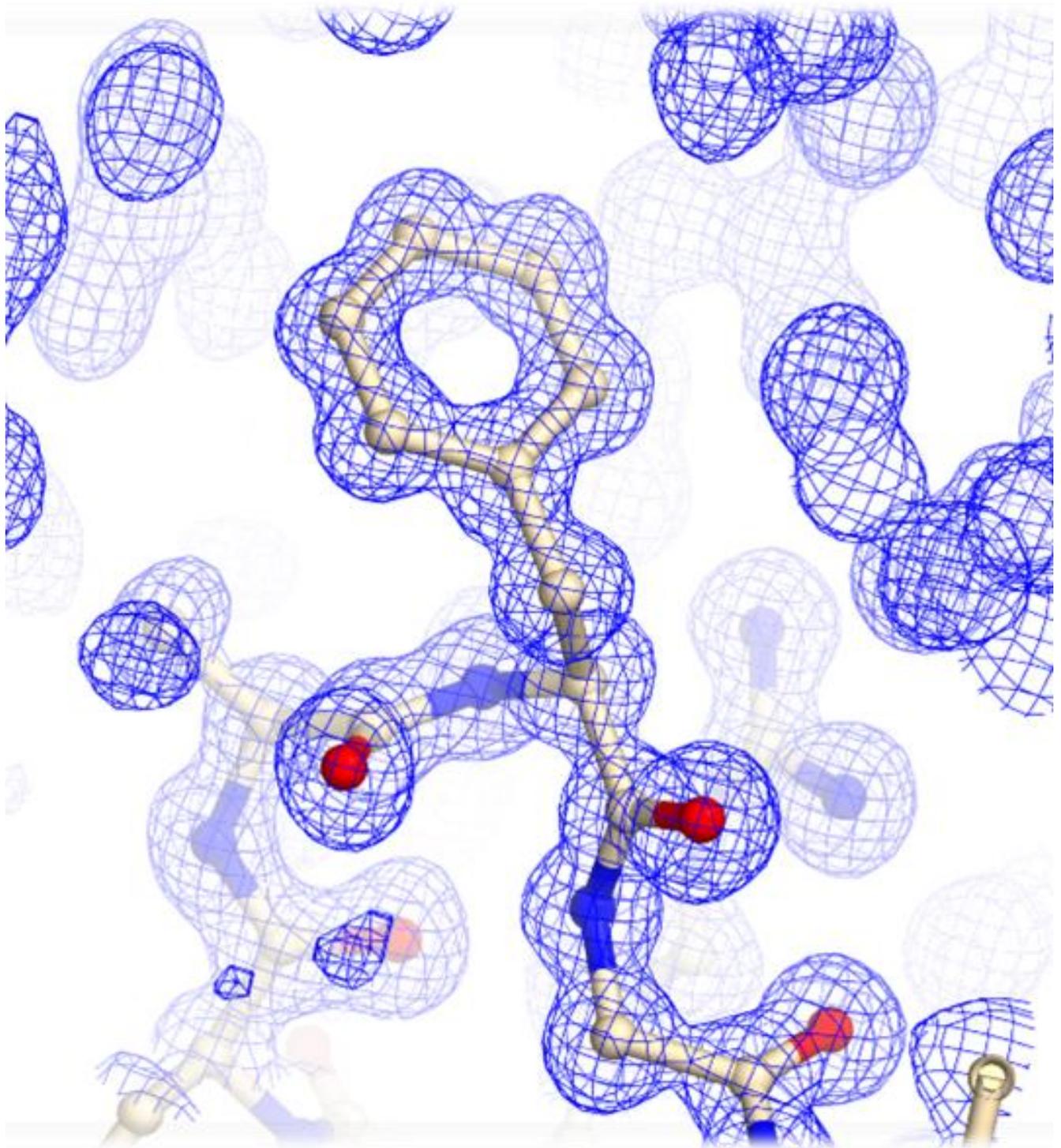
### ご用意いただくもの

- ・少量の精製済み試料 (100 μg 程度)
  - GFP タグは不要
- ・泳動バッファーの組成
- ・標的タンパク質の分子量、アミノ酸配列等の情報

### 納品物

- ・ FSEC 評価データ

※価格は、別途お問合せ下さい。



研究画像ギャラリー：農薬ターゲットタンパク質の超高分解能 X 線結晶構造 (0.83 Å)

# AgroDesign × BioStartup Collaboration



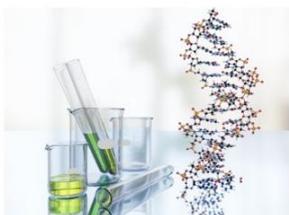
株式会社アグロデザイン・スタジオでは、他分野のバイオスタートアップと積極的にコラボレーションを行うことで、革新的なサービス提供を行って参ります。

# 構造解析をもっと活用するために、 遺伝子解析にも挑戦しませんか？



解析プラットフォーム「ANCAT」を開発・運営する株式会社アンプラットがお客様の研究に欠かせない解析業務の内製化を支援します。

## 研究をよりもっと深く、効率的に。



### 構造解析の前段階として 遺伝子解析を取り入れてみませんか？

(株)アグロデザイン・スタジオの「AgroBox®」では、サンプルや情報を送るだけで手軽に構造解析が可能ですが、せっかく構造解析を行うのであれば、前段階で遺伝子解析をすることをオススメします！



タンパク質の構造解析の前段階として遺伝子解析を追加すると、どの構造が注目すべきかを特定することができ、構造解析のターゲットを明確にすることができます。また、解析対象をあらかじめ遺伝子レベルで絞り込むことで解析の試行錯誤が減り、時間とコストを削減することができ、構造解析のプロセス効率化を実現します！

## 遺伝子解析を依頼しつつ、将来的には内製化したい...という方へ！

解析を内製するために必要な人材育成や解析環境の構築を支援します！

遺伝子解析は、高度な専門知識を必要とする構造解析とは異なり、ITの知識を身に付けることで研究者自身での内製化も可能な解析です。

アンプラットでは、将来的に遺伝子解析を内製化するために、バイオインフォマティクスについて学びながら解析をしたいという要望に応えます！

お客様のご要望や研究環境の課題を洗い出し、最適な研究環境の構築や研究効率の最適化にコミットする「Labo DX 支援サービス」をご用意しています。

## ITの専門知識がなくても解析可能！

プラン	価格 (アカデミア価格あり)	備考
オンライン情シス貸し出しサービス	300,000円~/月	研究室、チーム単位での料金
クラウド解析環境導入支援	100,000円~/1事例	研究室、チーム単位での料金
実態調査	50,000円~/1日	実態調査は必須で行います。

急速に進化を遂げるIT技術により、いまや研究で取り扱うデータ量は非常に膨大です。そのため、研究者がデータ解析を行う場合、自身の研究分野の専門知識とは別にITの専門知識も求められるようになりました。

「Labo DX 支援サービス」では、現場を知り尽くしたプロのバイオインフォマティシャンが、サーバの導入やシステムの環境構築などの解析環境の内製化に向けた整備を行います。また、ITの専門知識が不要で解析可能なプラットフォーム「ANCAT」の導入で解析自体を簡単にします。



【お申し込みからサービス開始までの流れ】「アグロデザイン・スタジオのパンフレット見た！」で、事前調査費用が10%OFFです！



1. 無料相談 左のQRコードよりお申し込み
2. 当社にて社内精査、事前調査費用を確定
3. 事前調査費用を当社までお振込み
4. 実態調査 当社スタッフが貴社を訪問し現地調査
5. 改善提案、個別見積
6. 提案内容に満足いただけたら、DX開始



## ありとあらゆる解析手法をあなたのお手元に

価格

解析や契約により異なる。ご利用方法に合わせたお得なプランをご提案いたします。

### 解析プラットフォーム ANCAT

マウスクリックによる簡単操作で、画面に沿って操作するだけで解析可能なシステムで、ITの専門知識や環境構築は不要です。

また、解析の実行以外にも解析手法の共有や研究者自身の解析手法や研究室独自の解析手法を用いた解析プラットフォームの運営など、解析に関わることがこのシステムですべて対応可能です。クラウド上ですべての解析が実行可能なため、**共同研究の場としても利用可能です。**

「ANCAT」を活用することで、解析自体を簡単に行うことができるため、研究者自身がこれまでの研究と並行してデータ解析を行えるようになります！



アグロデザイン・スタジオとの協業セクションも！  
遺伝子配列からタンパク質のX線結晶の構造までを解析のプロが最強のタッグを組んで解析します！

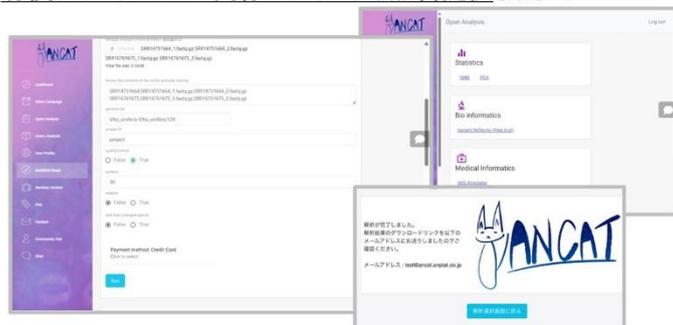
画面に従って操作するだけで簡単に解析が実行可能です！

「アグロデザイン・スタジオのパンフレット見た！」で、最初の解析において、有償サポートプランと同様のサポートを無料提供します！

#### 【実行までの3ステップ】

- ①解析したいデータを選択
- ②パラメーターや比較データを設定
- ③解析開始ボタンをクリック

ANCATはこちら ▶



### 解析サポートサービスも充実！

プラン

価格 (アカデミア価格あり)

備考

基本月額料金

300,000円～

研究室、チーム単位での契約



これまで解析を実行したことのない方や、解析に不慣れな方でもスムーズに、安心して解析いただくためのサポートサービスもご用意しています。

解析実行時のちょっとした疑問やお困りごとの解決はもちろん、バイオインフォマティクスについて学びたい方への学習支援や学びながら解析の内製化も視野に入りたい方向けのサポートなどより研究に没頭するためのサービスです。

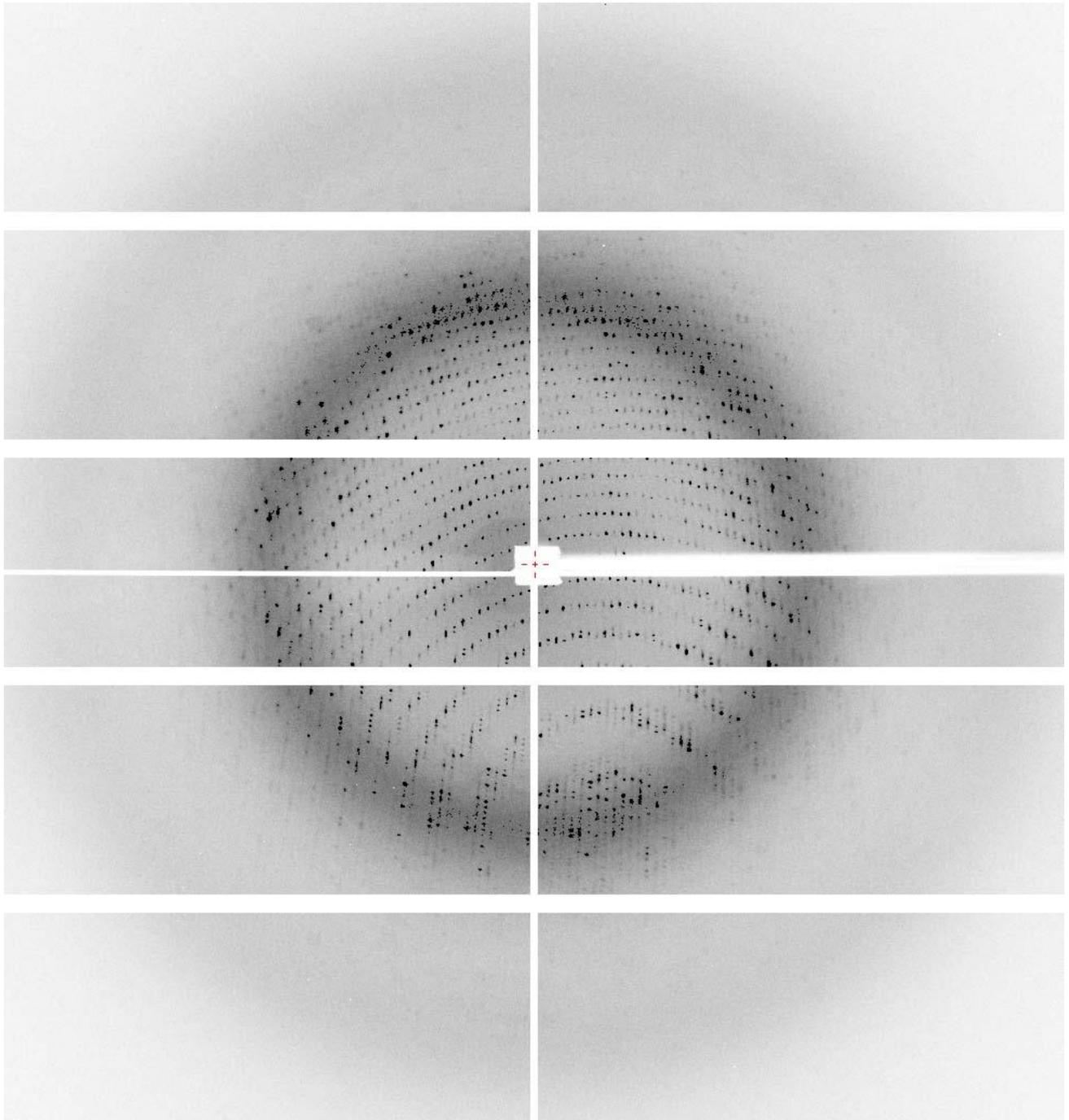
解析実行までの難関となる難しい環境構築の支援や実行サポートはもちろん、出力された解析結果の解説やフィードバックも行っていますので、内製化に向けた専門人材の育成にも活用いただけます。

株式会社アンプラットフォーム Web: <https://anplat.co.jp> 創業：2021年2月17日

〒220-8107 神奈川県横浜市西区みなとみらい 2-2-1 横浜ランドマークタワー7階

お問い合わせは、上記連絡先へ直接、または(株)アグロデザイン・スタジオまで。

※特典『アグロデザインのパンフレットを見た！』で、最初の解析において、有償サポートプランと同様のサポートを無償提供



研究画像ギャラリー：タンパク質結晶 X 線回折画像

放射光施設： SPring-8

ビームライン： BL41XU

分解能： 0.83 Å

# AgroDesign.SHOP



<https://agrodesign.shop> で販売中

# DIY ラボオートメーションに“ちょうどいい” UFACTORY ロボットアーム xArm シリーズ



**Vacuum Gripper**  
(電動真空グripper)



**BioGripper G2**  
(SBS 規格プレート専用グripper)



**Direct-drive Linear Motor**  
(xArm 用レール 70cm/150cm)



**xArm Gripper G2**  
(平行リンクグripper)

xArm 本体 (5 軸、6 軸、7 軸)

**118 万円~218 万円** (税込)

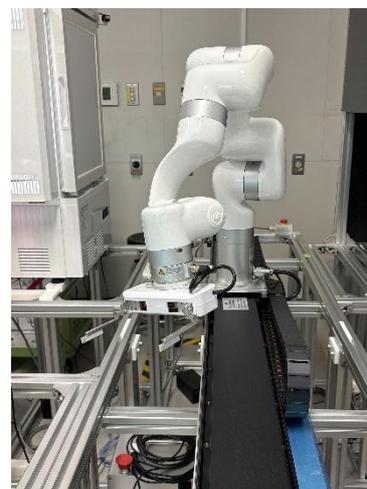
## AgroDesign Studios におけるラボオートメーション利用例



人工気象機からのプレート取出しシステム



BioGripper G2 使用例



Linear Motor (150 cm) 使用例

株式会社アグロデザイン・スタジオは UFACTORY 社の日本国内正規販売店です。

シロイヌナズナ野生型 Col-0 種子

モデル植物

# シロイヌナズナ 野生型Col-0 種子



商品名	内容	価格
シロイヌナズナ 野生株 (Col-0) 種子 (0.5gで約1.5~1.8万粒)	未滅菌0.5g <small>型番: AtCol0-500mg</small>	税抜18,000円 (税込19,800円)
	未滅菌0.5g × 2袋 <small>型番: AtCol0-500mg-2pcs</small>	税抜23,800円 (税込26,180円)
	滅菌済 0.5g <small>型番: AtCol0-500mg-HS</small>	税抜28,000円 (税込30,800円)
	滅菌済 0.5g × 2袋 <small>型番: AtCol0-500mg-HS-2pcs</small>	税抜45,000円 (税込49,500円)

自動種まき機での播種例



シロイヌナズナ種子採取キット (AgroBox®PlantTools ミニコンテナ栽培シリーズ)

# シロイヌナズナ種子採取キット



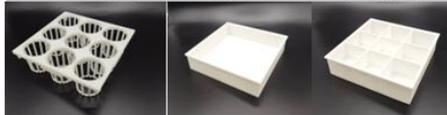
排水性の良いジャイロイド構造



繰り返し使える透明パイプ (9本)



カゴと受皿2種 (セパレーター有り/無し)



種子の自動回収ポケット付き  
(ゴミを除去する3次元アミ構造)



内容物：ポット9個、30 cm 透明パイプ 9個、半透明アダプター9セット、種子回収器9セット、ポットラック1個、  
トレイ1個（一辺18.6cm/セパレーター有りまたは無し） ※サイズ：横18.6 cm×奥18.6cm×高さ41 cm

価格は、「AgroDesign.SHOP」をご覧ください

## 使いやすい機能



### ① ゴミのない種子

ゴミ除去機構で花びらや鞘などの混入種子が採取可能



### ② コンパクト

人工気象機内で使用可能  
※ 上段が当製品になります



### ③ 持運び可能

上下が固定されているので持ち運びやすい

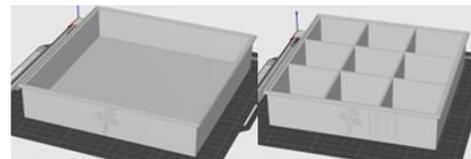


パイプ内で採取可能なので種子が飛散しない。  
※ 種子を叩き落とす棒も付属



### ⑤ 排水と通気に優れた ジャイロイド構造

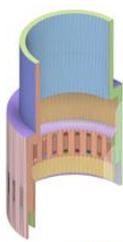
ジャイロイド構造を採用し、さらに境目を設けることで排水と通気を分離



### ⑥ 薬剤試験を考慮した 分画トレイ

分画されたトレイを使用することで異なる薬剤試験にも対応可能

## こだわり設計



### ① 植物科学者のための 独自設計！

シロイヌナズナの生育を多くこなす当社だからこそ設計できる独自構造！シロイヌナズナ生育に最適なポット・パイプ・ラックの形を求め、数百もの試作品から最適な形状を探索。



### ② 3Dプリンターによる 特殊構造

種子からごみを除くために、3Dプリンターでしか出せない特殊な3D網目構造を採用！すべて当社で設計・生産しています（アクリルパイプ除く）。

# 今後販売予定の AgroBox®



## 【X線結晶構造解析】

- ・膜タンパク質構造解析（LCP法）

## 【タンパク質発現・精製】

- ・大腸菌発現系
- ・セレノメチオニン置換タンパク質作製
- ・NMR用同位体ラベル化タンパク質作製

※Sf9発現系・動物細胞発現系は、提携会社との協業として提供しております。別途お問い合わせください。

## 【*in silico* 解析】

- ・ドッキング・シミュレーション
- ・分子動力学計算（Molecular Dynamics）

## 【その他実験】

- ・Octet（相互作用解析）
- ・蛍光偏光スクリーニング用分子プローブ設計
- ・生化学アッセイ
- ・植物科学系の実験
- ・クライオ電子顕微鏡解析（個別対応可能）

※ここに記載のサービスは、現在でも対応可能な場合があります。別途お問い合わせ下さい。



# 会社概要

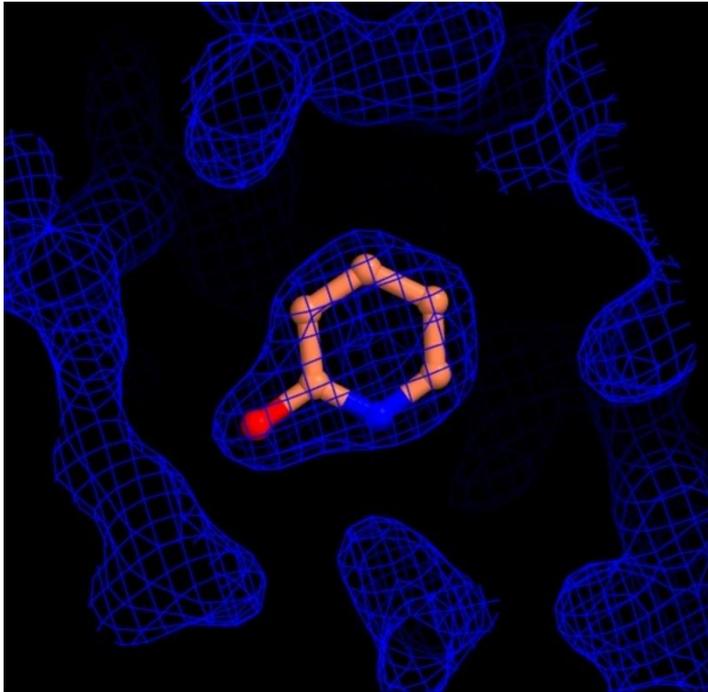


社名	株式会社アグロデザイン・スタジオ
英社名	AgroDesign Studios®
社名略称	AgDS
サービス名	受託研究サービス：AgroBox®、ネットショップ：AgroDesign.SHOP
住所	〒277-0882 千葉県柏市柏の葉六丁目 2 番地 3 東京大学 柏 II キャンパス 産学官民連携棟 303 <small>(東京大学ベンチャー・インキュベーション施設アントレプレナーハブ内 専用オフィス&amp;ラボ)</small>
会社 Web	<a href="https://www.agrodesign.co.jp">https://www.agrodesign.co.jp</a>
AgroBox® web	<a href="https://agrobox.jp">https://agrobox.jp</a>
WEB SHOP	<a href="https://agrodesign.shop">https://agrodesign.shop</a>
E-mail	AgroBox®のお問合せ：sales@agrobox.jp SHOP の問合せ：shopping@agrodesign.shop その他のお問合せ：info@agro.design
設立日	2018 年 3 月 30 日
法人番号	5050001044210
資本金など	資本金：58,000,421 円、資本準備金：141,158,381 円
会社代表	代表取締役社長 西ヶ谷有輝

※AgroDesign Studios®及び AgroBox®は、株式会社アグロデザイン・スタジオの登録商標です。



ホシザキユキノシタ：当社創業の地、つくば市（筑波山）の固有種。開花期は 5～6 月頃で筑波山山頂付近、筑波山神社境内、またはつくば実験植物園で見ることができます（当社撮影：当社ロゴは、ホシザキユキノシタを図案化したしました）。



医薬・農業の創薬のための結晶構造解析による  
**フラグメント化合物  
スクリーニング**

開始  
第一弾

フラグメントセット

**320化合物**

煩雑なフラグメント化合物スクリーニング作業を全て代行

定価 **2,980万円** (税別)

1構造解析 9.3万円~

⇒初回: **1,480万円** (税別)

1構造解析 4.6万円~

⇒初回 (料金前払) : **980万円** (税別)

1構造解析 3.1万円~

以下の作業が全て価格に含まれます

結晶作成  
(320個)



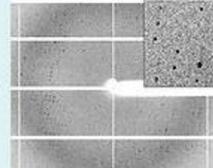
化合物320種  
ソーキング



結晶凍結  
(最大320個)



放射光X線測定  
(全凍結結晶)



結合を確認  
(全データマニュアルチェック)



\*フラグメント化合物スクリーニングの詳細は P52 をご覧ください。

## 株式会社アグロデザイン・スタジオ

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉六丁目2番地3 東京大学柏IIキャンパス産学官民連携棟 303  
(東京大学ベンチャー・インキュベーション施設 アントレプレナーハブ内)

<https://www.agrodesign.co.jp>



### AgroBox® 事業部 (受託サービス)

【Web】 <https://agrobox.jp>

【E-mail】 [sales@agrobox.jp](mailto:sales@agrobox.jp)

### AgroDesign.SHOP 事業部

【Web】 <https://agrodesign.shop>

【E-mail】 [shopping@agrodesign.shop](mailto:shopping@agrodesign.shop)

本パンフレット記載のサービスは、試験・研究用です。ヒトや動物への治療、もしくは診断目的としては使用できません。製品・サービスの品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。実際の価格、最新のサービス内容は、メールまたはウェブサイトにてお問い合わせください。なお、最新のパンフレットおよび価格表は、ウェブサイトよりダウンロード可能です(パンフレット表紙左下にリリース日の記載がございます)。本パンフレットに記載されている会社名、製品名などは、一般に各社の登録商標または商標です。本パンフレットは、株式会社アグロデザイン・スタジオの著作物になります。無断転載などをご遠慮ください。AgroDesign Studios®及び AgroBox®は、株式会社アグロデザイン・スタジオの登録商標です。©2023-2026 AgroDesign Studios®. All rights reserved.