

Agro Box

構造ベース創業 (SBDD) のための

タンパク質 結晶構造解析



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。

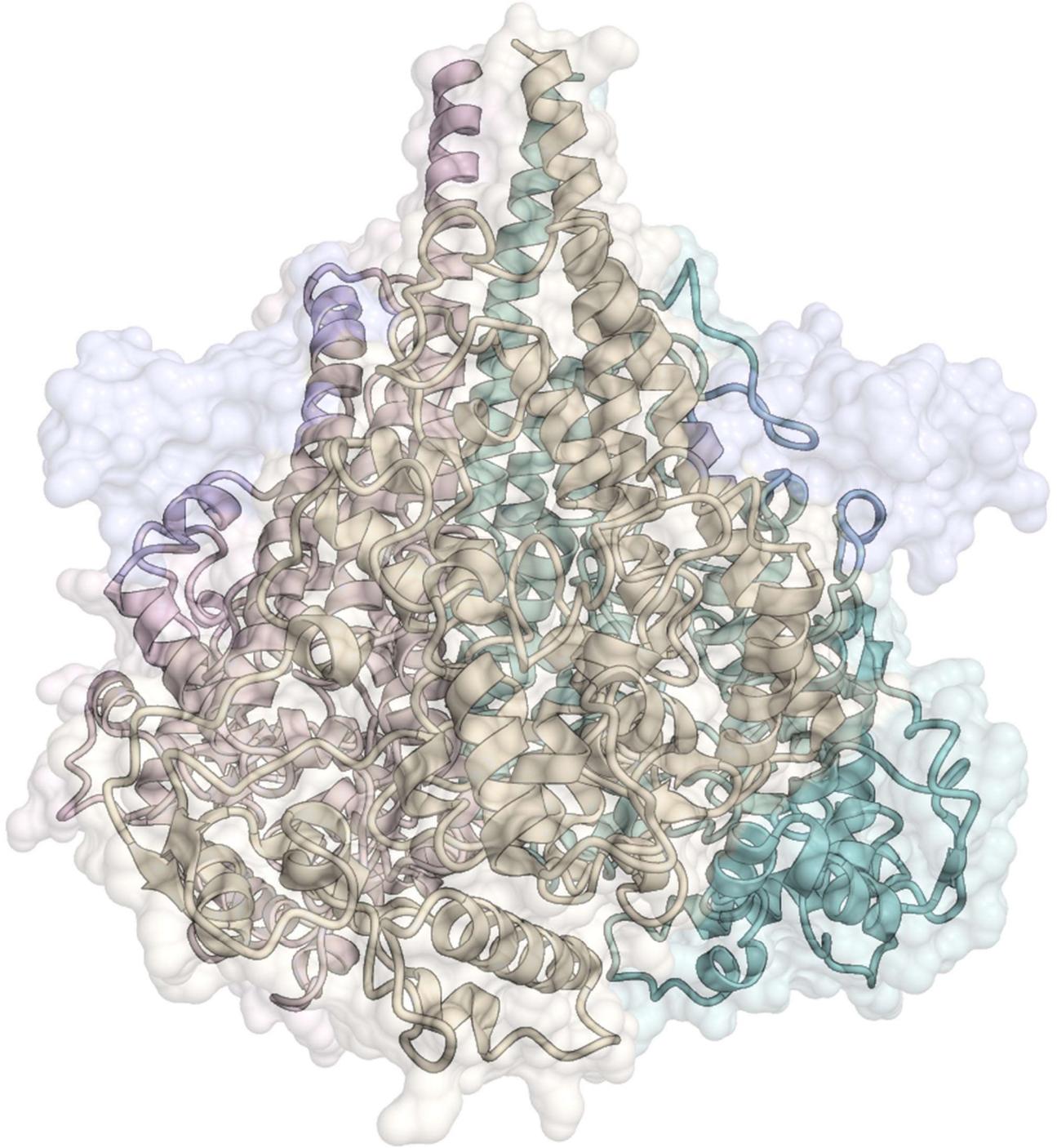
タンパク質構造データで産業にイノベーションを

タンパク質構造データは、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

AgroDesign Studios®について.....	2
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～	5
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. アグロデザイン・スタジオの構造活用例.....	8
4. アグロデザイン・スタジオの構造解析実績.....	10
AgroBox® タンパク質結晶構造解析の トータルソリューションパッケージ	15
1. AgroBox®：構造解析の実験をパッケージ化.....	16
2. AgroBox®ファミリー.....	17
3. AgroBox®サービスご利用方法.....	20
4. サンプルの安全性をご確認ください.....	22
AgroBox®結晶構造解析 Protein Crystallization (PX) 内容詳細	25
AgroBox® No.1 結晶化スクリーニング.....	26
AgroBox® No.2 結晶化条件の最適化.....	30
AgroBox® No.3 フルデータ測定用結晶の準備.....	32
AgroBox® No.4 フルデータ測定.....	34
AgroBox® No.5 X線回折データ処理.....	36
AgroBox® No.6 構造モデリング.....	38
AgroBox® No.7 リガンド複合体解析.....	40
AgroBox® Professional	43
AgroBox® Pro α 実験位相決定.....	44
今後販売予定の AgroBox®	46
会社概要	47



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。

製薬業界：低分子創薬

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。

タンパク質ではありませんが、近年は核酸を標的とした低分子薬の創薬も盛んに行われております。この場合にも核酸-低分子化合物複合体の結晶構造解析が利用されています。

製薬業界：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、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。



農業業界：低分子創薬（構造ベース創農薬 SBDD）

SBDD は、9 兆円産業である農業にも適用可能です。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、農業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、農業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）、洗剤や食品の加工などに活用されています。酵素の立体構造が分かれば、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、毎週1シフト (8 時間) 程度のビームタイムを確保し、農薬開発や AgroBox®においてルーチン的に利用しています (図 1)。

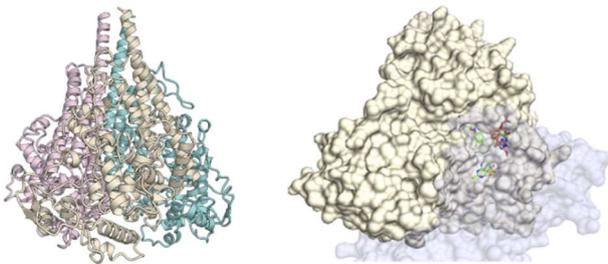


図 1 X 線結晶構造解析法で決定した酵素の構造

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 ¹⁹F-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、など温滴定カロリメトリー (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。

※溶液 NMR の AgroBox®については、別途お問合せ下さい。

3. 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 2）。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)

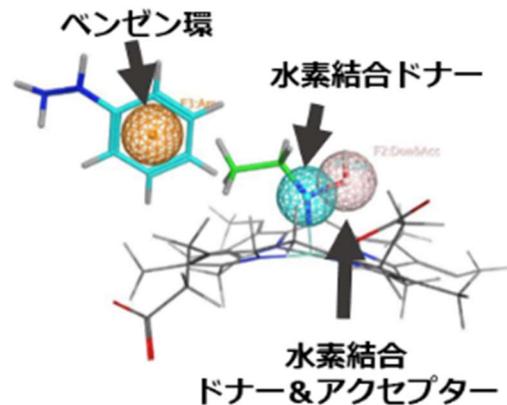


図 2 *in silico* スクリーニング (ファーマコフォアサーチ) に用いた HAO の基質結合ポケット

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 3)。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 にも野生型と同など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 様との共同研究として行われました)

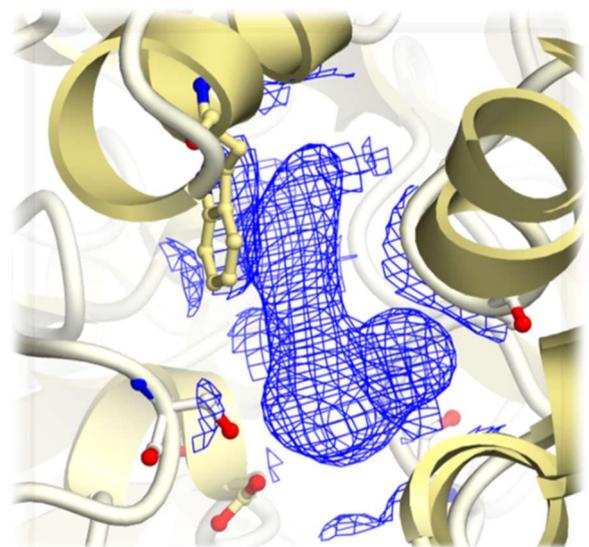


図 3 X線結晶構造解析法により決定した ALS と阻害剤の複合体結晶構造 スティックモデル：除草剤抵抗性に関わるアミノ酸側鎖、電子密度マップ：阻害剤

4. 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。国内外の放射光施設の 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)、スイス国 Swiss Light Source (SLS)、フランス国 European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) のビームタイムを合計で週に1度以上のペース（年間300時間以上）確保しているため、迅速にデータ収集を行えることが当社の強みの一つです（図4）。このうち、SPring-8とPFは夏季に長期運転休止期間がありますが、AichiSRとSLS（2024年はESRFで代替）は日本の夏季も稼働しております。特に

当社はSLSと年間176時間以上のビームタイム利用契約を締結しており、日本で唯一のSLS認定サービスプロバイダー（パンフレット作製日現在において）として、日本のお客様にSLSのX線測定サービスを展開しております（図5）。さらに当社ではAgroBox®用（受託サンプル）の測定だけでなく、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：0.83Å（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：1.7Å（岡崎生理研 TITAN Krios G4）

使用施設：岡崎生理研、KEK、SPring-8

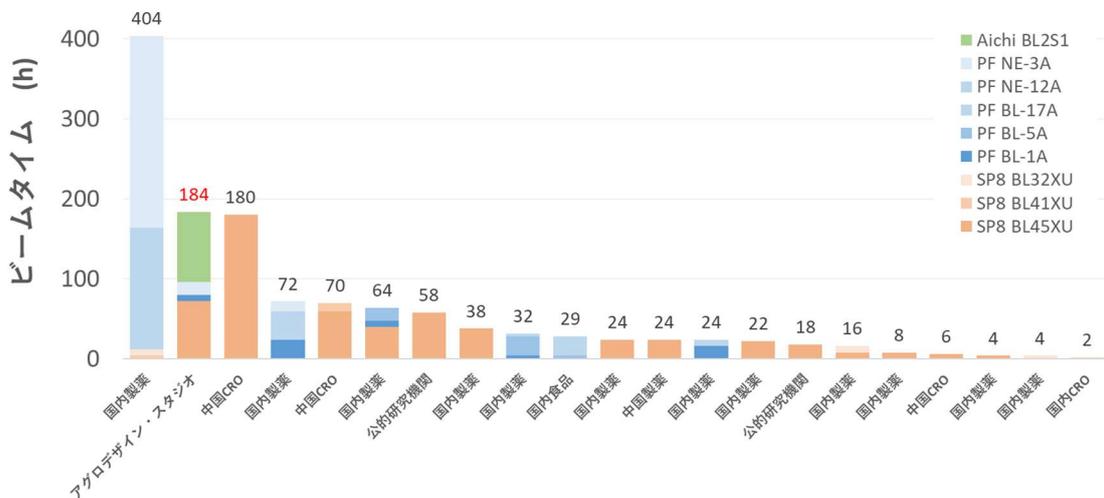


図4 国内放射光ビームライン成果占有(商用)測定時間数（2022年8月～12月）※公知情報より当社調べ

利用可能な放射光施設
国内3施設+海外2施設

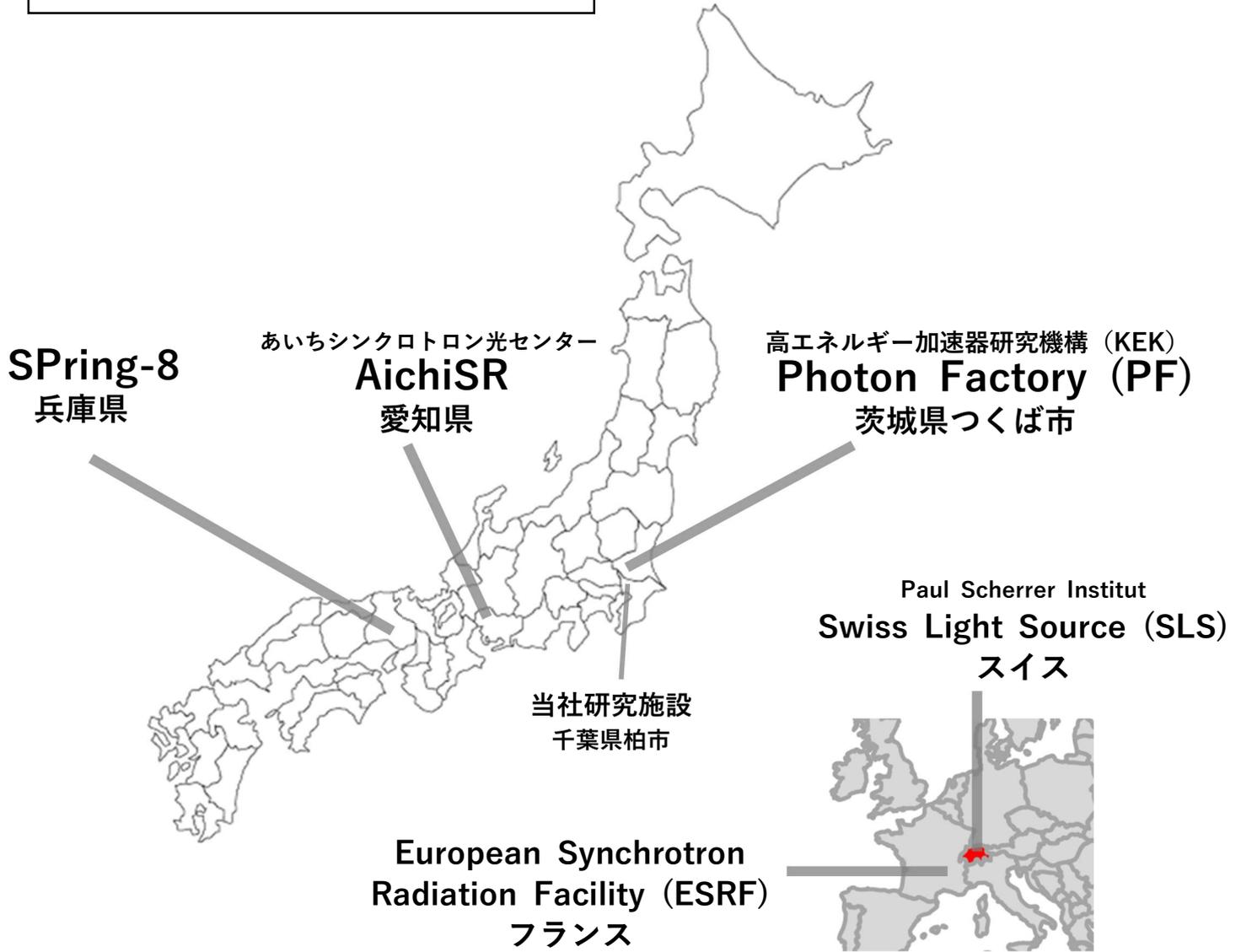


図 5 利用可能な放射光施設 (国内3施設+海外2施設)

豊富な構造解析の実績とノウハウ

当社にはX線結晶構造解析、クライオ電顕解析、溶液 NMR 解析、構造バイオインフォマティクスを専門とする構造生物学研究者 7 名（全員関連分野の博士号取得）が在籍しております。当社研究者は、アカデミア（大学など）在籍時だけでも、合計で 200 以上の構造解析に関わっており、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（KEK PF）での研究経験を有する者も複数在籍しており、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

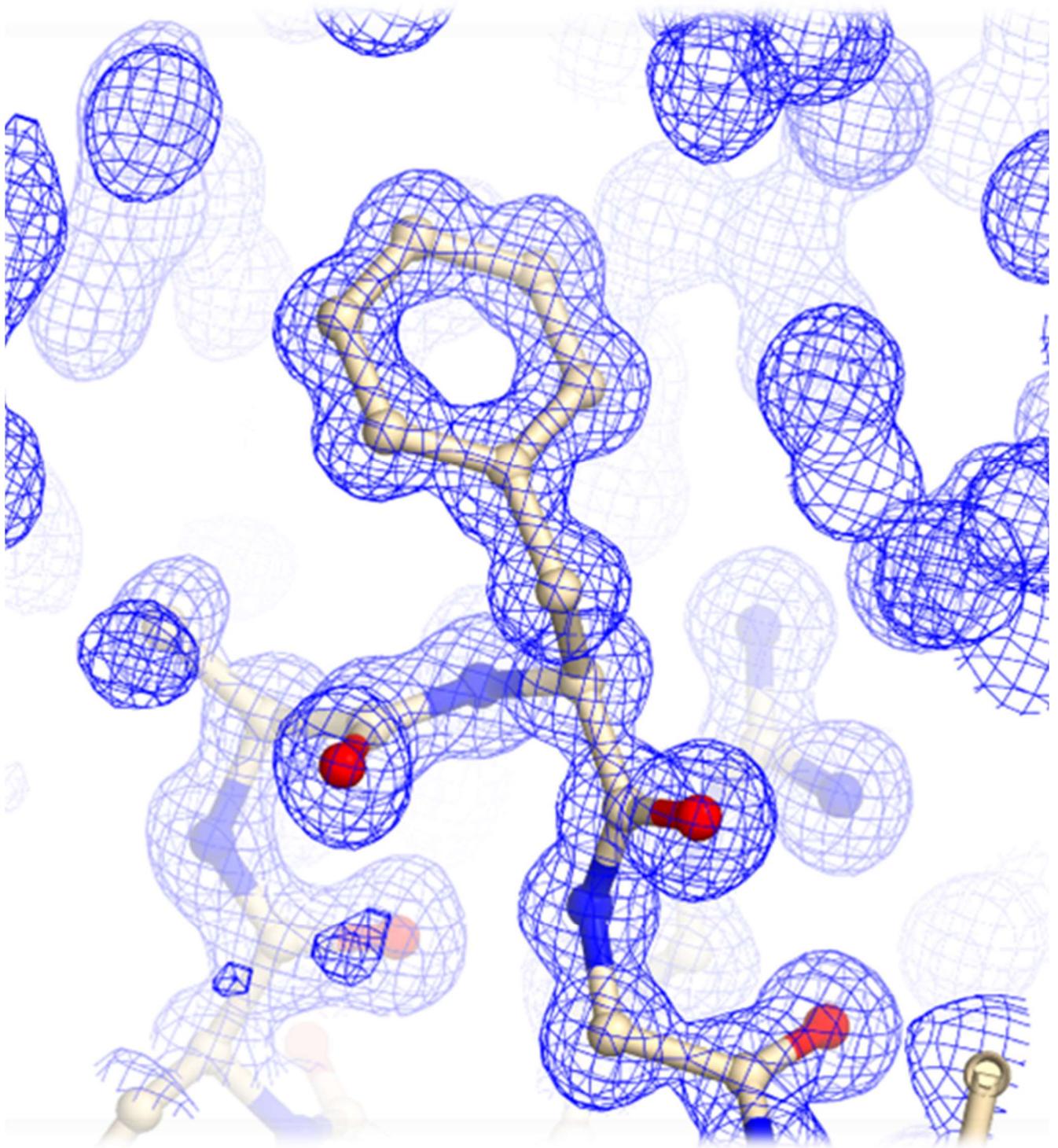
- 構造生物学研究者 7 名が在籍
- 自社創薬研究として SBDD を実施
タンパク質発現から構造解析、薬剤設計、相互作用解析まで可能（現在、構造解析のみサービス提供中です）
- 自社創薬の経験から、創薬に適した構造解析手法をご提案可能
- 年間 300 時間以上の豊富なビームタイムを確保
（2022 年度実績 334 時間）
- 国内外 4 放射光施設を併用し、年間通して測定が可能
- 多様なタンパク質などに対応可能
 - ✓ 可溶性タンパク質
 - ✓ 抗体
 - ✓ 膜タンパク質（LCP 結晶化は別途お問合せ）
 - ✓ 糖タンパク質
 - ✓ 核酸-低分子複合体（別途お問い合わせ）
- 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）
 - ✓ 溶液 NMR 解析（別途お問合せ）



研究画像ギャラリー *in silico* 創薬用コンピューター



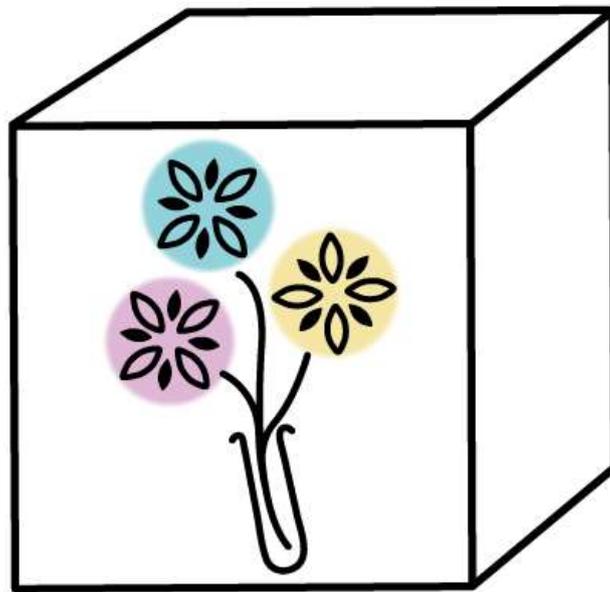
研究画像ギャラリー：SPring-8 の上空からの写真（羽田⇒岡山便）2024年4月当社撮影



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)

AgroBox[®]

タンパク質結晶構造解析の
トータルソリューションパッケージ



I. AgroBox®: 構造解析の実験をパッケージ化

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、当社が自社創薬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。

※タンパク質の発現精製のご依頼も可能です。サンプルに合わせた実験計画のご提案とお見積りをいたします。別途お問合せ下さい。

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（ご希望により、海外放射光を利用することも可能です）

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、必要に応じて政情が安定している国の放射光施設 [スイス Swiss Light Source (SLS) ※1、フランス European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) ※2] を利用します

※1 当社は SLS の認定サービスプロバイダーです。
 ※2 ESRF は、SLS のアップグレード工事期間中（2025年7月まで）に代替として利用可能です。

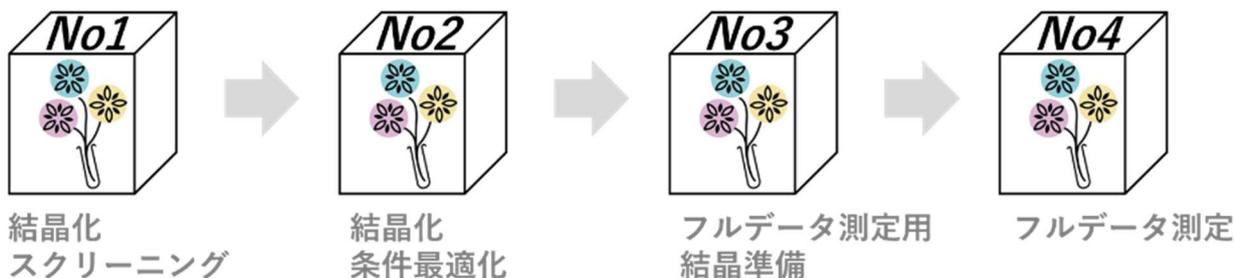


図 6 AgroBox®サービス概説

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VII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

(なお、当社がお客様のために発明を行うことは 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るため、当社が行う作業そのものには発明が生じる余地がありません。一方で、お客様のサンプル特有の条件によって、当社が取得したデータ

をもとに新たな発明を考案できる可能性はございます。当社が提供したデータはお客様に帰属されるため、それをもとに発明を行うことに制限はございません。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が

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。初回利用は、大幅割引が適用となるキャンペーンを実施中のため、ぜひ1度お試しください。

2. AgroBox®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(図6)。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(PX)】

- 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 (2 box 料金単位が必要)
- [AgroBox® Pro α 実験位相決定]



おすすめセット①～③ (タンパク質のみの構造解析)

BoxSet① 新規の構造解析セット (合計 6.5 box 料金単位)

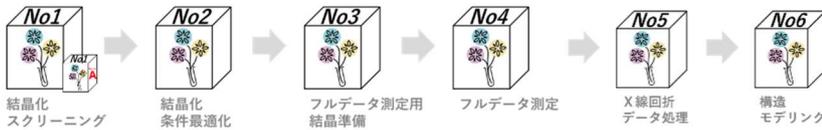
これまで構造解析が行われていないタンパク質の新規構造解析のためのセットになります。構造未知のタンパク質の場合は、結晶化条件も一切不明であるため、結晶化条件のスクリーニング (AgroBox® No.1) から行う必要があります。このセットでは、AgroBox® No.1～6 をセットにしておき、結晶化条件スクリーニングから構造モデリングまで一連の作業を行います。AgroBox® No.1 では、追加 BoxA も行い事により、結晶化の確実性を高めます。

AgroBox® No.1～6 の基本 Box + No.1 追加 BoxA

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：結晶化条件報告、測定生データ、PDB ファイル (タンパク質構造データ) など



BoxSet② 文献構造再現セット (合計 4 box 料金単位)

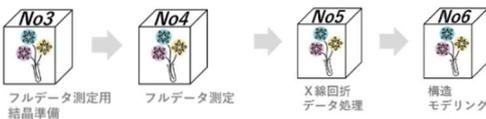
構造既知タンパク質で結晶化条件が論文などで公知なタンパク質で、AgroBox またはお客様側で再現性の確認がとれていない場合は、こちらのセットをご使用ください。当社にて論文情報を確認し、それに従い結晶化およびモデリングを行います。※論文購入・調査費用を含みます。

AgroBox® No.3～6 の基本 Box

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：PDB ファイル (タンパク質構造データ)



BoxSet③ 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)

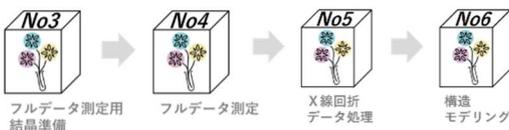
構造既知タンパク質の点変異体の構造解析をしたい場合は、このセットをご使用ください。お客様からご提供いただいた情報をもとに、結晶化およびモデリングを行います。

AgroBox® No.3～6 の基本 Box

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：PDB ファイル (タンパク質構造データ)



おすすめセット④～⑥ (タンパク質-リガンド複合体の構造解析)

BoxSet④ 新規構造+リガンド複合体解析[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。

AgroBox® No.1~7 の基本 Box+No.7 追加 BoxA
(※BoxSet①+BoxSet⑥と同等)

要ご準備: タンパク質溶液、低分子化合物 (阻害剤)

要情報提供: タンパク質のアミノ酸配列

納品物: PDB ファイル (タンパク質構造データ)



BoxSet⑤ 文献構造再現+リガンド複合体解析[6化合物分]セット (合計 8 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。

AgroBox® No.3~7 の基本 Box+No.7 追加 BoxA
(※BoxSet②+BoxSet⑥と同等)

要ご準備: タンパク質溶液、低分子化合物 (阻害剤)

要情報提供: タンパク質のアミノ酸配列

納品物: PDB ファイル (タンパク質構造データ)



BoxSet⑥ 構造解析済みタンパク質-リガンド複合体解析[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。

AgroBox® No.7 の基本 Box+追加 BoxA

要ご準備: タンパク質溶液、低分子化合物 (阻害剤)

要情報提供: タンパク質のアミノ酸配列

納品物: PDB ファイル (タンパク質構造データ)



3. AgroBox®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、糖たんぱく質など多様なタンパク質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きますが、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。

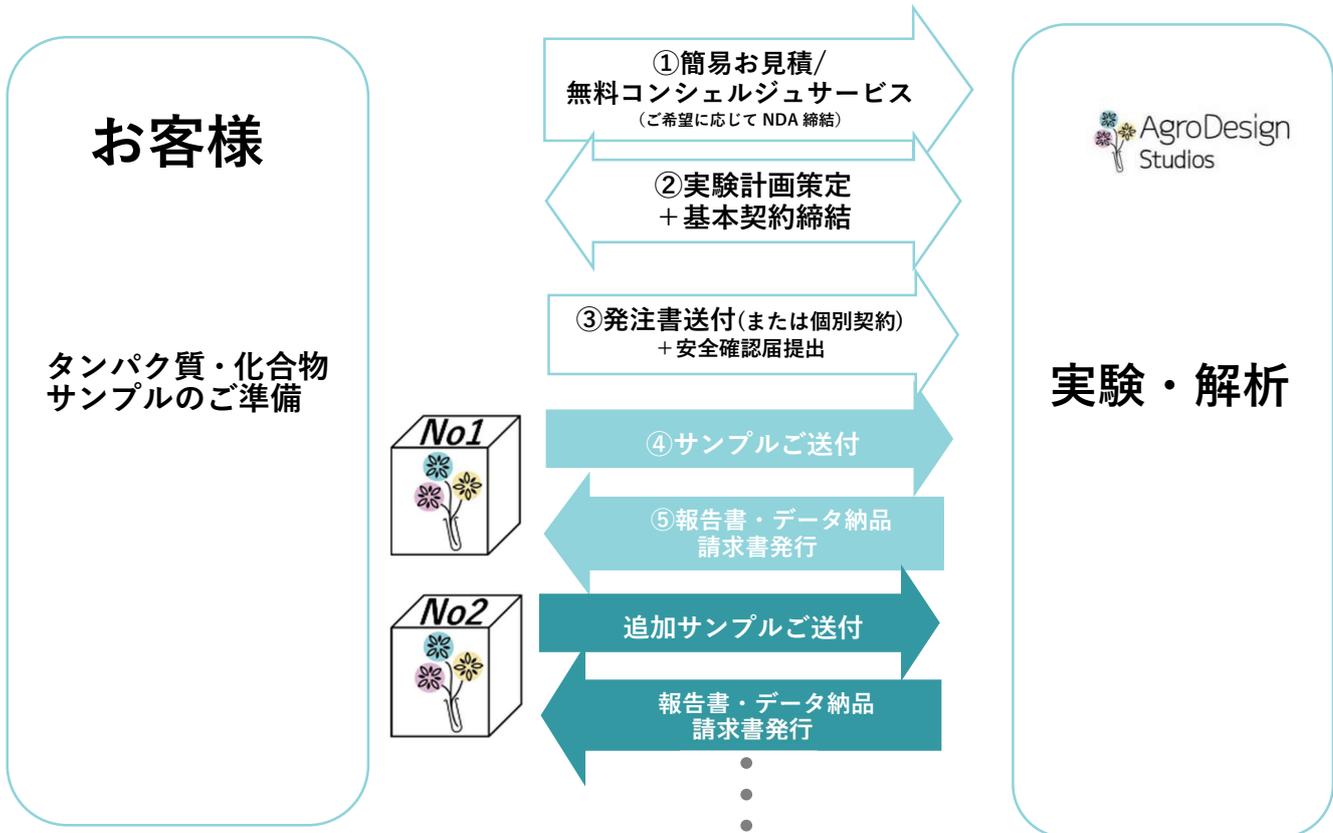


図 7 AgroBox のご利用方法

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）。

④サンプルご送付

タンパク質溶液は、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。

⑤報告書・データ納品

各 AgroBox®の作業が終わるごとに報告書、データの分割納品および請求書を発行いたします。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 メモリまたは Solid State Disk (SSD)）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）。データ容量サイズによっては、USB メモリ、ハードディスク（HDD）となることがあります。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。※テープドライブ形式での納品につきましては、現在準備中です。

【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きますが、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）

4. 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」は、一般的な生物の概念と異なり、ウイルスも含まれます^{*1}。ウイルスを用いた発現系（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、お客様側で任意の方法によりウイルスが含まれていないことを確認のうえ、安全確認届をご提出ください。

※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

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、昆虫、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サンプルの場合は、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。

●国立医薬品食品衛生研究所

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】

- 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 ₂	Uni-Puck AGG0001	1 本	5 mM 溶液をソーキング

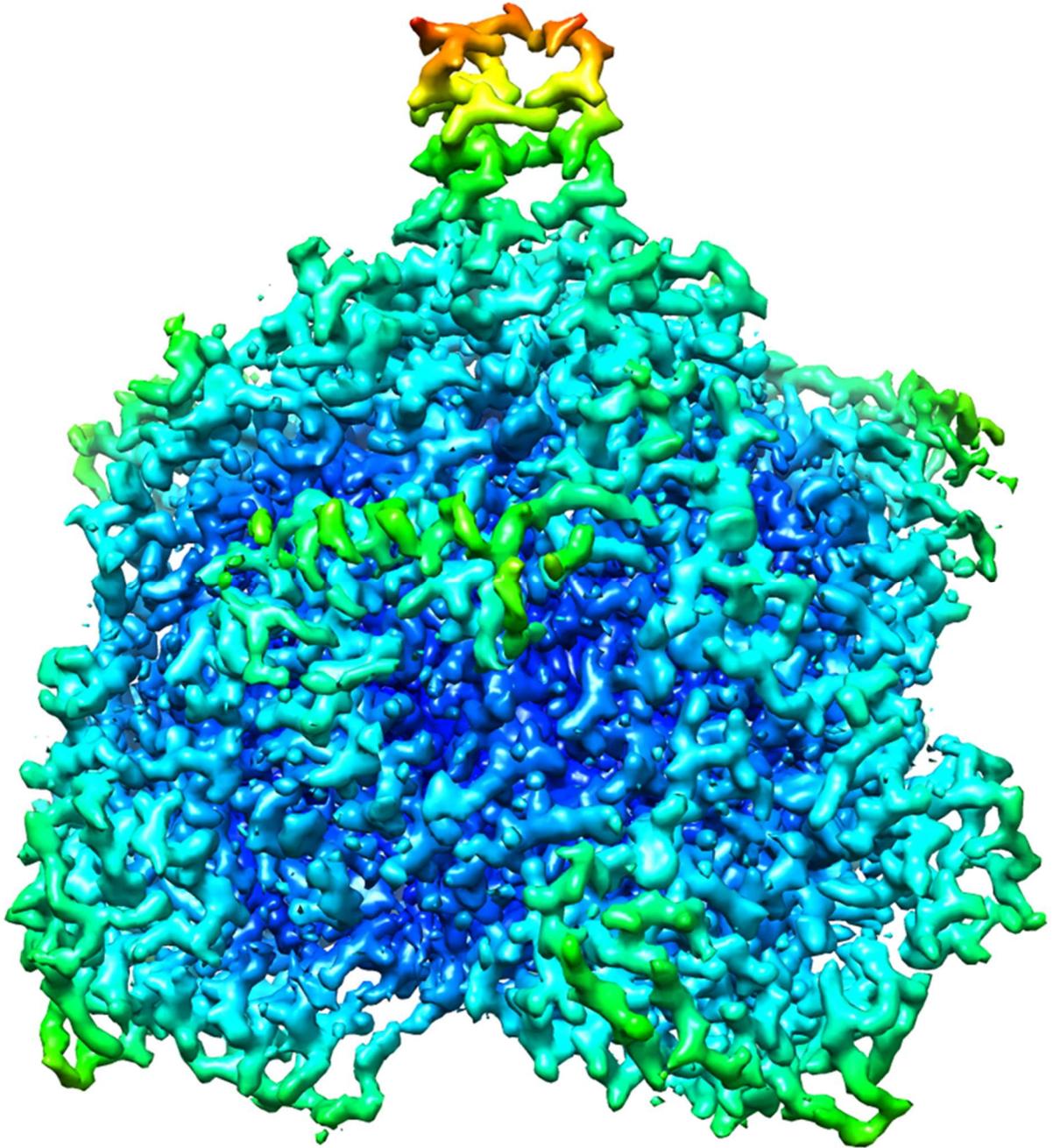
●提供試料中の『毒物及び劇物取締法 (毒劇法)』に該当する毒物、劇物、特定毒物 (以下『毒劇物』と略す) の有無。

【該当する場合、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	毒劇物を含む試料名 (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 8 安全確認届 ひな形

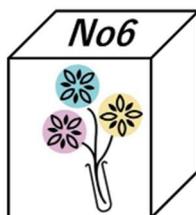
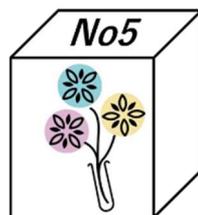
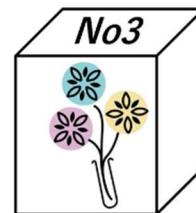
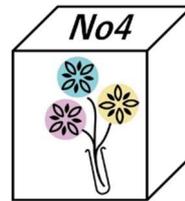
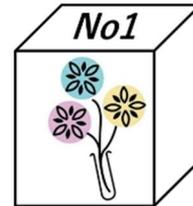


研究画像ギャラリー：農薬ターゲットタンパク質の高分解能クライオ電子顕微鏡構造（1.7 Å）

AgroBox[®]結晶構造解析

Protein Crystallization (PX)

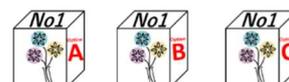
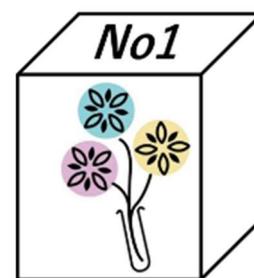
内容詳細



AgroBox® No.1 結晶化スクリーニング

まずは結晶を見出す

※精製されたタンパク質が必要です。



1. サンプル品質チェック

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

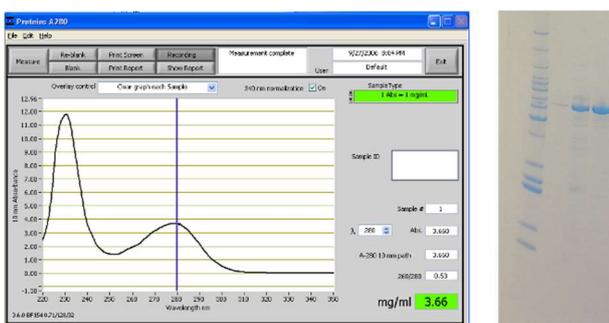


図 9 UV 計測と SDS-PAGE によるタンパク質サンプルの品質チェック

よび濃度の確認を行います (図 9)。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ると判明した場合、結晶化段階に進むか、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、単純な濃度不足の場合では、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)。

2. 一次結晶化スクリーニング

タンパク質結晶化実験として、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, B, C を選択いただけます。基本的には、20°C でシッティングドロップ蒸気拡散法を用いた結晶化スクリーニングを行います (96×5=480 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)。結晶化プレートは、結晶化ロボット (SPT Labtech 社製 mosquito) を用いて作成します (図 10)。480 条件のス

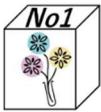
クリーニングを行うためには、10 mg/ml 以上の濃度のタンパク質溶液が 125 μl 必要になります (0.20 μl 分注)。

※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 10 タンパク質結晶化用ナノリッター分注機 mosquito Xtal3 (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）

	結晶化スクリーン 商品名	サプライヤー	溶液数	製品 No
1	Index	HAMPTON RESEARCH	96 条件	基本 Box 
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	セットで	追加 Box A 
	Stura FootPrint Screens	Molecular Dimensions	96 条件	
7	Cryo 1 および Cryo 2	Emerald Bio (RIGAKU)	96 条件	
8	Protein Complex	QIAGEN	96 条件	
9	PEGs II	QIAGEN	96 条件	
10	MIDASplus	Molecular Dimensions	96 条件	追加 Box B <small>(膜タンパク質の場合利用推奨)</small> 
11	MemGold	Molecular Dimensions	96 条件	
12	MemGold 2	Molecular Dimensions	96 条件	
13	MemStart & MemPlus	Molecular Dimensions	96 条件	
14	MemTrans	Molecular Dimensions	96 条件	
15	MemChanel	Molecular Dimensions	96 条件	
16	JBS-Membrane 1-4	Jena BioScience	96 条件	
17	PACT Premier	Molecular Dimensions	96 条件	追加 Box C 
18	Morpheus	Molecular Dimensions	96 条件	
19	The BCS Screen	Molecular Dimensions	96 条件	
20	The PGA Screen	Molecular Dimensions	96 条件	
21	ProPlex Screen	Molecular Dimensions	96 条件	
22	LMB Crystallization Screen	Molecular Dimensions	96 条件	

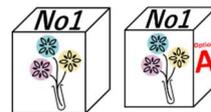
※任意のスクリーニングキットをご選択いただく事も可能です（別料金）。

【スクリーニング溶液おすすめ組み合わせ】

●SATOH セット（基本 Box+追加 Box A）



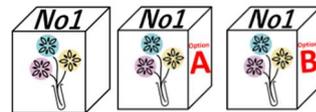
結晶化に関わったタンパク質は 70 種以上、結晶ソムリエ SATOH の異名を持つ私を選んだセットです。可溶性タンパク質が対象なら最もお勧めできます。もちろん基本 Box だけでも十分結晶が出る可能性はありますが、追加 Box A を加えることで、結晶化実績の豊富な溶媒条件が一度にスクリーニングできます。ぜひお試しください！



●YOSHIKI セット（基本 Box+追加 Box A & B）



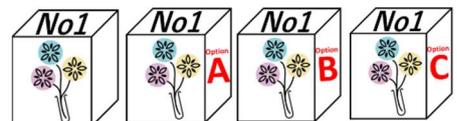
膜タンパク質のスペシャリスト、結晶マジシャン YOSHIKI のおすすめセットはこれです！特に追加 Box B は膜タンパク質に適した溶液条件が多く含まれています。これで膜タンパク質も怖くない！もちろん可溶性タンパク質にもおすすめです。



●SIMON セット（基本 Box+追加 Box A & B & C）



多数の難しいタンパク質の結晶化に成功してきたワタクシ結晶スナイパー SIMON のおすすめセットは、もちろんフルセットです！Little bit 追加費用は掛かりますが、ワタクシなら余計なことは考えずに全条件が一度に試せるこのセットにフルベットです！追加 Box C は、ユニークな溶媒条件ばかりですが、これらの条件でしか出ない結晶があることを経験しています。これならどんなタンパク質でもイチコロです！



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、タンパク質結晶だけではなく、結晶と見間違える沈殿や、沈殿剤などに含まれる塩の結晶が生じる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 11）。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、結晶化プレートの保存期間は最大2か月としております。

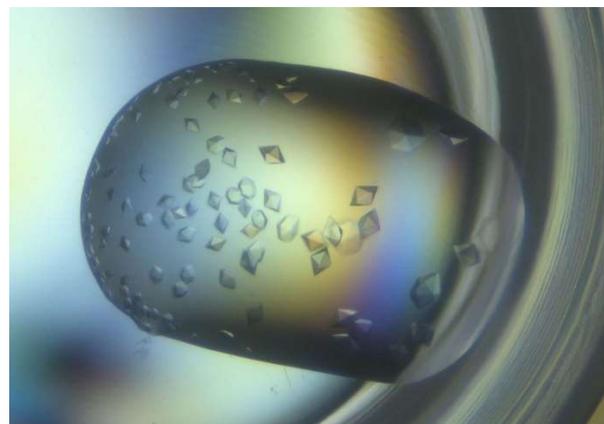


図 11 結晶観察

4. 結晶品質チェック（ループ測定/*in situ*プレート測定）

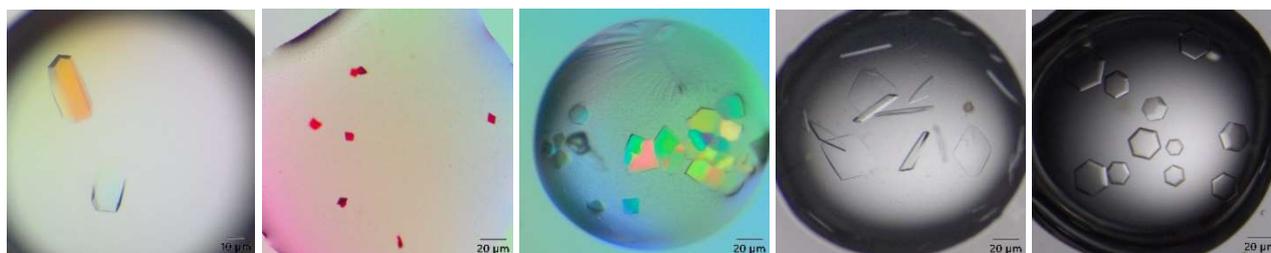
結晶化スクリーニングにより結晶が得られた場合は、X線照射によって結晶の質（分解能、回折点の形状、モザイク性など）を確認します。結晶の品質チェックには、結晶をループですくって凍結させる通常的手法と、結晶が生成した結晶化プレートに直接X線を照射する*in situ*プレート測定法があります。結晶の数やビームタイムの確保状況によって、ループ法と*in situ*プレート法を使い分けて測定を行います。

ループ法の場合、ループを用いて結晶の回収を行った後、結晶を凍結し、SPring-8、KEK/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（結晶を回転させずに1~2点のみ測定）により結晶の評価を行います。一般的にループ法の方が、データの質は良くなります。

（AgroBox® No2~4 をご購入の場合は、ループ法にて十分な回折点を得られた場合にフルデータ測定を行う場合があります。）

*in situ*プレート法では、KEK/PF・BL17A ビームラインを用いて、結晶化プレートに直接X線を照射します。PF BL17Aは、高輝度[1.5×10^{11} photons/s (0.98 Å)]かつ、微小なビームサイズ[0.040 mm (H) x 0.016 mm (V)]でX線を照射できるマイクロフォーカスビームラインであるため、*in situ*プレート測定に適しています。

以上の測定から、当社研究者がAgroBox® No.2の「結晶化条件最適化」に進める適切な結晶化条件を選び出します。



[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 12 『*in situ*プレート測定法』の活用により、短期間（2~4週間程度）で高分解能構造解析に成功したタンパク質結晶

AgroBox® No.1 サービス内容



基本 Box (480 条件) 【1box 料金単位必要】

結晶化ロボット (Mosquito) を用いて、結晶化実績が高い基本 Box の 5 キット (9 6 ウェルプレート 5 枚分、表 1 参照) による計 480 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。最終的にそれら結晶は、ループ法または放射光施設にてプレートに直接 X 線を照射する *in situ* プレート測定法を用いて、最大 25 条件の結晶品質チェックを行います。

ご用意いただくもの：

・5 キット (5 プレート) 分の結晶化には、1.25 mg 以上のタンパク質溶液をご用意ください (10 mg/ml を 125 μ l 推奨) をご用意ください。※タンパク量が足りない場合は、ご相談ください。この半分で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
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

追加 Box A, B, C (各 480 条件以上追加) 【1box 料金単位必要】

基本 Box に加えて、追加 Box 1 つにつき 480~576 条件 (9 6 穴プレート 5~6 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。1Box につきループ法または *in situ* 測定法にて最大 25 条件の結晶品質チェックを行います。

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 125 μ l (1.25 mg)。

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
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

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

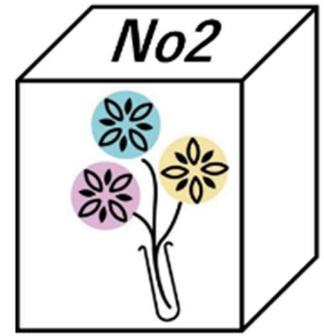
AgroBox® No.1
タンパク質 1.25 mg 以上 をご用意ください

※ご用意が難しい場合はご相談ください。

AgroBox® No.2 結晶化条件の最適化

結晶の質を向上させる

※精製されたタンパク質が必要です。



1. 二次結晶化スクリーニングおよび結晶観察

AgroBox® No.1 の 1 次結晶化スクリーニング条件をもとに、さらに詳細な条件検討を行い、結晶の質を向上させます。一次結晶化スクリーニングだけでは、ほとんどの場合は質の良い結晶を得ることができません。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う必要があります。一般的には、一次結晶化スクリーニングで多数の結晶化条件で結晶が生成していた場合、どの条件に絞れば良いかの判断がつかず、二次結晶化スクリーニングの量も膨大な数を行う必要があります。結晶の「見た目（大きさや形）」と「質（分解能や結晶性）」は、必ずしも関連しないからです。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行い続けることとなります。一方、本サービスでは AgroBox® No.1 の結晶品質チェック（X 線回折のスナップ測定）の結果に基づき、二次結晶化スクリーニングを行うため、効率的かつ迅速な条件最適化が可能になります。これに加えて、当社研究者の豊富な経験に基づき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 にて溶液を調製するため、極めて高い成功率が

期待できます。

具体的な作業は以下の通りです。一次結晶化スクリーニングおよび品質チェックの結果に基づき、当社研究者が 1 プレート分の 96 条件の結晶化溶液マトリックス溶液(pH、沈殿剤、塩濃度など)をデザインおよび調製し、二次結晶化スクリーニングプレートの作成と定期的な結晶観察を行います(図 13)。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(AgroBox® No.1)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 種類の元溶液の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(任意の温度をご希望の場合は、別途ご相談ください)。96 条件のスクリーニングを行うためには、5 mg/ml 以上の濃度のタンパク質溶液が 25 μ l 必要になります(0.20 μ l 分注)。

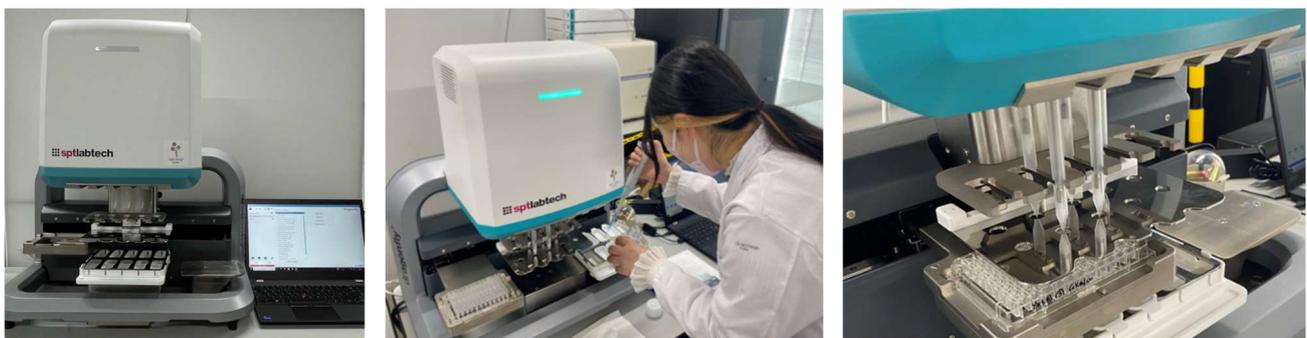


図 13 バッファー自動調製システム dragonfly discovery (SPT Labtech 社製) を用いた結晶マトリックス溶液調製

2. 結晶品質チェック(ループ測定/*in situ* プレート測定)

一次結晶品質チェック (AgroBox® No.1) と同様に、ループ法または *in situ* プレート測定法により結晶の質の評価を行います。どちらの方法を使うかは、ビームタイムのスケジュールなどから最短で結果をお返しできる手法を当社研究者が選択いたします。

ループ法の場合、ループを用いて結晶の回収を行った後、結晶を凍結し、SPring-8、PF、AichiSR、SLS、ESRF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 (結晶を回転させずに1~2点のみ測定) により結晶の評価を行います。※AgroBox® No2~4 をご購入の場合は、ループ法にて十分な回折点が得られた場合にフルデータ測定を行う

場合があります。

in situ プレート法では、PF・BL17A ビームラインを用いて、結晶化プレートに直接X線を照射します。PF BL17Aは、高輝度 [1.5×10^{11} photons/s (0.98 Å)] かつ、微小なビームサイズ [0.040 mm (H) x 0.016 mm (V)] でX線を照射できるマイクロフォーカスビームラインであるため、*in situ* プレート測定に適しています。

以上の測定から、当社研究者が AgroBox® No.3 の「フルデータ測定用結晶準備」に進める適切な結晶化条件を選び出します。

AgroBox® No.2 サービス内容



基本 Box (96 条件) 【1box 料金単位必要】

1 プレート (96 条件) の結晶化溶液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。

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 μ L 推奨)。※タンパク量が足りない場合は、ご相談ください。この半分で実施できる可能性があります。

追加 Box A (96 条件追加) 【0.5box 料金単位必要】

追加で1プレート分 (96 条件) の結晶化溶液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、最大で20種の結晶の品質チェックを行います。

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

※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

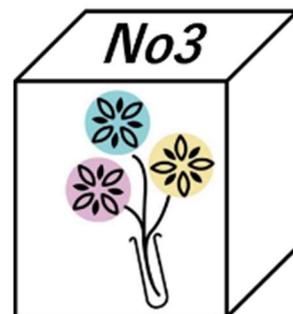
※ご用意が難しい場合はご相談ください。

AgroBox® No.3 フルデータ測定用結晶の準備

測定用結晶の凍結

※精製されたタンパク質が必要です。

※AgroBox® No.3~6 を合わせてご購入することをお勧めします。



AgroBox® No.2 の結果に基づき、測定に必要なクライオ条件の検討と結晶の凍結保存を行います。

1. 結晶化&結晶観察

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 の結晶品質チェックで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、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。本サービスでは、5 mg/ml 以上の濃度のタンパク質溶液が 50 μ l 必要になります (0.50 μ l 注)。タンパク質サンプル量の削減をご希望の方は、ウェル数を削減して結晶を仕込むことも可能です。

2. 結晶凍結(クライオ条件検討含む)

結晶構造解析に用いる放射光は高いエネルギーを持っているため、放射線損傷が問題となります。放射線損傷を受けると結晶中の分子の並びが乱され、回折測定が出来なくなります(常温で測定することもあります、その場合1つの結晶からデータを取れるのは10°程度)。放射線損傷を防ぐため、測定の際には結晶は極低温(100 K)の窒素ガス気流中で凍結されます。凍結の際に水が結晶性の氷に成長するとノイズの原因になるだけでなく、タンパク質結晶の破壊にも繋がります。そのため、抗凍結剤を加えてアモルファス状の氷になる条件で結晶を回収します。抗凍結剤となるのは有機溶媒や高分子(グリセロール、エチレングリコール、2-Methyl-2,4-pentanediol、Polyethylene Glycol)、糖類(トレハロース、スクロース)などがよく使われます。生じた結晶から形状の良い32個を選び、測定用ループを用いた結晶の回収と液体窒素凍結を行います。この時、結晶化溶液の組成によっては、氷が生じて測

定のノイズとなってしまいます。そのため、結晶を抗凍結剤(クライオプロテクタント)に浸します。抗凍結剤には結晶との相性があり、相性が悪いと結晶が壊れることがあるため、結晶化溶媒条件に基づき、3種類(グリセロール、エチレングリコール、PEG400など)のクライオプロテクタントを調製して、結晶の凍結条件の検討を行います。その後、32個までの単結晶を液体窒素により瞬間凍結し、測定日までUni-Puck(MiTeGen社製)に入れた状態で液体窒素保存します。

これら作業する際は、結晶回収用Pinの先に取り付けられている極小のナイロンループ(輪っか)に溶液中の結晶をひっかける作業(フィッシング)をする必要があります。この作業は顕微鏡下で行う必要があります、熟練の技術が必要です(初心者が行くと霜がつくなどして、測定データが悪化します)。当社には、結晶構造解析10年以上の経験者が多数在籍しております。安心してお任せください。



図 14 結晶サンプリング

タンパク質の結晶化は、専用プレートにタンパク質と沈殿剤を混合した溶液を仕込み、20°Cなどの定温環境で数日～数週間インキュベートを行います。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。十分な大きさの結晶が生じたら、ループがついたピンで結晶を拾い（フィッシング作業）、液体窒素にて凍結および保存を行います。結晶は、必要以上に長時間インキュベートすると劣化を招くため、当社研究者の判断で適切な時期にサンプリングいたします。この一連の作業は、熟練の技術が必要であり、作業者の経験によって測定結果が変わってきます。例えば、タンパク質結晶は、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さる、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。凍結作業については、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溶液から抗凍結剤溶液に置換した後、液体窒素に漬けて瞬間凍結します。凍結した結晶は、サンプルピン保管容器（Uni-Puck）を用いて保存します。Uni-Puckは、世界中の放射光施設の結晶マウントシステム（結晶交換ロボット）に対応しているため、ドライシッパーを使い液体窒素冷却したまま放射光施設へ送ります。

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。
 ※結晶化条件数×クライオ条件数（3 種）×同条件の結晶複数回収
 = 結晶 32 個（Uni-Puck 2 個分）まで結晶の凍結を行います。

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 μ L 推奨）。※タンパク量が足りない場合は、ご相談ください。この半分で実施できる可能性があります。

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。

納品物：

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

※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。

AgroBox® No.4 フルデータ測定

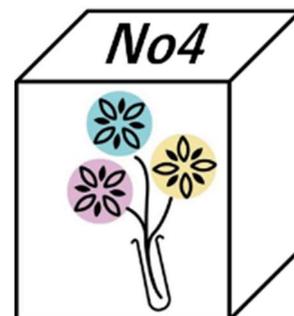
放射光施設で回折実験

※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。

※データ測定代行のみご希望のお客様は、別途お問合せ下さい (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, SLS/ESRF)

作成したタンパク質結晶は、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。X 線測定のためのビームタイム (測定割当時間) は、1 年を通してほぼ毎週確保しています。放射光施設としては、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、これら 2 施設が運転休止中の夏期および春季は、海外の Swiss Light Source (SLS) を利用します {2025 年 7 月までは、SLS が建替え中のため、European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) を利用します}。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 (SLS 利用の場合も追加料金は不要です)。基本 Box1 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 (無料オプション: お客様希望時)

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、スイスの SLS またはフランス ESRF もご利用が可能ですが、『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、SLS、ESRF 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 \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 \AA)。創薬用であれば 2.0 \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

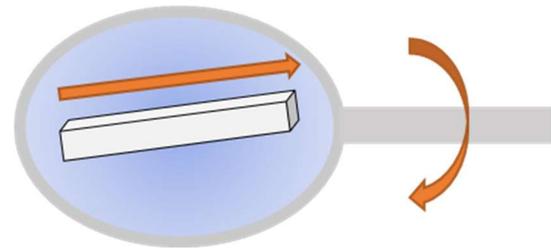
の構造が他放射光施設で解析済みで、その分解能が 2.0 \AA を切るような場合は、ご選択ください。



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 μm 以上ある場合には、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。

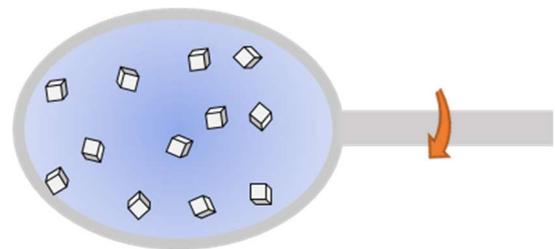


4. 小さな結晶：マルチモード測定（無料オプション：SPring-8 のみ可）

結晶サイズが 50 μm 未満または 1 つの結晶のみをループに回収するのが困難な場合には、マルチモードでの測定が有効です。一つのループに 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。測定手法は得られている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

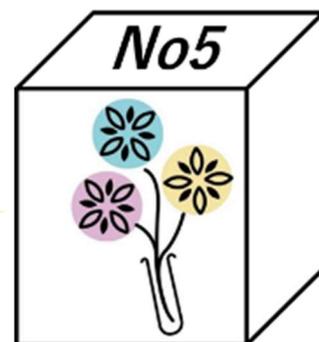
※価格は、別途価格表をご覧ください (<https://agrobox.jp>)。

AgroBox® No.5 X線回折データ処理

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 15）。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。

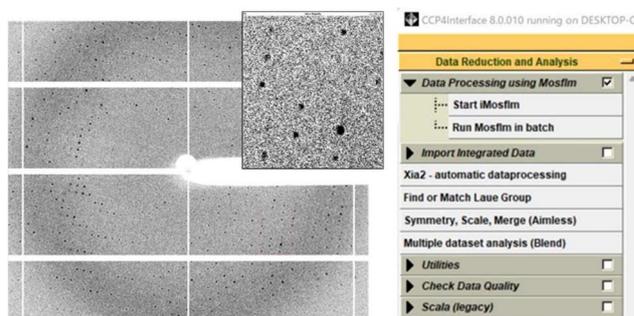


図 15 XDS、CCP4 を用いた X 線回折像のデータ処理

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共に、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>)。



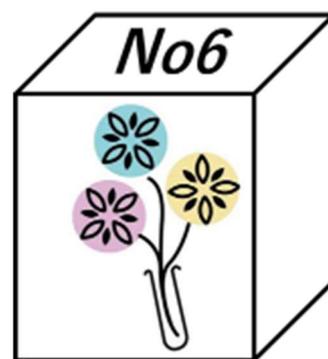
研究写真ギャラリー：ハスモンヨトウ幼虫 (蛾の仲間：重要な農業害虫)

AgroBox® No.6 構造モデリング

構造を見える形へ

※タンパク質のアミノ酸配列情報のご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

アミノ酸配列情報をご提供頂くことで、分子置換法による構造決定、タンパク質部分の構造精密化を行います。まず、ご提供いただいたアミノ酸配列をもとに、Protein Data Bank (PDB)に登録されている類似のタンパク質構造データ（サーチモデル）を探し、そのデータを利用して初期位相決定を行います。サーチモデルの探索は、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）。分子置換法に利用できる類似構造

が PDB に登録されていない場合は、当社で計算機による予測構造を用意し、サーチモデルとして利用いたします。類似構造が存在せず、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 α 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構造がある場合、必要に応じ、ご提供いただく事も可能です。

2. 分子置換法による初期位相決定とモデリング

初期位相決定および電子密度にアミノ酸残基を当てはめるモデリングを実施します（図 17、図 16）。CCP4 パッケージや Phenix に含まれるソフトウェアを使用し、分子置換法による初期位相決定と立体構造モデリング、構造精密化を行います。構造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。

論文グレード（追加 Box A）

追加 Box A をご購入いただくことでタンパク質全体を含めた高クオリティの構造精密化を実施いたします。具体的には、豊富な論文発表経験をもつ研究者が全てのアミノ酸残基をモデリングし、ラマチャンドラプロット、MolProbity スコア、R/Rfree 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のデータをご提供します。PDB 登録サポートも致します。



図 17 当社の構造生物学研究者による構造モデリング

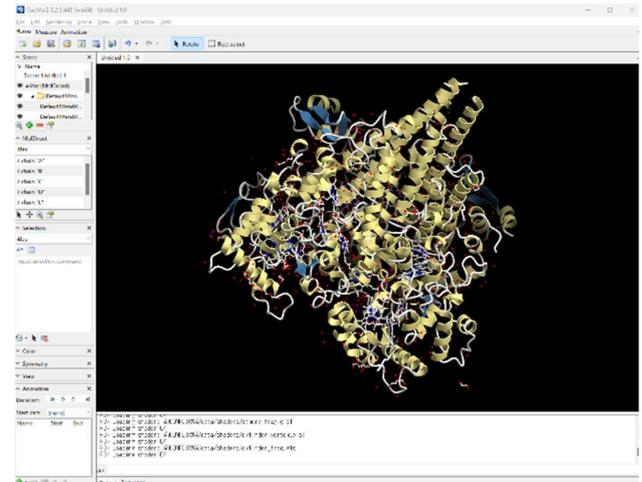


図 16 タンパク質構造の CueMol (<http://www.cuemol.org>) による表示。構造モデリングが完了すると分子ビューワーにて表示可能なファイル形式となる。

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）のアミノ酸残基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

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）【2 box 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全てのアミノ酸残基をモデリングし、ラマチャンドラプロット、MolProbity スコア、R/Rfree 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。タンパク質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。

追加サポート内容

- ・構造全体の精密化
- ・PDB 登録サポート

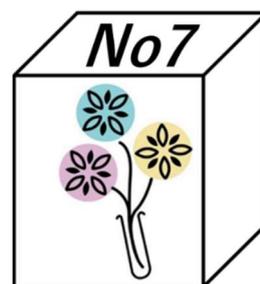
注：タンパク質サイズの制限は特に設けておりませんが、超高分子量のタンパク質に関しては追加料金が発生する可能性があります。

※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 3box 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

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が実施済み、またはお客様側で構造解析済みの場合にご利用可能です。

構造ベース創薬 (Structure-Based Drug Design : SBDD) 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。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、あらかじ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、結晶のパッキングの状況によっては、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。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。

2. フルデータ測定からモデリングまで

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います。利用可能な施設は、SPring-8、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (KEK/PF)、AichiSR、Swiss Light Source (SLS) の4か所です。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 (シングル、

ヘリカル、マルチ) 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 15 Å 以内) の構造精密化を行います。※海外放射光 Swiss Light Source を利用した場合も、追加料金は不要です。

AgroBox® No.7 サービス内容



基本 Box (2 化合物) 【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 つ分)、結晶凍結 (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 個分の合計 16 個の結晶を測定いたします。

※本 Box は、2 box 料金単位分の料金になります。

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 μ L (タンパク質 0.3 mg)
 - 追加 Box A : タンパク溶液 30 μ L (タンパク質 0.3 mg)
- ・DMSO 溶解化合物 10~100 μ 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。

追加 BoxA (4 化合物) 【2 box 料金単位必要】

基本 Box で決定した複合体結晶の調製条件を利用し、追加 4 化合物の複合体結晶の結晶化 (96 穴プレート 2 つ分) (4 化合物×4 結晶=16 個) の測定と解析を行います。Uni-Puck1 個分の合計 16 個の結晶を測定いたします。

別途ボリュームディスカウント用追加 Box もあります。

※本 Box は、2 box 料金単位分の料金になります。

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)

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

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 化合物に対してソーキング/共結晶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 (または 384 穴プレートの一部) 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

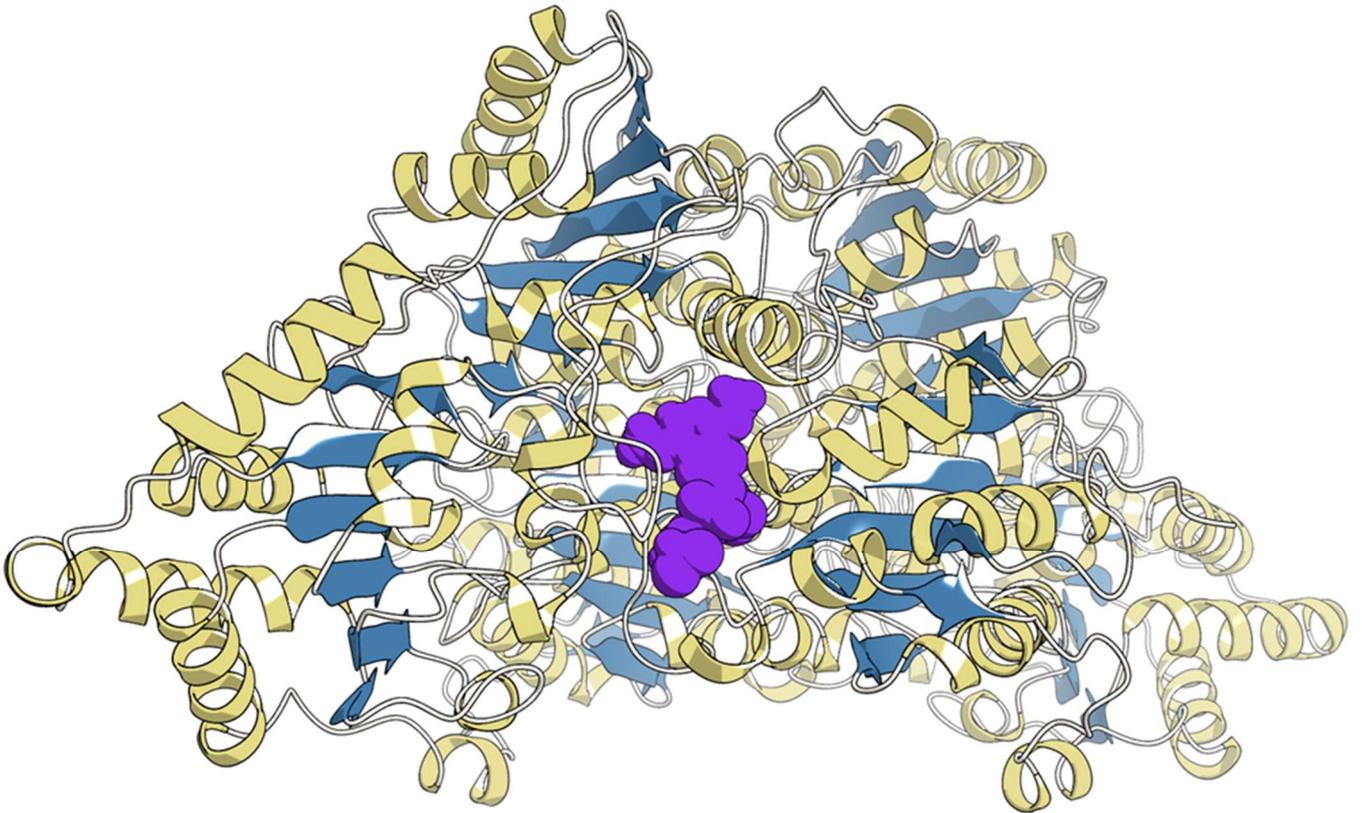
追加 Box C (384 穴プレート)

最大 384 化合物に対してソーキング/共結晶構造解析を行います。対象となるタンパク質は 1 種です。384 穴プレートに 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

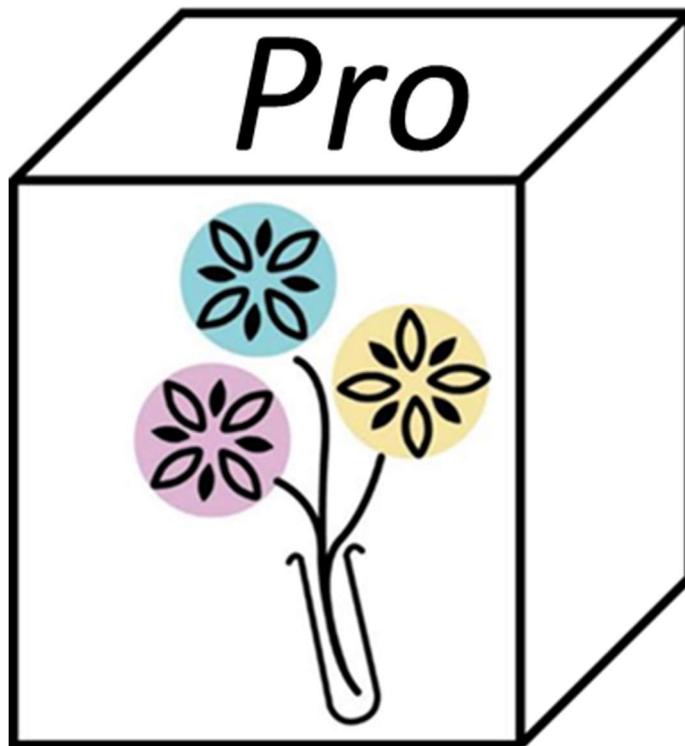
※ご用意が難しい場合はご相談ください。



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

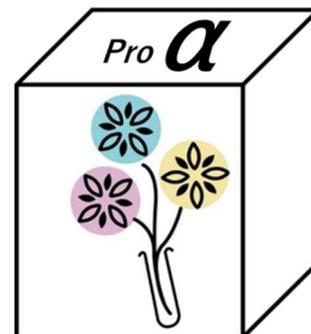
AgroBox[®] Professional

(高難度実験用 AgroBox)



AgroBox® Pro α 実験位相決定

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ますが、それにはいくつかの手法があります。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) 法などが代表的な位相決定方法となっています。いずれの方法においても、タンパク質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

鉛・銅・鉄などの金属を含む結晶化タンパク質の場合、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 (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、水銀など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（セレノメチオニン置換体）

セレノ置換アミノ酸（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化を行う方法もあります。この場合、セレンを含むアミノ酸位置を特定でき、モデル構築にも有用な方法となります。

金属タンパク質ではない場合（S-SAD 法）

S-SAD 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、結晶の大きさ、分解能、対称性が高い空間群など、使える条件は限定されます。

3. サンプルの準備

金属タンパク質の場合

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（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手法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製します。

金属タンパク質ではない場合（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点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、今後販売予定です。

金属タンパク質ではない場合（S-SAD 法）

通常通りの結晶化を行います。

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。

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、 α ヘリックスや β シートなどの二次構造、重原子の電子密度など

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。

今後販売予定の AgroBox®



【X 線結晶構造解析】

- ・結晶フィッシング代行
- ・膜タンパク質構造解析

【タンパク質発現・精製】

- ・大腸菌発現系
- ・バキュロウイルス-SF9 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

※一部のタンパク質発現系は、現在でも個別対応可能です。別途お問合せ下さい。

【Swiss Light Source サービス代行】

- ・フラグメント・スクリーニング
- ・常温 X 線回折測定

【溶液 NMR 解析】

- ・¹⁹F NMR (相互作用解析)
- ・NMR によるタンパク質の相互作用解析
- ・タンパク質の NMR 構造解析(30 kDa 以下)

※溶液 NMR 解析は、現在でも対応可能な場合があります。別途お問合せ下さい。

【*in silico* 解析】

- ・ファーマコフォアサーチ
- ・ドッキング・シミュレーション
- ・分子動力学計算 (Molecular Dynamics)
- ・フラグメント分子軌道法 (FMO)

【その他】

- ・Octet (相互作用解析)
- ・蛍光偏向スクリーニング用分子プローブ設計
- ・クライオ電顕解析
- ・生化学アッセイ(キットが販売されているもの)

※クライオ電顕解析は、現在でも対応可能な場合があります。別途お問合せ下さい。



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	AgroBox®
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&ラボ)</small>
会社 Web	https://www.agrodesign.co.jp
AgroBox® web	https://agrobox.jp
E-mail	AgroBox®のお問合せ：sales@agrobox.jp、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。



ホンザキュキノシタ：創業の地、つくば市（筑波山）の固有種。筑波山またはつくば実験植物園にて満つことができます。（当社ロゴは、この花を図案化したしました）

2024年

European Synchrotron Radiation Facility 測定代行開始！



年間通し X 線結晶測定を可能に

【第4世代放射光施設をいち早くご利用可能に！】

国内放射光施設が運転休止中の9月に豊富なビームタイムを確保しました。
測定代行を Uni-Puck1 個（結晶 16 個）からお受付しています。

AgroBox のご利用時は、追加料金なしでご利用可能です。

詳しくは web で (<https://agrobox.jp>)

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

【Web】 <https://agrobox.jp>

【E-mail】 sales@agrobox.jp



X (旧 Twitter) @agrobox_

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よりお問い合わせください。また、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・スタジオの著作物となります。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。

©2023-2024 AgroDesign Studios®. All rights reserved.