

# C-Kit Ground Pro XRD [X-ray Diffraction Kit]

## 取扱説明書

2024 年 6 月

株式会社コンフォーカルサイエンス

## 目次

1. はじめに.....	4
1.1. 概要.....	4
1.2. 本キットの特長.....	5
2. 本キットで使用する結晶作成法の原理.....	6
2.1. カウンターディフュージョン法 (CD 法).....	6
2.2. 拡散対浸透濃縮法 (DPOC 法).....	7
3. 実験操作マニュアル.....	8
3.1. CD 法による結晶作成のセットアップ.....	8
3.1.1. ご用意いただくもの (結晶化 1 条件、キャピラリー1 本分として).....	8
3.1.2. ゲルチューブの pre-soaking (数日前).....	9
3.1.3. 事前準備 (充填前).....	10
3.1.4. 充填作業.....	11
3.2. DPOC 法による結晶作成のセットアップ.....	14
3.2.1. ご用意いただくもの (結晶化 1 条件、DPOC 容器 1 本分として).....	14
3.2.2. DPOC 容器の pre-soaking (数日前).....	15
3.2.3. 事前準備 (充填前).....	15
3.2.4. 充填作業.....	16
3.3. CD 法キャピラリーからの結晶の取出し.....	19
3.3.1. ハーベスト溶液の準備.....	19
3.3.2. キャピラリーの切断.....	19
3.3.3. 結晶の取出し.....	19
3.4. DPOC 容器からの結晶の取出し.....	21
3.4.1. ハーベスト溶液の準備.....	21
3.4.2. DPOC 容器の切断.....	21
3.4.3. 結晶の取出し.....	21

3.5. 結晶の凍結処理.....	22
4. 技術資料.....	23
4.1. 溶液成分濃度の時間経過.....	23
4.1.1. CD 法.....	23
4.1.2. DPOC 法.....	25
4.2. CD 法と DPOC 法の使い分け.....	27
4.2.1. CD 法は高分解能結晶が得られやすい.....	27
4.2.2. CD 法はタンパク質試料中の低分子量成分の影響を受けにくい.....	27
4.2.3. DPOC 法は共結晶時のリガンド量が少ない.....	27
4.2.4. CD 法はソーキングが簡単.....	28
4.3. 結晶化条件の決め方.....	29
4.3.1. 結晶化条件が未知のタンパク質試料.....	29
4.3.2. 結晶化条件が報告されているタンパク質試料.....	30

## キット内容 (CRT101-1)

品名	個数	説明
キャピラリー (φ0.5 mm×47 mm)	15	CD 法結晶化で使用。ゲルチューブは予備品 3 個を含みます。
ゲルチューブ (φ1.0 mm×1 cm)	18	
DPOC 容器	8	DPOC 法結晶化で使用。
C-Cap	16	
シリコンチューブ (φ1.0 mm×50 cm)	1	試料を吸引する際に使います。
シーリングコンパウンド	1	キャピラリーや DPOC 容器の封止に使います。
ラウンドチューブ (5 mL)	23	充填したキャピラリー、DPOC 容器の保管用です。

## 使用上の注意

- 本キットは試験研究用です。目的以外には使用しないで下さい。
- キャピラリーはゲルチューブ装着時など、破損する恐れがあります。けがをしないようご注意ください。
- 本商品は宇宙航空研究開発機構 (JAXA) の技術開発成果を、許諾を受けて利用しています。特許第 4354457 号

# 1. はじめに

## 1.1. 概要

C-Kit Ground Pro XRD は宇宙実験のノウハウから生まれた、X 線回折実験向けタンパク質結晶作成用の実験キットです。カウンターディフュージョン(CD 法)<sup>1)</sup> のセルフサーチングメカニズム<sup>2)</sup>による最適結晶化条件の探索により、大規模スクリーニングを不要とする、論理的かつ低コストの実験手段をご提供します。また近年、弊社で開発した拡散対浸透濃縮法 (DPOC 法)<sup>3)</sup> は、この CD 法に浸透圧差による濃縮メカニズムを組み合わせ、より広範囲な結晶化条件の探索を実現します。両者を組み合わせることで試料や結晶化条件に応じて最適な方法を用いることができ、研究者の皆様がご自身で、良質なアポ体・複合体結晶を作成できます。

本キットで使用する CD 法は、宇宙航空研究開発機構 (JAXA) の業務委託により、株式会社コンフォーカルサイエンスらが共同で技術開発した方法です<sup>4),5)</sup>。JAXA より許諾を受けて利用しています。また当社では、中性子回折実験のためのタンパク質大型結晶の作成ができる実験キット (C-Kit Ground Pro ND、CRT101-2、[http://www.confsci.co.jp/images/C-kit%20Ground%20Pro\\_220908E.pdf](http://www.confsci.co.jp/images/C-kit%20Ground%20Pro_220908E.pdf)) や、国際宇宙ステーションの微小重力環境を利用した高品質結晶作成実験向けの C-Kit Space Pro Kit シリーズも販売しております。併せてご利用ください。

1) García-Ruiz, J.M.; Moreno, A. Investigations on protein crystal growth by the gel acupuncture method. *Acta Crystallogr., Sect. D.* 1994, 50 (4), 484–490

2) Otálora, F.; García-Ruiz, J.M. Computer model of the diffusion/ reaction interplay in the gel acupuncture method. *J. Cryst. Growth* 1996, 169, 361–367

3) Takahashi, S.; Koga, M.; Yan, B.; Furubayashi, N.; Kamo, M.; Inaka, K.; Tanaka, H. JCB-SGT crystallization devices applicable to PCG experiments and their crystallization conditions. *Int. J. Microgravity Sci. Appl.* 2019, 36, 360107

4) Tanaka, H.; Inaka, K.; Sugiyama, S.; Takahashi, S.; Sano, S.; Sato, M.; Yoshitomi, S. A simplified counter diffusion method combined with a 1D simulation program for optimizing crystallization conditions. *J. Synchrotron Rad.* 2004, 11, 45–48.

5) 吉崎ら 生体高分子結晶生成装置及び方法 特許第 4354457 号 2004.

## 1.2. 本キットの特長

- 少ないタンパク質試料量：標準で、CD 法キャピラリー1 本あたり 8  $\mu$ L、DPOC 法容器 1 本あたり 5  $\mu$ L です。
- 緩和な結晶化条件：CD 法、DPOC 法ともタンパク質試料と結晶化試薬の濃度を調節することで、緩和な結晶化条件を実現できます。
- 簡単な充填：CD 法、DPOC 法とも充填、セットアップは簡単です。
- 高い再現性・信頼性：CD 法、DPOC 法とも宇宙航空研究開発機構 (JAXA) ならびに有人宇宙システム株式会社 (JAMSS) が行っている宇宙実験で使用している方法です。高い再現性、信頼性は実証済みです。特に CD 法は 2002 年以降、のべ 500 種以上のタンパク質結晶化の宇宙実験に使用されています。
- ソーキングが容易：CD 法では、結晶が生成しているキャピラリーをソーキング用溶液の入った容器に移し替えるだけで、簡単にソーキングができます。
- 少ないリガンド量での共結晶化：DPOC 法では容器に充填するタンパク質溶液だけにリガンド化合物を添加するため、少量の化合物でソーキングできます。
- 長期安定性：本キットで生成した結晶は CD 法のゲルチューブ付キャピラリー中ならびに DPOC 法の容器中とも、長期にわたり安定です。
- 最適条件の検討：CD 法では、1 次元拡散シミュレーションプログラムでタンパク質試料と結晶化試薬の拡散時間経過を推定可能です。結晶化の最適条件の検討に利用できます。  
(C-Kit Pro Advanced Tool (CRT209)、[http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool 2208 2.pdf](http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool%202208%202.pdf))
- CD 法、DPOC 法それぞれの特長を生かせる使い方については、「4.2. CD 法と DPOC 法の使い分け」をご参照ください。

## 2. 本キットで使用する結晶作成法の原理

### 2.1. カウンターディフュージョン法 (CD 法)

本キットでは CD 法の一つである Gel Tube (GT) 法の結晶化容器を提供します。この方法による結晶生成のしくみを簡単に説明したものが図 2.1 です。

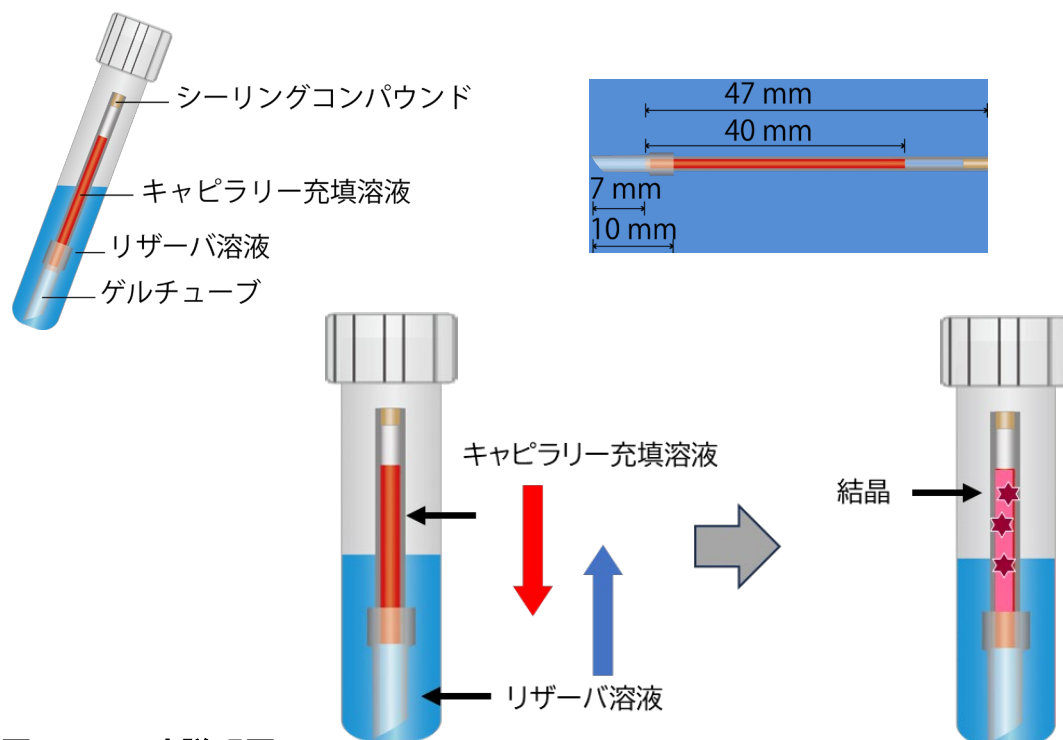


図 2.1 CD 法説明図

上: 主要構成品の模式図。下: キャピラリー充填溶液とリザーバ溶液の相互拡散 (カウンターディフュージョン) により結晶が生成します。

タンパク質試料を充填したキャピラリーの先端に、ゲルチューブと呼ぶアガロースゲル充填済のシリコンチューブを接続します。ゲルチューブを介して、キャピラリー内にリザーバ溶液成分が徐々に拡散するため、キャピラリー内にリザーバ溶液成分の濃度勾配ができます。またキャピラリー充填溶液内のタンパク質試料や共存する他の成分も、徐々にキャピラリーの外へ拡散します。その結果、キャピラリー内には、リザーバ溶液由来の結晶化試薬と、キャピラリー充填溶液由来のタンパク質試料の濃度の組合せによって、連続的で広範な結晶化条件が生まれます。キャピラリー内の結晶化に適した濃度組合せ条件が整った場所で、結晶生成が始まります (セルフサーチャングメカニズム)。この結晶化方法においては、結晶化試薬とタンパク質試料の拡散時間経過を把握することが重要です<sup>4)</sup>。詳しくは「4.1. 溶液成分濃度の時間経過」で説明します。

## 2.2. 拡散対浸透濃縮法 (DPOC 法)

本キットではもう一つの結晶化方法であるDPOC法の結晶化容器も提供します。DPOC法の標準的なコンフィギュレーションと結晶生成のしくみを簡単に説明したものが図 2.2 です。

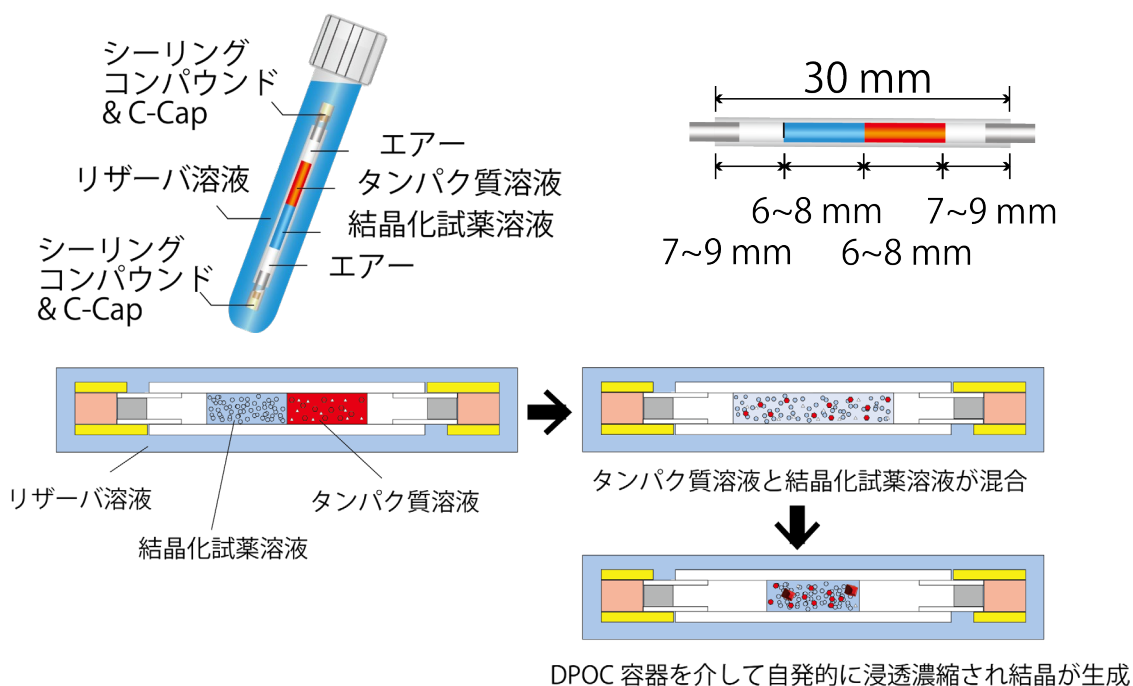


図 2.2 DPOC 法説明図

左上: 主要構成品の模式図。右上: DPOC 容器詳細図。下: タンパク質溶液と結晶化試薬溶液の相互拡散と、浸透濃縮により結晶が生成。

ガラスキャピラリーに、結晶化試薬とタンパク質試料を連続的に充填して拡散対 (diffusion pair) を形成し、相互拡散させることでタンパク質結晶を得る方法は、古くから知られた方法<sup>6)</sup>です。本キットのDPOC法ではキャピラリーの素材を水透過性のあるシリコンゴムとしましたので、DPOC容器の外側のリザーバ溶液と内側の溶液間の浸透圧差によって、DPOC容器中の溶液が浸透濃縮されます。拡散対中の拡散現象はCD法と共通しますが、結晶化試薬の溶液量がタンパク質試料の溶液量と同量のため、拡散現象だけではCD法よりも狭い範囲の結晶化条件しか探索できません。しかし、浸透濃縮を組み合わせることで、より広い範囲の探索が可能となりました。また、貴重なタンパク質試料をロスなしに濃縮した条件で結晶化することができます。CD法との違いについては「4.2. CD法とDPOC法の使い分け」で説明します。

6) Salemme, F.R. A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins for X-ray crystallography. *Arch. Biochem. Biophys.* 1972, 151, 533-539.

### 3. 実験操作マニュアル

#### 3.1. CD 法による結晶作成のセットアップ

##### 3.1.1. ご用意いただくもの（結晶化 1 条件、キャピラリー1 本分として）

試料・溶液	容量	説明
キャピラリー充填溶液	6~8 μL	キャピラリーに充填する溶液です。タンパク質試料、或いはタンパク質試料にリガンドや結晶化試薬成分などを加えた溶液です。 内径 0.5 mm ですので、必要量は試料長 30 mm の場合、6 μL、40 mm の場合、8 μL になります。充填作業のやり易さを考慮し、やや多めの準備が望ましいです。
リザーバ溶液	1 mL 程度	ゲルチューブを介してキャピラリー中に拡散させ、タンパク質を結晶化する溶液です。結晶化試薬成分、バッファ成分だけでなく、必要に応じてリガンド成分などを加えます。
ゲルチューブ浸漬溶液	4 mL 程度	ゲルチューブを予め浸漬しておく溶液です。早めの結晶生成を期待するときには、リザーバ溶液と同組成の溶液とします。緩和な条件での結晶化では、バッファ成分だけで十分です。ゲルチューブ(長さ 10 mm)が浸る液量が必要です。
シード溶液	数 μL	シーディングを行う場合に用意します。

キットから使うもの	数量	説明
キャピラリー (φ0.5 mm×47 mm)	1	試料を充填するときの目標の位置に、油性サインペンでマークをつけておきます。
ゲルチューブ (φ1.0 mm×1 cm)	1	本キット中のゲルチューブは、0.04% NaN <sub>3</sub> 溶液に浸漬されています。
シーリングコンパウンド	1	キャピラリーの上端を封止するために使用します。



シリコンチューブ	1	キャピラリーに溶液を充填する際、吸引する必要がある場合は使用します。
ラウンドチューブ (5 mL)	1	充填したキャピラリーの結晶化観察用です。

ご準備いただきたい器材	数量	説明
蓋付容器	1	高さ 40 mm、容量 5 mL 程度の容器。ゲルチューブを予め浸漬する際に使います。
マイクロピペット／チップ 各種	各 1	リザーバ溶液調製、充填用。
マイクロピペット／チップ (20~100 $\mu$ L 用)	各 1	キャピラリーに溶液を充填する際、吸引する必要があるときに使用します。
サージカルブレード (またはカッター)	1	ゲルチューブ下端カット用。刃先が鋭利なこと。
油性サインペン	1	キャピラリーに目安線を記入する際に使います。

### 3.1.2. ゲルチューブの pre-soaking (数日前)

#### 1. ゲルチューブ浸漬溶液の準備

C-Kit Ground Pro XRD 中のゲルチューブは、0.04%  $\text{NaN}_3$  溶液に浸漬した状態です。そのまま結晶化に使用すると、タンパク質試料によっては、塩濃度が低すぎるなどの急激な変化による影響が懸念されます。また、ゲルチューブ中を結晶化試薬が拡散するには時間を要します。そこで早めの結晶生成を期待する場合には、ゲルチューブ浸漬溶液は、リザーバ溶液と同組成の溶液とします。緩和な条件での結晶化では、バッファ成分だけ、またはそれに必要量の結晶化試薬成分を加えた溶液とします。これらいずれかの溶液を、ご準備いただいた蓋つき容器に 4 mL 程度入れ、ゲルチューブを浸漬します。**注意:** 乾燥を防ぐため、ゲルチューブは常に液体に浸しておいてください。

#### 2. ゲルチューブの浸漬に要する時間

ゲルチューブをゲル浸漬溶液に浸漬したときの塩濃度変化のシミュレーション結果から、ゲルチューブの浸漬日数は、NaCl 溶液で 0.5 日程度、PEG4000 溶液で 4 日程度です。

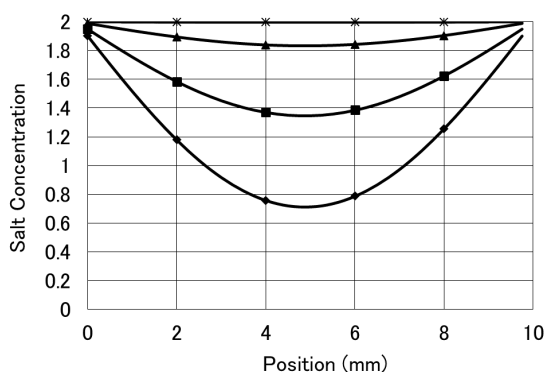


図 3.1 ゲルチューブを 2 M NaCl 溶液に浸漬したときの、内部の NaCl 濃度の時間変化のシミュレーション結果

横軸はゲルチューブの端からの距離、縦軸は NaCl 濃度。曲線は、下から、0.05、0.1、0.2、0.5 日後の NaCl 濃度を示す。

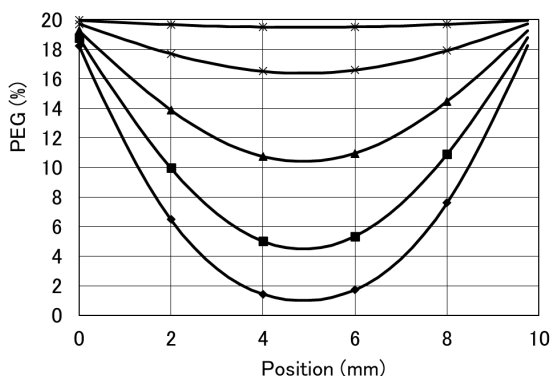


図 3.2 ゲルチューブを 20% PEG4000 溶液に浸漬したときの、内部の PEG4000 濃度の時間変化のシミュレーション結果

横軸はゲルチューブの端からの距離、縦軸は PEG4000 濃度。曲線は、下から、0.25、0.5、1、2、4 日後の PEG4000 濃度を示す。

### 3.1.3. 事前準備 (充填前)

#### 1. キャピラリー充填溶液の準備

充填に必要な量のタンパク質試料溶液を準備します。充填時に結晶化試薬やリガンドなどを混合する必要がある場合には、あらかじめ混合してキャピラリー充填溶液とします。

#### 2. 種結晶 (シード) 溶液

マイクロシーディングまたはマクロシーディングを行う場合には、種結晶からそれらを含む種結晶 (シード) 溶液を準備します。

#### 3. リザーバ溶液の準備

必要な量のリザーバ溶液を準備し、0.7 ~ 1 mL 程度をラウンドチューブ (5 mL) に入れます。

#### 4. キャピラリーの目安線

キャピラリーには溶液を充填する際の目安線を油性サインペンにつけます。試料を 40 mm 充填する場合には、端から 40 mm のところにつけます。シーディングを行う場合には、35 と 40 mm の 2 か所に目安線をつけます。

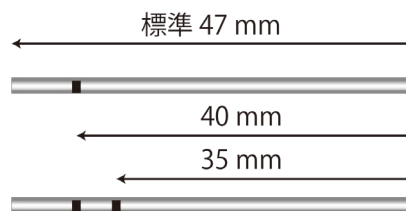


図 3.3 キャピラリーの目安線

### 3.1.4. 充填作業

#### 1. キャピラリー充填溶液の充填

キャピラリーを目安線が上になるように持ち、充填溶液をキャピラリーの目安線まで（シーディングを行う場合は 35 mm の線まで）充填します。

毛細管現象で、キャピラリーに充填することができる場合は、キャピラリー先端をキャピラリー充填溶液に漬けると、キャピラリー内を溶液が上がってきます。入りにくいときは、キャピラリーを横にすると、入りやすくなります。途中でエアーが入らないように、充填中はキャピラリー充填溶液からキャピラリー先端を上げないように気をつけます。シーディングの場合は、キャピラリー充填溶液を 1 本目の目安線まで充填し、次いでキャピラリー先端をシード溶液に移して、キャピラリー充填溶液が 2 本目の目安線まで来るようにシード溶液を充填します。

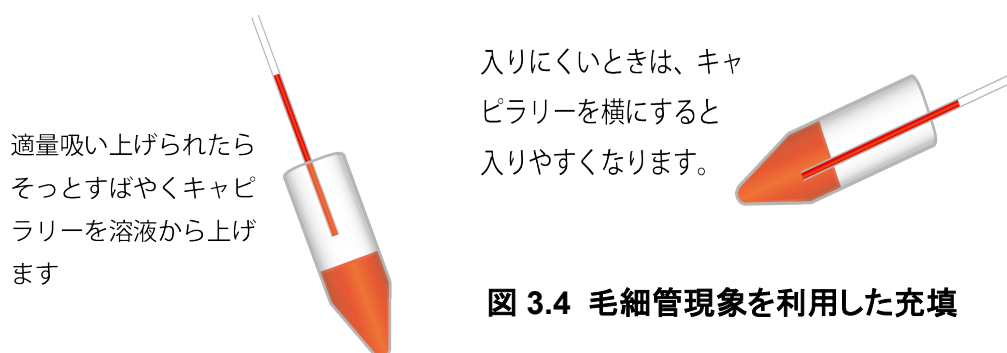


図 3.4 毛細管現象を利用した充填

毛細管現象でキャピラリーに容易に充填できない場合もあります。溶液の性状により、溶液が毛細管現象により上がってこない場合（粘性が高い場合等）や、

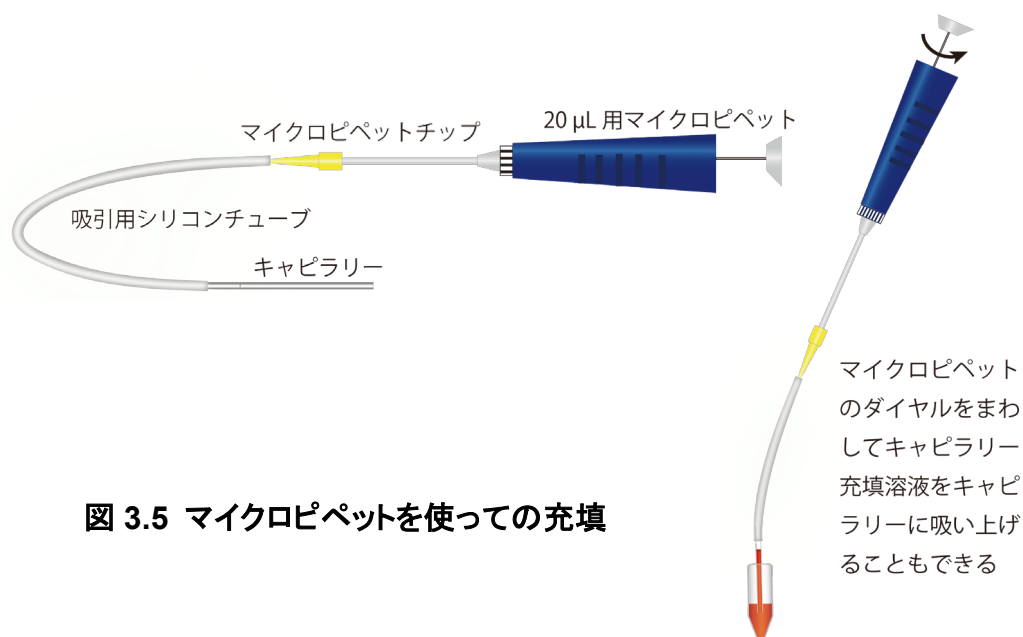


図 3.5 マイクロピペットを使つての充填

逆に、すぐにキャピラリーの先端まで溶液が上がってくる場合（界面活性剤や有機溶媒を含む場合等）があります。その場合には、マイクロピペットを使って、吸引充填します。

まず、20  $\mu\text{L}$  マイクロピペット用チップに吸引用シリコンチューブを装着し、その先端をキャピラリー上端に装着します。次いで、マイクロピペットの目盛りを、充填量に合わせ、キャピラリー下端をキャピラリー充填溶液に入れて吸い上げます。または、マイクロピペットのダイヤルを回して、キャピラリーに溶液を吸い上げます。所定の量を充填したら、吸引用シリコンチューブをつぶさないように注意しながら外します。シーディングの場合は、キャピラリー充填溶液を1本目の目安線(35 mm)まで充填し、次いでキャピラリー先端をシード溶液に移して、キャピラリー充填溶液が2本目の目安線(40 mm)まで来るように、マイクロピペットのダイヤルを回してシード溶液を吸い上げます。

いずれの方法で充填した場合でも、キャピラリー下端にエアールを入れるために、充填後直ちに下記の方法でキャピラリー上端を封止します。

## 2. キャピラリーの封止

逆さにしたシーリングコンパウンドに、下からキャピラリーの上端を突き立てて容器の底の板に押し付け、2、3回左右に回してから引き抜きます。シーリングコンパウンドがキャピラリー上端に2 mm くらい詰まるまでこれを繰り返します。右図のように、キャピラリーの下端から、充填液が少しはみ出しているのが観察できます。

キャピラリー充填溶液の充填時に、キャピラリー下端に若干エアールが入ってしまう場合があります。エアールはリザーバ溶液の拡散を妨げるので、追い出しておく必要があります。上端からシーリングコンパウンドを更に多量につめて、下端のエアールを押し出し、キャピラリー下端から充填溶液が少し盛り出ている状態にします。

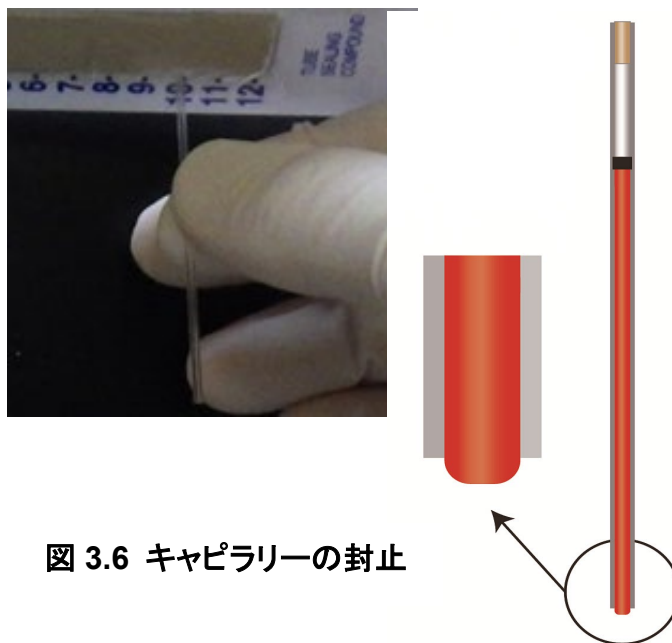


図 3.6 キャピラリーの封止

### 3. ゲルチューブの取付け

キャピラリー下端にゲルチューブを取付けます。キャピラリーとゲルチューブの間にエアが入らないよう、ゲルチューブのキャピラリー装着端に、ゲル浸漬溶液を少しのせてから、キャピラリーを装着します。ゲルチューブ下端からは、中のゲルが少量押し出されます。次いで、ゲルチューブの下端を鋭利なブレードなどで斜めにカットします。斜めにカットすることで、ゲルチューブ先端が、ラウンドチューブ底面に密着しても、リザーバ溶液の拡散が妨げられなくなります

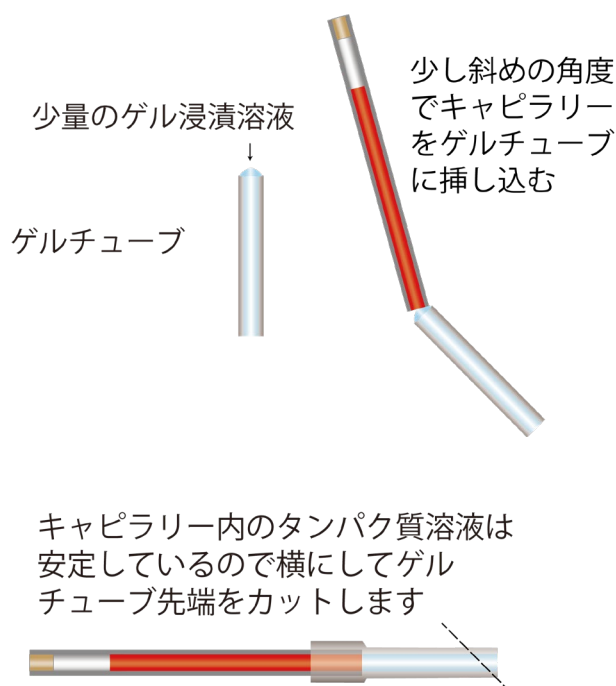


図 3.7 ゲルチューブの取付けと先端のカット

### 4. キャピラリーの保管

リザーバ溶液の入ったラウンドチューブにキャピラリーを静かに入れ蓋をします。所定の温度環境に、ゲル端を下にして縦置きで静置します。多くの場合、結晶化試薬を含むリザーバ溶液は、キャピラリー充填溶液よりも比重が大きいです。このためゲルチューブ側を下にして静置すると、リザーバ溶液のキャピラリー中への拡散によって、キャピラリーの下側ほど比重が大きくなり、キャピラリー中の溶液が密度差で移動することが抑えられます。その結果、微小重力環境での溶液拡散抑制と似た効果が期待でき、より良好な品質の結晶が得られます。

なお、観察時にはキャピラリーを横にする必要がありますが、短時間であれば影響はありません。

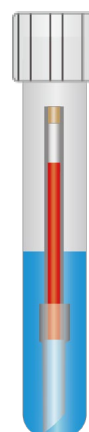


図 3.8 キャピラリーの縦置き保管

## 3.2. DPOC 法による結晶作成のセットアップ

### 3.2.1. ご用意いただくもの（結晶化 1 条件、DPOC 容器 1 本分として）

試料・溶液	容量	説明
タンパク質試料溶液	5~7 μL	DPOC 容器に充填するタンパク質試料溶液です。 内径 1.0 mm ですので、必要量は試料長 6 mm の場合、4.7 μL、8 mm の場合、6.3 μL になります。充填作業のやり易さを考慮し、やや多めの準備が望ましいです。
DPOC 容器充填結晶化試薬溶液	5~7 μL	DPOC 容器内で、タンパク質試料溶液と相互拡散させ、タンパク質を結晶化する溶液です。結晶化試薬成分、バッファ成分だけでなく、必要に応じてリガンド成分などを加えます。 シーディングを行う場合には、予め準備したシード溶液を加えておきます。
リザーバ溶液	4 mL 程度	DPOC 容器の外側の溶液です。通常、DPOC 容器充填結晶化試薬溶液と同濃度の結晶化試薬成分、バッファ成分の溶液とします。リガンド成分、シードなどは不要です。ラウンドチューブに充填します。

キットから使うもの	数量	説明
DPOC 容器 (φ 1.0 mm × 30 mm )	1	両端に吸引用の短いキャピラリーが接続されています。
C-Cap	2	キャピラリー端に取り付けるキャップです。
シーリングコンパウンド	1	キャピラリー端を封止します。
シリコンチューブ	1	DPOC 容器に溶液を充填する際に使用します。
ラウンドチューブ (5 mL)	1	充填した DPOC 容器の結晶化観察用です。

ご準備いただきたい器材	数量	説明
マイクロピペット／チップ 各種	各 1	リザーバ溶液 調製、充填用。
マイクロピペット／チップ (20~100 $\mu$ L 用)	各 1	DPOC 容器に溶液を充填する際に使用しま す。
油性サインペン	1	DPOC 容器に目安線を記入する際に使いま す。

### 3.2.2. DPOC 容器の pre-soaking (数日前)

#### 1. リザーバ溶液の準備

DPOC 容器の外側の溶液です。通常、DPOC 容器充填結晶化試薬溶液と同濃度の結晶化試薬成分、バッファ成分の溶液とします。リガンド成分、シードなどは不要です。ラウンドチューブに充填します。

#### 2. DPOC 容器の目安線

DPOC 容器には溶液を充填する際の目安線を油性サインペンでつけます。試料量を 4.7  $\mu$ L (試料長 6 mm) の場合には、容器の片側の端から 9 mm のところに、試料量を 6.3  $\mu$ L (試料長 8 mm) の場合には、7 mm のところにつけ、充填後の溶液の両側にエアが入る様にします。

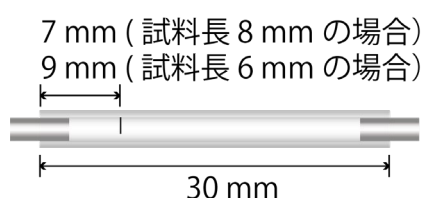


図 3.9 DPOC 容器の目安線

#### 3. DPOC 容器の浸漬

DPOC 容器の材質に吸着している空気を除き、水分を浸漬させるため、1~数日間、リザーバ溶液に浸漬します。

### 3.2.3. 事前準備 (充填前)

#### 1. DPOC 容器充填タンパク質溶液の準備

充填に必要な量のタンパク質試料溶液を準備します。充填時にリガンドなどを混合する必要がある場合には、あらかじめ混合して DPOC 容器充填タンパク質溶液とします。

#### 2. DPOC 充填結晶化試薬溶液の準備

DPOC 容器内で、タンパク質試料溶液と相互拡散させて、タンパク質を結晶化する溶液です。結晶化試薬成分、バッファ成分だけでなく、必要に応じてリガンド成分などを加えます。シーディングを行う場合には、予め種結晶から準備したマイクロシード、またはマクロシードを含む種結晶（シード）溶液を準備し、所定量を加えておきます。

### 3.2.4. 充填作業

#### 1. DPOC 容器の準備

リザーバ溶液に浸漬していた DPOC 容器を取り出し、DPOC 容器の目安線をつけた側に、吸引用シリコンチューブを取り付けたマイクロピペット（数十  $\mu\text{L}$  用）を接続します。容器内に溶液がある場合は、ピペッティングで排気して除去します。

#### 2. DPOC 容器への充填

DPOC 容器に 4.7～6.3  $\mu\text{L}$  のリザーバ溶液、次いで同量のタンパク質試料溶液を充填します。手順としては、マイクロピペットのメモリを規定量に合わせ、DPOC 容器の他端をリザーバ溶液に入れ、4.7～6.3  $\mu\text{L}$  吸い上げます。続いて DPOC 容器端をタンパク質試料溶液に入れ、ピペットマンのダイヤルを回しながら、タンパク質溶液を同量吸い上げます。

さらに、DPOC 容器端を溶液から外し、ピペットマンのダイヤルを回しながら、リザーバ溶液の溶液面が DPOC チューブにつけた目安線に達するまで、エアを入れます。



図 3.10 DPOC 容器への充填



### 3. DPOC 容器の封止

マイクロピペット・シリコンチューブはつなげたまま、DPOC の空いている端をシーリングコンパウンドで封止します。次いで、吸引用シリコンチューブをはずし、DPOC 容器の反対側の端をシーリングコンパウンドで封止します。

### 4. C-Cap の取付け



図 3.11 DPOC 容器の封止

つぎに、DPOC 容器端に大きな浸透圧が加わらないよう、C-Cap を取り付けます。C-Cap の斜めに切れている側から容器端のキャピラリーを差し込みます。C-Cap 内には、樹脂製の栓がありますので、それを一緒に押し込みます。このとき、反対側の端から栓が出ないように指で押さえておきます。樹脂製の栓が C-Cap の反対側の先端まで押し込まれたら、取付け完了です。



図 3.12 C-Cap の取付け

### 5. DPOC 容器の保管

ラウンドチューブにリザーバ溶液を 4 mL 程度入れます。DPOC 容器は結晶化試験溶液を充填した側を下にして、リザーバ溶液の入ったラウンドチューブに静かに入

れ、蓋をします。ラウンドチューブ中で、DPOC 容器全体がリザーバ溶液に浸っていることを確認し、所定の温度環境に縦置きで静置します。多くの場合、結晶化試薬を含むリザーバ溶液は、タンパク質試料溶液よりも比重が大きいです。このため結晶化試薬溶液を充填した側を下にして静置すると、結晶化試薬溶液の拡散に際して、下側ほど比重が大きくなり、DPOC 容器中の溶液が密度差で移動することが抑えられます。その結果、微小重力環境での溶液拡散抑制と似た効果が期待でき、より良好な品質の結晶が得られます。

なお、観察時にはDPOC 容器を横にする必要がありますが、短時間であれば影響はありません。

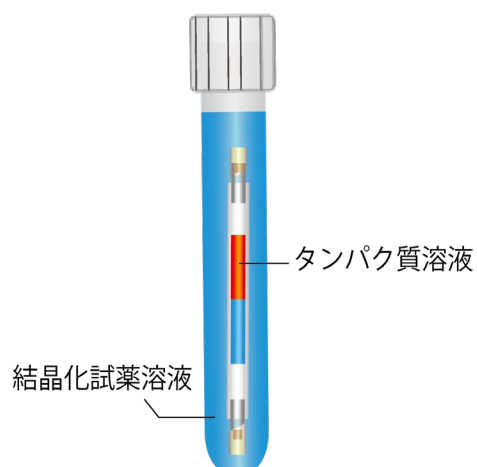


図 3.13 DPOC 容器の保管

### 3.3. CD 法キャピラリーからの結晶の取出し

#### 3.3.1. ハーベスト溶液の準備

結晶の品質を劣化させずに結晶を取出すには、取出した結晶を保管する溶液の組成を、キャピラリー中の結晶がある位置の溶液組成と揃えておく必要があります。その位置により、また充填後の時間により溶液組成は異なります。キャピラリー中の結晶化試薬濃度は、塩類を拡散させている場合で平衡に達するまでに半月程度、PEG 類の場合には数か月以上かかります。このため、平衡に達する以前に結晶を取り出そうとする場合には、狙った結晶周辺の結晶化試薬濃度とほぼ同じ濃度の結晶化試薬を含むハーベスト溶液を予測し、準備する必要があります。もし濃度が合っていない場合には、結晶が溶解、あるいは浸透圧差で破損することがあります。濃度の予測には、「4.1. 溶液成分濃度の時間変化」や、別売のシミュレーションプログラム **C-Kit Pro Advanced Tool** (CRT209、[http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool\\_2208\\_2.pdf](http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool_2208_2.pdf)) をご利用下さい。また、より確実な結晶の取出しのためには、予測濃度の上下数種類の溶液を準備することをお勧めします。準備したハーベスト溶液は、くぼみガラスのくぼみに入れておきます。

#### 3.3.2. キャピラリーの切断

目的の結晶の両側から 3~4 mm 離れたところで、キャピラリーを切断します。ダイヤモンドヤスリまたはキャピラリカッターなどでキャピラリーのガラス外側に鋭い傷をつけ、その傷が開く方向に折り曲げつつ、引っ張る力を加えることで切断します。

#### 3.3.3. 結晶の取出し

短く切ったキャピラリーをくぼみガラスのハーベスト溶液の中に浸漬し、ピンセットで保持します。実体顕微鏡で観察しながら、ピペットの先端からピンセットで保持したキャピラリーの中に向けて結晶周辺にピペッティングによる溶液の流れを加え、結晶をキャピラリー中からハーベスト溶液に流し出します。

結晶によってはキャピラリーのガラス面に固着している場合があります。このような場合には、慎重に先端が細くかつ鋭くないもの、例えばゲルローディングチップ (QSP 124-R204) 等で触って動かし、その後、再び結晶周辺にピペッティングによる溶液の流れを加えます。溶液の流れで、結晶をキャピラリー中から、ハーベスト溶液に流し出します。ハーベスト溶液中に取り出された結晶は、クライオループで掬い取って、必要があれば凍結保護溶液にくぐらせてから、X 線回折実験に利用します。詳しくは「3.5. 結晶の凍結処理」で説明します。

結晶取出しの操作手順は、リゾチームの結晶を CD 法で作成し、習熟されることをお勧めします。リゾチームの結晶はキャピラリー内面に固着しやすく、操作を習熟するにはよい試料です。

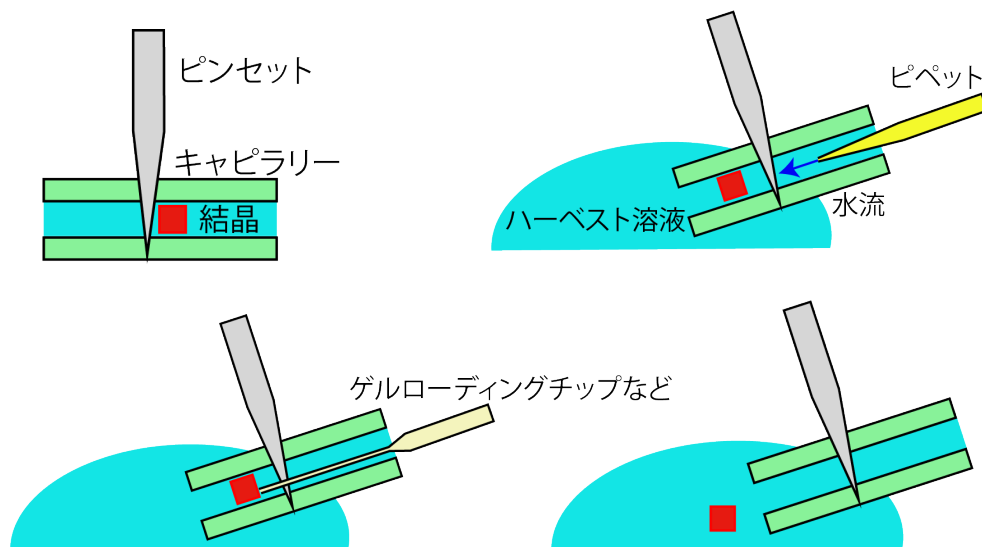


図 3.14 キャピラリーからの結晶の取出し

上左： 実体顕微鏡で観察しながら作業が出来るように、短く切ったキャピラリーはピンセットで固定します。

上右： ピペッティングで溶液を送って、ハーベスト溶液中に流し出します

下左： キャピラリーに固着しているときは、ゲルローディングチップなどで触って、動かします。

下右： ハーベスト溶液中に結晶を流し出したところ

## 3.4. DPOC 容器からの結晶の取出し

### 3.4.1. ハーベスト溶液の準備

DPOC 容器内の結晶化試薬の拡散は早く、PEG 類の拡散対でも 10 日前後で平衡になります。しかし、外部のリザーバ溶液との浸透濃縮は数週間を要します。実際の濃度は、DPOC 容器中の溶液の長さがどの程度になったかで予想できます。その予測をもとに、結晶周辺の結晶化試薬濃度とほぼ同じ濃度に希釈された結晶化試薬をハーベスト溶液として準備します。準備したハーベスト溶液は、くぼみガラスのくぼみに入れておきます。

### 3.4.2. DPOC 容器の切断

DPOC 容器を、目的の結晶の両側数 mm の位置で、サージカルブレード（先の鋭い繊細作業用カッターなど）で切断します。切断の際、DPOC 容器が変形し、中の結晶がつぶれないように注意します。

### 3.4.3. 結晶の取出し

短く切った DPOC 容器をくぼみガラスのハーベスト溶液の中に浸漬し、実体顕微鏡で観察しながら、ピペットの先端から DPOC 容器の中に向けて、結晶周辺にピペティングによる溶液の流れを加えます。溶液の流れで結晶を容器中からハーベスト溶液に流し出します。ハーベスト溶液中に取り出された結晶は、クライオグループで掬い取って、必要があれば凍結保護溶液にくぐらせてから、X 線回折実験に利用します。詳しくは「3.5. 結晶の凍結処理」で説明します。

結晶取出しの操作手順は、リゾチームの結晶を DPOC 法で作成し、習熟されることをお勧めします。

### 3.5. 結晶の凍結処理

放射光を利用した X 線回折実験では、放射線損傷を防ぐため、結晶を凍結する必要があります。この際、結晶周辺の水がガラス状に凍結することが重要です。ガラス状に凍結せず、氷晶が生じると結晶にダメージが生じ、良好な X 線回折像が得られなくなります。ハーベスト溶液から結晶をクライオループで掬った後、必要があれば凍結保護溶液にくぐらせて結晶周辺の溶液を凍結保護作用がある溶液に置換し、急速に冷却する必要があります。凍結の方法としては、吹き付け凍結や液体窒素への直接浸漬など、既にご経験がある方法をご利用ください。

PEG 系の結晶化試薬はそれ自体に凍結保護作用がありますので、その濃度が 35~40%であれば、そのまま凍結処理をすることができます。ハーベスト溶液の主成分が PEG 系だがその濃度がこれより低い場合には、同種の PEG をハーベスト溶液に加えたものを凍結保護溶液として置換するのが確実な方法です。あるいは、グリセロールを適量添加することで凍結保護溶液とすることができます。この際の濃度は、PEG 濃度と合わせて概ね 40%となるのが目安です。塩類が結晶化試薬の場合に凍結保護剤として最もよく使われるものはグリセロールです。ハーベスト溶液に添加し、凍結保護溶液とします。概ね 40%程度のグリセロール濃度で氷晶の生成を抑えることができます。その他、凍結保護剤としては、トレハロース、エチレングリコール、PEG400 等が使用されています。

凍結保護溶液を実際の結晶に適用する前には、その溶液が氷晶生成を抑えることが出来るかの事前チェックが必要です。クライオループで溶液を掬って、急速凍結処理をしたのち、ループ内の液滴がガラス状に凍結する溶液が適切です。溶液置換では、ループで掬った結晶を数秒間凍結保護剤溶液に浸し、結晶周辺の溶液を置換するという方法が最も多く用いられています。それでも、時には、浸透圧差が大きくて結晶にひびが入る等の問題が起こることがあります。特にグリセロールなど低分子量の凍結保護剤の場合に起きやすい傾向があるようです。

この問題を解決するには、結晶を中間濃度の凍結保護剤を含むいくつかの溶液に順番に浸します。たとえば、ハーベスト溶液に 10 mM MgCl<sub>2</sub>、1.5 M 硫酸アンモニウム、50 mM 酢酸緩衝液が含まれている場合、(A) 10 mM MgCl<sub>2</sub>、1.5 M 硫酸アンモニウム、50 mM 酢酸緩衝液、10% グリセロール、(B) 10 mM MgCl<sub>2</sub>、1.5 M 硫酸アンモニウム、50 mM 酢酸緩衝液、20% グリセロール、(C) 10 mM MgCl<sub>2</sub>、1.5 M 硫酸アンモニウム、50 mM 酢酸緩衝液、30% グリセロールの 3 種の溶液を用意し、(A)、(B)、(C) の順に結晶を浸し、結晶の周りの凍結保護剤の濃度を徐々に高めます。また、CD 法の場合には、リザーバ溶液を凍結保護剤入りの溶液に交換することで、結晶周りの溶液を緩和に置換することができます。「4.2.4. CD 法はソーキングが簡単」を参照してください。

## 4. 技術資料

### 4.1. 溶液成分濃度の時間経過

タンパク質の結晶化は、タンパク質試料の濃度と結晶化試薬の濃度が適切な組み合わせになった時に期待できます。確実な結晶生成実験のためには、CD 法キャピラリーや DPOC 容器中の結晶化試薬濃度の経時変化を把握して、計画することが重要です。

#### 4.1.1. CD 法

CD 法キャピラリー中の結晶化試薬濃度の時間変化は、1 次元の拡散シミュレーションで予測できます。別売のシミュレーションプログラムでは、様々な条件での予測計算が出来ます (C-Kit Pro Advanced Tool (CRT209)、[http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool\\_2208\\_2.pdf](http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool%202208_2.pdf))。

以下では、代表的な試薬として NaCl と PEG4000 のケースについての計算例を示します。

#### 計算例 1

タンパク質試料:ゲルチューブ付キャピラリーに 40 mm 充填

リザーバ溶液: 1 M NaCl 溶液

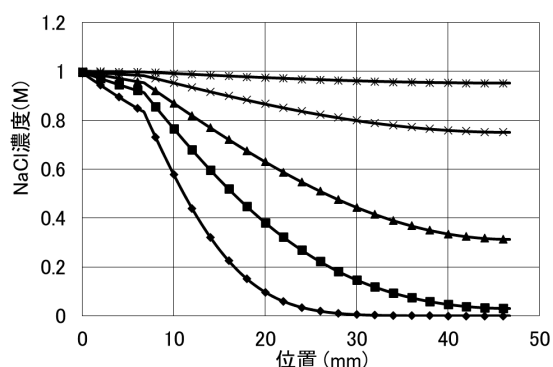


図 4.1 キャピラリー中の NaCl 濃度の予測

◆、■、▲、×、※は充填後 0.25、1、3、8、16 日後の値。

縦軸 NaCl 濃度、横軸ゲルチューブ端からの位置

キャピラリー中の NaCl 濃度は 16 日でほぼ平衡に達します。塩類としてよく使われる硫酸も、拡散係数が NaCl とほぼ同じですので、時間経過はほぼ同じになります。

#### 計算例 2

タンパク質試料:ゲルチューブ付キャピラリーに 40 mm 充填

リザーバ溶液: 25% PEG4000 溶液

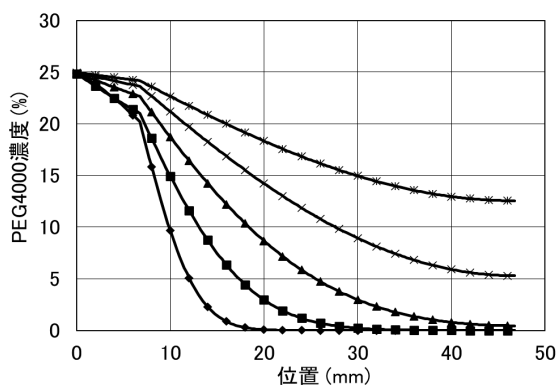


図 4.2 キャピラリー中の PEG4000 濃度の予測

◆、■、▲、×、※は充填後 1、4、12、32、64 日後の値。  
縦軸 PEG4000 濃度、横軸ゲルチューブ端からの位置

キャピラリー中の PEG4000 濃度は 64 日後でも、GT とは反対側の端ではリザーバ溶液の半分程度の濃度までしか上昇しません。結晶化条件を早めを実現するには、リザーバ溶液の PEG4000 濃度を高めにするか、キャピラリー中のタンパク質試料に予め適当な濃度の PEG4000 を混合するといった対応策が必要です。PEG 類の拡散係数は分子量のほぼ 1/2 乗に反比例しますので<sup>7)</sup>、高分子量の PEG 類ではこの時間経過よりもさらに遅い変化になります。

7) Luo, Z.; Zhang, G. Scaling for sedimentation and diffusion of poly (ethylene glycol) in water. *J. Phys. Chem. B* 2009, 113, 12462–12465

### 計算例 3

タンパク質試料: PEG4000 が 12.5%になる様にタンパク質試料溶液に加え、ゲルチューブ付キャピラリーに 40 mm 充填

リザーバ溶液: 25% PEG4000 溶液

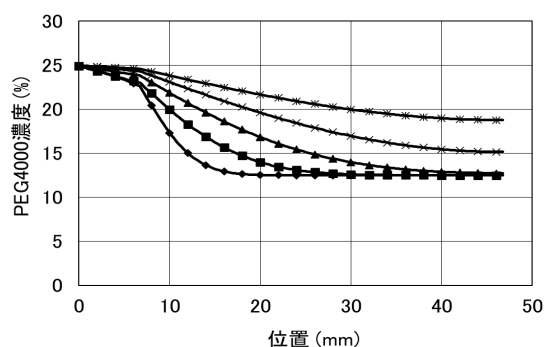


図 4.3 キャピラリー中の PEG4000 濃度の予測

記号等は図 4.2 と同じ

キャピラリー中のタンパク質試料に、PEG4000 をリザーバ溶液の濃度の 1/2 加えた場合です。計算例 2 と比較し、PEG 濃度は早く高濃度になることが分かります。



### 4.1.2. DPOC 法

DPOC 容器中のタンパク質濃度と結晶化試薬濃度の相互拡散の時間変化は、1次元の拡散シミュレーションで予測できます。さらに浸透濃縮による濃度上昇が並行して起こります。

#### 計算例 4

タンパク質試料を 8 mm、次いで 1M NaCl 溶液を 8 mm、DPOC 容器に充填  
リザーバ溶液: 1M NaCl 溶液

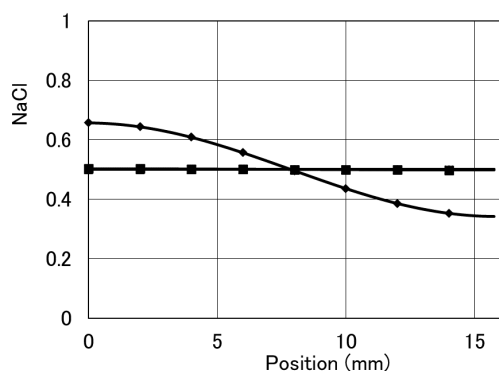


図 4.4 DPOC 容器中の NaCl 濃度の予測

◆、■は充填後 0.25 と 1 日後の値。  
縦軸 NaCl 濃度、横軸: 容器端からの距離。

DPOC 容器内の NaCl 濃度は 1 日でほぼ平衡に達します。

#### 計算例 5

タンパク質試料を 8 mm、次いで 25% PEG4000 溶液を 8 mm、DPOC 容器に充填  
リザーバ溶液: 25% PEG4000 溶液

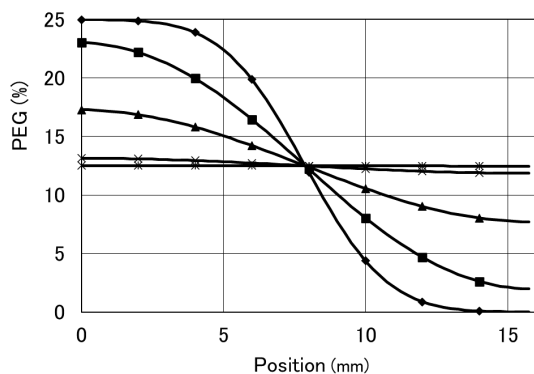


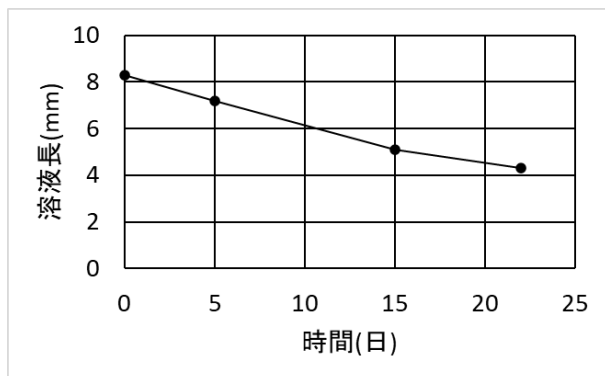
図 4.5 DPOC 容器中の PEG4000 濃度の予測

◆、■、▲、×、\*は充填後 0.25、1、3、8、16 日後の値。  
縦軸 PEG4000 濃度、横軸: 容器端からの距離。

DPOC 容器内の PEG4000 は 8 日くらいでほぼ平衡に達します。同時に、DPOC 容器内の溶液は浸透濃縮で濃縮されていきます。

リザーバ溶液に 20% PEG4000 と 600 mM NaCl の混合溶液を用いた場合の実験では、平衡に達するまでの期間は約 3 週間です (図 4.6)。22 日目に DPOC 容器

内の溶液長がほぼ半分になって、溶液組成が溶液外とほぼ同じになるまで濃縮されています。



**図 4.6 DPOC 容器内溶液濃縮の時間経過。**

タンパク質試料溶液を約 4 mm、20% PEG4000 と 600 mM NaCl の混合溶液を約 4 mm、合計 8.3 mm 充填した DPOC 容器を 20% PEG4000 と 600 mM NaCl の混合溶液中に保管したときの溶液長の時間経過。

## 4.2. CD 法と DPOC 法の使い分け

CD 法と DPOC 法の違いは以下の通りです。これらの違いを考慮して、最適な結晶化方法を選びます。

### 4.2.1. CD 法は高分解能結晶が得られやすい

一般に、主たる結晶化試薬（PEG とか硫酸）の濃度が高いほど、回折分解能は高くなる傾向があります。しかし、蒸気拡散法でこのような結晶化条件を設定すると、初期の結晶化試薬濃度が高すぎて、結晶のクラスター化や沈殿を生じやすい傾向があります。一方 CD 法では、タンパク質溶液中の結晶化試薬濃度の上昇がゆっくり実現されるために、このような問題が生じにくく、高濃度の結晶化試薬の設定が可能であり、高分解能の結晶が得られやすい傾向があります。

### 4.2.2. CD 法はタンパク質試料中の低分子量成分の影響を受けにくい

タンパク質試料は通常、塩類や EDTA の様な低分子化合物、バッファ類を含む溶液として調製します。これらの中には結晶化を阻害するような成分が含まれることがあります。結晶化の阻害につながる可能性がある代表的な成分としては、高濃度の NaCl です。結晶化試薬を加えた際に、沈殿を引起すケースが多いです。

CD 法は、このようなタンパク質試料に向いています。ゲルチューブ付の CD 法では前述した様な時間経過で、キャピラリー中の結晶化試薬濃度が上昇します。同時に、キャピラリー中の低分子量成分はタンパク質試料より先に、キャピラリー外に拡散していきます。結果として、時間経過とともにキャピラリー中の低分子量成分は、リザーバ溶液中の成分と置き換わることになり、結晶化の阻害につながる成分の影響を受けずに結晶化が可能になります。

DPOC 法では同様のタンパク質試料の場合、浸透濃縮で阻害成分の濃度が高くなりますので、結晶が得られにくくなります。試料調製時に透析等で予め除いておく必要があります。

### 4.2.3. DPOC 法は共結晶時のリガンド量が少ない

タンパク質分子に結合する化合物をタンパク質試料に添加し、共結晶化を行う場合に、CD 法では添加した化合物のうちフリーの成分が、キャピラリーからリザーバ溶液に拡散により出ていきます。リガンド化合物との結合定数 ( $K_D$ ) が十分小さい場合 ( $\mu\text{M}$  以下) には、多少拡散するにしても、タンパク質試料に添加した化合物だけで化合物が結合した複合体結晶の取得を期待できます。しかし  $K_D$  値がそれより大きい場合には、リザーバ溶液に化合物を添加する必要があります。

このような場合に、DPOC 法では、タンパク質試料溶液が結晶化に伴い更に濃縮されますので、タンパク質試料に添加したリガンド化合物だけで複合体結晶を期待することができます。

#### 4.2.4. CD 法はソーキングが簡単

結晶が得られたのちに、結晶外溶液に化合物を添加して、ソーキングする場合に、CD 法では操作が簡単です。ゲルチューブが装着された結晶入りのキャピラリーを、目的とする化合物が含まれる溶液に移し、十分な時間放置して化合物を拡散させることで実現できます。タンパク質に結合させたい化合物をリザーバ溶液に添加する方法では、結晶に与える影響を最小限にしてソーキングすることができます。

また、リザーバ溶液に、高濃度の PEG、エチレングリコールやグリセロールといった凍結保護剤を添加して、ソーキングすることも簡単にできます。結晶を凍結保護溶液に浸すと、結晶の周りの凍結保護剤の濃度が急激に上昇するため、結晶が劣化する場合があります。急激な変化を避けるには、高濃度の PEG、エチレングリコール、グリセロールなどの凍結保護剤を含んだリザーバ溶液に結晶をソークします。これにより、結晶の周りの溶液をゆっくりと交換できます。たとえば、リザーバ溶液に 10 mM MgCl<sub>2</sub>、1.5 M 硫酸アンモニウム、50 mM 酢酸緩衝液が含まれている場合は、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1.5 M 硫酸アンモニウム、50 mM 酢酸緩衝液、30% グリセロールを含む凍結保護溶液を調製し、結晶ができていない CD キャピラリーをその中に移します。キャピラリーの内外の溶液が平衡に達した後、この保護溶液を使用してキャピラリーから結晶を収穫し、そのまま凍結できます。

一方、DPOC 法では、容器から結晶を取出してから、ソーキング溶液に移す必要があります。

### 4.3. 結晶化条件の決め方

#### 4.3.1. 結晶化条件が未知のタンパク質試料

これまで結晶化条件が知られていないタンパク質試料の場合、通常、市販のスクリーニング試薬(たとえば、<https://hamptonresearch.com/cat-1.html>)を適用されることが多いかと思います。CD 法、ならびに DPOC 法ではセルフサーチングメカニズムにより、通常用いられているバッチ法や蒸気拡散法よりも、より広範囲の濃度条件の組合せを1つのキャピラリー/容器で探索できます。

少ない作業量で検討できる手順は以下の通りです。

1. スクリーニング試薬で提供されている溶液の組成を確認して、主たる結晶化試薬が塩類(例えば硫酸)とPEG類(PEG4000)のものを1つずつ選択します。それらのうち、pHがタンパク質試料のpIよりも+1~+2離れた高め側と、-1~-2離れた低め側のもの、合計4種類のスクリーニング試薬を選ぶ。
2. CD法で結晶作成をします。キャピラリーに、タンパク質試料を直接充填したものと、タンパク質試料と上記で選んだスクリーニングキットの溶液を1:1混合して充填したものの2種を準備し、当該スクリーニングキットの溶液をリザーバ溶液として、結晶化する。合計8条件。
3. 次に上記で選んだスクリーニングキットの溶液をそのまま充填溶液とリザーバ溶液として使用してDPOC法で結晶化する。合計4条件。
4. 最長1か月程度経過観察し、結晶が得られなかった場合に、以下の対策を検討する(可能性としてご参考ください)。

CD 法	DPOC 法	考えられる対策
変化なし。	変化なし。	タンパク質分子の電荷が大きい。リザーバ溶液に NaCl を 100~150 mM 加えて再セットアップ。
キャピラリーに沿って、徐々に沈殿する。	徐々に沈殿。	結晶化する条件に近い。キット溶液の主たる結晶化試薬以外の成分濃度を下げた溶液を調製して再セットアップ。

<p>キャピラリーのゲルチューブ側で一旦は結晶ができるが、後に消失する。</p>	<p>—</p>	<p>タンパク質試料中に結晶化を促進させる成分がある。タンパク質試料中にあるが、リザーバ溶液にはない成分をリザーバ溶液に加えて、CD 法を再セットアップ。</p>
--	----------	---

5. これらに該当しない場合や、対策しても結晶が得られない場合には、スクリーニングキットにある pH が近い他の成分のスクリーニング試薬 2～5 種を検討する。

#### 4.3.2. 結晶化条件が報告されているタンパク質試料

これまでに結晶化が報告されているタンパク質試料の場合、論文、あるいは PDB で結晶化条件の概要は把握できますが、手許のタンパク質試料では結晶化を再現できないことをしばしば経験します。原因としては (1) タンパク質試料の調製時に含まれる塩類やバッファの違い、(2) 結晶化に用いる溶液の主たる結晶化試薬成分以外の成分の違い、が考えられます。CD 法は、タンパク質試料の調製時に含まれる塩類やバッファの違いに影響を受けにくい好適の結晶化方法です。また CD 法、ならびに DPOC 法ではセルフサーチングメカニズムにより、通常用いられているバッチ法や蒸気拡散法よりもより広範囲の濃度条件の組合せを 1 つのキャピラリー/容器で探索できるので、結晶が得られる可能性は高くなります。

より少ない作業量で検討する場合に考えられる手順は以下の通りです。

1. 論文または PDB で報告がある溶液を数種類選んで調製。
2. CD 法で、リザーバ溶液には既知の結晶化試薬を用い、キャピラリーにはタンパク質試料を直接充填したものと、タンパク質試料に既知の結晶化試薬を 1:1 混合したものの 2 種を充填して、結晶化を検討する。
3. DPOC 法で既知の方法をセットアップする。
4. 最長 1 か月程度経過観察し、結晶が得られなかった場合の対策は「4.3.1. 結晶化条件が未知のタンパク質」をご参照ください。

また、高難度なタンパク質の結晶化につきましては、別途メールや Web でのご相談を受けさせていただきます。 **C-Kit Ground Pro e-mail support (CRT101-3)**, **C-Kit Ground Pro video support (CRT101-4)**, ([http://www.confsci.co.jp/images/C-kit%20Ground%20Pro\\_220908E.pdf](http://www.confsci.co.jp/images/C-kit%20Ground%20Pro_220908E.pdf))  
どうぞよろしくご活用ください。

● お問い合わせ先 **株式会社 コンフォーカルサイエンス**

〒158-0081 東京都世田谷区深沢 5-14-15

TEL: 03-5809-1561 FAX: 03-6411-6261

E-mail: [info@confsci.co.jp](mailto:info@confsci.co.jp) <http://www.confsci.co.jp/>