(MS15) 第三世代放射光施設での微小結晶を用いた タンパク質結晶構造解析の現状

副座長: Paul Scherrer Institut/Swiss Light Source 富崎孝司

Takashi TOMIZAKI: (MS15) "Microcrystallography": Methods and Results for Tiny Crystals at 3rd Generation Sources

MS15は先駆的なプロジェクトを支える重要な技術の1つとして、微小結晶による回折強度データ収集に焦点を当てたマイクロシンポジウムである。構造ゲノミクスプロジェクトがもたらした結晶構造解析の迅速化・自動化の恩恵は計り知れないものであることに疑う余地はないが、先駆的なプロジェクトをサポートするためにはそれとは違ったアプローチも必要になる。このようなプロジェクトで得られる結晶は、十分な大きさの結晶が得られないことも少なくなく、また、ある程度の大きさが得られたとしても、結晶中での同型性、X線に対する損傷度、データの質にバラつきが見られることが多く、これらがプロジェクトの遂行をより困難なものにしている。微小結晶から構造解析に用い得る回折強度データを収集するには、結晶の大きさに合わせたX線ビームサイズの柔軟な変更と、X線照射による結晶の損傷を抑えるためのいろいろな対処が必要である。座長であるProf. Q. Haoとともにシンポジウムの目的を明確にして、演者の方々には微小結晶を扱うことに特化したビームラインと、それらのビームラインで解析に成功した先駆的なプロジェクトを実例として紹介していただいた。演者の方々とそのタイトルは以下のとおりである。

R. Sanishvill: Small beams can play big roles in macromolecular crystallography

D. Flot: Recent development and success on ID23-2, at the ESRF

P. Metcalf: Microbeam studies of insect virus polyhedra, infectious protein crystals containing virus particles

K. Hirata: A new beamline to achieve protein microcrystallography at SPring-8

G. Evans: Microcrystallography at Diamond : Facilities for crystal optimization and structure determination

最初の演者であるR. Sanishvillには、結晶の大きさに対するビームサイズの最適化の重要性や、小さなビームサイズを用いることによってもたらされるいろいろな効果などを、彼らが設計・運用しているアメリカ合衆国・アルゴンヌ国立研究所のAPSのビームラインでの実験結果から報

告していただく予定であった。次の演者のD. Flotには、フランス・グルノーブルのESRFで一般供用が開始されたID23-2についてお話をいただいた。ID23-2は、微小結晶用にデザインされた最初のタンパク質結晶構造解析用のビームラインの1つであるID13での経験を踏まえた、さらなるユーザフレンドリネスの向上と高性能化を図ったビームラインで、その結果であり2007年の構造解析のハイライトの1つであったhuman β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor¹⁾の構造解析に大きく貢献している。P. Metcalfには微小結晶しか得られない先駆的なプロジェクトで、微小結晶用ビームラインを用いて構造解析に成功した一例を講演していただいた。回折強度収集にはスイスのポールシェーラー研究所にある微小結晶用ビームラインX06SAを使用し、1つのサンプルホルダー中に数百の微小結晶がある中から良いものを選び出す実例を紹介していただいた。

次の2人の演者の方々には、彼らが建設中の微小結晶用のビームラインについて、ビームラインのコンセプトと開発の現状について報告をいただいた。平田氏の発表についてはご本人のレポートをご覧ください。最後に発表していただいたG. Evansには、現在イギリス・オックスフォードのDiamondで建設中の微小結晶用ビームラインI24について、膜タンパク質の自動結晶化装置から*in situ* screening、データ処理までを1つのパイプラインとした、自動化をさらに推し進めたコンセプトのビームラインとして講演をいただいた。

R. Sanishvillには不都合のため講演をいただけなかったことが残念であるが、ほかの演者の方々の講演には興味深い質問があり、ユーザの方々からも微小結晶に関する問い合わせも増えたことから、シンポジウムの後にも微小結晶用ビームラインのコミュニティ内での交流も盛んになり、成果が得られたと考えている。最後に、会場の設営から講演進行すべてに尽力していただいたスタッフの方々に感謝したい。

文 献

- 1) Søren G. F. Rasmussen *et. al.*: *Nature* **450**, 383 (2007).

タンパク質微小結晶構造解析を可能にする SPring-8 の新しいビームライン (MS15)

講演者：理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター 基盤研究部 平田邦生

Kunio HIRATA: A New Beamline to Achieve Protein Micro-Crystallography at SPring-8 (MS15)

富崎氏の紹介にあったとおりこのマイクロシンポジウムはタンパク質の微小結晶構造解析を可能にするための放射光ビームラインの紹介と、その利用実験で得られた結果についての発表が主に行われた。筆者の発表では、2007年度から開始された文部科学省・ターゲットタンパク研究プログラムの一環で、2010年4月完成を目処にSPring-8で建設中の理研ターゲットタンパクビームラインBL32XUについて発表した。

まず発表のイントロダクションとしてタンパク質の微小結晶構造解析で問題になる点を述べた。微小結晶構造解析では回折に関与できるサンプル結晶の体積が小さくなることが回折強度の減衰につながることを簡単な実験データを示しながら説明した。この問題を解決するために回折強度のシグナルを最大化する必要がある。また、サンプル結晶サイズと同等のX線ビームを利用することにより余分な散乱（バックグラウンド）を最小限に抑えることも同時に必要となる。数ミクロンのタンパク質結晶を用いて結晶構造解析を成功させるためには、微小で高輝度なX線ビームを利用できる放射光ビームラインが必須であると述べた。

次にビームラインの設計についてごく簡単に説明した。このビームラインBL32XUはSPring-8で開発された高輝度光源・真空封止ハイブリッドアンジュレータを利用する。タンパク質結晶構造解析でよく利用されているエネルギー12.4 keVでは標準型真空封止アンジュレータに比べておよそ2倍の輝度をもつ光源である。このアンジュレータで発生した高輝度X線ビームは液体窒素冷却型二結晶分光器に入射され、単色化されてビームライン下流側へ射出される。この二結晶分光器の特徴はこれまでのSPring-8標準型と比べて分光結晶の振動を抑える工夫が施されていることである。分光結晶を駆動させるモータ軸（並進軸、回転軸）を必要最低限に減らし、分光結晶周囲の剛性を高め、床や循環する液体窒素からの振動伝播を最小限にすることを目指した設計である。さらに、分光器設置位置の床面コンクリートを高密度化、分光器内部の液体窒素循環経路配管の再設計などで分光結晶の振動を軽減すれば、X線強度や位置の安定度を向上できると期待している。分光された単色X線は集光時の仮想光源となる超高精度輸送チャンネルスリットを通過して、サンプル位置の直前に

設置する2枚の白金コートX線ミラーによって縦・横方向独立に集光される。X線ミラーは大阪大学で開発されたElastic Emission Machiningと呼ばれる超平坦加工を施し、X線ビームの損失を抑え、小さな集光径を達成可能な設計となっている。光線追跡（レイトレース）の結果からサンプル位置に集光されるビームサイズは1ミクロン角で、得られるX線光子は 6×10^{10} photons/secと予想されている。この試算どおりのビームラインが完成すれば、世界一ビームサイズが小さく、輝度が高いX線ビームが利用できるタンパク質結晶構造解析用ビームラインとなる。

ビームラインで利用する光学素子の開発と並行して行っているほかの要素技術開発についても発表した。本ビームラインでは、数ミクロンサイズのサンプル結晶に数ミクロンサイズのX線ビームを照射する必要があるため、サンプル結晶とX線ビームの位置をいずれもサブミクロンオーダーで制御する必要がある。このため、サブミクロンオーダーでサンプル結晶の回転・並進を制御できるゴニオメータ、ビーム位置モニターを利用してX線ビーム位置情報を光学素子にフィードバックし、ビーム位置を安定に制御するシステムなどの開発を進めている。さらに、サンプル結晶からの微弱な回折強度を効率良く収集するために高感度X線CCD検出器の開発、空気からの散乱を抑えるためのヘリウムチャンバ開発も行っている。

発表の後半ではまず、微小X線ビームが可能になると期待される新たな回折強度収集法を紹介した。微小X線ビームを用いれば、サンプル結晶上でX線ビームを照射する箇所が非常に広範に選択できる。このことを活用すれば、回折能が不均一な結晶や、クラスタ状の結晶からより良好な回折強度を与える部分を選びながら回折強度測定を行うことが可能となる。従来、低品質である、と判断されていたサンプル結晶を用いた構造解析が可能になれば、結晶化条件の最適化に要する時間を大幅に短縮できると期待している。

発表では微小結晶構造解析の利点のみではなく、回折強度収集中の放射線損傷についてこれまで以上に注意を払う必要がある点も述べた。サンプル結晶にX線ビームを照射して回折強度を測定する際には「得られる回折分解能」と「放射線損傷」の関係をしっかりと知っておくことが重要である。1枚の回折強度データを取得するのにサンプル

結晶に入射する X 線光子数は増やせば増やすほど回折分解能は向上する。しかし、入射光子数を増やせば増やすほどデータ収集中の回折強度の減衰速度は増す。筆者が行った実験データによりこれを示し、回折分解能と放射線損傷とはトレードオフの関係にあることを強調した。この実験事実に基づき、現在われわれが開発している放射線損傷を制御した回折強度収集システムの紹介も行った。講演終了後のディスカッションにより、関連研究の第一人者から、

このデータ収集システムの処理速度やシステムの根幹的な問題点などについて指摘、助言を得ることができた。

発表を通して、筆者は今後、われわれが日本国内でタンパク質微小結晶構造解析を汎用化していくうえで、想定すべき利用実験を知ることができた。さらに世界が次に目指すべきタンパク結晶用ビームライン開発についても見通せたように思う。筆者にとって非常に新鮮な情報がたくさん詰まった有意義なシンポジウムであった。