X線自由電子レーザーを利用した タンパク質高分解能無損傷構造解析

理化学研究所・放射光科学総合研究センター*, 兵庫県立大学**, JST/CREST***

平田邦生*, 伊藤(新澤)恭子**, 上野 剛*,***, 山本雅貴*, 吾郷日出夫*

Kunio HIRATA, Kyoko SHINZAWA-ITOH, Go UENO, Masaki YAMAMOTO and Hideo AGO: Determination of Damage-free Crystal Structure of an X-ray Sensitive Protein Using XFEL

We report a method of femtosecond crystallography for determining radiation damage-free crystal structures of large proteins at atomic resolution. The name of the method is 'serial femtosecond rotation crystallography' (SF-ROX). Here, we demonstrate experimental details of SF-ROX and 1.9-Å radiation damage-free structure analysis of bovine cytochrome *c* oxidase, a large (420-kDa), highly radiation-sensitive membrane protein.

1. 研究の背景

ミトコンドリア内膜に存在するチトクロム酸化酵素(以下CcO)は分子状酸素を水にまで還元する反応と共役して膜を介したプロトン能動輸送を行う細胞呼吸末端酵素の1つである。CcOが形成する膜内外のプロトン濃度差は細胞のエネルギー源であるATPの合成に利用されるため、この酵素は細胞のエネルギー変換過程で最も重要な酵素の1つであると言える。ウシ心筋由来酸化型休止型(以下単に酸化型と呼ぶ)CcOの構造解析は1995年に決定され¹⁾、その後、その分子機構のさらなる理解のため主に高分解能構造解析を中心としたCcOの構造生物学を展開した^{2),3)}。詳細については文献を参考にさせていただきたいが、特に酸化型の酸素還元中心の配位分子種の特定は反応サイクル中の電子の授受とプロトンポンプ機構のカップリングを理解する上で重要な研究対象であり、われわれは結晶構造解析や分光学的手法を組み合わせ

せこの解明に取り組んでいた。CcOの酸素還元中心は、文字どおり分子状酸素の還元反応が起こるCcOの活性中心である。ヘム鉄およびその近傍に存在するCu_Bで構成されるこの活性中心図(図1)には配位子の電子密度が認められており、特に酸化型CcOでは過酸化物であろうと推定していた。

われわれは高分解能酸化型CcO構造解析による配位子同定を目指す中、「タンパク質結晶の放射線損傷」という重篤な問題に直面した。CcO結晶へのX線照射と結晶の吸収スペクトル測定を交互に行った結果、X線の照射により酸化型CcO結晶の吸収スペクトルが変化することが明らかとなったのである。この吸収スペクトルの変化はX線照射により引き起こされる酸素還元中心の電子状態の変化が主原因であると考えられた⁴⁾。X線照射が構造解析に及ぼす影響を見るために、回折データ取得の際のX線総露光量(エネルギー吸収量)を変化させて酸化型CcOの高分解能構造決定を行った。結果、露光量が増えるに従って得られる構造中の配位子の結合長が伸長することが明らかとなった。われわれは配位子をその結合長から正確に同定するために少なくとも2 Åを超える高分解能で構造解析を行う必要があると考えていた。このためには結晶への「大強度」X線照射が必須であったが、「大強度」X線照射の結果、目的の配位子の形を歪めてしまうというジレンマに直面したのである。とりわけ電子密度の高い金属で構成されたCcOの酸素還元中心は放射線損傷感受性が高く、配位分子種の特定にはこの問題は深刻であった。

この問題を解決するため、われわれはシンクロトロンビームラインにおいて合計400個余りのCcO結晶の各結

図1 チトクロム*c*酸化酵素(CcO)の酸素還元中心の電子密度。(Electron density map of a ligand of CcO.)
ヘム_{a3}(Fe_{a3})とCu_Bの間に配位子の電子密度が確認できる。

晶から1枚だけ(通常はフルデータ450枚収集)回折像を取得し、それらをマージして利用する手法を開発し⁵⁾酸化型CcOの構造解析を行った。このように過去最少の放射線損傷量で収集したデータに基づいて決定した構造中の配位子O-O結合長を1.7 Åと推定し、この時点では過氧化物イオンであると結論づけた。⁴⁾しかしこの構造解析で得たO-O結合距離1.7 Åも、共鳴ラマン分光法(対象は溶液)により決定されていた1.5 Åよりも0.2 Å長いものであった。

このようにして、シンクロトロン放射光を用いた「放射線損傷最少」の酸化型CcO高分解能構造決定を行い配位分子種の推定を行ったが、「あるがままの」配位子の構造を直接観測については実現不可能と考えられた。

2. XFELを用いた回折実験

2.1 実験の概略

2012年3月われわれはSPring-8に併設されたXFEL施設であるSACLA(SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laserの略称)の共同利用ユーザとして「タンパク質無損傷高分解能構造解析」の実現を目指し実験を開始した。XFELを用いれば酸化型CcOの配位子を「あるがまま」捉えることができると期待したのである。SACLAで利用可能なXFELは時間幅約10フェムト秒におよそ 10^{11} 個の光子を含み、波長領域がX線領域にあるレーザー光である。

タンパク質結晶の放射線損傷は結晶に入射したX線により引き起こされる光電効果で生じた電子(光電子)が主な原因であると言われている。⁶⁾結晶内で生じた光電子は結晶中に多く含まれる水分子やタンパク質分子と相互作用を起こしラジカルなど反応性の活性分子種を

数多く生成する。これらが結晶の劣化(グローバル)やタンパク質分子の状態変化(ローカル)を誘起することが広く放射線損傷と呼ばれているものである。前者は、データ収集中に結晶の回折能が低下することにより得られるデータセットの分解能が低下、データ処理の困難化などの原因となるものである。後者は電子密度上、局所的な構造変化として現れる放射線損傷であり、結晶内で起きるこの化学反応の時間スケールは速いものでおおよそピコ秒オーダーであるとされている。そこで、10フェムト秒/パルスで回折像を取得可能なXFELを用いれば放射線損傷の化学反応が引き起こされる「前」の結晶構造を反映した回折像を取得することができ、無損傷構造解析が実現できる(“Diffraction before destruction”⁷⁾)と考えた。

実験を開始した頃にはすでに米国LCLS(XFEL施設)を用いたタンパク質結晶構造解析の報告はあったが、常温微小結晶を用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析(Serial Femto-second Crystallography 以下, SFX)^{8), 9)}で行われていた。われわれはこれとは異なり、数百ミクロン大の大型凍結タンパク質結晶を用いた「高分解能構造解析」の実現を目指し測定を開始した。良質なCcOタンパク質結晶標品を大量に調製する方法が確立していたこと、これまでのシンクロトロン光源で蓄積してきた高分解能構造解析やデータ収集経験を活用することが可能であること、大きな結晶を利用することで同じ強度のX線を使う場合に分解能を稼ぐことができること、凍結結晶の利用により放射線損傷伝播の影響を抑えることができる、と考えたからである。

まず今回のCcOの無損傷構造解析を実現するために確立した実験の概略図を図2に示した。XFELを凍結

図2 a: SF-ROX (Serial Femtosecond Rotation Crystallography)^{10), 11)}の実験コンセプト, b: SACLA XFELを利用した際の結晶上の放射線損傷伝播。(a: Schematic diagram of SF-ROX, b: Propagation length of radiation damage on CcO crystal.)SACLA 1 μm集光, 3×10^{10} 光子のパルスを減衰無しで照射した点(グラフ0 μm近傍)周囲の回折能減衰を回折イメージ上に観測される反射数で評価した。評価のためのイメージ(前:青, 後:赤)は1%程度に強度を減衰させて取得している。編集部注: カラーの図はオンライン版を参照下さい。

CcO結晶に1パルス(含まれる光子数 $10^{10} \sim 10^{11}$ 個)照射し1枚の回折イメージを取得後, 結晶をある量並進・ある角度回転させ, それまでXFEL照射で損傷を受けていない結晶体積に次のXFELを1パルス照射して回折イメージを1枚取得する。これを繰り返して無損傷回折データを完成する方法である。

この方法を用いるにあたり実験事前に決定しなければならないことが2点あった。1つは「無損傷構造解析を実現できる結晶上XFEL照射点間の距離」, もう1つは「照射点間での結晶の回転角度ステップ」である。

2.2 SACLAで使用した装置

実験パラメータ決定の説明の前に今回の実験で利用した装置について触れておく。計画した実験が可能な回折計のポイントは以下のとおりである。①試料結晶をミクロンオーダーで並進させることができること②結晶の回転が可能であること③凍結結晶を用いるため低温吹き付けガス装置が利用できること④数十HzでやってくるXFELの1パルスを切り出して試料に照射できること⑤回折像を取得するX線検出器を有すること, などである。これらの要求仕様は従来シンクロトロン放射光施設で利用している回折計とほぼ違いがないため, 最初の測定時にはSPring-8所内で利用していた回折計をSACLAに持ち込んで利用した。2013年の実験時に利用した装置の外観は図3に示したとおりである。④のパルスの選択に関してはSACLAに備え付けられているパルスセクタを利用し1パルスのみを結晶に照射することを容易に実現することができた。SPring-8構造生物学ビームラインで利用されている汎用制御ソフトBSS¹²⁾を用いて回折計を制御し測定を実現した。また今回のCcO回折実験ではゴニオメータへの凍結結晶マウントは人間が行ったが, SPring-8で利用している試料結晶自動交換ロボットSPACE¹³⁾を用いて自動で結晶をマウントすることも可能である。凍結結晶はUni-puck(Crystal Positioning Systems

社)を用いて32個(ピン)ストレージにおいておくことが可能である。このSPACEは測定効率を向上するため, 測定後のサンプルピンはソレノイドを利用してゴニオメータ上から落とすことが可能になっている。結晶を回収する必要がある場合には測定にかかる時間を一部短縮できる。

2.3 凍結タンパク結晶上の放射線損傷伝播距離

今回の測定では凍結CcO結晶にXFELを1パルス照射した場合, 結晶上どの程度の距離まで放射線損傷が広がるかを明確に知る必要があった。われわれは解析の対象となる酸化型CcO結晶を用いてX線照射による損傷の伝播距離を実験的に決定した。これはSPring-8・理研ターゲットタンパクビームラインBL32XUでの放射線損傷伝播距離の定量化で利用している方法と同じである。¹⁴⁾ まず半値全幅1ミクロン程度に集光されたXFELをシリコンのアッテネータで1%程度まで減衰させ, 1ミクロンステップで31点, 水平方向に移動させながら各露光位置から回折イメージを31枚取得し, 各イメージ上に観測された反射スポットの数を取得した。これを「損傷がないときの結晶の回折能」のリファレンスとした。次にこの水平30ミクロンの中心位置に減衰なしのXFELを1パルス照射した。これは「測定に利用する強度のX線で結晶に損傷を与える」ための照射である。最後に最初とまったく同じ条件で31枚の回折データを取得した。最初と最後の合計62枚の回折イメージ上のスポットの数を結晶上の照射位置に対してプロットしたのが図2右である。照射後のプロットでは中心に高強度XFELパルスが照射されているので損傷により最も観測された回折点が少なく, そこから離れるほど回折点の数は照射前のリファレンスに近づいている。このグラフから減衰なしで照射された10 keV(波長約1.24 Å)のXFELの中心位置からおおよそ11ミクロン程度の位置までが放射線損傷により影響を受けていることがわかる。同様の測定を縦方向についても行った結果, おおむね水平方向と同様の結果を得た。われわれはこの結果にセーフティマージンを付加し, 各照射点間の距離を50ミクロンとし実験を行うこととした。減衰なしのXFEL1パルスの照射での吸収線量はプログラムRADDOSE¹⁵⁾を用い9.8 MGyとなった。参考までにシンクロトロン放射光施設のBL32XUを用いた場合, 同じビームサイズ, 同じ吸収線量照射では照射位置から3ミクロン程度となりSACLAで得られた11ミクロンよりも狭くなっていた。詳細を検討する測定は行っていないが, 凍結結晶に $10^{10} \sim 10^{11}$ 光子のXFELパルスを照射した後, 顕微鏡で観察するとビームサイズより大きな径で結晶がえぐれたような照射痕が残ることが確認できる。このことからXFEL照射の際には通常の放射線損傷に加え, 結晶を「削り取る」ような損壊も起きているのではないかと考えている。

図3 SACLA回折計。(Diffraction for SF-ROX at SACLA.) XFELは図の左(上流側)からやってくる。

2.4 静止回折像を収集する条件決定

2つ目の実験パラメータ「照射点間の回転角度」についてわれわれが実験を行う前にどのようなことを検討したかについて簡単に触れておきたい。

シンクロトロン放射光を用いた結晶構造解析では回折データ収集の際にいわゆる“振動写真法”と呼ばれる測定方法を用いる。この方法ではタンパク質結晶を回転させながらX線を照射し1枚の回折イメージを得る。回折イメージ上に観測されるある反射強度に注目すると回転方向に強度プロファイルをもっており（以下ロッキングカーブ）1枚の回折イメージ上に観測される強度は図4に示したように全体の強度（完全反射強度）の一部である（部分反射強度）場合が多い。データ収集時には結晶は連続した回転角度をカバーするように多数の回折イメージを取得するので、最終的にはそれぞれのイメージ上に観測された部分反射強度をすべて足し合わせたものをその反射の回折強度（完全反射強度）として取り扱う。

ところが、フェムト秒パルスX線を照射している間に

図4 従来法（振動X線回折）とSALCAで利用している方法（静止X線回折）の違い。（Rocking curves in rotation method and still method.）振動X線回折では結晶を回転させながら回折強度（ロッキングカーブ）を得る（左）。一方、静止X線回折ではロッキングカーブを複数の固定角度でサンプリングした強度を得る（右）。

結晶を回転させることは（今のところ）装置の制限から不可能であるため、SACLAでは従来の振動写真法を用いることはできない。このため結晶をある角度に固定しX線を照射・回折イメージを取得する“静止写真法”を用いなければならない。図4右に静止写真法を用いた測定についての概略図を示した。回折強度を不連続にサンプリングするため、得られた強度を足し合わせても全体の強度を得ることができない。もちろん、この角度ステップを小さくしていけば正確に反射強度を測定することはできるが、構造解析のために集めなければならない回折イメージのフレーム数は増える。特に今回の測定のように1イメージごとに無損傷な結晶体積へXFELを照射しなければならない実験では必要フレーム数の増加は、利用する結晶数の増加、測定時間の増大につながるため非効率的であると判断した。

われわれはシンクロトロン放射光を用いた静止写真法のデータ測定により、どの程度の角度ステップであれば原子分解能で精密な構造解析が可能であるかを検討した。まず、ニワトリ卵白リゾチームの凍結結晶を用いて、SPRING-8偏光電磁石ビームラインBL26B2において振動写真法により取得したデータセット、また同じ結晶から角度ステップ0.05°、総データがカバーする結晶回転角度が90°の静止写真法により取得したデータセットを準備した。前者のデータを用いて構造精密化を行ったリゾチームの原子座標を「正しい構造」として取り扱った。同様に角度ステップ0.05°の静止写真法データについても振動写真法により得られたものとしてMOSFLMにより積分し構造解析を行った。さらに、同じデータセットを1枚ごと、2枚ごと、3枚ごと、と飛ばして作成した仮想的な0.10°、0.15°、0.20°ステップの静止写真データセットを用いて、それぞれMOSFLMで積分・構造解析を行った。表1にこの結果を示した。それぞれから得られた構造因子を用いて構造の精密化を行った後、信頼度因子（R-factor）や正しい構造との座標の違いを評価した。結果として、0.2°ステップの静止写真法であれば得

表1 静止写真法で収集したデータを用いた精密化の妥当性評価。（Evaluation of precision of structure factors obtained by various oscillation steps of still method.）同じニワトリ卵白リゾチームの結晶から0.05°振動写真法および0.05°静止写真法で回折データを収集した。0.10°、0.20°ステップの静止写真データは0.05°静止写真法のデータを間引いて仮想的に作製し、各データを独立のものとしてMOSFLM/SCALAで処理してPDBID:1LZCのリゾチームを初期モデルとして座標・温度因子の精密化を行った。原子座標のrmsd（平均二乗偏差）の計算では0.05°振動写真法で得られたデータで精密化した座標に対して、各データで精密化した座標を用いて評価した。C.C.は精密化で得られた最終モデルとマップとの相関係数（phenix.get_cc_mtz_pdbを用いて計算）を示している。

ステップ [deg.]	反射数	$\langle I/\sigma I \rangle$	R_{merge} [%]	R_{free}/R [%]	r.m.s.d. [Å]	C.C.
0.05 (rot)	110,528	35.0 (10.8)	3.5 (16.1)	18.6/16.8	—	0.891
0.05	110,931	26.3 (3.9)	5.2 (46.5)	20.5/17.1	0.031	0.899
0.10	111,577	21.2 (4.6)	6.0 (39.4)	19.8/17.0	0.033	0.900
0.20	109,082	11.0 (3.4)	10.8 (51.5)	20.2/17.4	0.033	0.897

られる構造の精度に問題がないと判断した。この時、結晶のモザイク角が 0.4° 程度であったため、われわれはモザイク角の半分程度のステップ角度を選択すれば原子分解能かつ精密構造解析が可能であると判断した。

実際には、凍結CcO結晶を用いてSACLAで収集したいくつかの結晶の平均的なモザイク角が 0.3° 程度であったためその半分よりも小さな 0.1° というステップ角度を選定し静止写真のデータ収集を行った。この方法はIlme Schlichting¹¹⁾によりSFX (Serial Femto-second Crystallography)と区別化するために「Serial Femtosecond Rotation Crystallography (以下SF-ROX)」と命名された。

2.5 SACLAで実施した測定と得られたデータ精度

測定の手順を簡単に以下に記す。凍結CcO結晶をゴニオメータにマウントし、結晶の最も広い面をXFEL光軸に垂直にし、この角度を 0° とした。複数結晶からデータ収集をすることが前提であったので、結晶マウント後この作業を必ず行い、 $0 \sim 135^\circ$ 分のデータを収集することを目指した。露光点間の距離50ミクロン、静止写真のステップ角度 0.1° で測定を行った。CcO結晶は平均的な結晶サイズは $500 \times 500 \times 100 \sim 200$ ミクロン程度であったため、多いものだと1結晶から100枚程度(約 10° 分)の角度が連続する回折イメージが取得可能であった。最終的に76個の結晶を用いておおよそ 135° 分のデータを収集することができた。それぞれの結晶についてはCCP4プログラムであるMOSFLMを用いて指数付け、各イメージ上に観測された反射強度の積分を行った。1,170枚の回折イメージから最終的には表2に示す統計値のデータを得ることができた。

2.6 無損傷構造解析の結果明らかになった配位子の構造

上記のような回折実験により得られたデータを用いてCcOの構造解析を行った。精密化に関する情報は表2にまとめた。余談になるが冗長度に関して、SF-ROXの場合には「部分反射強度を足しあわせた後の完全反射強度としての冗長度」であって、従来の振動写真法で評価する“冗長度”と同じである。いわゆるSFXのモンテカルロ積分データのそれ(部分反射強度も“1個”と数えた反射の数)とは厳密には定義が異なっている。

さて今回の目的であった配位子の構造についてはまず酸素還元中心の電子密度図を $2F_o - F_c$ マップにより確認した。配位子はこれまでのCcO酸化型構造と同様、 $\text{Fe}_{a3}\text{-Cu}_B$ の間に存在しており特に大きな構造変化は認められなかった。定量的に配位子の結合長を検討するためにはわれわれはここに酸素原子が2個存在することを前提とし、その結合長に通常精密化時に利用する束縛条件を適用しないで(un-restrained)原子座標の精密化を行った。un-restrained精密化後の酸素原子間距離は $1.7 \text{ \AA}$ となった。同じ精密化をシンクロトロンビームラインBL44XUと400個以上の結晶から得たデータに適用する

表2 データ処理の結果および精密化の結果。(Data statistics and refinement results.) * () 内に最外殻の情報を記載。

Data collection/processing	
Space group	$P2_12_12_1$
Cell dimensions a, b, c (標準偏差)	182.60 (0.38), 204.51 (0.55), 178.29 (0.46)
Resolution *	27.33-1.90 (2.00-1.90)
Observed reflections *	1,903,997 (256,844)
Independent reflections *	500,669 (71,920)
Averaged redundancy *	3.8 (3.6)
$\langle I/\sigma I \rangle$ *	6.7 (2.1)
Completeness (%) *	96.2 (95.1)
R_{merge} *	0.243 (0.408)
$CC_{1/2}$ *	0.872 (0.583)
Refinement	
Resolution	27.33-1.90
No. of reflections (all/free)	473,986/25,158
R/R_{free}	0.195/0.230
R.m.s. deviations	
Bond length ($\text{\AA}$)	0.027
Bond angles (degrees)	2.33

と $1.9 \text{ \AA}$ であり、⁴⁾ その数値よりも $0.2 \text{ \AA}$ 短いものとなった。さらに電子密度図に基づき酸素化合物の結合距離を決定するために、今度は逆に配位子の酸素間の結合距離に $0.1 \text{ \AA}$ ずつ $1.2 \text{ \AA}$ (分子状酸素) $\sim 1.8 \text{ \AA}$ という束縛条件を与えて構造精密化を行い、得られた構造因子を用いて $F_o - F_c$ マップを比較した。この結果、酸素結合距離が $1.5 \text{ \AA}$ と $1.6 \text{ \AA}$ の結合長のときに残余電子密度の量が最も減少して見えることがわかったため、酸化型CcO中の配位子結合距離が $1.55 \text{ \AA}$ であるとして精密化を行い最終構造とし、配位子の化学種が過酸化イオンであると結論づけた。ほかにもこれまでの高分解能構造解析において放射線損傷が増えると高くなる水分子の電子密度の評価からも得られた構造が無損傷であるという確証を得ることができた。¹⁴⁾

3. 考 察

3.1 結晶サイズと分解能についての考察

冒頭でも述べたが今回最も重要な目的は「無損傷かつ高分解能」のタンパク質結晶構造解析であった。結果として大きな凍結結晶を用いるメリットは十分あったと考えている。実験に利用する結晶サイズと分解能の関係について今回の実験結果を踏まえて少し考察しておきたい。

X線検出器で観測できる回折強度と実験に用いるパラメータの関係を示したDarwinの式がある。¹⁶⁾ この式から、回折強度はX線で照らされた結晶体積に含まれる単位格子の数に比例し、結晶の体積が大きいほど得られる強度シグナルは強くなることがわかる(直感的にも正しい)。次にCcOの場合には結晶格子体積はおおよそ $6 \text{ M}\text{\AA}^3$ となっており、例えばニワトリ卵白リゾチームの

図5 結晶サイズと得られる最大分解能。(Observed resolution limits against crystal size.) 結晶サイズ (X線から見て奥行き) の異なる酸化型CcO凍結結晶上から回折像を露光点1カ所につき1枚、合計10枚ずつ取得し、それぞれMOSFLMにより指数付け・積分し、シェルゴとの平均シグナルノイズ比2となる分解能を端分解能 (d) とし、 d^*2 としてプロットしている。横軸の結晶サイズは対数。

0.2 MÅ³に比較して非常に大きいと言える。これは単純にCcOの分子量が約400 kDaであるのに対してリゾチームは約18 kDa、という分子の大きさを反映しているとも言える。このように大きな分子の結晶であればあるほど必然的に結晶格子は大きくなるため、大きな結晶を利用することで回折分解能を向上することは有効であろう。

確認実験の結果として図5にCcO酸化型結晶のサイズとSACLAのX線を照射したときに得られる回折分解能の関係をプロットした。CcO酸化型の異なるサイズの凍結結晶を準備し、同じ結晶から1パルスXFEL照射で1枚、これを異なる照射点で繰り返して10枚ずつ回折イメージを取得し、それぞれを積分した後、得られた回折強度のシグナルノイズ比が2未満になる境界を最大分解能とし d^*2 として結晶サイズ(対数)に対してプロットしてある。この図から明らかなように少なくとも入射光子数を一定にした場合(この実験ではエネルギー10 keV、フォトン数 $\sim 10^{11}$ /パルス)、CcO凍結結晶では結晶のサイズが大きくなるにつれ回折分解能は向上していることがわかる。

ただ、論文のレビューアからは大きな結晶は成長過程で質が落ちる、回折実験中に結晶そのものによる吸収が大きくなる、などの理由で大きな結晶だからといって一概に高分解能回折が得られるとも限らない、とのご意見をいただいたことも付け足しておきたい。

3.2 XFELの利用により高分解能構造解析が実現できる？

今回の結果に関連してよく受ける質問に「XFELを用いて放射線損傷以前に回折データが撮れるならば得られる分解能がシンクロトロン放射光に比較して向上しているのではないか？」というものがある。今回の実験結果日本結晶学会誌 第57巻 第2号 (2015)

では、同品質の結晶に同程度の光子数入射をすればいずれの施設でも同程度の回折分解能が得られることを確認したのみである。この際の吸収線量は9.8 MGy/イメージであり、放射線損傷がさほど重篤ではない露光条件であるため、今後、XFELの強度が“桁”で強くなってきた場合には、上記のようなことが観測できるかどうかを確かめる必要があるだろう。

4. まとめと展望

新しい光源XFELを用いて、従来のタンパク質のX線結晶構造解析における大きなジレンマを解決することができた。「分子量40万超」の「膜タンパク質複合体である」チトクロム酸化酵素の「高分解能」かつ「無損傷」の構造を決定したことで、「その機能を理解するために重要な」構造情報を得ることができた、とも言い換えることができる。

XFELの利用はタンパク質の結晶構造解析に新たな可能性を与え、われわれはその特徴の1つを活用し構造生物学の大きな一歩を踏み出した。現在までにこの手法を光化学II (Photosystem II) の無損傷構造解析に適用することにも成功しており、¹⁷⁾ SF-ROXを1つの重要な構造解析基盤技術として確立できたと考えている。次の目標はXFELの極短パルス性を活用し、ポンププローブ時分割構造解析を高分解能で実現することであり、現在その準備を進めている。CcOの酵素反応過程を高分解能ムービーにすることを実現し、XFELを用いてタンパク質結晶構造解析に「時間軸」を与える技術確立を目指したい。

謝 辞

本構造解析はJST/X線自由電子レーザー施設重点戦略課題推進事業「無損傷・動的結晶構造解析による生体エネルギー変換過程の可視化」およびJST/CREST「ミトコンドリア呼吸鎖の構造生命科学—構造がもたらす正確さ」の支援を受け実施した。本実験にご協力頂いたJASRI, RSCエンジニアリングチームの皆様を始めとする関係各位に深く感謝申し上げます。また本稿に関する実験はSACLA利用実験課題(課題番号: 2012A8011, 2012B8040, 2013A8047 and 2013B8052)でデータ収集を行った成果です。

文 献

- 1) T. Tsukihara, *et al.*: *Science* **269**, 1069 (1995).
- 2) K. Muramoto, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7881 (2007).
- 3) K. Muramoto, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 7740 (2010).
- 4) H. Aoyama, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 2165 (2009).
- 5) K. Hirata, *et al.*: *J. Synchrotron Rad* **11**, 60 (2004) [doi:10.1107/S0909049503024129].
- 6) P. O'Neill, *et al.*: *J Synchrotron Rad* **9**, 329 (2002).
- 7) R. Neutze, *et al.*: *Nature* **406**, 752 (2000).
- 8) P. Fromme and J. C. Spence: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 509

- (2011).
- 9) I. Schlichting and J. Miao: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 613 (2012).
 - 10) K. Hirata, *et al.*: *Nat Meth* **11**, 734 (2014).
 - 11) I. Schlichting: *Nature* **517**, 26 (2015).
 - 12) G. Ueno, *et al.*: *J. Synchrotron Rad* **12**, 380 (2005) [doi:10.1107/S0909049505004735].
 - 13) H. Murakami, *et al.*: *J. Appl. Cryst* **45**, 234 (2012) [doi:10.1107/S0021889812003585].
 - 14) R. Sanishvili, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 6127 (2011).
 - 15) J. W. Murray, *et al.*: *J Synchrotron Rad* **12**, 268 (2005).
 - 16) J. M. Holton and K. A. Frankel: *Acta Cryst D* **66**, 393 (2010) [doi:10.1107/S0907444910007262].
 - 17) M. Suga, *et al.*: *Nature* **517**, 99 (2015).

プロフィール

平田邦生 Kunio HIRATA
理化学研究所放射光科学総合研究センター
RIKEN/SPRING-8 Center
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1 SPRING-8
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148,
Japan
e-mail: hirata@spring8.or.jp
専門分野: 放射光科学, 構造生物学

伊藤(新澤)恭子 Kyoko SHINZAWA-ITOH
兵庫県立大学生命理学研究科 生命科学専攻
〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1
3-2-1 Kouto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-
1297, Japan
e-mail: shinzawa@sci.u-hyogo.ac.jp
専門分野: 生物化学

上野 剛 Go UENO
理化学研究所放射光科学総合研究センター
RIKEN/SPRING-8 Center
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1 SPRING-8
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148,
Japan
JST/CREST
〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8
4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan
e-mail: ueno@spring8.or.jp
専門分野: 放射光科学, 構造生物学

山本雅貴 Masaki YAMAMOTO
理化学研究所放射光科学総合研究センター
RIKEN/SPRING-8 Center
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1 SPRING-8
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148,
Japan
e-mail: yamamoto@spring8.or.jp
専門分野: 放射光科学, 構造生物学

吾郷日出夫 Hideo AGO
理化学研究所放射光科学総合研究センター
RIKEN/SPRING-8 Center
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1 SPRING-8
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148,
Japan
e-mail: ago@spring8.or.jp
専門分野: 放射光科学, 構造生物学