世界の放射光施設を使ってみよう (4)

長波長X線を利用した
タンパク質結晶構造解析

高エネルギー加速器研究機構

松垣直宏, 山田悠介, 引田理英,
平木雅彦, 千田美紀, 千田俊哉Naohiro MATSUGAKI, Yusuke YAMADA, Masahide HIKITA,
Masahiko HIRAKI, Miki SENDA and Toshiya SENDA:
Macromolecular Crystallography Using Long Wavelength X-ray

Applying long wavelength X-ray (ca. longer than 2 Å) in macromolecular crystallography has been limited due to the lack of dedicated measurement environment. Photon Factory BL-1A, as an MX beamline optimized for diffraction experiment using the wavelength from 2.7 to 3.3 Å, offers the opportunity to routinely perform data collection for Native SAD phasing or light atoms identification with much sophisticated manner. Sample optimization is another key for successful experiment at the wavelength where severe absorption is inevitable. We describe how the difficulties in use of long wavelength X-ray were overcome at the beamline and the auxiliary facility, as well as the current results of Native SAD phasing.

1. はじめに

タンパク質の結晶構造解析に長波長X線を使う目的は、結晶中の軽原子による異常分散効果の利用にある。イオウ、リン、カリウムやカルシウムなどの軽原子の異常分散シグナルは、通常のタンパク質結晶構造解析用ビームライン (Macromolecular Crystallography, MX ビームライン) で利用可能な波長領域 (0.7 ~ 2 Å) では小さいが、2 Å より長い波長領域では増大する (図1)。この

図1 軽原子からの異常分散シグナルの波長依存性.
(X-ray wavelength dependency of the anomalous
signals from light atoms.) 参考までにSeの異常分散
シグナルも示す.

増大した異常分散シグナルを用いることで、結晶中の原子・イオンの同定や実験的な位相決定を、より正確に行うことが期待できる。

異常分散効果は、タンパク質結晶の位相決定のための最も重要な手がかりである。1990年代以降、セレノメチオニンを用いた大量発現系と波長可変の放射光ビームラインの発展により、多くのタンパク質結晶はセレンをはじめとする金属の散乱の波長依存性を利用した多波長異常分散法により位相決定された。その後、電子密度改善法など解析ソフトウェアの進歩とともに、異常分散効果が期待できる単一波長のデータのみを用いた位相決定 (Single Anomalous Dispersion 法, SAD 法) が実用化された。測定が簡便な上、試料の放射線損傷によるデータ間の誤差を考慮しなくて良いため、現在ではこのSAD法で位相決定される結晶構造が最も多い。¹⁾

Native SAD法は、タンパク質や核酸にもともと含まれているイオウ、リンなどの軽原子の異常分散シグナルを利用したSAD法である。位相決定のための結晶への金属導入 (セレノメチオニン結晶を含む) が不要となるため、構造解析に大幅な簡便化、効率化をもたらすと考えられた。しかし、1980年、46残基の小型タンパク質CRAMBINの構造解析²⁾で初めて可能性が示されて以降、PDBに登録されたNative SAD法による新規構造は100エントリー程度に過ぎない。^{3,4)} SAD法は今や最もポ

ピュアーな位相決定法であるから、成功例の少なさはデータの質が悪いことに起因すると考えざるを得ない。実際、これまでのNative SAD用のデータ測定は、MXビームラインで利用可能な長波長側 ($1.7 \sim 2 \text{ \AA}$)、あるいは実験室線源のCuK α 、CrK α (それぞれ波長 $1.54 \text{ \AA}$ 、 $2.29 \text{ \AA}$) を用いて行われてきた。しかも、異常分散効果が小さい波長であるにもかかわらず測定は通常と同一のセットアップで行われ、試料自身、あるいは試料-検出器間の空気によるX線の吸収・散乱への対応は限定的であった。これらがデータの精度を悪化させ、位相決定に必須な異常分散シグナルの検出を困難にした原因と考えられる。

このような過去の実績から、より大きな異常分散効果が期待できる長波長X線を用いること、そして長波長X線に最適化されたデータ収集を行うことが、Native SAD位相決定に必要であることは明らかである。しかもSe-SAD並みのアクセシビリティを考えるなら、一時的なセットアップではなく、常時長波長X線によるデータ測定に最適化された環境が望ましい。現存するMXビームラインでは、Diamond Light SourceのビームラインI23^{5,6)} およびKEK Photon FactoryのBL-1A⁷⁾ のみが、この条件を満足する。前者は測定環境を真空にすることで、後者はヘリウムガス雰囲気にするすることで、長波長X線による回折データ収集の困難を解決している。

2. 長波長X線に最適化された回折データ収集

2.1 Photon Factory BL-1A

BL-1Aは、Photon Factoryの5本のMXビームラインの1つとして2009年に建設された。Native SAD法によるタンパク質結晶の位相決定を主目的とし、波長 $2.7 \sim 3.3 \text{ \AA}$ の長波長X線を用いて日常的にデータ収集が可能な環境を実現している。試料からの回折X線がX線検出器に入るまでのビームパスは、検出器を含んだ回折計全体を囲うチャンバーによってヘリウムで満たされており、吸収・散乱によるシグナル低下・バックグラウンド増大を防いでいる(図2)。ビームパスを空気からヘリウムに置き換える効果は波長 $1 \text{ \AA}$ 付近でも顕著で、タンパク質結晶からの微弱な回折X線の検出を助ける(図3)。BL-1Aでは、利用可能な波長領域 ($0.96 \sim 1.1 \text{ \AA}$ 、 $1.9 \text{ \AA}$ 近傍、および $2.7 \sim 3.3 \text{ \AA}$) すべてにおいて、セットアップを変更することなく常時ヘリウム環境下での低バックグラウンド回折実験が可能である。

X線による試料の放射線損傷を低減するため、通常のMXビームライン同様、温度 95 K の冷却ガスを試料に吹き付けながらデータ収集が行われる。違いは窒素ガスの代わりにヘリウムガスを用い、吹き付けたガスを循環させて再利用している点である。こうすることで高価なヘリウムガスで試料部を冷却し続けることが可能となる。

図2 BL-1A回折計全体を覆うヘリウムチャンバーと、V字配置の2台のEIGER検出器。(Standing helium chamber enclosing the whole diffractometer at BL-1A. Two EIGER detectors are configured in V-shape.)

図3 大気およびヘリウム雰囲気での回折イメージのバックグラウンド。(The background diffraction images under air and helium atmosphere.)

冷却ガスやビームパスがヘリウムであること以外は通常のMXビームラインと試料まわりに違いはない。標準の試料ホルダー(クライオピン)を用いてほかのビームラインとほぼ同じ操作で実験を行うことができる。試料の交換は、標準の試料カセットUnipuckに対応した専用のサンプルチェンジャー⁸⁾によってのみ行われる。

サンプル位置での集光ビームサイズは約 $13 \mu\text{m}$ (FWHM)、波長 $1.1 \text{ \AA}$ 、 $2.7 \text{ \AA}$ でのフラックスはそれぞれ 0.9×10^{11} 光子/秒、 1.3×10^{11} 光子/秒である。 $10 \mu\text{m}$ 程度の結晶、あるいは結晶の良質部分のみにビームを当ててデータ収集することができる。幅広い波長領域のX線強度を調整できるよう、アルミニウムとベリリウムの薄膜を組み合わせたアテネータが準備されている。

試料の回転軸にはヘリウム環境下で動作可能なメカニ

図4 BL-1Aの試料周辺とミニカッパーゴニオメータ.
(Sample environment at BL-1A with the mini-kappa goniometer.)

カルダイレクトドライブ (QKSU-SDD, 神津精機製) が用いられている. 最大回転速度720度/秒, 芯ブレ1 μm 以下とエアベアリングと同等の性能をもつ. 回転軸上には試料センタリング用の直交ステージに加えてミニカッパゴニオメータが設置されており, 試料の方位を40度程度まで変化させることができる (図4).

X線検出器は, ヘリウム雰囲気中で運転可能なDECTRIS社製のEIGER X 4Mが設置されている. 計数型のピクセルアレイ検出器のため読み出しノイズの影響を受けにくく, 微弱な回折X線を検出するのに適しているとともに, 高フレームレート (最大750 Hz) でのデータ読み出しができる. 検出器は上下に並べて2台設置されており, 通常は下側の検出器を水平配置にして実験が行われるが, 2台の検出器をそれぞれ25度傾けV字配置にして同時に読み出すこともできる (図2). この配置でカバーできる回折角 (2 θ) はほぼ90度に達し, 高分解能データの収集時に用いられる. 回折データはほかのMX ビームラインと共通の大容量ストレージに, 専用の10 Gb/s高速ネットワークを使って書き込まれる.

すべてのビームライン操作は, PFのMX ビームラインで共通の統合GUI (UGUI) ソフトウェアを用いて行われる. リモートモニタリングシステム (PF Remote Monitoring System: PReMo)⁹⁾ により, ユーザーは実験の進行状況をWEBインターフェースで確認できる. また, 各データセットの収集後, PReMoによって起動される自動処理パイプラインによりバックグラウンドでデータ処理プロセスが走り, 完了次第, 結果がWEB上に表示される.

2.2 深紫外レーザーアブレーションによる試料加工

タンパク質結晶は通常, 自身が成長した結晶化溶液やクライオプロテクト溶液とともにサンプルホルダー (ナイロンループなど) 上で凍結・固定される. 長波長X線による回折を考えたとき, それら試料自身によるX線

図5 深紫外レーザーによる結晶加工機の外観. (Outlook of the crystal shaping machine by Deep-UV laser.)

の吸収は大きく, その効果は試料の構成や形状・サイズに依存して大きく変わる. 通常のデータ処理で用いられる半経験的な (試料の形状を仮定しない) 吸収補正を行うと, 不正確な補正により回折強度に含まれる微弱な異常散乱シグナルを埋没させてしまう. そのため, X線トモグラフィーなどで評価した試料形状に基づいた解析的吸収補正が検討されているが, 実用にはまだ困難がある.

一方で, 試料自体による吸収を低減する方法として, 結晶周辺の溶液を吸引した状態で凍結させる方法 (溶液フリーズマウント) が開発され一定の成功が得られている.^{10,11)} しかし, 特殊なサンプルホルダーを使用しなければならないこと, 結晶自体の形状に起因する吸収補正は依然として必要であることなど, 課題も存在する.

深紫外レーザーのアブレーション効果を利用した試料加工技術は, 当初タンパク質結晶の良質部分の切り出し等の目的で開発された.¹²⁻¹⁴⁾ 最近, この技術を長波長X線によるデータ収集に用いることで, データ精度に大きな改善が得られることがわかってきた. 図5に, 理研播磨研究所で開発されPF-AR北西実験棟に移設された加工装置を示す. 標準的な方法でサンプルホルダーにマウントされた試料は, MX ビームラインと同様の手順でサンプルチェンジャーにより低温ガス気流下に設置される. ビーム径8 μm (FWHM), 波長193 nmの深紫外レーザーをガルバノミラーによって高速にステアリングし, ゴニオメータの回転動作との組み合わせで試料を指定した形状に加工する. 1つの試料の加工に要する時間は, 交換も含め一般的に10~20分程度である. LCP (Lipidic Cubic Phase) 中で成長した結晶など, 試料中における結晶の視認が困難な場合は, 加工前にX線によるビームスキャンなどで位置決めしておくことが必要である.

加工方法としては, 試料の結晶以外の溶媒部分の除去や, 結晶自体を球や円柱などの軸対称形状への成形が可

図6 試料のレーザー加工とその効果。(laser shaping of samples and the effect.) a) 加工例(溶媒除去, 球, 団子), b) 波長3.3 Å, 振動角0.1度, 360度分の3,600枚のフレームに対するスケール因子の変化, c) 波長2.7 Åで収集した6個の結晶からのデータ統計値(I/sigI). 加工前(青)に比べて球加工後(赤)で大きな改善が見られる. 編集部注: カラーの図は電子版を参照下さい.

能で, 自由度は大きい(図6a). 結晶を球状にした場合は特に, フレーム間のスケールや吸収補正の角度依存性が単純になり, 長波長X線による回折データ精度が大幅に向上する(図6b, c).

3. Native SAD位相決定の現状

3.1 最適な波長の選択

図7は, 理想的な測定環境下において, 結晶中のイオウからの異常分散シグナルが得られる効率をプロットしたものである.¹⁵⁾ ここで理想的とは, ビームパス上の空気吸収が無視でき, 球状に加工された‘裸’の結晶に一定のサイズ(ただし結晶サイズよりは小さい)のX線ビームを照射したとする. これは球状加工した結晶をBL-1Aにおいて測定したケースに相当する. 最も効率良く異常分散シグナルが得られる波長は結晶のサイズによって大きく変わり, 例えば100~150 μm程度の大きさの結晶に対しては2.7~3.0 Åが最適となる. これはBL-1Aを用いた最近の実証研究^{7,15)}と良い一致を示す. 一方, 結晶周辺の溶媒の存在とビームパス上の空気を仮定して, 通常のMXビームラインでの測定をシミュレートすると, 最適波長は結晶のサイズによらず2.1 Å付近となり,¹⁵⁾ こちらも過去の研究結果¹⁶⁾とよく一致する. この図からは, 理想的な測定環境下において, 結晶のサイズが小さいほどより長い波長を使うべきと読める. しかし実際は2.7 Åより長い波長でX線検出器の検出効率が落ち始めることもあり, 2.7 Åに対してより長い波長のX線を使うことの有効性はこれまでのところ明確には示されていない.^{15,17)}

図7 理想測定環境下における, イオウの異常散乱効率の波長および試料サイズ依存性. (2D contour plots of theoretical anomalous diffraction efficiency for sulfurs under an ideal measurement condition).

3.2 BL-1Aにおける位相決定成功例

これまでBL-1AにおいてNative SAD位相決定に成功したタンパク質結晶(リゾチームやソーマチンなどの標準タンパク質を除く)の分布を示す(図8). すべての位相決定において波長2.7 Åで収集されたデータが使用された. 一方, ヘリウムチャンバーの利用は2016年以降, レーザー加工機の利用は2019年以降である. BL-1Aの分布は, 他所においてNative SAD法で解かれた構造の分布⁴⁾をほぼカバーしている. タンパク質の大きさでは分子量266 KDaであるtubulin complexの位相決定に成功している.¹⁵⁾ また, 異常分散効果が非常に小さいタンパク質結晶(シグナルの強さの目安であるBijvoet比²⁾が0.8%)の位相決定にも成功した. このタンパク質結晶の場合, 波長2 Åを用いたとするとBijvoet比はWangの理論限界とされる0.6%¹⁸⁾以下のため, 位相決定は困難であったと考えられる.

3.2.1 266 kDa tubulin complex T2R-TTLの位相決定¹⁵⁾

500 × 70 × 50 μm³の大きさの結晶をできるだけ溶媒が少なくなるようマウントし, カッパー角を変えながら低線量で14データセットを収集した(1データセットは振動角0.2度, 360度分). マージしたデータのredundancyは約178, 分解能は約3 Åとなった. 非対称単位中に1分子, 118S, 13P, 2Cl, 3CaのsubstructureをSHELXDで決定し, CRANK2パイプライン¹⁹⁾によって2,363残基中2,152残基が自動モデル構築された.

3.2.2 イオウの含有量が非常に少ないタンパク質結晶(Bijvoet比0.8%)の位相決定

大きさ150 × 100 × 100 μm³程度の10個の結晶を通常どおりマウントし, X線ビームスキャンにより結晶位置と回折能を確認後, 深紫外レーザー加工機によってそれぞれ直径80~100 μmの球状に加工した. 各結晶から低

図8 BL-1Aにおいて、波長2.7 ÅのNative SAD位相決定によって解かれた構造の分布。(Distribution of the solved structures by native SAD phasing with 2.7 Å wavelength at BL-1A. A: 266 kDa T2R-TTL, B: a protein with low sulfur content.) 他所においてNative SAD法で解かれた構造, およびSAD法で解かれたすべての構造の分布を重ねて示す。⁴⁾ Bijvoet比0.6%は、位相決定が可能とされる理論限界。

線量・多方位測定⁴⁾により4データセットずつ収集した(1データセットは振動角0.1度, 360度分)。そのうち2個の結晶からの8データセットをマージし, redundancy約47, 分解能3 Å程度のデータを得た。非対称単位中に2分子, 1分子178残基中1個のMetのみ(Cysなし)で, バッファ中にも異常散乱原子は存在しない難しい例であったが, AutoSHARP²⁰⁾により2個のイオウのsubstructureが問題なく決定され, 続く自動モデリングでほとんどすべての残基が構築された。

4. 結晶中の軽原子の同定

長波長X線のもう1つの重要な応用は, 結晶中の軽原子・イオンの異常分散効果を用いた同定である。吸収端がBL-1Aの利用可能な波長範囲に含まれるカルシウムについては, 厳格な同定が可能である。吸収端を挟む波長2.7 Åおよび3.15 Åの両方でデータ収集を行い, 波長3.15 Åのデータによる電子密度マップで異常分散ピークが消えることを確認することで, LH1-RC複合体中のカルシウムイオンの位置があいまいさなく決定された。²¹⁾ まだ実例はないが, カリウム同定のために吸収端3.44 Å前後でデータ収集することも可能である。

5. まとめ

Native SAD位相決定の成功には, 試料のサイズに最適な長波長X線を使用した高精度回折データ収集がカギで

あり, そのためには, 高輝度長波長X線ビーム, 低バックグラウンド測定環境, 回折強度を低ノイズかつ高速に測定できるX線検出器, 試料(結晶)の加工による最適化など, すべての要素が重要である。10年前のビームライン建設当初において不可能であったこれらの技術が現実のものとなり, Native SAD法は, 新規タンパク質結晶の位相決定法として最初に試してみるべき方法に変わりつつある。軽原子の同定も含め, 長波長X線をよりいっそう活用して結晶構造解析を展開していただきたい。

謝 辞

Photon Factory MXビームラインサポートメンバーに感謝します。レーザー加工機の利用・導入には理化学研究所放射光科学研究センターの河野能顕氏, 山本雅貴氏に協力いただきました。ポールシェラー研究所のMeitian WangグループがBL-1Aを利用して得た成果を一部紹介しています。本研究は, 文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム(TPRP, 2007-2011), 創薬等基盤技術開発プラットフォーム事業(PDIS, 2013-2017), AMED創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業(BINDS, 2018-)によって支援されました。

文 献

- 1) W. A. Hendrickson: *Acta Cryst.* **A69**, 51 (2013).
- 2) W. A. Hendrickson and M. M. Teeter: *Nature* **290**, 107 (1981).

- 3) J. P. Rose, *et al.*: *IUCrJ* **2**, 431 (2015).
- 4) T. Weinert, *et al.*: *Nat. Methods* **12**, 131 (2015).
- 5) A. Wagner, *et al.*: *Acta Cryst.* **D72**, 430 (2016).
- 6) A. Wagner: 日本結晶学会誌 **60**, 233 (2018).
- 7) D. Liebschner, *et al.*: *Acta Cryst.* **D72**, 728 (2016).
- 8) M. Hiraki, *et al.*: *AIP Conf. Proc.* **1741**, 030029 (2016).
- 9) Y. Yamada, *et al.*: *J. Phys.: Conf. Ser.* **425**, 012017 (2013).
- 10) Y. Kitago, *et al.*: *Acta Cryst.* **D61**, 1013 (2005).
- 11) N. Watanabe, *et al.*: *Acta Cryst.* **D61**, 1533 (2005).
- 12) H. Kitano, *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, L1271 (2004).
- 13) A. Murakami, *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, L873 (2004).
- 14) H. Kitano, *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**, L54 (2005).
- 15) S. Basu, *et al.*: *IUCrJ* **6**, 373 (2019).
- 16) S. Mueller-Dieckmann, *et al.*: *Acta Cryst.* **D61**, 1263 (2005).
- 17) F. Leonarski, *et al.*: *Nat. Methods* **15**, 799 (2018).
- 18) B. C. Wang: *Method Enzymol.* **115**, 90 (1985).
- 19) P Skubak and S. N. Pannu: *Nat. Comm.* **4**, 2777 (2013).
- 20) C. Vornrhein, *et al.*: *Methods Mol Biol.* **364**, 2115 (2007).
- 21) S. Niwa, *et al.*: *Nature* **508**, 228 (2014).

プロフィール

松垣直宏 Naohiro MATSUGAKI
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所
Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: naohiro.matsugaki@kek.jp
最終学歴：博士(理学)
専門分野：放射光構造生物学
現在の研究テーマ：ビームライン測定技術開発
趣味：クライミング

山田悠介 Yusuke YAMADA
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所
Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: yusuke.yamada@kek.jp
最終学歴：博士(理学)
専門分野：タンパク質X線結晶構造解析
現在の研究テーマ：MX ビームライン開発

引田理英 Masahide HIKITA
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所
Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: masahide.hikita@kek.jp
最終学歴：博士(理学)
専門分野：分光学
現在の研究テーマ：MX ビームラインにおける顕微分光装置開発

平木雅彦 Masahiko HIRAKI
高エネルギー加速器研究機構 素粒子原子核研究所
Institute of Particle and Nuclear Studies, High Energy Accelerator Research Organization
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: masahiko.hiraki@kek.jp
最終学歴：博士(工学)
専門分野：ロボティクス
現在の研究テーマ：実験装置開発・自動化

千田美紀 Miki SENDA
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所
Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: miki.senda@kek.jp
最終学歴：博士(工学)
専門分野：タンパク質の結晶化, 構造生物学
現在の研究テーマ：タンパク質の結晶化技術の開発
趣味：旅行, 食べ歩き

千田俊哉 Toshiya SENDA
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所
Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: toshiya.senda@kek.jp
最終学歴：博士(工学)
専門分野：蛋白質結晶学, 構造生物学
現在の研究テーマ：GTPエネルギー代謝と進化, 疫病関連タンパク質の構造解析
趣味：街歩き