全自動測定による高難度結晶からの構造解析

東京医科歯科大学難治疾患研究所 沼本修孝

Nobutaka NUMOTO: Structure Determination from Protein Crystal Clusters by Fully Automatic Data Collection

Recent advance in the automatic data collection systems at the synchrotron facilities enable us to obtain high quality diffraction data without on-site operation. Structural determinations from the crystal clusters of small proteins were successfully achieved with microfocus beam, the automated data-collection system, and the data-processing pipeline in SPring-8.

1. はじめに

近年の国内放射光施設での回折データ収集は高度に自動化され、通常、束所する必要なくこれまでと同等以上の精度でデータを取得できるようになった。筆者も、かれこれ2年近く放射光施設には足を運んでいないが、それでなんの問題もなく研究は進んでいる。それどころか、自動測定、自動解析でなければ構造決定は難しかっただろうと思われる事例までも経験することができた。本稿ではそのような例として、SPring-8の高輝度微小フォーカスビームとその利点を最大限に活かした自動データ収集システムZOO⁽¹⁻³⁾および同システムに内包されている自動データ解析パイプラインKAMO^(4,5)により、クラスター状結晶をそのまま用いた、これまでの常識を覆すような構造決定の例を紹介する。

なお本稿で取り上げる手法はZOOシステムの「Multi測定 (SWSX: Small Wedge Synchrotron Crystallography)」によるものであり、本来主に膜タンパク質の微小結晶からの構造決定のために開発されていたもので、その技術やプログラムは以前から使用されていたものである。筆者自身も、そのような特殊な技術と思い込んでしまっていたが、通常の可溶性タンパク質の結晶構造解析にもおおいに適用できるものであることを思い知らされた次第である。

2. 高度にクラスター化した結晶からの構造決定

1つ目の例では、解析対象試料は分子量14 kDaのタンパク質ドメインである。小型のドメインではあるが、分子内に三カ所ジスルフィド結合を有し、大腸菌で大量発現させたのち非可溶性画分から回収して非効率なりフォールディングにより調製する必要があり、収量の観点から結晶化は難航した。ようやく得られた結晶も、図1Aのようなひどいクラスター状の結晶であり、構造解析はとても不可能であると思われた。タンパク質の結晶であるかどうかを確認するためにX線回折実験を行ったところ、

同心円状の、いわゆる粉末結晶からの回折パターン様の回折像が得られたが、低角から回折リングが観測されており、タンパク質由来の回折像であることはわかった。

これに勇気づけられ結晶化条件の最適化を試みたものの、試料量に限りがあって多くの条件を試せなかったこともあり、図1Bのような依然多数の結晶からなるクラスター状のものが得られるに留まっていた。しかしながら、このような結晶は再現良く得られ、サイズも直径で200~400 μm程度と比較的大型であり、最近のSPring-8の高輝度微小フォーカスビームを用いれば、単結晶領域にビームを照射することは不可能ではないとも思われた。

筆者は最初、このようなクラスター結晶を物理的に砕いて小さな結晶に分割してしまえば、膜タンパク質の微小結晶による構造解析の手法が援用できるのではないかと考えたのだが、ビームライン担当者に相談したところ、結晶に与える物理的ダメージの心配もあるため、まずはこのままで微小フォーカスビームによって単結晶としてデータ収集が可能か確認するのが得策だろうとのことだった。早速BINDSの支援に申請し、ビームタイムを確保して実験を行ったところ、たった一度のビームタイムで構造解析まで完了してしまった(図1C)。

このときのデータ収集は次のとおり行った。まず、図1Bのような結晶をクライオプロテクトant置換後、通常行うようにクライオループに1つ拾い、液体窒素で凍結した。これを14個Unipuckに装填してSPring-8に送付し、データ収集を依頼した。データ収集は、SPring-8の

図1 14 kDa タンパク質の結晶構造解析。(Crystal structure analysis of a 14 kDa protein.) (A, B) クラスター結晶。スケールバーは0.2 mm。(C) 結晶構造と電子密度図。

図2 データ収集と解析.(Data collection and process) (A) ZOOシステムによる結晶のラスタースキャン結果. (B) KAMOによる small wedge データの階層的クラスタリング.

自動測定システムであるZOOの「Multi測定」モードにより行った. これは本来, 1つのクライオループに数十以上の微小な結晶がランダムな方位で存在していることを念頭に, これらの微結晶から5~10°分のデータを収集してmergeすることにより, また必要であれば同様のデータを複数のループにわたって収集し完全なデータセットを得る方法である. 上述のように, 膜タンパク質の主にLCP法による微結晶からのデータ収集で多くの成功を収めてきた手法である.

今回の結晶は, 「ひとつの塊」であるが, 内実はさまざまな方位を向いた微小な単結晶からなるクラスターであるとみなし, 上記の方法を適用することとした. SPring-8 BL32XUにおいて, 5 μm $\times$ 5 μm のビームサイズを用いて, 1つのクライオピン当たり最大100カ所で10°ずつの small wedge データ測定を行う設定とした. はじめにラスタースキャンにより回折点が記録された位置を記録してスコア付けがされ(図2A左), 上位のものについてデータ測定が行われる. X線の照射位置により, 比較的良好な回折像が得られる場合(図2A中央)とそうでない場合(図2A右)が見られるが, 奥行き方向に結晶が重なっている例も多いと思われる. 14個のループを用いたため, 合計1,400の small wedge データが収集された.

これらのデータは, ZOOシステムに含まれているプログラム KAMO により, 指数付けと積分がなされた後に取捨選択され, 格子定数または強度相関による階層的クラスタリングが行われた. ユーザーはどちらのクラスタリング結果を使用するか選択できる. 本稿では, 格子定数ベースのクラスタリングの結果を示す(図2B). 1,400のうち670データがmergeの対象となり, このうち最終的に582データが使用され, 2.5 Å分解能のフルデータとして分子置換法で構造決定を行うことができた(図1C).

データ収集の統計値(表1)は, 通常の1つないし数個の単結晶からのデータ収集時のそれとは様相が異なっ

表1 データ収集および解析の統計値. (Data statistics.)

	14 kDa protein	15 kDa protein
Spacegroup	C2	P6 ₁
Resolution (Å)	50~2.50 (2.59~2.50)	60~2.01 (2.13~2.01)
Completeness (%)	100 (100)	99.5 (99.5)
Redundancy	96.4	6.7
$I/\sigma(I)$	15.2 (1.4)	5.5 (1.6)
R_{meas} (%)	82.3 (>100)	36.2 (129)
CC _{1/2} (%)	99.8 (84.7)	97.4 (56.0)
R/R_{free} (%)	23.5 / 25.9	20.1 / 23.8

ている. 特に, 等価な反射の一致度を表す R 値が低角領域から高い値を示しているため, overall でも高い値となっている. 今回のデータでは, 結晶の空間群がC2と対称性が低いにもかかわらず, データの冗長性(redundancy)は100近いため, 必然的に R 値も高い値になったものと思われる. このようなデータ収集法では, もはや R 値はデータの質を判断する際にあまりよい指標にならないようであり, CC_{1/2}を指標にするほうが適切であるようである. 一方, 非常に高い redundancy のおかげで $I/\sigma(I)$ は広角側でも十分な値を保っており, 今回はCC_{1/2}と $I/\sigma(I)$ を指標に分解能のカットオフを2.5 Åとした. このデータで分子置換法により問題なく初期位相が決定でき, モデル修正と精密化を数サイクル行って, 2.5 Å分解能として妥当な R , R_{free} 値を得た(表1). 得られた電子密度図, 構造モデルの妥当性の検証データも順当なものが得られており, 問題なく構造解析が完了できたと言える.

繰り返しになるが, 以上の構造解析が, 事前に入念な予備的回折実験などを行うことなく, 来所することもなく, たった一度の全自動測定ビームタイムで完了した.

3. 小さなクラスター結晶からの構造決定

次の例も, 分子量15 kDaの小さなタンパク質ドメインである. 初回の結晶化スクリーニングで, 図3Aのような微細な針状結晶のクラスター状のものが得られた. ビームタイム直前になって得られたため, 結晶化の再現性確認や条件最適化をする間もなく, とりあえずそのまま回折実験に供した. 例によって全自動測定のビームタイムであり, すでにこの回の測定に割り当てる結晶(の数)は決まっていた. タンパク結晶であるか否かの判別がつけば上々という程度の気持ちで, クライオピンでクラスターごと無造作にすくい上げ(図3A), その1つのクライオピンだけを, 予定されていた結晶を1つ犠牲にして割り込ませてSPring-8に送付した.

全自動測定のビームタイムであるので, 当たり前であるが測定条件は事前に指定することになる. 単純に反射チェックができればよいと, スナップショットを撮るだけのモードに指定することも考えたが, 前回の成功体験が頭をよぎり, どうせならばと半ば興味本位で「Multi測定」を指定した. 結果は驚いたことに2.0 Å分解能の完全データとなり, 分子置換法により構造決定することができた.

図3 15 kDa タンパク質の結晶構造解析 (Crystal structure analysis of a 15 kDa protein.) (A) 微結晶のクラスター. スケールバーは50 μm . (B, C) ZOO システムによる結晶のラスタースキャン結果. (D) 結晶構造と電子密度図.

回折実験はSPring-8のBL45XUで行い、10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ のビームサイズを用い、1つのクライオピン当たり最大50カ所で10°ずつのデータ測定を行う設定とした。結果として、19個のsmall wedgeデータが収集され(図3C)、15のデータがmergeの対象となって格子定数による階層的クラスタリングが行われ、13のデータを選択してmergeすることで2.0 Å分解能の完全データが得られ、構造決定をすることができた(図3D)。この例では空間群が $P6_1$ と対称性が高かったことが幸いし、このような少数のsmall wedgeデータからでもoverallのcompletenessが99.5%、redundancyが6.7と問題のない完全データとなった(表1)。データ収集に要した時間は、たった1つのクライオピンということで、わずか8分強であった。

4. 自動測定のパラメータ設定

本稿の二例はいずれも、SPring-8の自動測定システムZOOによる「Multi測定」モードでデータ収集を行った。ZOOシステムは高度に洗練されているため、事前にユーザで指定すべきパラメータは驚くほど簡略化されているが、「Multi測定」モードならではの注意点も多少ある。1つはビームサイズの選定である。一例目の大型クラスター結晶のデータ収集では、実は筆者は当初さしたる思慮もなく、せっかくBL32XUなのではないかと思い、利用できる最小ビームサイズである1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ のビームタイムを指定していた。測定前にビームライン担当者から、反射チェックだけでなく、データ収集も視野に入れるなら、5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ 以上のビームサイズを推奨するとアドバイスをいただいた。あまりにも微小なビームサイズでは、回折点の分離がよくないデメリットよりも、放射線損傷の影響により分解能が低下するデメリットのほうが大きくなってしまいうようである。通常は、微結晶のサイズと同

等程度がよいようである。

もう1つはまさに「Multi測定」モード特有のパラメータであるが、最短の露光点間距離を規定する「Crystal size」というパラメータである。詳しくはSPring-8 構造生物ビームラインのWeb siteにあるマニュアル(http://bioxtal.spring8.or.jp/ja/users/Auto/PXBL_Auto_sample_sheet_manual_ja.pdf)を参照いただきたいが、結晶サイズより若干大きめに設定しておくことで、隣接する照射点が接近しすぎることに起因する、隣同士の露光点由来の放射線損傷を防ぐことができるようである。本マニュアルは非常に丁寧な記述がなされているので、全自動測定を利用する前には面倒がらずに熟読することをおすすめする。また、内容も頻繁にアップデートされているので、できればこまめに再読することをおすすめする。

5. おわりに

筆者はすでに放射光施設での回折実験については完全に自動測定に依存しており、自分で測定するよりも、自動測定のほうがよいデータを取得できると確信している。もちろん自動測定と同じことを手動で行うこともできないことはないが、時間効率と人為ミスの可能性を考えればまったく利するところがない。さらに、このようなクラスター結晶からの構造決定まで一度のビームタイムで可能となると、十分に構造解析が可能であるにもかかわらず、これまでの経験から回折実験を行うこともなく諦めてしまっているものがあるのではないかという思いにかられる。今後、結晶化実験とデータ収集の戦略が根本的に変わるのではないだろうか。

本構造解析では、理化学研究所の平田邦生博士、JASRIの仲村勇樹博士に実験前の条件設定から実験後のフォローアップまで大変お世話になりました。また平田博士には本稿に目を通していただき、的確な助言をいただきました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

文 献

- 1) K. Hirata, *et al.*: *Acta Cryst.* **D75**, 138 (2019).
- 2) 平田邦生: 日本結晶学会誌 **62**, 84 (2020).
- 3) 平田邦生, 山本雅貴: 生物物理 **59**, 215 (2018).
- 4) K. Yamashita, *et al.*: *Acta Cryst.* **D74**, 441 (2018).
- 5) 山下恵太郎: 日本結晶学会誌 **59**, 207 (2017).

プロフィール

沼本修孝 Nobutaka NUMOTO
東京医科歯科大学難治疾患研究所
Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University
〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan
e-mail: numoto.str@mri.tmd.ac.jp
最終学歴: 京都大学大学院理学研究科, 博士(理学)
専門分野: 構造生物学
現在の研究テーマ: 免疫細胞共受容体の構造生物学
趣味: 読書