

ターゲットタンパク研究プログラムで目指す X 線構造解析の高度化：  
フォトンファクトリーにおける技術開発

若槻壮市,\* 山田悠介, Leonard M. G. Chavas, 五十嵐教之,  
川崎政人, 加藤龍一, 平木雅彦, 松垣直宏

**Advancement of Synchrotron Radiation Protein Crystallography Aimed by the Targeted Protein Research Program: Beamline Developments at the Photon Factory**

Soichi WAKATSUKI,\* Yusuke YAMADA, Leonard M. G. CHAVAS, Noriyuki IGARASHI,  
Masato KAWASAKI, Ryuichi KATO, Masahiko HIRAKI, and Naohiro MATSUGAKI  
*Structural Biology Research Center, Photon Factory, Institute of Materials Structure Science,  
High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan*

(Received October 16, 2009)

The Targeted Protein Research Program (TPRP) started in 2007 as a sequel of the Protein 3000 Project which lasted from 2002 to 2007. In the new project, four cores, Protein Production, Structure Analysis, Control of Protein Functions with Compounds, and Informatics, have been established as focus of methodology developments critical for functional and structural studies by the target protein research teams. Within the “Analysis Core” synchrotron radiation plays a pivotal role providing X-ray beams for structural analyses of the target proteins. The two large Japanese synchrotron radiation facilities, SPring-8 and Photon Factory (PF), along with three protein crystallography groups from Hokkaido, Kyoto and Osaka Universities have teamed up to develop two complementary micro-beam beamlines, one on each synchrotron site, and associated technologies for cutting edge structural biology research. At the PF, there are 5 operational beamlines which are equipped with state-of-the-art instrumentation for high-throughput protein crystallography experiments. Within the TPRP framework, the PF is developing a micro-focus beamline optimized for a lower energy single anomalous diffraction (SAD) experiment. This will be particularly useful for structure determination of difficult protein targets for which heavy atom derivatives or selenomethionine substitution does not work and other standard phasing methods fail to give structure solutions. This will augment the capabilities of the PF structural biology beamlines with similar look-and-feel experimental environments.

**Key words**—Targeted Protein Research Program; protein crystallography; Photon Factory

1. はじめに：放射光 X 線結晶構造解析による  
生命科学への寄与

Hodgkin によるインシュリンや, Perutz らによるリゾチーム, ミオグロビン等のタンパク質の立体構造決定から始まったタンパク質 X 線結晶構造解析は, 過去 20 年間に長足の進歩を遂げた. 放射光の実用化と急速な進歩はタンパク質結晶学に大きな福音をもたらした. 特にウィグラーやアンジュレータといった挿入光源が導入され, 平行性や強度が高

く, 波長 (エネルギー) も自由に選べる X 線ビームが安定して得られるようになると, データ収集装置 (回折計や検出器) やデータ解析のための計算機, ソフトウェアの進化なども相まって, タンパク質構造解析の精度とスピードが格段に向上し, 米欧日で共同運営するタンパク質構造データベース Protein Data Bank (PDB) の構造登録数が指数関数的に増加した.

2007 年度から始まった文部科学省の「ターゲットタンパク研究プログラム (TPRP)」では, 基本的生命, 医薬・創薬, 食品・環境の分野における重要なタンパク質群やそれらの複合体をターゲットとして集中的に構造機能相関の研究を進めている. そこで目指している膜タンパク質やタンパク質複合体

高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設構造生物学研究センター (〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1)

\*e-mail: soichi.wakatsuki@kek.jp

本総説は, 日本薬学会第 129 年会シンポジウム S30 で発表したものを中心に記述したものである.

などの X 線結晶構造解析では、結晶化が困難で微小結晶しか得られないものや、複合体の不安定性、動的性質などから構造解析が困難なものが多く、既存の技術を超えた新しい放射光 X 線結晶構造解析技術を必要としている。

本稿では、まず TPRP の全体構想を概説し、日本における放射光 X 線ビームラインの状況と本プロジェクトで目指す高度化と汎用化についての技術開発を俯瞰する。また、このような構造プロテオミクス研究とそのための最先端技術開発の世界情勢について、主にアメリカの事例を中心に、海外でも構造ゲノムから構造プロテオミクスへ大きく舵が取られつつあることを紹介するとともに、われわれが進めている、生産・解析・制御という 3 つの技術開発と情報プラットフォームの連携等や将来計画について述べる。

## 2. ターゲットタンパク研究プログラム (TPRP)

**2-1. 全体構想** 2007 年に終了した「タンパク 3000 プロジェクト」の終了時に次期プロジェクトへの橋渡しとして「タンパク質解析基盤技術開発プロジェクト」が半年間実施され、「タンパク 3000 プロジェクト」で培った技術をベースに、高難度タンパク質の構造解析を可能にする重要な技術の開発が行われた。

TPRP の全体構想には、「タンパク質解析基盤技術開発プロジェクト」の考え方が取り入れられ、ターゲットとなるタンパク質の研究においてそれほど困難を伴わないような構造解析を支援するだけでなく、高難度ターゲットについても不可能を可能にするような技術開発へと発展させていく、技術開発プラットフォームの重要性が強く認識された。このような概念に基づき、TPRP ではプログラム全体が、ターゲットとなるタンパク質群の構造と機能の解明を目指す「ターゲットタンパク研究」と、高難度タンパク質群の構造・機能解析に必要な技術開発を行う「技術開発研究」の 2 つの分野から構成されている。

以下に概要を紹介するが、詳細は Web サイト (<http://www.tanpaku.org/>) を参照されたい。

### ① ターゲットタンパク研究

「基本的な生命の解明」、「医学・薬学への貢献」、「食品・環境等の産業利用」の 3 つの分野を対象として、重要なタンパク質群の構造・機能解析に基づ

き、その作用機序の解明を通してターゲットタンパクのネットワークとしての理解を目指している。

### ② 技術開発研究

現在の技術水準では解明が困難なタンパク質の解析を可能とするために、タンパク質の試料を作る「生産」、タンパク質の構造を解く「解析」、タンパク質の機能を知る「制御」、さらに「生産」・「解析」・「制御」の情報を共有化させる「情報プラットフォーム」の 4 つの領域を対象として技術開発を実施している。

**2-2. 技術開発研究「解析」について** TPRP の技術開発研究「解析」における「高難度タンパク質をターゲットとした放射光 X 線結晶構造解析技術の開発」テーマは、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) と理化学研究所播磨研究所 (理研播磨) の 2 つの放射光施設を中心に、北海道大学、京都大学、大阪大学の 3 大学のグループを加えた体制で研究開発を推進している (Fig. 1)。

TPRP で研究対象となる高難度タンパク質は、結晶の品質が悪く、 $10\ \mu\text{m}$  以下の超微小結晶しか得られないことが多く、また、構造決定に必須の位相情報を得るための重原子誘導体結晶の作製が困難であることが多い。そこで本研究では、2 つの相補的なビームライン—現在の放射光ビームラインでは解析不可能な微小結晶に最適化した超高輝度マイクロビーム・ビームラインと、重原子誘導体を用いずに天然型タンパク質に含まれる S などの軽原子を利用する構造決定法である低エネルギー単波長異常分散法 (SAD) に最適化した高輝度微小集光ビームライン—の開発を行う (Fig. 2)。それとともに、高難度タンパク質の構造解析を可能にする新規 X 線解析技術の基盤整備を行う。

ビームライン開発では放射光施設の性能を最大限活用するために、理研播磨が SPring-8 に高エネルギー領域での超高輝度マイクロビーム・ビームライン<sup>1)</sup>を、KEK が Photon Factory (PF) に低エネルギー領域での高輝度微小集光ビームライン (詳細は後述) を、2010 年 4 月の運用開始を目指してそれぞれの施設で開発を進めている。

また、北海道大学、京都大学、大阪大学では、それぞれキャピラリートップマウント法、サンプル交換システムの共通化、放射線損傷の影響を低減するデータ収集法など、微小結晶構造解析に必要な

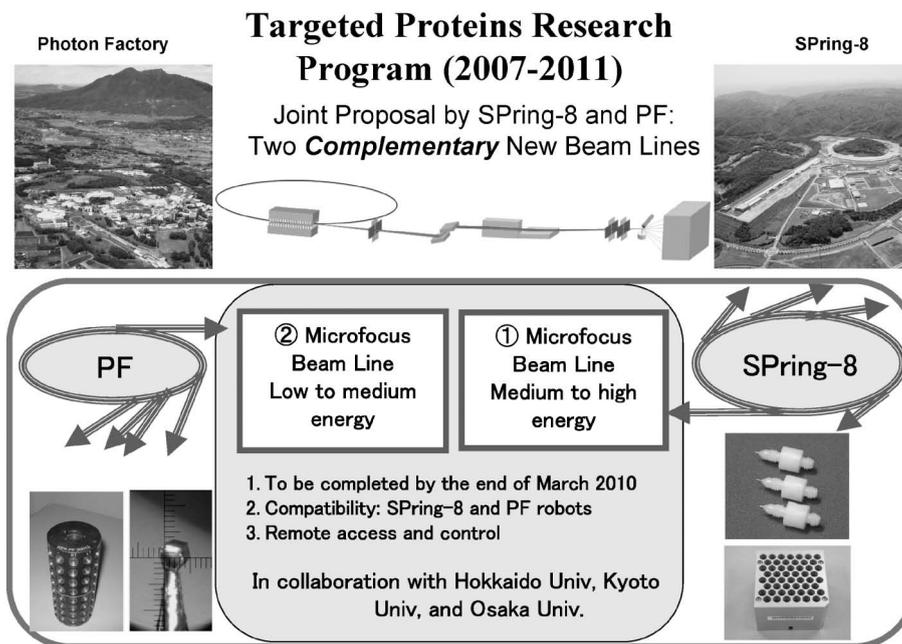


Fig. 1. Overview of Target Protein Research Project

### Micro-focus beamlines for crystal structure determination from micro crystals

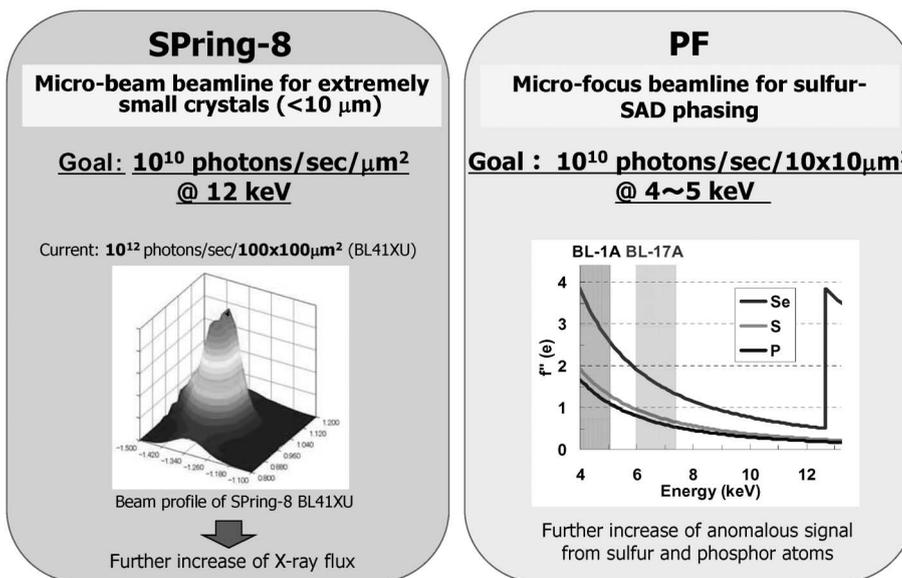


Fig. 2. Two Complementary Beamlines for the Structure Determination by Micro-sized Crystals

要素技術開発を行っており、2010年度までに開発される2つのビームラインと組み合わせた実用段階に移行させる。

#### 3. PFにおけるビームライン開発

**3-1. 概要** 現在、PFでは構造生物研究用のタンパク質結晶構造解析ビームラインが5本稼動し

ており、これらは構造生物学研究センターの下、開発、管理、運営がなされている。さらにTPRP用ビームラインBL-1Aが現在建設中である(Table 1)。

これらのビームラインは、その特徴からハイスループットビームライン、微小集光ビームライン、従来光源ビームラインの3つに大きく分類され、

Table 1. Macromolecular Crystallography Beamlines at Photon Factory

Beamline	BL-5A	BL-6A	BL-17A	NW12A	NE3A	BL-1A
Starting year	2004	1987	2006	2003	2009	2010
Category	High-throughput	Conventional	Micro-focus	High-throughput	High-throughput	Micro-focus
Synchrotron ring	PF			PF-AR		PF
Light source*	MPW	BM	SGU	U	U	SGU
Wavelength range (Å)	0.7–1.9	0.9–1.3	0.9–2.1	0.7–1.9	0.7–1.9	1.0, 3.0
Energy resolution ( $\Delta E/E$ )	$2.5 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-4}$	—
Flux (phs/s, @1.0 Å)	$2.0 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{10}$	$6.6 \times 10^9$ @1.0 Å $1.3 \times 10^{10}$ @2.0 Å	$2.0 \times 10^{11}$	$8 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{10}$ @3.0 Å
Slit size ( $\mu\text{m}$ )	200	100	20	200	200	10
Detector name	Quantum315r	Quantum4R	Quantum270	Quantum210r	Quantum270	—
Detector type	CCD	CCD	CCD	CCD	CCD	—
Active area (mm <sup>2</sup> )	315×315	188×188	270×270	210×210	270×270	—
Readout time (s)	0.9	8	1.1	0.9	1.1	—
Typical exposure time (s/image)	3	30	5	3	1	—
Typical (min)	14	120	24	14	11	—
Sample exchanger	PAM	—	PAM	PAM	PAM	—

\* MPW: Multi-pole wiggler; BM: Bending magnet; SGU: Short gap undulator; U: Undulator.

ユーザーはそれぞれの試料の特性に合わせてビームラインを使い分けることができる。現在、構造生物学研究センターでは、これらの中からハイスループットビームラインと微小集光ビームラインを中心に高度化を進めている。

ハイスループットビームラインである BL-5A, AR-NW12A, AR-NE3A は光源として、大強度 X 線ビームの発生が可能な、多極ウィグラー及びピアンジュレータを採用しており、解析に必要なデータセット収集が短時間でできる。典型的な結晶の場合、10–15 分で 1 データセットが取得可能である。また、幅広い波長領域の X 線を安定して供給することが可能で、多波長異常分散法 (MAD) 実験を容易に行うことができる。

微小集光ビームラインである BL-17A,<sup>2)</sup> 及び建設中の BL-1A は、PF の Short Gap Undulator (SGU) と呼ばれる小型の挿入光源を採用し、その光源性能から試料位置において 10–50  $\mu\text{m}$  のサイズまでビーム集光が可能である。その結果、結晶化が困難で微小結晶しか得られないような試料に関しても、回折データセットの収集が可能である。

各ビームラインの実験ハッチ内の回折計には、コリメーションスリットや高速シャッター、高精度ゴニオメータ、検出器、試料交換ロボットが装備され

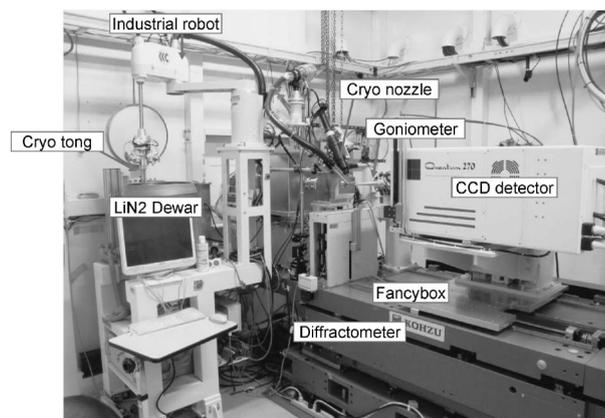


Fig. 3. Experimental Setup in the End-station of PF Macromolecular Crystallography Beamline

ている (Fig. 3)。光源性能の違いにより、ユーザーはそれぞれの試料の特性に合わせたビームラインの使い分けが可能となっている一方で、ビームライン実験ハッチ内の実験装置、及び制御システムは共通化されており、ユーザーは複数のビームラインの使い分けを違和感なく行うことができる。

ビームラインの利用形態は、大学及び公的研究機関のユーザーによる一般共同利用と、企業ユーザーによる施設利用、民間共同研究利用の 2 つに大別される。さらに海外、特にアジアからのユーザーの利

用も活発で、約 20% のビームタイムが海外からのユーザーに割り当てられている。一般共同利用では 1 日を 2 シフトに分割してユーザーにビームタイム配分を行い、企業ユーザーによる施設利用、民間共同研究利用では 4 時間を 1 シフトとして配分を行っている。2009 年度から利用開始した新ビームライン AR-NE3A は、アステラス製薬株式会社からの受託研究により建設され、ビームタイムの大部分はアステラス製薬株式会社が専有利用するが、残りのビームタイムは他のビームライン同様、一般課題、及び他の企業の施設利用に供されている。

PF の詳細に関しては Web サイト (<http://pfwww.kek.jp/indexj.html>) を参照されたい。

### 3-2. TPRP で開発する新ビームライン BL-1A

低エネルギー SAD 法は S や P などの軽原子の異常分散効果が、低エネルギー領域で有意なまでに増大することを利用して構造決定を行う手法である。現在稼働中のビームラインで得られる最も低いエネルギー (6 keV 近傍) でのそれら軽原子の異常分散効果は、現在構造解析によく用いられる 12.7 keV 近傍での Se 原子に比べて 1/3 から 1/4 程度に留まる (Fig. 2, 右のプロット参照)。しかも、ビームラインの光学系や測定系は Se の吸収端である 12 keV 近傍に最適化しており、6 keV 近傍の X 線を生かしてない場合が多い。そこで現在、高難度タンパク質をターゲットにネイティブ結晶からの位相決定を可能とするための、低エネルギー SAD 法に最適化した低エネルギー微小集光ビームライン BL-1A の開発を進めている。

ビームラインの仕様に関して、光源は SGU を採用し、その基本波で 4 keV 近傍のエネルギー領域をカバーするよう設計されている。4 keV 近傍での S の異常分散効果は 2 電子程度であり、6 keV 近傍に比べて約 2 倍、吸収端近傍での Se の異常分散効果のほぼ半分に匹敵する。ビーム輸送系は、4 keV 近傍の低エネルギー X 線を効率よく試料位置まで導くために、通常ビームライン中に挿入されて吸収の原因となる「窓」が最小限となるよう設計されている。集光光学系にはシンプルな KB ミラーを採用し、安定なビームを供給できることを重視した全長 20 m ほどのコンパクトなビームラインとなる予定である。ビームに関しては、大きな縮小率で楕円集光し、試料位置で約  $40 \times 10 \mu\text{m}$  (横×縦、半値全幅)

程度の大きさのビームを作る。ビームを試料直前で整形することで更にビームサイズを小さくすることも可能であり、実用的には  $10 \mu\text{m}$  角程度の大きさのビームまでの利用を想定している。集光システムにはバイモルフミラーを用いたアダプティブ光学系を採用し、ユーザーがビームの焦点を自由に変えることができるようにする。ビームの焦点を試料上ではなく、試料と検出器面の間に設定することで検出器面上でのスポットが小さくなり、回折データの質が改善する場合があると考えている (Fig. 4)。今後、ビームラインのコミッションングの中で推奨すべき測定条件を明らかにしていく。

また、4 keV のような低いエネルギーのビームを用いた回折実験では、入射 X 線の散乱によるバックグラウンドの増加や回折 X 線の吸収による減衰を防ぐために、試料から検出器までの空間をより X 線の吸収効果の小さい He に置換し、He 濃度を維持するために、試料を冷却するための吹き付けガスにも He を用いることが非常に重要である。ビームパスの He 置換は、試料周辺及び検出器までを空間的に覆う「He パス」によって実現するほかないが、過去のいくつかの報告例<sup>3,4)</sup>では、試料交換を非常に困難にしている。新ビームラインの回折計は、本来の機能である高精度試料回転軸とビームシャッター、ビーム位置・強度検出系、試料観察系、ビーム整形機能を高いレベルで実現しつつ、He パスと効率的な試料交換を両立させるデザインであることが求められており、現在検討を進めている。

**3-3. その他の高度化に向けた取り組み** PF 構造生物学研究センターでは、新ビームラインの開発以外にも様々な高度化のための技術開発を行っており、その一例を紹介する。

**3-3-1. 測定の自動化** ビームラインでの回折実験は、(1) 試料の交換、(2) センタリング (位置決め)、(3) 回折能評価とデータセット収集条件の検討、(4) データセット収集、という一連の工程によって行われる。現在われわれは、測定の自動化を実現するために、各ステップの自動化技術の開発とともに、全体を制御するソフトウェアの開発を行っている。

#### ① 試料交換の自動化

試料の交換の自動化に関しては、スタンフォード放射光研究所 (SSRL) の協力により、結晶試料を

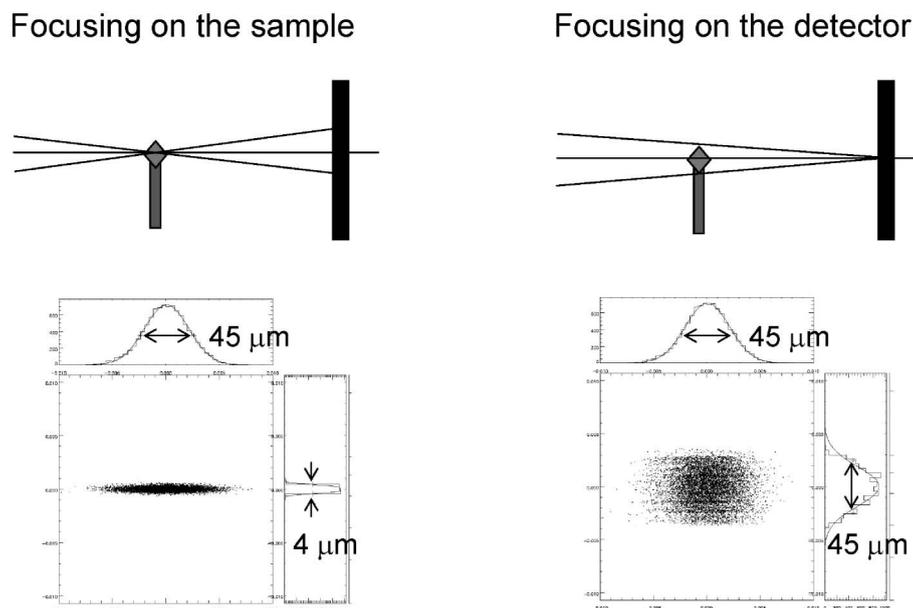


Fig. 4. Flexible Focusing System at BL-1A

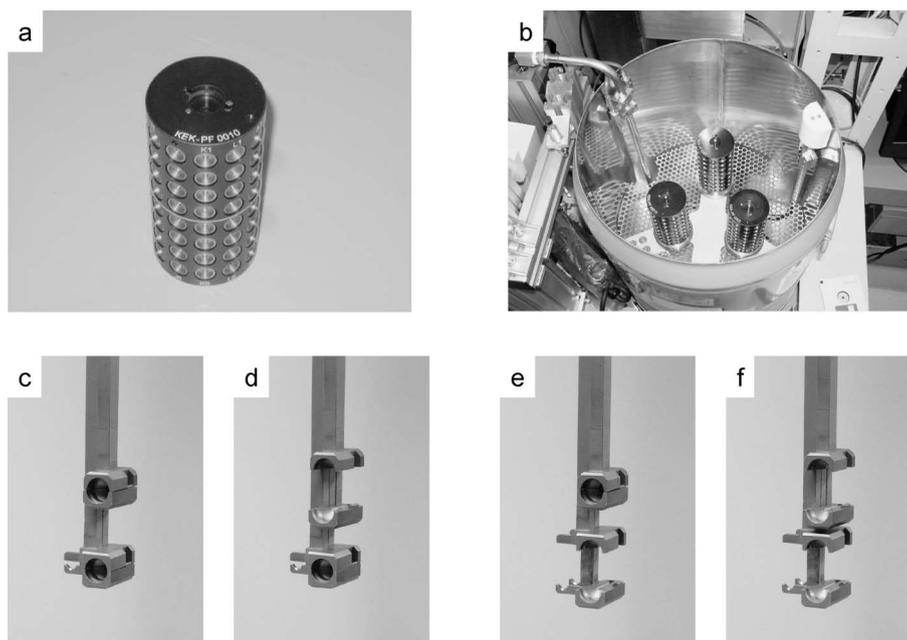


Fig. 5. PF Automated Mounting System

(a) cassette storing 96 samples, (b) three cassettes in the Dewar and (c-f) double tong system.

自動的に交換する専用ロボットを開発した.<sup>5,6)</sup> 現在、すべての挿入光源ビームラインでユーザー運用を開始し、随時利用可能な状態である。

ユーザーはループを取り付けた標準ピンを用いて結晶をすくい、凍結後、あらかじめ液体窒素中で冷却してある金属製のカセットに装填する。カセットは、通常凍結試料運搬に使用するドライシッパーに入れることができる大きさで、1個のカセットに96

個のピンを装填することができる [Fig. 5(a)]. カセットは試料交換ロボットに備え付けられている液体窒素デューワーに最大3個、すなわち288個のピンを一度にセットすることができる [Fig. 5(b)]. セットされた標準ピンは、マニュアルでの付け外しと同様の tong で極低温に保ったままゴニオメータ上に運ばれ、マウント、センタリング完了後、回折実験がスタートする。

PFではSSRLで開発されたロボットにダブルトングと呼ばれる独自開発した機構を追加している。この機構は2つのピンを同時にかつ独立に保持することで、一度の回折計へのアクセスでピンの取り外しと取り付けを可能とするものである [Figs. 5(c)-(f)]。この結果、これまで約90秒要していたピンの交換時間が10秒以内にまで短縮された。

## ② センタリングの自動化

回折実験において試料をビームから外さずに振動させるには、回転軸の中心に試料を正確に位置決め(センタリング)する必要がある。試料のセンタリングに関して、ループの形状を認識してその重心をビーム位置まで駆動する方法は、われわれを含む各所の放射光施設で既に実装されている。SPRING-8で開発された試料交換ロボットでは、再マウント時の再現性が非常に高くなるよう工夫されており、ピンを一度マウントして測定する試料の位置をデータベースにあらかじめ登録しておくことにより、半自動的な連続測定を実現している。<sup>7)</sup> ループ画像を保存しておき、再マウント時にループ形状をマッチングさせることで同様の操作が可能になる機能を現在開発中である。また、X線ビームを用いて回折強度の統計値を評価することにより試料の位置決めをする機能の開発も進めている。

## ③ 回折能評価とデータセット収集条件の検討の自動化

現在、ビームライン制御システムの一部として、データ解析機能を実装中である。<sup>8)</sup> これにより、回折像が得られると自動的にLABELIT<sup>9)</sup>で結晶方位の決定や結晶品質の評価を行い、MOSFLM<sup>10)</sup>で測定範囲や角度を見積もることができる。この結果から、測定するべきか否かを判断し、測定する場合には実験条件を自動でセットできるようになる。現在は上記2つのソフトだけ実装されているが、将来的には様々な処理ソフトに対応し、測定と平行してデータ処理が行えるように改良する予定である。

このように各自動化技術について開発を進めているが、自動化の早期実現への要求は非常に高く、これらの中の一部の機能を用いて全自動回折データ収集・処理システムを構築し、実用化している。このシステムでは、試料のセンタリングはループ形状のセンタリングを行うのみとし、データ収集条件も実験前にあらかじめユーザーが用意した条件に従って

データ収集を行う。比較的ビームサイズが大きいハイスループットビームラインBL-5A, NW12A, NE3Aでは、ループのセンタリングのみでも十分に試料からビームを外さずに測定することが可能となっている。このシステムは、タンパク質試料の結晶学的情報が十分得られており、多数の候補化合物群との複合体をハイスループットスクリーニングするような創薬研究において多大な威力を発揮すると思われる。

### 3-3-2. 遠隔からのビームライン実験モニタリング

これまでビームラインでの実験結果はビームライン上でしか確認することができなかったが、ビームライン以外の場所からでもビームラインの実験に参加できるよう、遠隔からのビームライン実験モニタリングシステムPreMo (PF Remote Monitoring system)を開発し、テスト使用を開始している。このシステムでは、ビームラインで行われたすべての実験結果がユーザー情報やその実験条件とともにデータベースに格納される。ユーザーはWebサーバにログインすることで、そのユーザーが行った実験が時系列に並んだリスト、及びそれぞれの実験結果を閲覧することができる。実験結果のデータベースへの格納は実験と平行して行われるため、Webインターフェースへのデータ反映もほぼリアルタイムに行われる。したがって、遠隔にいるユーザーもビームラインで実験しているユーザーと同時に実験結果を確認し、それらについて議論することが可能である。また、このPreMoは上述した全自動測定や今後の実施が期待されているMail-inサービスでも、実験の進行状況を確認する手段として有効である。

### 3-3-3. ビームラインの遠隔操作

米国SSRLや欧州ESRFを始めとするいくつかの放射光施設では、Nomachine社が開発したNXと呼ばれるリモートデスクトップ技術を利用して、ビームラインの遠隔操作を実現している。PF構造生物ビームラインでも、KEK内ネットワークへのVPN接続と上述のNX接続を介して、外部からビームラインの制御端末にログインして、ビームライン上と同等の操作で実験装置を操作するシステムを構築している。最近テスト的な運用を開始し、われわれビームラインスタッフ参加の下、いくつかの利用グループで実際の実験に使用している。ただし、ビームライ

ンの安全性やネットワークセキュリティ、データ保全性等、本格的な運用を行うためには、今後克服しなければならない課題は多い。

#### 4. 構造ゲノムから構造プロテオミクスへ：世界の潮流

米国 NIH の一機関 National Institute for General Medicine and Science (NIGMS) は、Protein Structure Initiative (PSI) という大規模プロジェクトを 2000 年に開始し、当初は 7 つのセンター、2001 年に 2 センターを加えて計 9 センターで、ハイスループット構造解析のための技術開発と原核生物、古細菌等のタンパク質の構造解析を進めた。2005 年からは第 2 期として PSI-2 が始まり、4 つの大型センターと膜タンパク質、真核生物など特定のテーマに特化した 6 つの小規模センター、モデリング関連の 2 センターと、コンストラクトなどを提供するリソースセンター、情報発信等を行うセンターとからなるネットワークとして生まれ変わり現在に至っている。4 つの大規模センターでは PSI-2 を開始してから、ターゲットタンパクリストの作成方法や分担について、また、進捗状況の共有方法等について多くのワークショップを開いて議論した上で全体方針を確定し、その後は定期協議を高い頻度で開催しながら、緊密に連携してプロジェクトを進めており、終了時には 3000 以上のタンパク質構造を明らかにする予定とのことである。

PSI-2 は来年で終了するが、米国におけるその後の構造プロテオミクスの展開については様々な評価委員会、国際誌などで議論された。最初の評価委員会では、PSI-1 と PSI-2 の両プロジェクトが生命科学の研究に対してどれだけのインパクトを与えたかについて非常に厳しい評価が下された。Structure, Nature などの各誌でも激しい議論が展開されたが、NIGMS の Berg 所長の強いイニシアティブにより第 3 期計画 PSI: Biology が来年から実施されることである ([http://www.nigms.nih.gov/Initiatives/PSI/psi\\_biology/](http://www.nigms.nih.gov/Initiatives/PSI/psi_biology/))。PSI-2 同様、大型センターが中核となるが、膜タンパク質に特化したセンターが別途設置されたことや、ハイスループット技術により可能となる生物学研究を行うパートナー制度も含め、上記の議論を踏まえて、生物学研究でのインパクトを重視した計画となっている。

一方、同じ NIH の中で、広く生命科学、医学分

野で必要な開発研究についての議論から「NIH ロードマップ」というプロジェクトが開始され、カリフォルニア大学サンフランシスコ校の Stroud 教授とスクリップス研究所の Stevens 教授がそれぞれ膜タンパク質の構造解析に関する技術開発プロジェクトを推進している。

また、この間の放射光 X 線結晶構造解析分野の状況としては、米国 NIH の PSI-2 ではハイスループットデータ収集と解析を目指した研究開発が行われており、それと並行して大型放射光施設 APS の NIH-NIGMS ビームラインでは 5  $\mu\text{m}$  程度のミニビームが既に利用可能となっているが、2010 年から始まる PSI: Biology では、数  $\mu\text{m}$  サイズのビームの利用を可能にするため、スイスポールシェラー研究所 (PSI) が開発したピクセル検出器を組み込む計画が盛り込まれる予定である。

ESRF, PETRA III, APS などの欧米の放射光施設で現在計画中若しくは建設中の放射光アップグレード計画では、すべて安定なマイクロビームを用いたタンパク質構造解析を行うための技術開発が主眼となっている。また、英国 DIAMOND や米国 SSRL の両放射光施設では、軽原子 SAD 法に最適化した低エネルギー X 線のビームラインが、数年後の稼働を目指して建設若しくは計画されている。特に DIAMOND では、2009 年 9 月下旬にビームラインの詳細設計を検討する委員会が開催され、いよいよ建設が始まろうとしている。

Structural Genomics Consortium (SGC) は、ストックホルム (スウェーデン)、オックスフォード (英国)、トロント (カナダ) の 3 カ国にまたがる研究ネットワークで、それぞれのサイトがヒトの健康に重要なタンパク質にターゲットを絞って構造解析を行っている。基本的にターゲットリストと構造解析の結果を公表しているが、一部については非公開で、国際特許の取得を視野に入れた医薬品開発研究へと展開している。SGC では、数多くのヒト由来キナーゼ複合体の構造を解くだけでなく、NIH の化合物ライブラリー、NIH Chemical Genomics Center (<http://ncgc.nih.gov/index.html>) と最近共同研究体制を確立するなど、世界の構造ゲノムプロジェクトの中でもユニークな存在である。

## 5. 今後の展望

今後の展望として2010年4月に稼動予定のTPRPで開発中の2つのビームライン、及びSPring-8とPFの既存ビームラインとともにTPRP、生命科学分野、創薬の進展に貢献していきたい。それらをさらに有効活用するため、次のような技術開発を並行して進めている。

- ミクロンサイズの微小ビーム位置・強度安定化フィードバック機構の開発
- 高精度回折計やHeチャンバー等による回折データのS/N向上と高精度化技術の開発
- 高難度タンパク質結晶構造解析を可能にする測定支援システムの開発。放射線損傷を可能な限り回避し、分解能の限界まで精度よく測定するデータ収集・処理技術の開発
- キャピラリートップマウント法の高難度微小結晶への対応(半自動マウントシステムの高度化)
- 試料の共通化カセットの実用化に必要な汎用化要素の検証と実際の安定運用化

また、「生産」・「制御」・「情報」との連携や、さらに今後の放射光分野と周辺技術の進展を見越して、いくつかの全く新しい技術開発の検討を始めている (Fig. 6)。「生産」との連携としては、結晶化技術は「生産」と「解析」をつなぐものであり、超高難度試料の結晶化技術の開発と合わせて、「生産」

と協力してインテリジェント結晶化プレートの開発を進める。生産・結晶化から結晶の品質評価、そして結果のフィードバックまで一貫して行えるビームラインシステムを開発し、高難度タンパク質の構造解析のスピードを加速する。「制御」との連携では、タンパク質間相互作用の高速スクリーニングの結果を基に、タンパク質間相互作用を制御する化合物の開発を進める。

一方、X線結晶構造解析とX線溶液散乱の結果を融合することで、超高難度タンパク質複合体の構造解析を支援できると考えている。マイクロビームビームラインを用いた超微量フローセルX線溶液散乱法を開発を行うことで、非常に微量なタンパク質試料のハイスループットスクリーニングが可能となる。また、これと熱量測定 (ITC) とのパイプライン化により、さらに高速で効率のよい複合体や低分子化合物相互作用のスクリーニングが可能となる。

さらに、新たに検討を始めている技術開発としては以下のようなことが挙げられる。

- 結晶のハンドリング：光ピンセットを用いた超微小結晶のハンドリング技術の開発(理研播磨)や、試料観察系の開発。回折イメージのノイズ削減や、不均質結晶、低品質結晶からのデータ収集を可能にするための紫外線パルスレーザーを用いた加工技術や結晶凍結前の含水率制御に

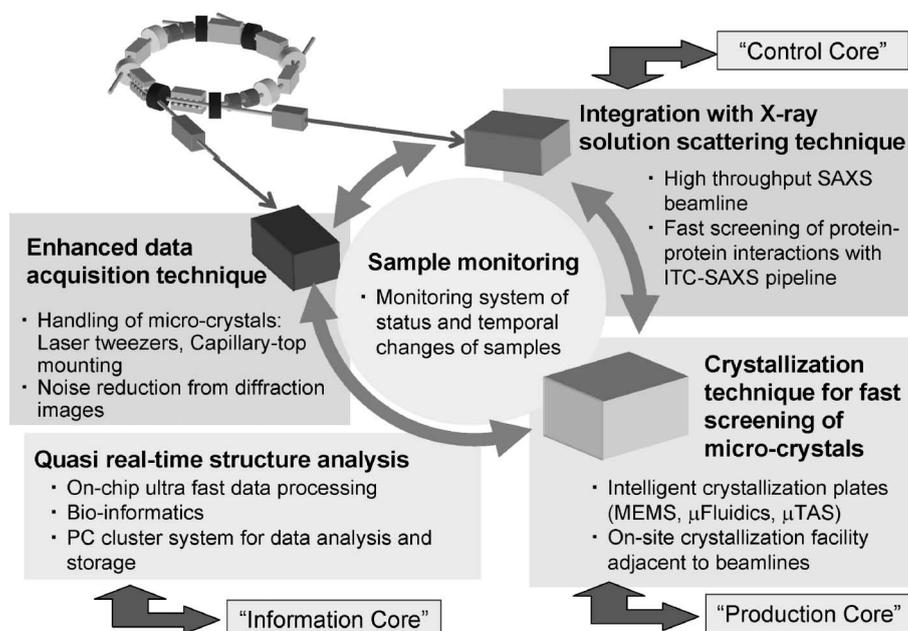


Fig. 6. Future Plan

よる結晶性改善技術の開発.

- 結晶化スクリーニング：Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), マイクロフルーディクス, Micro Total Analysis Systems ( $\mu$ TAS) の技術を用い, 結晶から直接情報収集を行い, 微小結晶の超高速スクリーニングを可能にするインテリジェント結晶化プレートの開発. 結晶化施設のビームラインのサイト併設によって, 回折実験結果を迅速に結晶化にフィードバックする環境の構築.
- ビームライン開発：回折データの擬リアルタイム解析と, 回折実験へのフィードバックを可能とするオンチップ高速データプロセスの開発. また, 高度なビームライン実験を簡便に進めるためのリモートアクセス技術の開発.

#### REFERENCES

- 1) Yamamoto M., Hirata K., Hikima T., Kawano Y., Ueno G., *Yakugaku Zasshi*, **130**, 641–648, (2010).
- 2) Igarashi N., Matsugaki N., Yamada Y., Hiraki M., Koyama A., Hirano K., Miyoshi T., Wakatsuki S., *AIP Conf. Proc.*, **879**, 812–815 (2007).
- 3) Djinovic Carugo K., Helliwell J. R., Stuhrmann H., Weiss M. S., *J. Synchrotron Rad.*, **12**, 410–419 (2005).
- 4) Boesecke P., Bois J. M., Crépin T., Hunte C., Kahn R., Kao W.-C., Nauton L., Winther A.-M. L., Moller J., Nissen P., Nury H., Olesen C., Pebay-Peyroula E., Vicat J., Stuhrmann H., *J. Synchrotron Rad.*, **16**, 658–665 (2009).
- 5) Cohen A. E., Ellis P. J., Miller M. D., Deacon A. M., Phizackerley R. P., *J. Appl. Crystallogr.*, **35**, 720–726 (2002).
- 6) Hiraki M., Watanabe S., Yamada Y., Matsugaki N., Igarashi N., Gaponov Y., Wakatsuki S., *AIP Conf. Proc.*, **879**, 1924–1927 (2007).
- 7) Ueno G., Hirose R., Ida K., Kumasaka T., Yamamoto M., *J. Appl. Cryst.*, **37**, 867–873 (2004).
- 8) Yamada Y., pHonda N., Matsugaki N., Igarashi N., Hiraki M., Wakatsuki S., *J. Synchrotron Rad.*, **15**, 296–299 (2008).
- 9) Sauter N. K., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D., *J. Appl. Crystallogr.*, **37**, 399–409 (2004).
- 10) Leslie A. G. W., *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl. Protein Crystallogr.*, **26**, (1992).