

放射光マイクロビームが可能にするタンパク質微小結晶解析

山本雅貴,* 平田邦生, 引間孝明, 河野能顕, 上野 剛

Protein Micro-Crystallography with a New Micro-Beam Beamline

Masaki YAMAMOTO,* Kunio HIRATA, Takaaki HIKIMA, Yoshiaki KAWANO, and Go UENO
RIKEN SPring-8 Center, 1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 678-5148, Japan

(Received October 16, 2009)

Recently, researchers' demands for high-quality data collection from protein micro-crystals, which would usually result from crystallization difficulty, have been remarkably growing. In order to collect efficient diffraction data for structure determination from micro-crystals, an expert data collection system providing high signal-to-noise ratio should be essential. A small sized and highly brilliant X-ray beam with size of a few micrometers has been proved to achieve protein micro-crystallography by both increasing reflection intensities and reducing background scattering from sample environments. Two micro-beam beamlines at SPring-8 and KEK-PF are currently under construction for Targeted Proteins Research Program by MEXT of Japan. At SPring-8, a new undulator beamline for protein micro-crystallography, named RIKEN Targeted Proteins Beamline (BL32XU), will start operation in May, 2010. The beam size at sample position of BL32XU will correspond to $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ with the photon flux density over 6×10^{10} photons/s/ μm^2 . Furthermore, research and developments of indispensable components to achieve protein micro-crystallography with micro-beam, such as high-precision diffractometer, automated micro-crystal handling, advanced data collection system to suppress radiation damage and so on, are progressing. The present status of the research and development for protein micro-crystallography will be presented.

Key words—protein micro-crystallography; synchrotron radiation; SPring-8

1. はじめに

生命の基本単位である細胞は、タンパク質、核酸、脂質や糖等の様々な物質で構成されている。なかでも主要な構成成分であるタンパク質は、それぞれの遺伝子情報でコードされたアミノ酸配列を持ち、それらが巧妙に折り畳まれ、個別の立体構造をとっている。また、個々のタンパク質の機能は、それに対応する異なる立体構造により実現されている。そのため、生命機能を理解するためには、タンパク質の立体構造情報は必要不可欠である。その立体構造決定において主要な実験手法であるタンパク質結晶構造解析では、タンパク質結晶に X 線を照射して得られる回折強度を基に、結晶を構成するタンパク質分子の立体構造を原子レベルで決定するこ

とができる。

タンパク質結晶構造解析で得られる回折強度の精度は、結晶サイズ、結晶品質（モザイク性）、結晶に照射する X 線の平行度、強度、サイズなど、様々なパラメータによって決まる。実験室の X 線発生装置に比べて放射光施設で利用できる X 線は平行度が高く、単位時間・単位面積あたりに含まれる光子数の多い高輝度 X 線であり、より小さなサイズの結晶から、より精度・分解能の高い回折強度データを、より短時間で取得することを可能にする。タンパク質結晶構造解析での放射光利用は、現在までに、20–30 μm 角サイズまでの微小結晶構造解析や構造決定の迅速化など、構造解析の質及び量に飛躍的な進歩をもたらしてきた。

しかし、重要な生命現象や疾病、障害に係わり、創薬における解析ターゲットとして非常に重要である膜タンパク質やタンパク質複合体などのサンプルでは、10 μm 以下の微小結晶しか得られない場合や、その結晶性に問題があるケースが多くみられ

理化学研究所 SPring-8 センター (〒678-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1)

*e-mail: yamamoto@riken.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。

る。そこで、文部科学省のターゲットタンパク研究プログラム¹⁾「解析」C 課題では、高難度タンパク質サンプルのミクロンオーダーの超微小結晶からの構造決定を可能にする超高輝度マイクロビーム・ビームラインとして、大型放射光施設 SPring-8²⁾ に理研ターゲットタンパクビームライン (BL32XU) の建設を進めている。

理研ターゲットタンパクビームラインは、サンプル位置でのビームサイズ $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ 、光子密度 6×10^{10} photons/s/ μm^2 以上の超高輝度マイクロビームを利用して、 $10 \mu\text{m}$ 以下の超微小結晶についての結晶構造解析を目標にしている。また、超高輝度マイクロビームを測定プローブとして利用することにより、微小結晶凝集クラスタや双晶内の良質な単結晶部分からの選択的データ収集や、放射線損傷を回避するために1つの結晶内からの複数箇所でのデータ収集など、より高度な新しいデータ収集を可能にする。

本稿では、SPring-8 においてターゲットタンパク研究プログラム「解析」C 課題で実施している、理研ターゲットタンパクビームライン (BL32XU) の研究開発を中心に、超微小結晶構造解析に向けた技術開発を紹介する。

2. 超微小結晶構造解析の問題点と課題

現在の技術レベルでは、放射光を利用しても $10 \mu\text{m}$ 以下の超微小結晶から構造決定可能な回折強度を測定することは大変難しい状況にある。これは、Darwin により示された回折強度の理論式³⁾より説明され、結晶試料からの回折強度は、回折に寄与した結晶体積に含まれる単位格子数に比例する。結晶からの回折強度を、1つの単位格子からの散乱の結晶内の全単位格子に渡る足し合わせにより表現したものが、Fig. 1 に示した Laue 関数 ($L^2 = \sin^2 [N \cdot \pi (s \cdot a)] / \sin^2 [\pi (s \cdot a)]$) である。Laue 関数の N 項は回折に寄与した単位格子数に対応しており、N を大きくすることにより回折強度・回折斑点のピークが大きくなるとともに、回折線の線幅が狭くなることを表している。これは、原理的に結晶が小さければ小さいほど回折強度が微弱になることを示しており、超微小結晶からの回折強度測定が困難な最大の理由である。⁴⁾ さらに、回折強度は入射 X 線強度にも比例することから、超微小結晶構造解析にとって高輝度放射光は回折強度を増加させるためにも大

Laue function

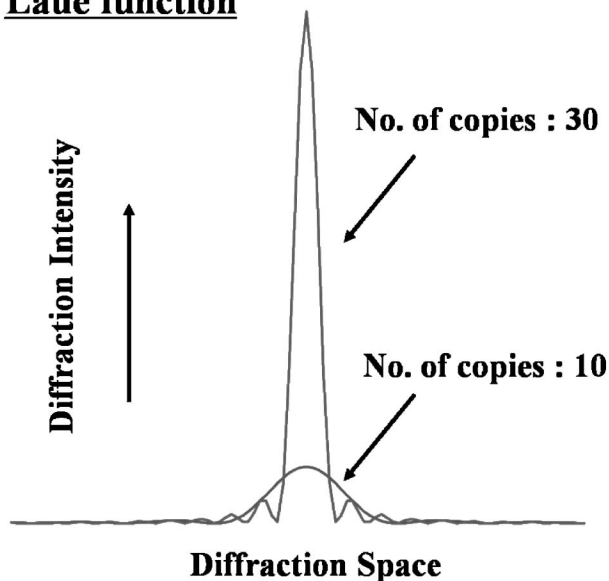
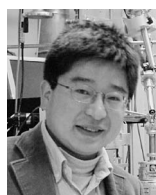


Fig. 1. Relationship between the Number of Unit-cell Copies and Diffraction Signal

The figure shows Laue function of virtual crystal with 10 and 30 copies.

変重要である。

また、超微小結晶からの微弱な回折強度を精度よく測定するには、記録する回折像での回折斑点のシグナルと、試料周りからの散乱 X 線や測定系に起因するバックグラウンドの比で表される S/N の最大化が必要になる。S/N を最大化するには、ただ闇雲に入射 X 線強度を増やすのではなく、ビーム形状の最適化や散乱 X 線によるバックグラウンド低減が課題となる。そこで、同一の結晶に異なるビームサイズを照射して回折斑点の形状変化を調べた結果を Fig. 2 に示した。ここでは、強度を一定に揃えたビームサイズ $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ 、 $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ 、 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ の入射 X 線を使用しており、Fig. 2 に示すように、ビームサイズを小さくすればするほど回折斑点のピークが高くなるとともに回折プロファイルの線幅が狭くなる。これらの結果から、超微小結晶の回折強度の S/N を向上させるためには、



山本雅貴

独立行政法人理化学研究所・播磨研究所・放射光科学総合研究センター・基盤研究部部長、1991年に大阪大学大学院・理学研究科・博士課程修了後、理化学研究所に研究員として、SPring-8の建設当初より、タンパク質結晶構造解析ビームラインの開発研究及び建設に係わってきた。2008年より現職。

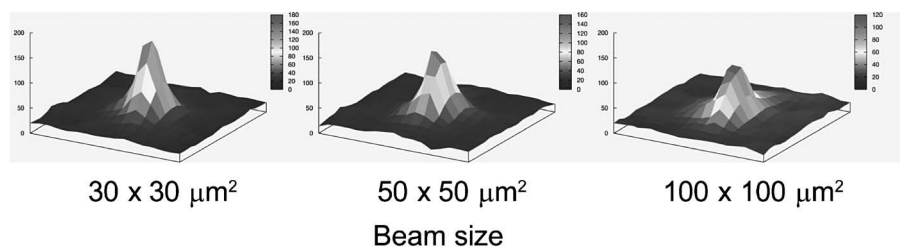


Fig. 2. Peak Profiles of Diffraction Spots Measured with Different Beam Size

Beam sizes are set to 30/50/100 μm squares. In the case of 30 μm beam size, which holds maximum photon flux density, provides the highest peak top value and the most sharpened peak profile.

結晶サイズと同等若しくはそれ以下のビームサイズの X 線利用が必要であることが分かる。このように、超微小結晶からの構造決定には、放射光の高輝度マイクロビームを利用することが大変重要である。

現在、国内で最も高輝度かつ微小な X 線ビームを利用できるタンパク質結晶構造解析用ビームラインは SPring-8 のアンジュレータビームライン BL41XU⁵⁾ である。このビームラインのサンプル位置での最小ビームサイズは $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ 、光子数は 2.8×10^{12} photons/s であるが、このビームラインを用いても解析が可能な最小結晶サイズは 20 μm 程度である。そこで、理研ターゲットタンパクビームライン BL32XU では、その解析目標とする超微小結晶サイズの数 μm –数十 μm に合わせて、それと同等のビームサイズを利用可能にするビームライン開発を進めている。

3. 理研ターゲットタンパクビームラインの開発

理研ターゲットタンパクビームライン BL32XU では、超微小結晶からの回折強度の S/N を最大化するために、試料サイズ (<10 μm) と同等の大きさに放射光ビームを集光・成型可能なビームライン光学系を設計した。⁶⁾ また、本ビームラインでは、ビーム及び結晶の位置を安定に制御することが非常に重要である。特に X 線と直接相互作用する光学素子、例えば、X 線集光ミラーや二結晶分光器などの機器の振動は、サンプル位置 (集光位置) で得られる X 線の強度・位置に大きな影響を与える。これを避けるために可能な限り光学素子を簡素化して、サンプル位置で得られるビーム強度及び位置の安定化を重視した設計としている。ビームラインの設計コンセプトを以下に簡単にまとめる。

- ・高輝度光源としての真空封止ハイブリッドアンジュレータを採用

- ・ビームの安定性向上に向けて必要最小限の光学コンポーネントにより構成
- ・大きな縮小率でのマイクロビームを実現する X 線集光光学系の採用
- ・サンプルサイズに応じた可変ビームサイズ (1 μm < ビームサイズ < 20 μm)

Figure 3 に建設中の機器配置を示す。光源にはエネルギー領域 8–25 keV の高輝度光が利用可能な真空封止ハイブリッドアンジュレータ⁷⁾を採用した。アンジュレータの準単色 X 線から実験に使用する X 線のエネルギーを切り出すための液体窒素冷却型二結晶分光器 (光源から約 43 m に設置) は、SPring-8 標準型分光器を基本に新たに改良を加えて製作・設置した (Fig. 4)。この分光器では、分光結晶駆動軸の数を必要最小限にすることにより機械的な剛性を高め、液体窒素配管などからの振動が伝播し難いよう工夫している。また、ビームの長期安定性及び周辺環境から伝わる振動対策として、光学ハッチ内の分光器設置床面に高密度コンクリート及びラバー素材を用いた防振エクステンション機構を導入、施工している。これにより出射される X 線強度・位置の安定度が向上することが期待されている。

このビームラインの最も重要な特徴は、10 μm 以下の高輝度ビームを利用可能にすることである。そのため、われわれは X 線集光素子として集光ミラーを選択し、ミラー集光により目標とするビームサイズの達成を目指す。本ビームラインでは高精度集光を達成するために、収差の少ない Kirkpatrick-Baez (KB) ミラー配置と呼ばれる X 線の縦・横方向を独立に集光する光学系を採用している。各集光ミラーは全長 400 mm の楕円筒面型 SiO₂ に白金をコートしたもので、ミラーによる理想的な集光点を

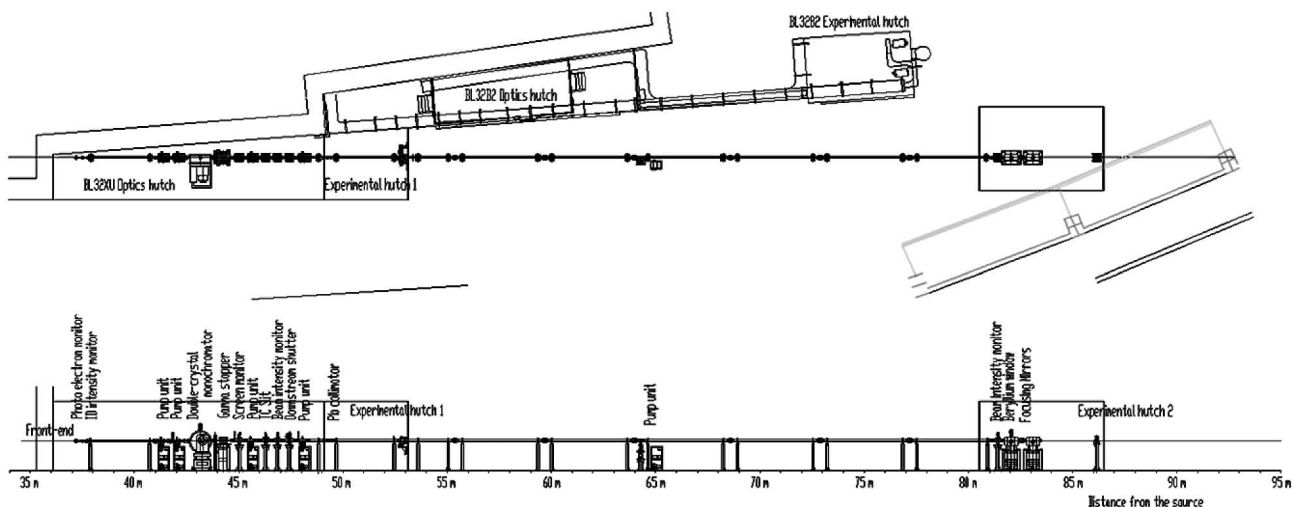


Fig. 3. Schematic Drawing of RIKEN Targeted Protein Beamline (BL32XU)

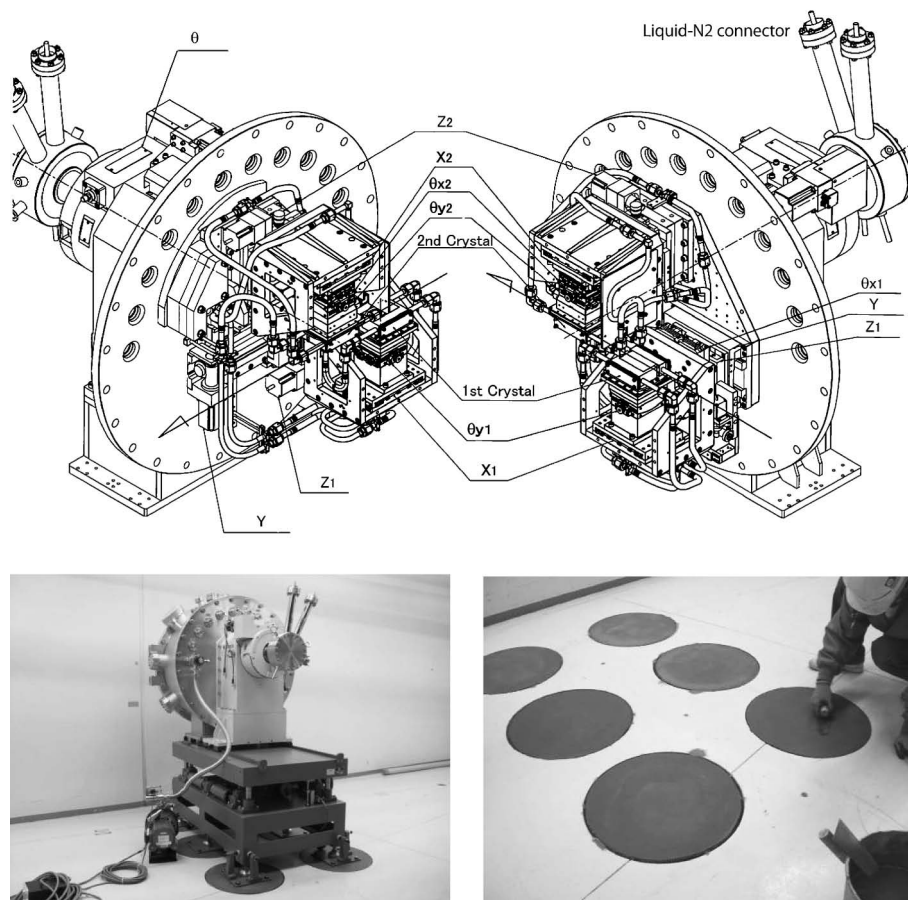


Fig. 4. New Double Crystal Monochromator (DCM)

The new DCM is designed by a calculation and combination type. The DCM floor was reworked by heavy weight concrete to eliminate environmental vibrations.

得るためにスロープエラー（ミラー表面の傾斜角のずれ）と表面粗さが最小となるよう大阪大学で開発された、Elastic Emission Machining⁸⁾ という原子レベルのミラー表面研磨技術を採用している。

ビームの集光サイズを決める縮小倍率（集光前と集光後のビームサイズの比）は、光源から集光素子までの距離と集光素子から集光点までの距離の比によって決定され、本ビームラインでは、縮小倍率を

可能な限り大きくするために、仮想的な光源となる TC スリットからおよそ 40 m (光源-集光素子までの距離) 下流に集光ミラーを、また、集光ミラーからわずか 1 m 弱 (集光素子-集光点までの距離) の位置に集光点 (サンプル位置) を配置している。

上記の集光光学系の基本性能をレイトレース (光線追跡法) シミュレーションなどの理論計算により評価した結果、 $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ (横×縦) のマイクロ集光ビームが実現可能であり、X 線エネルギー 12.4 keV (波長 1 Å) で光子数 6×10^{10} photons/s, 光子密度 6×10^{10} photons/s/ μm^2 と見積もられる。このビームサイズと光子数はタンパク質結晶構造解

析用のビームラインでは、現在、世界最高性能と位置付けられるものである。この計算結果と世界のタンパク質結晶構造解析用マイクロビーム・ビームラインとの比較を Table 1 に示している。また、仮想光源の大きさを制御することによって、サンプル位置では 1–20 μm 角の範囲でビームサイズ可変としている。

4. タンパク質微小結晶構造解析技術の開発

ここまで、ビームライン全体の設計を中心に説明してきたが、それと並行してタンパク質超微小結晶用高精度回折計の開発も必要である。^{9,10} 現在、Fig. 5 に示したように、結晶をサブミクロンオーダーの

Table 1. Comparison of SR Micro-beam Beamline for Protein Crystallography in the World

Synchrotron Radiation	Beamline	beam size (H×V μm^2)	photon flux (phs/s)	flux density (phs/s/ μm^2)
ESRF (Europe)	ID23-2	7.5×5	1×10^{11}	2.7×10^8
SLS (Switzerland)	PX-I	25×5	2×10^{12}	1.6×10^{10}
APS (USA)	GM/CA-CAT	7×4	1×10^{11}	3.6×10^9
MacCHESS (USA)	F1	~20×20	1×10^{10}	2.5×10^7
SPring-8	BL41XU	30×30	3×10^{12}	3.1×10^9
PF	BL17	20×20	7×10^9	2.5×10^6
SPring-8 New Beamline	<u>BL32XU</u>	1×1 5×5	6×10^{10} 1×10^{12}	6.0×10^{10} 4.0×10^{10}

Beamline information in the world synchrotron facilities can be obtained from BioSync: <http://biosync.rcsb.org/>

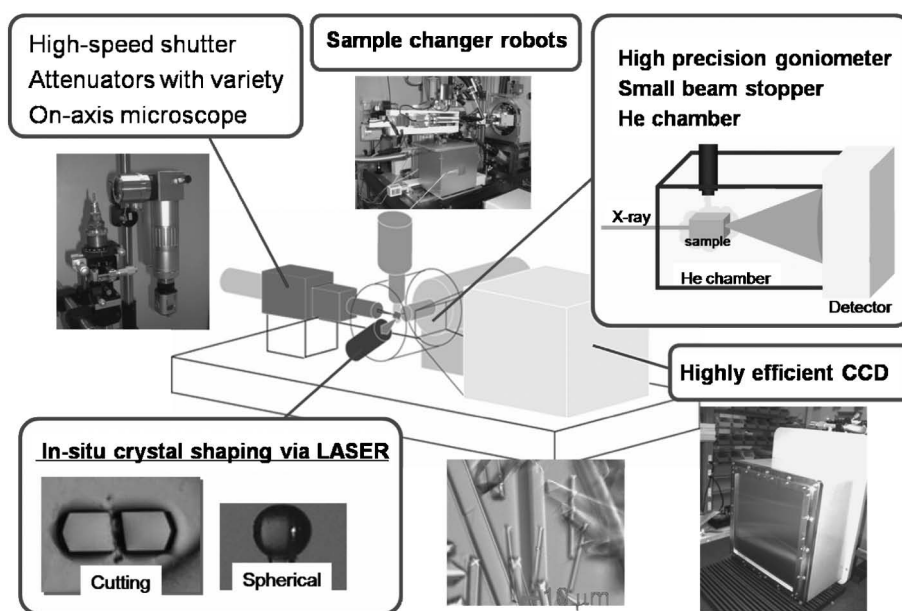


Fig. 5. Diffractometer Concept for Micro-protein Crystallography

Diffractometer will consist of the systems including high-speed shutter, attenuator units, precise goniometer, visualization optics for micro-crystal, etc.

偏心誤差で回転させる超高精度ゴニオメータ，マイクロオーダーの超微小結晶を観察する超高倍率顕微鏡，結晶からの回折 X 線の空気による吸収・散乱を低減するためのヘリウムパスの開発などを進めている。

また，今後，特に重要となるのは，X 線照射による結晶の放射線損傷^{11,12)}を，可能な限り低減するための技術・装置の開発である。例えば，放射線損傷を引き起こす化学反応¹³⁾は，結晶の温度が高いほど促進されるため，X 線露光による結晶の局所的な温度上昇を防ぐ極低温（40 K 以下）実験が有効であると考えられる。このため，結晶を超低温に保つためのヘリウムガス低温吹き付け装置の導入^{14,15)}や，また，極低温実験における放射線損傷の定量的評価が必要である。さらに，回折像を記録する X 線 CCD 検出器の高感度化など，回折強度データを効率よく収集することを目指した研究開発も重要である。

現在，高感度 CCD 検出器を高輝度アンジュレタビームライン（BL41XU）に設置して性能評価を行っている。導入した検出器（Rayonix MX225HE）¹⁶⁾は，検出器高感度化のために低テーパー比のテーパーファイバー光学系及び高感度の背面照射方式 CCD センサを採用している。評価実験では，超微

小結晶からの微弱回折強度を想定した微弱信号に対する性能を検証するため，同一のタンパク質結晶を用いて，露光を抑えた測定条件で既存の CCD 検出器との比較データを取得した。その結果，既存検出器に比べて高 S/N の高精度回折データが得られた（Fig. 6）。この結果は，微弱な回折強度しか得られない超微小結晶からでも，より高分解能のデータセットが取得可能であることを示すものである。

これらに加え，われわれは実験者の目的に応じて，放射線損傷を制御した回折強度測定を半自動／全自動で行う実験者支援ツールの開発も進めている。放射線損傷が重篤なサンプル結晶では，複数の結晶を利用して回折強度収集を行う必要があり，この場合，実験者が限られたマシンタイムの中で最適な測定条件を決めることには多くの困難を伴う。この支援ツールが完成すれば，放射光実験に不慣れた実験者でも効率よく超微小結晶からの回折強度測定を進めることができるようになる。

5. 期待される成果と展望

本ビームラインは，平成 22 年度からターゲットタンパク研究プログラムを対象としたユーザ運転を予定している。また，世界的にも最も微小で高輝度な X 線が利用できるタンパク質結晶用ビームラインの運用開始は，これまで不可能であった高難度タ

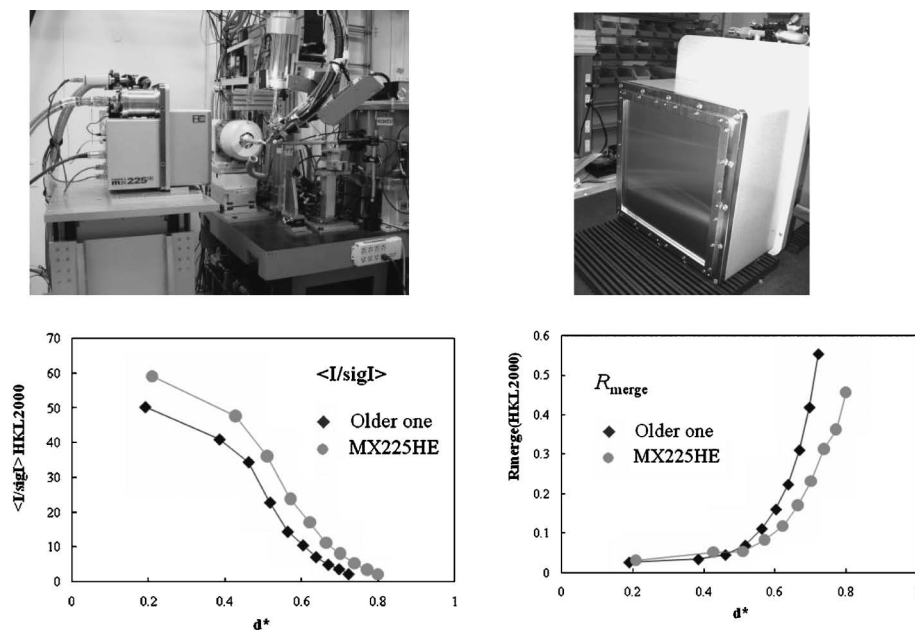


Fig. 6. X-ray CCD Detector with Higher Sensitivity (Rayonix MX225HE)

Comparison of diffraction data statistics between MX225HE and a previous detector is shown. The graphs show averaged diffraction data of $I/\sigma I$ and R_{merge} . Both graphs clearly show a significant advantage of MX225HE to detect weak diffraction signals.

ンパク質の結晶構造解析を可能にして、構造生物学を始めとした生命科学研究に新たな展開を切り拓くものと期待される。

さらに本ビームラインのマイクロビームには、結晶試料への X 線照射位置がより自由に選択できるという別の利点もある。例えば、 $50\ \mu\text{m}$ 角の結晶に $10\ \mu\text{m}$ のビームを照射する場合と、 $1\ \mu\text{m}$ のビームを照射する場合とでは、X 線照射位置の選択においては後者がより自由度が高いことは明らかである。このようにマイクロビームによってもたらされる照射位置の自由度は、クラスタ状結晶と呼ばれる単結晶が連続的に重なって析出してしまった結晶や、不均一結晶と呼ばれる異なる結晶性部分が混在している結晶などから回折強度収集する場合に非常に有利である (Fig. 7)。クラスタ結晶では単結晶部分を狙って X 線を照射し、回折強度を収集することが可能となり、不均一結晶では微小 X 線ビームをプローブとして、良質な結晶部分を探索することも可能になる。

前述してきたようなマイクロビームを利用する利点は、いずれもこれまで困難であった低品質なタンパク質結晶からの回折強度収集を可能にするための

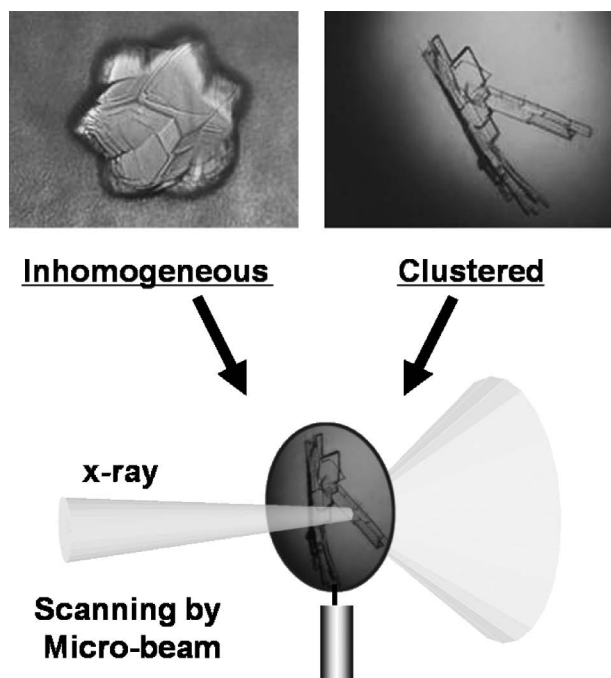


Fig. 7. Advantages of Micro-beam in Protein Crystallography

The micro-beam will easily probe good crystal components from low quality and inhomogeneous crystals or clustered crystals.

ものである。これは、現在の技術レベルでは解析に値しないと判断されてきたタンパク質結晶も、構造解析に利用できるようになることを意味している。一般的に、タンパク質の結晶化条件の最適化は、生産・精製が困難な高難度タンパク質や入手が困難な希少タンパク質などでは、より困難で多くの時間を必要とするため、本ビームラインの利用により構造研究に費やされる時間の大幅な短縮が期待される。

6. おわりに

現在の放射光施設では、ビーム性能や実験ステーションの仕様が異なる、すなわち、互いに相補的な役割を持つ複数のビームラインが稼動しており、得られた結晶のサイズや品質に応じて最適なビームラインの選択が可能である。分子量の小さなタンパク質の $100\ \mu\text{m}$ サイズの結晶では偏向電磁石ビームラインを用いた迅速な構造解析が可能であり、分子量が 10 万を超え、結晶サイズが $30\text{--}50\ \mu\text{m}$ 角の小さな結晶しか得られない場合には、既設のアンジュレータビームラインにより構造解析の可能性が高くなる。

そして、本稿で述べた理研ターゲットタンパク質ビームラインは、結晶サイズがさらに小さく、数 $\mu\text{m}\text{--}20\ \mu\text{m}$ 程度しか得られない場合、また、クラスタ結晶や不均質な結晶など高難度タンパク質結晶からの構造解析を行う場合に利用できる、SPRING-8 構造生物学ビームラインの新しい選択肢として位置付けられる。

本ビームラインの建設により、利用実験者はより広範な解析ターゲットについて、タンパク質結晶構造解析を行うことが可能になると期待される。

謝辞 理研ターゲットタンパク質ビームライン (BL32XU) は、文部科学省ターゲットタンパク質研究プログラム・解析課題として建設を進めており、記して謝意を表します。さらに、理化学研究所播磨研究所基盤研究部の二澤宏司氏、田中隆次氏、北村英夫氏、財団法人高輝度光科学研究センターの清水伸隆氏、熊坂 崇氏、高橋 直氏、竹下邦和氏、湯本博勝氏、大橋治彦氏、後藤俊治氏の協力を得て建設・研究開発を推進しており、心より感謝を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Targeted Proteins Research Program, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology: <http://www.tanpaku.org/>, cited 15 June, 2009.
- 2) SPring-8 Web: <http://www.spring8.or.jp/ja/>, cited 15 June, 2009.
- 3) Darwin C. G., *Phil. Mag.*, **27**, 315–333 (1914).
- 4) Glaeser R., Facciotti M., Walian P., Rouhani S., Holton J., MacDowell A., Celestre R., Cambie D., Padmore H., *Biophys J.*, **78**, 3178–3185 (2000).
- 5) Bioxtal Beamlines, SPring-8 Structural Biology Group, Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI): <http://bioxtal.spring8.or.jp/>, cited 15 June, 2009.
- 6) Hirata K., Yamamoto M., *SPring-8 Information*, **14**, 44–48 (2009).
- 7) Kitamura H., Bizen T., Hara T., Marechal X., Seike T., Tanaka T., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, **467**, 110–113 (2001).
- 8) Mimura H., Matsuyama S., Yumoto H., Hara H., Yamamura K., Sano Y., Shibahara M., Endo K., Mori Y., Nishino Y., Tamasaku K., Yabashi M., Ishikawa T., Yamauchi K., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44**, L539–L542 (2005).
- 9) Riekkel C., Burghammer M., Schertler G., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 556–562 (2005).
- 10) Moukhametzianov R., Burghammer M., Edwards C. P., Petitdemange S., Popov D., Fransen M., McMullan G., Schertler F. X. G., Riekkel C., *Acta Crystallogr., Sect. D*, **64**, 158–166 (2008).
- 11) Henderson R., *Proc. R. Soc. London Ser. B*, **241**, 6–8 (1990).
- 12) Murray J. W., Rudino-Pinera E., Owen R. L., Grninger M., Ravelli R. B., Garman E. F., *J. Synchrotron Rad.*, **12**, 268–275 (2005).
- 13) O'Neill P., Stevens D. L., Garman E. F., *J. Synchrotron Rad.*, **9**, 329–332 (2002).
- 14) Garman E. F., Owen R. L., *Acta Crystallogr., Sect. D*, **62**, 32–47 (2006).
- 15) Teng T. Y., Moffat K., *J. Synchrotron Rad.*, **9**, 198–201 (2002).
- 16) Rayonix: <http://www.mar-usa.com/>, cited 15 June, 2009.