

マイクロビームを用いたタンパク質微小結晶構造解析の現状

平田邦生

理化学研究所 放射光科学総合研究センター ビームライン基盤研究部

〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

国立研究開発法人科学技術振興機構・さきがけ 〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

■ 要約

タンパク質 X 線結晶構造解析はタンパク質の高分解能構造を得るために非常に強力な手法のうちの一つであり、高輝度かつ波長可変の X 線が使用できる放射光施設は今や無くてはならない存在である。結晶化によって得られるタンパク質の結晶の回折能や大きさは様々であるが、より結晶化が難しい場合には数 μm から数十 μm オーダーの微小結晶しか得られない場合もある。このような試料からも高精度データ収集を行い、より高分解能な構造解析を実現することを目指して放射光施設では高フラックス微小ビーム利用のための研究開発が推進されてきた。本稿ではタンパク質の微小結晶構造解析をテーマに、それに関わるビームラインのハードウェアやソフトウェア開発、実現した応用研究について簡単に紹介する。

1. 歴史的背景

タンパク質は生命体の構築や生理現象で中心的な役割を果たしている。生命活動はタンパク質が関わる化学反応によって担われており個々のタンパク質の機能やその発現のメカニズム解明は古くから重要な研究対象である。タンパク質の構造はその機能と強い相関があるため、機能を深く理解するためには詳細な構造情報が大きな手がかりとなる。X 線結晶構造解析はタンパク質の構造を詳細に知るための強力な手法のうちの一つである。また結晶構造解析を行う上で放射光施設は今や無くてはならない存在である。放射光 X 線を利用する場合のメリットは、波長の可変性（構造因子の位相決定や結晶に含まれる重原子同定に利用）、高強度であること（測定時間の劇的な短縮）、高い指向性（シグナル-ノイズ比の向上）などがあるが、特に微小ビームの利用はこの分野に大きな恩恵を与えている。

タンパク質結晶の大きさは様々だが、回折データ収集の際に結晶サイズとビームサイズが同程度であることが望ましい。結晶部分だけに X 線を照射し、溶媒や試料ホルダーからの散乱 X 線を低減することで回折強度のシグナル-ノイズ比を向上させることが可能になるからである。生体内で特に重要な役割を果たしている超分子複合体や膜タンパク質などは試料を結晶化することが難しいことが知られており、たとえ結晶化がうまくいったとしても得られる結晶のサイズが極端に小さい場合などがある。このような微小結晶からも高品質なデータ収集を実現するべく放射光施設では高フラックス微小ビームを作り出すビームライン技術開発が進められてきた。1998年に“Small is beautiful”というタイトルで高フラックス微小ビームがタンパク質結

晶構造解析に必須であろうという紹介記事が報告された¹⁾。フランスの放射光施設 ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) ID13において $40 \times 20 \mu\text{m}$ サイズの微小ビームを用いて $30 \times 30 \times 5 \mu\text{m}^3$ サイズの膜タンパク質（バクテリオロドプシン）結晶から 2.4 \AA 分解能のデータが得られたという事例も紹介されている（当時日本国内で利用できた最小ビームは SPring-8 BL41XU で $100 \mu\text{m}$ 程度）。この頃から世界各地の放射光施設でミクロンサイズの高フラックス微小ビームを作り出すための研究・開発が加速した。

2005年には同じく ESRF の ID13 で K-B (Kirkpatrick-Baez) ミラーを利用し $1 \mu\text{m}$ に集光したビームで、ウシロドプシン（膜タンパク質）の $5 \times 5 \times 100 \mu\text{m}$ サイズの微小結晶から 2.6 \AA 分解能でデータ収集を達成したとの報告があった²⁾。ESRF では、この結果に基づきタンパク質結晶構造解析用アンジュレータビームライン ID23-2 の開発を進め、 $7.5 \mu\text{m}$ 集光ビームを実現した³⁾。

2008年にはアメリカの放射光施設 APS (Advanced Photon Source) において、ミニビームと呼ばれるコンセプトで $7 \mu\text{m}$ ビームの利用を実現したという報告があった⁴⁾。APS 23ID-B のミニビームコンセプトは $125 \times 25 \mu\text{m}$ 程度に集光した高フラックスビームを種々のサイズのピンホールで整形して微小ビームを作り出すというものである。ミニビームコンセプトでは結晶サイズに合わせてビームサイズを容易に制御できるというメリットがある一方、整形によってビーム強度が弱くなるというデメリットもある。しかし、ビーム位置や強度の安定度を得やすいという手法上の特徴から、多くのビームラインでこのコンセプトによるビーム微小化が進められた⁵⁾。APS 23ID-B で

は後述する脂質メソフェーズ法 (LCP) 法 (注釈参照) と呼ばれる結晶化技術の開発者らと共同して G タンパク質共役受容体 (以下 GPCR) などの膜タンパク質結晶から高分解能データ収集を行うための先駆的な技術開発が行われた^{6,7)}。

注釈: 結晶化の際の脂質の状態によってキュービック相, スポンジ相を利用した結晶化の方法が存在するためこれらを併せた脂質メソフェーズ法と呼ぶ方が正確である。文中では脂質メソフェーズ法の意味で“LCP 法”の呼称を用いている。

2. 高フラックス微小ビームラインにおける研究開発

高フラックス微小ビームを実現するための, また, それを利用したデータ収集に関連するいくつかの重要なハードウェア開発について紹介する。

微小集光に重要な集光ミラーに関して, 主には X 線が反射する鏡面の形状誤差を小さくするための研磨技術の発展があった。日本でも大阪大学で開発された EEM (Elastic Emission Machining) という研磨技術により原子レベルでミラー母材の表面を研磨する技術が開発され⁸⁾ SPring-8 を始め, X 線自由電子レーザー (以下 XFEL) 施設 SACLA でも EEM 加工の集光ミラーが利用されている。またバイモルフミラーと呼ばれるピエゾアクチュエータを多数有し, 反射面の形状を変形させることが可能な集光ミラーの利用も進んでいる⁹⁾。バイモルフミラーを用いるメリットは形状を変形させることで柔軟にビームサイズや集光位置, 発散角を調整できる点である¹⁰⁾。

高輝度光源を利用したビームラインでは, 白色 X 線から必要なエネルギーの X 線を切り出すための分光結晶に多くの熱負荷がかかる。この熱負荷を低減することにより分光結晶の熱的歪みを低減して利用する X 線の強度や形状を安定化することが重要である。多くの高フラックスビームラインでは現在, 分光結晶を液体窒素により冷却する方法が採用されている¹¹⁾。また分光結晶が液体窒素などの媒体で振動することを低減することも安定な X 線利用には重要であり, 計測および改善対策について多くの取り組みがなされている¹²⁻¹⁴⁾。

微小集光を行うビームラインでは, 特に光学素子や回折計の振動を低減する対策も重要である。振動対策のコンセプトとしては第一に振動の原因を排除することである。これには重量の大きな石定盤を光学素子や回折計の架台として利用する, 極力振動源を光軸付近に設置しないなどの対策が含まれる¹²⁾。第二に振動によるビーム位置のズレを観測して, 光学素子 (二結晶分光器やミラー素子) にフィードバックをかけてビーム位置を安定化するという方法もある。高速 X 線位置強度モニター¹⁵⁾ などの開発により高速

かつ正確なフィードバックシステムの構築が容易になっている。

結晶から得られる回折強度シグナルを検出するための X 線検出器の進歩も目覚ましい。特に微小結晶から得られる回折強度シグナルは微弱であり, それらを正確に検出するためには低ノイズかつ検出効率の高い X 線検出器の利用が必須である。また限られたマシンタイムの中でより多くのデータ収集を行うために読み出し速度も重要である。後述するように視認が困難な微小結晶を X 線で検出する場合には, 読み出し速度が直接結晶を探索する時間に影響をおよぼす。本分野で広く利用されている CCD 検出器は X 線を蛍光スクリーンで可視光に変換し, そのシグナル像を光ファイバーで縮小し CCD チップで撮影するものである。像の縮小倍率, 蛍光体の厚みや変換効率, CCD の感度などによって PSF (Point spread function; にじみの大きさの指標) や検出効率は異なる。最近の CCD 検出器では波長 1 \AA あたりで PSF が $100 \mu\text{m}$ 程度, 検出効率 (DQE) $0.8-0.9$ のものが多く開発され利用されている。2006年頃には大面積のピクセルアレイ型フォトンカウンティング検出器が登場し¹⁶⁾, タンパク質結晶構造解析に広く利用されるようになってきた。これまでの CCD 検出器との根本的な違いは, 入射する X 線光子を直接カウントできることである。これにより微弱な回折シグナルを効率よく得るだけでなく, CCD 検出器では不可避であった読み出しノイズを無くした高精度データ収集が実現できるようになった¹⁷⁾。Dectris 社の PILATUS 検出器 (PILATUS3 X series) ではピクセル分解能が $172 \times 172 \mu\text{m}^2$, 読み出し速度は最大 500 Hz であり, 最近リリースされた EIGER 検出器 (EIGER 9M) ではピクセル分解能が $75 \times 75 \mu\text{m}^2$ 最大 238 Hz での高速検出が可能となっている。フォトンカウンティング型検出器では入射する X 線光子数が多くなると数え落としが起きる。これは計算によって補正されるよう設計されているが, 補正には限界があるため特に高強度 X 線を利用する場合には実験条件をよく精査して利用方法を検討する必要があるだろう。

$10 \mu\text{m}$ 以下のサイズの結晶から回折データを収集する場合には結晶位置をアラインメントするためのゴニオメータの位置再現精度についても要求が厳しくなる。ゴニオメータは通常, X 線の集光位置に試料結晶を移動し, 安定に保持して X 線を照射することを可能にするものである。 $1 \mu\text{m}$ の結晶を正確に $1 \mu\text{m}$ のビーム位置に合わせようとする場合, ゴニオメータの並進軸の位置精度はサブミクロンでなければならない。また通常試料結晶は回転させながらデータ収集を行う (振動写真法) ため, ゴニオメータの回転子の偏心誤差もサブミクロンオーダーであることが望ましい。SPring-8 では神津精機製のゴニオメータを利用しており, 回転子の偏心誤差が $0.5 \mu\text{m}$ 程度, 並進軸の繰り返し位置精度は $0.1 \mu\text{m}$ 程度, さらに移動した並進軸にはエンコーダと呼ばれる位置読み出し機能も有しておりフ

ードバック制御が必要な場合にも対応可能な設計としてある。

3. SPring-8 の高フラックス微小ビーム ビームライン BL32XU の開発

SPring-8 において2007年から文部科学省ターゲットタンパク研究プログラムの一環で、 $10\ \mu\text{m}$ 以下の微小結晶からデータ収集を実現することを目標に高フラックス微小ビームビームラインの建設を開始した。当時、SPring-8 で利用できていた最小ビームサイズは標準アンジュレータビームライン BL41XU の $20\ \mu\text{m}$ であり解析可能な最小結晶サイズは $30\ \mu\text{m}$ 程度であった。この最小限界を打破することが BL32XU の一つの大きな目標であったため $1\ \mu\text{m}$ 集光 X 線を恒常的に利用でき、フラックス密度を BL41XU の10倍である $10^{10}\ \text{photons}/\text{sec}/\mu\text{m}^2$ にすることを達成目標とした。またビームサイズを種々の微小結晶サイズに合わせて簡単に変更できる設計とした。光源は SPring-8 で開発されたハイブリッド真空封止アンジュレータとし、液体窒素冷却型二結晶分光器で分光した単色光を下流の輸送チャンネルスリットで切り出して仮想光源を作り、試料上流の K-B 配置の EEM ミラーで $1\ \mu\text{m}$ に集光する設計とした。ビームの位置・強度の安定化のために極力光学素子の数を抑え、曲率固定の EEM ミラーを利用するという極めてシンプルな光学設計とした。

2009年10月に光学ハッチにファーストビームを導入し、同年11月末には試料位置への $6 \times 10^{10}\ \text{photons}/\text{sec}$ 、 $0.9\ \mu\text{m}$ 集光に成功した (Fig. 1)。このビームを利用して標準試料であるリゾチームの $2\ \mu\text{m}$ サイズの結晶から $2\ \text{\AA}$ 分解能の回折像を得ることに成功し、マイクロビーム利用による微小結晶構造解析が実現できることを確認した。ところが、翌2010年5月からユーザ運転を開始すると同時にデータ収集についていくつかの深刻な問題に直面した。

最初に直面した問題は建設前からの懸案事項でもあった

タンパク質結晶の放射線損傷についてであった。タンパク質結晶の放射線損傷は結晶に X 線を照射した場合に必ず起こる現象で回折強度シグナルの低下や結晶格子定数の変化など高精度データ収集を妨げる要因となる。損傷量は吸収線量 (結晶が X 線照射によって単位重量あたりの吸収するエネルギー量 $\text{J}/\text{kg} = \text{Gy}$) に依存し、凍結したタンパク質結晶試料の回折能は吸収線量 $20\ \text{MGy}$ でおおよそ半分になるということが広く知られている (Henderson 限界)¹⁸⁾。BL32XU では1秒未満の露光でも Henderson 限界である $20\ \text{MGy}$ 程度の吸収線量に到達してしまうため、多くの実験者が「それまでの経験とカン」では使いこなすことができなかった。「結晶の寿命」をより定量的に評価してその寿命の範囲内で回折データを収集するという測定コンセプトは、少なくとも当時の日本では広く受け入れられていなかった。例えば、あるビームラインで決めた「この結晶には 1° あたり5秒程度 X 線を照射できる」といった条件を、X 線エネルギー、ビームサイズ、フォトンフラックスを意識せずにそのままフラックス密度の異なるビームラインで適用する実験者も多かった。このためまずビームライン BL32XU ではプログラム RADOSE^{19,20)} を用いて予想される吸収線量からデータ収集時の露光条件を決定するインストラクションを進めた。さらに「ヘリカルデータ収集法³⁾」をビームラインの標準測定法として採用した。通常は結晶を回転させて構造解析に必要なデータ収集を行うが、ヘリカルデータ収集法ではこれに加えて例えば一枚~数枚の回折像を得るごとに露光点を並進させる。並進させながら回転させるため「ヘリカルデータ収集」という名前がついている。この方法は特に結晶サイズに比べてビームサイズが小さい場合に有効である。運用開始当初の BL32XU では $50 \sim 100\ \mu\text{m}$ 以上の結晶が測定対象として多かったため、この方法を用いることで良質な回折データ収集が実現できるようになった。

2010年の中ごろから LCP 法で結晶化された膜タンパク質結晶が BL32XU に多く持ち込まれるようになった。

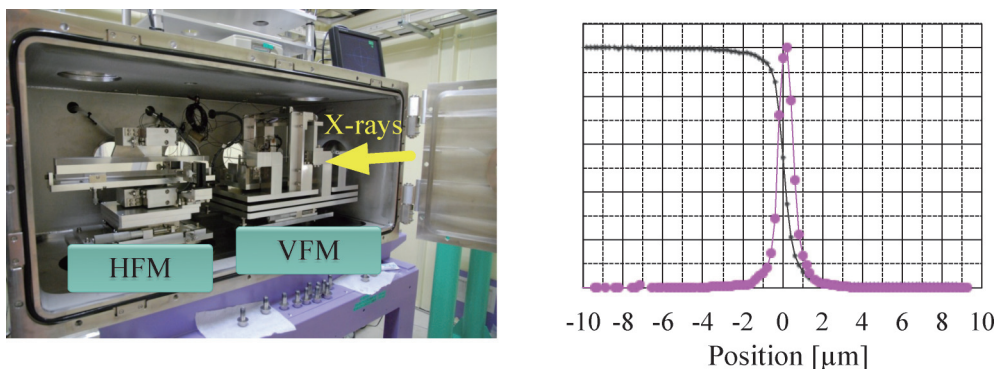


Fig. 1 (Color online) Left is the mirror chamber unit installed into the experimental hutch of BL32XU. Vertical and horizontal focusing mirrors (referred to as VFM and HFM, respectively) are shown. Right is the vertical beam profile available at the sample position. FWHM of the profile corresponds to $0.9\ \mu\text{m}$. Horizontal profile is not shown but the same FWHM was available.

LCP法はタンパク質を脂質二重層に再構成させた状態で結晶化させる方法で、これまでの方法に比較して安定かつ回折能が高い結晶を得やすいという特徴がある²¹⁾。LCP法で得られた結晶（以下LCP結晶）は高品質だがあまり大きく成長しないことがよくあるので、高フラックス微小ビームの利用が有効である。BL32XUでは初期スクリーニングが完了した直後の結晶からでも3 Å以上の高分解能回折が得られることもしばしばあった。しかし、LCP結晶の構造解析を行うための新たな問題に直面した。

一つ目にLCP結晶は可視光で視認が難しいという点である。結晶をピックアップする際に結晶が成長した環境である脂質を多く含んだ状態で試料ホルダーに載せて凍結するため、これまでのタンパク質結晶のように「非品質で透明な抗凍結剤に視認可能な結晶が浮いている」という状態ではない。つまりビームラインの顕微鏡で結晶がどこにあるのかを確認することができず、X線と試料位置を合わせるという作業（以下センタリング）が基本的にはできない。この場合にはX線ビームを用いた二次元走査が必須となる（Fig. 2）（以下ラスタースキャン⁷⁾）。ゴニオメータを並進させながら試料ホルダーをX線でラスタースキャンし、検出器上に回折像が確認された位置にセンタリングを行う方法である。ラスタースキャンは単に結晶を探索しセンタリングするために行う工程なので、ここでは放射線損傷は極力抑える必要がある。つまり「結晶が見つかる程度」の回折シグナルが得られる低吸収線量でラスタースキャンを行う必要があり、各試料の回折能に合わせた条件選

定を行うのに試行実験を多く必要とした。またBL32XUで利用できる最大ビームサイズ10 μm角、試料ホルダーが150~500 μm角程度であったことから例えば150 μm角のホルダーでも縦15×横15=225枚の走査イメージを取得する必要があった（Fig. 2）。さらに得られた走査イメージ上に回折点が観測されているかどうかを確認し結晶位置を特定する必要もある。ラスタースキャンで結晶を探索する際、X線検出器の読み出し速度に依存して測定時間が決まる。当時、BL32XUで搭載していたRayonix社のMX225HE検出器は高い検出効率を有していたが読み出し速度は1秒程度かかっており、更にラスタースキャン1枚ごとにシャッターを開閉する制御を行っていたため測定完了までに最低15~20分程度の時間を要していた。さらにイメージ解析や高精度なセンタリングを完了する工程で30~45分程度の時間を要していた。微小ビームが利用できることで決定できる結晶位置精度は高かったが、この工程にかかる時間を短縮することが測定効率向上の鍵であった。

二つ目はLCP微小結晶の重篤な放射線損傷である。結晶が小さくなればなるほど放射線損傷の影響は大きくなる。結晶のサイズに関係なく結晶には吸収線量で規定される寿命があり、シグナルを得るために利用できる体積が小さい微小結晶の方が得ることができるデータ量が少なくなるためである。ヘリカルデータ収集法を用いることにより大きな結晶では高分解能構造解析が可能なデータ収集も行えるようになってきたが、30~50 μm程度の結晶を用い

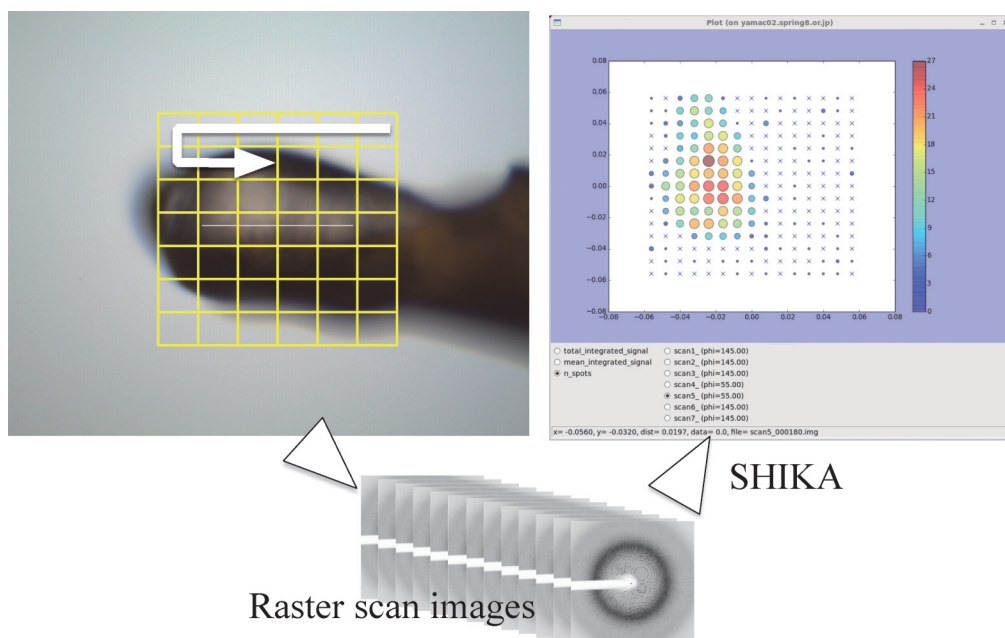


Fig. 2 (Color online) The concept of 'raster scan'. The dark region in the left-top figure shows a sample holder which includes membrane protein crystals with lipidic mesophase medium. After defining the raster area and spatial resolution of the 2-dimensional grids, as shown with the yellow mesh, raster scan images are collected from each grid. SHIKA analyses the images and outputs the contour map of the results. The score of each grid is plotted to the corresponding 2-dimensional goniometer coordinates.

る場合にはより正確な吸収線量の見積もりとそれに基づく実験条件の選定が必要であった。このため我々は異なる X 線エネルギー、ビームサイズを用いた場合に凍結タンパク質結晶上をどのように放射線損傷が伝播するかということを実験的に決定し、ヘリカルデータ収集時に結晶が吸収する線量を正確に予測することに成功した。その結果、利用するビームサイズと結晶のサイズ、必要なデータ量から、重篤な放射線損傷を回避するための露光条件を自動的に選定して実験者に提案するプログラム KUMA の開発を行った。このプログラムの利用により、どのようなサイズの結晶からも微小ビームを用いた高効率なデータ収集を行うことを実現した。

また LCP 微小結晶からのデータ収集を通して、微小ビームを用いた測定において解決すべき装置の問題を洗い出すこともできた。例えば、回折計の温度変化によるゴニオメータ回転中心とビーム中心の位置ずれは微小ビーム利用ならではの問題であった。通常、ユーザ運転を開始する前にビームラインの光軸調整を行い、回転中心とビーム中心のズレが無いようにしてユーザ実験を開始するが、調整後 2~3 時間で回転中心とビーム中心に 4~5 μm のズレが起きるといった問題が頻発した。原因を調査した結果、結晶観察用顕微鏡架台の温度変化であることがわかった。調整中にハッチ内で利用していた液体窒素容器乾燥機の影響で架台温度が通常時より 1°C 程度高くなっていた。回転中心を観察するために設置した微小針の先端を観察するカメラは調整時には 4~5 μm 程度高い位置にあり、2~3 時間かけて徐々に通常運転時の温度に近づき、架台が収縮して回転中心とビーム位置ズレが起きていた。このため液体窒素容器の乾燥方法を変更すると共に、試料観察用顕微鏡架台を熱膨張係数が元素材の 1/10 程度の素材で製作しこの問題を解決した。現在では自動光軸調整プログラムを開発し光軸調整時の人為的な誤差の介入を防ぐこと、さらに調整結果は自動的に記録し光軸ズレが起きた際の問題特定を迅速に行えるような工夫をしている。

4. 複数微小結晶を用いたデータ収集法の開発

上記のようにビームラインにおける応用にも即した開発により、多くのインパクトの高い成果²²⁻²⁷⁾が創出できるようになった反面で残された問題点もいくつかあった。LCP 結晶は回折能が比較的高いものが多いが、もちろんそうでないものも多く存在する。このような場合には結局のところ結晶化条件を再検討し、スクリーニングを行って結晶品質を向上するということが求められる。このことはヘリカルデータ収集をはじめとした「1つの結晶から1つのデータセットを収集する」ということを前提にした測定に共通の問題点であるとも言える。構造解析を行うためには前述したとおり、結晶を回転させながら 90°分~360°分などのデータ収集を行うということが一般的である。この

ため、放射線損傷に規定される寿命が例えば露光時間 100 秒と決まっていた 100°分のデータ収集をしなければならぬ場合には、1°分の回折イメージを収集するために結晶に照射できる X 線は 1 秒と決まる。ヘリカルデータ収集法を用いてこの角度あたりの露光量を増やせる場合もあるが、数 μm の結晶しか得られない場合にはその量の変化は劇的ではない。

ここで複数の試料結晶からのデータ収集を許容した場合には、その露光量を劇的に増やすことができる。例えば先の結晶について収集するデータ量を 10°分とした場合、1°あたりに照射できる X 線量は 10 倍となるため同じ回折能を有する結晶からでも得られる回折分解能は向上する。ただし構造解析に必要な全データ量が集まるわけではないため、100°分のデータを収集するためには少なくとも 10 個の結晶を用いて必要なデータ量を完成することが必須となる。実際に LCP 結晶を用いた GPCR などの高難度タンパク質結晶構造解析ではこのような方法がとられている報告が多数ある^{28,29)} (以下、複数結晶データ収集法)。BL32XU でも結晶サイズが 30~50 μm よりも大きい場合にはヘリカルデータ収集が高効率ではあるが、それよりも小さな結晶、もしくは回折能が著しく低い試料に対して複数結晶データ収集法を採用する必要に迫られた。

複数結晶データ収集法を用いる上で重要な技術開発はラスタースキャンの高速化であった。ラスタースキャンは測定時間の大半を占めていたためこの工程の高速化は実験効率の向上に直結する。我々はピクセル分解能 78 μm において 10 Hz 読み出しが可能な X 線 CCD 検出器 (Rayonix 社製 MX225HS) を導入した。検出器はピクセル分解能を 312 μm まで落とせば 100 Hz の読み出しが可能である。これと同時に X 線シャッターを開けたままゴニオメータを並進させるシャッターレス測定を採用した。これによりシャッターの開閉とゴニオメータの位置合わせにかかる時間を短縮することができた。ラスタースキャンで最も重要なことは、イメージを取得した時のゴニオメータ座標が正確に分かることである。このため、我々は SPring-8 で開発された同期制御システム Blanc³⁰⁾を導入することで、ラスタースキャンを取得する検出器へのトリガーパルスとゴニオメータを並進させるパルスを同期させている。現時点でのラスタースキャンの標準条件は 10 μm 角のビーム、ゴニオメータ並進速度 500 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、検出器読み出し 50 Hz である。この速度では一連の制御を含め、600 μm 角で 3,600 枚の走査をおおよそ 3 分程で完了することができる。データ収集が現実的である回折能を有する LCP 結晶の探索であればおおよそ 30~100 kGy という非常に少ない吸収線量で行うことができる。

ラスタースキャンの高速化の一方で、得られた回折イメージの解析の高速化も重要である。我々はストレージ上に高速に撮りためられた走査イメージを認識し、ブラッグ反射ピークを自動的に解析するプログラム SHIKA を開発

した。24コア CPU を搭載したクラスターマシンでバックエンド回折強度解析プログラム *distl*³¹⁾ を利用した並列計算によりスキャン終了後30秒程度で結果のスコア（各イメージ上に観測されたブラッグ反射の数など）をゴニオメータの三次元座標上にマップとして表示することができる（Fig. 2）。マップ上のグリッドをクリックすると対応するゴニオメータ座標へ移動することができる。高速ラスタースキャンシステムの構築と SHIKA の開発により微小結晶探索の時間と労力に関する効率は劇的に向上した。ラスタースキャンに時間がかかっていた頃は、走査領域が小さくなるように試料結晶を少量ずつピックアップするなど実験者の手技が測定効率向上に重要であったが、この高速ラスタースキャンおよび高速解析プログラムの開発により実験者の試料準備の簡便化にもつながった。

我々はまず各試料ホルダー上に数個～50個凍結した LCP 微小結晶を測定対象とした手動データ収集プロトコルを確立した。試料ホルダーの形状に合わせてラスター領域を設定し、10 μm 角のビームを利用して高速ラスタースキャンを行い、SHIKA の解析結果から見出された結晶位置を記録する。マークした全ての結晶に10 μm 角のビームを照射して5～10°分の回折データ収集を行う。SHIKA でマークした座標はプログラム KUMA に転送し、利用するエネルギーやビームサイズなどから放射線損傷を考慮した最適露光条件を設定しデータを順次測定する。ラスタースキャンを行った角度を中心として、例えば5°分ならば $\pm 2.5^\circ$ 分といった測定をすればビームから結晶が外れることなくデータ収集が行える。各結晶は互いに独立にランダムに配向しているものと仮定すれば、数十～数百の結晶からデータを得れば必要な回折強度データを全て得ることができる。我々はこの手動データ収集プロトコルを利用することにより、ある GPCR の高分解能（1.95 Å）[論文投稿準備中] のデータ収集に成功した（Fig. 3）。このデータ収集には400個以上もの結晶を用いて16時間もの時間をかけた。しかしこの経験を通してこの手動データ収集プロトコルを自動化できることを確信した。また同時に得られた大量のデータをその品質・性状に基づいて取捨選択し、うまくスケール合わせとマージを行うプログラム開発の必要性もあると認識した。

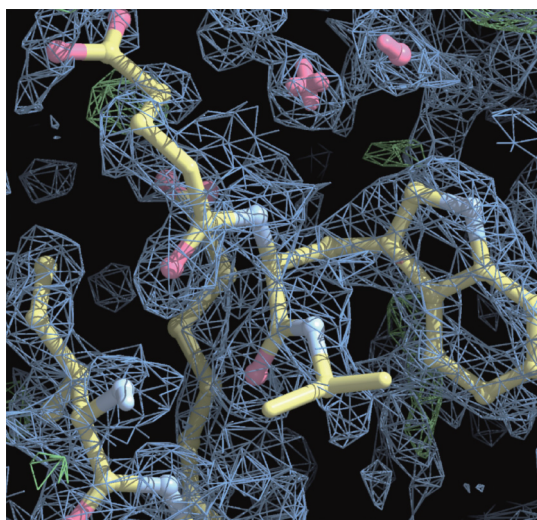


Fig. 3 (Color online) Electron density map of a GPCR crystal structure at 1.95 Å resolution.

備中] のデータ収集に成功した（Fig. 3）。このデータ収集には400個以上もの結晶を用いて16時間もの時間をかけた。しかしこの経験を通してこの手動データ収集プロトコルを自動化できることを確信した。また同時に得られた大量のデータをその品質・性状に基づいて取捨選択し、うまくスケール合わせとマージを行うプログラム開発の必要性もあると認識した。

5. 手動測定から自動測定へ

新たに試料結晶ホルダーの外形を自動的に認識してラスター領域を自動的に決定するためのプログラム INOCC を新たに開発した。さらに SPring-8 の構造生物学ビームラインで標準的に利用されているビームライン制御プログラム BSS³²⁾ の機能を利用した自動データ収集システムを開発した。自動データ収集システムのナビゲータプログラムは BSS にコマンドを送信して自動試料交換ロボット SPACE³³⁾ を用いた試料交換やラスタースキャン、さらにはデータ収集などの高度な装置制御が必要な工程の自動化を実現する。また自動ルーブセンタリング・ラスター領域自動決定プログラム INOCC、ラスタースキャン結果自動解析プログラム SHIKA、露光条件自動決定プログラム KUMA をつなぐ役割も担っており、ユーザが測定前に設定した試料情報や測定条件に従って複数結晶を用いたデー

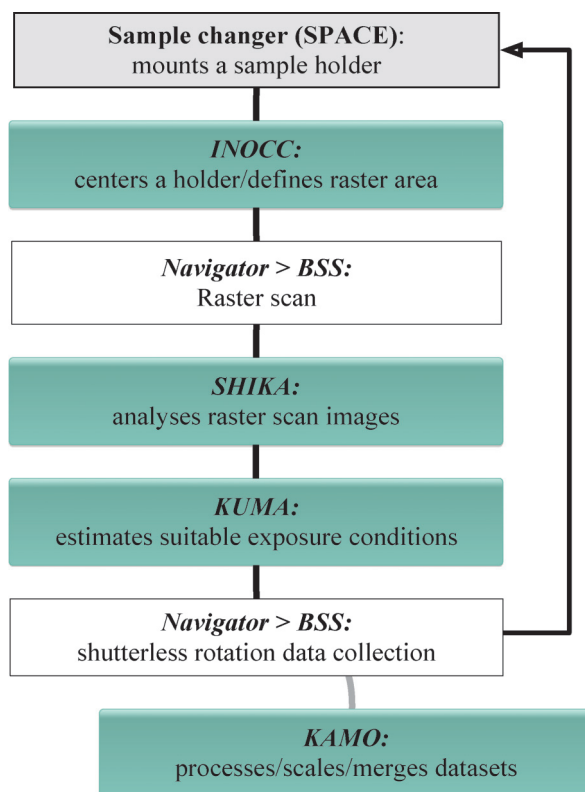


Fig. 4 (Color online) Experimental flow chart in our automatic data collection system.

タ収集を全て自動的に行うことを実現した (Fig. 4)。実績としては16個の試料ホルダーを2.5~3.5時間程度で完了することができている。測定自動化に加え、全自動データ処理システムの開発も行った。開発したプログラム KAMO は、大量の結晶から収集した回折データを認識して指数付け・積分を行い個々の格子定数やデータ間の相関係数を利用して同型結晶をグルーピング・マージする機能を有している。開発した Zoo システム (INOCC, SHIKA, KUMA, KAMO) を用いて2015年度には微小結晶を用いたタンパク質の高分解能構造解析を既に20個以上も実現しており中には重原子を利用した GPCR の位相決定も含まれている。現在、さらに広範な測定に対応するべく、通常の単一露光点データ収集 (露光点を1点とし360°分のデータ収集が可能)、ヘリカルデータ収集 (前述)、シリアル放射光データ収集 (後述: SMX 法) などの機能を有するシステムとして高度化を進めている。

6. XFEL 施設を用いたタンパク質微小結晶構造解析

2011年に XFEL を用いた最初のタンパク質結晶構造解析の事例が Nature に掲載された³⁴⁾。XFEL 施設ではフェムト秒オーダーの極短パルス X 線が数百 nm~数 μm 集光サイズ、強度 10^{10} ~ 10^{11} phs/pulse 程度、繰り返し周波数30~120 Hz で試料位置に供給される。上記構造解析で採用された方法 (シリアルフェムト秒結晶構造解析: Serial Femto-second Crystallography: 略称 SFX) は当該分野の測定手法として革新的であった。現在も広く利用されているこの SFX は数 μm に集光した XFEL 光路上に液体ジェット等でマイクロオーダーの微小結晶を連続的に供給し、XFEL の繰り返し周波数と同期した高フレームレートの X 線検出器で撮像を繰り返す。XFEL が結晶に当たった場合には検出器上に回折点が観測され、観測されたイメージを選別して指数付け・積分の後でモンテカルロ積分法によってマージを行う。従来法 (シンクロトロン放射光施設などで採用されている振動写真法) と異なり、1 結晶 1 枚限りの回折データ、しかも結晶を回転しない (できない) 静止写真法である。上記論文の解析では3,000,000枚のデータ収集 (現在はもっと少ない枚数で構造解析が実現できることが示されている) を行い、強度積分を行った後、結晶学的に等価な反射強度をすべて平均化し (モンテカルロ積分)、平均値が収束するまで測定を繰り返す方法が採用されている。SFX は先に述べた「複数微小結晶からのデータ収集法」の究極の形とも言える。

SFX はタンパク質結晶構造解析分野において「複数結晶からデータ収集する」ことに対する価値観を変えたのではなかろうか。例えば Redecke らはアメリカ XFEL 施設 LCLS で行った SFX³⁵⁾ の実験と同じ結晶を利用して、ドイツのシンクロトロン放射光施設 DESY³⁶⁾ のマイクロフ

ォーカスビームラインにて凍結結晶を利用した SSX 法 (Serial Synchrotron Crystallography の略) を開発した。1 μm ほどの大量の微小結晶を600~1,000 μm サイズの試料ホルダー上に凍結し、サイズ5 μm の高フラックスビームで高速に走査しつつ、フォトンカウンティング検出器 (Dectris 社製 PILATUS 6M) で高速データ収集を行っている。試料ホルダーは並進させる際に同時に回転も加えているため、1 結晶 1 照射であっても必要な回折強度をより効率的に取得できる。この報告をきっかけにヨーロッパでは SFX 法と同じように液体ジェットを利用した常温結晶の SSX 法が提案されたり³⁷⁾、大量の微小結晶を大面積の試料ホルダー上にマウントして測定に利用する手法が盛んに開発されるようになった³⁸⁻⁴³⁾。XFEL・シンクロトロン問わず、今後もこのような微小結晶構造解析における高速データ収集に必要な技術開発が活発になると考えられる。

SFX のデータ処理方法の開発では検出器の幾何学的配置を精密化するなどマルチパネル検出器に特化したデータ処理法の最適化がデータ精度向上に重要であるという報告もある。BL32XU では取得したデータの取舍選択、クラスタリングやマージの技術 (プログラム KAMO) により大量微小結晶からの高分解能データ収集と解析を実現した。さらに SFX で部分反射強度から完全反射強度を見積もるプログラムの開発も進んでいる^{44,45)}。このようなデータ処理プログラムの発展は既存の実験手法の効率向上だけでなく、上述した測定技術などと組み合わせることで、相乗的に新たなハードウェア開発や手法開発にもつながっていくことが期待できる。

7. 今後の展望

本稿ではタンパク質の微小結晶構造解析にテーマを絞って執筆を進めてきたが、最後に私が今思うところを述べたい。私はどんなタンパク質に対しても微小結晶構造解析を適用したいと思っているわけではない。タンパク質の結晶は大きければ大きいほど理想的には回折能は高いし、放射線損傷量という制限がある以上、微小結晶より高分解能構造解析も容易である。本稿で述べたいことは加速器や放射光施設のたゆまぬ発展と共に種々のハードウェアやソフトウェアの技術が成熟した結果、微小結晶しか得ることができなかったタンパク質の構造解析を効率化できた、ということである。

冒頭に述べたようにタンパク質の機能を深く理解するためには構造をより高分解能で解析できた方が良い。私はこの「高分解能」は分解能2 Å 以上であると思っている。もしこの高分解能構造解析が「どんなタンパク質でも微小結晶で」実現できるのであれば微小結晶構造解析だけを推進すれば良いと思う。しかし、現時点でも微小結晶を利用して2 Å 分解能を超える構造解析が実現した膜タンパク質は希少であるし、今後の結晶構造解析の対象として残さ

れているタンパク質はこれまで以上に結晶化も高分解能化も困難になると予想できる。これらの高分解能データ収集を実現するためのビームライン技術開発を継続することは今後も重要である。

「過去の不可能を可能にした」という意味で高フラックス微小ビームビームラインは非常に重要な開発であった。SFX がシンクロトロンでの測定方法を進化させたように、シンクロトロンでの微小ビームの利用技術が XFEL 施設を含めた他のビームラインの進化を促し、より多くのタンパク質の高分解能構造解析が実現できるようこれからも尽力したい。

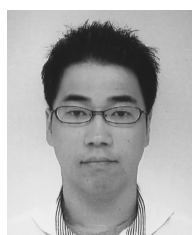
謝辞

SPring-8 ビームライン BL32XU の建設・開発は文部科学省ターゲットタンパク研究プログラムの一環として建設され、現在は AMED 創薬等支援技術基盤プラットフォームプロジェクトによって高度化とユーザ支援を継続している。ビームラインの建設・高度化・運用は理研・放射光科学総合研究センターならびに高輝度光科学研究センターの関係者の方々のご指導・ご協力の下継続して行っている。また利用実験者には高度化に関する多くのアイデア、時には試料結晶を提供して頂いている。関係して頂いた方々に深く感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) S. Cusack *et al.*: Nat. Struct. Biol. **5 Suppl**, 634 (1998).
- 2) C. Riek *et al.*: Current Opinion in Structural Biology **15**, 556 (2005).
- 3) D. Flot *et al.*: J Synchrotron Rad **17**, 107 (2009).
- 4) R. Sanishvili *et al.*: Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **64**, 425 (2008).
- 5) K. Hasegawa *et al.*: J Synchrotron Rad **20**, 910 (2013).
- 6) S. Stepanov *et al.*: Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**, 176 (2011).
- 7) V. Cherezov *et al.*: Journal of The Royal Society Interface **6**, S587 (2009).
- 8) K. Yamauchi *et al.*: Rev. Sci. Instrum. **73**, 4028 (2002).
- 9) R. Signorato *et al.*: J Synchrotron Rad **5**, 1195 (1998).
- 10) R. F. Fischetti *et al.*: J. Phys.: Conf. Ser. **425**, 012006 (2013).
- 11) T. Mochizuki *et al.*: Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A **467**, 647 (2001).
- 12) N. Igarashi *et al.*: J Synchrotron Rad **15**, 292 (2008).
- 13) P. Kristiansen *et al.*: J Synchrotron Rad **22**, 879 (2015).
- 14) H. Yamazaki *et al.*: J. Phys.: Conf. Ser. **425**, 052001 (2013).
- 15) O. Bunk *et al.*: J Synchrotron Rad **12**, 795 (2005).
- 16) C. Broennimann *et al.*: J Synchrotron Rad **13**, 120 (2006).
- 17) G. Hulsen *et al.*: J Appl Crystallogr **39**, 550 (2006).
- 18) R. Henderson: Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **241**, 6 (1990).
- 19) K. S. Paithankar and E. F. Garman: Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**, 381 (2010).
- 20) K. S. Paithankar *et al.*: J Synchrotron Rad **16**, 152 (2009).
- 21) E. M. Landau and J. P. Rosenbusch: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**, 14532 (1996).
- 22) H. E. Kato *et al.*: Nature **482**, 369 (2012).
- 23) Y. Tanaka *et al.*: Nature **496**, 247 (2014).
- 24) K. Kumazaki *et al.*: Nature **509**, 516 (2014).
- 25) T. Nishizawa *et al.*: Science **341**, 168 (2013).
- 26) S. Doki *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **110**, 11343 (2013).
- 27) D. Deng *et al.*: Nature **510**, 121 (2014).
- 28) S. G. F. Rasmussen *et al.*: Nature **450**, 383 (2007).
- 29) D. M. Rosenbaum *et al.*: Science **318**, 1266 (2007).
- 30) M. Ishii and T. Ohata: Proceedings of ICALEPCS2009, Kobe, Japan 465 (2009).
- 31) Z. Zhang *et al.*: J Appl Crystallogr **39**, 112 (2006).
- 32) G. Ueno *et al.*: J Synchrotron Rad **12**, 380 (2005).
- 33) H. Murakami *et al.*: J Appl Crystallogr **45**, 234 (2012).
- 34) H. N. Chapman *et al.*: Nature **469**, 73 (2011).
- 35) L. Redecke *et al.*: Science **339**, 227 (2013).
- 36) C. Gati *et al.*: IUCrJ **1**, 87 (2014).
- 37) P. Nogly *et al.*: IUCrJ **2**, 168 (2015).
- 38) C. Y. Huang *et al.*: Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **71**, 1238 (2015).
- 39) C. Y. Huang *et al.*: Acta Crystallogr D Struct Biol **72**, 93 (2016).
- 40) E. L. Baxter *et al.*: Acta Crystallogr D Struct Biol **72**, 2 (2016).
- 41) D. A. Sherrell *et al.*: J Synchrotron Rad **22**, 1372 (2015).
- 42) P. Roedig *et al.*: Sci. Rep. **5**, 10451 (2015).
- 43) U. Zander *et al.*: Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **72**, 1 (2016).
- 44) W. Kabsch: Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **70**, 2204 (2014).
- 45) M. Uervirojnangkoorn *et al.*: eLife **4**, e05421 (2015).

著者紹介



平田邦生

理化学研究所放射光科学総合研究センター
専任技師

E-mail: hirata@spring8.or.jp

専門: 放射光科学, 構造生物学

【略歴】

2003年大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻博士課程修了, 博士(理学), 高輝度光科学研究センター博士研究員, 理化学研究所・放射光科学総合研究センター博士研究員, 2009年同センター技師を経て2012年より現職。

Current status of protein micro-crystallography

Kunio HIRATA RIKEN SPring-8 Center SR Life Science Instrumentation Unit, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan

Abstract The beamline BL32XU at SPring-8 is dedicated to protein micro-crystallography. Available beam size ranges 1–10 μm squares with flux density of 10^{10} photons/sec/ μm^2 . This high flux micro-beam enabled the high resolution data acquisition from protein micro-crystals. Through the 5 years operation of the beamline BL32XU, we had successfully determined several structures of challenging membrane proteins by the developed method, coupled with the maturity of the novel crystallization techniques. Developments related to protein micro-crystallography at synchrotron and also at X-ray free electron laser facilities are introduced.