

X線自由電子レーザーを用いた金属タンパク質試料の結晶構造解析とX線分光測定

矢野淳子

Molecular Biophysics and Integrated Bioimaging Division, Lawrence Berkeley National Laboratory

1 Cyclotron Road, Berkeley, CA 94720, USA

■ 要約

フェムト秒X線レーザーが生体試料の研究に用いられるようになって以来、さまざまな系において室温での立体構造の決定および反応中間体を捉える上でその有用性が証明されている。そして結晶構造解析への応用に加えて、生体分子の分光手法への応用も進んでいる。フェムト秒X線レーザーを用いることで従来難しかった金属タンパク質のような希薄な系の室温におけるスペクトル測定が可能になる。本稿では、XFELを用いた結晶構造及びX線分光法(X線発光法およびX線吸収法)、さらにそれらの同時測定手法に関して我々の最近の研究結果を中心に解説する。

1. はじめに

フェムト秒X線レーザー(X-ray Free Electron Laser, XFEL)を用いた結晶構造解析は、構造生物学の研究分野においてここ数年の間に重要な位置を占めつつある。2011年にLinac Coherent Light Source, LCLS(アメリカ合衆国)が、そして2012年にSACLA(日本)が共用運転をはじめユーザーに開放されて以来、XFELは様々な生体高分子の構造研究に用いられている。XFELでは、フェムト秒パルス幅をもつX線を測定に用いることで試料がX線によって2次の放射線損傷を起こす以前にシグナルを測定することが可能である。したがって、放射線損傷を受けやすい生体高分子の構造研究において重要な進歩をもたらすことが期待される。さらに、これまでごく一部の系でしか行われていなかったX線を用いた生体試料の‘室温’における‘動的構造解析’が可能になる。このような手法は、構造解析のみならずX線分光法の分野においても重要な役割を果たす。

2. フェムト秒X線レーザーを用いた結晶構造解

2.1. XFELにおける結晶構造解析

試料の放射線損傷はX線を用いる研究に常に存在する問題であり、損傷の程度をいかにして評価し、かつ最低限に留めて放射線の影響のないデータを得るかが課題である。生体試料で起こる放射線損傷の主たる原因は、X線と水との相互作用によるヒドロキシルラジカルの形成とその拡散による。従って、通常の放射光X線実験ではラジカルの拡散速度を軽減するため液体窒素温度(100–150 K)で測定が行なわれている。さらに、複数の結晶を使用して

特定の結晶部位あたりのX線量を軽減し、放射線損傷の影響を受けない結晶構造を得ることが可能である。これに対して、XFELではフェムト秒の非常に短いパルスX線を測定に用いるため、放射線損傷がおきる以前に試料からのシグナルを測定することが可能である。従って、既に放射光X線を用いて構造解析が行なわれている系においても、放射線損傷のない構造を得るという点で新たな情報をもたらす。そのような例は、ウシ心筋チトクロム酸化酵素や光化学系II複合体(photosystem II, PSII)単結晶の研究において実証されている^{1,2)}。通常結晶構造解析に用いられるX線量の基準値(つまり結晶のdiffractivityが保たれるX線量)は、HendersonやGarmanが提案している値によると低温測定でおよそ20–30 MGy、室温測定では1 MGy程度である。しかし、PSIIやチトクロム酸化酵素のような、酸化還元反応を行なう金属活性中心における放射線損傷がおこるX線量は、これよりもさらに一桁以上小さい。XFELでは、パルス毎の線量がこれらの値より大きいにも関わらず、フェムト秒の非常に短い発光時間を用いることで放射線損傷がおきる以前に試料からのシグナルを測定することが可能であることを証明している。上記の研究例はXFELを使った液体窒素温度での測定であるが、XFELを結晶構造解析に利用する最大の利点は測定を室温で行うことが可能である点であろう。このことは、室温で存在するアミノ酸側鎖の異性体分布や、その酵素反応中の動的構造変化を知る上で非常に重要である。一方で、さらに大きなX線量を試料に照射すると多重内殻イオン化などの複雑な過程による電子損傷が起こることも知られており、本来観測されるべき自然な構造や電子状態を観測できない場合もありうるので注意が必要である。

2.2 連続フェムト秒結晶構造解析

XFELで用いられる連続フェムト秒結晶構造解析 (Serial Femtosecond X-ray Crystallography) 法では³⁾, タンパク質微小結晶を分散させた液体を試料として液体インジェクターから連続的にX線レーザーの照射領域に導入し, 数千から数百万個の微結晶からのシングルショット回折像を積算して構造解析を行なう (Fig. 1)^{4,5)}. 非常に強力なパルスX線を用いることで, 通常放射光施設では測定が難しいマイクロサイズの微結晶から, しかも常温でX線回折像を得ることができる。LCLSの場合, パルスX線は120 Hzでやってくるが, パルスX線が単結晶に命中する確率 (ヒット率) は液体中の結晶濃度に依存する。例えば光化学系I膜タンパク質結晶の場合³⁾, X線パルス185万ショット (約4時間の実験に相当) のうち, 結晶のヒット率はおよそ6%, そのうち指数付けが可能であったものの割合はショット数に対して1%未満である。従ってヒット率を上げ試料の消費量を軽減するためには, X線の周期と結晶試料の導入を同期させる drop-on-demand 等の概念を利用したインジェクターの導入が必要である。

加えて, XFELデータ解析に関して通常のX線構造解析と異なる点は, SFXで得られる一つ一つの回折像がフェムト秒間に測定された‘静止画像’ (Still image) であ

る点である (Fig. 1)。したがって, それぞれの回折スポットは部分強度しか反映しない (partiality)。Uervirojnankooらは, ポストリファインメントをデータ解析に加えることによって部分強度から完全強度を見積もる手法を報告している^{6,7)}。また, 微結晶自体に大きさや質, あるいは格子定数の分布があること (Fig. 1), 加えて測定に際してはX線が結晶のどの位置に照射されるかを制御できないことなど, 1つ1つの結晶から得られる回折像の質は大きく異なる。そのような非常に不均一な分布を持ったデータから質のよい結晶構造を得るために, 膨大な回折データを測定して立体構造を求める方法がとられている⁸⁾。しかし, 現在の方法では限られた量しかえられない試料の高分解能構造解析は簡単ではないため, より少ないデータからいかにして高分解能な結晶構造を得るかが課題である^{9,7)}。

結晶化が難しい生体高分子の構造解析に加えて, XFELを結晶構造解析に用いることの本来の魅力は, 化学反応, 光化学反応等によって引き起こされる生体分子内の構造変化をリアルタイムで追うことにある。光化学反応を起こすタンパク質, 例えば, 光化学系II複合体やロドプシンなどがその例としてあげられる^{10,11)}。このうち, PSIIは植物やシアノバクテリアが行なう光合成反応における重要

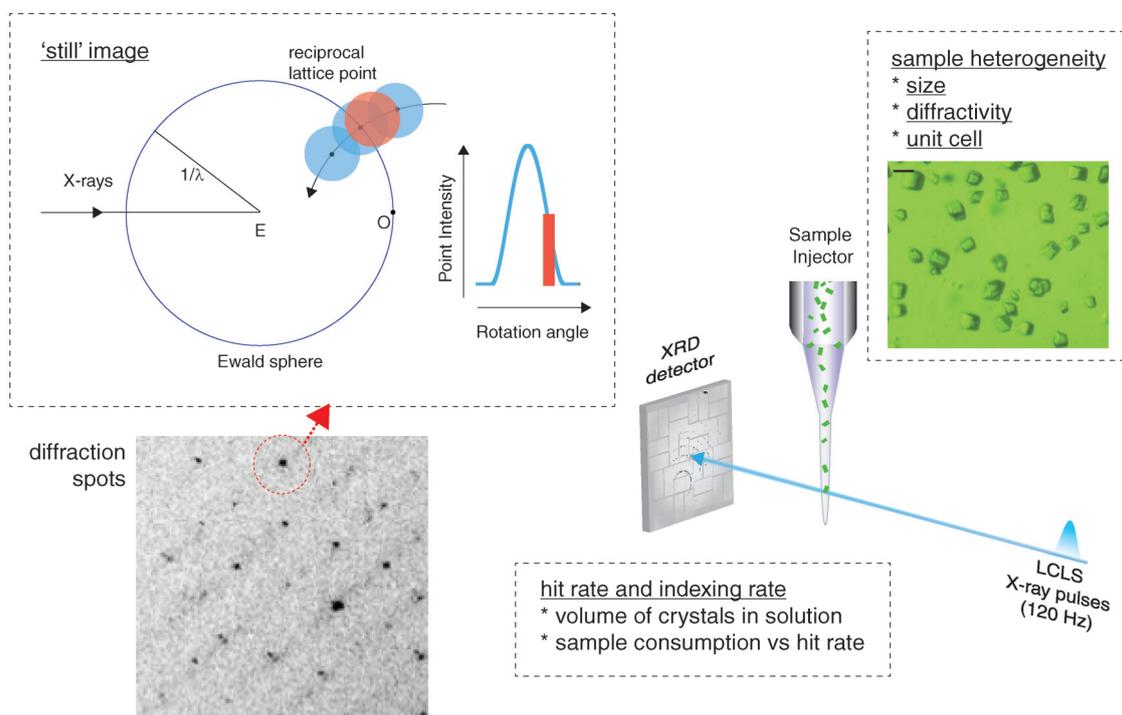


Fig. 1 (Color online) Serial Femtosecond X-ray crystallography (SFX) using a liquid jet, and the existing challenges. Diffraction data obtained from crystalline samples using fs XFEL pulses is fundamentally different from standard diffraction measurements at synchrotron sources. The crystal does not move during the pulse length, leading to recording of ‘stills’ in contrast to oscillation images from standard diffraction measurements. There are many potential error sources in the determination of the actual Bragg intensities for each reflection, including the different sample volume for recording each individual diffraction image and the inherent fluctuations in the intensity and energy spectrum of the XFEL pulses due to the stochastic nature of the lasing process at an XFEL. Another issue is to improve the crystal hit rate and the indexing rate.

なタンパク質であるが、そのクロロフィル反応中心が赤色光を吸収し、光励起が起動力となって金属活性中心における水分解反応がおこる。その触媒反応中におこるタンパク質の構造変化を追うことは触媒機構解明において重要であり、現在 XFEL を用いて研究が進められている¹²⁾。

3. フェムト秒 X 線レーザーを用いた X 線発光及び吸収スペクトル測定

金属タンパク質中の金属活性中心の化学構造に関しては、X 線吸収法や X 線発光法などの元素選択性のある分光法を用いることで X 線構造解析のみからは得られないより詳細な局所的構造および電子、スピン状態に関する情報を得ることができる。以下に、我々のグループで行った 2 つの分光方法を述べる。

3.1 X 線発光法

X 線発光法 (X-ray emission spectroscopy, XES) では、元素の内殻電子を外殻軌道に励起し、その励起状態が X

線を放出して緩和する際のスペクトルを測定する。様々な発光スペクトルのうち、3d 遷移金属の $K\beta_{1,3}$ スペクトルとそのサテライトピークである $K\beta'$ ピークは 3p から 1s 軌道への電子の遷移に相当し、(3p, 3d) スピン交換相互作用を通して 3d 軌道のスピン数、つまり電荷密度を反映する。さらに、その高エネルギー側に現れる $K\beta_{2,5}$ 及び $K\beta''$ スペクトルは配位子原子の 2s/2p 軌道から金属の 1s 軌道へのクロスオーバー遷移に相当する。X 線発光スペクトルは XFEL の入射 X 線バンド幅 (およそ 0.5%, つまり、7 keV 入射 X 線でおおよそ 40 eV, 9 keV でおおよそ 45 eV) に影響されないため、XFEL を用いたスペクトルの 'スナップショット' 測定に適している。また後述するように、同じ入射 X 線エネルギーを用いて X 線結晶構造解析と XES の同時測定が可能である。そして溶液、結晶懸濁液試料いずれからもデータを得ることができる。ただし溶液試料の XFEL X 線照射率が 100% であるのに対して結晶懸濁液の照射率は通常 10% 以下におちるので、後者の場合より長時間のスペクトル積算が必要である。

XES のスナップショット測定には、Fig. 2 (a) に示すよ

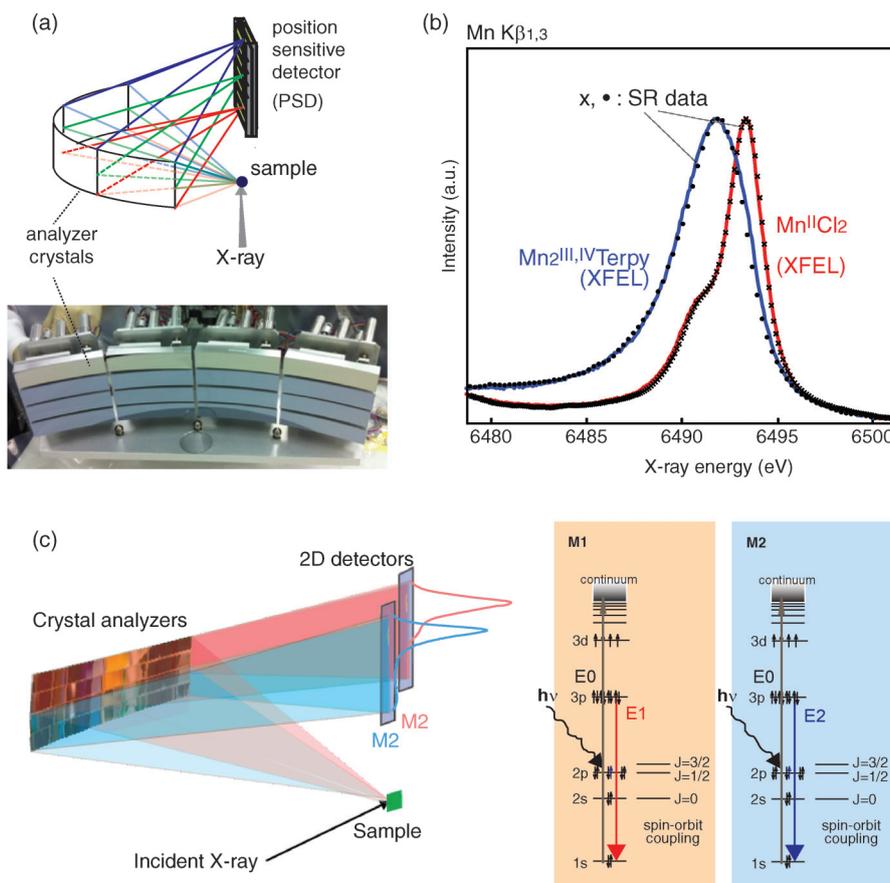


Fig. 2 (Color online) (a) von Hamos spectrometer, that consists of 16 analyzer crystals, for X-ray emission spectroscopy data collection.^{13,14)} (b) A comparison of the Mn model compound solution spectra collected at XFEL (room temperature) and those collected at a synchrotron facility (cryogenic temperature). (c) A simultaneous XES data collection of two elements using von Hamos spectrometer. For example, $K\beta$ XES spectra of two metals, M1 and M2, can be collected simultaneously by using the incident X-rays above the K-edge absorption energies of the two elements.

うな16個のアナライザー結晶からなるエネルギー分散型 (von Hamos) 分光器を用い、CSPAD (Cornell-SLAC hybrid Pixel Array Detector) や MPCCD (multiport CCD) などの2D検出器を用いてスペクトル測定を行う。MnK $\beta_{1,3}$ スペクトルの場合、Siの440反射を用いる。カバーする立体角は全立体角の1.3%、1 eVにつきおよそ0.04%である^{13,14}。蛍光エネルギー6490 eVでは、この分光器を用いた場合の最終的なエネルギー分解能はおよそ0.44 eVである。

XFELのような非常に強力なX線 ($\sim 10^{12}$ photons/pulse) を試料に照射した場合、多重内殻イオン化 (multiple ionization) 等の原因によるスペクトルの形状変化がおこる可能性がある。我々のグループでは、マンガンのモデル化合物を使って、 $\sim 10^{12}$ photons/pulse, 50-100フェムト秒の実験条件下で放射光実験と同一のスペクトルが得られることを示した¹³。Fig. 2 (b)にXFELで室温測定したMnモデル化合物のMnK $\beta_{1,3}$ スペクトルと、放射光ビームラインで測定 (液体ヘリウム温度) した同化合物のスペクトルを示す¹⁵。異なる温度とX線量にもかかわらず、両者のスペクトルは非常によく一致している。本実験で使用したX線量では、単純計算すると1パルス毎にマンガン一原子につき0.1個の光子が照射されていることになる。つまり、この実験条件下では試料の多重内殻イオン化状態はおきておらず、XFELにおいて電子損傷が起こる以前にスペクトル測定が可能であること、そして常温においても放射線損傷のないデータが得られることを示している。一方で、高X線量の入射線を用いた場合XFELによる試料の電子損傷もみられるのでX線のビームサイズ等に注意する必要がある。

XES測定は、吸収端より大きな入射光エネルギーを用いることによって複数の元素の発光スペクトルの同時測定にも応用することができる (Fig. 2 (c))。この方法は、試料中に存在する複数の金属元素の反応誘起後の電子伝達や触媒反応に伴う電子状態の経時変化を追うのに威力を発揮する。例えば、MnとTiを含むクロモフォア化合物の場合、 ~ 400 nmの光励起によって金属間のMMCT (metal-to-metal charge transfer) が起こると考えられているが、そのような連続的な金属間の電子伝達を追うのにも用いることができる¹⁶。

3.2 軟X線を用いた金属タンパク質のXAFS測定

金属タンパク質のX線分光測定では、その金属の酸化還元状態や局所構造に関する情報を得るため硬X線領域のエネルギーを用いたX線吸収法、発光分光法などが通常用いられる。同様の、あるいはより詳細な電子状態に関する情報は軟X線領域のX線を用いて行う金属のL吸収端測定からも得ることができる。L吸収端測定を行う利点は、(i)内殻正孔寿命に依存したスペクトルのもつ自然幅がK吸収端と比較して小さいことから、測定されるスペ

クトルがよりシャープであること (MnL吸収端は ~ 0.3 eV, MnK吸収端は ~ 1.2 eV)、そして(ii)スピン-軌道相互作用によって得られるスペクトルは電子のスピン状態に関する情報も含むことがあげられる。3d遷移金属の2pから3dへの遷移では、スピン軌道結合を反映してエネルギーの異なる2つのピーク領域が現れる。L_{III}が2p_{3/2}から3dへの遷移、L_{II}が2p_{1/2}から3dへの遷移に相当し、これらのピークは、電子状態に加えて元素のスピン状態を反映する。しかし、生物分野では軟X線領域の実験はその実験上の様々な制約のためほとんど行われていない。最大の問題点は、軟X線領域におけるX線の試料による吸収が大きいことで、硬X線を用いた実験と比較すると生体高分子のように水を含む試料ではX線損傷のおこる速度がおよそ二桁ほど早いことがあげられる。加えて、多くの吸収端が近接している (金属のL吸収端およびM吸収端、そして軽元素のK吸収端) ため、軽元素からのバックグラウンドシグナルの寄与が大きいこと、そしてX線の空気や溶媒による吸収が大きいこと、大気中や溶液中での測定が困難で測定環境を高真空状態に保つ必要があることなどの難しさがある。しかし、材料化学の分野では軟X線を用いた研究は幅広く行われており、金属タンパク質の研究分野においても軟X線領域のエネルギーを用いたX線分光法の潜在的可能性は高い。

われわれの共同研究グループでは、上記の問題点を克服して生体高分子中の3d遷移金属のL吸収端XANES実験の汎用性を広げることを目的として、XFELで応用可能なゾーンプレートを用いた分光器を作成した¹⁷。Fig. 3 (a)に示すように、溶液試料を液体インジェクターを用いてX線照射領域に導入し、そこから得られる蛍光シグナルをゾーンプレートからのマイナス一次反射を用いて二次元検出器で測定する。光化学系II複合体膜タンパク質の触媒反応中心であるMn₄CaO₅クラスターの例をあげると、そのMnからのL α 蛍光線 (637 eV) はタンパク質中の大部分を占める酸素原子のK α 線 (525 eV) が非常に大きなバックグラウンドになるため全蛍光収量TFY (total fluorescence yield) や全電子収量TEY (total electron yield) を用いたXAS測定は困難である。そこで、ゾーンプレートを用いて特定エネルギーの蛍光線を選択的に集光することで、バックグラウンドシグナルと目的とする元素からのシグナルを空間的に選別し、部分蛍光収量 (PFY, partial fluorescence yield) を用いたXAS測定を行うことができる。

LCLS SXR (Soft X-ray Research) ビームラインのモノクロメーターを用いて0.25 eV間隔でMnCl₂溶液のL_{III}及びL_{II}吸収端のスペクトル測定を行った例をFig. 3 (b)に示す。ゾーンプレートによってMnのL α とOのK α を区別する。ゾーンプレートのエネルギー分解能は20 eV程度で、grating (分解能0.2 eV) に比較するとかなり低い、金属タンパク質溶液のような本来金属濃度が非常に希薄な系

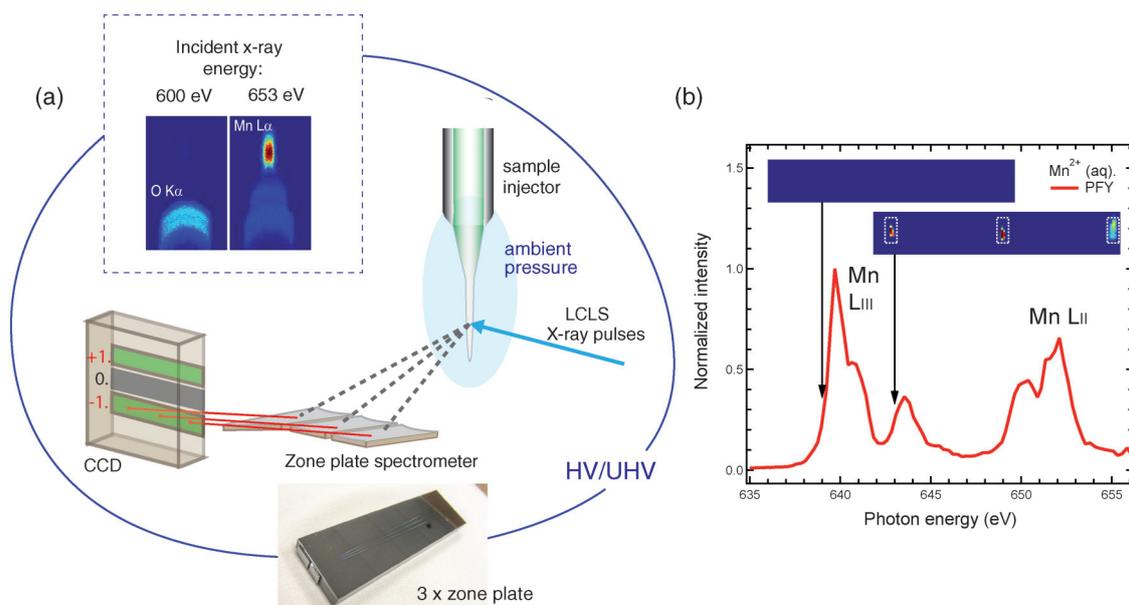


Fig. 3 (Color online) (a) Experimental setup of the high-transmission X-ray spectrometer for collecting Mn L-edge XAS using a liquid injector at XFELs. Inset (top) shows the CCD images of the fluorescence from a solid MnO sample as diffracted off one zone plate taken at an incident photon energy below (600 eV) and above the Mn L-edge (653 eV). The intensity is encoded in color: red high, blue low). (b) Mn L-edge spectrum of 500 mM MnCl₂ solution collected using a RZP (reflection zone plate) spectrometer (PFY, Partial Fluorescence Yield). Adapted from Mitzner *et al.*¹⁷⁾

の PFY を用いた X 線吸収スペクトル測定では、蛍光線の高エネルギー分解能は必要としない。一方で、たんぱく溶液中の Mn 濃度が ~1 mM 程度であるため、効率の良い集光が求められる。このような場合、gratings を用いるよりもバンド幅が大きく (gratings: 0.5 eV, HZP: 20 eV)、立体角が一桁から二桁大きいゾーンプレートの方が適している。

XFEL における軟 X 線を用いたこのような実験手法の確立は、L 吸収端 XAS の汎用性を広げるとともに、将来生体高分子系において、より高いエネルギー分解能が要求される 2p3d 共鳴非弾性 X 線散乱法などの実現につながる。

4. X 線回折と X 線分光法の同時測定

X 線回折パターンからは結晶構造に関する情報が、そして同時に X 線発光スペクトルからは金属部位の電荷状態や化学構造変化に関する情報が得られるが、金属タンパク質試料の場合、両者を同時測定すれば、タンパク質の動的立体構造解析と金属活性中心の化学変化を同じタンパク微結晶を用いて追跡することができる (Fig. 4)。我々のグループでは、本方法を用いてミクロンサイズの光化学系 II 複合体単結晶の X 線回折測定と XES の同時測定を行ない、水分解反応過程で現れる中間体の構造と化学的性質に関する研究を行っている^{10,15)}。植物やシアノバクテリアが行なう光合成による水分解反応は、チラコイド膜タンパク質である PSII のルーメン側に位置する触媒活性中心にお

いておこる。その活性中心は 4 つの Mn と 1 つの Ca が酸素架橋したクラスター (Mn₄CaO₅)、そしてリガンドであるカルボキシル基、ヒスチジル基及び水分子によって構成されている。水分解反応は、Mn₄CaO₅ クラスターが 5 つの反応中間体 S_n (n=0~4) を経る光駆動サイクル (Kok cycle) によっておこるが、n が大きいほどより酸化が進んだ状態を表す。PSII を暗順応させると S₁ 状態で安定化されるが、反応中心であるスペシャルペアクロロフィルの光誘起に伴って S₁ 状態は S₂, S₃ へと 1 電子ずつ酸化される。そして 3 回目の光照射後に寿命の短い過渡状態である S₄ を経て 1 酸素分子を遊離した後、S₀ 状態へ戻る。

Fig. 4 に示すように、液体インジェクターのガラスキャピラリーに装着した 3 つの光ファイバーと、1 つのフリースペースレーザーを組み合わせて使用することによってそれぞれの S 状態リッチな結晶、あるいは溶液試料を作成することができる。そして、XRD と XES の同時測定と可視光ポンプレーザーを組み合わせることで Mn₄CaO₅ の触媒反応機構とそれを可能にしているタンパク質の構造に関する情報が得られると期待される。

5. 今後の展望

XFEL は、今後さらに新規のタンパク質の構造解析、より高度な 2 次元 X 線分光法等への応用、そして生体高分子の動態変化を追う手法として発展することが期待される。現在様々な国で新たな XFEL の建設あるいはその計

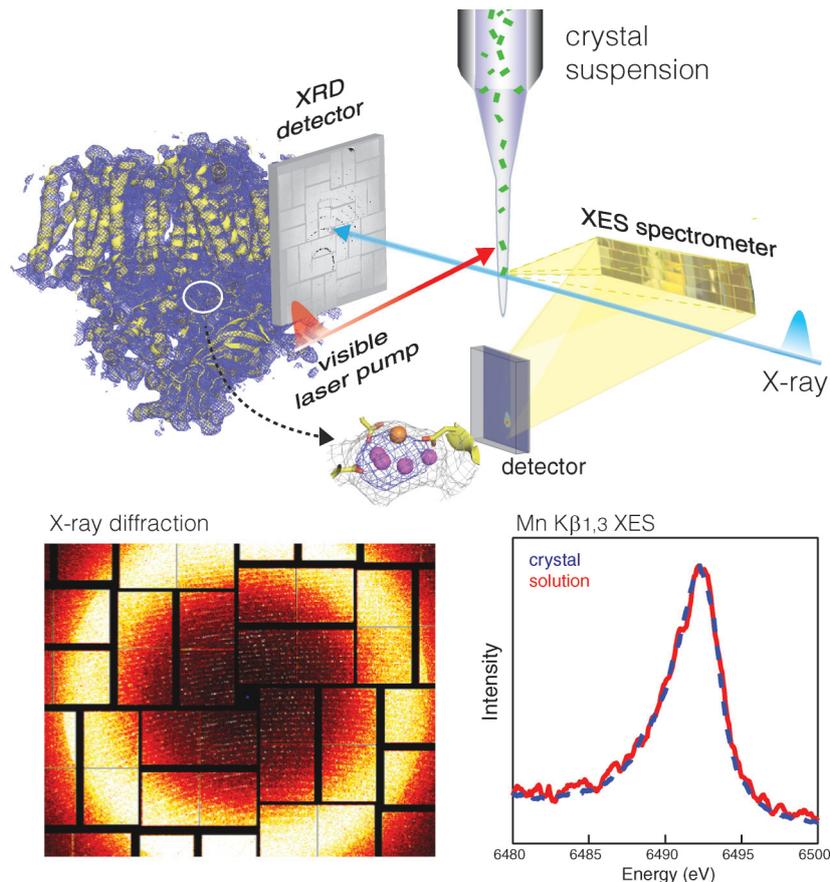


Fig. 4 (Color online) A. Simultaneous collection of X-ray diffraction data (downstream) providing overall structural information and X-ray emission spectra (at 90 degrees) using the wavelength-dispersive spectrometer providing electronic structure information of the metal site. Adapted from Kern *et al.*¹⁰ (Bottom left) An example of a diffraction image on the CSPAD. (Bottom right) XES spectra of PSII from solution and crystalline samples.

画が進んでいるが、近い将来、放射光 X 線のようにより汎用性の高い X 線源となるであろう。

参考文献

- 1) K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, M. Hatanaka, K. Muramoto, T. Kawahara, T. Tsukihara, E. Yamashita, K. Tono, G. Ueno, T. Hikima, H. Murakami, Y. Inubushi, M. Yabashi, T. Ishikawa, M. Yamamoto, T. Ogura, H. Sugimoto, J.-R. Shen, S. Yoshikawa and H. Ago: *Nat. Methods* **11**, 734 (2014).
- 2) M. Suga, F. Akita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, Y. Nakajima, T. Shimizu, K. Yamashita, M. Yamamoto, H. Ago and J. R. Shen: *Nature* **517**, 99 (2015).
- 3) H. N. Chapman, P. Fromme, A. Barty, T. A. White, R. A. Kirian, A. Aquila, M. S. Hunter, J. Schulz, D. P. DePonte, U. Weierstall, R. B. Doak, F. R. N. C. Maia, A. V. Martin, I. Schlichting, L. Lomb, N. Coppola, R. L. Shoeman, S. W. Epp, R. Hartmann, D. Rolles, A. Rudenko, L. Foucar, N. Kimmel, G. Weidenspointner, P. Holl, M. N. Liang, M. Barthelmess, C. Caleman, S. Boutet, M. J. Bogan, J. Krzywinski, C. Bostedt, S. Bajt, L. Gumprecht, B. Rudek, B. Erk, C. Schmidt, A. Homke, C. Reich, D. Pietschner, L. Struder, G. Hauser, H. Gorke, J. Ullrich, S. Herrmann, G. Schaller, F. Schopper, H. Soltau, K. U. Kuhnel, M. Messerschmidt, J. D. Bozek, S. P. Hau-Riege, M. Frank, C. Y. Hampton, R. G. Sierra, D. Starodub, G. J. Williams, J. Hajdu, N. Timneanu, M. M. Seibert, J. Andreasson, A. Rocker, O. Jonsson, M. Svenda, S. Stern, K. Nass, R. Andritschke, C. D. Schroter, F. Krasniqi, M. Bott, K. E. Schmidt, X. Y. Wang, I. Grotjohann, J. M. Holton, T. R. M. Barends, R. Neutze, S. Marchesini, R. Fromme, S. Schorb, D. Rupp, M. Adolph, T. Gorkhover, I. Andersson, H. Hirsemann, G. Potdevin, H. Graafsma, B. Nilsson and J. C. H. Spence: *Nature* **470**, 73 (2011).
- 4) D. P. DePonte, U. Weierstall, K. Schmidt, J. Warner, D. Starodub, J. C. H. Spence and R. B. Doak: *J. Phys. D Appl. Phys.* **41**, 195505 (2008).
- 5) R. G. Sierra, H. Laksmono, J. Kern, R. Tran, J. Hattne, R. Alonso-Mori, B. Lassalle-Kaiser, C. Glockner, J. Hellmich, D. W. Schafer, N. Echols, R. J. Gildea, R. W. Grosse-Kunstleve, J. Sellberg, T. A. McQueen, A. R. Fry, M. M. Messerschmidt, A. Miahnahri, M. M. Seibert, C. Y. Hampton, D. Starodub, N. D. Loh, D. Sokaras, T.-C. Weng, P. H. Zwart, P. Glatzel, D. Milathianaki, W. E. White, P. D. Adams, G. J. Williams, S. Boutet, A. Zouni, J. Messinger, N. K. Sauter, U. Bergmann, J. Yano, V. K. Yachandra and M. J. Bogan: *Acta Crystallogr. D* **68**, 1584 (2012).
- 6) M. Uervirojnangkoorn, O. B. Zeldin, A. Y. Lyubimov, J. Hattne, A. S. Brewster, N. K. Sauter, A. T. Brunger and W. I. Weis: *Elife* **4**, e05421 (2015).

- 7) N. Sauter: *J. Synchrotron Radiat.* **22**, 239 (2015).
- 8) R. A. Kirian, X. Wang, U. Weierstall, K. E. Schmidt, J. C. H. Spence, M. Hunter, P. Fromme, T. White, H. N. Chapman and J. Holton: *Opt. Express* **18**, 5713 (2010).
- 9) J. Hattne, N. Echols, R. Tran, J. Kern, R. J. Gildea, A. S. Brewster, R. Alonso-Mori, C. Glockner, J. Hellmich, H. Laksmono, R. G. Sierra, B. Lassalle-Kaiser, A. Lampe, G. Han, S. Gul, D. DiFiore, D. Milathianaki, A. R. Fry, A. Miahnahri, W. E. White, D. W. Schafer, M. M. Seibert, J. E. Koglin, D. Sokaras, T. C. Weng, J. Sellberg, M. J. Latimers, P. Glatzel, P. H. Zwart, R. W. Grosse-Kunstleve, M. J. Bogan, M. Messerschmidt, G. J. Williams, S. Boutet, J. Messinger, A. Zouni, J. Yano, U. Bergmann, V. K. Yachandra, P. D. Adams and N. K. Sauter: *Nat. Methods* **11**, 545 (2014).
- 10) J. Kern, R. Alonso-Mori, R. Tran, J. Hattne, R. J. Gildea, N. Echols, C. Glockner, J. Hellmich, H. Laksmono, R. G. Sierra, B. Lassalle-Kaiser, S. Koroidov, A. Lampe, G. Y. Han, S. Gul, D. DiFiore, D. Milathianaki, A. R. Fry, A. Miahnahri, D. W. Schafer, M. Messerschmidt, M. M. Seibert, J. E. Koglin, D. Sokaras, T. C. Weng, J. Sellberg, M. J. Latimer, R. W. Grosse-Kunstleve, P. H. Zwart, W. E. White, P. Glatzel, P. D. Adams, M. J. Bogan, G. J. Williams, S. Boutet, J. Messinger, A. Zouni, N. K. Sauter, V. K. Yachandra, U. Bergmann and J. Yano: *Science* **340**, 491 (2013).
- 11) C. Kupitz, S. Basu, I. Grotjohann, R. Fromme, N. A. Zatsepin, K. N. Rendek, M. S. Hunter, R. L. Shoeman, T. A. White, D. J. Wang, D. James, J. H. Yang, D. E. Cobb, B. Reeder, R. G. Sierra, H. G. Liu, A. Barty, A. L. Aquila, D. Deponte, R. A. Kirian, S. Bari, J. J. Bergkamp, K. R. Beyerlein, M. J. Bogan, C. Caleman, T. C. Chao, C. E. Conrad, K. M. Davis, H. Fleckenstein, L. Galli, S. P. Hau-Riege, S. Kassemeyer, H. Laksmono, M. N. Liang, L. Lomb, S. Marchesini, A. V. Martin, M. Messerschmidt, D. Milathianaki, K. Nass, A. Ros, S. Roy-Chowdhury, K. Schmidt, M. Seibert, J. Steinbrener, F. Stellato, L. F. Yan, C. Yoon, T. A. Moore, A. L. Moore, Y. Pushkar, G. J. Williams, S. Boutet, R. B. Doak, U. Weierstall, M. Frank, H. N. Chapman, J. C. H. Spence and P. Fromme: *Nature* **513**, 261 (2014).
- 12) J. Kern, V. K. Yachandra and J. Yano: *Curr. Opin. Struc. Biol.* **34**, 87 (2015).
- 13) R. Alonso-Mori, J. Kern, R. J. Gildea, D. Sokaras, T. C. Weng, B. Lassalle-Kaiser, R. Tran, J. Hattne, H. Laksmono, J. Hellmich, C. Glockner, N. Echols, R. G. Sierra, D. W. Schafer, J. Sellberg, C. Kenney, R. Herbst, J. Pines, P. Hart, S. Herrmann, R. W. Grosse-Kunstleve, M. J. Latimer, A. R. Fry, M. M. Messerschmidt, A. Miahnahri, M. M. Seibert, P. H. Zwart, W. E. White, P. D. Adams, M. J. Bogan, S. Boutet, G. J. Williams, A. Zouni, J. Messinger, P. Glatzel, N. K. Sauter, V. K. Yachandra, J. Yano and U. Bergmann: *P. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19103 (2012).
- 14) R. Alonso-Mori, J. Kern, D. Sokaras, T. C. Weng, D. Nordlund, R. Tran, P. Montanez, J. Delor, V. K. Yachandra, J. Yano and U. Bergmann: *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 073114 (2012).
- 15) J. Kern, R. Tran, R. Alonso-Mori, S. Koroidov, N. Echols, J. Hattne, M. Ibrahim, S. Gul, H. Laksmono, R. G. Sierra, R. J. Gildea, G. Han, J. Hellmich, B. Lassalle-Kaiser, R. Chatterjee, A. S. Brewster, C. A. Stan, C. Glockner, A. Lampe, D. DiFiore, D. Milathianaki, A. R. Fry, M. M. Seibert, J. E. Koglin, E. Gallo, J. Uhlig, D. Sokaras, T. C. Weng, P. H. Zwart, D. E. Skinner, M. J. Bogan, M. Messerschmidt, P. Glatzel, G. J. Williams, S. Boutet, P. D. Adams, A. Zouni, J. Messinger, N. K. Sauter, U. Bergmann, J. Yano and V. K. Yachandra: *Nat. Commun.* **5**, 5371 (2014).
- 16) S. Gul, J. W. D. Ng, R. Alonso-Mori, J. Kern, D. Sokaras, E. Anzenberg, B. Lassalle-Kaiser, Y. Gorlin, T.-C. Weng, P. H. Zwart, J. Z. Zhang, U. Bergmann, V. K. Yachandra, T. F. Jaramillo and J. Yano: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 8901 (2015).
- 17) R. Mitzner, J. Rehanek, J. Kern, S. Gul, J. Hattne, T. Taguchi, R. Alonso-Mori, R. Tran, C. Weniger, H. Schroder, W. Quevedo, H. Laksmono, R. G. Sierra, G. Y. Han, B. Lassalle-Kaiser, S. Koroidov, K. Kubicek, S. Schreck, K. Kunus, M. Brzhezinskaya, A. Firsov, M. P. Miniti, J. J. Turner, S. Moeller, N. K. Sauter, M. J. Bogan, D. Nordlund, W. F. Schlotter, J. Messinger, A. Borovik, S. Techert, F. M. F. de Groot, A. Fohlich, A. Erko, U. Bergmann, V. K. Yachandra, P. Wernet and J. Yano: *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 3641 (2013).

著者紹介



矢野淳子

Lawrence Berkeley National Laboratory,
Molecular Biophysics and Integrated
Bioimaging Division, Senior Scientist
E-mail: JYano@lbl.gov

専門：振動分光，生物物理化学，X線分光
【略歴】

広島大学生物圏科学研究科博士課程前期修了，広島大学生物生産学部助手，大阪大学理学部高分子学科論文博士（理学），Golda Meir Research Fellow, Lawrence Berkeley National Laboratory 研究員を経て現職。振動分光，生物物理化学。

X-ray spectroscopy and X-ray crystallography of metalloenzymes at XFELs

Junko YANO Molecular Biophysics and Integrated Bioimaging Division Lawrence Berkeley National Laboratory
1 Cyclotron Road, Berkeley, CA 94720, USA

Abstract The ultra-bright femtosecond X-ray pulses provided by X-ray Free Electron Lasers (XFELs) open capabilities for studying the structure and dynamics of a wide variety of biological and inorganic systems beyond what is possible at synchrotron sources. Although the structure and chemistry at the catalytic sites have been studied intensively in both biological and inorganic systems, a full understanding of the atomic-scale chemistry requires new approaches beyond the steady state X-ray crystallography and X-ray spectroscopy at cryogenic temperatures. Following the dynamic changes in the geometric and electronic structure at ambient conditions, while overcoming X-ray damage to the redox active catalytic center, is key for deriving reaction mechanisms. Such studies become possible by using the intense and ultra-short femtosecond X-ray pulses from an XFEL, where sample is probed before it is damaged. We have developed methodology for simultaneously collecting crystallography data and X-ray emission spectra, using an energy dispersive spectrometer at ambient conditions. In addition, we have developed a way to collect metal L-edge data of dilute samples using soft X-rays at XFELs. The advantages and challenges of these methods will be described in this review.