

BL41XU

構造生物学I

BL41XUはタンパク質結晶構造解析用の共用ビームラインで、光源であるSPring-8標準アンジュレータの持つ高輝度・高平行特性を活かして、高難度試料(600Åを超える超長格子結晶、 $\sim 10\mu\text{m}$ サイズの微小結晶など)の測定や、高精度な測定(高S/N比データ収集、0.8Å分解能を超える超高分解能解析など)を実現する為の整備や高度化を行っている。

1. 垂直集光ミラー・回折装置架台の更新

本ビームラインの集光光学系は、K/B配置の水平・垂直の両ミラーで構成されている。本光学系の経年劣化に伴う諸問題を改善するために2004年度から更新を行ってきたが、2006年夏季停止期間中の垂直集光ミラーの更新により完了した(図1)。本ミラーは水平集光ミラー同様にSi製でRhによりコートされている。あおり角は、アンジュレータの1次光使



図1 新垂直方向集光ミラー。

用時(6.5~17.5keV)は3.5mrad、3次光使用時(19.5~35keV)では1.5mradに設定している。この結果、試料位置で垂直方向 $70\mu\text{m}$ 、水平方向 $80\mu\text{m}$ まで集光できることを確認した。これにより、試料位置での光子数、光子密度が上昇し、 $25 \times 25\mu\text{m}^2$ サイズで光子数 2.5×10^{11} photons/sec、光子密度 4.0×10^{14} photons/sec/ mm^2 を達成することができた。

また、同期間中に回折装置架台を新設計のものに更新した(図2)。回折計本体と検出器搭載部を分離して2つの検出器に個別の架台を導入した結果、検出器の切り替えは架台自体を交換する形態となったため、リスクや時間のコストが軽減した。また、歪みがなくなったことで回折計全体が高い位置再現性及び駆動精度を有するようになった。

2. 吸収線量に基づくタンパク質結晶試料の放射線損傷評価

高輝度放射光を利用したX線回折測定では、結晶試料の放射線損傷により構造決定が不能となる現象がしばしば見られる。その詳細なメカニズムは明らかになっていないが、試料のX線吸収によって共有結合が解離し、それによって発生した反応性電子(ラジカル)が周辺の共有結合や水分子を励起させる反応が連鎖して、格子を形成する分子間相互作用を破壊して結晶性を低下させることが原因と考えられている。現在、世界の放射光施設を中心にして、このメカニズムの評価実験と吸収線量(Absorbed dose、単位: Gy = J/kg)に基づく議論が行われている。そこで我々は、6.5-33.0keVの間の複数のエネルギーで測定を行い、放射線損傷に対する測定エネルギーの効果に関して吸収線量に基づく評価を行った[1]。



図2 新回折装置架台。

左はCCD検出器使用時で、右はIP検出器架台。

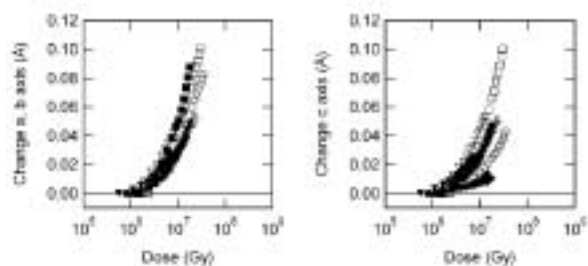


図3 格子定数の放射線損傷に伴う変化。全てのエネルギーで吸収線量の増加に伴い格子が長くなっていく様子が分かる。

試料位置でのビームサイズ $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ 、試料温度100Kに設定し、ニワトリ卵白リゾチーム結晶（サイズ $100 \times 150 \times 150 \mu\text{m}^3$ ）を用い、測定エネルギー毎に露光1秒、振動角 1° 、 180° 分を1データとして1つの結晶から12~15データセットを収集した。その結果、すべてのエネルギーで 10^6 Gy以上の吸収線量で、放射線損傷による変化が生じることが示された。また、結晶学的パラメータの変化に明確なエネルギー依存性は示されず、基本的に吸収線量に依存することが示された（図3）。4つのジスルフィド結合の構造についても、すべてのエネルギーで結合の解離が観測された（図4）。したがって、測定エネルギーに依存した放射線損傷の違いはなく、あくまで精密な構造を得るためには吸収線量を抑制したデータ収集が必要であると考えられる。

3. アンジュレータビームを利用した高度な測定法の開発

3-1 放射線損傷を考慮した微小結晶測定法の開発

2005年度後半から $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ サイズの微小ビームを利用して、 $25 \mu\text{m}$ 角程度の微小結晶（ニワトリ卵白リゾチーム結晶など）のデータ収集法の検討を開始している。これまでの結果から、試料結晶サイズが小さくなるほど放射線損傷の影響が致命的になることがわかっている。そこで、タンパク質結晶試料の吸収線量計算プログラムRADDOSE^[2]を利用して、吸収線量の予測限界値（ヘンダーソン限界）を目安に1フレーム当たりの露光時間を設定して実験を行った。その結

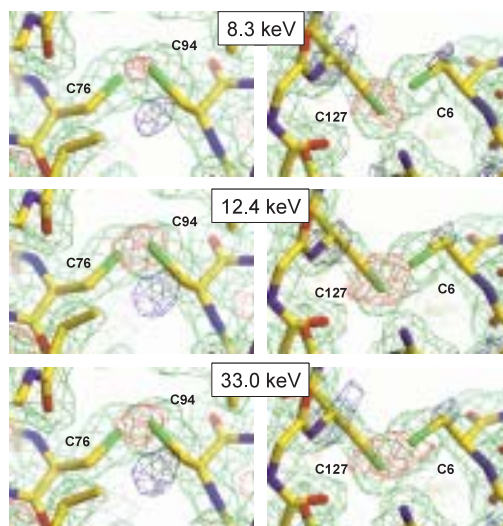


図4 典型的な3つの測定エネルギーにおける2.33 Å 分解能の電子密度図。観測された電子密度（緑色）にモデル構造を重ねている。黄緑色はイオウ原子でジスルフィド結合を形成しているが（損傷前）、損傷後の電子密度では負電荷（赤色）と正電荷（青色）が生じ、結合の解離が観測されている。

果、結晶学的統計値に明確な改善が見られたが、この方法では高い分解能の回折データが得られないという問題がある。そこで、位相決定が可能となる分解能の下限を検討するため、いくつかのSe-Met化タンパク質を用いて解析を行った。

最初に露光時間を短くしてデータを収集したところ、6つのサンプルにおいて3.0~3.9 Å という低い分解能でもSAD法での位相決定に成功した。一方、BL41XUには、測定ソフトウェアBSS^[3]に以前より連続測定中に結晶を一定方向に動かしてビーム照射位置を変更するツールが導入されている。そこで、放射線損傷を抑制しながら露光時間を伸ばすために、一定枚数毎に照射位置を2点以上変更しながらデータ収集を行った。その結果、先の6つのサンプルのいずれも分解能が向上しながら位相も決定した。うち1つに関しては $20 \times 20 \times 300 \mu\text{m}^3$ という結晶形状を活かし、露光時間を1秒から3秒に伸ばして360枚のイメージを60枚ごとの6箇所にてビーム照射して測定した（図5）。その結果、1箇所での1秒の露光では2.9 Å だった分解能が2.3 Å まで向上した。したがって、結晶形状

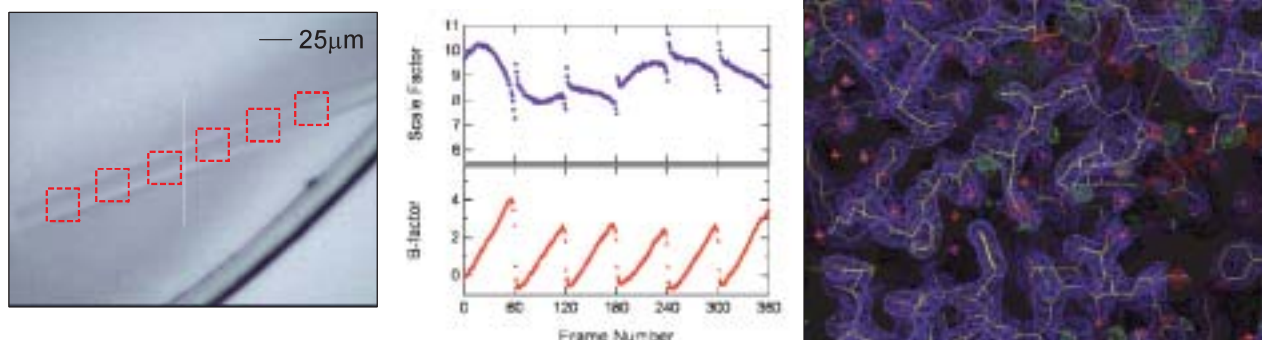


図5 $20 \times 20 \times 300 \mu\text{m}^3$ サイズの結晶の測定。左図のように $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ビームを60枚ずつ6箇所に照射して測定している。中心の図は強度のスケールリング時のスケール因子と温度因子の変化の様子を示している。60枚ごとに温度因子が下がっており、ビーム照射位置の変更が放射線損傷に対して有効な効果を示していることがわかる。右図は、初期位相決定後の2.3 Å 分解能の電子密度図。

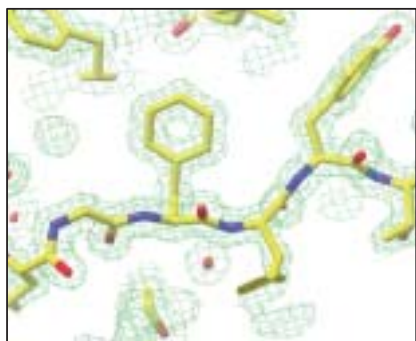


図6 測定波長0.9Å で位相決定されたウシインスリンの
2.1Å 分解能での電子密度図。

に依存するが、ビーム照射位置を複数設定することができれば、放射線損傷を抑制し構造決定に対して非常に有効であると考えられる。

3-2 硫黄原子の異常分散効果を利用したSAD法解析

近年、天然タンパク質中のシステインやメチオニンに含まれるイオウ原子の異常散乱効果を利用して、無修飾のネイティブ結晶から単波長での回折実験で位相を決定するS-SAD法が注目されている。しかし、イオウは軽原子であり、かつX線吸収端がかなり長波長（K吸収端：5.02Å）にあるため、放射光BLで利用可能な波長領域（1.9～0.7Å）では、その異常散乱シグナルは非常に小さい。そのため、放射光BLでS-SAD法を行うことは難しいとされてきた。BL41XUは非常に高いSN比で回折データ収集が行えるBLである。そこで、本BLで、どの波長領域までS-SAD法が適用できるか検討するため実験を行った。

ウシ由来インスリン結晶（I213、 $a=78\text{Å}$ ）を用いて、波長0.71、0.90、1.10、1.30、1.50、1.70、1.90Å、露光時間1秒/フレームで回転角360°分のデータセットを収集した。得られた各波長の回折データ（分解能範囲50～2.1Å）について、プログラムHKL2MAP^[4]（SHELXC・D・E^[5]）を用いてイオウ原子の位置決定と電子密度修飾による位相改良を行い、プログラムARP/wARP^[6]による自動モデル構築を試みた。その結果、0.90Å以上の波長において、1データセット（回転角360°分、冗長度～20）でS-SAD法により位相が決定し、N・C両末端残基以外のほとんどの残基を側鎖も含めて自動構築することができた（図6）。この結果は、従来の「放射光BLでS-SAD法を行うことは難しい」という常識を覆し、BL41XUにおける回折データの高いS/N比を証明していると考えられる。

4. 最後に

BL41XUはSPring-8におけるタンパク質結晶構造解析分野のフラッグシップビームラインであり、その高度な利用を実現するために、BL担当者のみならずJASRI構造生物グループ、制御・情報部門、光源・光学系部門、理化学研究所

研究技術開発室のメンバーがその性能の維持と高度化に寄与している。また、図5で示した結果は、理化学研究所放射光システム生物学研究グループとの共同研究である。

- [1] Shimizu, N. et al. (2007) J. Synchrotron Rad. 14, 4-10.
- [2] Murray, J. W. et al. (2004) J. Appl. Cryst. 37, 513-522.
- [3] Ueno, G. et al. (2005) J. Synchrotron Rad. 12, 380-384.
- [4] Pape, T. et al. (2004) J. Appl. Cryst. 37, 843-844.
- [5] Sheldrick, G. et al. (1997) Methods Enzymol. 277, 319-343.
- [6] Perrakis, A. et al. (1999) Nature Struct. Biol. 6, 458-463.

利用研究促進部門 構造生物グループ 結晶構造解析チーム

清水 伸隆、河本 正秀、長谷川和也、酒井 久伸
岡崎 伸生、熊坂 崇、山本 雅貴