

生命科学領域

三浦 圭子、足立 伸一、梅谷 啓二

平成12年4月より、以下の3研究開発課題について実行してきた。その研究目的および活動報告を各研究リーダーより行う。それぞれSPring-8サイトの3機関(原研・理研・JASRI)が連携して実行するに適したものとなっており、各課題とも活動初年度にも係わらず、生命科学分野での先端の利用技術の開発の成果に繋がるものが多い。その成果が生命科学関係のビームライン・実験ステーションへの新機軸の機器導入などへ近い将来繋がることが期待される。

研究開発課題名	研究リーダー
(1) 実時間タンパク質結晶構造解析法の研究	三浦圭子(JASRI)
(2) タンパク質機能の時間分解X線解析法の研究	足立伸一(理研)
(3) 高分解能X線バイオ・イメージング法の研究	梅谷啓二(JASRI)

1. 実時間タンパク質結晶構造解析法の研究

研究組織

- 三浦圭子 (JASRI)
統括および結晶構造解析
- 勝部幸輝 (JASRI)
結晶構造解析ソフトウェアシステム開発
- 河本正秀 (JASRI)
結晶構造解析データ収集および構造解析
- 濱田賢作 (島根大学、理研兼務)
同上およびソフトウェアシステム開発
- 倉光成紀 (大阪大学、理研兼務)
結晶解析用蛋白質サンプル供給

研究開発の目的

実時間 X 線結晶構造解析法 (Real Time Protein Crystallography System, 略称 RTPC システム) として、蛋白質 X 線結晶構造解析で利用される各種のソフトウェアおよびハードウェアを有機的に結合させて構築する高速簡便構造解析のための統合システムを作成することを目的とする。今後構造解析情報が更に重要な意味を持つてくる構造生物学分野でのシンクロトン放射光利用について、大きく貢献することを期待する。

活動状況

1) 実時間解析ソフトウェア開発

勝部らにより数年間構築してきた、Windows版 RTPCソフトウェアが完成した。位相決定法として Phases baseのMIR, SIRAS等がWindowベースに操作しやすい環境で構築された。濱田らによる自動分子置換システム AMR-Web (PDB or Swiss Modellによる Model 構築、Amore and/or EPR による位相計算を含む)も組み込むことが可能となった。これにより、新規構造解析の位相計算、および、類似構造が想定される蛋白質分子でも困難であった位相決定、いずれに

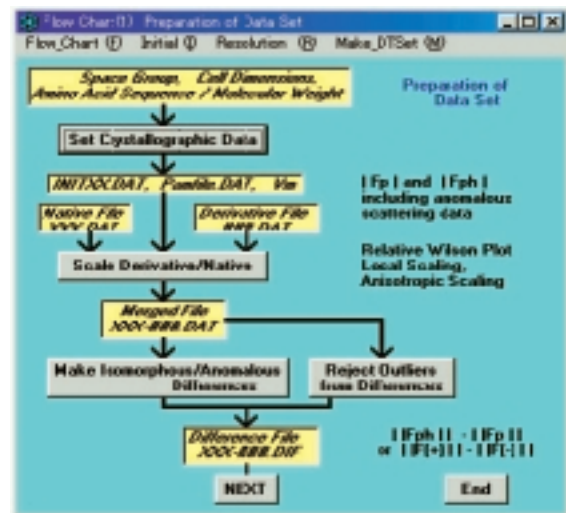


Fig. 1

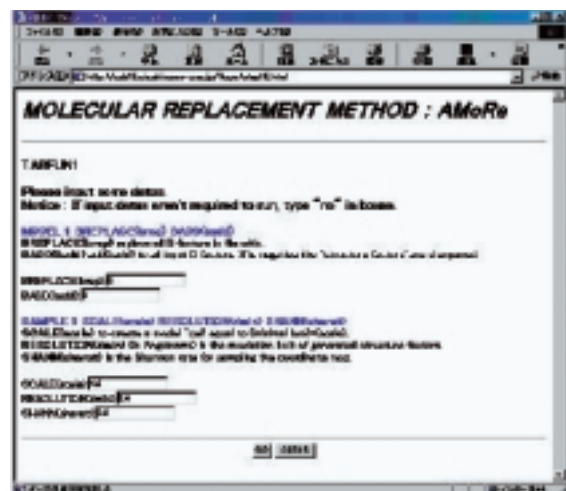


Fig. 2 AMR-Webの一部

いても迅速な計算システムが統合された。合わせて、MAD位相決定および電子密度表示もビームラインPCで出来ることを目的とし、X線回折データ測定中に収集データによる構造解析可能性評価が出来るようにインストール準備を行った。

2) 構造解析計算システム整備

平成12年後半のR&DビームラインBL38B1での蛋白質結晶解析データ測定システムの立ち上げが完了し、ビームライン近隣での迅速計算システムを増強する目的で実験ハッチ横に解析計算機器を一台増設した。リング棟外周のBL38B1側室に解析計算機器を3台設置し、特に時間を要する電子密度による立体構造解釈を複数のテーマで同時に出来るように整備した。計算機はCPU Pentium 800 MHz以上、OSはLinux red hat 6.2 (E)とした。

3) 評価データ測定および構造解析実績

整備するソフトウェアシステムによる評価データを入手する目的で、倉光らストラクチュローム研究グループにより大量発現および精製された蛋白質サンプルについて、濱田らにより結晶化検討を行った。

平成12年度初旬に受け取った12種類の蛋白質についてはいずれも結晶作成は成功し、その中で2.8 以上のX線回折データが得られたものは7蛋白質結晶であった。Se-Met化蛋白質が5月末までに得られた分子量約45,000の蛋白質については、BL40B2で測定したMADデータを利用し位相決定を行い、1.5 分解能までの構造精密化が成功した。他に分子置換法による解析が成功し1.9 分解能までの構造精密化が成功したものもある。これらは、構造ゲノム科学国際会議 I C S G 2000 (平成12年10月) で発表する機会を得た。

いずれの構造解析計算においても、上記 2) で計算機器を導入する前に使用していたワークステーションでの処理時間と比較して、1/3程度のCPU timeで迅速に計算処理出来るようになってきた。

4) 凍結結晶作成システム導入

クライオ結晶の効率的供給によるビームタイム有効活用も考慮し、オフラインでの凍結結晶作成装置を導入した。冷却室素吹付け装置に瞬間凍結結晶作成用に倒立型ゴニオを使用することで、凍結・回収・保存を一括して実施できるシステムとした。結晶のカメラモニタ像をまとめて結晶像データベース作成を予定する。液体窒素30リットル容量の大量凍結結晶保存容器の整備も行った。

これにより、結晶生成時からデータ測定時までの期間が長い場合に結晶性が損傷してくることもあった結晶についても、迅速凍結による結晶有効活用の整備を行ったことになる。

(三浦 圭子)

2. タンパク質機能の時間分解X線解析法の研究

研究組織

足立伸一 (理研)

光反応性タンパク質結晶の時間分解結晶回折測定

八木直人 (JASRI)

筋収縮の分子機構に関する時間分解X線回折測定

岩本裕之 (JASRI)

筋収縮の分子機構に関する時間分解X線回折測定

井上勝晶 (JASRI)

BL40XUの整備、高度化と利用

岡 俊彦 (JASRI)

光受容体タンパク質の2次元膜の時間分解回折測定

加藤博章 (理研)

光反応性タンパク質結晶の時間分解結晶回折測定

研究開発の目的および背景

SPring-8の高フラックスビームラインBL40XUを利用し、タンパク質結晶、タンパク質溶液、2次元膜、筋肉組織などの生体試料中でサブナノ秒以上の時間領域で生じる過渡現象を、時間分解X線回折法、X線散乱法により計測する方法を開発することを目的としている。BL40XUはアンジュレータ1次光を分光することなく高フラックス準単色光として利用できる世界でも類を見ないビームラインであり、この特長を生かして生体試料を利用した時間分解測定法を展開することを目指している。

活動状況

BL40XUでは1999年度にコミッショニングを終え、2000年4月よりユーザー共用モードが開始された。これに伴い、非晶質試料(筋肉組織、光受容体タンパク質の2次元膜など)と結晶試料(光反応性タンパク質など)の2種類の試料に分けて、時間分解X線散乱、回折実験装置の整備と利用実験を開始した。非晶質試料の実験については、イメージインテンシファイア付高速CCD検出器、高速回転式シャッター、パルスレーザーを組み合わせ、蓄積リングのフルフィルモードを利用して露光時間約5マイクロ秒で回折イメージを取得するシステムが構築された。紫膜や筋肉繊維などの試料を用いた時間分解実験が既に開始され、成果を上げつつある。

結晶試料については、高速読み出し型CCD検出器を用いて、露光時間約5マイクロ秒で回折データセットを収集した場合のデータの統計精度について検討を開始した。標準結晶としてリゾチーム結晶を用いた場合、BL40XUの準単色X線を用いても、他のビームラインで単色X線を用いて測定した場合とほぼ同程度の統計精度を持つ回折データが得られることを確認した。今後はさらにパルスレーザーを組み合わせたポンプ プローブ実験を展開することを目指している。

時間分解X線回折実験装置整備のために、2000年度は

回折実験用の実験定盤、ゴニオメータ、コリメータ等を購入した。また蓄積リングのRFクロックと同期した実験を見越して、RFクロックの分周モジュール、RFアンプ、ケーブル等を購入した。今後の整備計画としては、高速回転シャッターを高度化し、RFクロックを分周した信号に対してフェーズロックできる回転シャッターの導入を予定している。この高速回転フェーズロックシャッターは最高900Hzで回転するシャッターであり、チタン合金製の三角形回転ディスク、磁気ベアリング式モータ、フィードバック制御回路からなる。900Hz回転時の1回転あたりのシャッター開時間は約0.6マイクロ秒、基準クロックに対するジッターは±10ナノ秒以下である。このシャッターを使うと、例えば508.58MHzのRFクロックを $2436 \times 240 = 584640$ 分周したクロック(870Hz)と同期してシャッターを回転させることにより、蓄積リング240周回に1回、約0.6マイクロ秒間のX線を取り出すことができる。蓄積リングの周回時間4.79マイクロ秒のうち、0.6マイクロ秒に相当する部分だけシングルパンチにした場合、シングルパンチの時間幅に相当するX線パルスを用いたポンププローブ実験が可能になる。2001年度以降、この高速回転フェーズロックシャッターを利用したピコ秒～サブナノ秒領域での時間分解X線回折実験についても整備を進める。

(足立 伸一)

3. 高分解能X線バイオ・イメージング法の研究

研究組織

梅谷啓二	(JASRI)	イメージング装置の開発
山崎克人	(JASRI)	撮影画像の臨床医学的な評価
上杉健太郎	(JASRI)	X線画像検出器の開発
香村芳樹	(理研)	X線顕微鏡の開発
今井茂樹	(川崎医大)	撮影画像の臨床医学的な評価
山下武則	(川崎医大)	標本作製と動物実験
前原信直	(川崎医大)	標本作製と動物実験

研究開発の目的

10μm程度以下の生体組織構造のX線による画像化を目的として、静止および動態画像用の分解能5μm程度のX線バイオ・イメージング装置を開発する。そして、悪性腫瘍の増殖に伴う10～100μm径の新生血管を画像化する方法を確立し、悪性腫瘍早期発見や新たな癌治療法などについて検討する。また、高分解能検出器を光学顕微鏡と組み合わせ、光学顕微鏡観察に並ぶX線での分解能1μm程度を達成し、細胞レベルの生体構造の画像化を目的とした予備実験を行う。

活動状況

1) 腫瘍増殖と新生血管構築の相関の観察

腫瘍組織は周辺の正常組織に比べて増殖力が強く、正

常組織に比べて血液からの多くの栄養や酸素の供給を必要とする。このため腫瘍組織は自分自身への血液供給量を増すため、周辺組織の血管を腫瘍組織まで延ばす新たな血管系の形成を促したり、腫瘍組織回りの既存の微小血管に作用して、その血管径を増大させるなどの作用を行う。

このような血管は腫瘍血管と呼ばれ、腫瘍組織を取り囲むように特徴的な形態を持つ。微小血管造影の目的の一つは、特異的な腫瘍血管の画像化により、癌を初期段階で診断することである。また、腫瘍を移植した動物での実験で、腫瘍の増殖過程や、治療での腫瘍の消滅過程を画像化し、癌治療に関する研究にも用いる。

固定標本は、ウサギ耳介にVX2腫瘍細胞を移植し4日後に、バリウム造影剤を耳介動脈に注入した後でウサギを安楽死させ、耳介を切り取りホルマリン固定する方法により作製された。医学利用実験施設のBL20B2の

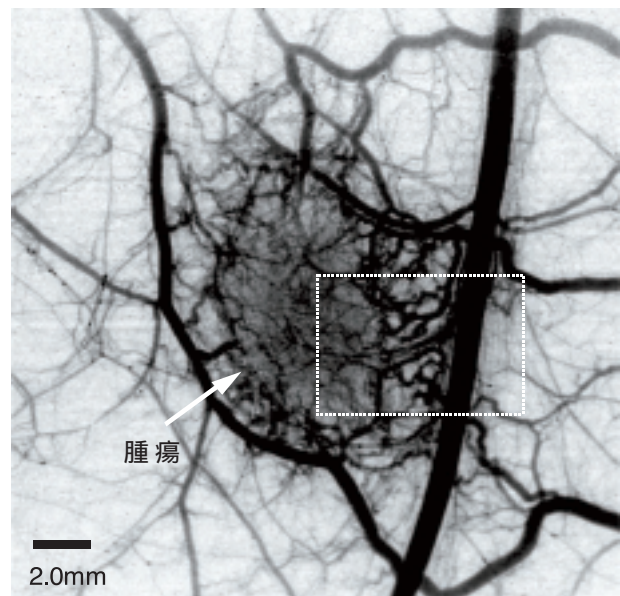


図1 画素サイズ24μmでの固定標本腫瘍血管

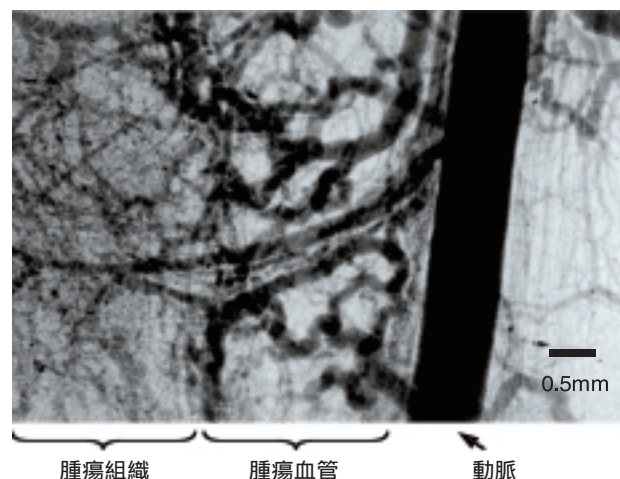


図2 画素サイズ6μmでの腫瘍血管画像

実験ハッチ3で撮影した固定標本の画像を図1に示す。画像検出器は、蛍光板でX線像を可視光像に変換し、これを光学レンズによりCCDカメラで撮影する方式の装置である。X線画像上での画素サイズは24 μm であり、空間解像度もこの程度である。単色X線のエネルギーは、バリウムの吸収端直上の37.6keVに設定し、スリットを調整してX線ビーム断面を20mm角とした。

さらに、図1の長方形点線で囲まれた部分を、X線画像上での画素サイズが6 μm で、さらに高解像度な蛍光板・CCD検出器で撮影した画像を図2に示す。この画像では、腫瘍組織、腫瘍血管領域、動脈右側の正常組織などの状態が鮮明に画像化されている。このような高画質の画像ならば、腫瘍の増殖過程や、治療での腫瘍の消滅過程の時間変化を画像化することができ、癌治療のための研究に役立てることができる。

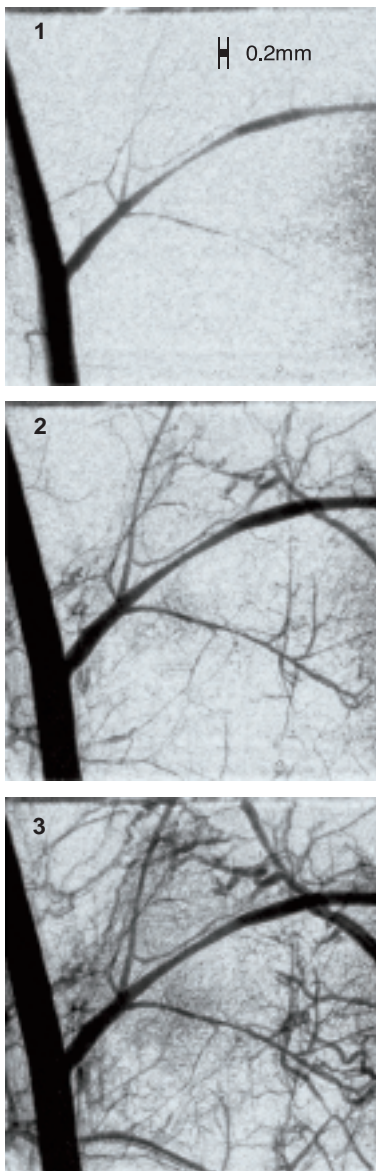


図3 VX2腫瘍細胞を移植後7日目のウサギ耳介での微小血管造影による血流動態観察

続いて、腫瘍移植動物の動態画像観察の予備実験を行った。画像検出器としては、X線直接検出型撮像管を使ったビデオカメラを用いた。図3は、ウサギ耳介動脈からヨウ素造影剤を注入したときの撮影画像で、露光時間0.4秒で0.8秒間隔の時間変化を示している。空間解像度10 μm 程度での撮影により、直径30~40 μm の血管の構築が動態で画像化できた。高解像度動態画像撮影は、生体での腫瘍血管の観察において非常に有効な手段である。

2) 高分解能検出器と光学顕微鏡の組み合わせによる高分解能化

高分解能検出器を光学顕微鏡と組み合わせ、分解能1 μm 程度を達成するための方式検討を行った。透明単結晶シンチレータでX線像を可視光像に変換し、可視光像を顕微鏡の対物レンズによりCCDカメラに結像する方式のX線画像検出器を開発した。蛍光体を使った従来の蛍光板では、蛍光体粒子による蛍光の拡散で解像度が低下するが、透明シンチレータならば光の拡散がなく高解像度化が達成できる。幅3 μm でピッチ17 μm の1500番メッシュの撮影結果から、空間解像度5 μm を越える高解像度での画像撮影が達成できた。この方式で1 μm 程度の解像度も達成できると考えられる。

(梅谷 啓二)