

利用系グループ活動報告

JASRI 回折・散乱推進室 回折構造生物チーム

(公財) 高輝度光科学研究センター

回折・散乱推進室 回折構造生物チーム 長谷川 和也、馬場 清喜

Abstract

回折・散乱推進室 回折構造生物チームは、共用の生体高分子結晶解析ビームラインBL41XUの高性能化・利用支援と、理研ビームラインBL26B1の共用枠の利用支援を行っている。同じく生体高分子結晶解析ビームラインであるBL45XUが自動測定に特化しているのに対し、BL41XUでは、自動測定を含む通常のデータ測定に加え、遠隔実験、室温での測定や顕微分光と組み合わせた回折実験など、自動では難しい実験を行うことができる。ビームラインの高性能化として、室温構造解析と時分割構造解析を中心に、タンパク質の構造ダイナミクスに関わる回折データ測定のための技術開発を進めている。時分割構造解析では、SACLAと相補的に利用できる環境の構築が重要であり、SACLAと連携して整備を進めている。

1. はじめに

回折・散乱推進室 回折構造生物チームは、共用ビームラインBL41XUの利用支援と理研ビームラインBL26B1の共用枠の利用支援を行っている。また、高性能化においては、近年多岐にわたる生体高分子の構造研究のニーズの中で、室温構造解析と時分割構造解析の2つに対して重点的に測定技術の開発を進めている。本稿では、これらのビームラインの運用と高性能化について紹介する。

2. ビームラインの運用・利用支援

BL41XUには実験ハッチが2つあり、下流側にある実験ハッチ2は波長0.7~1.9 ÅのX線を用いた回折実験（通常モード）に、また上流の実験ハッチ1は波長0.35~0.6 ÅのX線を用いた回折実験（高エネルギーモード）に利用されている。通常モードでは最小5 μmのマикроビームが利用でき、数μmの微小結晶からの回折データ測定も可能である。自動測定・遠隔実験を含む凍結結晶を用いた通常のデータ測定に加え、室温での測定や紫外可視顕微分光法と組み合わせた回折実験など、自動では難しい回折実験を行うことができる（図1）。高エネルギーモードでは、この領域に吸収端をもつ元素の位置の決定や、分解能0.8 Åを超えるような超高分解能での構造解析^{[1][2]}などに利用されている。このような高エ

ネルギーX線を用いた回折実験ができる生体高分子結晶解析ビームライン（MXビームライン）は国内ではBL41XUだけであり、世界的にも珍しい。



図1 BL41XU実験ハッチ2の回折計

BL26B1では、偏向電磁石BLの自由度を活かし、室温測定や汎用的な高分解能測定などに対応している。活性部位の化学状態を同定するための紫外可視顕微分光法と組み合わせた回折実験も可能である。また、我々の技術開発にも利用されており、後段で紹介する紫外可視顕微分光装置やプレート回折装置^[3]はここで開発され、BL41XUに導入された。

これらビームラインの性能諸元は次のサイトを参照されたい。

http://stbio.spring8.or.jp/ja/blinfo/SPring8_PX_beamlines.pdf

3. ビームラインの高性能化

放射光ビームラインにおけるタンパク質結晶の回折データ測定は、多くの場合、X線照射損傷を低減するために結晶を100 Kの極低温に冷やし、凍結状態で行う^[4]。しかしながら、タンパク質によっては凍結状態と非凍結状態で活性部位の構造が異なるという報告もされており^[5]、ここ十年来、室温での構造解析が注目されている。また、結晶構造解析で得られる構造は、タンパク質の働く過程で存在する状態のうちの一つを捉えたものであることが多い。実際には生体中ではタンパク質は大きく構造変化しており、その変化（構造ダイナミクス）が機能発現に重要である。そこで、このような構造ダイナミクスに関わる構造解析を行う環境をBL41XUに構築するため、室温構造解析と時分割構造解析を中心に高性能化を進めている。

(1) 室温構造解析

室温での測定では、環境変化に敏感な非凍結状態の結晶を、データ測定中にいかに品質を保持するかが重要になる。そのための手法として、Humid Air and Glue-coating method (HAG法)の開発を進めてきた^[6]。この手法は、ポリビニルアルコール (PVA) などの水溶性ポリマー溶液で包埋した結晶に調湿気流を吹き付けることで非凍結状態で回折実験を行う我々独自の手法である。この手法を用いた癌関連タンパク質H-Rasの室温構造解析では、閉じた状態のH-Rasの結晶の湿度を変えたところ開いた構造が捉えられている^[7]。また、気流の湿度を保ちながら温度を変えることも可能であり、様々な温度で回折データを測定することができる^[8] (図2)。このような手法はMulti-temperature crystallographyと呼ばれ、温度変化に伴う平衡状態の遷移で現れる新たな構造を捉えることが可能である^{[9][10]}。現在、さらに別の物理パラメータを変えながら回折実験を行う技術開発も進めており、ユニークな技術として新規ユーザーを取り込むことが期待される。

室温測定のもう一つの手法として、プレート回折法の高性能化も進めている。プレート回折法は、タンパク質の結晶を析出させた結晶化プレートに入っ

たままX線を照射し、回折データを測定する手法である^[3]。室温での構造解析という目的に加えて、ループで扱うという結晶ハンドリングがない利点を生かした回折実験の効率化・自動化のために開発を進めてきた。2025A期にBL41XUへのプレート回折計の実装が完了し、現在、関連構造生物チームと連携して本手法の自動化を進めている。

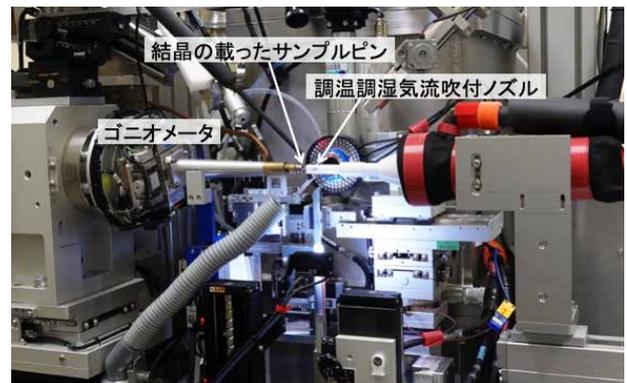


図2 HAG法を用いた室温での回折実験

(2) シリアル結晶解析法による時分割構造解析

シリアル結晶解析法は、X線上に逐次搬送される微小結晶にX線を照射して回折データを取得する方法であり、SACLAなどのXFEL施設で開発された。その成功を受けて、放射光のMXビームラインでも行われるようになり、Serial Synchrotron Crystallography (SSX) と呼ばれている^[11]。BL41XUでもSerial Synchrotron Rotation Crystallography (SSROX) や、それをHAG法と組み合わせたHAG-SSROXなど、微小結晶解析法の改良を進めてきた^{[12][13]}。ここで培った測定技術を発展させる形で、2種類のシリアル結晶解析法による時分割構造解析環境の構築を進めている。

一つはXFEL施設のSerial Femtosecond Crystallography (SFX) で使われているインジェクターを用いる方法である。インジェクターから射出される微小結晶にX線を照射して回折データを測定する手法であり、反応を開始する励起レーザーと組み合わせることで時分割測定を行う。放射光では露光時間がミリ秒オーダーになることからSerial Millisecond Crystallography (SMX) と呼ばれ、海外ではSFXと組み合わせた構造解析も行われている^[14]。我々もSACLAのSFX実験で実績のある高粘度媒体インジェクター^[15]をBL41XUに導入し、

東北大学の南後教授のグループと連携して立ち上げを進めている。既に励起レーザーの整備やタイミング制御系の構築は終わり、光受容タンパク質の時分割測定を進めており、構造変化を捉えつつある。

もう一つは固定ターゲット法である。この方法では、テーパ状の穴が数万個あいたシリコン製のサンプルチップに結晶をトラップし、あらかじめ計算した穴の位置を高速でX線光軸上に逐次移動しながら回折データを取得する^[16]。サンプルチップへの微小結晶の搭載手順の確立や、高速で移動しながら結晶にX線を照射するための制御系の準備が完了し、静的な実験ではあるものの試験的なユーザー利用を開始した(図3)。反応のトリガーとして、タンパク質と反応する化合物(基質)を結晶に添加する方法の開発を進めており、これまでにサンプルチップの動きに同期してインクジェットで基質の液滴を添加しながら回折データ測定を行う技術を確認している。2025B期に標準試料の結晶に基質を添加する実験を行う予定である。

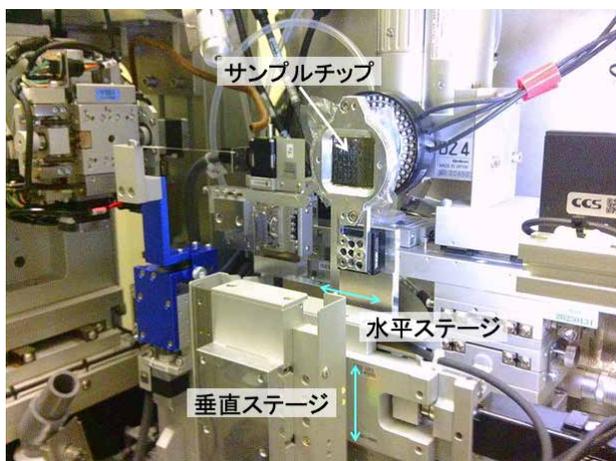


図3 固定ターゲット法による回折実験

(3) 測定試料準備室の整備

ここまで、室温構造解析・時分割構造解析に向けた高性能化について述べてきたが、従来の凍結法による構造解析も構造ダイナミクス研究において有効である。外場からの摂動もしくは反応開始のトリガーを与えた後、一定のディレイ時間後に結晶を凍結することで変化を起こしたタンパク質の構造を固定することができる。そのために、BL41XUのハッチの後方にプレハブ試料準備室を整備し、ワンク

リックで、レーザー照射、結晶の凍結、サンプルカセット(UniPuck)への試料の収納までを行うシステムを構築している。こうして準備した凍結結晶試料は、自動測定で回折実験を行うことができる。

また、この試料準備室には紫外可視顕微分光装置を整備し、結晶中のタンパク質の状態を分光学的に決定できるようにしている。これを使うことで、反応開始後の構造変化のタイムスケールの見積もりや、外場変化で生じる状態の決定を分光学的に行うことができる。なお、この顕微分光装置は非常にコンパクトに設計されており、BL41XUの回折計にも設置でき、回折実験を行いながら結晶中のタンパク質の状態を確認することにも使える。

4. 今後の展開

SPring-8-IIへのアップグレードが近づく中で、BL41XUではピンクビームを用いるためのビームラインの改造を提案している。これが実現すると、サブミリ秒の時間分解能の時分割構造解析も行えるようになりSACLAと相補的に利用する環境が整う。それに向けてこれまで以上にSACLAとの連携を強めて高性能化を進めてゆきたい。

構造生物研究を取り巻く環境は、クライオ電子顕微鏡(CryoTEM)による構造解析の普及や高精度構造予測プログラムの出現により10年前と様変わりしている。SPring-8キャンパスにもCryoTEMが導入され、結晶化の難しい膜タンパク質や超分子複合体など、いわゆる高難度試料の構造解析に利用されている。このような中で、良質な結晶が得られれば高い分解能で迅速に構造を決めることができることや、室温でも構造解析ができるという放射光X線結晶解析法の利点を生かした整備がMXビームラインには求められている。CryoTEMや自動化に特化したBL45XUを担当する相関構造生物チームと連携し、今後もSPring-8キャンパスの構造生物学研究に貢献していきたい。

謝辞

BL41XUへのSACLA高粘度媒体インジェクターやレーザーなどの導入にあたっては東北大学の南後恵理子博士、JASRIの登野健介博士、大和田成起博

士、理化学研究所の鈴木則広氏にご協力いただきました。固定ターゲット法の立ち上げにあたってはDiamond Light SourceのRobin Owen博士とSofia Jaho博士に大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

参考文献

- [1] K. Takaba *et al.*: *IUCrJ* **6** (2019) 387-400.
- [2] Y. Fukuda *et al.*: *Biochemistry* **63** (2024) 339-347.
- [3] H. Okumura *et al.*: *Acta Cryst. F* **78** (2022) 241-251.
- [4] J. W. Pflugrath: *Acta Cryst. F* **71** (2015) 622-642.
- [5] J. S. Fraser *et al.*: *Nature* **462** (2009) 669-673.
- [6] S. Baba *et al.*: *Acta Cryst. D* **69** (2013) 1839-1849.
- [7] S. Matsumoto *et al.*: *Sci. Rep.* **6** (2016) 25931.
- [8] S. Baba *et al.*: *J. Appl. Crystallogr.* **52** (2019) 699-705.
- [9] M. C. Thompson: *Methods Enzymol.* **688** (2023) 255-305.
- [10] T. Murakawa *et al.*: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **116** (2019) 135-140.
- [11] C. Gati *et al.*: *IUCrJ* **1** (2014) 87-94.
- [12] K. Hasegawa *et al.*: *J. Synchrotron Radiat.* **24** (2017) 29-41.
- [13] K. Hasegawa *et al.*: *Acta Cryst. D* **77** (2021) 300-312.
- [14] T. Weinert *et al.*: *Science* **365** (2019) 61-65.
- [15] Y. Shimazu *et al.*: *J. Appl. Crystallogr.* **52** (2019) 1280-1288.
- [16] A. Ebrahim *et al.*: *Acta Cryst. D* **75** (2019) 151-159.

長谷川 和也 HASEGAWA Kazuya

(公財) 高輝度光科学研究センター
 回折・散乱推進室 回折構造生物チーム
 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
 TEL : 0791-58-0833
 e-mail : kazuya@spring8.or.jp

馬場 清喜 BABA Seiki

(公財) 高輝度光科学研究センター
 回折・散乱推進室 回折構造生物チーム
 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
 TEL : 0791-58-0833
 e-mail : baba@spring8.or.jp