

シリアルフェムト秒結晶構造解析におけるテープ駆動型装置開発と 時分割実験への応用

東北大学 多元物質科学研究所

国際放射光イノベーション・スマート研究センター 南 後 恵 理 子

(国研) 理化学研究所 放射光科学研究センター 姜 正 敏

(公財) 高輝度光科学研究センター Luo Fangjia、登 野 健 介

Abstract

シリアルフェムト秒結晶構造解析では、無数の微結晶をX線自由電子レーザー照射域に送る方式が用いられ、試料消費量や時分割実験の観点で試料導入法が課題であった。我々は液滴による試料導入とテープ搬送を組み合わせた Compact Tape-Driven Sample Delivery System (CoT) を開発し、試料消費量を削減すると共に結晶を含む液滴を安定にX線照射域まで搬送することに成功した。また二液混合型時分割実験を行い、リゾチームへの阻害剤結合過程を観察した。本手法は、光感受性タンパク質のみならず、酵素や受容体など幅広いタンパク質の動的構造解析への応用が期待される。

1. はじめに

X線自由電子レーザー (XFEL) の登場は、タンパク質結晶構造解析を大きく変えたといっても過言ではないだろう。従来は、基本的に単結晶を用いて回折させながら回折像を取得していたが、XFELを用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX) では、複数の微結晶から回折像を取得して三次元構造を得る。複数の微結晶を使用する理由は、高強度のX線レーザーパルスにより結晶が損傷するため、測定には常に損傷を受けていない“新鮮”な結晶試料を供給する必要がある。SFX実験では、この試料導入方法が実験の鍵を握っており、ユーザーが最も苦勞する部分でもある。

今回、我々はSFXのためのテープ駆動型の試料導入装置を開発した^[1]。更に酵素に阻害剤を添加することで、活性部位に阻害剤が結合していく様子を捉えることにも成功した。本稿では本装置について紹介し、時分割実験への応用についても紹介する。

2. SFX実験における試料導入法とその課題

最初のSFX実験で使用された方法は、液体ジェット法である^[2]。この方法は微結晶を緩衝液に高い濃度で懸濁し (10^{7-8} 個/mL)、50-100 μm 程度の直径

のガラスキャピラリーから高流速で流す方式である。試料や結晶化条件に依存するが、このような高濃度の結晶懸濁液を調製するには、1 mL 当たり 10~20 mg 程度のタンパク質を必要とする。数 μm に集光され、高い繰り返し周波数で照射される XFEL に効率良く結晶が当たるようにするために最も容易な方法として用いられてきた。しかし、細いノズルから連続して流すためには、数 10~数 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ といった流速が必要である。測定時間は結晶が XFEL に当たる率 (ヒット率) に依存し、ヒット率が高すぎても回折点が重なり指数付けが困難になるため、最大でも 60%、概ね 20~30% で測定される。結晶の空間群にもよるが、構造解析には概ね 1 万枚の回折像を必要とするため、XFEL が 30 Hz の場合は 20 分程度で 1 データセットを取得できる。測定試料量を減らすためにシースガスによって溶液の流れを絞ることでより流速を抑えることも行われているが、試料消費量が数 100 mg ~ 数 g にも及ぶ。従来の X 線結晶構造解析で用いられるタンパク質の量は概ね数 mg であることを思うと、タンパク質結晶をこのようなスケールで調製することはなく、実験実施が容易ではない。また、連続的な試料導入方法では、パルス間の XFEL が照射されない時間でも (SACLA

では典型的に33 ms)、試料は流れ続けるため、その間の試料は浪費されることになる。

次に登場した試料輸送方法は、膜タンパク質の結晶化で用いられる脂質（モノオレイン）^[3]やグリースなどの高粘度媒体^[4]を用いた方法である。この場合は、数100 nL/min程度の低流速でも試料を連続的に流すことが可能であり、試料消費量を大幅に抑えることができる。一方で、媒体を結晶に添加することで回折能に影響を与えることもあること、バックグラウンドノイズの高さ、光励起による時分割実験では、媒体の光透過性の低さが励起効率を低下させるなどの課題があった。

そんな中で次にSACLAで開発されたのは、真船らによる液滴インジェクターであった^[5]。緩衝液に懸濁させた微結晶をピエゾ素子によるpL単位の液滴として吐出し、XFELに同期させて「不連続」に試料を導入することで試料消費量を激減させることに成功した。しかし、この方法にも弱点はあった。例えば、高速で吐出される微小の液滴に集光したXFELを照射するのは、結晶サイズのばらつきや結晶が沈殿することによる溶液中の結晶密度などに左右され、容易ではなかった。また、液滴は数10 m/sで移動するため、ポンプ光による励起を行った場合に遅延時間を長くすることは難しく、光励起から数 μ s程度の反応経過しか追うことができなかった。タンパク質内部で起こる構造変化は μ s～msのタイムスケールで顕著である場合も多く、遅延時間が限られるのは大きな課題であった。

3. テープ駆動型装置の開発

2017年、液滴による試料吐出の欠点を克服する新しい方法がFullerらにより報告された^[6]。これは液滴をテープ上に吐出してXFEL照射領域まで送る方法で、一定速度で安定して試料を搬送することができる。この時に採用された液滴吐出は、音響液滴射出（Acoustic Droplet Ejection, ADE）で、試料に非接触で微量の液滴を生み出す方式であった。今までの結晶を含む溶液の吐出は、キャピラリーなど細い流路を用いてきた。このような細いノズルから結晶懸濁液を吐出する際、結晶が密集してノズル付近で詰まる問題が起りやすかったことから、ノズ

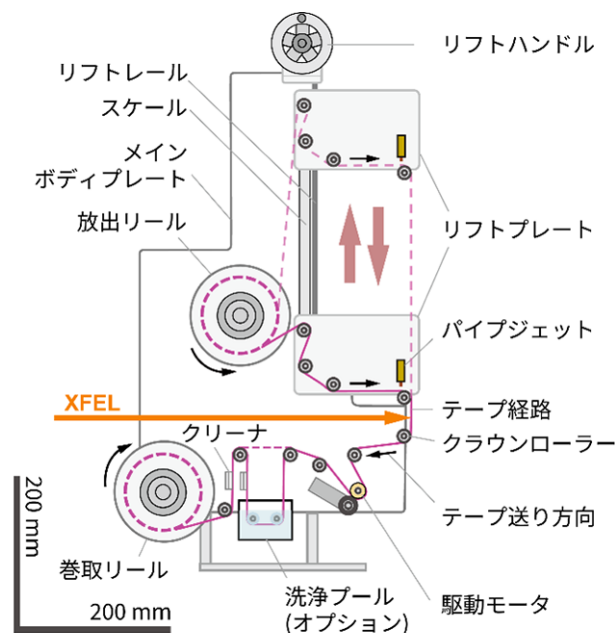


図1 Compact Tape-Driven Sample Delivery System (CoT) の模式図

ルを用いず非接触で液滴を吐出できるADEは画期的である。しかし、装置自体が大きく、非常に高額であるという課題もある。また、彼らの方法ではXFELが液滴中の結晶に照射される際、テープに対して平行に照射される。これは高強度のXFELがテープに当たるとテープを損傷するため、ベルトコンベアとして繰り返しテープを使用するためにこのような照射方式が用いられた。しかしながら、1) 回折像の半分程度にテープからの高いバックグラウンドノイズが生じる、2) 液滴がテープ上で盛り上がっていないと、テープに当たることなくXFELを照射できないため、テープの撥水処理が不可欠であった。動くテープの上にある数10 μ mの高さの液滴にXFELを照射するのは容易ではない。また、従来の試料導入装置（インジェクター）に比べて、ベルトコンベア装置は大型であり、気軽に使えるものとは言い難かった。

そこで我々は異なるXFEL照射方式と液滴吐出を取り入れた新たなテープ駆動型試料導入装置（Compact Tape-Driven Sample Delivery System, CoT）を開発した（図1）。この装置では、XFELの照射はテープに対して垂直に行われる。平行に照射される場合に比べ、液滴の高さは不要であるため撥水処理は必要としない。その一方で照射後テープ

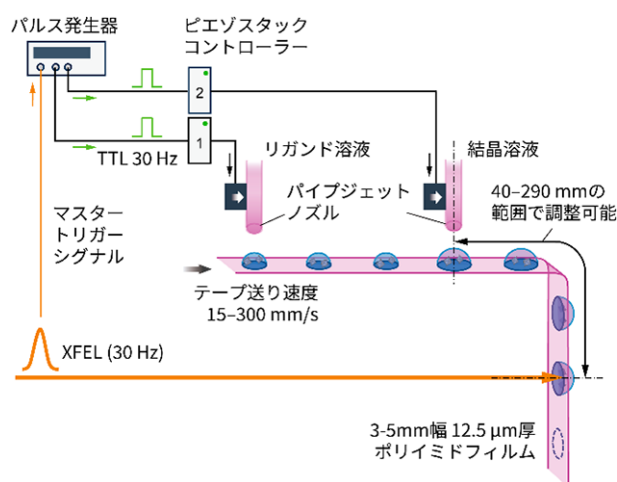


図2. CoTを用いた二液混合実験の模式図

にXFELによる穴が開くため、テープは一回の使用で回収されるというカセットテープ方式を採用している。テープは厚さ12.5 μm 、幅3~5 mmのポリイミド製フィルムを用いる。これは、テープにかかる張力に耐えて安定に駆動しつつ、極力バックグラウンドノイズを低減させ、かつ、容易に入手し加工できる最も薄い厚さ（開発当時）である。また、液滴吐出はパイプジェットと呼ばれるインジェクターで、ピエゾ方式である。液滴吐出のタイミングをXFELパルスに同期させて、液滴を照射位置に搬送している。液滴の吐出量はノズル径や試料の粘性に依存し、一液滴当たり2~14 nL程度である。XFELが30 Hz、液滴が5 nLの場合、一時間当たりの量は540 μL となり、液体ジェットに比べて試料消費量は10分の1以下となる。

時分割実験への応用としては、光励起によるポンププローブ型実験も可能である。従来の連続型試料導入では、試料が流れ落ちてしまうため可能な遅延時間の範囲が数10 fs~数10 ms程度に限られていた。しかし、CoTを用いた場合、図1のパイプジェット位置とXFELの照射位置の間にポンプ光レーザーを照射することで、秒スケールの長い遅延時間で測定することも可能である。これはテープ速度を落とすと共に、リフトプレートの位置を変えることにより、液滴吐出位置とXFEL照射位置の距離を変えることによって達成される。また、例えば基質と結晶など二種類の液滴を別々に吐出して重ね合わせるこ

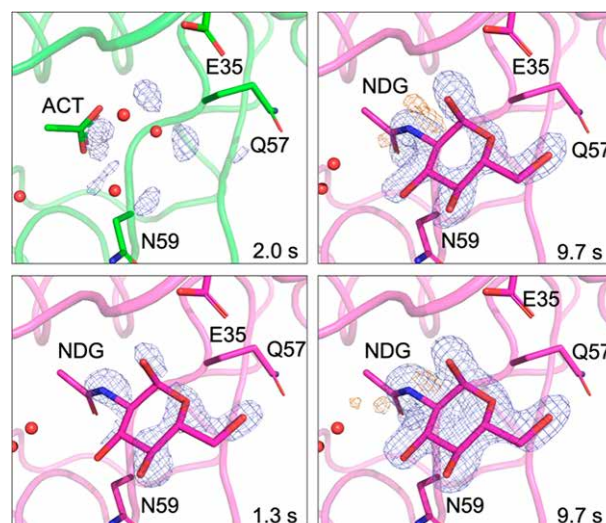


図3 リゾチームに結合する阻害剤の電子密度の変化
リゾチームの活性部位構造の主鎖（線）を主に表示している。一部のアミノ酸残基の側鎖は棒モデルにて表示している。上段は3~5 μm 結晶を用いた実験結果、下段は1 μm 結晶を用いた結果。右下の数字はそれぞれ混合時間を意味する。2.0 s: 緑で描画されている図は、炭素原子 (C_α) を繋いだ主鎖構造を意味する。赤は酸素原子、青は窒素原子を意味し、赤で表示した球は水分子である。青色のメッシュは差フーリエマップ ($F_o(\text{混合後}) - F_o(\text{混合前})$) を表す（上二つは5 σ 、下二つは6 σ で描画）。ACTは酢酸イオン、E35、Q57、N59はアミノ酸残基（一文字表記）である。ピンク色で表示された図はピンク色が炭素原子を意味し、酸素原子と窒素原子はそれぞれ赤、青である。NDGは阻害剤を意味する。

とにより、低分子化合物の結合による反応開始も可能である。実際、我々はこの二液混合型実験を行い、CoTの実証を行った。

4. 二液混合による阻害剤結合過程の観察

二種類の異なる液滴を吐出するため、図2のように二台の液滴インジェクターを設置した。二つの液滴は重ね合わさり、低分子化合物は結晶内部へと拡散する。今回、酵素であるニワトリ卵白由来のリゾチームの微結晶（1または3~5 μm ）と、その阻害剤であるN-アセチルグルコサミンを用いて実験を行った。

その結果、混合時間と結晶サイズに応じて、活性部位に結合する阻害剤の占有率が変化することが観察された（図3、阻害剤上の電子密度図の明瞭さが占有率と連動する）。上段の結晶サイズが大きい場

合は、混合から2秒後において、阻害剤の電子密度は観察されなかったが、下段の小さな結晶の場合は1.3秒後でも阻害剤の電子密度が観察された。また、混合から9.7秒後は大きな結晶でも阻害剤の結合が観察されたが、結晶サイズが小さい方が高い占有率であった。これは、結晶内部への阻害剤の拡散が混合時間や結晶サイズに依存することを示しており、CoTの結晶溶液吐出タイミングやその搬送が正確に行われていることを実証することができた。

5. おわりに

二液混合による時分割SFXはマイクロ流路型デバイスを用いた方法が報告されており^[7,8]、数10ミリ秒といった早い混合時間での観察が可能である一方、非常に試料消費量が多いことが課題となっている。本法による二液混合実験は数10～数100分の1に試料消費量を抑えることができる。本装置を用いた二液混合実験において可能な遅延時間は、前述のマイクロ流路型デバイスに比べると若干劣ることは否めない。現状ではテープ速度を最大限の300 mm/sにすると130 ms程度が計算値としては可能である。また、遅い方は、テープ搬送速度自体を遅くすることは可能であるが、遅すぎると隣接の液滴同士が重なるために、15 mm/sのテープ速度が限界で、概ね最長19.3 sまで伸ばすことが可能と予想される。

遅延時間の幅や、拡散効率の向上など課題もあるが、試料消費量の低減は大きな利点である。今まで時分割実験の多くは光感受性試料に限られてきたが、光感受性タンパク質はタンパク質全体の1%にも満たず、タンパク質動的構造解析の成功例は限定的であった。今後は酵素反応や受容体へのリガンド結合など様々なタンパク質の時分割実験への応用が可能であり、タンパク質が機能を発揮する際の動きや内部で起こる反応への理解や、それを踏まえた分子設計などが期待される。

参考文献

- [1] J. Kang, *et al.*: *J. Appl. Cryst.* in press
- [2] D. P. DePonte, *et al.*: *J. Phys. D Appl. Phys.* **41** (2008) 195505

- [3] U. Weierstall, *et al.*: *Nat. Commun.* **5** (2014) 3309
- [4] M. Sugahara *et al.*: *Nat. Methods* **12** (2015) 61
- [5] F. Mafune *et al.*: *Acta Cryst. D* **72** (2016) 520-523
- [6] F. D. Fuller, *et al.*: *Nat. Methods* **14** (2017) 443-449
- [7] J.R. Stagno, *et al.*: *Nature* **541** (2017) 242-246
- [8] Murakawa, T. *et al.*: *Nat. Commun.* **16** (2025) 11149

南後 恵理子 NANGO Eriko

東北大学 多元物質科学研究所／
国際放射光イノベーション・スマート研究センター
〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1
TEL : 022-217-5345
e-mail : eriko.nango.c4@tohoku.ac.jp

姜 正敏 KANG Jungmin

(国研) 理化学研究所 放射光科学研究センター
SACLAビームライン基盤グループ
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1丁目1-1
TEL : 0791-58-0802
e-mail : j.kang@spring8.or.jp

Luo Fangjia

(公財) 高輝度光科学研究センター
回折・散乱推進室
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1丁目1-1
TEL : 0791-58-0802
e-mail : luo.fangjia@spring8.or.jp

登野 健介 TONO Kensuke

(公財) 高輝度光科学研究センター
分光・イメージング推進室／XFEL利用研究推進室
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1丁目1-1
TEL : 0791-58-0833
e-mail : tono@spring8.or.jp