

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：82118

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14686

研究課題名(和文) 回折イメージング法による結晶化ドロップ評価および最適結晶化条件探索の自動化

研究課題名(英文) Evaluation of a crystallization drop by a diffraction imaging method, and automated optimization of crystallization conditions

研究代表者

山田 悠介 (Yamada, Yusuke)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教

研究者番号：20391708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質X線結晶構造解析はタンパク質の立体構造を原子レベルで明らかにすることが出来る非常に強力なツールである。しかしながら解析に十分な回折能を有する結晶を得ることが重要で、このための技術開発が求められている。

本研究では、タンパク質結晶が析出した結晶化ドロップ全体に対して微小なX線を走査し、それぞれの箇所で見られる回折パターンを解析して得られる指標をマッピングすることで、結晶化ドロップ中のタンパク質結晶の位置や大きさ、個数、回折能などを可視化する回折イメージング法を開発した。また、この可視化されたイメージと結晶化条件を結び付けて、さらに良い結晶化条件を探索することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで結晶化ドロップの観察では可視光などを用いて、結晶の形状に関する情報のみが得られていた。本研究で開発した回折イメージング法を用いることで、結晶の形状だけでなく、X線回折能の情報まで取得することが出来る。この情報は構造解析の結果に直結するものであり、結晶化条件探索から構造決定までの工程をシームレスに連携させることで、学術には重要だが解析困難なタンパク質での構造解析を可能にすることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Protein crystallography is one of the most powerful techniques to determine three-dimensional structures of proteins at the atomic resolution.

In this study, a new imaging method of a protein crystallization drop has been developed. In this method, a crystallization drop is scanned with a tiny X-ray beam at a synchrotron radiation beamline, and a diffraction image from each position is recorded. The diffraction image is processed and resulted value is mapped to the position where the diffraction image is recorded. As the result, positions, shape, number and diffractivities of protein crystals in the drop are imaged. The trial of clarifying the relationship between the image obtained by the new method and the crystallization condition has been started.

研究分野：タンパク質X線結晶構造解析

キーワード：タンパク質X線結晶構造解析 放射光 自動化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析は生体高分子を原子レベルで構造決定することが可能であることから、構造生物学研究における強力なツールとして欠かせないものとなっている。また、これにより構造生物学は医学・薬学を含めた生命科学一般に広く浸透しつつある。しかしながら構造決定に至るまでの工程は複雑で、X線結晶構造解析の経験を有さない多くの生命科学研究者にとってはまだ敷居が高いのが現状である。その中でも結晶化はその後の構造解析の成否を決定する極めて重要な工程であるものの、数百から千という数の結晶化条件をスクリーニングしたり、その後の結晶化ドロップの経過観察を人間がマニュアルで行い主観的に判断したりする必要があり、研究者の経験が大きく問われる工程である。特に得られた結晶が回折実験に適したものであるかどうかについては結晶のハンドリングから回折実験、回折データの解釈まで、多くの経験と判断が必要である。

申請者はこれまで放射光ビームラインの開発者として、自身の担当するビームライン BL-17A 高度化を行ってきた。その中で結晶化プレート上の結晶化ドロップに直接 X 線を照射して回折データを取得できる in-situ データ収集装置の開発を行ってきた。それと同時に、放射光ビームラインで行われた実験条件や得られる実験データを取り込むデータベースや、申請者の所属するグループで開発された大規模結晶化システムの結晶化条件から観察結果の記録までを取り込むデータベースの開発も行ってきた。これらの開発の目的は、結晶化から回折実験までをシームレスにつなげることであったが、その有機的な連携を模索している中で、回折イメージング法を用いた結晶化ドロップの可視化および評価と、データベースを利用した結晶化条件の最適化を自動で行うという本研究の発想に至った。

2. 研究の目的

生体高分子の X 線結晶構造解析において結晶化はその後の構造解析の成否を決める極めて重要な工程である。本研究では、結晶化プレート上の結晶化ドロップに直接 X 線を照射し回折像を取得する in-situ データ収集装置を用いて、結晶化ドロップを微小の X 線ビームでスキャンし得られた回折像を解析してマッピングする回折イメージング法を開発することで、結晶化ドロップ中の結晶の有無から結晶の数、結晶の質までの多岐にわたるスコアリングを客観的に、且つ全自動で行う。さらに結晶化システムデータベース中の結晶化条件と上記スコアとを結び付け、多変量解析や機械学習等のデータ解析を行うことで、最適な結晶化条件を導き出す。

3. 研究の方法

結晶化ドロップの回折イメージング法の確立

申請者が開発を行っている放射光ビームライン BL-17A ではビーム径を水平方向 10 μm 、垂直方向 5 μm まで小さくすることが可能である。さらに BL-17A には結晶化プレートを垂直に保持し、結晶化プレートの任意の位置にこの微小ビームを照射することが可能な in-situ データ測定装置が備えられている。したがって、結晶化ドロップのある位置に微小ビームを照射すると、10 x 5 μm^2 の領域からの回折データを取得することが出来る。位置を水平方向ないし垂直方向にビームサイズ分シフトさせながらその都度回折データを収集することを結晶化ドロップの領域全体に対して行くと、結晶化ドロップ中の幅 10 x 5 μm^2 で区切ったグリッド上のそれぞれの箇所でも回折データを得ることが出来る。この回折データをマッピングすることで、10 x 5 μm^2 の分解能で可視化することが可能であり、これを結晶化ドロップの回折イメージング法と称することとする。

回折イメージング法を確立させるための技術的な問題として、(1)結晶化ドロップの領域の認識と適切なグリッドの作成、(2)in-situ データ測定装置内の X 線シャッター、並進ステージそして X 線検出器の正確な同期、(3)放射線損傷を極力抑える X 線照射条件、(4)得られる回折データの解析とマッピング(詳細は後述)、などが挙げられる。これらの問題について一つ一つ検証を行いながら、最終的にはリゾチームなどの標準試料を用いた試験を行うことで回折イメージング法を確立させる。

結晶化ドロップのスコアリング方法の検討

回折イメージング法によって得られた各回折イメージデータは、それぞれ LABELIT を用いて解析する。LABELIT による解析では、回折点の数、最大分解能、モザイク幅、空間群と格子定数、結晶の方位などの情報を得ることが出来、これらを結晶化ドロップ上にマッピングする。例えば、回折点の数についてマッピングを行うと、結晶化ドロップ中の結晶の位置や形状を特定することが出来る。さらに最大分解能や格子定数、結晶の方位の情報を組み合わせることで、結晶が生体高分子由来の結晶なのか、低分子由来の結晶なのか特定出来たり、結晶の回折能を評価したりすることが出来る。実験者がこれらの情報を容易に解釈出来るようにマッピングした画像を作成すると同時に、後述する結晶化条件の検討のためこれらの情報を如何に結晶化ドロップのスコアリングへとつなげるかについて、標準試料を用いた解析例をもとに検討を行う。

最適な結晶化条件の導出

まずは簡易的な例として、結晶化の二次スクリーニングを想定して、結晶化試薬の濃度や pH

を振った一連の結晶化条件で結晶化ドロップのスコアリングを行い、結晶化条件との相関から、最適な結晶化条件を導き出す。この際に結晶化条件、およびスコアリングのパラメータは双方とも複数にわたることを想定して、多変量解析を行うためのモデル作りから検討する。さらには、より広範囲なスクリーニングである Crystal screen kit (Hampton research) に代表される一次スクリーニングへの適用を念頭に、機械学習による最適結晶化条件の導出についても検討を行う。

4. 研究成果

結晶化ドロップの回折イメージング法の確立

回折イメージング法の確立に必要な、(1)結晶化ドロップの領域の認識と適切なグリッドの作成、(2)in-situ データ測定装置内の X 線シャッター、並進ステージそして X 線検出器の正確な同期、(3)放射線損傷を極力抑える X 線照射条件、(4)得られる回折データの解析とマッピングについて一つ一つ検証を行っていた。

(1) 結晶化ドロップの領域の認識と適切なグリッドの作成については、機械学習を用いた結晶化ドロップ領域の認識を筑波大学人工知能センターのグループと共同で開発することで、高精度での領域認識とその領域に対するグリッド作成を行えることが出来るようになった。(2)in-situ データ測定装置内の X 線シャッター、並進ステージそして X 線検出器の正確な同期については、並進ステージの動作を常時モニター可能なエンコーダを取り付けること、さらに並進ステージやシャッター、検出器トリガを制御するコントローラへのコマンド系列を見直すことで、1mm/sec 程度の高速なスキャンにおいても十分な精度で測定が可能となった。しかしながら、採用しているプレート保持装置の重量の問題から In-situ 測定では 0.1mm/sec 程度までしかスキャン速度を上げられない問題がある。この点については今後プレート保持の方法を再検討することで解決していきたい。(3) 放射線損傷を極力抑える X 線照射条件について、各グリッドでの放射線吸収線量が 10kGy となるように設定することで、回折イメージの評価に十分なシグナルが得られることが確認され、その条件を採用している。(4)得られる回折データの解析とマッピングについては、本イメージング法確立のための最重要事項であり、期間中に何度もソフトウェアの変更を行った。期間中に BL-17A の検出器が Dectris 社の EIGER X 16M に変更となったことから、この検出器に最適化したシステムに最終的に落ち着いている。開発したシステムでは、超高速な応答が可能なデータベース redis を用いたスケーラブルなジョブ管理と、dials.find_spots を用いた回折画像解析を組み合わせることで、100Hz までの回折像出力に対してほぼリアルタイムで解析出来ることを確認した。

結晶化ドロップのスコアリング方法の検討

で示した dials.find_spots は回折画像解析結果として、回折点の数、予想される最大分解能、アイスリングの有無、回折強度などを出力する。一方で、スコアリングとしては、結晶のモザイク幅や方位なども必要で、この計算を行うため、2 次処理として LABELIT を用いた解析を行った。そして、これらの数値を結晶化ドロップ画像上にマッピングするための jupyter notebook による解析テンプレートを作成した。現在はこれを回折スキャンと同時に見られるような GUI の作成に取り組んでいる。

最適な結晶化条件の導出

研究方法で示した簡易的な例でのモデル作りについては実施できなかったものの、結晶化 1 次スクリーニングへの適応のために、結晶化データベースと回折実験データベースの連携などの開発を行った。現在、結晶化条件と回折イメージング結果との相関の検証を開始したところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Yamada, Y., Hiraki, M., Matsugaki, N., Kato, R. & Senda, T., In-situ data collection at the photon factory macromolecular crystallography beamlines., AIP Conf. Proc., 査読あり, 1741, 2016, 050023.
DOI: 10.1063/1.4952943

[学会発表](計 9 件)

山田悠介、田辺幹雄、尾関雅弘、菅原隆広、篠田晃、加藤龍一、千田俊哉、Photon Factory における膜タンパク質結晶構造解析パイプライン、第 32 回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム、2019
Yusuke Yamada, Akira Shinoda, Masahiko Hiraki, Masahide Hikita, Naohiro Matsugaki,

Toshiya Senda, Fully automated data collection system at the Photon Factory macromolecular crystallography beamlines, AsCA2018/CRYSTAL32, 2019

山田悠介、田辺幹雄、尾関雅弘、菅原隆広、千田俊哉、加藤龍一、Photon Factory における膜タンパク質結晶構造解析パイプライン、平成 30 年度日本結晶学会年会、2018

山田悠介、松垣直宏、引田理英、平木雅彦、田辺幹雄、加藤龍一、千田俊哉、PF タンパク質結晶構造解析ビームラインによる構造生物学研究支援、第 91 回日本生化学会大会、2018

Yusuke Yamada, Integrated database of structural biology experiments at the Photon Factory, International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation, 2018

山田悠介、菅原隆広、引田理英、松垣直宏、平木雅彦、千田俊哉、PF タンパク質結晶構造解析ビームライン BL-17A における In-situ 測定、第 31 回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム、2018

山田悠介、松垣直宏、引田理英、平木雅彦、湯本史明、田辺幹雄、加藤龍一、千田俊哉、PF タンパク質結晶構造解析ビームラインによる構造生物学研究支援、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017

山田悠介、引田理英、松垣直宏、平木雅彦、田辺幹雄、湯本史明、加藤龍一、千田俊哉、BINDS における PF タンパク質結晶構造解析ビームラインの支援と高度化、平成 29 年度日本結晶学会年会、2017

Yusuke Yamada, Upgrade of a macromolecular crystallography beamline, BL-17A, at the Photon Factory, 12th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。