

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560251

研究課題名（和文） タンパク質 X 線結晶構造解析を加速する結晶装填システムの高度化

研究課題名（英文） Upgrade of sample exchanger to accelerate protein X-ray crystal structure analysis

研究代表者

平木 雅彦 (HIRAKI MASAHIKO)

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・研究機関講師

研究者番号：20282676

研究成果の概要（和文）：タンパク質 X 線結晶構造解析の一連のプロセスの内、結晶を保持しているサンプルホルダーを液体窒素デューワー内の結晶保存用カセットに装填するためのシステム開発を行った。また、キャリブレーション法も開発し、トラブル率 0.1%程度で安定に動作することを確認した。さらに実際にタンパク質結晶を用いてテスト実験を行い、カセットに装填されたタンパク質結晶を用いたデータ測定、構造解析が問題なく行えることを確認した。

研究成果の概要（英文）：We developed a sample exchange system that was able to insert sample holders to cassettes in a liquid nitrogen Dewar. The developed system was operated stably with only 0.1% troubles after the calibration of the system. In addition, the X-ray diffraction data of protein crystals stored by the developed system were enough for structure analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ロボティクス

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：X線結晶構造解析、タンパク質、ロボティクス

1. 研究開始当初の背景

構造生物学は生体物質の機能発現機序を原子・分子レベルで明らかにすることで、生命科学や基礎医学の分野だけでなく、創薬、食品、環境等の応用分野においても重要な学問になっている。生体物質複合体の原子・分子レベルの構造が明らかになることで、それらの機能の理解が格段に進むことが多く、生体物質の立体構造の解明が必要不可欠となってきた。

2000 年前後から各国で構造ゲノミクスと

呼ばれるタンパク質の立体構造を網羅的に解析する国家プロジェクトが進められており、決定されたタンパク質の立体構造数は指数関数的に増えてきている。例えば、我が国のタンパク 3000 プロジェクトとそれに続くターゲットタンパク研究プログラム、米国立公衆衛生院の PSI (Protein Structure Initiative) プロジェクト、欧州の SPINE (Structural Proteomics IN Europe) プロジェクトなどが挙げられる。いずれの場合もそれらと平行して進められている構造解析の

高度化のための方法論・技術開発が重要な要素となっている。

タンパク質の構造の多くはX線結晶構造解析により決定されており、目的タンパク質の大量発現、精製、結晶化、ホルダーへの装填、X線回折実験、データ処理という流れで行われる。特に結晶化はルーチ的に処理できることが多く、我々は結晶化のプロセスの自動化・高速化を目指し、大規模タンパク質全自動結晶化・観察システムの開発を行った。

また、回折実験におけるタンパク質結晶の自動マウントシステムを開発し、従来 90 秒かかっていた結晶のマウント時間を 10 秒に短縮することに成功した。

以上のように結晶化およびX線回折実験の自動化は各国の大学、研究所で開発が進められているが、得られたタンパク質結晶をホルダーに装填する部分については開発が行われておらず、我々はマイクロマンピュレータを併用した結晶装填システムの開発を世界に先駆けて行った。

これらのシステムの開発により、タンパク質構造解析の速度は飛躍的に向上したが、タンパク質結晶を保持するホルダーを結晶自動マウントシステムに受け渡すためには、ホルダーを液体窒素内のカセットに自動的に装填することが必須である。

2. 研究の目的

タンパク質結晶はX線のダメージを極力抑えるために極低温で実験が行われる。そのためあらかじめタンパク質結晶を液体窒素で冷却しておくのが普通である。まず結晶を先端のナイロンループですくい取った後のホルダーを液体窒素内のカセットに格納するための装置開発を行う。現在はこの作業は手作業で行われているが、タンパク質結晶を単に液体窒素に入れば良いわけではなく、温度変化が結晶に与える影響が大きいと言われている。また結晶に霜が付着することで、その後のX線回折データの質を下げる、もしくは解析できなくなるため霜が付着しないようにする必要もある。

そこで、ホルダー運搬用ロボットハンドを製作し、実際にタンパク質結晶を用いて液体窒素デューワー内のカセットへの装填テストを行い、X線回折実験による結果をフィードバックしながら安定にホルダーをカセットに装填するための方法の確立とシステムの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ホルダー運搬用ロボットハンドおよび周辺機器の開発

現在、放射光施設のビームラインで稼働し

ている結晶マウントシステムで用いられているカセットにホルダーを格納するための装置の設計・製作を行う。現在多く用いられているハンプトンリサーチ社のホルダーの他、SPring-8 で用いられているSPACE用ホルダーにも対応したロボットハンドを製作し、放射光施設に設置している4軸水平多関節ロボットを用いて動作テストを行う。

(2) ロボットのキャリブレーション方法の開発およびテスト実験

液体窒素デューワー内のカセットにホルダーを安定に装填するためには、カセットなどの位置を正確に知る必要があるが、液体窒素温度下では室温と比べて 200K 以上温度差があるため、ほとんどの部材は収縮する。そのため室温でのティーチングの結果を用いることができない。そこで、(1)で製作したロボットハンドを液体窒素デューワー内のカセットに接触させ、そのときのロボット座標を元にカセットの位置を計算で求めるキャリブレーションを行う。

また、計算によって求めたカセットの位置情報を用いてホルダーの装填実験を行う。さらに実際に放射光施設で行われるユーザー実験で用いたホルダーをカセットに装填する実験を行い、その結果を元にキャリブレーション法の再検討を行う。

(3) タンパク質結晶を用いたテスト実験

本システムは単に動作ができるだけでなく、実際にタンパク質結晶を取り扱うことができなければならない。テスト実験用のタンパク質結晶は、容易に結晶が得られ、数多くのテスト実験で用いられているリゾチームを用いる。結晶化は現有の結晶化システムを用いて行う。

開発したシステムを用いて、タンパク質結晶を保持しているホルダーを液体窒素内のカセットに装填し、その後、カセットからホルダーを取り出してX線回折実験を行う。得られた回折データを用いて結晶構造解析を行い、その統計値からタンパク質結晶が安定に装填されているかどうかを判断する。

4. 研究成果

(1) ホルダー運搬用ロボットハンドの開発と既存ロボットへの組み込み

本研究で対象とするのは、ハンプトンリサーチ社のホルダー(図1左)とSPACE用ホルダー(図1中)である。これら両方のホルダーをつかむことができるロボットハンドを製作した(図1右)。マニュアル操作で用いているトングと基本的な形状は同じであり、上下2分割されているハンドが圧空で開閉できるようになっている。



図1. ホルダーとロボットハンド先端 (左: ハンプトンリサーチ社のホルダー、中: SPACE用ホルダー、右: 製作したロボットハンドの先端部)

製作したロボットハンドをフォトンファクトリー放射光研究施設に設置してある4軸水平多関節ロボットに取り付けた(図2)。ロボット本体とハンドの間には、6軸力トルクセンサが取り付けられており、ハンド先端にかかる荷重を計測できるようになっている。この力センサの値を元に、液体窒素デューワー内のカセットの位置や傾きの計測を行う。また、霜の混入を防ぐために液体窒素デューワーの上部にヒーターを取り付けた。



図2. フォトンファクトリー放射光研究施設BL-1Aに設置している4軸水平多関節ロボット

(2) 液体窒素デューワー内のキャリブレーション後の装填テスト実験結果

液体窒素内のキャリブレーションは、カセットの位置に加え、傾きも測定した。カセットが傾くことにより、ホルダーを格納する穴の位置の変化が無視できないためである。また、カセットはアルミ製で液体窒素温度では室温の時に比べて収縮するため、この影響も考慮した。

我々が用意したハンプトンリサーチ社製ホルダーを用いた実験では、装填回数に対するトラブルの件数の割合は0.15%であったが、2008年度C期(2008C期:2009年1~3月)

にユーザーのホルダーを用いて行った実験では0.64%であった(表1)。トラブルの大半はホルダーをそれが取り付けられている軸から取り外す際に図1右に示したハンドが完全に閉まらなかったために停止したためであった。そこで、ハンド内側の形状を見直した。その結果、2009A期(2009年4~6月)ではトラブル率を0.08%にまで低減させることに成功した。

表1. ホルダーの装填実験結果

	回数	トラブル	%
2008C	1,849	12	0.64
2009A	3,538	3	0.08
2009B	3,895	15	0.39
2009C	4,310	7	0.16
2010A	3,596	13	0.36
2010B	5,482	7	0.13
2010C	3,239	1	0.03

しかし、2009B期(2009年10~12月)、2009C期では、液体窒素デューワー内でカセットにピンを装填する際のトラブルが目立った。さらに2010A期では動作中に力センサが反応し停止するという原因不明のトラブルがあった。2010年夏期のユーザー運転がない時期に連続動作中のシステムの動画を撮影した結果、カセットにピンを装填する前に液体窒素内の棒にホルダーを取り付ける際にホルダーがずれることが原因であることをつきとめ、この棒のキャリブレーション方法を見直した。具体的には、ハンドを接触させて直接座標を求めめるのではなく、棒が乗っている台の座標から計算で求める方がより正確な座標を得ることができることが分かった。さらに力センサにソフトウェアでフィルタをかけることで動作中のノイズを除去することにした。

その結果、2010B期および2010C期では、それぞれ0.13%、0.03%にまでトラブル率を低減させることができた。

(3) タンパク質結晶を用いたテスト実験

現有の結晶化システムを用いて、タンパク質リゾチームの結晶化を行った。得られたリゾチームの結晶の画像を図3に示す。

リゾチームの結晶をホルダー先端のナイロンループで保持させ、開発したシステムを用いて、液体窒素内のカセットに装填した。本実験では、15個のSPACE用ホルダーを用意したが、全てトラブルなくカセットに装填することができた。カセット内のホルダーを1つつ取り出して、フォトンファクトリー放射光施設のビームラインBL-1Aの回折計に取り付け、X線回折データ収集を行った。その後、得られた回折データを用いて構造解析を行った。結果の一部を表2に示す。

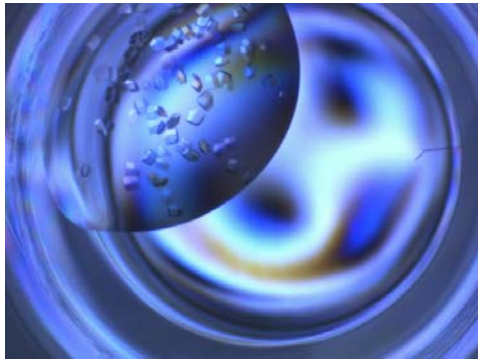


図3. 得られたリゾチーム結晶

表2. 構造解析時の統計値

Sample No.	1	2
Space Group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Cell a	78.72	78.62
Cell b	78.72	78.62
Cell c	37.16	37.15
Resolution(Å)	50-1.25	50-1.19
I/Sigma(I)	72.0	68.6
Rmerge(%) Total	4.5	4.2
Rmerge(%) Outer	32.5	27.2

6	7	10
P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
78.53	78.49	78.62
78.53	78.49	78.62
37.10	37.11	37.97
50-1.37	50-1.21	50-1.33
70.0	63.7	71.9
4.4	4.2	4.7
31.0	29.6	29.4

表2の空間群 (Space Group)、格子定数 (Cell a-c)はどれも同様の結果となっている。また本測定の Rmerge は Total で 5%以下であり回折データが良質であることを示している。分解能は 1.2Å程度であり、これは同条件で結晶化したリゾチームをマニュアル測定した場合の結果と同程度であった。

以上の結果から、開発したシステムを用いて液体窒素中のカセットにタンパク質結晶を装填し、これらのタンパク質結晶を用いて、X線回折データ測定、構造解析が問題なく行えることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Masahiko Hiraki, Shokei Watanabe, Leonard M. G. Chavas, Yusuke Yamada,

Naohiro Matsugaki, Noriyuki Igarashi, Soichi Wakatsuki, Masahiro Fujihashi, Kunio Miki, Seiki Baba, Go Ueno, Masaki Yamamoto, Mamoru Suzuki, Atsushi Nakagawa, Nobuhisa Watanabe and Isao Tanaka, Fully Automated Data Collection Using PAM and the Development of PAM/SPACE Reversible Cassettes, American Institute of Physics, 査読有 Vol.1234, 2010, 673-676

[学会発表] (計11件)

- ① 平木雅彦, Leonard M. G. Chavas, 山田悠介, 松垣直宏, 五十嵐教之, 若槻壮市, タンパク質結晶自動交換ロボット PAM, 第24回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム, 2011/1/7-10, つくば国際会議場, 茨城
- ② 平木雅彦, Leonard M. G. Chavas, 山田悠介, 松垣直宏, 五十嵐教之, 若槻壮市, タンパク質結晶自動交換ロボット PAM, 日本結晶学会年会, 2011/12/3, 大阪大学コンベンションセンター, 大阪
- ③ 平木雅彦, Chavas Leonard M. G., 山田悠介, 松垣直宏, 五十嵐教之, 若槻壮市, タンパク質結晶交換ロボット PAM, PF 研究会「放射光利用による構造生物の将来像」, 2010/7/12-13, KEK 小林ホール, 茨城
- ④ Masahiko Hiraki, Shokei Watanabe, Léonard M. G. Chavas, Yusuke Yamada, Naohiro Matsugaki, Noriyuki Igarashi, Soichi Wakatsuki, Masahiro Fujihashi, Kunio Miki, Seiki Baba, Go Ueno, Masaki Yamamoto, Mamoru Suzuki, Atsushi Nakagawa, Nobuhisa Watanabe and Isao Tanaka, Upgrade of High-throughput Sample Exchange Robots PAM and Development of PAM/SPACE Reversible Cassettes, 回折構造生物学に関する国際シンポジウム ISDSB2010, 2010/5/28, パリ SUD 大学, フランス
- ⑤ 平木雅彦, Leonard M. G. Chavas, 山田悠介, 松垣直宏, 五十嵐教之, 若槻壮市, 蛋白質結晶自動交換ロボットの現状と今後の予定, 第27回 PF シンポジウム, 2010/3/9, つくば国際会議場, 茨城
- ⑥ 平木雅彦, 山田悠介, 松垣直宏, Leonard M. G. Chavas, 五十嵐教之, 若槻壮市, 結晶交換システム PAM の高度化, 第23回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポ

ジウム、2010/1/8、イーグレ姫路、兵庫

- ⑦ Masahiko Hiraki, Leonard Chavas, Yusuke Yamada, Naohiro Matsugaki, Noriyuki Igarashi and Soichi Wakatsuki, Current status and developments of macromolecular crystallography beamlines at the Photon Factory, アジア結晶学会 AsCA2009, 2009/10/24, 北京 Jing Yi Hotel, 中国
- ⑧ Masahiko Hiraki, Shokei Watanabe, Leonard M. G. Chavas, Yusuke Yamada, Naohiro Matsugaki, Noriyuki Igarashi, Soichi Wakatsuki, Masahiro Fujihashi, Kunio Miki, Seiki Baba, Go Ueno, Masaki Yamamoto, Mamoru Suzuki, Atsushi Nakagawa, Nobuhisa Watanabe and Isao Tanaka, Fully-automated data collection using PAM and development of PAM/SPACE reversible cassettes, 放射光装置に関する国際会議 SRI2009, 2009/10/1, メルボルン国際会議場, オーストラリア
- ⑨ 平木雅彦、山田悠介、松垣直宏、五十嵐教之、若槻壮市、PF 構造生物ビームラインにおける全自動解説データ収集の実現への取り組み、第26回PFシンポジウム、2009/3/25、つくば国際会議場、茨城
- ⑩ 平木雅彦、山田悠介、松垣直宏、五十嵐教之、若槻壮市、藤橋雅宏、上野剛、馬場清喜、鈴木守、タンパク質結晶交換ロボットによる測定自動化とサンプル用カセットの共通化、第22回PF日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム、2009/1/11、東京大学山上会館、東京
- ⑪ Masahiko Hiraki, Naohiro Matsugaki, Yusuke Yamada, Noriyuki Igarashi, Yurii Gaponov, Shokei Watanabe, Wataru Uda, Kumiko Sasajima, Nobuo Honda and Soichi Wakatsuki, Approach for automated data collection at the Photon Factory macromolecular crystallography beamlines, 国際結晶学会 IUCr2008, 2008/8/23-31, グランキューブ大阪国際会議場、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平木 雅彦 (HIRAKI MASAHIKO)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・研究機関講師
研究者番号：20282676

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
若槻 壮市 (WAKATSUKI SOICHI)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授
研究者番号：00332114

加藤 龍一 (KATO RYUICHI)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授
研究者番号：50240833

川崎 政人 (KAWASAKI MASATO)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授
研究者番号：00342600

五十嵐 教之 (IGARASHI NORIYUKI)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授
研究者番号：80300672

松垣 直宏 (MATSUGAKI NAOHIRO)
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：50342598

山田 悠介 (YAMADA YUSUKE)
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