

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月18日現在

機関番号：82118

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21687010

研究課題名（和文） 低エネルギーSAD法における回折データの高シグナル低ノイズ化に向けた技術開発

研究課題名（英文） Technical developments for high S/N ratio of diffraction data in low energy SAD phasing

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

研究成果の概要（和文）：本課題ではタンパク質 X 線結晶構造解析の位相決定手法の一つである低エネルギーSAD法について、回折データに存在する微弱な異常散乱シグナルを高精度に測定するための技術開発を行ってきた。その結果として、測定試料のまわりの X 線吸収効果を低減するためのヘリウムガス吹付装置とヘリウム置換用チャンバー、そして取得したデータからいち早く異常散乱シグナルのレベルを評価するための回折データ処理システムの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：In this project, technical developments to measure weak anomalous signals in diffraction data for low energy SAD phasing method has been carried out. As results, a helium gas cryo-stream system and a helium gas substitution chamber has been made to decrease X-ray absorption effects around samples. In addition, automated data processing system which rapidly evaluates a level of anomalous signals in diffraction data has been developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	18,500,000	5,550,000	24,050,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質 X 線結晶構造解析は飛躍的な進歩を遂げ、分子生物学研究において一般的なツールとなりつつある。その中で研究者の関心はより解析の困難なヒト由来蛋白質や膜蛋白質へとシフトしており、それらの構造解析を可能とする技術への要求が高まっている。波長が 1.6 Å よりも長い、いわゆる低エネルギー X 線領域では、蛋白質中に天然に含まれる硫黄原子からの異常散乱シグナルが増大するため(図 1)、ネイティブの結晶のみで構造解析を行うこと

が可能となる。したがって発現系の構築が困難でセレノメチオニン置換体を作成することが出来ない蛋白質などに非常に有利である。

低エネルギー X 線を用いた構造解析手法(低エネルギーSAD法)のためには微弱なシグナルを正確に測定する必要があるが、近年の実験・解析手法の発達によりその成功例が多く報告されるようになってきた。しかしながら、X 線の吸収効果が大きいという実験上の制約のため、この手法はまだ一部の経験豊富な研究者が利用するにとどまっており、多くの研究者が汎用的に用

いるためには実験手法の確立というものが望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、高輝度で波長可変な放射光ビームラインを利用し、低エネルギー領域の X 線に特化した実験装置の開発、およびデータ収集・解析手法の開発を行うことで、低エネルギー SAD 法の汎用化を目指した。

3. 研究の方法

(1) ヘリウムガス吹付システムの開発

タンパク質結晶から X 線回折データを取得する際には、通常 100K 程度の窒素ガスを吹き付けながら結晶を冷却する。これはタンパク質結晶が高強度の X 線によって損傷することを防ぐためである。しかしながらこの窒素ガスは入射 X 線及び散乱の光路にあり、X 線の吸収効果から回折イメージのバックグラウンドノイズの上昇、回折点の強度低下を招き、回折データの精度を悪化させる。そこで吹き付けるガスをより吸収効果の少ないヘリウムガスにすることでこれらの問題を低減することを行った。ただし、ヘリウムガスは一般に高価であり、実験中常にヘリウムガスを吹き付けガスとして消費することはコストの面から現実的ではない。そこで、データ収集時のみ吹き付けガスとしてヘリウムガスを使用し、データ収集時以外の試料交換時やセンタリング時は窒素ガスを使用できるようなガス交換システムの開発も同時に行った。

(2) ヘリウムガスチャンバーの開発

(1) で述べたように X 線は試料まわりのガスによって吸収され、回折データの精度を悪化させるが、これは回折計のコリメータから試料まで、および試料から検出器表面までに存在する空気も同様である。そこで、これらの空気についてもヘリウムガスに置換することが出来るようなヘリウムチャンバーの開発を行った。

(3) 回折データ自動処理システムの開発

回折データ中の異常散乱シグナルは放射線損傷の進行に伴い減衰していく。そのため、回折データが位相決定に十分な異常散乱シグナルを有しているかを判断するためには、実際に回折データを処理し、異常散乱シグナルの存在を示す統計値をモニターする必要がある。また、ビームライン性能の向上に伴い、X 線の輝度が格段に高くなった現在、一つの結晶から低エネルギー SAD 法に必要な高精度の完全データセットを収集することは難しく、複数の結晶から得られる部分的なデータセットを足し合わせることで、完全データセットを得ることが必要となってくる。こ

れらの回折データ処理を効率的にかつ汎用的に行うためには、ビーム多インでの回折データ収集の進行に合わせて、自動的に回折データを処理するシステムが必要となってくる。このためのシステムの開発を行った。

4. 研究成果

(1) ヘリウムガス吹付システムの開発

低温ガス吹付装置としては、窒素ガスとヘリウムガスの両方が冷却可能であり、さらにヘリウムガスが最大 20 K まで冷却可能である Cryo Industry 社の CRYOCOOL-G2b を選定した(図 1)。2つのマスフローコントローラと 5つのバルブ、それらを制御するソフトウェアからなるガス交換システムを独自に開発し(図 2)、上記低温ガス吹付装置と組み合わせることで、利用者が簡単に窒素ガスとヘリウムガスを切り替えられるヘリウムガス吹付システムとした。このシステムでは、試料の温度を 100K 近傍の低温に保ちながら窒素ガスからヘリウムガスへ、またはその逆のヘリウムガスから窒素ガスへ切り替えられることが確認された。また、その切り替えに要する時間が約 15 秒と十分に実用的であることも確認した。さらにはヘリウムガス使用時に 25 K までの低温ガスを安定に吹き付けることが出来ることを確認した。これは今後問題となってくるタンパク質結晶の放射線損傷問題の解決にもつながることが期待される。



図 1. Cryo Industry 社製低温ガス吹付装置
移動が簡便になるようにラックに搭載された本装置はコールドヘッドとトランスファーライン、温度制御装置から成る。

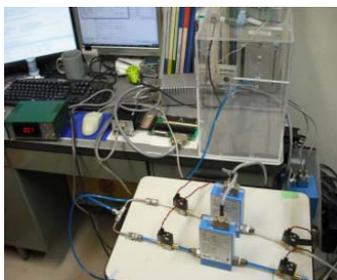


図 2. ガス交換システム

2つのマスフローコントローラと 5つの電磁制御バルブ(左図)と制御ソフトウェア(右図)から成る。

このヘリウムガス吹付システムはもともと低エネルギーSAD 実験を行うときに各ビームラインに簡便に設置できることを目的に、移動が容易な構造で作成したが、この装置開発の経験の元に、低エネルギーSAD 法に特化したビームライン BL-1A においては同様のシステムを別途用意し、使用している。

(2) ヘリウムガスチャンバーの開発

ヘリウムガスチャンバーは BL-17A 専用のもので、図 2 にあるようなものを作成した。データ収集時には完全に試料雰囲気はヘリウムガスに置換するものの、試料交換時には利用者やビームラインに設置されている自動結晶交換システムが回折計にアクセスできるように、チャンバーが分離できるような構造としている(図 3)。試料側のチャンバーは上面および下流面が解放されているため、試料交換時には試料雰囲気のヘリウムガスが完全に空気に入れ替わってしまうが、10L/min 程度流れるヘリウムガス吹付装置からのガスを供給源とすることで、チャンバー連結から約 2 分でチャンバー内がヘリウムガスに置換されることを確認している。この時間はサンプルのセンタリング等に要する時間に相応するもので、実験上問題ないと考えられる。

しかしながら、チャンバーの連結の際に、回折計の他のコンポーネントである X 線成形スリットが 10~20um 程度シフトしてしまうことが判明した。このシフト量は BL-17A の X 線ビーム径約 40 um に対して相当な量であり、試料位置でのビーム強度が 10% 程度まで減少してしまう。この問題を解決するために、コンポーネント構成の見直しや、ヘリウムチャンバーのサポートの増強を今後行っていく予定である。



図 3. ヘリウムガスチャンバー

試料側チャンバー(左上)と検出器側チャンバー(右上)から成る。これらはデータ収集時には連結する。(下)



(3) 回折データ自動処理システムの開発

回折データの自動処理システムは構造生物ビームラインのリモートモニタリングシステムとして利用されている研究開発ミドルウェアである RCM システム(キャトルアイサイエンス社製)をベースに開発を行った。ビームラインでは行った実験の条件と結果がデータベースに取り込まれるようになっており、その取り込みの際に回折データ処理を行い、その結果も同様に取り込むようにした。これにより利用者は回折イメージや結晶の写真とともに回折データの統計値も容易に閲覧することが可能となった(図 4)。また、必要に応じて利用者が処理パラメータを変更して再処理を行うインターフェースも確立した。

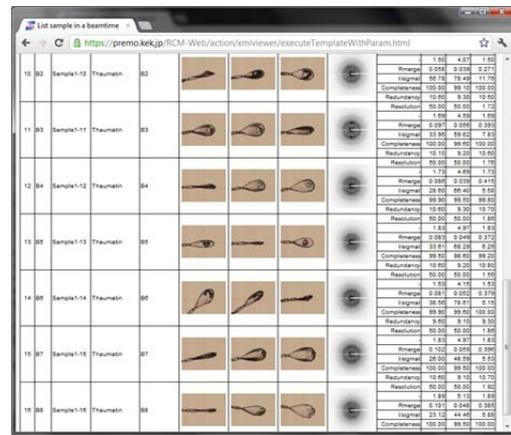


図 4. 自動回折データ処理システムの Web インターフェース

このシステムを活用する予備実験として、複数の結晶から回折データを収集し、放射線損傷の程度が小さな状態の回折データを足し合わせることで、低エネルギーSAD 法の成功率が格段に上昇することを確かめた(図 5)。

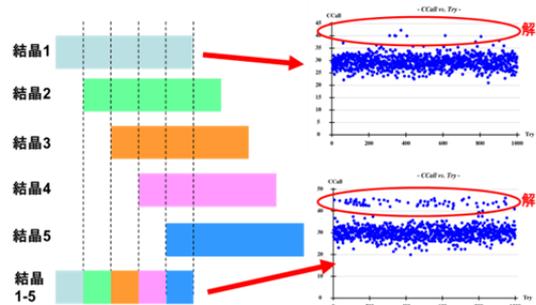


図 5. 複数の結晶からの足し合わせ
左図はデータ処理の方法を模式的に示したもので、右図は SHELXD の結果である。単一の結晶からのデータセット(上)に比べて、複数の結晶から放射線損傷の程度が小さい領域を足し合わせたデータセット(下)のほうが高い成功率を示している。

このような実験手法と自動回折データ処理システムとを組み合わせることで、位相決定手法に高度な知識・経験を有さない利用者でも簡便に低エネルギーSAD法が利用できるシステムが開発できると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 山田悠介、PF 構造生物ビームラインにおけるデータ管理、第29回PFシンポジウム、2012年3月15日、つくば国際会議場
- ② 山田悠介、PF 構造生物ビームラインにおける全自動回折実験システムの高度化と汎用化、第25回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム、2012年1月9日、鳥栖
- ③ 山田悠介、PF 構造生物ビームラインにおける高度化への取り組み、平成23年度日本結晶学会 年会及び総会、2011年11月24、25日、北海道大学
- ④ 山田悠介、PF 構造生物学ビームラインにおける回折データセットの収集と解析の自動化、第28回PFシンポジウム、2011年7月12日、つくば国際会議場
- ⑤ 山田悠介、高エネ研フotonファクトリーにおける生体高分子X線結晶構造解析ビームラインの高度化、第33回日本分子生物学学会年会第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド
- ⑥ 山田悠介、PF 構造生物ビームラインの高度化と自動化、平成22年度日本結晶学会年会、2010年12月3日、大阪大学コンベンションセンター
- ⑦ 山田悠介、より高度なタンパク質 X 線結晶構造解析のための回折データ処理の自動化、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、2010年1月9日、つくば国際会議場

[図書] (計 1 件)

- ① 高エネルギー加速器研究機構 構造生物学研究センター 編、共立出版、入門 構造生物学 -放射光X線と中性子で最新の生命現象を読み解く-、2010、203

[その他]

ホームページ等

<http://pfweis.kek.jp>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし