

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23600016

研究課題名(和文)新規微小結晶マウント法とキセノン加圧誘導体調製法の開発

研究課題名(英文)A new capillary mounting technique for protein microcrystals and its derivatization by xenon

研究代表者

熊坂 崇 (Kumasaka, Takashi)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・タンパク質結晶解析推進室・副主席研究員

研究者番号：30291066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射光マイクロビームは蛋白質結晶学にも新展開を導き、10 μm程度の微結晶で原子分解能の構造解析を可能にした。しかし研究開始当時の2011年にも微結晶の操作は難しかった。課題解決のため、細胞へのマイクロインジェクションを参考に新結晶マウント法を開発した。ガラスの硬さを生かして作成した先端径15 μmのテーパ形状のキャピラリは結晶を保持しつつ、凍結も可能にした。細さゆえ溶媒が減らせ、散乱X線を減らす効果が得られた。耐圧性を利用したガス加圧では、ねじ式ピンにキャピラリを取付け、加圧装置に直接つないだ。簡単な操作で卵白リゾチーム結晶のキセノン誘導体を作成でき、異常分散効果による位相決定も実現した。

研究成果の概要(英文)：Synchrotron microbeam technology has opened the new window of protein crystallography enabling us to analyze atomic structures from the microcrystals with the size of ca. 10 μm. Such tiny and fragile crystals, however, were difficult to be handled in 2011 when this project has been started. To solve the issue, we developed a mounting technique inspired by a capillary used for microinjection in cell biology. Glass capillary is rigid, therefore it can be made sharper. The fine and tapered capillary, with 15 μm diameter at its tip, successfully held and cooled the crystals. The capillary can minimize amount of solvent, leading to the reduction of X-ray scattering noise. Since the capillary is resistant to pressure, it is also used as a gas-derivatization tool. The capillary attached to a screw-type mounting tool can directly connect to the gas-pressurization device. By a simple procedure, the xenon-derivatives of egg-white lysozyme crystals was prepared and phased by X-ray anomalous data.

研究分野：放射光構造生物学

キーワード：結晶解析 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

高輝度放射光は測定試料の微小化に大きく貢献しているが、微小な試料の取り扱いにより困難になってきている。特に水等の揮発性溶媒を含む試料では、操作中の溶媒の蒸散によって溶媒溶質比が変化し、その結果として構造変化をはじめとする試料状態の変化をもたらす。分析測定中であれば測定結果の一貫性を損なう。したがって、この種の試料を安定に支持する方法は、測定の根幹に関わる課題である。

特に、タンパク質結晶は溶媒水の含有量が25-75%と高く、その蒸散によって表面形状の変化やひび割れ、局所的な相転移などが起こり、X線回折能が顕著に低下する場合が多い。このため、これまでに試料を支持する方法として主にガラスキャピラリー封入法とクライオループ法が利用されてきた。

キャピラリー封入法では、試料をそのサイズに対応した数百 μm ～数 mm 径の肉薄のガラス細管中に置き、ワックスやガラス自体の溶融などで封入する。この際、共存していた溶媒を細管内の先端部等に微量入れ、管内の溶媒蒸気圧を一定に保つことにより、試料の変質を防いでいる。この技術は長らく利用されてきたが、近年一般的に用いられている液体窒素温度での試料凍結は困難なため、現在ではほとんど用いられていない。

試料凍結は、放射光などの高輝度量子ビームによる試料の放射線損傷を回避するため、一般となっている。その場合の試料支持には、一般にクライオループと呼ばれているマウント具が使われる。その構造は、10-20 μm 径のナイロン繊維を試料サイズと同等の径をもつ環状にしたものや、ポリイミド等の高分子膜をリソグラフィの技術で環状に加工したものを、金属製の細い筒の先端に接着剤で取り付けられたものとなる。この方法では、まず試料を溶媒ごと環の部分にすくい取る。試料を封入しないために溶媒の蒸散が起こるが、すくい取った後ただちに凍結することで、その問題を回避している。

しかしながら近年、分析技術の進展によって、数 μm ～数十 μm のより微小な試料でも測定が可能になってくると、この方法では散乱ノイズや放射線損傷の原因となる溶媒等の試料以外の成分を微小化することが難しくなってきた。この問題を回避するため、マウント時に溶媒を除去するキャピラリートップマウント法(Kitagoら2005)が開発されているが、微小結晶には構造上やや困難だと考えられる。また、クライオループは開放系であるため溶媒の蒸散が起こりやすく、凍結までのわずかな時間でも、微小試料の場合は損傷が起きることがしばしば確認されている。このため、これに代わる少ない体積の試料を安定に支持する方法が必要となっている。

試料マウント法のもう一つの課題として、ガス置換実験がある。分析測定では、試料を

種々の条件下に置き、その構造や機能の変化を調べる実験も多く行われている。例えば、酸素を吸着するヘモグロビンの研究では、 O_2 、 CO 、 NO などへの分子応答や構造変化が調べられている(Kroeger & Kundrot 1994)。また、キセノンなどの希ガスがタンパク質に結合することを利用した重原子誘導体結晶の作成法は、一部の試料で有効性が示されている。一般にX線照射実験にはガス置換に特化した専用の装置が必要となり、主に以下の3種類があるが、それぞれに一長一短がある。

(i) 高压容器に室温に保持した試料をマウント具ごと差し込んでガスを吸着させる。しかし、試料凍結前にガス圧を大気圧に戻すため、分子吸着の圧力依存性を調べるのが困難で、高压条件を維持することが望ましい誘導体作成に難がある。

(ii) ガス圧を高压に維持して凍結する装置は、圧力容器の体積が相対的に大きく、かつガスの回収が困難である。毒性の高いガスや希ガスなどの高価なガスの取り扱いには難がある。

(iii) 凍結した試料を、液体窒素中に保持した高压容器に差し込んでガスを吸着させる方法も近年開発された。しかし、ガス吸着には高压容器を含めた系全体の温度上昇が必要になる場合は試料へのダメージが見られている。

2. 研究の目的

これら2つの課題を一度に解決する方法として、液体窒素温度での凍結とガス置換を簡便に行うことができる微小試料用微細ガラスキャピラリーによる試料マウント法およびマウント具の開発を進めることを目的とし、1) マウント法の簡便化、2) ガス加圧状態で試料を凍結する方法の開発、3) 希ガス加圧により重原子を導入した誘導体試料による構造解析法の開発を中心に行った。

3. 研究の方法

(1) ガラスキャピラリーへの試料の封入方法

試料を数十 μm の極微細な管内に導入する方法としては、直接吸引(毛細管現象を含む)、ピペット等で吸い上げた試料を根元部から挿入する、管内で試料を調製するなどの種々の方法が考えられる。これらの方法について検証する。また、先端部の封止についても、接着剤、ガラス溶融、予め封じておいた管に根元部から挿入する方法などを検討する。

(2) ガラス細管のデザイン

これまで試料マウントに用いられてきたクライオループに比べて、本法は比重の大きいガラスをマウント部分に利用している。このため、X線散乱が相対的に強く起こり、回折データに影響があると考えられてきた。この問題を回避するために、ガラスを極薄い肉厚(数 μm)にしているが、微細なガラス直管は剛性が低いことがこれまでの予備調査で明

らかとなっている。冷却は一般に低温ガスの吹き付けでなされるが、吹き付けられるガスの乱流や脈流などの乱れのために、試料の振動が避けられない。またガラス管が細くなるほど冷却速度が上がるが、振動に弱くなり、測定に支障を来たした。そこで、細管構造（径・肉厚・形状など）をさまざまに検討し、剛性と X 線散乱のバランスが取れるデザインを決定する。

(3) ガス加圧法の開発

このマウント法のベースとなっている自動サンプル交換ロボット(Ueno ら 2004)では、マウント具のベース部分に特徴的なねじが採用されているので、従来の磁石による固定に比べてガスの封じ切りに都合がよく、極微小なガス耐圧の閉空間を容易につくることができている。これまでの初期的な実験により、2 MPa の窒素ガス条件においても十分に耐えることは確認済みであるが、加圧した状態での凍結実験については未実施であり、本課題で開発する。このため、本装置に直結できるガス圧調整装置を試作・改良し、既存の試料自動マウント装置に接続して凍結を行いながら試料管理ができる系を構築する。

(4) ガス加圧法の実証実験と改良

ミオグロビン・ヘモグロビンといった比較的入手しやすいガス吸着性のタンパク質の結晶を利用し、実際にどのような形で実験が可能かを検証する。また、ガス吸着の構造研究においては、比較的大きな結晶試料からの高分解能データの収集が必要になる場合もあり、微小試料に限らず大型試料でのマウント法と加圧実験の可能性を検討する。

(5) サンプル自動マウントロボットでの利用検討

ガス加圧に際してマウントロボット SPACE 用のネジ式試料ピンを併用するため、同時にロボットでの試料管理が可能であるか確認する。

(6) 希ガス誘導体結晶による位相決定法の開発と評価

キセノンやクリプトンなどの希ガス類はタンパク質の空隙に van der Waals 相互作用によって結合するとされているが、大気圧ではその結合力が弱いため 0.5 - 5 MPa 程度の高圧条件が必要とされている。開発中の本装置では、これらの条件を十分に満たし、圧力をかけたままで凍結が可能であるため、この方法の適用を試みる。種々のタンパク質結晶を用いて、加圧後に大気開放して凍結する従来法と比較するとともに、加圧条件と占有率の関係を評価して適切な加圧条件を探索し、より効率的な重原子誘導体作成法の開発につなげる。

また、希ガス類はタンパク質に結合しなくても、溶媒に溶け込むことによって溶媒の電

子密度を変化させるコントラスト変調実験が可能である。クリプトンでは K 吸収端の波長が約 0.86 Å であり、異常分散効果によるコントラスト変調実験も適用できる。タンパク質結晶解析においても容易に溶媒コントラスト変調が可能な系としての構築を進める。

(7) 低温で晶析した試料の操作・保持：ガラス細管内結晶化は脆い試料を安定に保持するのに有効な方法である。サンプルマウントと結晶化を両立させることを目的とし、とくに操作が難しい低温で析出する結晶の操作に注目して、試料劣化を最小限にした試料操作方法の開発を試みる。

4. 研究成果

(1) ガラス細管への試料の封入方法

試料の安定保持には有利であるが操作性にやや問題がある本法について、試料を管内に導入する方法を種々検討した。単純に片側末端部を閉じることで、指で操作し温度変化を生じさせることで管内ガス圧を調節する簡便な方法を検討したところ、若干の慣れは必要なものの、操作が十分に可能であった。

一方、微量を操作できるピペットで吸い上げる方法を検討した当初、管への吸引時に脈流が見られ、微量の制御にはさらに検討が必要であることが明らかとなった。

そこで細胞に生理活性物質を導入するマイクロインジェクション法で用いられる空圧インジェクタを適用したところ、良好な操作性が得られることを確認した。また、精密デジタルピペットコントローラを導入して、この空圧インジェクタとの操作性の比較を行った。吸引量を厳密に制御できる本装置を利用することで、手動操作に比べて微小結晶の操作性が向上し、封入方法として複数の手段が使えるようにした。

結論として、毛細管現象を利用した吸引に加え、空圧マイクロインジェクタおよび電動ピペッタを導入したことで操作性が格段に向上したため、広く利用者に普及させることができそうであり、実際に放射光施設 SPring-8 において利用提供を開始した。

(2) ガラス細管のデザイン

キャピラリープラーを用いて様々な形状でガラス管を加工したところ、形状をテーパ状にし、先端部をマイクロフォーシで落とす位置を変えることで、開口サイズをさまざまに変化させながらも、剛性を保てることを確認できた。また、10 μm 程度の微小結晶を吸い込む内径では X 線散乱等には問題がなく(図 1)、おおよそ 150 μm くらいの外径になったところで冷却効率の問題が生じることが明らかとなった。しかし、すでにこれらより太い管で凍結させる実験に成功している事例も報告されており、実際の実験では抗凍結剤の条件検討を併用することで、広口径でも

実施可能と考えられる。

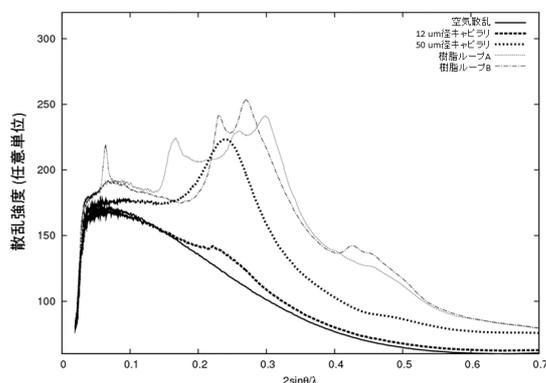


図1: マウントツールによる X 線散乱

この細管については、細管を含む試料ピンの製作について結晶マウントツールメーカーと協議し、販売を含めて提供が可能となった。

(3) ガス加圧法の開発

理研・上野らが開発した自動サンプル交換ロボット (SPACE) 用試料ピンに接続したキャピラリーを用いたシステムを構築した(図2)。これを用いて、抗凍結剤に浸したリゾチーム結晶を2 MPaのキセノンガス条件においてガラス状で凍結することができ、今後の開発に支障のないことを確認できた。

引き続き、ガスリークを防ぐためマウントツールの見直しやビームラインでの測定条件の最適化を行った。さらに、汎用性を高めるため、SPACEの一部として設置されていたシステムを、一般的なゴニオメータに装着される一般的な磁石アタッチメントにも設置できるよう、新たな治具を製作した。



図2: ガス加圧装置。A: 装置全体像、B: ねじ付SPACE用試料ピン、C: 放射光実験時の様子。

(4) ガス加圧法の実証実験と改良

キセノンガス・クリプトンガスについて、ガス圧と結晶内のガス分子の占有率の関係を調べた。また、微小結晶に利用することを目的として開発された本マウント法を、80マ

イクロメートル程度の結晶にも試み、良好な回折データを取得できることを確認した。

ただ、当初計画していたガス吸着蛋白質 (ミオグロビン・ヘモグロビン) については、試料の調達について共同研究を開始しているが、CO ガスを使用した測定環境の整備が予算的に実施できなかったため、継続して検討を行っている。

(5) サンプル自動マウントロボットでの利用検討

マウントロボット SPACE 用のネジ式試料ピンによるロボットでの試料管理が可能であることは確認できた。

一方、キャピラリーが破損しやすいガラス細管製であることから、ロボットの安定運転に支障が出る可能性を考慮し、より破損時に支障のない樹脂コーティングを検討した。また、これによる耐压性能の向上も期待できる。

(2)に示した業者と共同で樹脂コーティングを試みた。厚みのムラが生じやすい難点はあるが、作製は可能で期待した効果がみられた。この難点に関しても樹脂の粘度を調整することで良好な結果が得られつつあり、引き続き高度化を継続中である。

(6) 希ガス誘導体結晶による位相決定法の開発と評価

キセノン及びクリプトンガスでの加圧実験を行い、リゾチーム結晶でのガス吸着を確認し、本法が従来法に比べて優れた点を明らかにすることができた。従来は希ガス加圧後、大気圧に戻してから試料凍結を行っていたが、本法では加圧状態のまま凍結できる。卵白リゾチーム正方晶を用いて、加圧時凍結および減圧後凍結の試料で、希ガスがどのような蛋白質の領域に結合するかを調べた。加圧時凍結の結果、従来見出されていた結合部位2箇所に加え、新たに2箇所の結合を確認した。従来キセノンは溶媒から隔離されたポケットに結合するとされていたが、新たな結合部位はいずれも分子表面に位置していた。このことは、これまで結合が見られなかった試料についても誘導体を作成できる可能性が広がったといえる。

さらに引き続き実施したシステムの最適化により、リゾチーム正方晶での位相決定にも成功した。他のガス吸着蛋白質での初期的な実験でも手法として利用できることが分かった。

(7) 低温で晶析した試料の操作・保持

最終年度に導入した低温インキュベータに観察用の CCD カメラを組み合わせたシステムを構築できた。引き続き、結晶化と凍結操作の簡便化を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Mizuno, N., Makino, M., Kumasaka, T., A convenient tool for gas derivatisation using fine-needle capillary mounting for protein crystals. *J. Synch. Rad.*, 20, 999-1002 (2013). 査読有. doi:10.1107/S0909049513021584

(2) Makino, M., Wada, I., Mizuno, N., Hirata, K., Shimizu, N., Hikima, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Fine-needle capillary mounting for microcrystals. *J. Appl. Cryst.*, 45, 785-788 (2012). 査読有. doi:10.1107/S0021889812024545

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Mizuno, N., Makino, M., Kumasaka, T., Advanced crystal mounting tool for gas pressurization improves efficiency of xenon-derivatization. AsCA'13, Hong Kong, Dec 8 (2013).

(2) Kumasaka, T., Mizuno, N., Baba, S., New versatile crystal mounts using hydrophilic polymer glue with humidity control and fine capillary developed at SPring-8. ISDSB2013, Nagoya Trade & Industry Center, Nagoya, Aichi, May 26 (2013).

〔図書〕(計 1 件)

(1) 水野伸宏, 熊坂崇, シーエムシー出版, III-1-3 Fine-needle キャピラリーを用いたマウント法, 「タンパク質結晶の最前線」(杉山成監修) 2013, p163-171 (全 288 頁)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 微小試料用キャピラリー

発明者: 熊坂崇, 牧野正知, 桑本いづみ, 山本雅貴

権利者: 公益財団法人高輝度光科学研究センター, 国立研究開発法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2012-18603, 特開 2013-156218

出願年月日: 平成 24 年 1 月 31 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://bioxtal.spring8.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊坂 崇 (KUMASAKA, Takashi)

高輝度光科学研究センター・タンパク質結晶解析推進室・副主席研究員(室長代理)

研究者番号: 30291066

(2) 連携研究者

牧野 正知 (MAKINO, Masatomo)

島根県産業技術センター・研究員

研究者番号: 30529582