

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657100

研究課題名(和文)多チャンネル・セルを用いたハイスルーブットX線小角散乱

研究課題名(英文)Multi-observation-port cuvette for solution scattering

研究代表者

秋山 修志 (AKIYAMA, Shuji)

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・教授

研究者番号：50391842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：X線小角散乱はタンパク質分子の形状を評価する手法で、近年、X線結晶構造解析との相補的利用が主流となりつつある。本課題では、多チャンネルセルを開発してデータ収集効率を向上させることを目的としている。これまでの試行を通じて、大面積シール法による多チャンネル化が多大な困難を伴うことが判明し、当初の計画を根本的に見直すこととなった。現在、電動ピペッターを2軸アクチュエータに取り付け、それをセル、制御系、計測系とリンクさせる代替案について検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Small-angle x-ray scattering (SAXS) is one of the powerful methods to evaluate the size and shape of macromolecules in solution. This project aims at improving a throughput of SAXS measurements by developing a multi-observation-port cuvette. According to the experimental trials so far we made, it was technically difficult to seal many observation ports so uniformly with a large-area quartz window. Thus, we had no choice but to make an alteration to the original plan so that the samples were semi-automatically supplied to a single-port cuvette with an auto-dispensing apparatus mounted on X-Y electronically actuating devices.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：X線 散乱 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

X線小角散乱はX線結晶構造解析の長所と短所を逆転させたような存在で、試料の種類・状態に対する制限は低く、分子の大きさ・形を生理的溶液条件で検証することができる。X線結晶構造解析ほどの高分解は望めないが、小タンパク質やドメインを捉えるには十分な分解能である。よって、タンパク質複合体を構成する因子について高分解能構造(X線やNMR)が既知であれば、それらをX線小角散乱で調べた複合体全体の低分解能構造と照らし合わせることで、タンパク質複合体の構造や時間発展を調べることが可能となる。生体高分子の構造解析はX線結晶構造解析やNMRが主流であるが、動的性質の強い観察対象やそのダイナミクス調べるといった目的から、X線小角散乱を相補的にタイアップさせた研究論文が数多く出版されつつある。

生体高分子を対象としたX線小角散乱実験は相応の手間を要する。放射光施設を利用した実験の場合、実験者は次のA~Gの操作を行うこととなる。A: タンパク質や核酸などを含む溶液試料を観測セルに封入する。B: 観測セルを入射X線光軸上にマウントする。C: ビームラインの実験ハッチを閉じる。D: 試料にX線を照射して散乱像を記録する。E: 実験ハッチを開ける。F: 観測セルを取り出す。G: 観測セルを洗浄し乾燥させる。

試料がタンパク質分子である場合、「タンパク質を含む緩衝溶液の散乱強度」から「緩衝溶液だけの散乱強度」を減ずる必要があるため、1つの試料に対して上記の手順を2回(サンプルおよびバッファー計測)繰り返すことになる。また、対象の大きさや形状を正しく評価するためには粒子間の干渉効果を解消することが必須で、そのために5点以上の異なるタンパク質濃度でデータを収集する。よって、ある1種類の試料についてデータセットを得るには、A~Gまでの手順を2(サンプルとバッファー)×5(異なるタンパク質濃度)=10回以上繰り返す必要が生じる(1回20分として計3時間強)。実験室内用の装置であった場合、実験者が拘束される時間はこの数十倍にもなる。

2. 研究の目的

本申請課題は、多チャンネル型のX線小角散乱セルを開発する。これにより、実験データの質を大きく損なうことなく、実験にかかる人的・時間的なコストを大幅に削減することを目的としている。

3. 研究の方法

市販されている96wellのマイクロプレートのデザインをベースにX線小角散乱用の多チャンネルセルを検討した。試作機の準備、純水や標準BSA試料の散乱計測などを通じて、観測ポートの同一性を評価した。

一方、実験室内用のX線小角散乱装置を立

ち上げ、セルホルダーの動きに同期させつつ、X線シャッターや検出器の動作を制御するシステムの構築・調整に着手した。

4. 研究成果

薄いアルミ板にドリルで穴を開け、それを薄い石英ガラスでシールした散乱用セルを試作した。ドリル穴部分に試料を封入してX線溶液散乱を計測したところ、BSAについてはほぼ文献通りの散乱データが得られた。

そこで、アルミ板に複数のドリル穴を開け、同様に石英ガラスでシールした後に評価を行った。しかし、各試料からの散乱強度にはバラつきが見られ、セルの設計の基本部分を再検討することが必要となった。

様々な原因が考えられるが、中でも窓剤のシール方法が重要であり、圧着・接着の方法だけでなく、窓剤の支持部分の工作精度も大きく影響することがわかった。化学的接着として市販のエポキシ系接着剤を使用した場合、接着面積の増大にともなって窓剤に歪みが生じる傾向にあった。今後の多チャンネル化によるシール面積増大を考えると、化学的接着は今回の目的に不向きであることが示唆された。そこで熱によって可逆的に軟硬化が調整できる材料をつかってシーリングを試みた。エポキシ系接着剤に比べてシール作業が容易であり、また歪みが軽減されることがわかったが、この場合にはセルの使用温度範囲が限定されてしまうという別問題が生じた。これらの試行を通じて、大面積シール法による多チャンネル化が多大な困難を伴うことが明らかとなり、当初の計画を根本的に見直すこととなった。

代替案の一つとして、電動ピペッターを2軸アクチュエータに取り付けたシステムを構築し、それを小角散乱計測の試料位置に設置する方法が考えられた。単一の観測窓を有するセルを設置し、上記システムを用いて試料の添加、除去、洗浄などを自動化する計画である。



図1 2軸アクチュエータ上に固定された電動ピペッター 電動ピペッターをXY軸方向に平行移動、Z軸方向(図中赤矢印)に上下させることで、試料の吸入や吐出を自動

的に行う。

電動ピペッターと2軸アクチュエータを一体化したシステムについては、別目的での開発・運用実績があったため(図1) そちらを小角散乱用に調整のうえ導入する準備を進めている。

アクチュエータ及び電動ピペッターの制御に必要なソフトウェアについては Delphi を用いて開発している。あらかじめソフトウェアに特定の動作(吸引、吐出、軸移動、チップ脱着など)を記憶させておくことで、複雑な動作シーケンスについても柔軟に対応できるよう工夫されている。

計測に関する各種情報(ファイル名や測定条件など)は別のソフトウェア上で記録・管理し(図2) 対応する試料とバッファの間で円環平均データの減算を行って、最終的に散乱曲線を出力させている。

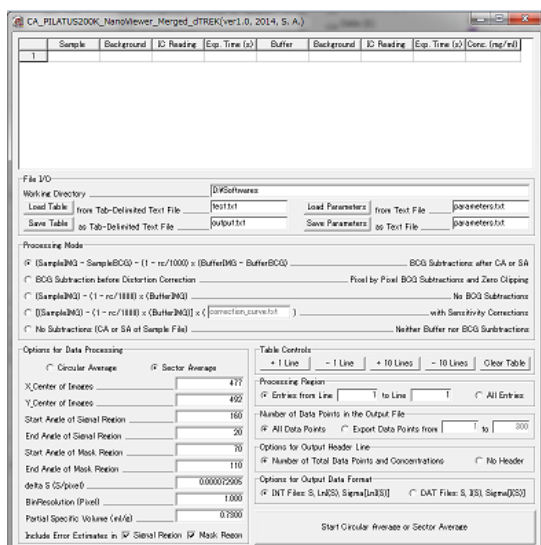


図2 各種計測情報を記録し散乱曲線を出力するソフトウェアの概観

今後の課題は、上記の要素を互いに連携させて全体としての効率化を図ることである。あらかじめ濃度調製された希釈系列を準備しておき、2軸アクチュエータ・電動ピペッターが自動的に試料をセルへと移す。実験室内に設置されているX線小角散乱装置の場合、1試料あたり15~30分の露光を行う。測定後の試料をピペッターにより排出し、洗浄後、バッファの注入・測定を行う。実験室系であれば、30分~1時間で試料・バッファが一对計測される見通しとなる。

今後、セル、2軸アクチュエータ・電動ピペッター、計測系、データ出力系を連携させたシステムを構築し、X線小角散乱計測のスループット向上を図りたい。

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 3件)

Akiyama S., Small-angle x-ray Scattering Study on Cyanobacterial Clock Protein KaiC, The 6th Taiwan-Japan Joint Meeting on X-ray and Neutron Scattering, Taipei, Taiwan (Mar. 11, 2014).

Akiyama S., KaiC as A Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock, Asian CORE Winter School on Frontiers of Molecular, Photo-, and Material Sciences, Taipei, Taiwan (Feb. 25, 2014).

Akiyama S., Tracking and Visualizing Intramolecular Feedback in Cyanobacterial Clock Protein KaiC, The 5th Japan-Taiwan joint meeting on neutron and X-ray scattering, Tokai, Japan (Feb. 26, 2013).

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://bms.ims.ac.jp/AkiyamaG/index.htm>
|

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山 修志 (AKIYAMA, Shuji)
分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・教授
研究者番号: 50391842

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：