

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06862

研究課題名(和文)多数の微小結晶を用いた結晶構造解析手法および自動化システムの開発

研究課題名(英文)Development of automated data collection and processing system for multiple microcrystals

研究代表者

山下 恵太郎 (Yamashita, Keitaro)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：20721690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の結晶構造解析において、特に高難度試料の場合、現状簡便に解析が可能な20-30 μm 以上の大きさの結晶の作製は困難である場合が多い。本研究では多数の微小結晶を用いたデータ収集およびデータ処理の自動化を行うことで、構造解析可能な構造振幅データを自動で得られるようにした。はじめに微小結晶を用いたデータ収集・処理のワークフロー化を行い、これまで手作業が必要であった部分の自動化およびデータ処理プロトコルの確立を行った。これにより、微小結晶作製から構造決定までのプロセスが大幅に短縮された。共同研究により入手した試料を用いてテストを行い、既に多数の構造決定に成功している。

研究成果の概要(英文)：We developed an automated data collection and processing system for multiple microcrystals to allow structure analyses of challenging targets that do not produce crystals large enough to collect complete data from single crystals. The workflow of data collection and processing for microcrystals was first established and automated. The system was tested using various protein samples obtained via collaborations. The data collection and processing, and generation of graphical report were automated. This system dramatically reduced time and human effort that spent after crystallization.

研究分野：X線構造生物学

キーワード：X線結晶解析 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

第三世代放射光による X 線の超高輝度化や、タンパク質調製技術の進歩などにより、1 つのタンパク質の構造決定に必要な時間やコストは大幅に削減された。しかしながら、膜タンパク質や複雑な複合体など生命機能の解明に重要な構造解析の難度は高く、現状簡便に解析が可能な 20–30 μm 以上の大きさの結晶を得ることは難しい。近年、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL32XU で利用可能になったマイクロビーム X 線を用いることで、10 μm 程度の微小結晶からでも高い分解能の回折を得ることができるようになってきたが、放射線損傷により数回程度の照射で試料が破壊されるため、多数の微小結晶から回折強度測定を繰り返し、完全なデータを収集しなければならない。現状この作業は人の手で行う必要があり、また、収集されたデータを 1 つ 1 つ処理し、同型同質なデータに分類した上でマージ処理を行うことは煩雑であり、さらに確立された方法は無かった。

2. 研究の目的

本研究は、多数の微小結晶を用いたデータ収集およびデータ処理の自動化を行うことで、構造解析可能な構造振幅データを全自動で得られるようにし、微小結晶作製から構造決定までのプロセスを大幅に短縮・簡易化することを目的とした。

3. 研究の方法

はじめに、多数の微小結晶を用いた高分解能データ収集・処理のワークフロー化を行い、自動化を行うべき要素を整理した。本研究では、ループ上に多数の結晶が存在している場合を想定しており、試料に厚みもあることから結晶個別の 3 次元的なセンタリングは困難であるため、1 結晶あたりから測定可能な角度領域は 5–10°程度に制限することとした。

結晶位置は、可視顕微鏡による判断がそもそも不可能な場合が多いため、ループセンタリング後は低線量の X 線回折スキャンを行う。この結果の自動解釈は既に開発していた SHIKA システムを用いて行う。微小結晶においては放射線損傷が重篤になりやすいため、KUMA システム[1]を用いて吸収線量を適切に制御したデータ収集ストラテジを構築する。収集されたデータは、既存プログラムをベースに、個別データの積分処理およびマージ処理を行う。さらにデータの分類や異常値棄却も実装する。

共同研究を通じて、膜タンパク質を含む種々の試料を入手し、システムのテストを行った。

4. 研究成果

ロボットによる試料交換、ループのセンタリングおよび回折スキャンとその結果の解釈による結晶位置の特定を経て、各結晶から 5–10°程度ずつ振動写真データを自動収集することが可能になった。Unipuck に収められた凍結結晶を多数用意し、スキャン条件の設定を行えば、自動のデータ収集・処理が可能である。

データ処理は、自動化システム KAMO として実装した。KAMO は実験中の利用だけでなく、実験後に再処理を行ったり他のデータも結合させたりする場合があるため、ユーザーに広く利用されるよう Web (GitHub) 上でオープンソースライセンス (New BSD License) で公開している。KAMO はまず、個別に収集されたデータの指数付けおよび積分処理をプログラム XDS [2] を用いて行う。処理状況は GUI を通じて確認できる。続いて、同種のサンプルに属しているデータのうち、同一格子として処理されているものを選別し、個別に決定された対称性の情報から、頻度をもとに Laue 対称性を仮定する。この時、仮定された Laue 対称性が格子対称性よりも低い場合、

indexing ambiguity の解消が必要になる。この解消は、リファレンスデータがあればそれを利用し、無ければ Selective Breeding 法 [3] を用いて行う。その後、階層的クラスタリング法を用いて、同型なデータに分類する。BLEND [4] を用いた格子定数に基づく分類と、データ間相関係数に基づいた分類のいずれかを用いる。続いて、データの完全性および多重度が十分に高いクラスタ全てに関して、データのスケーリングおよびマージ処理を行う。スケーリングには XSCALE [2] を用いるが、その出力を参照して異常値と判断されたフレームやデータセットの除去を行う。どのクラスタが最良の結果を与えるかを判断するため、最後に HTML 形式のインタラクティブなレポート出力を行う。サンプル情報を事前に与えておくことで、サンプルごとに分解能の決定を含む自動マージ処理を行うことも可能である。また、結晶方位の偏りの情報も視覚的に提供される。将来的には、これらの情報を実験中にリアルタイムに提供し、さらに実験へのフィードバックを行えるようにする予定である。これにより、さらに効率的な構造決定が可能になるだろう。

本成果を用いて、東工大上野研究室との共同研究において、様々な変異等を加えた多角体結晶のデータ収集および処理を行った(雑誌論文: 1)。この他にも、多くの構造決定に成功しており、それぞれ論文投稿中または投稿準備中である。

<引用文献>

[1] K. Hirata, J. Foadi, G. Evans, K. Hasegawa & O. B. Zeldin (2016) “Structural Biology with Microfocus Beamlines” *Advanced Methods in Structural Biology*, Springer Protocols, pp. 241–273.

doi: 10.1007/978-4-431-56030-2_14

[2] W. Kabsch “XDS” *Acta Cryst. D66*, 125–132, 2010.

doi: 10.1107/S0907444909047337

[3] W. Kabsch “Processing of X-ray snapshots from crystals in random orientations” *Acta Cryst. D70*, 2204–2216, 2014.

doi: 10.1107/S1399004714013534

[4] J. Foadi, P. Aller, Y. Alguel, A. Cameron, D. Axford, R. L. Owen, W. Armour, D. G. Waterman, S. Iwata and G. Evans “Clustering procedures for the optimal selection of data sets from multiple crystals in macromolecular crystallography” *Acta Cryst. D69*, 1617–1632, 2013.

doi: 10.1107/S0907444913012274

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) Satoshi Abe, Hiroyasu Tabe, Hiroshi Ijiri, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Kohei Atsumi, Takuya Shimoi, Masaki Akai, Hajime Mori, Susumu Kitagawa, Takafumi Ueno “Crystal Engineering of Self-Assembled Porous Protein Materials in Living Cells” *ACS Nano*, **11**, 2410–2419, 2017. 査読有.

doi: 10.1021/acsnano.6b06099

[学会発表] (計 3 件)

(1) 山下恵太郎, 平田邦生, 河野能頭, 上野剛, 長谷川和也, 熊坂崇, 山本雅貴「PX ビームラインにおける回折データ自動処理・構造決定システムの開発」第 30 回放射光学会年会, 2017 年 1 月 7–9 日, 神戸芸術センター (兵庫県神戸市)

(2) 山下恵太郎, 平田邦生, 河野能頭, 上野剛, 長谷川和也, 熊坂崇, 山本雅貴「回折データ自動収集・処理システム Zoo による微小結晶を用いた高難度タンパク質構造解析の効率化」第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016

年 6 月 7-9 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

(3) 山下恵太郎, 平田邦生, 河野能顕, 上野剛, 長谷川和也, 熊坂崇, 山本雅貴「微小結晶のための回折データ自動処理システムの開発」第 29 回放射光学会年会, 2016 年 1 月 9-11 日, 東京大学柏の葉キャンパス駅前サテライト (千葉県柏市)

[その他]

ホームページ等

<https://github.com/keitaroyam/yamtbx/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 山下恵太郎

(Keitaro Yamashita)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号 : 20721690