

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05407

研究課題名(和文) フェムト秒X線パルスを用いた高速単粒子解析による液体中微粒子の非平均構造の研究

研究課題名(英文) Non-average structure of particles in liquid studied by fast single-particle analysis using femtosecond X-ray pulses

研究代表者

登野 健介 (Tono, Kensuke)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・XFEL利用研究推進室・主幹研究員

研究者番号：00353508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：XFEL施設SACLAにおいて微小粒子の構造解析システムの開発を行い、生体物質の機能発現メカニズムの解明に向けた研究を行った。特に、システムの肝となる効率的な試料導入法として、XFELと同期させたパルス液滴ノズルから試料を導入するシステムを開発した。この試料導入システムをSACLAの回折計測システムに導入し、マイクロメートルサイズの微結晶の構造解析を行った。さらに、光学レーザーと組み合わせ、光応答性蛋白質の動的構造解析実験を行い、本研究で開発した手法が物質の機能解析に有効であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Function analysis of biological materials has been performed at the SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser (SACLA) by using a newly developed experimental system for obtaining dynamical structure of micrometer-scale particles. A pulsed droplet injector was developed as an efficient sample delivery tool in the experimental system, which was successfully applied to the structure analysis of small protein crystals. By combining with an optical laser, this system was able to capture structural dynamics of photo-responsive protein. These studies demonstrate that the new experimental system is highly useful for function analysis of materials.

研究分野：物理化学

キーワード：X線自由電子レーザー X線構造解析 X線回折

### 1. 研究開始当初の背景

高機能物質の創成を目指す研究開発においては、モデルシステムを対象として多様な分析技術を適用し、物質の構造と機能の相関を明らかにすることが極めて重要な過程となっている。このような過程を経ることで、より機能の高い物質のデザインが可能となる。ナノメートルスケールの微小な粒子をターゲットとする材料科学や創薬分野の最先端研究においては、多数粒子の集団からのアンサンブル平均を求める分析技術では不十分となってきており、個別粒子の個性にまで踏み込んだ分析が求められている。すなわち、集団の中で特に高い機能を発揮する物質構造を突き止め、物質デザインのターゲットを絞ることが研究開発の効率を飛躍的に高める。

現象を理解するための分析法については、レーザー光を利用した計測技術の急速な発展により、個別粒子を対象とした分析への流れが 20 年くらい前から生まれている。特に共焦点レーザー顕微鏡に代表される液相中の単一粒子計測法が 1990 年前後から盛んに開発され、現在では、物理化学や生物化学の最先端研究に欠かせない分析技術となっている<sup>1)</sup>。

このような状況の中で、直接的な構造解析手法による単粒子分析の需要が高まっていた。液相中の微粒子の構造解析には物質透過能の高い X 線が広く利用されており、特に代表的な構造解析法である X 線散乱・回折法は、生体試料、有機高分子、各種コロイドなどを対象とした構造解析に不可欠なツールとなっている。このような手法は単粒子の分析にも適用できるものの、実現させるには既存の光源をはるかに凌ぐ輝度の X 線源が必要であった。

このような状況のもとで、究極の X 線源である X 線レーザーの開発が世界的に進められた。2009 年、遂に X 線自由電子レーザー (XFEL) が登場し、単粒子構造解析の可能性が拓けた。研究開始当時に稼働中の XFEL 施設は、アメリカの Linac Coherent Light Source (LCLS) と日本の SPring-8 Angstrom Compact free electron Laser (SACLA) の 2 施設であった。既に両施設において X 線回折顕微鏡による単粒子イメージングの実証が行われ、SACLA においては 10 nm 以下の分解能で金属微粒子の単粒子構造解析が可能となった<sup>2,3,4)</sup>。

### 2. 研究の目的

本研究は、開発段階にあった X 線単粒子構造解析を、物質創成研究における標準的手法へと発展させるものである。特に物質の機能を理解する上での非平均構造情報の重要性に着目し、将来的にはレーザー分光法と組み合わせで機能と構造の相関を単一粒子レベルで明らかにすることを目指す。

本研究期間内には、動的構造解析に応用可能な実験システムの開発を、XFEL 施設 SACLA

において行う。特に、効率的な試料導入法を開発し、約 1 万枚の試料の回折像を 1 時間程度で記録できる測定法を確立する。得られた多数の回折像を解析し、試料の構造に関するパラメーターを求める。さらに、複数種類の微粒子を含む多成分系への適用を視野に入れて、2 種類以上の試料粒子を含む系について測定を行い、種類別に構造解析を行う。

### 3. 研究の方法

XFEL を用いた測定では、単一パルスで回折像が得られるものの、試料が破壊されてしまう。このため、パルス毎に試料を交換する必要がある。SACLA から最大 60 Hz で供給される X 線パルスを無駄にすることなく利用し、しかもなるべく少量の試料で測定を行うには、X 線パルスに同期した微小液滴として試料を導入する方法が効果的である。そこで、本研究では、パルス液滴式試料インジェクタを開発し、液滴中の試料粒子について X 線回折法による構造解析を行った<sup>5)</sup>。

初年度 (平成 27 年度) においては、液滴式インジェクタを開発し、SACLA の共用装置である汎用回折実験チャンバー DAPHNIS (Diverse Application Platform for Hard X-ray Diffraction in SACLA) と組み合わせで実験システムを構築した (図 1)。SACLA の XFEL は直径 1 μm 程度に集光することができるため、液滴のサイズは直径数十ミクロン程度が適している。このような微小液滴を、開口直径 80 μm のインクジェットノズルを用いて作り出した。例えば、直径 80 μm の液滴の体積は 0.27 ナノリットル程度である。SACLA の運転周波数 (60 Hz) で 3 時間程度の測定をしても、試料は 0.2 ml しか消費されない。実験システムの最適化のため、リゾチームの微小結晶粒子 (サイズ 5 μm 程度) を用いて試験実験を行った。

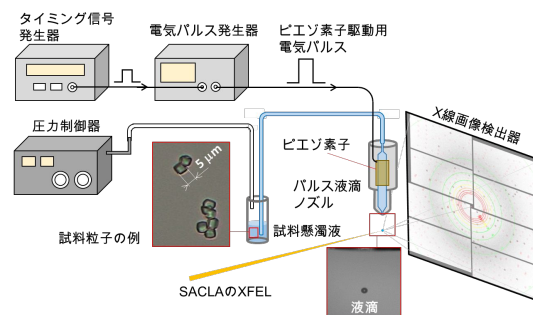


図 1 パルス液滴式インジェクタを導入した実験システムの構成図。ピエゾ素子駆動のインクジェットノズルに印加する電気パルスのタイミングを制御することで、XFEL パルスと同期させる。

平成 28 年度以降には、液滴式インジェクタの安定性を向上させるための改良を行うとともに、光学レーザーと組み合わせた動的

構造解析の実験システムを構築した。

インジェクタの主な改良点は2点あり、試料輸送配管と圧力制御装置に関するものである。試料輸送配管については、試料リザーバをピエゾ駆動ノズルと直結させることで配管のデッドボリュームを小さくし、測定に必要な試料の量を半分から数分の一程度に削減することができた。また、配管を短くすることで、配管中の目詰まりの発生を抑えることもできた。圧力制御装置については、遠隔操作を可能とすることで、試料リザーバの近傍に配置できるようにした。これにより、リザーバまでの配管が短くなり、圧力制御の応答性が向上した。こういった改良により、典型的な測定時間である30分間のあいだ、液滴を安定に吐出できるようになった。

動的構造解析用の測定システムは、液滴式インジェクタ、DAPHNIS、ナノ秒光学レーザーから構成される(図2)。光学レーザーで試料に刺激を与え、XFELで構造変化を捉えるポンプ・プローブ計測を可能にするものである。DAPHNISに液滴観察用のモニタを組込むとともに、インジェクタ、光学レーザー、XFELのタイミングを同期させる仕組みを整えた。試験実験として、バクテリオロドプシンの微小結晶を試料とした動的構造解析をSACLAにおいて行った<sup>6)</sup>。

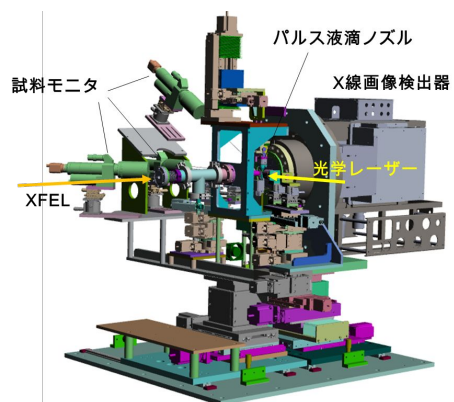


図2 動的構造解析用のポンプ・プローブ計測システム。

#### 4. 研究成果

##### (1) 液滴式インジェクタを利用した蛋白質微小結晶の構造解析

リゾチームの微小結晶(1辺約5 $\mu\text{m}$ )を含む水溶液(数密度 $1.6 \times 10^8 \text{ cm}^{-3}$ )を試料とし、連続フェムト秒結晶構造解析<sup>7)</sup>(SFX; Serial Femtosecond Crystallography)の実験を行った。実験はSACLAの硬X線ビームライン(BL3)にて行い<sup>8)</sup>、約1 $\mu\text{m}$ に集光された波長0.18 nmのXFELビームを利用した。XFELの繰返し周波数は30 Hzであった。

インジェクタの動作条件の最適化を行うことにより、わずか30分程度の測定で4265枚の良質な回折像を取得することができた。回折像を解析した結果、0.23 nmの分解能でリゾチームの構造を決定することができた。

図3に、実験で得られた構造(電子密度マップ)を示す。測定中の試料の流速は約30  $\mu\text{l h}^{-1}$ であり、測定で消費されたリゾチームの量は0.3 mg以下であった。このようなわずかな量の試料で測定を完結させることに成功し、本研究の目的のひとつである「効率的な試料導入手法の開発」を達成した。

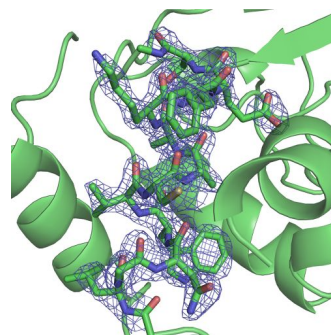


図3 リゾチームの電子密度マップ。液滴式インジェクタを利用したSFX実験により得られた。

##### (2) 光機能性蛋白質の動的構造解析

本研究の主目的である物質の機能解析に向けた実験システムとして、液滴式インジェクタを備えたポンプ・プローブ計測システムを完成させた(図2)。このシステムを用いて、バクテリオロドプシンの動的構造解析を行った。バクテリオロドプシンは高度好塩菌の紫膜上に存在する光駆動プロトンポンプで、光のエネルギーを化学エネルギーに変換する機能を有する。光照射後の構造変化を追跡することで、プロトン輸送の仕組みの解明につながる。

実験はSACLAのBL3にて行った。液滴式インジェクタでバクテリオロドプシンの微小結晶を導入し、波長532 nmの光学レーザー(パルス時間幅5 ns)を照射した。この光励起から1 $\mu\text{s}$ 経過した後に、約1 $\mu\text{m}$ に集光された波長0.16 nmのXFELビームを照射して回折像を取得した。光学レーザーパルスを15 Hz、XFELを30 Hzで繰り返すことにより、光励起された試料とされていない試料の回折像を交互に記録した。

光励起の有りと無しそれぞれの場合について、約2万枚の回折像を取得することができた。解析の結果、0.22 nmの分解能で構造を決定することができた。光励起の有りと無しの場合における電子密度の差を求めることで、構造変化の情報を抽出することが可能である。図4に、得られた構造と光励起前後の電子密度差を示す。中心部分に存在するレチナルが、光吸収後にトランス体からシス体に異性化している様子が分かる。

上記の実験により、光によって機能を発現する物質の動的構造解析にポンプ・プローブ計測システムが有効であることを示すことができた。今後は、試料の機能解析を進めるため、レーザー分光法との同時測定システム



の開発を行う。機能を発現している粒子の電子状態をプローブするためのレーザー分光法と組み合わせることで、構造と機能の相関を明らかにすることができる。また、複数種類の粒子を含む試料への適用を進め、粒子の種類を同定しつつ回折像を記録することを可能とする。さらに、生体高分子だけでなく、無機材料、有機物高分子など様々な機能性物質を対象とした方法論へと一般化させる。

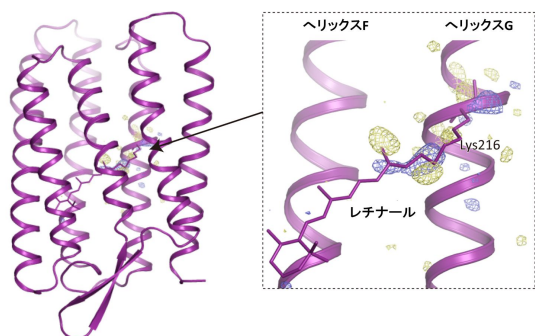


図4 光吸収によるバクテリオロドプシンの構造変化。本課題で開発したパルス液滴式インジェクタを利用し、ポンプ・プローブ測定によって回折データを取得した。波長 532 nm のレーザーパルス照射した後、1  $\mu$ s 経過した時点での変化を示している。青色のメッシュが電子密度の増加、黄色のメッシュが減少に対応する。

#### <引用文献>

- W. E. Moerner and M. Orrit, Illuminating Single Molecules in Condensed Matter, *Science*, Vol. 283, 1999, 1670-1676
- M. M. Seibert et al., Single mimivirus particles intercepted and imaged with an X-ray laser, *Nature*, Vol. 470, 2011, 78-81
- M. Nakasako et al., KOTOBUKI-1 apparatus for cryogenic coherent X-ray diffraction imaging, *Rev. Sci. Instrum.*, Vol. 84, 2013, 093705
- Y. Takahashi et al., Coherent Diffraction Imaging Analysis of Shape-Controlled Nanoparticles with Focused Hard X-ray Free-Electron Laser Pulses, *Nano Lett.*, Vol. 13, 2013, 6028-6032
- F. Mafuné et al., Microcrystals delivery by pulsed liquid droplet for serial femtosecond crystallography, *Acta Cryst. D*, Vol. 72, 2016, 520-523
- M. Kubo et al., Nanosecond pump-probe device for time-resolved serial femtosecond crystallography developed at SACLA, *J. Synchrotron Rad.*, Vol. 24, 2017, 1086-1091

S. Boutet et al., *Science*, Vol. 337, 2012, 362-364

K. Tono et al., Beamline, experimental stations and photon beam diagnostics for the hard x-ray free electron laser of SACLA, *New J. Phys.*, Vol. 15, 2013, 083035

#### 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 8 件)

真船文隆、武田佳宏、河野淳也、登野健介、宮島 謙 他(6 人中 4 番目)、従来の数 10 分の 1 の試料で結晶構造解析を可能にする技術を開発、*レーザー加工学会誌*、査読有、24 巻、2017、51-54

C. D. M. Hutchison, V. Cordon-Preciado, R. M. L. Morgan, T. Nakane, K. Tono 他(20 人中 18 番目)、X-ray Free Electron Laser Determination of Crystal Structures of Dark and Light States of a Reversibly Photoswitching Fluorescent Protein at Room Temperature, *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, Vol. 18, 2017, 1918-1933

DOI:10.3390/ijms18091918

K. Tono, Fluid sample injectors for x-ray free electron laser at SACLA, High Power Laser Science and Engineering, 査読有, Vol. 5, 2017, e7-1-7.

DOI:10.1017/hpl.2017.6

M. Kubo, E. Nango, K. Tono, T. Kimura, S. Owada 他(23 人中 3 番目)、Nanosecond pump-probe device for time-resolved serial femtosecond crystallography developed at SACLA, *J. Synchrotron Rad.*, 査読有, Vol. 24, 2017, 1086-1091

DOI:

<https://doi.org/10.1107/S160057751701030X>

K. Tono, Diverse Application Platform for Hard X-ray Diffraction in SACLA (DAPHNIS), *Synchrotron Radiation News*, 査読無, Vol. 30, 2017, 12-15

DOI: 10.1080/08940886.2017.1267555

登野健介、SACLA のビームライン・実験装置の概要、*日本結晶学会誌*、査読有、Vol. 59、2017、6-11

菅原道泰、登野健介、南後恵理子、岩田想、シリアルフェムト秒結晶構造解析における結晶導入法、放射光、査読有、Vol. 29、2016、198-203

F. Mafuné, K. Miyajima, K. Tono, Y. Takeda, J. Kohno, 他(11 人中 3 番目)、Microcrystals delivery by pulsed liquid droplet for serial femtosecond

crystallography, Acta Cryst. D, 査読  
有, Vol.72, 2016, 520-523  
DOI: 10.1107/S2059798316001480

(4)研究協力者  
無し

〔学会発表〕(計 5件)

K. Tono, Recent progress in structural biology at SACLA, 5th Ringberg Meeting on Structural Biology with FELs (2018年2月, ドイツ連邦共和国バイエルン州クロイト)

K. Tono, Developments in structural biology at SACLA: Resent results and instrument updates, 4th Ringberg Meeting on Structural Biology with FELs (2017年2月, ドイツ連邦共和国バイエルン州クロイト)

K. Tono, Sample Delivery Methods and Instruments at SACLA, 2016 SSRL/LCLS Users' Meeting, (2016年10月, アメリカ合衆国カリフォルニア州メンロパーク)

K. Tono, Platforms for biological researches at SACLA, 12th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (2016年8月, アメリカ合衆国カリフォルニア州メンロパーク)

登野健介、真船文隆、宮島 謙、武田佳宏、河野淳也 他 (11人中1番目)、XFELと同期したパルス駆動試料インジェクターの開発、第29回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム(2016年1月、千葉県・柏市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

SPring-8 Web Site

<http://www.spring8.or.jp/ja/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

登野 健介 (TONO, Kensuke)

高輝度光科学研究センター・XFEL 利用研究  
推進室・主幹研究員

研究者番号: 00353508

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し