

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：82118

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14467

研究課題名(和文)Cryo-BioSAXSによる高精度タンパク質溶液構造解析

研究課題名(英文)Precise analysis of protein solution structure by Cryo-BioSAXS

研究代表者

清水 伸隆 (Shimizu, Nobutaka)

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・准教授

研究者番号：20450934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のX線溶液散乱法(BioSAXS)は溶液中での分子概形を解析可能な手法である。しかし、測定は通常室温で行なわれるため、高輝度放射光を用いた測定では放射線損傷の効果で正しい構造を得ることが困難な場合も多い。本研究では、0℃以下の低温における溶液散乱測定解析を実現させるための測定や解析法の開発を行なった。グリセロールを抗凍結剤として使用し、-100℃までの範囲で試料溶液に含まれる水の凍結防止に必要なグリセロール濃度を調査した。最終的に、-50℃までの低温で精度良くSAXS曲線を得ることが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Biological small-angle X-ray solution scattering (BioSAXS) is a method that can analyze the shape of a molecule in solution. However, since the measurement is usually performed at room temperature, it is often difficult to obtain a correct structure due to the effect of radiation damage in measurement at the synchrotron radiation facility. In this study, the method of measurement and analysis were developed to realize BioSAXS at low temperature below 0 °C. Glycerol was used as a cryoprotectant, and the concentration of glycerol required to prevent freezing of water contained in the sample solution was investigated up to -100 °C. Finally, it became possible to obtain a SAXS curve accurately at a low temperature up to -50 °C.

研究分野：生物物理学

キーワード：SAXS クライオ 蛋白質 溶液構造

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の X 線溶液散乱法 (BioSAXS) では、得られた 1 次元の散乱曲線を用いた Ab-initio 解析によって、ビーズモデルによる構造推定法が確立している。その結果、結晶構造などの高分解能構造解析と組み合わせた相関解析によって、タンパク質やタンパク質複合体の概形構造や複体内のドメイン配置を推定することが可能になっている。しかし、X 線を照射して測定する限り、放射線損傷が解析に与える影響は結晶解析同様に非常に深刻である。結晶解析では、100K まで冷却した窒素ガス中で結晶を冷却することで損傷の効果をある程度抑制することが可能だが (クライオ法)、定温で測定する溶液散乱では、損傷による効果を抑制することは難しい。現状では、DTT (ジチオトレイトール) などの還元剤を光電効果で生じるラジカルを補足するためのラジカルスカベンジャーとして溶液に添加し、損傷による効果を抑制するなど対策を行っているが、効果は限定的である。そこで、結晶のクライオ法のように溶液試料に抗凍結剤を添加し、試料溶液を凍結して測定する Cryo-BioSAXS 法が以前より議論されており、実際、コーネル大学の放射光施設 CHESS のビームライン G1 において装置の整備が始まっていた[2]。

2. 研究の目的

BioSAXS の解析では、試料タンパク質溶液の散乱強度から試料タンパク質以外同一組成の緩衝溶液 (バックグラウンド溶液) の散乱強度を差し引くことで、タンパク質由来の散乱強度を得ることができる。従って、解析においては両溶液の厚みが同一であることが前提である。Cryo-BioSAXS 法が以前から提唱されていたものの手法開発が進まなかったのは、凍結した溶液の厚みを制御するのが難しいからである。実際、コーネル大学のグループも解決策を見出しているわけでは無く、依然試行錯誤の段階であった。そこで、本研究では、凍結状態での溶液の厚みを制御する方法を開発し、Cryo-BioSAXS 法を成功確率の高い手法として一般化することを目的とした。

3. 研究の方法

試料を凍結させ凍結状態のまま測定するために、タンパク質結晶解析で使用される低温窒素ガス吹きつけ装置を使用する。凍結試料の厚みを一定にするためには、基本的に凍結前の状態で試料の厚みを一定にしておく必要がある。その観点で、以下の 3 点を基に研究を進めることとした。

試料厚み一定で凍結可能な治具の開発

試料厚みを 0.5 ~ 1mm 程度で一定に保ちながら凍結するための治具を 3D プリンターで製作する。

試料をマウントするゴニオの導入

タンパク質 X 線結晶構造解析のクライオ法同様に、低温の窒素ガスを吹き付けて試料を凍結させて計測する。一方で、結晶解析と同様の試料マウント方法で試料を取り扱うことが可能であれば、将来的に結晶構造解析で利用されている試料ホルダとマウントロボットが利用出来るので、試料の取り扱いの簡易化とハイスループット化が同時に達成できると期待される。そこで、結晶構造解析で一般的に使用されているクライオピンを利用してゴニオメータにマウントして計測できるようなシステムを開発する。

抗凍結条件の検証

で構築したシステムを利用して実際に測定を行なう。しかしながら、通常のタンパク質結晶よりは試料サイズが大きく、その体積で十分な抗凍結能力を得るために必要な、抗凍結剤の濃度を精査する必要がある。そこで、各温度で抗凍結剤として用いるグリセロールの最適濃度を実験的に明らかにする。

解析方法の確立

で抗凍結条件が確定するため、その条件下で実際にタンパク質試料の測定を行ない、解析方法の検証を行なう。基本的には が確実に達成されていれば、通常通り試料溶液の散乱強度から試料を含まない緩衝溶液の散乱強度を差し引くことで目的の試料分子の散乱強度が得られるはずだが、実際それで十分であるのかも含めて検証を行ない、もし別の要素がある可能性があれば、その対策法を検討する。

4. 研究成果

前段の「3. 研究方法」で ~ に記した内容に従い、研究を推進した。

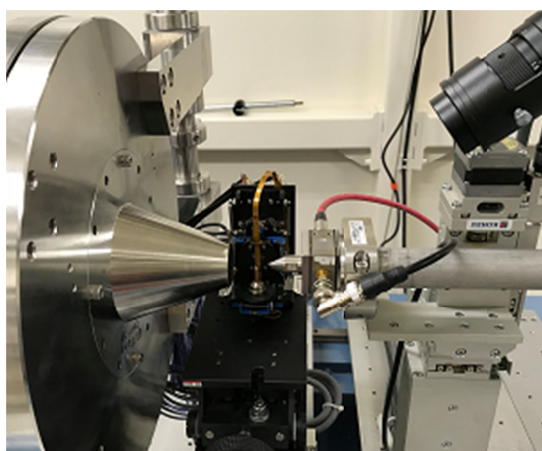
(1) 結果と考察

試料厚み一定で凍結可能な治具の開発

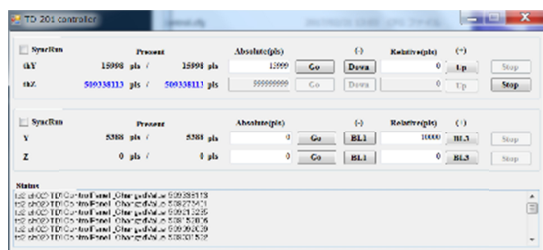
基本的に溶液試料が凍結する場合、体積が増えることになる。そこで、その体積膨張の方向を X 線と直交する方向のみに限定することができれば、X 線進行方向の厚みは一定に保たれることになる。結晶構造解析においてクライオ法初期にアプローチされていた方法を参考にし、まずは実績のある 0.5 ~ 1.5mm の石英ガラスキャピラリー管や、ポリイミド細管を用いて、その管に直交方向から X 線ビームを照射する系を採用した。その結果、凍結時の体積膨張は、管の長軸方向に限定されるため、試料の厚みは管径として保存されることになる。一方で、このチューブをクライオピンに固定する為の治具を 3D プリンターで製作しようとしたが、残念ながら装置能力と材質の問題で、1mm 程度のサイズの物体を精度良く作ることは不可能であった。そこでピンに直接接着する形態で固定するように変更した。

試料をマウントするゴニオの導入

で開発した試料ピンをマウントし、細管を X 線ビームに対して正対させるためには、角度や位置を調整（いわゆるセンタリング）するための多軸ステージが必要である。そこで本研究では、軽量でスムーズな動きと動作精度が高い点に着目し、超音波アクチュエータ式 4 軸ユニット（(株)テクノハズ）を設計して導入した（図 1）。X 線進行方向を X 軸とすると、それに対して、試料面を並進移動させる Y、Z 軸、また、試料の角度を調整する γ 、 z 軸を搭載している。一方で、同ステージを Photon Factory の測定システムに組み込むため、PF 標準フレームワークである STARS[2]の基で制御ソフトウェアを開発した。プログラム言語は Perl を使用し、GUI は .NET Framework 3.5 を利用した（図 2）。図 2 の GUI にて各軸の基本コンフィギュレーションの設定、動作制御を行なうことができる。検出器など測定系全体への組み込みも完了している。



（図 1）開発した 4 軸ユニットを実際の計測位置にセッティングした様子。X 線は写真右から照射され、試料で散乱された X 線は左側の真空パスを通して検出器で記録される。試料センタリングと観察のための顕微鏡カメラが右斜め上方から狙っている。また、試料周辺の空気からのバックグラウンド散乱を抑制する為に、試料直前に散乱ガードピンホールを設置するための専用ノーズコーンを製作して導入した。



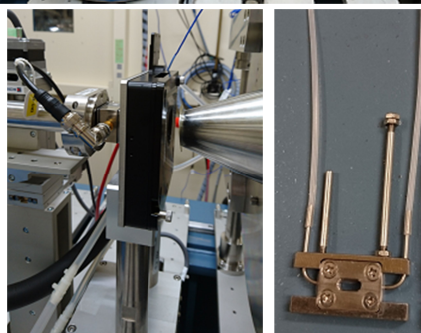
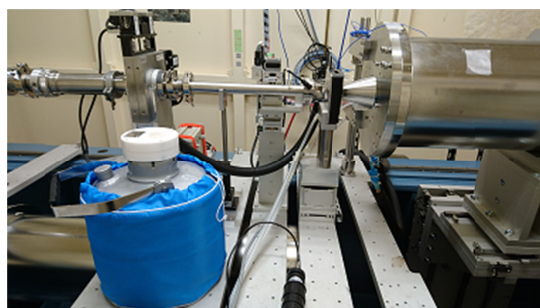
（図 2）4 軸ユニット制御プログラム

抗凍結条件の検証

で開発整備された計測システムの下で、低温窒素ガス吹き付け装置を利用して、ユニット上にマウントした試料に低温窒素ガス

を吹き付けながら計測を開始した。しかしながら、使用した装置では途中から温度が -100 以下に下がらないだけで無く、吹き付けノズルから多量の霜が放出される状況になってしまった。吹き付け装置のヘッドの真空度が悪化していると考えられたため、真空ポンプで常時真空に引きながら計測を行ったが全く改善せず、その状況からヘッドに真空リークが発生したと判断した。研究メンバーが所属する施設内で代替機を探索したが、同様の機種がタンパク質結晶構造解析ビームラインで専用装置として組み込まれているものの、自由に使用可能なものは故障した装置しか残念ながら無く、修理には高額な費用も必要であることから、本研究での利用を断念した。

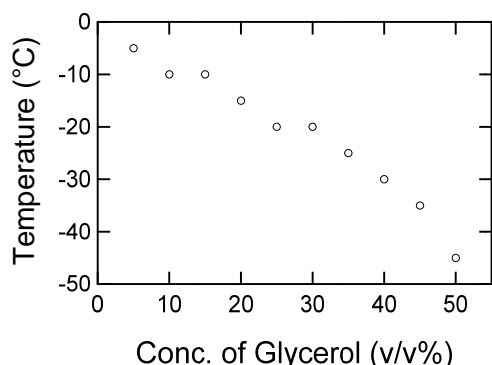
低温ガス吹き付け装置が利用出来ないため、研究計画の再考が必要となった。検討の結果、ガスを試料に直接吹き付けるタイプでは無く、低温ガスを循環させてステージを冷却し、そこに接触させた試料セルを間接的に冷却するシステムを利用する方法に変更した。図 3 に、使用した加熱冷却ステージ HCS302-LN190 (Instec) とステンレス製の試料セルを表示している。冷却されるのは内部ステージで、試料セルをそこに接触させて試料を冷却する。試料セルには熱電対を取り付け、実際の試料温度は冷却ステージとは別にモニターする。



（図 3）（上）測定に使用した冷却加熱ステージ HCS302-LN190 (Instec)、 -190 までの冷却能力がある。実際に冷却されるステージ部（左下）と実験に使用した試料セル（右下）。X 線が透化する窓の部分には一般的には石英ガラスを取り付けるが、本研究では $10\mu\text{m}$ 厚のポリエーテルイミド膜（スペリオ UT F タイプ、三菱樹脂）を使用した。試料溶液はポンプでチューブから流し入れ、熱電対を取り付けた試料セルをステージ内にセットする。

試料の光路長（試料厚み）は 1.25mm。

試料の凍結条件を最適化するために、グリセロール濃度を 5~50%の間で変更しながら温度を-100℃まで段階的に下げて X 線散乱を計測した。グリセロール以外の緩衝液の組成は、10mM HEPES、120mM NaCl、pH7.0 となっている。試料溶液が凍結すると六方晶の氷の結晶が生成してしまうため、それに由来する強い散乱が観測される。そこで、散乱データをモニターし、各温度で凍結を防止できる限界グリセロール濃度を検証した（図 4）。

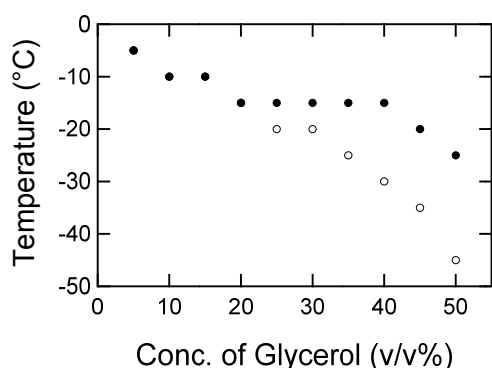


（図 4）各グリセロール濃度で氷由来の散乱パターンが観測されない限界温度。

50%というかなり濃いグリセロール濃度でも、温度は-45℃までしか耐えられなかった。今回の冷却方法では、結晶のクライオ実験の様に試料を急冷することが不可能であるため、構造相転移点をゆっくり通過してしまい氷の生成を抑制することが出来ないことが原因と考えられる。また、試料体積も約 20 μ l とクライオチューブと比較すればかなり大きいことも影響していると考えられる。

解析方法の確立

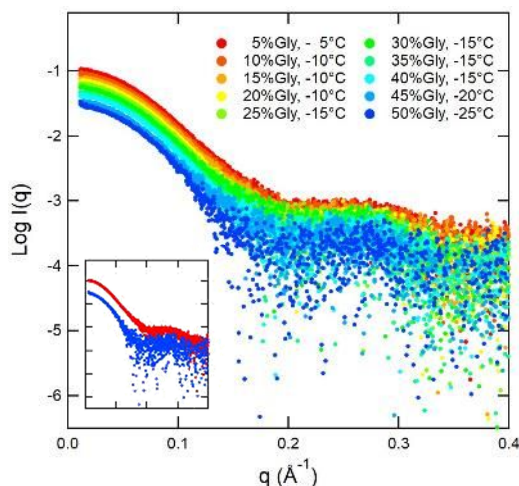
の結果を基に、実際に標準試料タンパク質としてニワトリ卵白アルブミン（オボアルブミン）を用いて低温での X 線散乱実験を行った。オボアルブミン濃度は、グリセロール濃度とは無関係に常に 3.5mg/ml となるように試料調整を行った。図 4 の結果に基づいて各グリセロール濃度での限界温度に設定した所、グリセロール濃度が高濃度になるほど、図 4 の結果に対してかなり低い温度で試料が凍結する現象が観測された。



（図 5）オボアルブミン存在下（○）と非存在下（●、図 4）における凍結限界温度の比較。

図 5 には、オボアルブミン存在下での凍結限界温度の分布を示している。グリセロール濃度 50%では、オボアルブミン非存在下で-45℃まで耐えたのに対して、オボアルブミン存在下では-25℃までとなっている。非存在下では、グリセロール濃度 35%で限界温度が-25℃と示されているため試料調整の方法を検証したが、グリセロール濃度が 15%もずれる可能性は低いと推測された。

図 5 で示した温度条件で、各グリセロール濃度でのオボアルブミンの散乱曲線を得るべく、試料溶液とバックグラウンド溶液の散乱曲線を計測し、両者の散乱強度を差し引いた。その結果、グリセロール濃度が高濃度になるにつれて、正常に差し引くことができなかった。これはグリセロールによる X 線の吸収の影響が無視できなくなった効果であると考えられた。そこで、ソフトウェア SAnGler[3、4]に、バックグラウンドを差し引く際に、試料前後で計測した X 線のダイレクトビーム強度を自動的に読み込んで X 線の透過率を計算し、透過率で散乱強度を規格化してから差し引く機能を追加した。その結果、正常な散乱曲線を得ることが可能となった。



（図 6）図 5 のオボアルブミン存在下の凍結限界温度で計測されたオボアルブミンの X 線散乱曲線。

図 6 では、オボアルブミン濃度一定の条件で計測したにも関わらず、グリセロール濃度が上昇するにつれて、観測される散乱強度は減衰することが示された。これは散乱 X 線強度がグリセロールに吸収されたことを意味しており、特に高角側の散乱強度が減衰し、統計精度の劣るデータになってしまったと考えられる。また、今回利用した試料セルでは、凍結による試料の厚みの変化を抑制することができ無いため、バックグラウンドの引き具合はかなり困難であろうと推測していた。

しかし、透過率を考慮することで、基本的には問題無い計算が可能であることが示唆されたため、求めた透過率にはグリセロールによる吸収の効果だけではなく、試料厚みによる係数も含まれていると推測される。

(2) 結論

本研究では、計画していた試料マウントのための多軸ユニットを設計導入し、その制御系を開発することができたが、当初利用を予定していた低温窒素ガス吹き付け装置の不具合により、計画変更を余儀なくされた。しかしながら、低温ステージを利用することにより、試料タンパク質存在下での抗凍結能の低下、高濃度の抗凍結剤存在下での試料タンパク質測定の高難度、ソフトウェア SAngler への透過率を考慮したバックグラウンドの差し引き機能の追加等、今後、本研究を継続するに当たって基本となる要素を観測、検証できたと考える。従って、本研究で得られた知見を基に、Cryo-BioSAXS 法を確立するための研究を継続したい。

<引用文献>

- [1] Meisburger et al. (2013) Biophys. J. 104, 227-236.
- [2] <http://stars.kek.jp/>
- [3] Shimizu et al. (2016) AIP Conf. Proc. 1741, 050017.
- [4] <http://pfwww.kek.jp/saxs/SAngler.html>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shimizu, N., Yatabe, K., Nagatani, Y., Saijyo, S., Kosuge, T. and Igarashi, N., Software Development for Analysis of Small-angle X-ray Scattering Data, AIP Conf. Proc., 査読有、1741、2016、050017.

Hiraki, M., Matsugaki, N., Yamada, Y. and Senda, T., Development of sample exchange robot PAM-HC for beamline BL-1A at the photon factory, AIP Conf. Proc., 査読有、1741、2016、030029.

Takagi, H., Igarashi, N., Mori, T., Saijyo, S., Ohta, H., Nagatani, Y., Kosuge, T. and Shimizu, N., Upgrade of Small Angle X-ray Scattering Beamline, BL-6A at the Photon Factory, AIP Conf. Proc., 査読有、1741、2016、030018.

〔学会発表〕(計 7 件)

清水伸隆、相関構造解析における X 線小角散乱、第 31 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2017 年 1 月 8-10 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

清水伸隆、米澤健人、谷田部景子、高橋正剛、永谷康子、五十嵐教之、Photon Factory における BioSAXS 測定解析、日本結晶学会平成 29 年度年会、2017 年 11 月 23-24 日、JMS アステールプラザ (広島県広島市)

Nobutaka Shimizu, Solution structure analysis of the protein complex using SEC-SAXS, 第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年 9 月 19-21 日、熊本大学黒髪北地区 (熊本県熊本市)

清水伸隆、放射光小角 X 線散乱装置の概要および最新情報、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 16-19 日、慶応義塾大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市)

清水伸隆、高木秀彰、西條慎也、永谷康子、森丈晴、大田浩正、谷田部景子、高橋正剛、米澤健人、小菅隆、五十嵐教之、Photon Factory の小角散乱ビームラインの現状、第 30 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2017 年 1 月 7-9 日、神戸芸術センター (兵庫県神戸市)

清水伸隆、西條慎也、永谷康子、谷田部景子、大田浩正、森丈晴、高木秀彰、小菅隆、五十嵐教之、PF における BioSAXS 測定システムの高度化、日本結晶学会平成 27 年度年会、2015 年 10 月 17-18 日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (大阪府堺市)

Shimizu, N., Yatabe, K., Nagatani, Y., Saijyo, S., Kosuge, T. and Igarashi, N., Software development for analysis of small-angle X-ray scattering data, 12th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation, 2015 年 7 月 6-10 日、New York (USA)

〔その他〕

PF 小角散乱ビームライン HP
<http://pfwww.kek.jp/saxs/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 伸隆 (SHIMIZU, Nobutaka)
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・准教授
研究者番号：20450934

(2) 研究分担者

平木 雅彦 (HIRAKI, Masahiko)
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・機械工学センター・准教授
研究者番号：20282676