

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20612022

研究課題名（和文）放射光硬 X 線による結晶化困難蛋白の新しい構造決定法

研究課題名（英文）Structure determination method for non-crystallizable proteins by synchrotron radiation hard X-rays

研究代表者

岩本 裕之 (IWAMOTO HIROYUKI)

(財)高輝度光科学研究センター 主幹研究員

研究者番号：60176568

研究成果の概要（和文）：

現在ある医薬品の実に 70%が膜蛋白を標的とするといわれ、医薬品の有効な開発には膜蛋白の 3 次元構造に関する知識が欠かせない。しかし、膜蛋白は構造決定に通常必要な結晶化が困難なため、構造が解かれたものはごくわずかである。本研究では、X 線ホログラフィー法を応用し、このような蛋白分子を結晶化せずに構造決定するのに必要な諸技術进行研究した。特に実際に蛋白分子を試料に用いるときのように試料と参照物体の組が多数存在するケースにつき研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

About 70% of currently used medical drugs are said to be targeted to membrane proteins. Because of this, the knowledge about the 3D structure of these proteins is indispensable for the development of new drugs. However, the structures of only a few of the membrane proteins have been solved, because it is generally difficult to obtain crystals of these proteins, which are indispensable for the standard procedure of structure determination. This study is conducted to develop the principles needed to determine the structure of these proteins without making crystals, by applying the technique of X-ray holography.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：X 線回折学

科研費の分科・細目：量子ビーム科学

キーワード：量子ビーム、放射光硬 X 線、結晶化困難タンパク質、流動配向法、X 線ホログラフィー

1. 研究開始当初の背景

硬 X 線は波長が短いため、蛋白構造を原子分解能で決定するのに最適である。硬 X 線を用

いて結晶化困難な蛋白分子の 3 次元構造を決定するにはどうしたらよいか。

X 線回折・散乱法の一歩の問題は位相問題、

つまり回折像から構造復元をするのに必要な位相情報が測定時に失われる問題である。この位相問題を非結晶試料で解決するのに、遺伝アルゴリズムやシミュレーテッド・アニーリングに基づくアブイニシオ構造決定法に頼っているのが現状であるが、実験データを説明する解が多数生じるという問題がある。ところが非結晶試料の X 線散乱像から容易にしかも一義的に構造決定できてしまう方法が存在する。これは主に軟 X 線領域で試みられているフーリエ変換ホログラフィー (FTH) である。軟 X 線領域での空間分解能の最終到達目標は 10nm と言われるが、これを硬 X 線領域 (~10keV) に発展させることで原理的には原子分解能 (~0.1nm) で構造決定できると期待される。軟 X 線領域での技術はそのままでは使用できず、硬 X 線独自の技術開発が必要になる。研究代表者のグループは硬 X 線による微小な生体試料の回折実験には多くの実績があり、本課題はその延長線上に位置するものである。

2. 研究の目的

本課題の目的は、第三世代放射光実験施設 (スプリングエイトなど) の通常の硬 X 線ビームラインにおいて、蛋白分子またはその複合体の FTH による実用的な構造解析への見通しをたてることである。具体的には次の 2 点を目標として研究を行った。

(1) テストパターンによる FTH 動作の確認。微細加工技術によりテストパターンを作成し、放射光硬 X 線ビームを照射して、硬 X 線領域においても FTH により試料の実像が再生できること、特に試料と参照物体の組が多数あっても FTH により試料の実像が再生できることを確認すること。

FTH においては試料の近傍に小さな参照物体を配置する。通常の FTH においては試料と参照物体の組は 1 つだけである。しかし蛋白分子を試料とする場合、特に硬 X 線領域においては個々の蛋白分子からの X 線散乱は非常に弱く、蛋白分子と参照物体の組を多数用いなければ必要な信号強度は得られない。そこで試料と参照物体の組が多数ある場合でも、1 個の組しかない通常の場合と同様に試料の実像を得られることを確認する必要がある。

(2) 配向法の開発。個々の標的蛋白分子に参照物体を配置し、多数の分子を同じ向きに配向させる方法を開発する。

参照物体を配置する方法としては、細いリンカーを介して重金属のクラスターを蛋白分子に結合させる方法が好適と考えられる。

また配向させる方法としては、ずり応力がかかる方法 (Sugiyama et al., 2009) を応用する。これは固定した円盤と回転する円盤の間に細長い形状の粒子を含む懸濁液を加えると、ずり応力によって粒子が配向するという原理を応用したものである。

3. 研究の方法

(1) テストパターンによる FTH 動作の確認。回折像記録は SPring-8 の BL40XU ビームラインで行った。エネルギー 8keV (波長 = 1.55 Å) の X 線を 10 μ m 径のピンホールに通すことで部分的コヒーレンスを得た。X 線のフラックスは 10¹¹ photons/s と推定された。試料-検出器間距離は 3.2m で、その間には長い真空パスを置いた。ビームストップの径は 2mm とした。モニター用として冷却 CCD カメラ (浜松ホトニクス、C4880) と X 線イメージンテンシファイヤ (浜松ホトニクス、VP5445) の組み合わせを用いた。光軸合わせ後、回折像はイメージングプレート (富士フィルム) に記録し、50 μ m の分解能でリーダー (富士フィルム、BAS2500) で読み取った。

テストパターンは集束イオンビーム加工により 0.5 μ m 厚の金箔上に「上」の字と参照点の組を 5x5 個の正方形のマトリクスに形成したものである。漢字の大きさは幅約 0.26 μ m、高さ約 0.28 μ m で、参照点 (径 45nm) は漢字の下端から 0.41 μ m の距離に置いた。マトリクスのピッチは 1.5 μ m とした (図 1)。

テストパターンの実空間像は、回折像の逆フーリエ変換像を位相全て 0 として計算することにより得た (パターンマップ)。ビームストップなどにより一部の画素の情報が失われているため、単純にパターンマップを計算すると本来存在しないはずの密度が再生されてくる。この偽密度を最小限にするため、フーリエ変換-逆フーリエ変換の繰り返しにより失われたピクセルの回折強度の復元を行った。

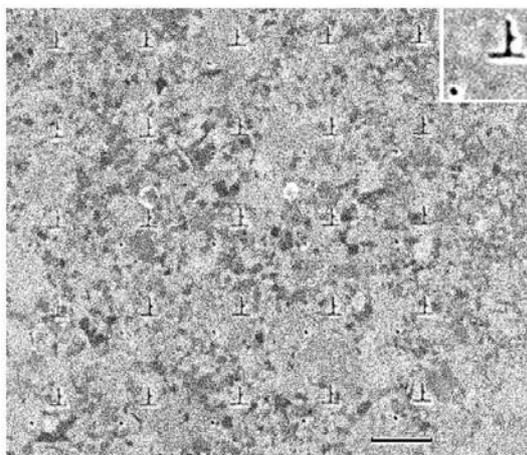


図1. 金箔上に作成したテストパターン。

(2) 配向法の開発。配向法として2種の方法を試験した。1つは細長い分子に対してずり応力をかける方法(Sugiyama et al., 2009)であり、もう1つは分子の一端に比重の大きい粒子を結合させ、遠心力により配向させる方法である。試料としては、1番目の方法のためにはフェリチン分子にPEG(ポリエチレングリコール)鎖を介して量子ドット(Invitrogen社製)を結合させたもの、及び合成ポリペプチド鎖(50残基)の両端に金クラスター(Nanoprobe社製)を結合させたものを用いた。2番目の方法のためにはチログロブリンまたはピルビン酸キナーゼに1次抗体を介して金コロイド(径5-6nm)結合2次抗体を結合させたものを用いた。1番目の方法では、真核生物鞭毛軸系、タバコモザイクウイルス、微小管等の繊維状の試料が精度良く配向することが分かっている。1番目の方法には配向装置として固定子と回転子の間に試料溶液を流し込み、ずり応力をかける方式のもの(以前製作)を用い、2番目の方法には単純に円盤状の試料セルを小型高速回転モーターで回転させるものを製作した(図2)。これで最高約3,000xgの遠心力をかけることができる。

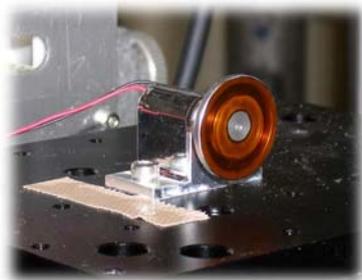


図2. 試料溶液に遠心力をかけながらX線散乱像を記録するための回転試料セル。

測定は SPring-8 の BL40XU または BL45XU ビームラインで行った。検出器は冷却 CCD カメラ(浜松ホトニクス、C4880)と X 線イメージンテンシファイヤ(浜松ホトニクス、VP5445) の組み合わせを用いた。

4. 研究成果

(1) テストパターンによる FTH 動作の確認。イメージングプレートに記録されたテストパターンの回折像(ホログラム)を図3に示す。通常ホログラムにみられる「上」の字と参照点からの散乱の干渉に由来するモワレパターンが見られるほか、拡大してみると回折像全体が「上」の字のマトリクス配列により四角格子の形に細かくサンプリングされているのが分かる。マトリクスの要素の間隔は $1.5\mu\text{m}$ のため、X線の空間コヒーレンス領域がマイクロメートルオーダーで広がっていることが分かる。

回折像のフーリエ変換像(図4)では、中央

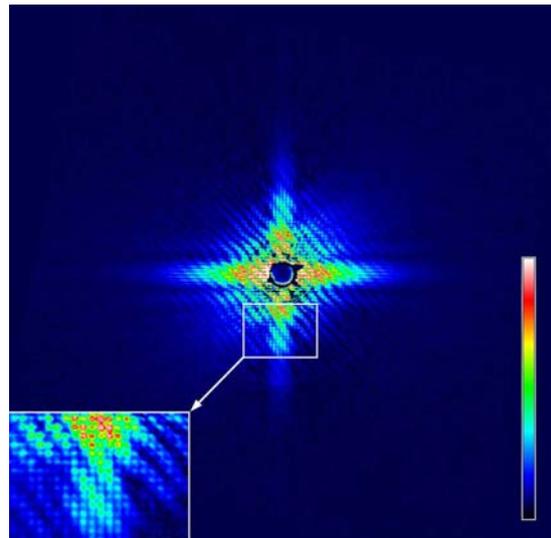


図3. テストパターン(図1)の回折像(ホログラム)。

の自己相関項の両側に「上」の字の実空間像が再生されている。これは一組の試料と参照物体から得られるものと同様である。試料と参照物体による干渉縞は $1/40\text{nm}^{-1}$ まで見えているので、この再生像の空間分解能は 40nm となる。

試料に対して参照点が1個の場合、通常の FTH では自己相関項の両側に1対の実空間像が再生されるだけであるが、この例では試料-参照点の組がマトリクス状に多数並べられているため、中央の自己相関項-実空間像の3つ組以外にも3つ組が多数再生される。理想的な条件ならば無限の数の3つ組が再生され、それぞれの再生像を平均化すれば S/N 比を大幅に上げることができるはずである。しかし周囲の3つ組は中心から離れるほど強度も弱くなり、形も崩れてしまっていて、は

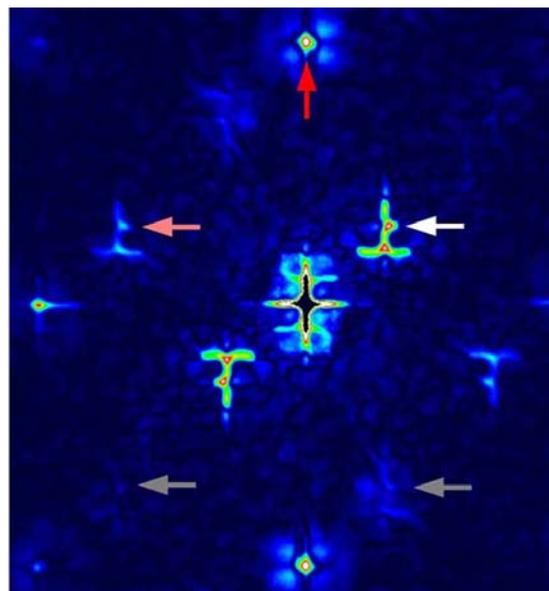


図4. 回折像(図3)のフーリエ変換像(パターンマップ)。中央の自己相関項の傍らに1対の「上」の字が再生されているほか、弱いながらも他にも字が再生されている(横向きの矢印)。

つきりと「上」の字と認識できるものは1組しかない。これはマトリクスの大きさが5x5個と限られていること、空間コヒーレンスが大きくないこと、X線波長のバンド幅が広いこと(2%)などが原因として考えられる。

本研究の結果は、試料-参照点の組が多数あっても、それらの向きと試料-参照点間距離が揃っていれば従来の1組の場合と同様にFTHの原理により試料の実空間像が再生できることを初めて実証した。これにより、散乱強度が非常に小さい蛋白分子であっても、それぞれの分子に固定長のリンカーを介して参照点(金クラスターなど)を結合させ、向きを揃えて、蛋白分子の実空間像を再生するための重要な道筋ができたことになる。実際本研究では硬X線(波長=1.55Å)を用いているので、通常FTH実験が行われる軟X線領域に比べて1個のパターン(「上」の字)からの散乱は格段に弱いはずであるが、わずか0.5秒の露光時間でも実像再生が可能であった。

また、蛋白分子の場合は今回の実験のように規則的なマトリクスに並べるのは困難で、後述のように溶液条件で実験を行えば各蛋白分子はランダムな位置に存在するであろう。このような場合、X線のコヒーレンスが余りに高いと分子間の干渉が起こって実空間像の再生を妨害すると予想される。従って本研究で明らかにされた原理に基づく蛋白分子の実空間像再生にはコヒーレンスの高いX線自由電子レーザー光よりは蓄積リング放射光を用いるほうがより適切であると考えられる。実際、分子間の干渉は蓄積リング放射光を用いた通常の蛋白溶液散乱実験にも影響を及ぼしており、そのため各種蛋白濃度で測定を行ったのちデータを濃度0に外挿して正しい値を求めることが日常行われている。

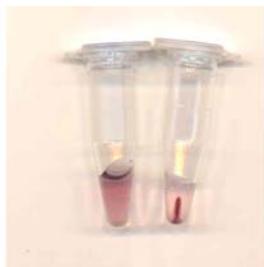


図5. 6nmの金クラスターを結合させた2次抗体の溶液(左)とそれを10,000×g、30分の遠心力で沈殿させたところ(右)。

(2) 配向法の開発。配向法として用いた2種の方法のうち、ずり応力をかける方法では、フェリチン分子に量子ドットを結合させたもの、合成ポリペプチド鎖の両端に金クラスターを結合させたものの何れの場合も分子が配向する様子が見られなかった。これには、

ずり応力による配向のためには分子にある程度の剛性が必要という考えがあり、PEG鎖あるいはポリペプチド鎖に剛性が足りなかったことが原因として考えられる。また首尾よく配向したとしても、この方法では蛋白分子と参照点のどちらが先を向くかは分からず、向きが180°異なる蛋白-参照点の組が混在する可能性がある。そうすると実空間像も180°回転したものが重なって再生されてくることになり都合が悪い。

それに対して2番目の方法では、比重の高い参照点(金コロイド)が必ず遠心力のかかる方向を向くため上記のような問題は生じないと考えられる。図5は金コロイド結合2次抗体に遠心力をかけたところであるが、通常の蛋白は沈殿しない5,000~10,000xgという比較的低い遠心力で沈殿することが分かる。1次抗体を介してこの2次抗体を標的蛋白に結合させた後で同じ遠心力をかけても沈殿はしなくなるが、金コロイドにかかる遠心力は同じであるので、分子を配向させる力がかかっているものと予想される。ピルビン酸キナーゼに金コロイド(径5nm)結合2次抗体を反応させたものに3,000xgの遠心力をかけながらX線散乱を記録したところ(図6)、期待していた干渉縞はみられなかったが散乱が異方性となり、分子が配向する傾向があることが分かった。今回のX線回折実験にて加えることのできる遠心力は3,000xgが最高であったが、今後最適な遠心力を模索するとともに、分子の運動を抑えるため適切な高分子を溶液中に加えるなどの工夫により、より精度の高い配向が得られるようになるであろう。

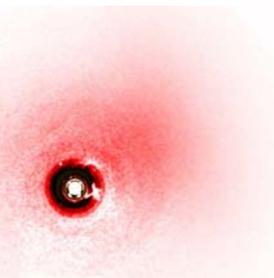


図6. ピルビン酸キナーゼに金コロイド2次抗体を結合させ、遠心力をかけながら記録したX線散乱像。異方的な散乱が記録されている。

引用文献

① Sugiyama, T., Miyashiro, D., Takao, D., Iwamoto, H., Sugimoto, Y., Wakabayashi, K. and Kamimura, S. Quick shear-flow alignment of biological filaments for X-ray fiber diffraction facilitated by methylcellulose. *Biophys. J.*, 97: 3132-3138 (2009).

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 Iwamoto, H. and Yagi, N. Hard X-ray Fourier transform holography from an array of oriented, referenced objects. J. Synchrotron Rad., 18 (2011). [doi: 10.1107/S0909049511009836] (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 裕之 (IWAMOTO HIROYUKI)

(財)高輝度光科学研究センター・主幹研究員

研究者番号 : 60176568