

SAGA-LS におけるタンパク質結晶の長波長 X 線回折実験の試み

河本正秀¹, 清水伸隆^{2,3}, 馬場清喜², 平田邦生³, 石地耕太郎¹,
隅谷和嗣¹, 本島浩之⁴, 岡島敏浩¹, 熊坂 崇^{2,3}, 渡邊啓一⁴, 山本雅貴³

¹財団法人佐賀県地域産業支援センター九州シンクロトロン光研究センター

〒841-0005 佐賀県鳥栖市弥生が丘 8-7

²財団法人高輝度光科学研究センター

〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

³独立行政法人理化学研究所播磨研究所

〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

⁴佐賀大学農学部生命機能科学科

〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1 番地

要 旨 近年、天然タンパク質を構成するアミノ酸であるシステインやメチオニンに含まれるイオウ原子の異常分散効果を利用して、タンパク質結晶構造解析における位相問題の解決を行う「S-SAD 法」が注目されている。この方法では、イオウの K 吸収端に近い長波長 X 線で回折データ収集を行うことが位相決定上有効である。そこで、九州シンクロトロン光研究センターの県有ビームライン BL15 を用いて、CrK α 線を越える長波長 (>2.3 Å) によるタンパク質結晶の X 線回折実験と S-SAD 法解析を行った。その結果、長波長測定では散乱 X 線の増加や回折 X 線強度の減衰による測定誤差の上昇よりも異常分散効果の増大のほうが勝り、位相決定に有利であることが確認できた。

1. はじめに

1.1 タンパク質結晶 X 線構造解析における位相問題とその解決法

X 線結晶構造解析は、構造振幅と位相で表される結晶構造因子を逆フーリエ変換することで結晶格子中の電子密度を求め、結晶を構成する分子等の立体構造を決定する方法として広く用いられている。必要な 2 つの情報のうち、構造振幅は X 線回折実験により求められるが、位相は実験的に求めることができない。この位相を何らかの方法で決定するのが「位相問題」である。

この位相問題の解決方法として、1980 年半ばまでは多重同形置換 (Multiple Isomorphous Replacement: MIR) 法が多く用いられてきた。MIR 法では、タンパク質結晶を重原子試薬の溶液に浸漬することで、重原子がタンパク質分子の特定部位に結合した重原子誘導体結晶を複数作製する。これら誘導体結晶と、元のタンパク質結晶 (ネイティブ結晶) の回折強度の差から位相を決定する。しかし、重原子試薬溶液への浸漬操作や重原子によるタンパク質分子の修飾によって、結晶の同形性や結晶性 (回折能) が低下するなどの問題があり、良好な誘導体結晶の作製が構造解析全体の大きな律速段階となっていた。

1980 年終わりごろから、タンパク質結晶の X 線回折実験に放射光が利用されるようになり、測定に用いる波長を

選択できるようになった。その結果、従来の主流だった MIR 法に代わり、多波長異常分散 (Multiwavelength Anomalous Dispersion: MAD) 法¹⁾が良く用いられるようになった。MAD 法では、誘導体結晶に含まれる重原子の X 線吸収端近傍の複数波長で回折データ収集を行い、異なる波長で測定された回折データセットのバイフィット対 (指数 h と指数 \bar{h} の組) 間の強度差から位相を決定する。原子の X 線吸収端から離れた波長の X 線による散乱では、原子散乱因子は原子内の全ての電子が自由電子であるという近似から求めることができる。しかし X 線吸収端近傍の波長では、電子が原子核に束縛されている効果が無視できず、その原子散乱因子は波長依存性を持つようになる。この効果が異常分散 (Anomalous Dispersion) である。異常分散効果を含んだ原子散乱因子 f_{λ} は、非異常分散項 f_0 と異常分散項 f'_{λ} , if''_{λ} の和によって次式のように表される。

$$f_{\lambda} = f_0 + f'_{\lambda} + if''_{\lambda} \quad (1)$$

Karle らは、分子内に 1 種類の異常分散原子を持つ場合について、X 線回折における異常分散の取扱いを考察し、X 線回折強度の基本方程式を以下のように示した²⁾。

$$|{}^2F(\pm \mathbf{h})|^2 = |{}^0F_T|^2 + a(\lambda) |{}^0F_A|^2 + b(\lambda) |{}^0F_T| |{}^0F_A| \cos(\phi_T - \phi_A) \pm c(\lambda) |{}^0F_T| |{}^0F_A| \sin(\phi_T - \phi_A) \quad (2)$$

ここで、

$$\begin{aligned} a(\lambda) &= (f'^2 + f''^2) / f_0^2 \\ b(\lambda) &= 2(f' / f_0) \\ c(\lambda) &= 2(f'' / f_0) \end{aligned}$$

0F_T …全原子の非異常分散項による構造振幅

ϕ_T …全原子の非異常分散項による位相成分

0F_A …異常分散原子の非異常分散項の寄与による構造振幅

ϕ_A …異常分散原子の非異常分散項の寄与による位相成分

この(2)式では、 $a(\lambda)$ 、 $b(\lambda)$ 、 $c(\lambda)$ は波長にのみ依存する定数項であるため、2つ以上の波長で $|{}^2F(\pm \mathbf{h})|$ を測定すれば、 $|{}^0F_T|$ 、 $|{}^0F_A|$ 、 $(\phi_T - \phi_A)$ の3変数を求めることが可能である。得られた $|{}^0F_A|$ を用いて異常分散原子の位置を求めて ϕ_A を計算すれば、最終的に必要としている位相角 ϕ_T が求められる。異常分散の効果を最大限に活用するため、測定には重原子のX線吸収端を含む複数波長が用いられる。この方法では、1種類の重原子誘導体結晶から得られた回折データセットのみで位相を決定できるため、ネイティブ結晶との同形性は考慮しなくて済むという利点がある。また、1990年にHendricksonらは、遺伝子工学的手法を用いて大腸菌で発現されるタンパク質分子中のメチオニン残基を金属セレンを含むセレンメチオニンに置換し、そのセレンの異常分散効果を利用したMAD法(Se-MAD法)で位相を決定できることを実証した³⁾。この方法では、発現されるタンパク質自体が重原子誘導体として得られるため、重原子試薬溶液への浸漬等による誘導体結晶の作製が不必要となる。そのため、タンパク質の発現・精製・結晶化から回折データ収集・位相決定に至る手順が一本化され、その手軽さゆえに2000年頃から爆発的に普及し、現在では位相問題解決法の主流となっている。

ここ数年、MAD法に代わる位相決定法として注目されているのが、単波長異常分散(Single wavelength Anomalous Dispersion: SAD)法⁴⁾である。SAD法では、ある1波長で回折データ収集を行い、そのデータセットのバイフット対の回折強度差を観測する。1波長の回折データでは、(2)式の方程式から得られる2つの等価な位相解を一意に決定することは出来ない。しかし、バイフット対の回折強度差のパターソン関数等から重原子位置を求めることが出来れば、これを部分構造と見做すことが可能である。部分構造と全体構造の位相には相関があることが知られており⁵⁾、全体構造の位相角 ϕ_T は、部分構造(この場合、異常分散原子)からの位相角 ϕ_A に近い値である確率がわずかながら高い⁶⁾。そこで、2つの位相解のうち ϕ_A に近い方を初期位相として選ぶ。こうして選ばれた位相は間違

いを含むため、得られる電子密度図もノイズが多く、そのままでは解釈不能であることがほとんどである。そこで、電子密度修飾(Density Modification: DM)法により位相の改良を行う⁷⁾。タンパク質結晶の電子密度には、溶媒領域とタンパク質領域が明瞭に分かれて存在し、溶媒領域の電子密度はタンパク質領域のそれよりも低くかつ平滑である、という特徴がある。これらの知識を基にして、初期位相から得られた電子密度図を人為的に修飾し、フーリエ変換によって位相を計算する。この新しい位相は、電子密度図の修飾が適切なものであれば、より正解の位相に近いものとなっている。新しい位相とX線回折強度から求められた構造振幅を結合し、このサイクルを繰り返すことで位相改良を行い、解釈可能な電子密度図を得ることが出来る。

1.2 イオウの異常分散を利用したSAD法による位相問題解決の試み

大腸菌によるセレンメチオニン置換タンパク質の発現とSe-MAD法は、タンパク質結晶のX線構造解析の世界を一変させたといっても過言ではないが、それとて万能の方法ではない。セレンメチオニン置換タンパク質では、大腸菌の生育不良や目的タンパク質の発現量低下によって、結晶化条件の検討に必要な大量のタンパク質を得ることが困難である場合も少なくない。さらに、膜タンパク質やタンパク質複合体など生命科学的に重要なタンパク質の多くは大腸菌発現系が存在せず、セレンメチオニン置換は基本的に不可能である。そのため現在においても、より効率的な位相問題解決法が模索され続けている。その1つに、イオウの異常分散を利用したSAD法による位相決定が挙げられる。

SAD法では、1波長の回折データのバイフット対の回折強度差のみから位相決定を行うため、異常分散効果が観測されさえすれば測定波長は問わない、という利点がある。このことは、放射光施設のビームラインで利用可能な波長範囲外にX線吸収端を持つ核種を異常分散原子として利用できるということを意味する。そこで、タンパク質を構成するアミノ酸であるメチオニンとシステインが分子内に持つイオウ(K吸収端=2.4720 keV)を異常分散原子として利用し、SAD法により位相を決定する方法(Sulfur SAD: S-SAD)が試みられている。この手法が実現できれば、ネイティブ結晶のみから位相を決定することができ、いかなる誘導体の作製も不必要となる。このことはタンパク質結晶X線構造解析のさらなる迅速化とともに、良質な誘導体結晶を得ることが出来なかった試料のX線構造解析を可能とする。ただし、イオウは従来用いられてきた重原子(Hg, Pt, Se等)よりも軽いいため、その異常分散効果も非常に小さなものとなる(Fig. 1)。そこでS-SAD法では、イオウのX線吸収端に近い、できるだけ長い波長で測定を行い、バイフット対間のX線回折

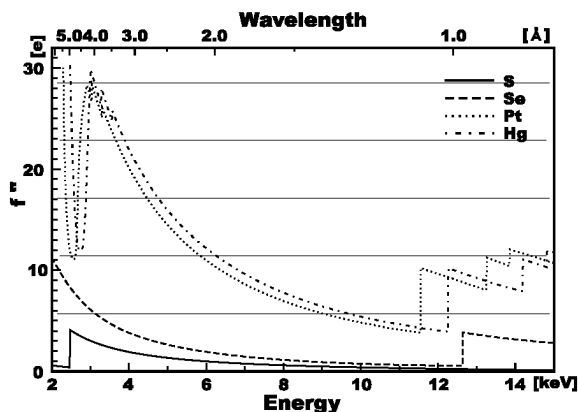


Fig. 1 Energy dependences of f'' values of several atoms.

強度差を大きくすることが重要である。ところが、国内外の放射光施設にあるタンパク質結晶構造解析用ビームラインでは、利用できる波長範囲が最長2.0 Åのところほとんどであり、S-SAD法による解析事例の多くは、CrK α 線(波長2.29 Å)を用いた実験室系X線発生機で行われている⁸⁾。実験室系発生機ではX線強度が弱いため、大きなサイズの試料結晶が必要であったり、データ収集に長時間を要したり等の制約がある。また、Crターゲットでは波長が固定されるため、より長い波長を用いることで異常分散効果によるパイフット対間のX線回折強度差を増やすこともできない。従って、S-SAD法を適用できる試料範囲は、現状では非常に狭いと言わざるを得ない。

我々は、九州シンクロトロン光研究センターの持つ放射光施設(以下、SAGA-LS)⁹⁾のBL15¹⁰⁾において、CrK α 線を超える長波長X線でのタンパク質結晶のX線回折実験を行い、S-SAD法における長波長X線利用の有効性の検証を行った。

2. 実験装置とビーム性能

2.1 SAGA-LS・BL15

SAGA-LSは、周長約75.6 mの1.4 GeV電子蓄積リングを持つ中規模放射光施設である。リングへの電子入射は、30 m長の255 MeV電子線形加速器によって行われる。線形加速器からの入射電子は、255 MeV、100 mA(設計300 mA)で蓄積され、その後リング内加速により1.4 GeVまで加速され蓄積される。このときのビーム寿命は15時間以上である。

BL15は、佐賀県が建設した3本の県有ビームラインのうち1本である。偏向電磁石(臨界エネルギー:1.9 keV)を光源とし、Si(111)2結晶分光器により2.1 keV~23 keVの単色X線を利用できる。特に、2.1 keV~14 keVでは光源から16 mの位置に設置された湾曲円筒型ミラーによって集光と高調波除去を行える。また、ミラーによる集光位置は光源から約25 mで、集光点でのビームサ

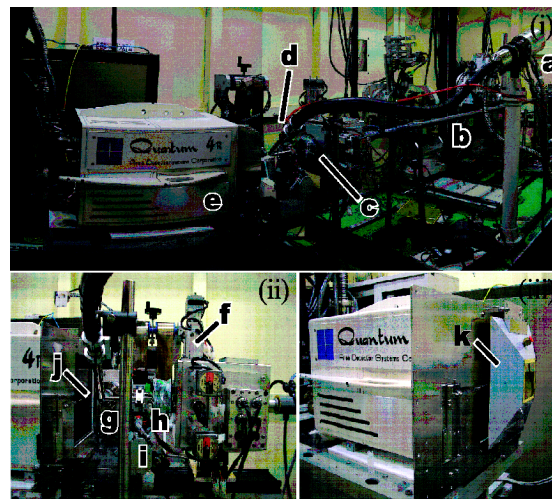


Fig. 2 Photographs of diffractometer for protein crystallography on SAGA-LS/BL15, (i): whole view, (ii) and (iii): close-up view of goniometer and detector. (a): slit and ion chamber, (b): He path, (c): shutter box, (d): cryo-stream cooler, (e): X-ray CCD detector, (f): quadrant slit, (g): goniometer, (h): collimator, (i): video camera for sample, (j): direct beam stopper, and (k): He chamber.

イズは計算値で0.5 mm(横)×0.4 mm(縦)である。

実験ハッチには、2.5 m長と1.25 m長の2つの定盤が設置されている。2.5 m長定盤は、最上流部に輸送チャンネルからのビーム整形用4象限スリットと強度モニタ用のイオンチェンバの他に、 ω -2 θ ステージを備えたX-Z架台、2連精密ゴニオメータと4軸回折計を持つ。また検出器として、イオンチェンバ、Lytle型検出器、単素子Ge SSD、Siマルチカソード検出器、NaIシンチレーションカウンタ、イメージングプレートを備える。これらの装置と検出器を組み合わせることで、XAFS測定、X線反射率測定、X線回折測定やイメージング測定等の多様な測定に対応している。また1.25 m長定盤にイメージングインテンシファイア付きX線CCD検出器を設置し、X線小角散乱測定にも対応可能である。

2.2 実験装置

今回の実験では、X線CCD検出器を含むタンパク質結晶のX線回折実験に必要な装置類を持ち込み、1.25 m長定盤上に専用のX線回折計を構築して実験を行った。

実験に用いたタンパク質結晶用X線回折計の写真をFig. 2に示す。輸送チャンネル直下に既設されている17 cm長イオンチェンバは波長変更時の分光器チューニングに利用した。分光器チューニングのX線強度計測時にはイオンチェンバ内部を大気開放したが、X線回折実験時にはHeガスを流して、吸収によるX線強度低下を防ぐようにした。また、イオンチェンバからタンパク質結晶用X線回折計までの空間(約2.5 m)には塩ビパイプ製のHeパスを置いた。

1.25 m 長定盤のイメージインテンシファイア付き X 線 CCD 検出器用の X-Z ステージ上に、シャッターボックス、コリメータ、ゴニオメータを設置した。シャッターボックスには、内部にロータリースレノイド式の X 線シャッターと 4 象限スリットおよび回転切替式のアッテネータユニット (Al 箔厚 0.4 mm, 0.8 mm) が装備されている。X 線シャッターはリガク製コントローラによりゴニオメータと同期制御される。コリメータは先端ピンホール径が 2 mm のものを用い、試料結晶から約 10 mm の距離に設置した。シャッターボックスとコリメータは、X 線吸収を抑えるために内部を He 置換した。ゴニオメータには、リガク製のタンパク質結晶用 ϕ 軸ゴニオメータを水平配置して用い、試料結晶のマウントとセンタリング用に、先端部をマグネットに交換した小型 XYZ ゴニオメータヘッドを設置している。ゴニオメータは試料観察用 CCD ビデオカメラを備え、このビデオカメラからの映像を見ながら試料結晶のセンタリングが行えるようになっている。また、試料結晶位置に低温窒素ガス吹き付け方式の試料低温装置 (リガク製) を設置し、凍結条件下 (100 K) で X 線回折実験が行えるようにした。

X 線 CCD 検出器には Quantum4R (ADSC 製) を使用した。この検出器は、FOT (Fiber-Optic Taper: 縮小型光ファイバー) によって蛍光体スクリーンとカップリングされた冷却型 CCD 素子のユニットが、 2×2 のアレイ状に配置された構成となっている。総画素数は 2304×2304 で、検出面上での画素サイズは $81.7 \mu\text{m} \times 81.7 \mu\text{m}$ 、検出面積は $188 \text{ mm} \times 188 \text{ mm}$ である。CCD 素子からのフレーム読み出し時間は 8.9 秒で、ファイル書き出し時間も加えたターンオーバー時間は 10 秒強である。また、熱雑音低下のため CCD 素子は -50°C まで冷却されている。

X 線 CCD 検出器の前面には張り出し板を設け、ダイレクトビームストッパーを取り付けてある。ビームカップは 5 mm 角の鉛製で、検出器面から約 15 mm に位置している。また、この張り出し板にはパス長 30 mm の He パスを取り付けることが可能である。高さとして試料間距離の 2 つの自動調整軸を持つカメラステージに X 線 CCD 検出器を搭載し、1.25 m 長定盤に設置した。試料-検出器間の最短距離は、He パス未設置時で 50 mm、設置時で 85 mm である。

2.3 試料位置でのビーム性能

タンパク質結晶用 X 線回折計のゴニオメータに蛍光板を設置し、試料位置でのビームサイズを観察した。以降の回折実験で利用する波長範囲 ($1.5 \sim 2.9 \text{ \AA}$) において、そのビームサイズは約 $600 \mu\text{m}$ (横) \times $400 \mu\text{m}$ (縦) であり、波長による違いはほとんど見られなかった。また、この波長範囲内での定位置出射性能は、水平 $\pm 100 \mu\text{m}$ \times 垂直 $\pm 400 \mu\text{m}$ 以内であった。タンパク質結晶は大きなものでも数百 μm 程度しかないため、X 線回折実験時には波長変更

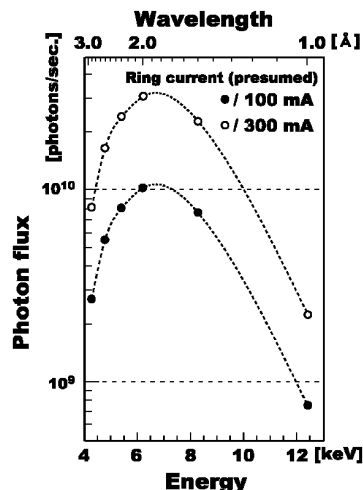


Fig. 3 Photon flux at the sample position of goniometer for protein crystal. All slits in front of sample position are fully opened.

毎にゴニオメータの回転中心とビーム位置とのアライメントが必要であった。

試料位置に、1 気圧の大気を充填した 33 mm 長のイオンチェンバを設置し、印加電圧 1000 V でフォトンフラックスの計測を行った。各波長のフォトンフラックスを蓄積電流値 100 mA と 300 mA に換算したグラフを Fig. 3 に示す。

3. タンパク質結晶を用いた X 線回折実験

3.1 試料結晶の作製

試料には、ウシ由来インスリン (分子量 5,751) を用いた。インスリンは 51 個のアミノ酸残基で構成され、1 個のイオウ原子を持つシステイン残基を 6 個含んでいる。また、Fig. 4 に示すように、これら 6 個のシステイン残基は 2 個ずつで 3 組のジスルフィド結合を分子内で形成している。分子量が小さく、ジスルフィド結合に由来してイオウの異常分散シグナルが比較的強く観測できることから、インスリンは S-SAD 法評価実験の標準試料として良く用いられている。

結晶化にはハンギングドロップ蒸気拡散法を用いた。20 mg/mL のインスリンを含むタンパク質溶液 (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 12.0) を、リザーバー溶液 (0.4 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 10.4, 1 mM EDTA) と 2 μL ずつ等量混合し、200 μL のリザーバー溶液を含むタンパク質結晶化用プレートに封入後、293 K で静置した。約 400 μm 角に成長した結晶を、タンパク質結晶凍結マウント用ナイロンループを用いて、周囲の母液ができるだけ少なくなるようハーベストした。ハーベスト後に液体窒素で急速凍結し、ドライシッパー (Taylor-Wharton, CX-100) で保存と SAGA-LS への搬送を行った。

3.2 X線回折実験と結果

X線回折実験は、1.5, 2.3, 2.6, 2.9 Åの波長で行った。各波長について、試料温度100 K, 振動角1度, 露光時間60秒の条件で90度分(1.5 Åのみ84度分)の回折写真を収集した。MOSFLM¹¹⁾を用いて回折写真の指数付けと積分強度計算を行い、SCALA¹²⁾により回折強度のスケールリングとマージを行った。各波長での測定条件と回折データの統計値を**Table 1**に示す。処理を行った最高分解能は、分割された分解能範囲において $\langle I/\sigma(I) \rangle$ が2以上かつ R_{merge} が40%を超えない範囲で選んだ。波長2.3 Åと2.6 Åの回折データでは、できるだけ高い分解能を得るため、検出エリアの四隅に記録された回折点まで処理に含めた。そのため、分解能範囲の最外殻での測定点数充足度(Completeness)が他の波長に比べて低くなってしまっている。

実験を行った全ての波長で、十分な精度の回折データを

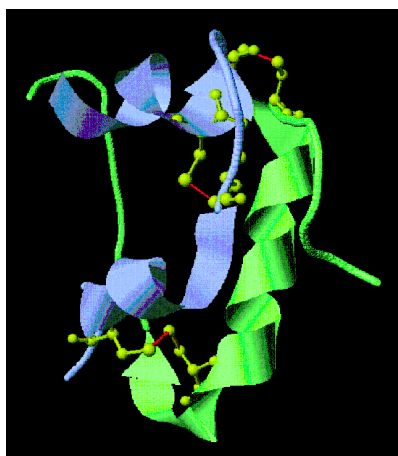


Fig. 4 Ribbon model of the bovine insulin. The ribbon colored light blue and green indicates A and B chain, respectively. Yellow balls-and-sticks indicate cysteine residues, and red lines are positions of disulfide bond.

得ることができた。測定誤差の指標である R_{merge} が全測定分解能範囲で4~7%という統計値は、他の放射光施設のタンパク質結晶構造解析用ビームラインと比べても遜色のない値である。このことは、検出器も含めて、ゴニオメータやX線シャッター等の測定系が十分な精度を持つことだけでなく、測定時間内でのX線ビーム強度や出射位置の変動が、タンパク質結晶のX線回折実験に充分耐えうるレベルまで小さいことを示している。

全測定分解能範囲において、測定波長が長くなるほど R_{merge} が大きくなる傾向が見られた。これは、試料周辺の空気や水(氷)、および試料自体によるX線の散乱が増えるためにバックグラウンドノイズが増えることや、試料へのX線吸収線量が増えるため、放射線損傷に伴う試料劣化が激しくなることが原因と考えられる。また同じ分解能領域で比較した場合、測定誤差が大きくなる傾向は、高角度領域ほど強く見られることがわかった(**Fig. 5(a)**)。平板状の2次元検出器を用いているため、低角より高角の回折のほうが試料-検出器間距離が長くなり、そのため空気による減衰の影響を強く受けるためであると考えられる。波長2.3 Åと2.6 Åでの測定では、試料-検出器間(85 mm)にHeパスを挿入しているが、このパスは30 mmの厚さしかなく残りの約2/3は空気となっている。2.3 Åを超えるような長波長でのX線回折実験では、試料-検出器間を可能な限りHe置換できるようなパスを設計することが、データ精度の向上に必須であると考えられる。

Fig. 5(b)に、異常分散効果の度合いを表す R_{anom} (パイフット対間の R_{merge})を測定波長ごとに比較したグラフを示す。どの分解能領域においても長波長のほうが R_{anom} は大きく、イオウからの異常分散効果を反映したデータが得られているように思われる。ただし、この値には測定誤差の影響も含まれるため、観測された異常分散効果による回折強度差と測定誤差の比である $R_{\text{anom}}/R_{\text{pim}}$ (冗長度を考慮

Table 1

| Wavelength | 1.5 Å | 2.3 Å | 2.6 Å | 2.9 Å |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Distance (Path type) | 100 mm (Air) | 85 mm (He) | 85 mm (He) | 50 mm (Air) |
| Oscillation range/frames | 84°/84 | 90°/90 | 90°/90 | 90°/90 |
| Exposure time | 60 sec. | 60 sec. | 60 sec. | 60 sec. |
| Space group & cell lengths | $I2_13$, $a=b=c=77.87$ Å | $I2_13$, $a=b=c=78.06$ Å | $I2_13$, $a=b=c=78.50$ Å | $I2_13$, $a=b=c=78.53$ Å |
| Resolution: overall (outer shell) | 30.00–1.80 Å (1.90–1.80 Å) | 40.00–2.40 Å (2.52–2.40 Å) | 55.50–2.70 Å (2.84–2.70 Å) | 20.00–2.90 Å (3.06–2.90 Å) |
| R_{merge}^a | 0.057 (0.315) | 0.066 (0.244) | 0.048 (0.376) | 0.073 (0.378) |
| R_{pim}^a | 0.029 (0.271) | 0.032 (0.236) | 0.023 (0.366) | 0.034 (0.174) |
| R_{anom}^a | 0.030 (0.262) | 0.036 (0.197) | 0.038 (0.112) | 0.044 (0.073) |
| $\langle I/\sigma(I) \rangle^a$ | 24.3 (2.1) | 25.7 (2.8) | 31.2 (2.4) | 25.8 (7.1) |
| Number of diffraction measured/unique ^{a)} | 60037/7351 (3036/984) | 23561/2938 (311/205) | 16763/2106 (219/139) | 18066/1867 (2472/258) |
| Completeness ^{a)} | 0.990 (0.931) | 0.909 (0.460) | 0.912 (0.443) | 0.998 (1.000) |
| Multiplicity ^{a)} | 8.2 (3.1) | 8.0 (1.5) | 8.0 (1.6) | 9.7 (9.6) |

Statistics of collected data in each wavelength. ^{a)} Values in the parentheses are for the highest resolution shell in each wavelength.

した R_{merge} ¹³⁾ という指標を用いて、異常分散を用いた「位相決定の有利さ」を見積もり、比較した (Fig. 5(c))。高分解能領域 (3.5 Å~) では測定誤差の悪化の影響を受けるが、低-中分解能領域では確かに長波長の方が有利である、という結果が示された。

3.3 S-SAD 法による構造解析

各波長で得られた回折データについて、S-SAD 法による構造解析を行った。

SHELXC¹⁴⁾ によって回折強度から見積もられた $|^0F_A|$ (異常分散原子の非異常分散項の寄与による構造振幅) について、SHELXD¹⁵⁾ を用いて直接法によりイオウ原子の位置決定を行い、その位置を基に、SOLVE¹⁶⁾ / RESOLVE^{17,18)} による初期位相計算と電子密度修飾法による位相改良を行った。改良後の位相 (ϕ_{calc}) と、MOLREP¹⁹⁾ と REFMAC²⁰⁾ による分子置換・構造精密化をプロテイン

・データ・バンクに登録されているウシ由来インスリンの分子モデル (PDB ID: 2BN3) に対して行ったモデル位相 (ϕ_{model}) との間の平均位相誤差を計算した。また改良後の位相から求められた電子密度マップに対して、ARP/wARP²¹⁾ による分子モデルの自動構築を試みた。それらの結果を Table 2 に示す。

イオウ原子の位置決定において、波長 1.5 Å の回折データでは 4 箇所 (うち 2 箇所はジスルフィド結合の中間位置) しか決定できなかったのに対し、波長 2.3 Å, 2.6 Å, 2.9 Å では、3 組のジスルフィド結合を構成している 6 個のイオウ原子を全て決定できた。また、測定波長が長くなるほど、S-SAD 法解析により求められた位相とモデル構造の位相の差は少なく、より正しい構造が得られていると考えられる。そうであるにも関わらず、波長 2.6 Å や 2.9 Å の回折データでは自動構築できるアミノ酸残基は逆に少なくなっていた。電子密度図を確認したところ、アミノ酸残基を自動構築できなかった部分の電子密度の一部に欠落が見られるが、主鎖の流れやチロシンなど芳香環を有する大きな側鎖に関しては視認することが可能であった (Fig. 6)。従って、2.6 Å や 2.9 Å の測定波長で分子モデルの自動構築ができなかったのは、解析に用いた分解能が低かったためであると推測される。

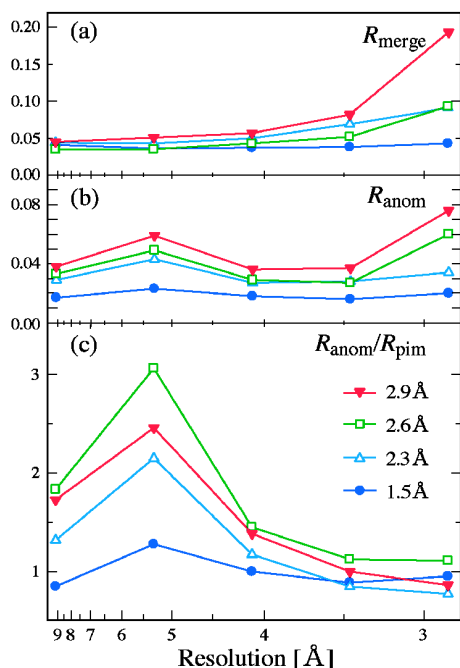


Fig. 5 Resolution range dependences of statistics of collected data in each wavelength. (a): R_{merge} , (b): R_{anom} , and (c): $R_{\text{anom}}/R_{\text{pim}}$.

4. まとめと今後の展望

今回の実験で、SAGA-LS・BL15がタンパク質結晶の X 線回折測定用ビームラインとしても十分な性能を持ち、また波長 2.3 Å を超える長波長 X 線が S-SAD 法解析に有効であることが確認できた。しかし、今回の実験結果はあくまでも「標準試料を用いた予備的なもの」であって、今すぐ BL15において一般のタンパク質結晶でも長波長による X 線回折データ収集と S-SAD 法解析が行えるわけではない。以下に、今回の SAGA-LS での実験の反省点を踏まえた今後の展望について述べる。

4.1 X 線強度について

本実験で用いたタンパク質結晶用回折装置の試料位置での X 線強度は、 10^9 半ばから 10^{10} フォトン/秒であった。この強度は、実験室系の回転対陰極型 X 線発生機と比較

Table 2

| Wavelength | 1.5 Å | 2.3 Å | 2.6 Å | 2.9 Å |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Resolution | 30.00–1.80 Å | 40.00–2.40 Å | 55.50–2.70 Å | 20.00–2.90 Å |
| Number of found sulfur | 4 | 6 | 6 | 6 |
| $\langle \phi_{\text{calc}} - \phi_{\text{model}} \rangle$ | 65.79° | 43.01° | 41.73° | 41.77° |
| Sequence coverage | 97% | 97% | 62% | 58% |
| R_{work} (R_{free}) | 21.6% (25.8%) | 22.9% (31.1%) | 25.0% (46.0%) | 24.2% (42.2%) |

Results of S-SAD analysis and automatic model building.

Wavelength

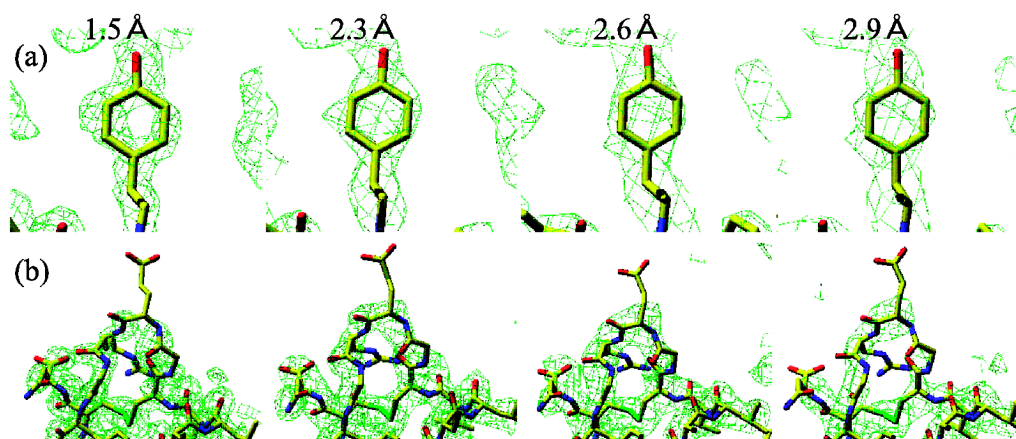


Fig. 6 The SAD-phased maps (green, $\sigma > 1$) around specific residues, (a) tyrosine 16, and (b) glutamate 21 on B chain. Superposed models were obtained by molecular replacement method using model structure.

すると、最新の高輝度型のものよりは1桁ほど大きい
が、他の放射光施設の偏向電磁石光源のビームラインより
は1桁ほど小さい。異常分散を利用した位相決定を行う
場合には、弱い回折強度を精度良く測定することが重要で
あり、そのためにもX線強度は高いほうが望ましい。

また、本実験で用いた約400 μm 角の結晶サイズは、現
在のタンパク質結晶のX線回折実験に用いるものとして
はかなり大きなサイズである（通常は100~200 μm 角程
度）。その大きな結晶を使用しても1フレーム当たり60秒
の露光が必要であった。今回使用したX線CCD検出器は
ターンオーバー時間が10秒強であるため、この露光条件
では1時間で約50フレームの回折写真しか記録するこ
とができない。X線回折実験で測定された回折強度はフ
レーム毎にスケールアップを行うにせよ、測定途中でX
線強度が大きく変化することは好ましくなく、1つのデー
タセットはビームを連続して利用できるうちに取り終え
てしまうのが望ましい。SAGA-LSでは現在のところ、9時
と15時に蓄積リングへの電子入射を行い、21時にユー
ザタイムを終了するため、X線を連続して利用できる時
間は最長で5時間強であり、この時間で撮影できるフ
レーム数は60秒露光では約250枚である。サイズの
小さな結晶を実験に用いる場合には、さらに露光時間
を延ばさなければならず、撮影可能枚数は少なくな
ってしまう。対称性の低い空間群の結晶の場合撮影
できる等価回折点数が少なくなってしまう、S-SAD
法解析に必要な高精度データを収集できない恐れが
ある。少ない撮影枚数で効率よく等価回折点を記録
できるような測定上の工夫が必要であろう。さら
に、X線を連続して利用できる時間を現在の5時間
から伸ばすなど、マシンタイムの運用面での工夫も
必要と思われる。

4.2 測定分解能について

今回の実験に用いた回折計とX線CCD検出器では、
長波長測定時に高分解能回折データを収集することが
できなかった。そのため、波長2.6 Åや2.9 Åの回折
データのほうが、統計値上より良く異常分散効果
を捉えており、またイオウ原子位置も正しく決定
できているにも関わらず、分子モデル自動構築
ソフトウェアにおいて構築できるアミノ酸残基が
少なくなっている。分解能の低い回折データから
では、タンパク質を構成する原子の位置を正確
に決定することは出来ず、生化学的な反応機構
の詳細を立体構造の見地から議論することは困
難である。そのため、長波長測定時でも高分解
能回折データを収集できるような仕組みが不可欠
である。測定可能な分解能領域を向上させる最
も単純で効果的な方法は、より大面積の検出器
を利用することであろう。しかし、大面積のX
線CCD検出器は非常に高価であり、実現はか
なり難しいと言わざるを得ない。比較的安価な
大面積X線検出器としてイメージングプレート
検出器があるが、これは読み取り時間がCCDと
比べて長い（数十秒~1分）、限られたビーム
タイムで取得できるフレーム数が今以上に減り、
データ冗長度が下がってしまうという問題点
がある。試料-検出器間距離の短縮化や2 θ 軸
の採用など、回折計側の装置変更も考慮する
必要があると考える。

謝辞

この実験は、財団法人佐賀県地域産業支援センター・九
州シンクロトロン光研究センターと財団法人高輝度光科学
研究センターの間で結ばれた技術協力に関する協定に基
づき行われました。実験を遂行するに当たり、事務手続き
等にご尽力いただいた財団法人佐賀県地域産業支援セン
ター・九州シンクロトロン光研究センター利用・企画グル
ープ

と財団法人高輝度光科学研究センター研究調整部の皆様に厚くお礼申し上げます。また、ウシ由来インスリンの結晶を作製いただいた理化学研究所・播磨研究所の清水哲哉博士に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) W. A. Hendrickson et al.: Methods in Enzymology 276 (Academic Press Inc., 1997) 494.
- 2) J. Karle: Int. J. Quant. Chem. 7, 357 (1980).
- 3) W. A. Hendrickson et al.: EMBO J. 9, 1665 (1990).
- 4) Z. Dauter: Acta Cryst. D58, 1958 (2002).
- 5) G. A. Sim: Acta Cryst. 12, 813 (1959).
- 6) G. N. Ramachandran et al.: Curr. Sci. 25, 348 (1956).
- 7) B. C. Wang: Methods in Enzymology 115 (Academic Press Inc., 1985) 90.
- 8) Y. Kitago et al.: Acta Cryst. D61, 1013 (2005).
- 9) 平井康晴: 放射光 Vol. 20 No. 6, 375 (2007).
- 10) T. Okajima et al.: AIP Conf. Proc. 879, 820 (2007).
- 11) A. G. W. Leslie: Joint CCP4 and ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography 26 (1992).
- 12) P. R. Evans: Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter 33, 22 (1997).
- 13) M. Weiss: J. Appl. Cryst. 34, 130 (2001).
- 14) G. M. Sheldrick: SHELXC (Gottingen University, Germany, 2003).
- 15) G. M. Sheldrick et al.: International Tables for Crystallography F, 333 (2001).
- 16) T. C. Terwilliger et al.: Acta Cryst. D55, 849 (1999).
- 17) T. C. Terwilliger: Acta Cryst. D59, 38 (2003).
- 18) T. C. Terwilliger: Acta Cryst. D59, 45 (2003).
- 19) A. Vagin et al.: Appl. Cryst. 30, 1022 (1997).
- 20) G. N. Murshudov et al.: Acta Cryst. D53, 240 (1997).
- 21) A. Perrakis et al.: Nature Struct. Biol. 6, 458 (1999).

● 著者紹介 ●



河本正秀

財佐賀県地域産業支援センター九州シンクロトロン光研究センタービームライングループ研究員

E-mail: kawamoto@saga-ls.jp

専門: タンパク質 X 線結晶構造解析

【略歴】

1996年大阪大学大学院理学部博士課程(後期)生化学専攻修了, 1996年理化学研究所基礎科学特別研究員, 1998年財団法人高輝度光科学研究センター研究員, 2001年同副主幹研究員, 2008年4月より現職。



清水伸隆

財高輝度光科学研究センター利用研究促進部門構造生物グループ研究員

E-mail: nshimizu@spring8.or.jp

専門: 生物物理学, 構造生物学

【略歴】

2003年奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科物質創成科学専攻博士課程終了, 理学博士。2003年より現職。



馬場清喜

財高輝度光科学研究センター利用研究促進部門構造生物グループ研究員

E-mail: baba@spring8.or.jp

専門: 構造生物学

【略歴】

2004年千葉工業大学大学院工学研究科工業化学専攻博士後期課程修了, 同年千葉工業大学特別研究員(タンパク3000プロジェクト), 2006年大阪大学特認研究員(タンパク3000プロジェクト), 2007年独立行政法人理化学研究所研究員, 同年に現職。



平田邦生

理化学研究所播磨研究所放射光総合科学研究センター・研究技術開発室 協力研究員

E-mail: hirata@spring8.or.jp

専門: タンパク質結晶構造解析

【略歴】

2003年大阪大学大学院博士後期課程修了, 2004年財団法人高輝度光科学研究センター協力研究員, 2006年より現職。



石地耕太郎

財佐賀県地域産業支援センター九州シンクロトロン光研究センタービームライングループ 研究員

E-mail: ishiji@saga-ls.jp

専門: 固体物理

【略歴】

2004年奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科博士後期課程修了, 神戸大学, 高エネルギー加速器研究機構の任期付研究員を経て, 2006年より現職。



隅谷和嗣

財佐賀県地域産業支援センター九州シンクロトロン光研究センタービームライングループ 研究員

E-mail: sumitani@saga-ls.jp

専門: X 線回折・散乱・イメージング

【略歴】

2005年東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻博士課程修了, 2005年財高輝度光科学研究センター利用研究促進部門協力研究員, 2006年より現職。

● 著者紹介 ●



本島浩之

佐賀大学農学部生命機能科学科 助教
E-mail: motos@cc.saga-u.ac.jp
専門：構造生物学，タンパク質工学

【略歴】

1997年九州大学薬学部大学院薬学研究科修了，同年理化学研究所構造生物物理研究室基礎科学特別研究員，2001年佐賀大学農学部応用生物学科助手，2007年より現職。



岡島敏浩

財佐賀県地域産業支援センター九州シンクロトロン光研究センタービームライングループグループ長 主任研究員
E-mail: okajima@saga-ls.jp
専門：X線吸収分光，ビームライン技術

【略歴】

1989年広島大学大学院理学研究科物性学専攻修士課程修了，同年三菱電機株式会社入社。1999年博士（理学）（名古屋大学）取得。2003年2月財佐賀県地域産業支援センター科学技術推進部主任研究員。組織改変に伴い，2004年4月から財佐賀県地域産業支援センター九州シンクロトロン光研究センターに所属。以後，研究・技術グループ主任研究員等を経て，2007年4月より現職。



熊坂 崇

財高輝度光科学研究センター利用研究促進部門構造生物グループグループリーダー
E-mail: kumasaka@spring8.or.jp
専門：放射光構造生物学

【略歴】

1996年東京工業大学大学院生命理工学研究科博士後期課程修了（博士（理学）），同年理化学研究所研究員，2002年東京工業大学大学院生命理工学研究科講師，2007年より現職。



渡邊啓一

佐賀大学農学部生命機能科学科 教授
E-mail: watakei@cc.saga-u.ac.jp
専門：タンパク質科学

【略歴】

1984年九州大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士課程修了，同年Max-Planck研究所研究員，1986年九州大学農学部助手，1988年佐賀大学農学部助教授（1999年Cambridge大学在学研究員），2002年同教授，現在に至る。



山本雅貴

独立行政法人理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター研究技術開発室 室長

（兼）財団法人高輝度光科学研究センター利用研究促進部門

E-mail: yamamoto@postman.riken.go.jp
専門：タンパク X線結晶構造解析

【略歴】

1991年に大阪大学大学院博士課程修了後，理化学研究所に研究員として，SPRING-8のビームライン建設開始時より，タンパク質結晶構造解析ビームラインの開発研究および建設に関わってきた。2004年より現職。

Preliminary studies of long wavelength X-ray diffraction experiment for protein crystallography in SAGA-LS

Masahide KAWAMOTO¹, Nobutaka SHIMIZU^{2,3}, Seiki BABA²,
Kunio HIRATA³, Kotaro ISHIJI¹, Kazushi SUMITANI¹,
Hiroyuki MOTOSHIMA⁴, Toshihiro OKAJIMA¹, Takashi KUMASAKA^{2,3},
Keiichi WATANABE⁴, Masaki YAMAMOTO³

¹Saga Prefectural Regional Industry Support Center Kyushu Synchrotron Light Research Center,
8-7 Yayoigaoka, Tosu, Saga 841-0005, Japan

²Japan Synchrotron Radiation Research Institute,
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198, Japan

³RIKEN Harima Institute, 1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan

⁴Department of Applied Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Saga University,
1 Honjo-machi, Saga-city, Saga 840-8502, Japan

Abstract Recently, "S-SAD" phasing in protein crystallography that uses anomalous signal from sulfur atoms included in cysteine and methionine residues in native proteins has been widely noticed. It is effective in phasing to collect diffraction data in a long wavelength near the X-ray absorption edge of sulfur. We did a preliminary X-ray diffraction experiment with protein crystals in several wavelength conditions ($> 2.3 \text{ \AA}$) at the BL15 in the SAGA Light Source, and analyzed the data using S-SAD method. The increase of the anomalous dispersion effect in a longer wavelength was superior to the rise of the measurement errors originating from augmentation of the scatter and attenuation of the diffraction by air and water. The advantage for S-SAD phasing in a longer wavelength was ascertained.
