

## 放射光によるタンパク質結晶構造解析の新展開

山本雅貴

理化学研究所・放射光科学総合研究センター 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

要旨

タンパク質結晶構造解析は、1959年の Kendrew による初めてのタンパク質の結晶構造決定以来さまざまな技術開発を背景にタンパク質の構造研究において最も重要な解析手法へと発展してきた。なかでも1990年代からの放射光利用はタンパク質結晶構造解析のデータ精度や位相決定法など革新的な進歩をもたらし、膜タンパク質や超分子複合体などその解析対象を拡大させてきた。本稿ではタンパク質結晶構造解析の歴史に放射光が果たした役割を概説するとともに今後の展望をまとめる。

## 1. はじめに

結晶である閃亜鉛鉱からの X 線の回折写真を初めて観測した Max von Laue, そして、その回折現象を表す有名な Bragg の式を導出した Bragg 親子のノーベル賞受賞から凡そ100年が経過した。X 線の回折現象の発見以降、結晶学は目覚ましい発展を遂げ、様々な分野の基礎研究や応用研究において欠かす事の出来ない重要な構造解析手法として多くの成果を挙げている。そこで、UNESCO は2014年を世界結晶年と制定して、脈々と続く結晶学の業績を称える事とした。

結晶学は生命科学においても広く活用されており、タンパク質の立体構造解析には X 線結晶構造解析が最も重要な解析手法として利用されている<sup>1)</sup>。21世紀は「生命科学」の時代とも言われ、生命の基本的解明に加えその知見を医療や産業利用など広い分野での応用が期待されている。遺伝子情報を基に生産されるタンパク質は複雑な生命を司る機能性分子として、21世紀の生命科学研究の重要なターゲットである。

タンパク質結晶解析の歴史を紐解くと、1934年に J. D. Bernal と D. C. Hodgkin らによるペプシン結晶からの X 線回折写真の撮影成功<sup>2)</sup>が、初めての生体高分子関連での X 線回折実験の成果である。その後、結晶ではないが、1953年に R. Franklin による DNA の X 線回折像測定<sup>3)</sup>が行われ、J. D. Watson と F. H. C. Crick はこの回折写真を基に DNA の二重螺旋構造と塩基間の相補的な水素結合による DNA 複製機構を提唱したことは有名である<sup>4)</sup>。そして、J. C. Kendrew や M. F. Perutz らが、1958年に 6 Å 分解能でのミオグロビンの X 線結晶構造解析<sup>5)</sup>、1960年には 2.0 Å 分解能のミオグロビンの解析<sup>6)</sup>とヘモグロビンの 5.5 Å 分解能での解析<sup>7)</sup>に成功した。これらの初めてのタンパク質の立体構造決定により J. C. Kendrew と M. F. Perutz は1962年ノーベル化学賞を受賞している。さらに、1965年には D. C. Phillips らが 2.0 Å 分解能という高い分

解能でリゾチームの解析<sup>8)</sup>に成功し、その後も阻害剤や基質アナログとの複合体結晶<sup>9)</sup>を次々と解析した。これは、構造機能相関研究の先駆けとなる研究で、酵素としてのリゾチームの基質特異性とその反応機構を原子レベルで初めて明らかにした。1971年には7つのタンパク質構造座標を集めた Protein Data Bank (PDB)<sup>10)</sup>が創設された。

放射光 (Synchrotron Radiation) を利用した測定については、1971年ドイツの電子シンクロトロン DESY で初めての筋肉からの繊維回折写真が G. Rosenbaum, K. C. Holmes らにより報告された<sup>11)</sup>。これが、生物試料の放射光構造研究の端緒となり、1976年には K. O. Hodgson らが Stanford 大学の電子陽電子シンクロトロン SPEAR の放射光を使って初めてタンパク質結晶からの回折写真撮影に成功した<sup>12)</sup>。これらの実験結果より、放射光 X 線は実験室 X 線発生装置と比べ50-60倍高いビーム強度を持ち、またその波長可変性より異常分散効果が利用可能であることが明らかになり、タンパク質結晶構造解析の有力な光源として注目されることとなる。その後、1981年にイギリスの第2世代放射光施設 Daresbury・SRS に MX beamline 7.2が建設される<sup>13)</sup>のを皮切りに、米国・ブルックヘブン国立研究所の NSLS や高エネルギー物理学研究所のフォトンファクトリー (PF) をはじめとした多くの第2世代放射光施設にタンパク質結晶構造解析用ビームラインの建設が進められた<sup>14)</sup>。

1990年代以降、タンパク質結晶構造解析は第三世代放射光施設での高輝度ビームラインの建設、分子生物学と歩調を合わせた新しいタンパク質発現精製技術の導入やコンピュータ技術の進歩の恩恵により、複雑かつ巨大なタンパク質や結晶化が困難な膜タンパク質にも適用範囲が拡大し続けている。それらの解析のなかでも、今まで不可能であると思われていた重要な解析結果に対してはノーベル化学賞が贈られている。2000年以降では、カリウムチャンネル (2003年)、RNA ポリメラーゼ (2006年)、リボソーム (2009年)、G タンパク質共役受容体 (GPCR) (2012年)

の構造決定である。21世紀のポストゲノム時代の生物学の一分野として、生命機能を司る巨大分子であるタンパク質や核酸の立体構造を決定しそれらの構造と機能を研究する「構造生物学」という新しい研究分野が誕生し現在の構造機能相関研究を推進している。本稿では、タンパク質結晶構造解析を中心に放射光の役割と将来展望について記述する。

## 2. 放射光によるタンパク質結晶構造解析の発展

生命機能を実現するタンパク質は複雑かつ合理的な3次元立体構造を持ち、現在その立体構造は主にX線結晶構造解析により解析されている。現在この生命科学の分子論的基盤を構築するタンパク質の構造研究では、放射光は必要不可欠なツールとして広く認知されている。それを端的に示すデータとして、Fig. 1にPDB<sup>15)</sup>の構造登録数と利用された光源の推移を示した。2014年8月19日時点の統計では全102,720の立体構造のうち94,917がX線結晶構造解析であり、そのうち74,566が放射光により構造決定されたものである。この様に、現在では放射光による構造解析の占める割合は全構造に対して73%、X線結晶構造解析の中では82%と非常に高く、放射光X線結晶構造解析法はタンパク質分子の構造解析の主流となっている。

現在、世界には40以上の放射光施設があり、タンパク質の立体構造解析がさかんに行われている。我が国でも、PF運転開始の翌1983年には結晶構造解析用実験ステーションとしてBL14A<sup>16)</sup>が飯高洋一博士、佐藤能雅博士らにより建設された。本実験ステーションには4軸型自動回折計と初期はシンチレーションカウンターが設置され、佐藤能雅博士らはW. A. Hendricksonらと共同で本実験ス

テーションを使った異常分散効果による先駆的な位相決定法を実用化した<sup>17)</sup>。1985年には両宮慶幸博士らが富士写真フィルム(株)により開発された医療用のイメージングプレート(IP)が、X線写真フィルムに比べ100倍程高感度で極めて広いダイナミックレンジと低バックグラウンドノイズを実現していることを明らかにした<sup>18)</sup>。その結果、IPはX線写真フィルムにかわる世界標準のX線2次元検出器としてタンパク質結晶構造解析を含め広く利用されることとなる。1987年に坂部知平博士らによりタンパク質結晶構造解析専用実験ステーションとしてBL6Aが建設され、IPと放射光用ワイセンベルグカメラの組み合わせによる利用が開始された<sup>19)</sup>。BL6Aに引き続きBL18B、BL6Bと放射光用ワイセンベルグカメラによるタンパク質結晶構造解析専用実験ステーションが整備されて、放射光を利用したタンパク質結晶構造解析の普及が始まった。1996年には月原富武、吉川信也両博士のグループにより、我が国初の膜タンパク質結晶構造解析であるチトクロムc酸化酵素の構造解析が行われた<sup>20)</sup>。1997年には第三世代大型放射光施設SPring-8が理化学研究所・日本原子力研究所の共同チームにより建設され<sup>21)</sup>、その供用開始と同時に構造生物学用として2本のアンジュレータビームライン(BL41XU<sup>22)</sup>とBL45XU<sup>23)</sup>)の利用が開始され、2000年には豊島近博士らによるCa-ATPase<sup>24)</sup>と岡田哲二・宮野雅司両博士らによる世界初のGPCRの結晶構造解析であるウシロドプシンの構造が決定された<sup>25)</sup>。その後もPF・SPring-8共にさまざまなタンパク質結晶構造解析用ビームラインの建設・高度化がすすめられ、現在のタンパク質結晶構造解析にとって欠かす事の出来ない放射光利用環境が整備され、世界第一線の多くの成果が世に出されている。

この様な放射光によるタンパク質結晶構造解析の急速な発展は、その波長可変な高輝度X線が重要な役割を果たしている。タンパク質は窒素、炭素、酸素、水素といった軽元素を主成分としたアミノ酸が直鎖状に連なったポリペプチド鎖が折れ畳まれて立体構造を構成する。そのポリペプチド鎖の長さは数十から時には数百残基にもおよび、分子量も数万から大きなものでは100万に至るまで多種多様である。それらタンパク質分子を構成する各軽原子のX線散乱断面積は非常に小さく、タンパク質分子からの散乱強度も非常に小さなものとなる。また、一方で分子量が大きなタンパク質は非常に多くの数の軽原子により構成され、巨大で複雑な分子構造を持ち、そのタンパク質の結晶は数百Åの格子長を持つものも珍しくない。このようなタンパク質結晶は、低分子や有機分子の結晶に比べてX線回折強度は微弱で、より多くの格子点の計測が必要となる。また、巨大分子であるタンパク質の構成原子数は千個から数万にもおよびそれぞれの原子の3次元座標を低分子結晶構造解析で用いられている直接法により決定するには回折強度が微弱なため解析に必要な観測数と精度が圧倒

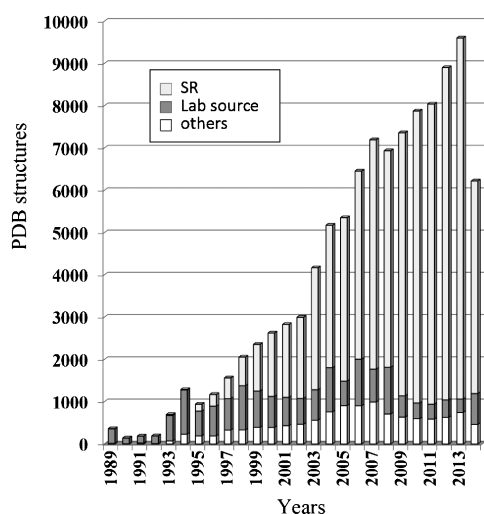


Fig. 1 Growth of PDB structures per year by experimental methods by light source. “Others” shows the structures determined by methods other than X-ray crystallography.

的に不足している。そのため、結晶構造解析で問題となる位相問題を解決するため実験的な位相決定法が必要となる。

放射光は、非常に輝度が高く紫外線からX線まで広いエネルギー範囲をもつ特徴があり SPring-8 からの放射光輝度は、実験室のX線発生装置から得られるX線に比べ約1億倍となっている<sup>21)</sup>。このような高輝度放射光はタンパク質結晶構造解析の測定精度や解析手法に飛躍的な進歩をもたらし、今まで回折強度不足で構造解析できなかった微小サイズ結晶からの構造決定を可能にしている<sup>26)</sup>。また、放射光の波長可変性は、今までの複数の重原子誘導体調製を必要とした煩雑な位相決定法を不要とし、金属などの異常散乱原子を含んだ唯一のタンパク質結晶から異常分散効果による回折強度の変化による簡便な位相決定を可能にした<sup>27,28)</sup>。

これら放射光の特徴を受けて、タンパク質結晶構造解析に放射光の果たすべき役割は、「解析対象の拡大」と「構造解析の高精度化」および「解析の迅速・簡便化」である。解析可能範囲の拡大では、まず巨大かつ複雑な複合体構造など高難度試料の構造解析である。これには、膜タンパク質の生産・精製・結晶化技術、弱い相互作用を巧みに制御する複合体調製技術と歩調を合わせた高精度回折データ測定を可能にする放射光利用技術などの発展が不可欠であった。また、構造解析の高分解能化を含めた高精度化は、放射光技術の汎用化とも相まった構造情報の精度向上をもたらし、例えば水素原子の位置情報も含めたタンパク質の立体構造から原子分解能での化学反応を論じることを可能にしようとしている。構造解析の迅速・簡便化では、構造ゲノム研究など膨大なサンプルの迅速構造決定のために異常分散を利用した位相決定法（後述のMAD法・SAD法）を最大の武器とした放射光利用が不可欠であり、サンプルチェンジャーの開発<sup>29-31)</sup>やビームライン制御の自動化<sup>32,33)</sup>と併せた、ビームライン回折強度測定完全自動化・高効率化を進めている。その結果は、タンパク質立体構造の網羅的解析<sup>34)</sup>に貢献するのみならず、タンパク質構造研究の技術的水準を大きく高め、構造解析を汎用的な研究技法に近づけることとなった。

### 3. 放射光による異常分散を利用した位相決定の簡便化

結晶構造解析では、結晶中に整列したタンパク質分子によって回折されたX線回折強度を解析し、その結晶構造を決定する。この解析は(1)に示した構造因子 $F(\mathbf{S})$ と呼ばれるX線回折の基本式に基づき行われる。X線は結晶中に整列した分子内の電子により散乱される。(1)式は、それを式で表した物であり、最終的に結晶中の電子密度分布 $\rho(\mathbf{r})$ によって散乱された波の重ね合わせの式となり、 $\rho(\mathbf{r})$ のフーリエ変換の形で表される。

$$F(\mathbf{S}) = \sum_j f_j \exp [2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_j] \exp [-B_j (|\mathbf{S}|/2)^2] \\ = \int_{cell} \rho(\mathbf{r}) \exp [2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}] d\mathbf{v} \quad \dots (1)$$

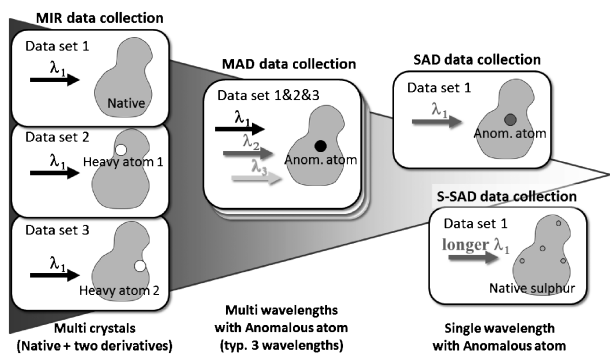
ここで、 $\mathbf{r}_j$ は結晶単位格子内の $j$ 番目の原子の原点からの位置ベクトルを示し、 $\mathbf{S}$ は散乱ベクトルである。 $f_j$ と $B_j$ は $j$ 番目の原子の原子散乱因子と温度因子であり構成原子の種類とゆらぎの状態を示している。また、(1)式の $\mathbf{r}$ は単位格子を構成するベクトルの $\mathbf{a}$ 、 $\mathbf{b}$ 、 $\mathbf{c}$ を使って $\mathbf{r} = \mathbf{a} \cdot x + \mathbf{b} \cdot y + \mathbf{c} \cdot z$ と表現できるので、結晶の回折条件を表すLaue条件から $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = \mathbf{S} \cdot (\mathbf{a} \cdot x + \mathbf{b} \cdot y + \mathbf{c} \cdot z) = hx + ky + lz$ となる。そこで $F(\mathbf{S}) = F(hkl)$ として、3次元のタンパク質構造は(2)式で示す構造因子 $F(hkl)$ の逆フーリエ変換により求めた結晶中の電子密度分布から解析ができる。ここで、 $V$ は単位格子体積である。

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F(hkl) \exp [-2\pi i (hx + ky + lz)] \quad \dots (2)$$

しかし、実際の回折実験で測定される回折強度は、構造因子の振幅の二乗に比例する強度であり位相情報が失われている。これを「位相問題」という。現在では類似の構造を持つ生体高分子（モデル分子）がすでに解析されている場合には分子置換法（Molecular Replacement (MR) 法）で解析が進められる。MR法では、解析を進める構造と既知モデル分子の構造が似ていることが重要であるがPDBの充実に伴い、アミノ酸配列の相同性が高い近縁タンパク質の構造解析や、構造既知タンパク質と反応基質や補欠因子などとの複合体構造解析に広く利用されている。しかし、新規構造の解析には実験的に位相を求める方法が必要で、これまでに様々な解析法が開発されてきた。

1950年代の初めてのタンパク質結晶構造決定で用いられたのは、結晶中のタンパク質を重金属原子でラベルした「同型結晶」を複数用いる重原子多重同型置換法（Multiple Isomorphous Replacement (MIR) 法<sup>35)</sup>）であり、以来多くの解析に用いられて来た。しかし、同型の重原子誘導体結晶調製には多くの試行錯誤が必要であり、位相決定を困難なものとしていた。

1980年代後半からの放射光の利用により、金属原子などの異常散乱効果を用いた位相決定法である多波長異常分散法（Multi-wavelength Anomalous Dispersion (MAD) 法<sup>27)</sup>）が、同型置換法に代わる簡便かつ精密な位相決定法として注目されはじめた。1990年にW. A. Hendricksonらが開発したセレンを異常散乱因子として導入したタンパク質を用いるMAD法<sup>28)</sup>が、放射光利用の進展に伴い多くの新規構造解析に利用されるようになった。異常分散効果を利用した位相決定の原理はKarle<sup>36)</sup>によって定式化された。一種類の異常散乱子を含む結晶について、複数の波長 $\lambda$ における反射 $h$ とそのFriedel対 $-h$ に対する構造振幅 $|F_2(\pm h)|$ について連立方程式を解く事でタンパク

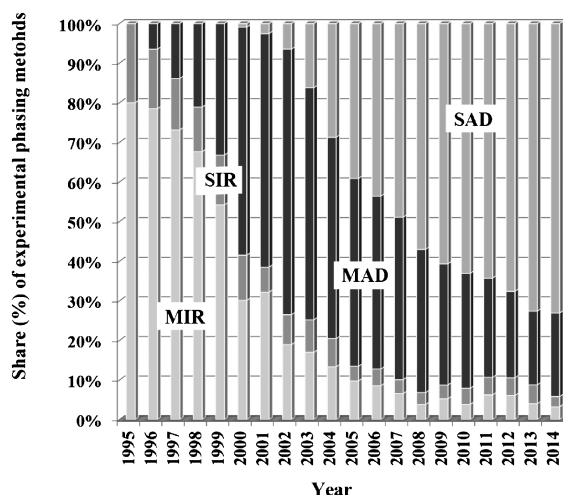


**Fig. 2** Characteristics of phasing methods in *de novo* X-ray structure determination. The preparations of the isomorphous crystals using the MIR method as heavy atom derivatives are very difficult and the time-consuming step. The use of the anomalous dispersion effect by the SR dispensed with the preparation of troublesome heavy atom derivatives and simplified the phase determination.

質の位相を一義的に求める事ができる。セレンを利用したMAD法では、タンパク質を構成するアミノ酸の1つであるメチオニンをセレンメチオニンに置き換えたタンパク質を合成・結晶化することにより、重原子ラベルの調製なしに異常散乱原子を含むタンパク質結晶を得ることができる。一般的にMAD法を適用するためには、使用可能な波長範囲内でX線の異常分散を引き起こす原子をタンパク質結晶内に導入する必要がある、前述のセレンのほか金属タンパク質に固有の亜鉛・銅・鉄などの金属原子や同型置換法で導入する白金・水銀などの重原子が異常散乱原子として利用されている。

2000年代中頃から、溶媒平滑化や電子密度のヒストグラム解析などによる位相改良法の高性能化に伴い、複数波長によるMAD法ではなく、より簡便に1波長だけの異常散乱効果から位相決定を行う単波長異常分散法 (Single-wavelength Anomalous Dispersion (SAD) 法)<sup>37)</sup>による構造解析も実用化され、現在ではセレンメチオニンを異常散乱因子としたSAD法が新規構造解析の重要な位相決定法となっている。また、組み換え体タンパク質生産の難しい天然型の高難度タンパク質を対象にタンパク質が本来もっているイオウの異常散乱効果を手がかりにした「低エネルギーSAD (S-SAD) 法」<sup>38)</sup>の開発も精力的に進められている。この手法は、解析対象のタンパク質を天然のまま特に試料調製することなく結晶化するだけで位相を求めることが出来る最も簡便な位相決定法である。現在、低エネルギー放射光利用を目指して、PFのBL-1A<sup>39)</sup>や英国の放射光施設DIAMOND<sup>40)</sup>で低エネルギー高輝度マイクロビームラインの開発が進められており、タンパク質結晶構造解析の新しい位相決定法として注目されている。

**Fig. 2** にタンパク質結晶構造解析の新規位相決定法の特徴と発展を模式的にまとめた。また、**Fig. 3** に新規タンパク質結晶構造解析に利用されている位相決定法の時間的推



**Fig. 3** Changing phasing methods in *de novo* X-ray structure determination. The *de novo* phasing methods moves to the use of the anomalous dispersion effect from the use of the heavy atom derivative during these 20 years. The growth of the SAD method for the past 10 years is remarkable, and the SAD method enters the mainstream of the *de novo* phasing methods now.

移を1年ごとにプロットした。放射光の利用が一般化した1995年以降主流の位相決定法がMIR法からMAD法、さらにはSAD法に変化している。この様に、放射光は位相問題により簡便な解決手法を提供し、X線光学やX線計測技術の進歩と併せてタンパク質結晶構造解析<sup>26)</sup>に飛躍的な進歩をもたらした。

#### 4. 高輝度放射光による高精度構造解析

高輝度放射光利用の一般化は、タンパク質結晶構造解析の測定精度に飛躍的な進歩をもたらし今まで回折強度不足で構造解析できなかった超分子複合体の巨大格子結晶や高難度結晶化サンプルの微小サイズ結晶からの構造解析を可能にしている。**Fig. 4** にPDBに登録されたタンパク質の分子量分布を1995年までと2000年以降の5年ごとに示すが、年を追うごとに大きなタンパク質が構造決定されるようになってきている。現在では2009年にノーベル賞を受賞したりボソームのような大小さまざまな50個を超えるサブユニットから構成される巨大なタンパク質まで解析可能となっている。

そこで、実験で得られる結晶試料からのX線回折強度を数式化したDarwinの式<sup>41)</sup>から放射光の有効性について議論する。

$$I(\mathbf{h}) = I_0 r_e^2 \lambda^3 LPA \frac{V_x}{\omega V_0} |F(\mathbf{h})|^2 \quad \dots (3)$$

( $F(\mathbf{h})$ : 結晶構造因子,  $\omega$ : 結晶回転速度,  $I_0$ : 入射X線強度,  $\lambda$ : X線波長,  $P$ : 偏光因子,  $L$ : ロレンツ因子,

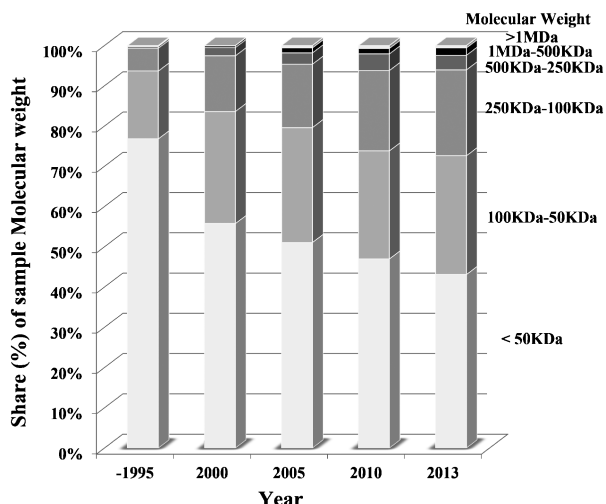


Fig. 4 Changing the protein molecular weight analyzed by X-ray crystallography. The molecular weight of protein analyzed increases with the times.

$A$  : 吸収因子,  $V_x$  : 回折に関係した結晶体積,  $V_0$  : 結晶格子の体積,  $r_e$  : 古典電子半径)

まず(3)式より実験で得られる回折強度は入射 X 線強度 ( $I_0$ ) に比例することから, 入射 X 線強度を高めることは回折強度を増加させるために重要であることがわかる。また,  $V_x/V_0^2$  にも比例することから, 回折に関係した結晶体積 ( $V_x$ ) に含まれる単位格子数 ( $V_x/V_0$ ) を増加させることも, 回折強度の増加に有効であることがわかる。一方, 回折強度の S/N を向上させるためには, 結晶サイズと同等もしくはそれ以下のビームサイズを利用することが重要であり, これらの考察から, 小さな結晶からの微弱な回折強度をより高精度に測定するには, より光子密度が高くビームサイズの小さな X 線を用いることが望ましい。そこで, 多くのタンパク質結晶構造解析用ビームラインでは, 微小サイズで微弱な回折能のタンパク質結晶から高 S/N での回折強度測定を実現するため 2 次元集光ミラーによる高輝度 X 線<sup>26)</sup> を生成して「より大きなタンパク質のより小さな結晶からの高精度 X 線結晶構造解析」を可能にした。特に 1990 年代の ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, フランス・グルノーブル), APS (Advanced Photon Source, 米国・シカゴ), SPring-8 をはじめとした第三世代放射光施設の登場以降, さらなる高輝度放射光を発生する光源としてアンジュレータ<sup>42)</sup> が大きな役割を担っている。

SPring-8 でも構造生物学 I ビームライン (BL41XU)<sup>22)</sup> や生体超分子複合体構造解析ビームライン (BL44XU)<sup>43)</sup> により各辺 30  $\mu\text{m}$  程度の微小結晶やウィルスなど 1,000  $\text{\AA}$  程度の格子長をもつ超分子複合体結晶からの回折実験を可能にした。BL41XU は, 水平・垂直方向それぞれ独立な KB 集光ミラーにより 80  $\mu\text{m}$  程度に集光した高輝度放射光

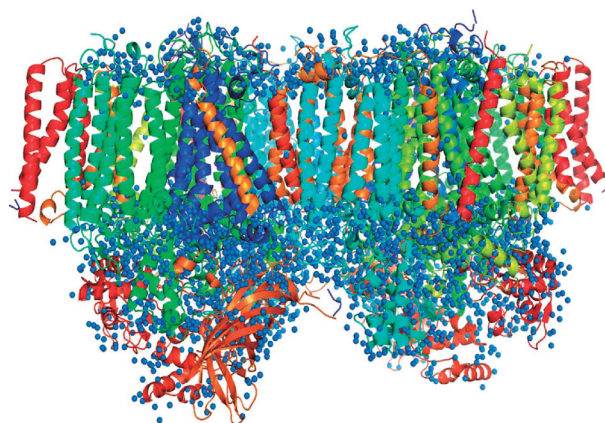


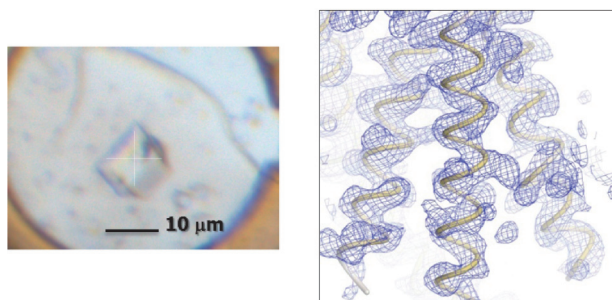
Fig. 5 (Color online) 1.9  $\text{\AA}$  crystal structure of Photosystem II (PSII). PSII is the membrane protein with 19 subunits with molecular weight of 350 kDa. PSII is the world's largest membrane protein determined at more than 2.0  $\text{\AA}$  resolution.

( $10^{13}$  photons/sec) が利用可能で, Fig. 5 に示した光化学反応中心 II (PS II)<sup>44)</sup> や Ca-ATPase など膜タンパク質の高分解能構造解析で成果を挙げている。また, エンドポリガラクトツロナーゼ (EndPG)<sup>45)</sup> など良質なタンパク質結晶からは, 1  $\text{\AA}$  を超える原子レベル分解能での解析を実現して水素原子の可視化に成功している。一方 BL44XU は, ビームを平行化するコリメータミラーとピンホールを組み合わせた準平行光学系を採用し, 格子長の長い生体超分子複合体の結晶からの低ノイズデータ収集に最適化したビームラインである。これまで細菌の多剤排出タンパク質 (AcrB)<sup>46)</sup> をはじめ膜タンパク質やウィルスなど超分子複合体の構造決定に成功している。2009 年には分子量約 1000 万の世界最大の巨大粒子ボルト (Vault)<sup>47)</sup> の構造を決定している。

## 5. 高輝度マイクロビームによるタンパク質微小結晶構造解析

タンパク質結晶構造解析技術の急速な進歩に伴い, その解析対象はますます高難度化している。たとえば, 疾病や障害の原因を含めた重要な生命現象に関わる膜タンパク質では, 10  $\mu\text{m}$  以下の微小結晶やクラスター結晶しか得られない場合が多く, その解析は困難を極めている。回折強度の微弱な微小結晶から精度良く回折強度データを得るためには, 結晶からの回折シグナルを最大化し, 試料周りの結晶母液等からの不要ノイズを最小化する試料結晶と同等サイズのマイクロビームが必要である。

その様な状況のなか, 2004 年に ESRF の C. Riekler らはマイクロビーム開発の過程でビームライン ID13 の 1  $\mu\text{m}$  サイズのマイクロビームを使って, 回折体積 40  $\mu\text{m}^3$  のアミロイド繊維結晶からの回折像撮影に成功した<sup>48)</sup>。そこで, 2000 年代後半には, 世界的に既存の技術水準で解

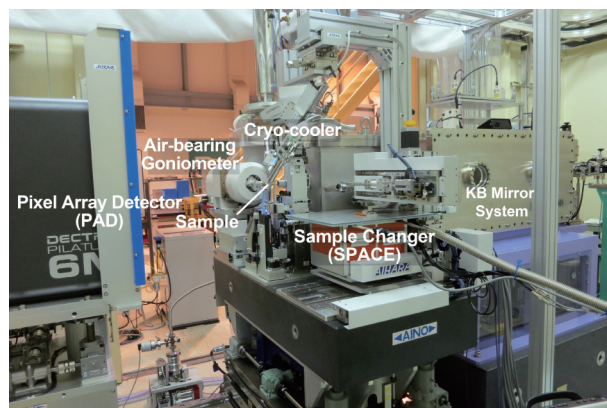


**Fig. 6** (Color online) Structure determination from 10  $\mu\text{m}$  size of the YidC microcrystal at 3  $\text{\AA}$  resolution<sup>51</sup>. The protein YidC inserts its substrates into the membrane, thereby facilitating membrane protein assembly in bacteria.

析が不可能な10  $\mu\text{m}$  以下の微小結晶からの構造解析を目指したタンパク質結晶構造解析専用のマイクロビームビームラインの開発が進められている。スイス・SLSの5 $\times$ 10  $\mu\text{m}^2$  集光ビームや米国・APSの5  $\mu\text{m}\phi$  の成形ビームを初めとして、多くの放射光施設で次世代タンパク質結晶構造解析用のマイクロビームビームラインが建設された<sup>49</sup>。

我が国でも、2007年より SPring-8 において微小結晶構造解析に最適化した超高輝度マイクロビームビームラインの建設を進め、2010年から利用を開始している。その理研ターゲットタンパク (BL32XU) では、タンパク質結晶構造解析専用として世界で初めて試料位置での1  $\mu\text{m}$  サイズ集光を実現している。このビームラインは真空封止ハイブリッドアンジュレータからの高輝度放射光を超平坦ミラーで2次元集光することにより、試料位置で1~10  $\mu\text{m}$  角サイズで6 $\times$ 10<sup>10</sup> photons/sec/ $\mu\text{m}^2$  という世界最高輝度のマイクロビームを実現している<sup>50</sup>。この1  $\mu\text{m}$  角のマイクロビームにより Fig. 6 に示すような10  $\mu\text{m}$  サイズの膜タンパク質微小結晶から3  $\text{\AA}$  分解能での構造決定に成功している<sup>51</sup>。一方、このような超高輝度マイクロビームは放射線とタンパク質の相互作用として原理的に避けられない深刻な放射線損傷<sup>23</sup>を引き起こした。そこで、微小結晶構造解析では放射線損傷を低減しながら良好な回折強度を測定するため、マイクロビームで結晶上のX線照射位置を移動させながら回折強度を測定する「ヘリカルデータ収集法」<sup>52</sup>が利用されている。BL32XUでも、「ヘリカルデータ収集法」を標準測定法として導入し、これまで解析不可能だった10  $\mu\text{m}$  サイズ以下の微小結晶からの回折強度データ収集を可能とした。さらに、SPring-8では2013年にアンジュレータを光源とするタンパク質結晶構造解析用BL41XUにBL32XUで開発された光学系・回折計およびデータ収集技術を移転するとともに、最先端のピクセルアレイ検出器 (Pixel Array Detector, PAD) を導入して微小結晶構造解析対応<sup>53</sup>を進め (Fig. 7)、2本の微小結晶構造解析用ビームライン体制を構築している。

発現精製や結晶化が難しい膜タンパク質や高分子量のタ



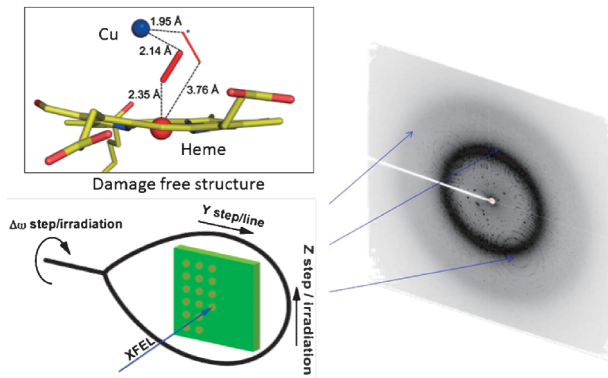
**Fig. 7** (Color online) New experimental station of BL41XU at SPring-8. The precise two-dimensional focusing mirror which generated a few  $\mu\text{m}$  size of microbeam, a diffractometer using highly precise air-bearing and a high-speed and high-sensitive pixel array detector (PAD) were introduced for the data collections for micro crystals.

ンパク質複合体の立体構造を知りたいという要望の高まりから、微小な結晶からの高精度の回折強度データに向けた高輝度マイクロビームビームラインへの期待は大きい。現在建設中のNSLS-II, MAX-IV, TPSなど次世代放射光施設では、1  $\mu\text{m}$  サイズのマイクロビームによる微小結晶構造解析が世界標準となりつつある。

## 6. 構造機能研究に向けたX線自由電子レーザーの利用

放射光の利用がタンパク質結晶構造解析に様々な革新をもたらしてきたなか、新しい光源としてX線自由電子レーザー (XFEL) が開発され、米国 Linac Coherent Light Source (LCLS)<sup>54</sup>と日本のSPring-8 Angstrom Compact Laser (SACLA)<sup>55</sup>の2つの施設で利用可能となった。この新しい光源XFELでこれまでの放射光によるタンパク質結晶構造解析では観測できなかった生体内でのタンパク質などの精密な反応過程を「あるがままの形」で明らかにすることを目的とした研究が開始された。

ここでは、反応過程の活性状態の放射線損傷の無い「静的」な構造解析を実現する無損傷高分解能X線結晶構造解析、さらに外部からのポンプ光により反応過程を制御して「動的」な構造解析を目指した超高分解能時分割構造解析についてふれる。いずれの解析もXFEL光がフェムト秒程度の大強度パルスX線である特徴を生かして、観察タンパク質の変化・動きをスナップショットで切り出して解析することが基本となる。これは大強度のXFEL光を照射すると、放射線損傷により試料が数十ピコ秒の時間でイオン化過程を経て破壊 (destroy) されてしまうが、そのフェムト秒程度の極短パルス幅のうちに破壊する前の回折像 (diffraction image) が記録可能である “Diffract be-



**Fig. 8** (Color online) The present experimental setup of damage-free X-ray structural analyses at SACLA. The distance between each irradiation point was set to  $50\ \mu\text{m}$  to prevent the radiation damage of successive XFEL pulses. The  $\text{O}_2$ -reduction site of bovine cytochrome oxidase clearly shows damage-free X-ray structure.

fore destroy<sup>56)</sup>と呼ばれる測定原理に基づいている。

無損傷高分解能 X 線結晶構造解析では、一般的な回折計を XFEL に導入して **Fig. 8** に示すような大きな結晶を使って XFEL パルスごとにその照射位置を変えながら一連の高分解能回折像を記録する。大きな結晶は、回折に寄与する結晶体積を増大させ容易に高分解能解析が可能である。また、大きな結晶では一つの結晶から多数の連続した回転角の静止回折写真を取得可能で、その回折強度処理も容易である。SACLA では、放射線損傷によりタンパク質の機能を担う活性中心の正確な構造決定が困難な試料を対象に研究開発が進められており、本年チトクロム酸化酵素の酸素還元反応の活性中心の無損傷構造が  $1.9\ \text{\AA}$  という高い分解能で解析された<sup>57)</sup>。

また、XFEL パルスごとに新しい微小結晶試料を液体ビーム等で照射野に導入し、回折データを取得する方式は、Serial Femtosecond Crystallography (SFX)<sup>58)</sup> と呼ばれ、最近では、LCLS においてミクロンサイズの微小結晶を対象にした実験結果が多数報告されるようになった。SACLA でも、SFX システムの開発が精力的に行われている。

今後 XFEL のタンパク質構造研究は、これらの放射線損傷の無い静的構造解析技術を基礎として、外部からのポンプ光によりタンパク質の反応過程を制御した動的構造(機能発現時における構造変化や短寿命反応中間体の構造)解析技術<sup>59)</sup>の確立が望まれている。これらの動的構造解析は、タンパク質の反応機構と生理機能を原子・電子レベルの「反応化学」の視点で解明するために必要であり、将来的には生命機能の理解に繋がる重要な情報を与える解析手法として期待される。

## 7. おわりに

Kendrew のミオグロビンの構造決定を源流として脈々

と続くタンパク質結晶構造解析の発展によって今や放射光は欠かす事の出来ない重要な役割を担っている。放射光は測定データ精度の大幅な向上や新規位相決定法の開発など、タンパク質結晶構造解析に飛躍的な進歩をもたらした。世界的に第3世代放射光以降のタンパク質結晶構造解析用ビームラインでは、アンジュレータ光源と高集光光学系を組み合わせることで実現した高輝度マイクロビームを活用して高難度タンパク質の微小結晶や超巨大分子複合体の長格子結晶にもその解析対象を拡大しつつある。また、多くのビームラインでは、ユーザが MAD・SAD 法など位相決定のための回折強度測定を簡単に実現するユーザインターフェースや測定戦略補助ソフトが一般化され、構造決定の簡便化・迅速化が進んでいる。しかし、高輝度放射光の性能を最大限活用するには、原理的に避けられない放射線損傷を如何にコントロールしながら実験を進めていくかが大変重要であり、「ヘリカルデータ収集法」や XFEL の利用など放射線損傷の克服に向けた取り組みが続けられている。これら放射光ビームラインによるタンパク質結晶構造解析の高度化は、今まで不可能であった高難度サンプルの解析可能性の助けになるとともに、多くのビームライン利用者の負担を軽減するものであり、今後もタンパク質結晶構造解析の一層の拡大と発展が期待される。

また、フェムト秒という超極短パルス X 線が利用できる XFEL の登場は、放射線損傷の影響を全く受けていない原子レベルでの高分解能構造や反応過程を実時間で追跡できる超高速時分割結晶構造解析など、新しいタンパク質 X 結晶構造解析を開拓できる新しい時代の到来を予感させるものである。

## 謝辞

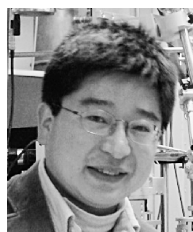
SPring-8 の BL32XU および KEK/PF の BL-1A は文部科学省「ターゲットタンパク研究プログラム」の技術開発「解析」領域課題により建設された。現在、SPring-8 および KEK/PF のタンパク質結晶構造解析では文部科学省「創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業」の支援によりビームライン高度化およびユーザ利用支援を進めている。また、SACLA で進めている無損傷結晶構造解析の一部は文部科学省「X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題」等の支援を受けて実施している。

## 参考文献

- 1) T. Blundell and L. Johnson: Protein crystallography (Academic Press, London, UK). (1976).
- 2) J. D. Bernal and D. Crowfoot: Nature **133**, 794 (1934).
- 3) R. Franklin and R.G. Gosling: Nature **172**, 156 (1953).
- 4) J. D. Watson and F. H. C. Crick: Nature **171**, 737 (1953).
- 5) J. C. Kendrew *et al.*: Nature **181**, 662 (1958).
- 6) J. C. Kendrew *et al.*: Nature **185**, 422 (1960).
- 7) M. F. Perutz *et al.*: Nature **185**, 416 (1960).
- 8) C. C. Blake *et al.*: Nature **206**, 757 (1965).

- 9) L. N. Johnson *et al.*: Nature **206**, 761 (1965).  
 10) F. C. Bernstein *et al.*: J. Mol. Biol. **112**, 535 (1977).  
 11) G. Rosenbaum, K. Holmes and J. Witz: Nature **230**, 434 (1971).  
 12) J. C. Phillips *et al.*: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **73**, 128 (1976).  
 13) J. R. Helliwell *et al.*: J. Phys. E Sci. Instrum. **15**, 1363, (1982).  
 14) J. R. Helliwell: Macromolecular Crystallography with Synchrotron Radiation. (Cambridge University Press.) (1992).  
 15) H. M. Berman *et al.*: Nucleic Acids Research **28**, 235 (2000).  
 16) Y. Satow and Y. Iitaka: Rev. Sci Instrum. **60**, 2390 (1989).  
 17) W. A. Hendrickson *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**, 2190 (1989).  
 18) Y. Amemiya and J. Miyahara: Nature **336**, 89 (1988).  
 19) 坂部知平: 日本放射光学会誌 **44**, 95 (2002).  
 20) T. Tsukihara *et al.*: Science **272**, 1136 (1996).  
 21) H. Kamitsubo: J. Synchrotron Rad. **5**, 162 (1998).  
 22) M. Kawamoto *et al.*: Nucl. Instrum. Methods A **467-468**, 1375 (2001).  
 23) T. Kumasaka *et al.*: Structure **10**, 1205 (2002).  
 24) C. Toyoshima *et al.*: Nature **405**, 647 (2000).  
 25) K. Palczewski *et al.*: Science **289**, 739 (2000).  
 26) E. M. H. Duke and L. N. Johnson: Proc R Soc A **466**, 3421 (2010).  
 27) W. A. Hendrickson: Science, **254**, 51 (1991).  
 28) W. A. Hendrickson *et al.*: EMBO J. **9**, 1665 (1990).  
 29) A. E. Cohen *et al.*: J Appl Cryst **35**, 720 (2002).  
 30) F. Cipriani *et al.*: Acta cryst. D **62**, 1251 (2006).  
 31) H. Murakami *et al.*: Journal of Applied Crystallography **45**, 234 (2012).  
 32) S. M. Soltis *et al.*: Acta Cryst. D **64**, 1210 (2008).  
 33) A. Pauluhn: J Synchrotron Radiat **18**, 595 (2011).  
 34) A. Joachimiak: Curr. Opin. Struct. Biol. **19**, 573 (2009).  
 35) D. W. Green *et al.*: Proc. R. Soc. Lond. A **225**, 287 (1954).  
 36) J. Karle: Int. J. Quant. Chem. **7**, 357 (1980).  
 37) L. M. Rice, T.N. Earnest and A.T. Brunger: Acta Cryst. D **56**, 1413 (2000).  
 38) M. Cianci, J.R. Helliwell and A. Suzuki: Acta Cryst. D **64**, 1196 (2008).  
 39) H. Ru *et al.*: Acta Cryst. D **68**, 521 (2012).  
 40) G. Evans *et al.*: Crystallography Rev **17**, 105 (2011).  
 41) C. G. Darwin: Philos. Mag. **27**, 315 (1914).  
 42) H. Kitamura: J. Synchrotron Rad. **7**, 121 (2000).  
 43) E. Yamashita *et al.*: Acta Cryst A **58**, C288 (2002).  
 44) Y. Umena *et al.*: Nature **473**, 55 (2011).  
 45) T. Shimizu *et al.*: Biochemistry **41**, 6651 (2002).  
 46) S. Murakami *et al.*: Nature **419**, 587 (2002).  
 47) H. Tanaka *et al.*: Science **323**, 384 (2009).  
 48) A. Perrakis *et al.*: Acta Cryst. D **55**, 1765 (1999).  
 49) J. L. Smith, R. F. Fischetti and M. Yamamoto: Curr. Opin. Struct. Biol. **22**, 602 (2012).  
 50) K. Hirata *et al.*: AIP conference proceedings **1234**, 901 (2010).  
 51) K. Kumazaki *et al.*: Nature **509**, 516 (2014).  
 52) D. Flot: Journal of Synchrotron Radiation **17**, 107 (2010).  
 53) P. Kraft P. *et al.*: J. Synchrotron Rad. **16**, 368 (2009).  
 54) P. Emma *et al.*: Nature photonics **4**, 641 (2010).  
 55) T. Ishikawa *et al.*: Nature photonics **6**, 540 (2012).  
 56) H N. Chapman *et al.*: Nature **470**, 73 (2011).  
 57) K. Hirata *et al.*: Nature Methods **11**, 734 (2014).  
 58) B. D. Patterson: Crystallography Reviews **20**, 242 (2014).  
 59) C. Kupitz, *et al.*: Nature (2014) doi: 10.1038/nature13453

## 著者紹介



## 山本雅貴

理化学研究所・放射光科学総合研究センター・利用システム開発研究部門長(兼)基盤研究部長 博士(理学)  
 E-mail: yamamoto@riken.jp  
 専門: X線結晶構造解析

## 【略歴】

1991年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了。同年、理化学研究所に入所しSPring-8のタンパク質結晶構造解析用ビームラインの研究開発と構造生物学研究に従事する。2011年より利用システム開発研究部門長。兵庫県立大学大学院客員教授および神戸大学連携創造本部客員教授も併任。おもな研究分野は放射光を用いた生体高分子に対するX線回折実験技術および解析方法の開発。趣味は近隣散歩。鉄道。

## Development of the protein crystallography by synchrotron radiation

Masaki YAMAMOTO RIKEN SPring-8 Center, 1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148

**Abstract** Since crystal structure determination of the first protein by Kendrew in 1959, protein crystallography developed into the leading role of the protein structure study by various technology developments. Especially the utilization of synchrotron radiation from the 1990s brought innovative progress of protein crystallography on the data quality and the phasing method and had expanded the sample targets including membrane proteins and supramolecular complexes. Here I give the outline of the history and the future prospects of the protein crystallography from the role of synchrotron radiation.