

■JSR2016企画講演報告

企画講演 1 『機能発現サイトの三次元可視化最前線』

田尻寛男, 室隆桂之 (JASRI)

企画要旨

機能性材料では不純物や界面, ナノ物質等の局所的な原子構造体や生体物質の化学反応部位, すなわち「活性サイト」が機能発現の重要な役割を担っている。ホログラフィーの原理に基づく活性サイトの放射光三次元可視化手法は近年発展が著しく, その機構解明の強力なツールたりうる。本企画では, 無機からバイオ材料に至る幅広い測定対象の放射光による活性サイト研究の現状を確認するとともに今後の新たな研究展開について議論を深めたい。

企画参加人数 約100名

講演構成

1. 「趣旨説明 機能発現サイトの三次元可視化最前線」
田尻寛男 (JASRI)
2. 「蛍光 X 線ホログラフィーによる特異な 3D 構造の可視化」
林好一 (名工大)
3. 「X 線 CTR 散乱による有機半導体の表面構造の可視化」
若林裕助 (阪大)
4. 「X 線損傷と 3D 活性サイトイメージング」
赤木和人 (東北大)
5. 「放射光を用いたバイオ材料活性サイト計測の新しい展開」
佐々木裕次 (東大)
6. 「光電子ホログラフィーによる三次元局所原子構造: 層状物質を例に」
松井文彦 (奈良先端大)
7. 「蛍光 X 線・光電子ホログラフィーの原子像再生理論」
松下智裕 (JASRI)
8. 「産業応用技術における 3D 活性サイトイメージング: 半導体中の不純物サイト」
筒井一生 (東工大)
9. 「総括 活性サイト周りの三次元原子構造解明と新機能材料創成科学の新展開」
大門寛 (奈良先端大)

講演概要

はじめに, 田尻から本企画の趣旨説明が行われた。機能発現に大きく関わる活性サイトは, 一般に三次元周期性を持たないため通常の X 線回折が適用できない。この X 線回折のその先を目指して, 放射光軟・硬 X 線を活用した活性サイトの構造科学に取り組んでいる先生方による講演が行われることが説明された。

林好一氏からは, 蛍光 X 線ホログラフィー (XFH) は局所構造の三次元イメージングが可能で原子分解能が実現できること, 放射光の波長選択性を活用した多波長ホログラムの測定によって双画像問題は解決できることが示された。SPring-8 を使った原子像再生例として, 強磁性半導体コバルトドープ酸化チタンでは, コバルトが通常存在しえない亜酸化チタン構造体を形成していることが紹介され

た。超薄膜や単分子膜など希薄系への展開について質疑応答され, 現状の放射光輝度で XFH による原子像再生が十分に可能である, とのことで大きな発展が期待される。

若林裕助氏からは, 結晶表面に由来する X 線 CTR 散乱を用いた, 結晶深さ方向 (一次元) の原子密度可視化手法が紹介された。KEK PF を活用した有機結晶表面の構造可視化例が示され, テトラセンでは水吸着によって表面構造に緩和がみられた。有機デバイスでは表面近傍がキャリア移動度等の物性を支配しているが, 有機結晶表面の構造解析はこれまでほとんど例がなく, 本可視化手法は非常に有用であることが指摘された。

赤木和人氏からは, 特に有機物において避けられない放射光実験における X 線損傷の問題について, 密度汎関数法に基づく第一原理計算結果が紹介された。X 線損傷の原因である温度上昇と化学的損傷のうち脱励起の時間スケールが数フェムト秒である後者が主に議論された。BEDT-TTF 系では重元素よりも炭素や窒素といった軽元素に内殻励起状態を導入した場合に損傷の蓄積が大きいことが示された。これまで X 線損傷を計算予測する試みはわずかであり, その重要性は今後ますます増えていくであろう。

佐々木裕次氏からは, 生体物質の XFH 測定の試み, および放射光 X 線 1 分子追跡法による成果が紹介された。巨大ヘモグロビン結晶の XFH 測定に成功したこと, 同ヘモグロビンの X 線 1 分子追跡法ではアロステリック転移に近い構造変化を捉えた可能性があることなどが示された。生来的に周期性をもたないため結晶化しない天然変性タンパク質は生物科学の中でも極めて影響力があり, アルツハイマー病の原因となるものも含まれている。SPring-8 や KEK PF を活用して, これら X 線回折でアプローチできない生体物質へ研究が展開されることへの期待は大きい。

松井文彦氏からは, 放射光軟 X 線を利用する光電子ホログラフィー (PEH) が紹介された。SPring-8 の活用例として, 黒鉛にカリウムやカルシウムをインターカレーションした超伝導特性を示す層状物質の可視化像が示された。質疑応答では, PEH が近年発展した理由は何か質問され, 二次元検出器による高速・高効率計測が発展に大きく寄与したとのことで, 装置開発の重要性が改めて認識された。今後の展開として, 実験装置の高エネルギー分解能化 (サブ eV 程度) によって化学状態選別も可能になれば活性サイト研究にとって大きな強みとなる旨コメントがあった。

松下智裕氏からは, XFH と PEH の両ホログラフィー技法の原子像再生理論が紹介された。XFH ではバートン

法の高速計算法を確立し、PEHでは最大エントロピー法を活用した像再生理論を構築したことが示された。これらはフリーソフト3D-AIR-IMAGEに収められユーザーへ提供されている。PEHがなぜ近年進展したか再度質疑応答がなされ、小型リングでは光電子の運動エネルギーが足りず情報量が少なかったがSPRING-8等大型リングの利用でそれが解消されたこと、上述の像再生理論により解析法の難点が解消されたこと、の二つが挙げられた。ここでは光源性能と解析法の進展が手法発展に重要であることが明らかとなった。

筒井一生氏からは、産業応用技術における3D活性サイト研究の展開が示された。二硫化モリブデンからなる新デバイスやCMOS集積回路、窒化ガリウム系パワーデバイスなどの研究例のうち、特にシリコン中の不純物について議論された。典型的な機能発現サイトである半導体中にドーパされた不純物元素ですら、その周りの三次元構造は未だ直接観測された例がないことが強調され、光電子回折やPEHはそれを観測できる可能性のある計測技術であることが指摘された。優れた観測技術により古くて新しいテーマである不純物ドーピングの課題が克服できれば、新プロセス技術の開発に大きく貢献できるであろうことが示唆された。

最後に大門寛氏より本企画講演が総括された。我が国には放射光を活用した独自のあるいは発展・継承してきたホログラフィーの原理に基づく手法群があり、その最大の特長は、周期性をもたない構造の解析もできることであることが指摘された。これまで解析できなかった非周期の活性サイト構造を原子レベルで三次元的にイメージングできるこれら手法を通じて、触媒、太陽電池、スピントロニクス材料、タンパク質分子等、極めて幅広い試料対象にアプローチして「局所構造の物質科学」という新たな学理と新機能材料創成の道筋を切り開いていくべきであり今がその好機である、とまとめられた。

企画講演2『量子ビームの連携による新しい構造生物学』

足立伸一（高エネルギー加速器研究機構
物質構造科学研究所）、
三木邦夫（京都大学大学院理学研究科）

企画趣旨

基礎と応用の科学分野でこれまで広範に利用されてきた量子ビーム技術について、それらを連携・融合利用することの重要性が注目されている。これまで量子ビーム技術はそれぞれ個別に研究開発が行われてきたが、近年は利用する領域が重なり合うようになり、各量子ビームの特性を取り入れて複数の量子ビームを利用することの利点が認識されるようになった。放射光についても、その他の量子ビームを相補的に利用することで、生命科学や物質科学分野での新しい先導的研究が展開されようとしており、その結果もたらされる産業分野の高度化や国際競争力の強化に期待

が集まっている。そのような中で、文部科学省では平成25年度より「光・量子融合連携研究開発プログラム」が開始され、量子ビームを融合的・相補的に用いた研究を推進する基盤が整備されようとしている。生物科学に関連する分野でも、放射光と中性子の連携、放射光とレーザーの融合に着目した研究課題が推進されている。

本企画講演は、放射光と中性子、放射光とレーザーの連携の利用による構造研究の最新の動向を紹介し、新しい構造生物学の方向性を議論することを目的として行われた。また、本企画講演は、文部科学省「光・量子融合連携研究開発プログラム」における下記二つの研究課題（利用課題）が協賛した。

課題「レーザー・放射光融合による光エネルギー変換機構の解明」（課題責任者：高エネルギー加速器研究機構・足立伸一）

課題「中性子と放射光の連携利用によるタンパク質反応プロセスの解明」（課題責任者：京都大学・三木邦夫）

講演構成

0. 趣旨説明 三木邦夫（京大院理）
1. 「放射光によるタンパク質の超高分解結晶構造解析と中性子線回折との連携」 竹田一旗（京大院理）
2. 「薬剤開発を目指したタンパク質の放射光と中性子による精密構造解析」 山縣ゆり子（熊本大薬）
3. 「植物型フェレドキシンの精密構造解析と金属置換体を用いた機能解析」 栗栖源嗣（阪大蛋白研）
4. 「レーザー・放射光融合による人工光合成反応の分子機構解明」 足立伸一（高エネ機構物構研）
5. 「レーザー照射によるヘモグロビンの構造ダイナミクス研究」 佐藤文菜（自治医大）

講演概要

0. オーガナイザーの一人である三木より趣旨説明が行われ、前項の「企画趣旨」に示した本講演企画の背景が説明された。放射光と中性子を連携利用することで、水素原子の構造情報や分子の電子状態が機能解明に重要な光合成や呼吸に関わるタンパク質、創薬ターゲットとなるタンパク質を対象として、タンパク質の高精度解析の技術基盤が確立されようとしていること、また、放射光とレーザーの連携では、太陽光エネルギーを人工的に化学エネルギーに変換する「人工光合成」の高効率化の実現に向けて、物質構造と電子状態の精密計測プラットフォームの構築が目指されていることが示された。

1. 前半の三題は放射光と中性子の連携利用に関するものであった。最初の講演で、竹田一旗氏（京大院理）は「放射光によるタンパク質の超高分解結晶構造解析と中性子線回折との連携」という演題で、近年の放射光施設の高度化により放射光X線を用いたタンパク質の超高分解能解析が可能になり、従来捉えることが困難であった水素原子や外殻電子など微細な構造情報が決定できるようになったことを、電子伝達や光応答に関連したタンパク質を例に

示した。また、中性子構造解析と相補的に組み合わせることで、さらに精度よく微細構造を決定でき、分極や解離に関する知見が得られるという放射光と中性子の将来展望が述べられた。結晶構造解析がタンパク質の物性や反応性の解明に直接的に迫り、タンパク質の機能発現を実験的に論じる将来を期待させるものであった。

2. つづいて山縣ゆり子氏（熊本大薬）が、「薬剤開発を目指したタンパク質の放射光と中性子による精密構造解析」と題して、薬剤開発の視点からの放射光と中性子の融合の利用について講演した。構造生物学の進展がもたらした標的タンパク質の立体構造に基づく薬剤設計（Structure Based Drug Design, SBDD）の現状を紹介し、膜タンパク質を含む多くの標的タンパク質の薬剤設計への貢献について述べた。その上で、薬剤設計における精密構造解析の意義とその重要性に言及し、自身が進めている新規抗ガン剤の標的として期待されているタンパク質についての放射光と中性子による精密構造解析の現状を紹介した。このような研究の進展が、基質認識機構や薬剤設計の構造基盤の解明に大きな進展をもたらすことを期待させるものであった。

3. 栗栖源嗣氏（阪大蛋白研）の「植物型フェレドキシンの精密構造解析と金属置換体を用いた機能解析」では、鉄・イオウクラスターを持つ植物型フェレドキシンの放射光を利用した高分解能構造解析、変異体タンパク質や金属置換タンパク質を用いた機能解析が紹介された。精密構造解析の重要性を示すとともに、金属置換タンパク質を用いた酸化型および還元型による活性型電子伝達複合体の精密構造解析についても言及した。放射光によるタンパク質構造解析の将来の大きな可能性を示唆するものであり、中性子線解析との連携利用に道を拓くことを示すものであった。

4. つづく二題は放射光とレーザーの融合に関するもので、まず、オーガナイザーの一人である足立（高エネ機構物構研）が、「レーザー・放射光融合による人工光合成反応の分子機構解明」と題する講演を行った。エネルギー需給に占める再生可能エネルギーの比率を向上させるために、太陽光エネルギーを化学エネルギーに変換する光触媒反応（人工光合成）の高効率化が重要な研究課題となっている。光触媒反応のエネルギー変換効率向上に向けて、光励起後の電荷分離状態の構造と電子状態をレーザーポンプ・放射光プローブ法で計測する手法開発を進めており、開発の現状を紹介した。今後、本手法を実際の光触媒系に適用し、反応機構解明から高効率光触媒の開発につながることを期待させる内容であった。

5. 最後に、佐藤文菜氏（自治医大）は、「レーザー光照射によるヘモグロビンの構造ダイナミクス研究」と題して、レーザー光照射によりタンパク質の結晶構造が変化する過程を時間分解解析した事例について紹介した。測定温度100 K 付近の低温条件下でレーザー光を連続照射することにより、配位子（一酸化炭素）がヘモグロビン分子内を

拡散する過程とともに、ヘモグロビンの四次構造変化の初期過程を可視化できることを示した。

以上のように、生物科学分野における放射光と中性子ならびにレーザーの連携・融合利用について、研究の現状の紹介と将来の可能性がさまざまな視点から示され、活発な討論が行われた。この企画講演への参加者は約100名であった。

企画講演3「細胞から生体高分子までの時空間階層イメージングと放射光」

山本雅貴（理研）、中迫雅由（慶應大）

企画趣旨

放射光は、核酸、タンパク質など生体高分子の複雑かつ合理的な立体構造の精密解析による分子的基盤情報の蓄積に貢献してきた。最先端の生命科学研究では、それらの情報を基にした生命機能を実現する生体システムの時空間階層構造の解明が期待されている。そこでは、離合集散する生体高分子複合体、細胞小器官（オルガネラ）さらには細胞という様々な時空間階層で互いに連携したダイナミクス解明に向けて、放射光・XFELによるX線回折顕微鏡、クライオ電子顕微鏡・超解像顕微鏡など生体システムを直接構造観察するイメージング法や情報を階層的に束ねる計算解析法の開発が精力的に進められている。

本企画では放射光・XFELでの研究に留まらず電子顕微鏡・可視光イメージングや計算機科学からの最先端研究の報告を交えて、生体システムの時空間階層構造の解明に向けた近未来の生命科学イメージングの中での放射光の役割について議論を深めた。

企画参加人数 約110名

講演構成

1. 「趣旨説明」 山本雅貴（理研）
2. 「細胞内分子ダイナミクスを理解するために必要なシミュレーションと放射光生命科学」 杉田有治（理研）
3. 「X線結晶構造解析による生体高分子の時空間階層構造研究の可能性」 加藤博章（京大）
4. 「クライオ電子顕微鏡による生命科学研究の最先端」 難波啓一（阪大）
5. 「階層横断的に機能する分子システムの構造アンサンブルとダイナミクス研究～生命の時間を規定する時計タンパク質を例に～」 秋山修志（分子研）
6. 「蛍光ライブイメージングと超解像顕微鏡による生命動態学研究的の最先端」 松永幸大（東理大）
7. 「コヒーレントX線回折イメージングで解き明かされた始めた細胞の姿」 中迫雅由（慶應大）

講演概要

企画提案者の山本からの本企画の趣旨説明の後、放射光分野、放射光以外の分野から各3件の発表を交互に挟む形で講演を進めた。

まず細胞をシステムとして俯瞰する視点から、杉田氏が

分子動力学 (MD) 計算による生体シミュレーションを紹介した。分子動力学計算は専用計算機“Anton”の登場以降急速な技術革新が進み、1週間でシミュレーション時間2マイクロ秒が計算可能となり、生体機能の発現に重要なより大きな動きをシミュレーション可能なミリ秒も視野に入ってきている。それを受けて、杉田氏は分子クラウディング状態にある細胞内シミュレーションに取り組んでおり、京コンピュータの全原子シミュレーションにより12ナノ秒の細胞質内の相互作用計算を達成したとの報告があった。そこでは細胞内でのタンパク質構造のしなやかな変化やタンパク質間相互作用の多様性が観察されており、全原子シミュレーションを進めることで、細胞内局所領域における生体分子群の生のダイナミクスに迫ることが可能になると締めくくられた。

続いて加藤氏からは、がん細胞の薬剤耐性獲得の原因タンパク質であるABCトランスポーターの結晶構造解析に基づく薬剤排出ダイナミクス研究が紹介された。1990年代初頭の時分割ラウエ法、さらには、化合物との複合体による反応中間体解析など、結晶構造解析によるダイナミクス研究の困難さが紹介された。ABCトランスポーターのダイナミクス研究では、MD計算によるタンパク内空洞での化合物の振舞いシミュレーションやNMRによる反応時間測定なども併用して、多角的に機能発現メカニズムに迫る研究成果を積み上げてきていることが報告された。今後はそれらの成果を基に、基質との相互作用を制御した試料によるXFEL時分割構造解析を予定しており、多角的な実験技術を駆使してタンパク質のダイナミクス研究に取り組む重要性が指摘された。

難波氏からは、クライオ電顕の現状と可能性が紹介された。まず複雑なナノマシンであるべん毛の運動メカニズム研究が紹介され、クライオ電顕では、真空内での焼いた干物と称されていた解析から氷包埋による凍結固定サンプルからの活性状態の研究へと大きな進化を遂げていた。また低分解能(1nm)での単分子構造解析構造は結晶構造との組合せにより、複合体のダイナミクス研究を可能にした。さらに、シングルエレクトロンカウンティングが可能なダイレクト検出器の登場により、リボソームの3.2Å分解能構造解析が実現され、ノーベル賞科学者による“リボソームの構造解析は結晶構造解析からクライオ電顕の時代へ”との発言など、その急速な発展の現状が紹介された。最後に、クライオ電顕では氷包埋による氷の厚さの影響で、小分子が見にくい点が今後の課題として示された。

休憩を挟んだ後半のセッションは、まず秋山氏から「生体分子システムの構造アンサンブル解析に放射光はどの様に貢献するのか」についてX線小角散乱(SAXS)を中心とした研究の紹介があった。SAXSの解析では空間平均された測定散乱曲線と、参照モデルや分子を模したビーズモデルからの計算散乱曲線の最適化による構造推定が進められる。解析では分子やドメインの形状レベルの構造が

求められることに加え、溶液状態での測定のため複数分子種やその離合集散系、複合体の時間発展の解析が可能である。この様なSAXSの長所を生かした解析例として、3種の時計タンパク質の混合系における24時間周期の遅くかつ秩序を保持したタンパク質の離合集散解析が紹介された。SAXSによる構造ダイナミクス研究では、MDとの融合による散乱曲線のシミュレーションが主流であるが、今後はタンパク質のドメイン構造などを粗視化したライブラリーによるアンサンブル解析や他の測定手法(結晶解析・WAXS)と組合せた情報量の積み増しが重要と話を締めくくった。

松永氏は可視光による蛍光ライブイメージングと超解像顕微鏡の最先端研究を紹介した。蛍光ライブイメージングではGFP他の蛍光タンパク質をプローブとした細胞内の染色体の分裂過程可視化や薬剤の時間的作用点の解明など生命機能時間展開研究の成果が紹介された。また、光照射によるタンパク質機能阻害を利用したイメージングなど細胞の機能解析の可能性が議論された。さらに、可視光の回折限界(200nm)を超える超解像イメージングについては、“Do it yourself biology”として開発した超解像顕微鏡がノーベル賞に繋がった逸話を紹介しながら、超解像イメージング(STOM)の原理からタンパク質単分子の動き可視化までを俯瞰した。超高解像顕微鏡による超高解像イメージングはNature Milestoneに挙げられているが、観察対象の細胞死を招きやすいという問題の解決が今後重要であり実際の成果はこれからであると締めくくった。最後の講演者は中迫氏で、XFELの登場により急速な進歩を遂げているCXDIの開発状況と現在の研究成果について報告があった。SACLAでは30Hzの高繰返しで凍結固定試料から大量の回折イメージを記録する回折計や位相回復のための自動データ処理システムの構築などCXDI実験環境の整備が順調に進んでおり、具体的には細胞核や葉緑体の投影電子密度や、その投影電子密度からの三次元再構成について報告があった。また、SPRING-8での単一の生体粒子を対象とした低温CXDIトモグラフィーについても報告があった。これらの報告から、CXDIは電子顕微鏡の適応範囲外の厚い試料の内部構造を光学顕微鏡では不可能な高分解能で可視化するための手法として、細胞内のシームレスな時空間階層構造イメージングにおいて今後その重要が高まるものと期待された。

学会3日目の午前中全体を使った企画講演であったが、放射光に留まることなく先端生命科学のイメージング・構造解析を網羅したプログラム構成により、生命科学関係者のみならず他分野からも多くの参加者があり、立ち見もみられる盛況ぶりとなった。今回の企画講演により、それぞれの解析手法の長所短所を俯瞰することで、我が国の生命科学研究における放射光・XFELを使った構造生物学やイメージングの役割と位置づけを議論する大変良い機会が得られたものと確信している。