

SPring-8 戦略活用プログラム課題利用報告書

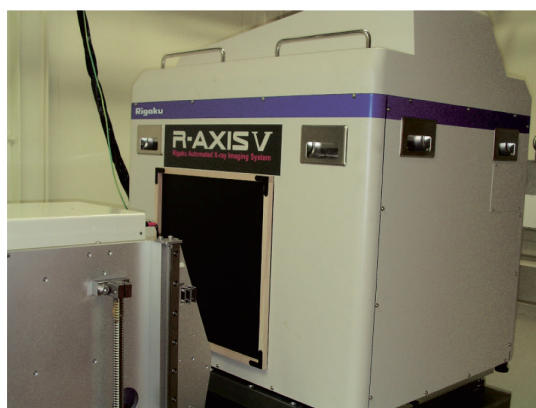
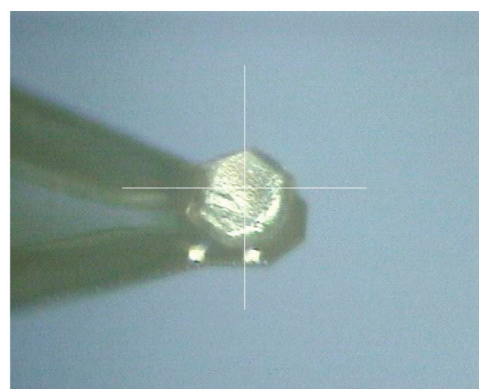
課題番号	2005B0885
実施課題名	産業利用を目的とした SPring-8 での S-SAD 法ルーチン化の試み
実験責任者	所属：ファルマ・アクセス（株）播磨事業所 氏名：廣瀬 雷太
使用ビームライン	BL26B2

1 概要

近年、硫黄原子の異常分散を使ったタンパク質結晶の位相決定法である S-SAD 法が注目を集めている。S-SAD は、MIR/MAD などに必要な重原子をタンパク質結晶に導入する必要がなく、**native** 結晶だけで構造決定が可能である。本実験では、ヨーロッパで S-SAD の評価に標準的に利用されているブタ由来インスリンの結晶を使い、SPring-8 におけるタンパク質回折実験の標準的なビームラインである BL26B2 において、S-SAD による構造決定がほぼ自動で行えることを実証した。

一般に、硫黄原子による異常分散は微弱であり、これを検出するためには測定系におけるノイズの低減が重要となってくる。本課題共同研究者である長谷川らによる実験室系での同様な S-SAD についての研究（山野昭人他、CrK α 線を用いた SAD 法による位相決定、構造生物 Vol10 No1、30-38、2004）では、結晶を Cornell 大学で開発された MicroMount™ にマウントすることや、R-AXIS VII の受光面の黒紙を X 線の吸収が少ないポリカーボネート製フィルムに交換し、X 線通路を He 置換することが有効であると報告している。

Kapton®フィルムをペン先のような形状にした結晶マウント用ツールである MicroMount™（右図：インスリン結晶をマウントした写真）は、従来のナイロンループに比べ、そのものの X 線の吸収の影響が少ないだけでなく、結晶とともにマウントされる結晶化母液を最小限に抑えることができるため、母液による X 線の散乱を低減することができる。



製紙法から黒紙は X 線の吸収の面では不均一な可能性が高い。一方、ポリカーボネートフィルムは紙より X 線の透過性が良いが、可視光の遮光性に劣る。両者の有効性を調べるため、R-AXIS V の受光面に既存の黒紙に代わって容易に取り付けられる磁石付き受光面フレーム（左図：ポリカーボネートフィルムを貼って R-AXIS V に取り付けた様子）を作成した。この受光面フレームを黒紙、ポリカーボネートフィルム、黒紙なし（直接露光）にした計 3 条件で比較を行った。また、CCD 検出器 Jupiter210 でも測定を行った。

2 実験方法

ブタ由来インスリン結晶はシッティングドロップ蒸気拡散法で作成した。Fluka より購入したインスリンを 50mM リン酸緩衝液 (pH11.0) に 15mg/ml になるように溶かし、リザーバ溶液 (25% ethylene glycol 水溶液) と 2 μ l ずつ混ぜてドロップとした。20°C インキュベータに静置して 3–4 日後に六角柱型の結晶を得た。

Jupiter210、R-AXIS V (黒紙)、R-AXIS V (ポリカーボネート)、R-AXIS V (直接露光) のそれぞれの条件において、別個のインスリン結晶をクライオプロテクタントなしで MicroMount™ でマウントし、100K でフラッシュクーリングした後、その温度で回折データを測定した。

波長は、実験室系で使われる CuK α 線との比較も可能とするために 1.54Å とし、測定条件は右表のように Jupiter210 でのカメラ長および露光時間を除いて同一とした。なお、R-AXIS V に使われているイメージングプレートは可視光にあると潜像が消去されてしまう。これを防ぐため、直接露光の実験の際は、実験ハッチ内の全照明を消し、また外部からの明かりの進入を防いだ。また、ポリカーボネートは強い可視光を透過するため、測定時には同軸カメラ用の照明を消した。

表：データ測定条件

波長	1.54Å
カメラ長	200mm (R-AXIS V) 150mm (Jupiter210)
振動範囲	-90° ~+90°
振動角	1°
露光時間	40 秒 (R-AXIS V) 25 秒 (Jupiter210)

得られた測定データを HKL2000 (HKL Research, Inc.) で処理し、CRANK (Leiden University) で位相決定、ARP/wARP (EMBL) でモデルの構築を行った。なお、これらのソフトウェアはデフォルトのまま使用し、S-SAD の自動化の可能性について評価した。

3 結果と考察

表に示すように、直接露光およびポリカーボネートの条件で測定したケースにおいて、インシュリンの全アミノ酸 51 残基のうち 46 (直接露光) と 48 残基 (ポリカーボネート) を自動的にモデル構築し、硫黄の異常分散を用いて自動的に構造解析できることを実証できた。

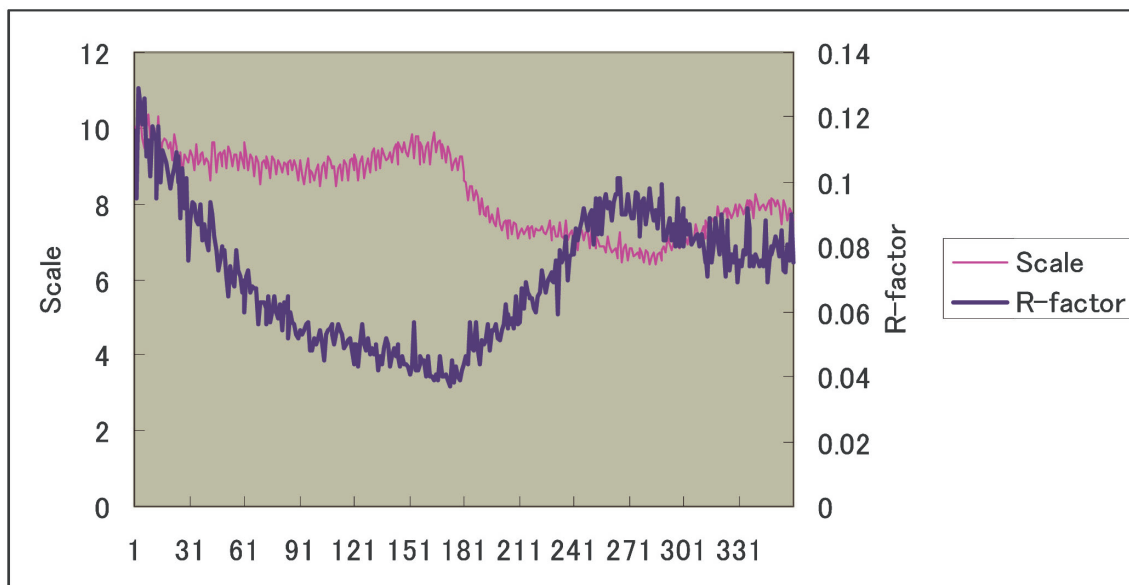
表：各データセットでの結果

検出器	R-AXIS V (直接露光)	R-AXIS V (ポリ カーボネート)	R-AXIS V (黒紙)	Jupiter210 CCD
空間群	<i>I</i> 2 ₁ 3	<i>I</i> 2 ₁ 3	<i>I</i> 2 ₁ 3	<i>I</i> 2 ₁ 3
格子定数 (Å)	<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> =77.47	<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> =77.03	<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> =77.64	<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> =77.73
最大分解能 (Å)	2.01	2.01	2.00	2.52
R-merge (%)	4.2	4.6	4.6	4.8
Redundancy	20.3	20.2	20.5	19.6
初期位相の FOM	0.201	0.254	0.156	0.189
位相改良後の FOM	0.712	0.753	0.309	0.446
構築された残基数/全残基数	46/51	48/51	0/51	0/51
モデルの R(%)	19.9	20.8	N/A	N/A
PDB9INS との rmsd (Å)	0.19	0.24	N/A	N/A

R-AXIS Vで前面パネルを黒紙にして測定したデータではモデル構築ができなかったことから、黒紙による吸収に起因する測定ノイズは硫黄の異常分散のシグナルより大きくなる可能性があり、これをポリカーボネートに交換するなどの対策が必要であることが明らかになった。

実際の測定は冗長性 (Redundancy) をあげるために同一結晶で 180° の範囲を 2 回繰り返し測定したが、これらをマージした 360° のデータでは構造決定ができず、 180° のデータを使ったときのみ構造が決定できた。一般に S-SAD では冗長性をあげて統計的に精度を上げることが重要といわれてきたが、必ずしもそのことは必要条件でないことを本研究では示した。 360° のデータで構造決定できなかった原因は、X 線のダメージによる結晶の劣化であると考えられる。ポリカーボネートを使ったデータセットにおいて、 180° では R-merge が 4.6% であるのに対し、 360° のデータでは R-merge が 7.1% となり、エラーが 1.5 倍に増えたことを意味する。異常分散シグナルがこのエラーに埋没したために位相が決定できなかったと考えられる。

長波長の放射光は結晶に与えるダメージが大きく、劣化が生じやすい。したがって、結晶がダメージに弱い場合には、冗長性を重視するのではなく、少ない範囲で精度よく測定するほうが構造が解ける可能性がある。このためには、異常分散を精度よく測定できる方法、たとえば Inverse beam 法や Bijovet 対を同一イメージで測定するように結晶の軸立てを行う方法、などを検討する必要があると考えられる。



グラフ：ポリカーボネートを使ったときの強度およびエラーの推移。180 枚目以降からスケール因子の減少および R 値の増加がある。

Jupiter210 CCD ではモデルの構築がうまくいかなかった。一つの要因は最大分解能が低い (Jupiter210 で 2.52 \AA 、R-AXIS V で 2.01 \AA) 点だと思われる。DM などの位相改良ソフトウェアは、データの最大分解能が高いほうが位相改良の効果が高い。試しにポリカーボネートでのデータのうち 2.5 \AA 以下だけを使って解析したところ、重原子サイトのサーチには成功したが、位相の改良が進まず、モデルは全く構築されなかった。他の要因がある可能性もあるが、今回の実験で見出すことはできなかった。

最大分解能は結晶から検出器までの距離（カメラ長）と検出器の受光面積に依存するため、S-SADのように長波長を使う場合は、カメラ長をより短くできるほうが有効だと思われる。もしくは、 1\AA と 1.54\AA （もしくはより長い波長）と1つの結晶で2データセットを測定し、長波長のデータで重原子位置を決定し、短波長のデータを使って位相改良およびモデル構築を行うという方法も考えられる。

4 結論

SPring-8におけるタンパク質回折実験の標準的なビームラインであるBL26B2において測定した、ブタ由来インスリン結晶の回折データを用いてS-SAD法での構造解析を試みた結果、S-SADによる構造決定が可能であることが確認された。

今後の課題としては、SPring-8においてS-SADを行うための波長の最適化、Inverse Beam法などの有効性の検証、SPACEを使ったS-SADの自動化が可能であるかどうかの検証、などが挙げられる。

最後に、本研究に関してご指導、ご助言をいただいた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の山本雅貴室長および上野剛博士、ならびに開発室スタッフの方々に深く感謝いたします。