

研究技術開発室

Division of Synchrotron Radiation Instrumentation

室長 山本 雅貴

YAMAMOTO, Masaki

タンパク質結晶構造解析は放射光の高輝度かつ波長可変なX線の利用により、実験手法として大幅な進歩を遂げた。第3世代放射光施設 SPring-8 においても、挿入光源や偏向電磁石を光源とする高輝度放射光の利用は構造生物学研究に大きな貢献をしている。当開発室は、SPring-8 の理研構造生物学研究用ビームラインを中心に、微小結晶や超格子結晶からの極限結晶構造解析に向けたビームライン光学系や実験ステーションの装置開発、および迅速回折強度データ収集システムの構築を目指した利用技術開発を進めている。また、4本の理研構造生物学研究用ビームライン (BL26B1&B2, BL44B2, BL45XU) の管理・運転も行っている。

1. 放射光ビームライン高度化に向けた技術開発

(1) 高輝度サジタル集光にむけた偏向電磁石ビームライン光学系の開発 (山本、上野、二澤^{*1}、村上^{*2}；米田(JAEA)、後藤 (JASRI)、石川 (石川 X 線干涉光学研究室))

ビームライン光学系の高度化を目指して、サジタル集光光学系のためのフィンクーリング式直接冷却第一結晶の R&D を BL26B2 で行った。この R&D は JASRI、原研、理研共同で実施しているものである。耐放射線特性に優れる膨張黒鉛シール材を採用したフィンクーリング式の直接冷却第一結晶 (Si 311) の開発を継続して行っている。膨張黒鉛シール材に均一な圧力を加えながら結晶をホルダに取り付けることが可能な専用治具の開発を行い、アッセンブリ化の確実性および分光特性の向上を実現させている。作製した結晶は基本的な性能評価の後、昨年度同様共同で R&D を進めている BL14B1 (原研) に設置されサジタル集光光学系で実際に使用されており、性能の向上が確認されている。今後この結果を基に、さらなる要素部品の改良を進めサジタル集光に向けたスタディを継続して行く予定である。

(2) ビームライン自動運転およびメールイン測定システムの開発 (上野、山本、村上^{*2}；長谷川、岡崎(JASRI))

理研構造ゲノムビームライン I&II (BL26B1&B2) では、サンプルチェンジャー SPACE (SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger) およびビームライン制御ソフトウェア BSS (Beamline Scheduling Software) を開発してビームライン運転の自動化を図り、構造ゲノム研究に向けたタンパク質結晶試料の迅速回折測定を行うとともに、Web インターフェースを備えたデータベース D-Cha (Database for Crystallography with Home-lab. Arrangement) の開発により、大量の試料情報および実験条件、回折データ等の効率的な管理を行っている。2005 年秋には D-Cha を SPring-8 のサイト外に公開し、SPACE 専用サンプルトレイに詰めて宅配便で送付されたタンパク質結晶試料を受け付ける、メールインデータ測定を開始した。このシステムではビームラインでの実験作業をオペレータが行い、またインターネットを介して実験条件の指定および回折データのダウンロードを行うことが可能なため、ユーザーは SPring-8 を訪れることなく簡便にビームラインを利用することができるようになった。本年度から JASRI と

共同で、本ビームラインで開発したシステムを応用し、製薬企業等の外部ユーザーを対象とした商用メールインデータ測定サービスを BL26B2 にて開始し、トライアル (試用) 実験実施期間としてサンプルを受け付け、運用を行った。

(3) X線 CMOS 検出器を用いた回折データ測定 (山本、平田^{*3}；長谷川 (JASRI))

SPring-8 のタンパク質結晶解析ビームラインでは、CCD 検出器を用いた回折データ測定が行われているが、検出器の読み取り時間が存在するため、実際の露光時間よりも測定時間が長くなる。また、微小角振動法を用いた高 S/N 回折データ測定を行うには、通常の測定方法に比べて 10 倍以上の回折画像を記録する必要があり、CCD 検出器で実施することは困難である。そこで、研究技術開発室では高速回折データ測定を実現するため、X線 CMOS 検出器を用いた回折データ測定法の開発を行っている。CMOS 検出器は高速連続読み取りが可能で、読み取りに伴うデッドタイムの無い効率的な回折データ測定が可能となる。今年度は、昨年度作製したアクティブピクセル型 CMOS 検出器をビームラインに設置し、直線性・一様性などの基本性能評価を行った。更に、タンパク質結晶の回折データ測定を行い、タンパク質結晶構造解析を行うのに十分な精度を持つデータが得られることを明らかにした。

2. 構造生物学に関わる諸技術の開発

(1) 高輝度放射光による放射線損傷回避の測定手法開発・検討 (山本、上野、平田^{*3}、清水^{*3}；清水、長谷川 (JASRI))

この開発の目的はタンパク質の超高分解能構造解析を出来るだけ少ない結晶放射線損傷で完成させることである。この実現に向けて我々は複数の結晶から得られた複数のデータセットをどのようにスケール合わせして構造解析を行うかを開発・検討した。通常、タンパク質結晶の超高分解能構造解析では結晶に対するX線露光時間を長くした「広角領域 (高分解能)」のデータセットと短くして検出器のピクセル飽和のない「低角領域 (低分解能)」のデータセットを収集する。一般に、高分解能・低分解能二つのデータセットをスケールする際に通常は「重なりのある」分解能領域の全ての反射を用いる。しかし、この手法ではうまく二つのデータセットを繋ぐスケール因子が得られない場合が多い。我々は「重なりのある」分解能領域の中から、独立な反射の測定回数が多く (冗長的な) 確

からしい平均値を持つ反射のみを用いて高分解能・低分解能のデータセットのスケール合わせを行い、異なる結晶間のデータをマージすることによって非常に良い統計値・電子密度を示すことを見出した。この手法は複数の結晶から高精度の回折強度データを収集して解析に使用する際に非常に有効であると考えられる。今後、さらに検討を進め、複数の結晶からのデータを用いた超高分解能結晶構造解析を目指している。

(2) 赤外線レーザ光ピンセットによる微小結晶操作(山本、引間、清水^{*3})

多くの放射光施設において、ミクロン角のビームサイズを利用した微小結晶を用いた蛋白質結晶構造解析が可能になりつつある。しかし、蛋白質結晶を結晶化ドロップからすくい上げる作業は現在のところ手作業で行うしかない。1~10 μ m角の微小結晶は、人が取り扱うにはあまりにも小さく、また、衝撃にも弱い。そこで我々は微小結晶をX線回折測定用ピンに自動マウントする微小結晶操作システムの構築を行っている。結晶化ドロップ中の微小結晶の操作には波長1064nmの赤外線レーザを用いた光ピンセットを利用する。光ピンセットの赤外線レーザが蛋白質結晶にほとんど損傷を与えないことは確認済みである。本年度は大口径の集光レンズを用いた光ピンセットと2本のレンズファイバーを操作プローブに用いた光ピンセットによる微小結晶の操作を検討した。前者では結晶化ドロップ中で100 μ m角の蛋白質結晶を二次元的に、後者では20 μ m角の結晶を三次元的に操作することに成功した。レンズファイバーを用いた光ピンセットは狭い結晶化ウェル中の結晶化ドロップに直接操作プローブを挿入し結晶を操作することが可能であり、様々な結晶化容器で作製した蛋白質結晶の操作に有効である。今後は様々な形状の微小結晶での操作性の向上とともにX線回折測定用ピンへのマウント方法を構築していく予定である。

3. SPring-8 構造生物学ビームラインを管理運転

(1) 理研構造生物学ビームライン I (BL45 XU) (山本、引間; 伊藤、高田 (高田構造科学研究室) 藤澤、城 (城生体金属科学研究室) 石川 (石川 X 線干渉光学研究室) 北村 (北村 X 線超放射物理学研究室))

結晶構造解析ブランチはダイヤモンドトリクロメータを利用した多波長異常分散法による解析に特化したビームラインである。本年度も引き続きダイヤモンド分光器を中心にビームラインの保守を実施している。また、小角散乱ブランチは溶液からのX線の散乱情報に基づいて生体巨大分子のドメイン構造やドメイン間での構造変化研究に利用されており、本年度はユーザーへの技術支援を城生体金属科学研究室、高田構造科学研究室に依頼した。

(2) 構造生物学ビームライン II (BL44B2) (山本、引間、二澤^{*1}、松^{*2}; 石川 (石川 X 線干渉光学研究室) 北村 (北村 X 線超放射物理学研究室))

BL44B2 は生体巨大分子の動的結晶構造解析とX線吸収スペクトロスコーピー (XAFS) との兼用ビームラインとして1996年に建設された。経年変化による各部の老朽化のため昨年度より光学系の大幅な改修を進めた。利用率の低い白色光実験を廃止し単色光実験専用とすることで、分光器にはSPring-8標準型の定置出射型二結晶分光器を導入した。あわせて光学コンポーネントの再配置を行ない、設

置機器数の必要最小限化を図るとともに各コンポーネントをSPring-8標準品へ入れ替えを行なった。改修後はエネルギー分解能($\Delta E/E$)が 2×10^{-4} 以下、AuL3吸収端スペクトルの繰り返し測定においては1 σ で0.1eV以下の高いエネルギー再現性が得られた。12時間の強度変動はC.V.値で0.26%と非常に安定している。通常利用の6~18KeVでのフォトンフラックスは本集光光学系に対する計算値とよい一致を示しており、分光器の更新によって偏向電磁石ビームラインで得られる性能をほぼ満たせるところまで特性を改善することができた。

(3) 構造ゲノムビームライン (BL26B1&B2) (山本、上野、村上^{*2}; 石川 (石川 X 線干渉光学研究室) 北村 (北村 X 線超放射物理学研究室) 長谷川、岡崎 (JASRI))

BL26B1、B2は構造ゲノム研究に特化したビームラインであり、サンプルチェンジャーSPACEやビームライン制御ソフトウェアBSSの開発により、大量試料の迅速自動測定を実施している。本年度はBL26B2同様BL26B1にもSPACEを常設し、両ビームラインで自動運転システムによる運用を行ったほか、WebデータベースD-Chaを利用したSPring-8サイト外からの試料受付(メールイン・データ収集)を実施し、これまで順調に稼働している。本年度からJASRIおよび民間協力企業5社との協力により、BL26B2において週1日、自動運転システムを応用した商用メールイン事業を開始した。

^{*1} 協力技術員、^{*2} 業務協力員、^{*3} 協力研究員

The Division of Synchrotron Radiation Instrumentation has two major missions. One is research and development of new technologies for structural biology and beamlines. This includes the instrumentation of beamline optics, experimental station, sample handling and X-ray detectors, and the methodology of data collection and structure determination. Another is the operation of four RIKEN structural biology beamlines.

1. Research and development of instrumentations for SPring-8 beamlines

Radiation-proof fluorocarbon gasket was devised and tested for the new sealing material of cooling-water for the first monochromator crystal at BL26B2. The characteristic feature of the monochromatized beam was confirmed to be comparable with conventional sealing method with rubber O-ring. At BL26B1 and BL26B2, automatic beamline operation has been started with sample auto-changer robot to cope with a large number of structural determinations needed for the structural genomics research. The web database D-Cha made the beamline possible to accept samples from outside SPring-8. In order to achieve rapid data collection using fine ϕ -sliced oscillation method, we have been developing X-ray CMOS detectors. Since CMOS detectors have advantages of fast readout, rapid data collection without dead time become possible. In this year, we evaluated the performance of the active pixel type CMOS detector we fabricated last year. Recording diffraction images of protein crystals revealed that the diffraction intensity measured by the CMOS detector has a sufficient precision to analyze protein structures.

2. Research and development of new techniques for

structural biology

To improve data quality for protein crystallography especially at ultra-high resolution we designed to use multiple crystals. In the case, long exposure time of X-ray for each oscillation frame can be chosen. We studied how to scale datasets from different crystals into a final one. Sometime, problems to scale several datasets into one come because of lack of common reflections among them. To avoid this, a lot of reliable datasets collected at low resolution are merged and made very redundant and reliable average structure factors. Each dataset, collected at both low and high resolution, can be scaled to the reliable structure factors and finally merged into one dataset. This was revealed as robust in merging multiple crystal samples. Using the method, precise protein crystal structure analysis at ultra-high resolution will be achieved. Automatic microcrystal picking up system, which adopts optic tweezers with 1064 nm wavelength laser, is under development. The laser tweezers with the two lensed fiber probes enabled to manipulate protein crystals with the size in 20µm range without critical damages.

3. Operation of the RIKEN Structural Biology Beamlines

Our division supports user experiments and beamline operations of four RIKEN structural biology beamlines: BL26B1&B2, BL44B2 and BL45XU. BL45XU is a branch undulator beamline designed for protein crystallography (BL45XU-PX) and small-angle X-ray scattering of biological macromolecules (BL45XU-SAXS). The maintenance and user support services for BL45XU-SAXS have been entrusted to the Structural Materials Science Laboratory. In BL44B2, beamline optics, including monochromator, have been updated to make the beamline specialize in monochromatic X-ray diffraction experiment. Structural Genomic Beamlines (BL26B1&B2) have implemented the automatic operation with the sample changer SPACE and have started the mail-data collection accepting samples from outside SPring-8 by developing the web database D-Cha. Commercial mail-in service utilizing this system started this year at BL26B2.

Staff

Head

Dr. Masaki YAMAMOTO

Members

Dr. Go UENO

Dr. Takaaki HIKIMA

Dr. Atsushi SHIMADA

Dr. Kunio HIRATA^{*1}

Dr. Hideaki NIWA^{*1}

Dr. Tetsuya SHIMIZU^{*1}

Dr. Atsushi NISAWA^{*2}

Mr. Taiji MATSU^{*2}

Mr. Hironori MURAKAMI^{*2}

^{*1}Contract Researcher

^{*2}Contract Technical Researcher

in collaboration with

Dr. Tetsuya ISHIKAWA (Coherent X-Ray Optics Lab.)

Dr. Hideo KITAMURA (Coherent Synchrotron Light Source Physics Lab.)

Dr. Yoshitsugu SHIRO (Biometal Science Lab.)

Dr. Tetsuro FUJISAWA (Biometal Science Lab.)

Dr. Masaki Takata (Structural Materials Science Lab.)

Dr. Kazuki ITO (Structural Materials Science Lab.)

Visiting Members

Dr. Yoshihisa HAGIWARA (AIST)

Dr. Koh IDA (Sch. Sci., Kitasato Univ.)

Dr. Hiroaki KATO (Grad. Sch. Pharm. Sci. Kyoto Univ.)

Dr. Takashi KUMASAKA (Dept Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

Dr. Hiroyuki MOTOSHIMA (Fac. Agri., Saga Univ.)

Dr. Masayosi NAKASAKO (Grad. Sch. Sci., Keio Univ.)

Dr. Toru NAKATSU (Grad. Sch. Pharm. Sci. Kyoto Univ.)

Dr. Eriko NANGO (Grad. Sch. Sci. & Eng., Tokyo Inst. Tech.)

Dr. Eiki YAMASHITA (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

Dr. Keiichi WATANABE (Fac. Agri., Saga Univ.)

Trainees

Mr. Guntur FIBRIANSAH (Dept Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

Mr. Tadashi GANBE (Dept Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

Mr. Yuichi KATO (Dept Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

Mr. Shinpei KONDO (Dept Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

Mr. Tomotaka MORIGUCHI (Sch. Sci., Kitasato Univ.)

Mr. Ryoichi MURAKAMI (Dept Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

Mr. Takashi OCHI (Grad. Sch. Sci., Keio Univ.)

Mr. Takao OKABE (Kyoto Univ.)

Mr. Aik-Hong TEH (Dept Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

Ms. Mariko TSUJI (Sch. Sci., Kitasato Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Hirotsu S., Chu G. C., Unno M., Lee D., Yoshida T., Park S., Shiro Y., and Ikeda-Saito M. : "The Cyrtal Structures of the Ferric and Ferrous Forms of the Heme Complex of HmuO, a Heme Oxygenase of *Corynebacterium diphtheriae*", J. Biol. Chem. 279(12), 11937-11947(2004). *

Nakano N., Okazaki N., Sato S., Takio K., Kuramitsu S., Shinkai A., and Yokoyama S. : "Structure of the Stand-alone RAM-domain Protein from *Thermus thermophilus* HB8", Acta Cryst. F 62(9), 855-860(2006). *

Teh A., Kimura M., Yamamoto M., Tanaka N., Yamaguchi I., and Kumasaka T. : "The 1.48 Å Resolution Crystal Structure of the Homotetrameric Cytidine Deaminase from Mouse", Biochemistry 45(25), 7825-7833(2006). *

Hirata K., Muraoka S., Suenaga K., Kuroda T., Kato K., Tanaka H., Yamamoto M., Takata M., Yamada K., and Kigoshi H. : "Structure Basis for Antitumor Effect of Aplyronine A", J. Mol. Biol. 356(4), 945-954(2006). *

Okazaki N., Kumei M., Manzoku M., Kuramitsu S., Shirouzu M., Shinkai A., and Yokoyama S. : "Structure of a UPF0150-family Protein from *Thermus Thermophilus* HB8", Acta Cryst. F 63(3), 173-177(2007). *

山本 雅貴 : "トリクロマティック多波長異常分散法およびデータ収集の自動化に関する開発研究", 日本結晶学会誌 48(3), 199-206(2006).

播磨研究所 放射光科学総合研究センター
平成 18 年度 研究年報
研究技術開発室原稿

(総説)

白水 美香子, 村山 和隆, 新野(終元) 睦子, 嶋田 睦, 横山 茂之: "低分子量Gタンパク質を介したシグナル伝達に関わるタンパク質の構造と機能", 実験医学 24, No. 17, pp.2601-2605(2006).

上野 剛, 廣瀬 雷太, 井田 孝, 神田 浩幸, 熊坂 崇, 山本 雅貴: "SPRING-8理研構造ゲノムビームラインの自動運転", 放射光 19, No. 2, pp.83-91(2006).

山本 雅貴, 宮野 雅司: "創薬に役立つタンパク質のX線結晶構造解析", 放射線と産業, No. 110, pp.10-16(2006).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Hashimoto Y., Goda M., Nojiri M., Nakajima H., Kamiya N., Chida T., Higashibata H., and Kobayashi M.: "Identification of the Active Amino Acids in Isonitrile Hydratase", ASBMB Annual Meeting and 8th IUBMB Conference, Boston, USA, June (2004).

Irie K., Nakatsu T., Mikoshiba K., Sobue K., Fujiyoshi Y., Kato H., and Miyazawa A.: "Preliminary Structure of Complex by Co-crystallization of IP3 Receptor Suppressor Domain and Homer CRH1", 3rd International Conference on Structure, Dynamics and Function of Proteins in Biological Membranes, (Paul Scherrer Institute), Monte Verita, Switzerland, May (2006).

Yoshimura M., Yamashita E., Suzuki M., Tsukihara T., Nakagawa A., Yamamoto M., and Yoshikawa S.: "Macromolecular Assemblies Beamline (BL44XU) at SPRING-8", 9th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2006), (Japan Synchrotron Radiation Research Institute and others), Daegu, Korea, May--June (2006).

Shimizu N., Hasegawa K., Ueno G., and Yamamoto M.: "Radiation Damage of Protein Crystal in various X-ray energies", 9th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2006), (Japan Synchrotron Radiation Research Institute and others), Daegu, Korea, May--June (2006).

Ueno G., Hasegawa K., Okazaki N., Hirose R., Sakai H., Kumasaka T., and Yamamoto M.: "SPRING-8 Structural Biology Beamlines / Automatic Beamline Operation at RIKEN Structural Genomics Beamlines", 9th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2006), (Japan Synchrotron Radiation Research Institute and others), Daegu, Korea, May--June (2006).

Kawamoto M., Hasegawa K., Shimizu N., Sakai H., Nisawa A., and Yamamoto M.: "SPRING-8 Structural Biology Beamlines / Current Status of Public Beamlines for Protein Crystallography at SPRING-8", 9th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2006), (Japan Synchrotron Radiation Research Institute and others), Daegu, Korea, May--June (2006).

Irie K., Nakatsu T., Mikoshiba K., Sobue K., Fujiyoshi Y., Kato H., and Miyazawa A.: "Preliminary Structure of Complex by Co-crystallization of IP3 Receptor Suppressor Domain and Homer CRH1", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Yamamoto M., Ueno G., Hirose R., Hasegawa K., Okazaki N., and Kumasaka T.: "Automatic Beamline Operation at SPRING-8 RIKEN Structural Genomics Beamlines", 2006 Meeting of the American Crystallographic Association (ACA 2006), Honolulu, USA, July (2006).

Shimizu N., Hasegawa K., Ueno G., and Yamamoto M.: "Radiation Damage of Protein Crystal in Various X-ray Energies", 2006 Meeting of the American Crystallographic Association (ACA 2006), Honolulu, USA, July (2006).

Ueno G., Hasegawa K., Okazaki N., Murakami H., Hirose R., Kumasaka T., and Yamamoto M.: "Automatic Beamline Operation System for Protein Crystallography Beamlines at SPRING-8", 6th NOBUGS Conference 2006 (NOBUGS 2006 Conference), Berkeley, USA, Oct. (2006).

Ueno G.: "Computing Environments at SPRING-8 Facilities - A Panel Report", 6th NOBUGS Conference 2006 (NOBUGS 2006 Conference), Berkeley, USA, Oct. (2006).

Okazaki N., Hasegawa K., Ueno G., Murakami H., Sakai H., and Yamamoto M.: "Mail-in Data Collection at SPRING-8 Protein Crystallography Beamlines", 6th NOBUGS Conference 2006 (NOBUGS 2006 Conference), Berkeley, USA, Oct. (2006).

(国内会議)

西條 慎也, 大熊 章郎, 内藤 久志, 川上 恵典, 沈 建仁, 宮原 郁子, 神谷 信夫: "X線損傷低減法による光化学系IIマングンクラスターの構造解析", 文部省科学研究費補助金特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第2回ワークショップ, 葉山, 8月 (2006).

山本 雅貴: "Present Status of Structural Biology Beamlines at SPRING-8", 理研シンポジウム「第2回生体分子の分離・解析法の進展: 構造生物学の新技術開発とその応用」, 和光, 10月 (2006).

清水 哲哉: "真菌 *Stereum purpureum* 由来エンドポリガラクトナーゼの超原子分解能 (0.62) X線結晶構造解析", 理研シンポジウム「第2回生体分子の分離・解析法の進展: 構造生物学の新技術開発とその応用」, 和光, 10月 (2006).