



Title	ループレス結晶マウント法の開発とCr K $\alpha$ 線による非標識タンパク質の結晶構造解析
Author(s)	渡邊, 信久; WATANABE, Nobuhisa
Citation	日本結晶学会誌, 48(4), 271-276
Issue Date	2006
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/14757">https://hdl.handle.net/2115/14757</a>
Type	journal article
File Information	crsj2006-48-4.pdf



# ループレス結晶マウント法の開発と Cr $K\alpha$ 線による非標識タンパク質の結晶構造解析

北海道大学大学院先端生命科学研究院 渡邊信久

Nobuhisa Watanabe: Development of the loopless free crystal mounting method and crystal structure determination using Cr  $K\alpha$  X-rays without any modifications nor derivatizations.

A novel crystal mounting technique was developed for the sulfur SAD (S-SAD) method using longer wavelength X-rays. With this novel technique, the cryo-buffer and cryoloop surrounding the protein crystal can be removed before data collection to eliminate their X-ray absorption. Structures of several novel proteins have been solved by S-SAD using this mounting technique in combination with in-house chromium  $K\alpha$  radiation (2.29 Å). Our novel crystal mounting technique is superior to the standard cryoloop mounting method for the measurement of small anomalous differences, and yields good results in sulfur substructure solution and phasing by the SAD method. These results indicate that the S-SAD method with a chromium source becomes more practical for macromolecular structure determination using our crystal mounting technique.

## 1. はじめに

近年のタンパク質結晶構造解析では、遺伝子工学的にタンパク質中のメチオニンをセレノメチオニンに置換し、シンクロトロン放射光の波長可変性を利用してセレン原子の異常分散効果による多波長異常分散法 (MAD 法) で位相決定することが一般的であった。しかし、最近の検出器と構造解析ソフトウェアの進歩によって、一波長のみでの測定データを用いて位相決定してしまう単波長異常散乱法 (SAD 法) による解析が急速に進展して来た<sup>1,3)</sup>。プロテインデータバンク (PDB) への登録数を見ても、今年度中には SAD 法による構造解析数が MAD 法を抜くことが予想されている (B.C. Wang 私信)。

多波長である必要がなく、ある波長での異常散乱の虚数項 $f''$ のみを利用する SAD 法で位相を決めてしまうことが可能ということになると、測定に使用する波長の自由度が増す。例えばセレン原子の場合でも、吸収端 (0.9795 Å, 12.6 keV) にこだわらなくて良いのであれば、長波長の X 線を使用すれば比較的大きい値の $f''$ が期待できる。さらには、長波長ではイオウ原子の $f''$ も増大する (図 1)。イオウ原子は、ほとんど全てのタンパク質中にメチオニン残基やシステイン残基として含まれている。イオウの異常散乱を用いた SAD 法 (S-SAD 法) によって、セレンやその他の重原子を導入しない非標識のネイティブタンパク質のまま位相問題を解決してしまうというこ

とができれば、リコンビナントで大量精製が困難かつ天然にも微量しか無いようなタンパク質の結晶構造解析の可能性を広げ、タンパク質結晶学ひいては構造生物学を大幅に加速することができる。

## 2. 長波長X線の利用

イオウのK吸収端は5 Å (2.47 keV)であるので、図1に示すように、 $f''$ は波長とともに単調に増大する。したがって、イオウの異常散乱を使用してSAD法による位相決定を行うためには、できるだけ長波長を利用すれば良いことになる。しかし、一方で長波長のX線は物質との相互作用が大きく、特に吸収による影響を大きく受けるため測定データの精度が悪化する。S-SAD法での測定波長の選択については議論があり、Mueller-Dieckmannらの放射光を用いた実験による結果では2.1 Åが最適な波長と主張されている<sup>4)</sup>。

しかし、実験室で比較的長波長のX線を使用したい場合、Cu K $\alpha$  (1.54 Å), Co K $\alpha$  (1.79 Å), Fe K $\alpha$  (1.94 Å), Cr K $\alpha$  (2.29 Å)等、ターゲット金属による不連続な波長選択の可能性しか無い。これらの各波長でのイオウ原子の $f''$ の大きさと、Hendrickson & Teeter<sup>5)</sup>に従って、ソーマチンの場合に見積もったBijvoet比 ( $\langle \Delta F \rangle / \langle F \rangle$ )を表1に示す。S-SAD法による位相決定では、当然このBijvoet比が大きいほど有利である (SAD法については、例えばDauter, 2002<sup>6)</sup>参照)。したがって、著者らの研究室ではCr K $\alpha$ 特性線発生装置による長波長X線を利用したS-SAD法による構造解析法の実用化に向けた開発を進めて来た。

## 3. ループレス結晶マウント法

高輝度X線を利用する現在のタンパク質結晶学では、結晶の放射線損傷が無視できない。通常は直径10ないし20ミクロンのナイロン糸で形成したループで、結晶をそれが成長した溶液ごとすくい取ってそのまま100K程度の低温下に急速凍結して測定に供している。このため、結晶の周辺にレンズ状のアモルファスガラス様の凍結溶液が存在する (図2)。Cr K $\alpha$ 線を使用した場合、例えば0.5mmの水の層があるとX線の強度は0.2に減衰してしまう。回折強度を処理する際に吸収補正がなされるが、極端な場合には同一データセット中で10倍以上異なるスケール因子が使用されることになる。また、図2の模式図に示すように、結晶の形状や方位とこのレンズ状の氷の形状には何ら関連がないため、そもそも吸収補正も困難である。表1に示したようにCr K $\alpha$ 線ではイオウの $f''$ は大きくなるが、それでもわずか1.14電子分しかなく、せいぜい2%台のBijvoet比しか期待できない。吸収の影響は厳しい。著者らの研究室にCr K $\alpha$ のX線発生装置を導入した際、最初にセレン化したタンパク質の構造解析を試みたが、測定精度を上げるためにリダンダンシーを上げても構造解析に成功しない場合があった。著者らは、これを克服し、長波長利用を真に実用的なものにするために、Kiefersauerらの結晶マウント法<sup>7)</sup>にヒントを得て、タンパク質結晶を完全溶液フリーの状態で凍結してしまう簡便な新規結晶マウント法を開発した (図3)<sup>8)</sup>。これは、引き伸ばした1mm径ガラスキャピラリーの先端部にナイロンループを接着したものであり、細胞生物学用のキャピラリープラー等を使用すれば比較的容易に作製することができる。現在著者らの研究室ではナリシゲPC-10ピペットプラーおよびMF-900マイクロフォージ、EG-400マイクロピペットグラ

インダーを使用している。これによって、凍結前はループ中に溶液を保持することで結晶が乾燥して損傷することを避け、凍結直前に溶液を除去して溶液フリーに凍結することを両立させることが可能となった。これを使用して結晶をマウントする際の手順の模式図を図3に示す。冷却室素気流を使ってフラッシュクーリング法で結晶を凍結する場合の方法は以下のとおりである。まず、通常のクライオループの際と同様に結晶が成長した溶液から結晶を拾い出す。そのまま回折装置のゴニオメータヘッド上に置き、直ちに結晶周辺の溶液をキャピラリーを通して吸い取り、結晶が乾燥しないよう瞬時に低温窒素気流を吹き付けて凍結する。最後に小さいフック等でナイロンループをひっかけて取り去ると、図3(b)のように、溶液やループフリーの状態に結晶が凍結マウントされた状態、ループレスマウントが完成する。この方法は、直方体の結晶のみでなく平板状や棒状等さまざまな外形の結晶をキャピラリーすなわち回折装置のφ軸に平行にマウントすることができる。

文字での説明では少々分かりにくいかも知れない。百聞は一見にしかずという。結晶を溶液フリーに凍結マウントしている様子のビデオ画像を <http://www.sci.hokudai.ac.jp/~nobuhisa/XtalMount/> においてあるので参照していただきたい。

#### 4. X線源および検出器

イオウの異常散乱を利用する際の長波長のメリットは上述のとおりであるが、長波長では散乱角が大きくなるため、検出器のアクセプタンスに依存する測定可能な分解能の限界がきびしくなる。30cm 四方のイメージングプレート (IP) の検出面を持つリガク R-AXIS VII を使用しても、例えば結晶—検出器間距離 80mm では検出器の上下のエッジで 2.2Å が限界となる。構造精密化には 2.2Å では不十分なことも予想されることから、Cr  $K\alpha$  線で位相決定した上で Cu  $K\alpha$  線で精密化用高分解能データを収集する方針 (分解能限界は 80mm で 1.5Å) で、リガク FR-E SuperBright を改造し、Cr/Cu の2波長システム (Cu: 45kV, 45mA; Cr: 40kV, 40mA) とした。Osmic Confocal MaxFlux (CMF) 人工多層膜ミラーとの組み合わせで、100 ミクロン程度の大きさのタンパク質結晶でも振動角 1° あたり 1 分程度の露光時間で測定可能という高輝度のシステムとなっている。出来るだけ完浴法でデータ収集するため、通常は 0.5mm のコリメータを用いている。なお、検出器 R-AXIS VII も長波長使用のために改造されており、検出器窓の黒紙をポリカーボネートフィルムに交換し、ヘリウムパスを搭載している<sup>9)</sup>。

このシステムは Cr/Cu の2色ゼブラターゲットであるため、装置の真空を破ってターゲットを交換しなくても両波長間の切り替えをすることが可能である。しかし、現在のところ R-AXIS VII を左側の出射ポートにしか搭載しておらず、右側ポートにはタンパク質結晶評価用の Mercury CCD が搭載されている。従って R-AXIS VII で Cu  $K\alpha$  のデータ収集をするためには、両波長用の CMF ミラーをその都度交換し光学系の調整をする必要がある。そのための波長切り替えには1時間程度を要する。

#### 5. 構造解析例

著者らの研究室では、ループレス結晶マウント法と Cr $K\alpha$  線のシステムを用いて、これまでに 9.6kDa から 84kDa

の新規かつ非標識のタンパク質の構造解析に成功している。これらの解析例をまとめたものを表2に示す。いずれの場合も、測定にはそれぞれ一個のみの結晶を用いてφ軸回転360度分ないし720度分のハイ・リダダン・データを収集しており、高角データの統計が良くなかったSCO7518（2.4Åまでのデータを使用）以外は検出器の限界の2.2Åまでの全データを使用して初期位相を決定している。これらの例では、回折強度データの積分にはHKL2000<sup>10</sup>を使用し、イオウ等の異常散乱原子位置の決定にはSHELXC<sup>11</sup>, SHELXD<sup>12</sup>を用いている。初期位相の計算および構造モデル構築はSOLVE<sup>13</sup>, OASIS<sup>14</sup>, OASIS-2004<sup>15</sup>, DM<sup>16</sup>, RESOLVE<sup>17,18</sup>およびARP/wARP<sup>19</sup>を適宜使用している。これらのタンパク質の場合、50%程度から90%以上のほぼ全ての側鎖を含めた構造を自動で構築することが出来ている。

Kitago らの論文<sup>9</sup>ではリゾチームと古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 PH1109 を例にループマウントと我々のループレスマウントを比較しているが、ここでは64kDaで異常散乱原子にイオウしか含まない高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 TT0570 (TTHA1634) を例に、従来のループマウントと我々のループレスマウントを比較してみる。両者のデータのモザイシティとR因子を比較したものを表3に示す。S-SADの場合のデータの良否の指標がなかなか無いことが問題になるように<sup>20</sup>、個々のデータを個別にみると、いずれもそれなりのデータに思われる。しかし、こうして従来のループ法とループレス法のデータを並べてみれば両者の測定精度の差を容易に確認することができる。ただしループレスマウント法による loopless-A ではモザイシティが大きくなり、R因子が従来ループ並に悪化している。おそらく溶液除去と凍結のタイミングが合わず、結晶にいくらかのダメージがあったのではないかと考えられる。これらのデータを任意に分割したサブセット間の異常散乱差の相関 CC(anom) と、異常散乱シグナルの大きさ  $\langle d^2 \alpha(F) \rangle$  を SHELXC の出力結果を使って分解能に対してプロットしたものを図4に示す。比較できるように、これらのデータのエラーモデルは SCALEPACK でのスケーリングの際に  $\chi^2$  を用いて規格化してある。loopless-A の挙動は合理的に説明できないが、その他についてはループレスマウント法を用いたデータが従来ループによるデータよりも良い傾向を示している。実際にこれらのデータの異常散乱差を使って SHELXD でイオウのサブサイトを解いてみると、図5に示すようにループレスマウントのデータ (loopless-B, loopless-C) は50回の試行でも容易に解を得られることが分かる。

このように、ループレス結晶マウント法を用いてデータ収集を行うと試料結晶のみの吸収を補正すれば良いため、従来のループマウントを用いる場合よりもはるかに高精度のデータ収集ができる。通常、イオウのサブサイトは容易に決定することができる。しかし、このイオウ原子の座標を用いて SAD 法で決定した位相は大きな誤差を含む。S-SAD 法による構造解析では溶媒平滑化等による位相改良は必須である。著者らがリゾチーム、トリプシン、ソーマチン、グルコースイソメラーゼの標準試料を用いてテストした結果でも、溶媒含量の多い結晶ほど解析が容易なことが示されている<sup>21</sup>。例にあげた TT0570 の loopless-C データを用いて SHELXC/D で決定したイオウ原子座標を SOLVE で精密化して初期位相を計算した電子密度分布図は図6(a)に示すようなものであった。TT0570 の構造精密化終了後の最終モデルに対する平均位相誤差は71.5°あり、電子密度の相関も主鎖部分

で0.52, 側鎖部分で0.40しかない. この初期位相を基にして, 例えば *RESOLVE\_BUILD script* を用いた場合に位相改良サイクル毎に構造モデルが自動構築されていく様子をリボンモデルで図7に示した. 非対称単位中の2分子に相当する1206残基のうち, 1サイクル目で528 (うち16残基が主鎖を含む. 以下同じ) 残基, 2サイクル目で916 (422) 残基, 3サイクル目で1071 (666) 残基が自動構築され, 5サイクルで90%を超える1126 (918) 残基が構築された. 5サイクル目の位相による電子密度図を図6(b)に示す. この段階の平均位相誤差は $40.1^\circ$ であり, 電子密度の相関は主鎖部分で0.90, 側鎖部分で0.84となった. なお, *OASIS-2004* と *RESOLVE, ARP/wARP* を組み合わせるとさらに位相の収束が早い<sup>21)</sup>.

## 6. まとめと展望

表2に示したように, ループレス結晶マウント法と Cr  $K\alpha$  線を組み合わせれば, イオウ原子数から予想される Bijvoet 比が1%程度あれば非標識のネイティブタンパク質のまま, SAD 法で構造解析ができる. 実際 SCO7518 や TT0570 の場合は異常散乱原子としてイオウ原子しか含まず, それぞれ Bijvoet 比は0.89%と1.09%であったがループレス結晶マウント法を使ってデータ収集すれば, S-SAD 法で構造解析が可能であった. さらに興味深いことに, ここに示した解析例のうち4例では  $Ca^{2+}$  や Cl,  $K^+$  といったイオウ原子以外の異常散乱原子を含んでいた. したがって, 一次構造から予想される Bijvoet 比が1%という条件は, 現時点で長波長利用 SAD 法によって構造解析できる可能性があるタンパク質として厳しいものではなく比較的ゆるい妥当な条件と考えられる. イオウ含量はヒト等真核生物の方が原核生物よりも多いことが知られている<sup>22)</sup>. 線虫 *C. elegans* の第1染色体の ORF についてイオウ含量から見積もった Bijvoet 比の分布を Cu  $K\alpha$  線と Cr  $K\alpha$  線のそれぞれの場合について見積もったグラフを図8に示した. もしも Bijvoet 比1%が SAD 法による初期位相決定に十分であれば, Cr  $K\alpha$  線の 2.29 Å を利用すれば, ほとんど全てのタンパク質の構造解析が非標識のネイティブ状態のまま可能となることが分かる.

今回示したように, 著者らの開発したループレス結晶マウント法は, 長波長X線を利用する測定に有効であるが, シンクロトロン放射光でタンパク質微結晶を測定する際にも非常に有用になると考えている. しかし, キャピラリーの作製やループの接着には多少の熟練を要するため, より簡便かつさらに微結晶に対応可能なマウントデバイスとするための改良を継続中である.

## 謝 辞

この開発ならびに解析は北海道大学大学院の田中勲教授の研究室メンバーとの共同で行われた. 特にループレスマウント法の開発と, SAD データの収集およびデータ処理の多くは大学院生の北郷悠による. ループマウント法とループレスマウント法による TT0570 の比較データ収集は南ゆかりによる. その他の解析に用いた試料結晶は, 姚関博士, 坂井直樹博士, 林毅博士, 高永貴博士, 森田綾音, 北村百世に提供していただいた. また, FR-E SuperBright のターゲット2色化の改造は(株)リガクの塚本勝美氏による. 深く感謝する. また, 本研究は文部

科学省タンパク3000プロジェクトによって行った研究の一部である。

## 文 献

- 1) L. M. Rice, T. N. Earnest, and A. T. Brunger: *Acta Cryst.* **D56**, 1413 (2000).
- 2) Z. Dauter, M. Dauter, and E. Dodson: *Acta Cryst.* **D58**, 494 (2002).
- 3) D. Blow: *Methods Enzymol.* **374**, 3 (2003).
- 4) C. Mueller-Dieckmann, S. Panjikar, P. A. Tucker, and M. S. Weiss: *Acta Cryst.* **D61**, 1263 (2005).
- 5) W. A. Hendrickson, and M. M. Teeter: *Nature* **290**, 107 (1981).
- 6) Z. Dauter: *Acta Cryst.* **D58**, 1958 (2002).
- 7) R. Kiefersauer, M. E. Than, H. Dobbek, L. Gremer, M. Melero, S. Strobl, J. M. Dias, T. Soulimane, and R. Huber: *J. Appl. Cryst.* **33**, 1223 (2000).
- 8) Y. Kitago, N. Watanabe, and I. Tanaka: *Acta Cryst.* **D61**, 1013 (2005).
- 9) 山野昭人, 佐藤貴久, 長谷川智一: *構造生物* **10**, 30 (2004).
- 10) Z. Otwinowski, and W. Minor: *Methods Enzymol.* **276**, 307 (1997).
- 11) G. M. Sheldrick: *SHELXC*, Göttingen University (2003).
- 12) G. M. Sheldrick, H. A. Hauptman, C. M. Weeks, M. Miler, and I. Usón: *International Tables for Crystallography F*, 333 (2001).
- 13) T. C. Terwilliger, and J. Berendzen: *Acta Cryst.* **D55**, 849 (1999).
- 14) Q. Hao, Y. X. Gu, C. D. Zheng, and H. F. Fan: *J. Appl. Cryst.* **33**, 980 (2000).
- 15) J. W. Wang, J. R. Chen, Y. X. Gu, C. D. Zheng, and H. F. Fan: *Acta Cryst.* **D60**, 1991 (2004).
- 16) K. Cowtan: *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* **31**, 34 (1994).
- 17) T. C. Terwilliger: *Acta Cryst.* **D59**, 45 (2003).
- 18) T. C. Terwilliger: *Acta Cryst.* **D59**, 38 (2003).
- 19) A. Perrakis, R. Morris, and V. S. Lamzin: *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458 (1999).
- 20) P. H. Zwart: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 1437 (2005).
- 21) N. Watanabe, Y. Kitago, I. Tanaka, J. Wang, Y. Gu, C. Zheng, and H. Fan: *Acta Cryst.* **D61**, 1533 (2005).
- 22) E. Micossi, W. N. Hunter, and G. A. Leonard: *Acta Cryst.* **D58**, 21 (2002).

表1 実験室系X線の波長とソーマチン結晶の場合に期待されるBijvoet比. (Wavelength of in-house X-ray sources and expected Bijvoet ratio for thaumatin crystal.)

X線源	波長 (Å)	$f''$	Bijvoet比 (%)
Cu $K\alpha$	1.54	0.56	1.23
Co $K\alpha$	1.79	0.74	1.63
Fe $K\alpha$	1.94	0.85	1.87
Cr $K\alpha$	2.29	1.14	2.52

表2 ループレスマウントを用いてCr S-SAD法で解析した新規構造のまとめ。(Summary of the novel structures solved by the Cr S-SAD using loopless crystal mounting method.)

Proteins	PHS023	PH1109	SCO7518	RNA binding protein	TT0570	Glucosidase
No. of residues	83	144	185	241	603	738
Molecular weight	9,667	16,721	20,876	26,918	68,624	84,310
Molecules / AU	2	1	4	1	2	2
	6	6	2	4	10	29
Sulfur atoms / molecule	6 Met	4 Met, 2 Cys	2 Met	4 Met	8 Met, 2 Cys (S-S)	23 Met, 6 Cys
Bijvoet ratio (%)*	2.45	1.86	0.89	1.11	1.09	1.68
Other anomalous scatterers / 1 molecule **	1 K <sup>+</sup>	1 Ca <sup>2+</sup> , 2 Cl <sup>-</sup> , 2P	None	2 Cl <sup>-</sup>	None	1 Ca <sup>2+</sup>
Solvent contents (%)	45.1	58.0	48.0	46.5	45.7	51.9
Auto-built residues with side chain	154 (93%)	79 (55%)	366 (48%)	223 (93%)	1167 (97%)	1378 (93%)

\* Calculated after Hendrickson and Teeter (1981) using only sulfur atoms as anomalous scatterers

\*\* Confirmed by final structures

表3 従来ループ法とループレスマウント法による TT0570 のデータの比較. (The differences of several parameters among the datasets of TT0570.)

	mosaicity	Rmerge	R(rim)*	R(pim)*	Redundancy	Completeness
loop-A	0.43	0.075	0.076	0.014	28	98.2
loop-B	0.71	0.068	0.070	0.013	273	99.5
loopless-A	0.89	0.067	0.068	0.013	269	99.8
loopless-B	0.63	0.057	0.059	0.011	273	99.8
loopless-C	0.50	0.057	0.058	0.011	27.7	99.8

\*Weiss & Hilgenfeld (1997). J. Appl. Cryst. 30, 203-205.

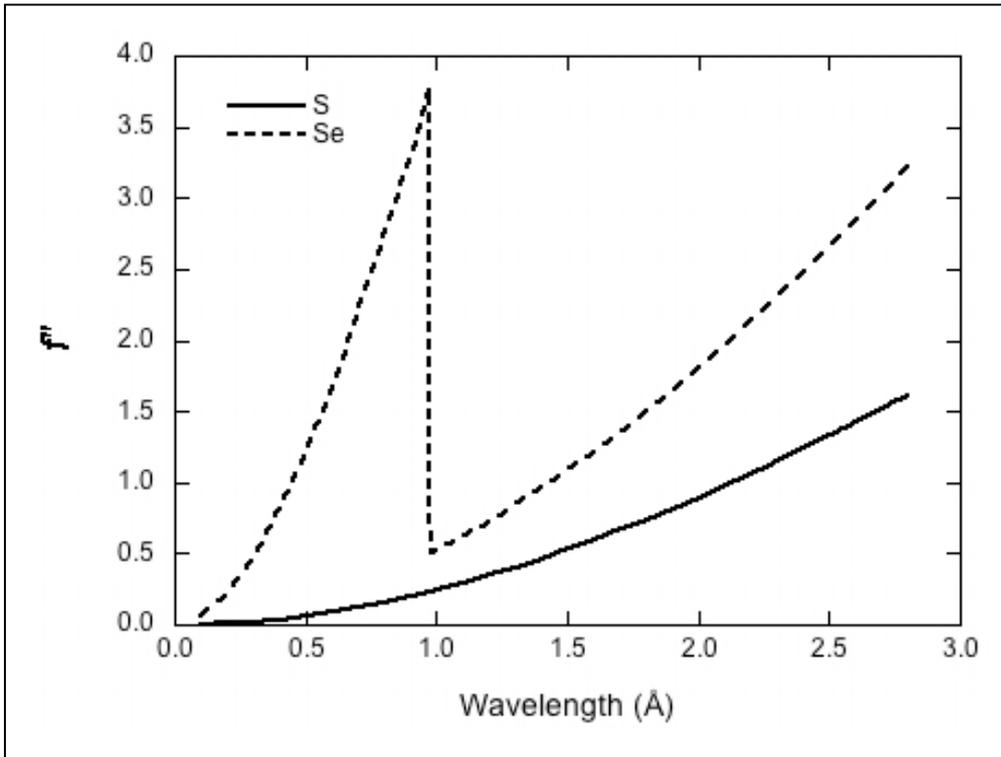


図1 セレンとイオウの異常散乱項の波長依存性. (Wavelength dependence of the anomalous term of selenium and sulfur.)

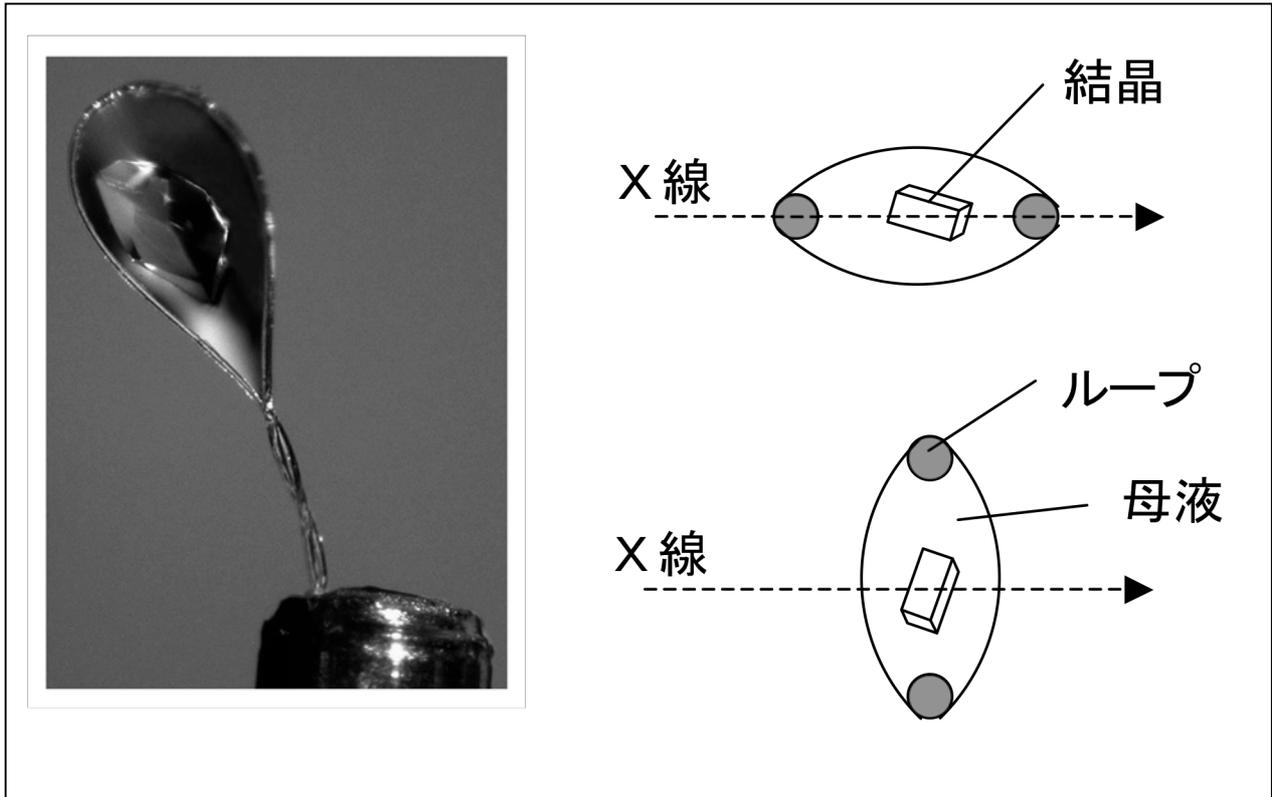


図2 従来のループマウント法の写真と模式図. (Photograph and schematic drawings of the standard cryoloop mounting method.)

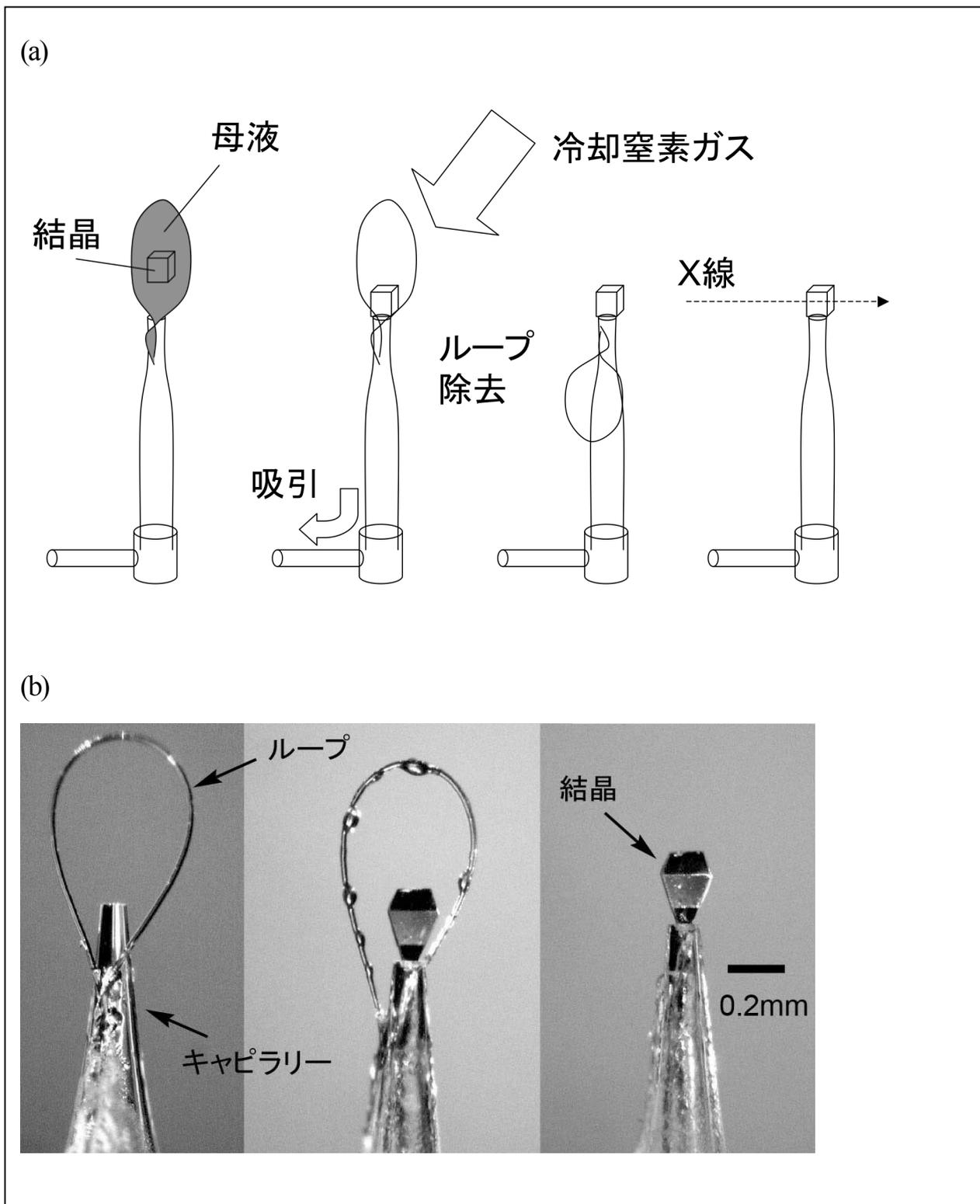


図3 ループレスマウント法の模式図と写真。(Schematic drawings and photographs of the loopless crystal mounting method.)

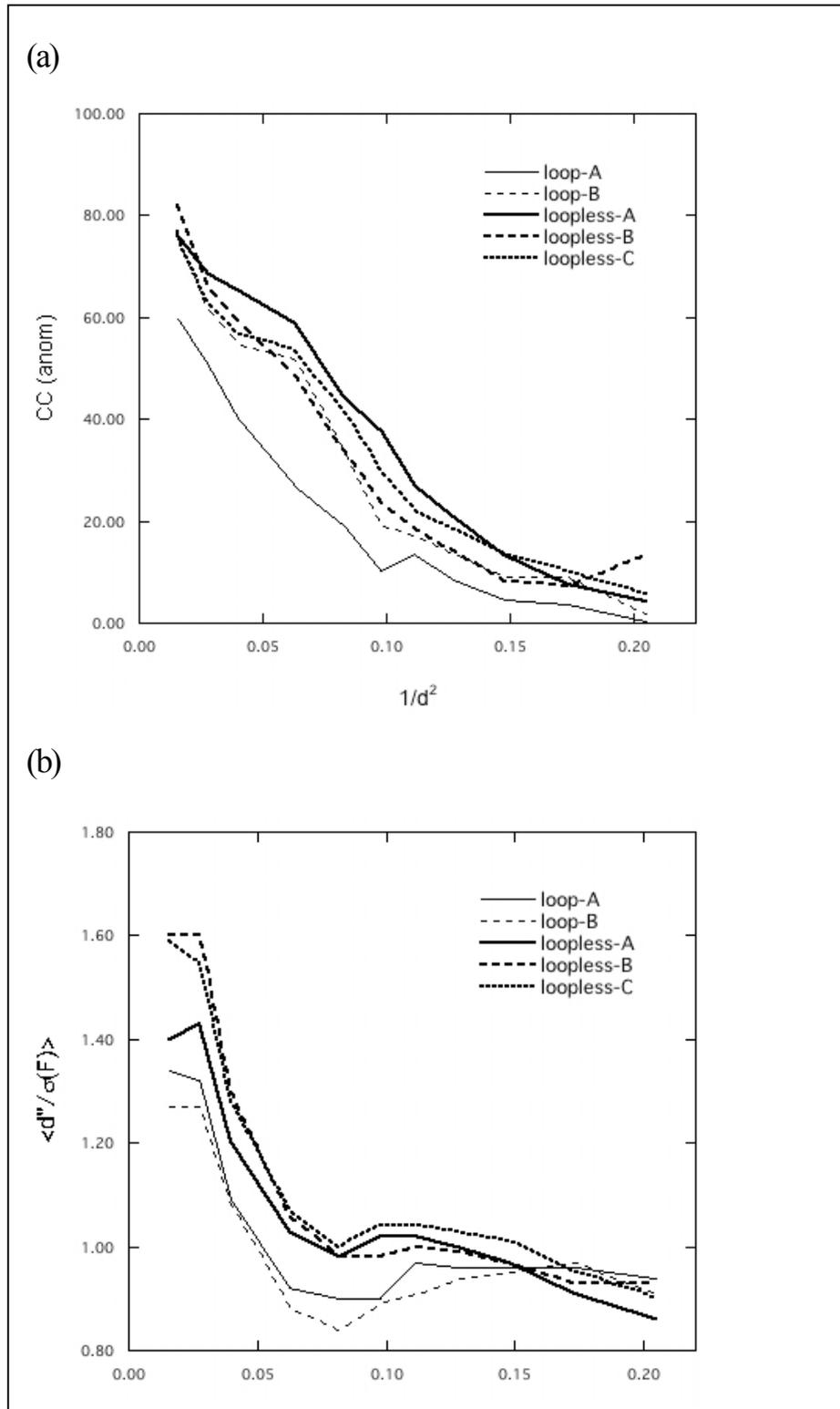


図4 TT0570 結晶の異常散乱シグナルの分解能に対するプロット。(Dependence of the anomalous signal of TT0570 crystal upon resolution bin.) (a) 任意に分割したサブセット間の異常散乱差の相関。(b) 異常散乱シグナルの大きさ。

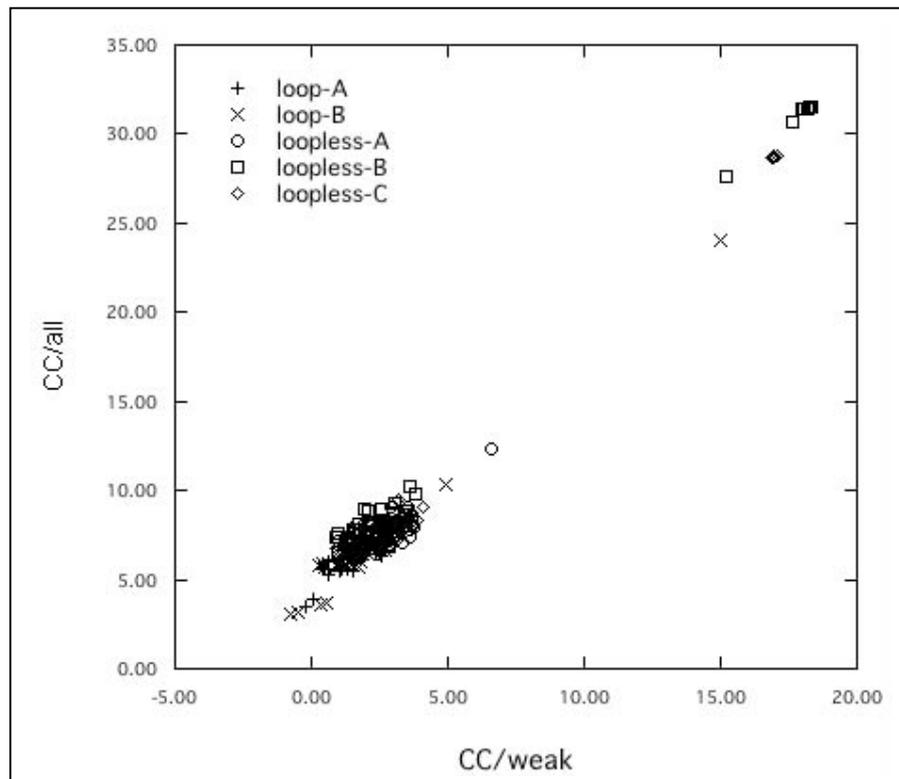


図5 *SHELXD*の解のCC all/weak プロット. (CC all/weak plot for each *SHELXD* try.)

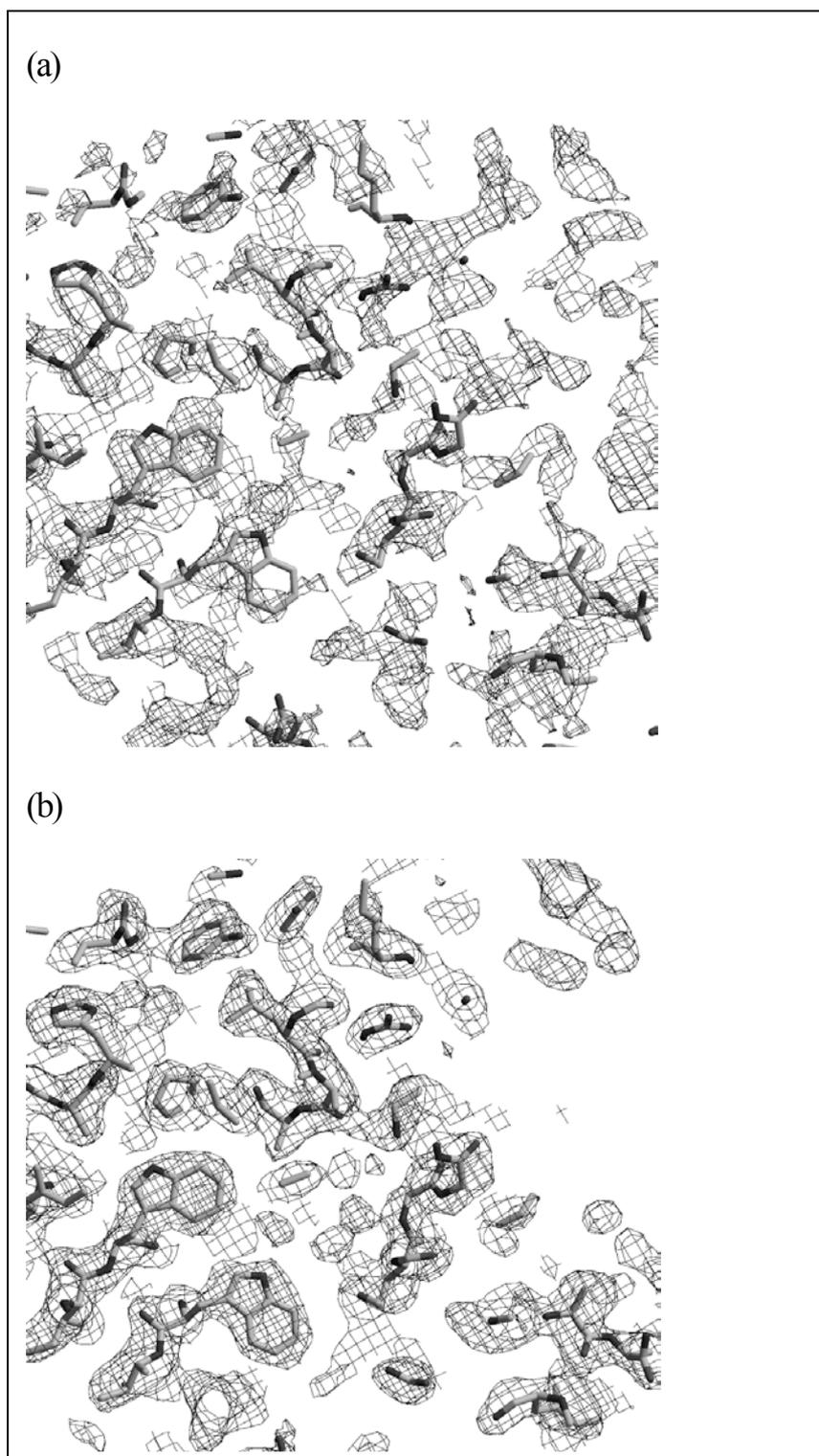


図6 S-SAD法によるTT0570の電子密度分布図。(Electron density map of TT0570 phased by S-SAD method.)  
(a) *RESOLVE*による位相改良前。(b) 5サイクルの位相改良後。参考のために電子密度分布図に重ねた構造モデルは最終構造のもの。

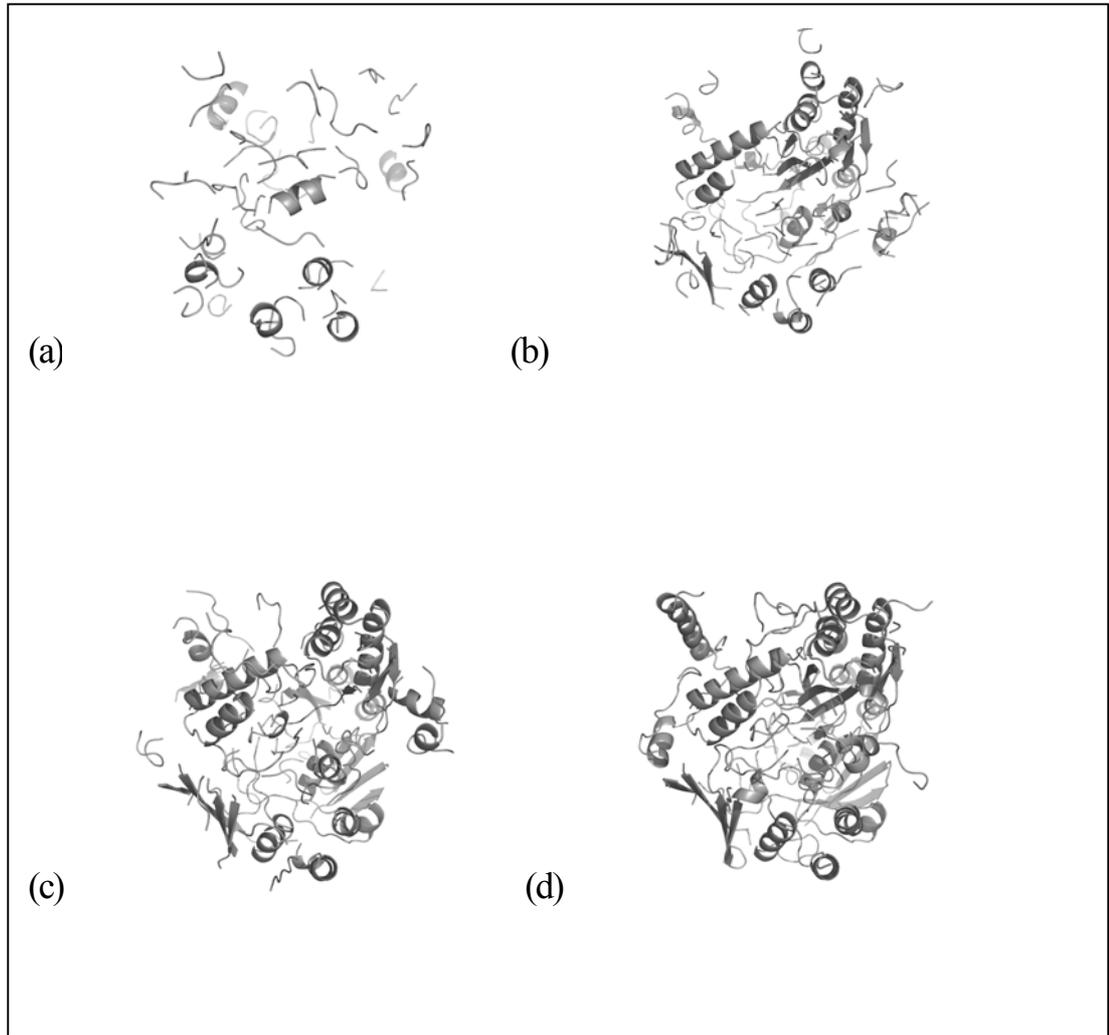


図7 位相改良サイクルと TT0570 自動構築モデル. (TT0570 ribbon models built automatically from different phase improve cycles.) (a) 1 サイクル目, (b) 2 サイクル目, (c) 3 サイクル目, (d) 5 サイクル目. 非対称単位中に2つあるうちの片方のサブユニットのみのリボンモデルを示している.

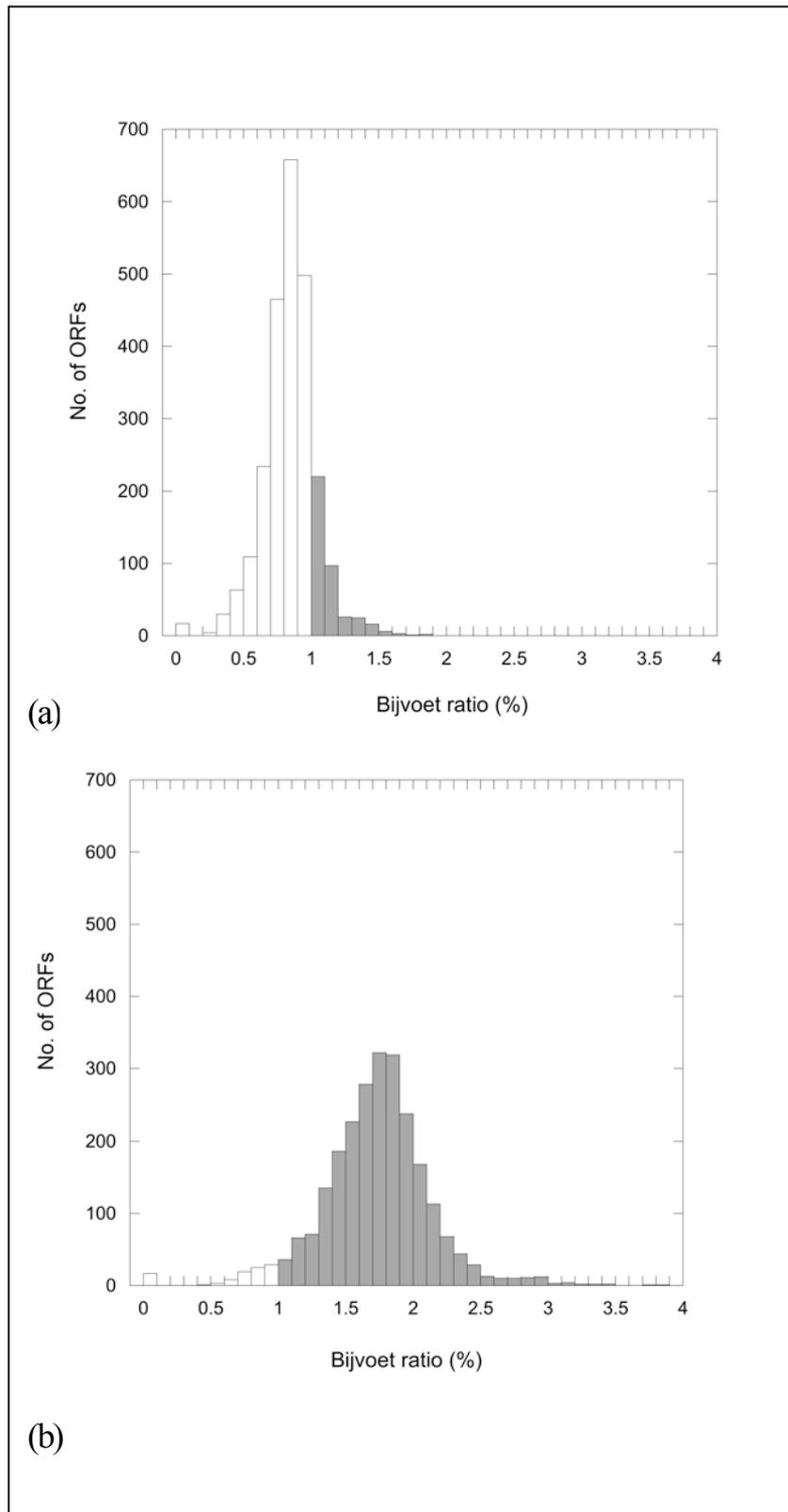


図8 *C. elegans*の第1染色体の全ORFについてアミノ酸配列からBijvoet比を予測してプロットしたもの。  
 (Histogram showing the distribution of the number of ORFs as a function of Bijvoet ratio.) (a) Cu  $K\alpha$ の波長の場合. (b) Cr  $K\alpha$ の波長の場合. 1%以上のBijvoet比が期待できるORF部分がグレーに塗りつぶされている.