

SACLA 利用装置提案課題 研究内容報告書 2011 年度

利用装置提案課題名 「蛋白質単粒子解析用分子ビーム生成装置の共用化のための整備研究」

実施体制

- ① 蛋白質単粒子解析用分子ビーム生成装置の整備と共用化
(慶應義塾大学・理工学部・中嶋 敦)
- ② 質量分析装置を用いた蛋白質単粒子のイオン化
(独立行政法人理化学研究所・和光研究所・基幹研究所・堂前 直)
- ③ 分子ビーム法を検討するための試料の探索と供給
(独立行政法人理化学研究所・播磨研究所放射光科学総合研究センター・国島直樹)
- ④ スペックル解析手法の高度化
(独立行政法人理化学研究所・播磨研究所放射光科学総合研究センター・内藤久志)

所属機関 慶應義塾大学理工学部

氏名 (責任者) 中嶋 敦 (参画者) なし

分担課題 蛋白質単粒子解析用分子ビーム生成装置の整備と共用化

達成目標 パルス赤外レーザーを用いて液体試料の効果的な粉碎と電荷付与の手法を共用化のために整備するとともに XFEL パルス照射によって蛋白質単粒子のスペックル散乱パターンを測定するための装置との最適化を図り、解析方法に合わせた装置全体の共用化を推進する。

研究内容報告

XFEL のバイオサイエンス分野利用では、結晶化が困難な膜貫通蛋白質などの立体構造を、高い空間分解能で可視化する生体単粒子立体構造解析に大きな期待が寄せられている。この構造解析では、網羅的に収集した生体非晶粒子の三次元スペックル散乱パターンからオーバーサンプリング法と位相回復アルゴリズムを用いて像回復するとされている。本研究では、生体単粒子立体構造解析実験照射装置のうち、蛋白質単粒子解析用分子ビーム生成装置の共用化のための整備研究を実施するとともに、XFEL 実機利用に向けた実験技術および解析技術を構築する研究を推進した。

これまでに開発してきた単粒子解析用分子ビーム生成装置を用いて、XFEL パルスに同期した照射位置に蛋白質単粒子を安定して導入できるように、液滴にパルス赤外レーザー光を照射する試料導入法を特徴とする装置の整備と共用化を実施した。液滴の効果的な粉碎を CCD カメラ画像によって観測する技術を活用して、空間拡がり、時間幅を測定し、歩留まりの良い蛋白質単粒子イオンの導入法を構築した。質量分析法は真空度の高い条件下で動作することから、液滴の粉碎を (1) 大気中で粉碎して空間的に広がったイオンを集め質量分析する、または、(2) 液滴を真空下に導入した後に、粉碎直後にイオンを質量分析する、の 2 つの方法を、それぞれ構築した。(1)では、空間的に広がったイオンを集める手法としてイオンファネルの設計、製作を進めた。(2)では、真空装置内に導入される際の液

滴の不規則運動を抑え込み、レーザー粉砕の歩留まりを高めた導入部分を設計製作した。これらの基本性能を有する蛋白質単粒子解析用分子ビーム生成装置を XFEL 棟に搬送し、三次元スペックル散乱パターン検出装置の構築と連携した装置開発を進めた。さらに、チーム内の研究会を開催するとともに研究成果の取りまとめを行った。

所属機関 独立行政法人理化学研究所・和光研究所・基幹研究所

氏名 (責任者) 堂前 直 (参画者) 渡邊 剛、鈴木 健裕

分担課題 質量分析装置を用いた蛋白質単粒子のイオン化

達成目標 達成目標 市販品・国島グループから提供されたタンパク質の中で標準となるタンパク質を数種決め、その非変性条件下でのイオン化を行い、質量分析スペクトルを得る。加えて、イオン化された粒子が天然構造であるかどうかの基準を決める。

研究内容報告

シトクロム c、ヘモグロビン、血清アルブミンなどの標準タンパク質について、中性でイオン化し、質量分析を行った。中性では天然状態に近い構造のイオンが見られていると予想されるが、この場合でも電荷の価数が減少することを確認し、構造が保たれている可能性が示された。現在整備している質量分析装置の測定上限が m/z (質量電荷比) =4000 までであり、天然状態での構造では多くて 5 価までしか発生しないと見積もると、20 k Da のタンパク質までしか分析できず、大きなタンパク質や、タンパク質複合体の測定はできないことがわかった。さらに、質量分析装置の今後の整備について検討した。

所属機関 独立行政法人理化学研究所・播磨研究所放射光科学総合研究センター

氏名 (責任者) 国島直樹 (参画者) なし

分担課題 分子ビーム法を検討するための試料の探索と供給

達成目標 真空中で天然構造を保ったまま分子イオン化が可能と予測される蛋白質等の試料を選定し、開発した分子ビーム装置や ESI マススペクトルでの実験に試料供給するとともに、結果のフィードバックにより試料の再選定や調製法の最適化を行う。

研究内容報告

1) 真空中で天然構造を保ったまま分子イオン化が可能と予測される試料の選定

XFEL 利用推進課題において、145 種類の結晶構造既知タンパク質 (主に耐熱性タンパク質) から成るタンパク質ライブラリーのうち N 末端から C 末端まで全アミノ酸残基において完全な構造モデルが得られるものについて、水中の変性自由エネルギー変化 (ΔG_u) と真空中の変性自由エネルギー変化 (ΔG_{vu}) を理論的に見積もった。本課題でこの予測計算をさらに進めた結果、現在までに 86 種類について計算が完了した。これらのうち、 $\Delta G_{vu}/\Delta G_u$ 値が高いもの、すなわち水中と比較して真空中で天然型がより安定化するものが、分子ビーム法に適したタンパク質であると考えられる。PhBCCP タンパク質とその複合体形成相手である PhBPL の $\Delta G_{vu}/\Delta G_u$ 値はリスト中最も高い部類に属する。そ

こで、今後この PhBCCP-PhBPL の系を使って分子イオン化の研究を進めることにした。

2) PhBCCP タンパク質の金クラスター修飾

金クラスターによるタンパク質の標識は、XFEL によるタンパク質単粒子解析において必要不可欠な技術である。そこで、真空中で安定と考えられる PhBCCP タンパク質の N 末端に 1 つだけシステイン残基を導入した PhBCCP 変異体を調製し、そのシステイン残基に市販のモノレイミド基付き金クラスターを 1:1 で結合させることを試みた。金クラスター付加反応後の PhBCCP サンプルをゲルろ過クロマトグラフィーで精製し、PhBCCP と金クラスターが 1:1 で結合した分子種を単離した。

3) MD シミュレーションによる PhCutA1 タンパク質の分子イオン化条件検討

XFEL 利用推進課題において、CutA1 タンパク質を用いた分子イオン化の条件検討が行われた。その結果、真空中の MD シミュレーションでは天然型フォールディングが大局的に保たれると予測されたが、一方、ESI マススペクトル実験では PhCutA1 タンパク質が天然状態の 3 量体ではなく単量体として観測された。これを受けて本課題では、分子イオンの荷電状態を考慮して PhCutA1 の真空中 MD シミュレーションを行った(城地博士と共同)。その結果、価数が高くなると真空中での分子イオンが不安定化することが明らかになった。ESI マススペクトル実験では高い正電荷の分子イオンを観測するので、単量体に分解してしまったと考えられる。

所属機関 独立行政法人理化学研究所・播磨研究所放射光科学総合研究センター

氏名 (責任者) 内藤久志 (参画者) なし

分担課題 スペックル解析手法の高度化

達成目標 実測およびシミュレーションから得られたスペックル散乱パターンを位相回復する。また、それに必要な解析ソフトウェアの設計・制作をおこなう。

研究内容報告

単粒子サンプルのスペックル散乱パターンから位相回復計算機シミュレーションをおこなない実機 XFEL の効率的利用条件整備を計ることを目的として、スペックル解析手法について検討を進めた。実機からのデータにさらに近づけるために量子ノイズを加味してスペックル像計算を行った。検出器の 1 ピクセルに到達する光子数を $I \cdot \int d\Omega \cdot \frac{d\sigma_r}{d\Omega} \cdot |F(\mathbf{K})|$ として得られたスペックル像に量子ノイズの影響を加味した。実際に到達する光子はポアソン分布しており、単位時間当り λ 個の光子が到達する点に、実際 k 個の光子が到達する確率を表すことにより、シミュレーションを行った。