

# 単結晶X線構造解析 基礎講座

## 第12回 タンパク質結晶のデータ測定と処理の注意点

松本 崇\*

### 1. はじめに

タンパク質の単結晶X線構造解析には、タンパク質の発現、結晶化、データ収集、位相決定などの越えなければいけないハードルがある。放射光施設の発展、検出器の進化、実験室系装置におけるX線源の高輝度化、ソフトウェアの発達で、測定可能な結晶の範囲が飛躍的に広がっている。しかし、このように環境が整ってきても越えなければならないハードルが存在する。それは、タンパク質結晶の品質チェックや凍結条件の検討である。いくら装置やソフトウェアが発展しても、結晶の質が悪ければ構造解析に耐えうるデータの収集を行うことができない。また、凍結条件がはっきりと決まっていない状態では、結晶中の水が凍結中に結晶化してしまい、結果として結晶の質を落としてしまう。また、アイスリングが出ている状態で解析に十分な分解能まで回折スポットが観測されたとしても、イメージに映り込んだアイスリングの領域の回折スポットを除去しなければならないため、データの質や完全性 (completeness) の低下を引き起こしてしまう。今回はX線構造解析にむけたタンパク質のデータ測定と処理における注意点について解説する。

### 2. 結晶のスクリーニング

結晶の品質は顕微鏡下での観察だけでは判断することはできない。実際にX線を照射して観測できる回折スポットや分解能から初めて判断することができる。外形がはっきりとしていて見た目が美しい結晶でも、X線を照射してみるとほとんど回折スポットが観測されなかったり、観測されても歪んだ形状であったりすることがある。反対に、結晶の形状がいびつで丸みをおびているような結晶でも、高角側まで回折スポットが観測され、解析用データが収集可能な場合もある。また、同じ結晶化バッチ内で析出している結晶でも、それぞれ品質が異なることがある。ひとつの結晶は回

折スポットが伸び高角側の回折スポットが観測されないような場合でも、すぐ隣で析出した結晶は回折スポットの形状もよく高分解能まで観測される場合がある。このため、結晶のスクリーニングはひとつの結晶でのみ行うのではなく、複数個の結晶を用いて行う必



図1. In situ X線回折スクリーニング装置PX Scanner.

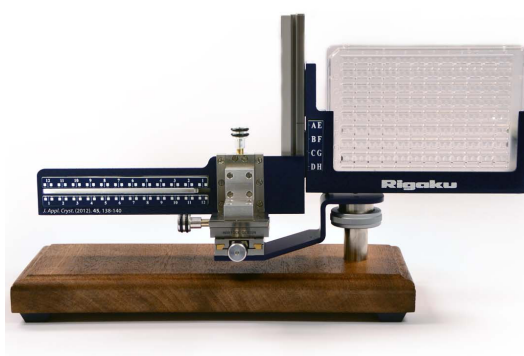


図2. 結晶化プレート in situ X線照射アタッチメント PlateMate.

\*株式会社リガク X線機器事業部 応用技術センター

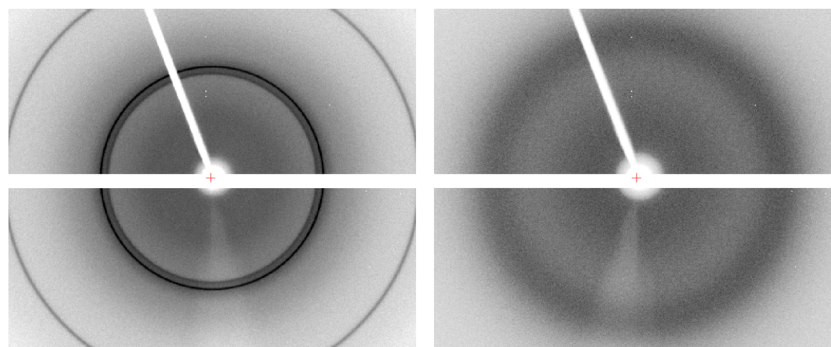


図3. 左：アイスリングの観測例，右：適切なクライオプロテクタント使用時。

要がある。一つ一つ結晶をピックアップし、凍結・測定・評価を行い、品質の高いものだけそのまま測定を行ったり、放射光での測定に使用したりするのが一般的となっている。しかし、この方法は実験者個々のスキルに大きく依存するため、結晶のピックアップ時や結晶凍結時の劣化の可能性を排除することができない。結晶化プレートのまま測定できる PX Scanner (図1) や PlateMate (図2) を使用することで、結晶のピックアップ・凍結といった時間や凍結等による品質劣化の不安なく評価することが可能となる。

### 3. タンパク質結晶の凍結

現在は、タンパク質結晶を凍結して測定することが一般的となっている。しかし、タンパク質結晶中には多くの溶媒領域が存在する。このためほとんどの結晶の場合には、そのまま凍結するとタンパク質結晶中の水が結晶化してしまう。六方晶に結晶化した水、すなわち氷は溶液のときよりも体積が増えるため、タンパク質結晶の品質低下や崩壊を引き起こしてしまう。また、多数の氷の結晶が析出することによりアイスリングと呼ばれるリング状の回折パターンが観察されるようになる。この結果、データとして使用できない領域ができてしまう。せっかく品質の良い結晶が得られたとしても、凍結処理の失敗で品質を劣化させては、これまでの実験が無駄になってしまうため、凍結条件のスクリーニングは重要なステップである。氷の生成を抑えるためには抗凍結剤、クライオプロテクタントが使用される。十分な量のクライオプロテクタントが添加されている溶液を急速に凍結させることで、水が結晶にならずにガラス状に凍結する。このため、タンパク質結晶にダメージを与えることなく、かつアイスリングの出現を抑えた状態でタンパク質結晶を凍結することが可能となる。クライオプロテクタントには、グリセロール、エチレングリコール、ポリエチレングリコール等が使用される。

#### 3.1. 凍結条件の探索

まず予備実験として、結晶化の溶媒へクライオプロ

テクタントを添加後凍結し、溶液が透明に凍ることを確認する。ガラス状に凍結した水は透明であるためである。一見透明に凍っていても、微小な水の結晶ができている場合があるため、凍結した溶媒に X 線を照射し、アイスリングが観測されないことを確認する必要がある。もし、溶媒が白く凍ったりアイスリングが観測されたりする場合には、クライオプロテクタント濃度を上昇させる必要がある (図3)。また、結晶化条件にポリエチレングリコールやエチレングリコール等を使用している場合には、その濃度を増やすことで良好に凍結させることが可能となることがある。

予備実験で良好に凍結する条件が決定したら、次は本測定には適さない、小さめのタンパク質結晶をクライオプロテクタントへ浸し、溶解したり亀裂が入ったりしないかをチェックする。初めから本測定用の結晶をクライオプロテクタントへ浸してしまい、クラックが入る等の問題が起これば、取り返しがつかないことになる。まず小さめの結晶でチェックすることをお勧めする。問題が起これなかったときは、本命の結晶を用いて凍結し、測定を実施する。もし、タンパク質結晶が溶けたり亀裂が入る場合には、クライオプロテクタントの濃度を増やすと同時に沈殿剤の濃度を増やしたり、クライオプロテクタントの種類を変更して再度試みる。

#### 3.2. 凍結の方法

タンパク質結晶の凍結方法には、大きく分けて吹き付け低温装置の低温ガス流を使用する方法と液体窒素を使用する方法の2種類がある。

低温ガス流を使用する方法は、低温ガス流を名刺等のカードで塞ぎ、その間にタンパク質結晶をマウントしたループをセットする。セット後、すばやくカードを引き抜き急速凍結する (図4)。

液体窒素を使用する方法は、タンパク質結晶をマウントしたループをすばやく液体窒素に浸す。液体窒素の沸騰が治まった後に、熱浴のついた専用トングを使用してゴニオメーターヘッドヘループをセットする (図5)。

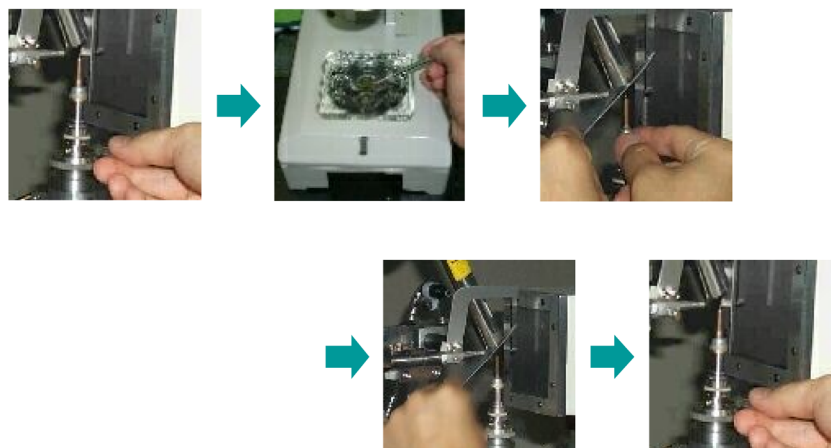


図4. 低温ガス流による凍結の手順.

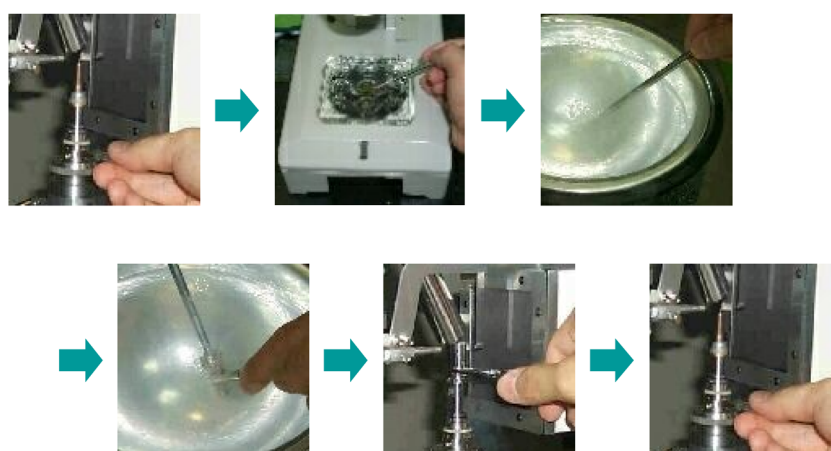


図5. 液体窒素による凍結の手順.

#### 4. データ収集

データ収集では、一般的に1イメージあたりの振動角を小さくし、露光時間を短くして測定することでS/Nが向上する。また、格子の長いタンパク質結晶のときには、振動角を小さくすることにより回折スポットの分離も向上するため好都合である。実験室系の装置では、 $0.25 \sim 0.5^\circ$ /イメージで測定することが一般的である。

高角の回折スポットを測定するためには、露光時間を伸ばすことが効果的である。しかし、露光時間を伸ばすことで、低角側の回折スポットの強度が強くなりすぎ飽和する危険性が出てくる。この問題を回避するために、 $2\theta$ を低角測定用・高角測定用で変えて、低角測定時には短時間露光で、高角側測定時には露光時間を伸ばした測定とすることでよりよい高分解能のデータ収集が可能となる。

#### 5. データ処理

データ処理後に表示される Rmerge, Completeness, I/sig(I) の値を確認する。最初に Rmerge に注目する。等価な回折点の一致度を示す値であるため、一般的に

小さいほうが良好な結果が得られていることになる。Rmerge が非常に大きい時 ( $Rmerge > 20\%$ ) には、再測定をお勧めする。また、最高分解能領域の Rmerge にも注目する必要がある。どの程度の分解能までデータとして使用するかの判断にかかわってくるためである。例として、最高分解能側の Rmerge は 60% 以下までとしたり、 $I/\text{sig}(I)$  が一定以上の値があれば最高分解能側の Rmerge が 100% を超えていても問題はないとしたりなどがあり、判断の基準値は研究者ごとに異なっている。

次に Completeness であるが、データ処理をしてみると Completeness が低いことがしばしばある。原因として、タンパク質結晶の Mosaicity が大きく見積もられている場合や、格子が長い場合回折スポット同士が近接している場合が考えられる。この場合には、データ処理をする際の強度積分用の箱を小さくすることで回避できることがある。

各分解能の  $I/\text{sig}(I)$  の値をチェックし、あまりにも小さい値 ( $I/\text{sig}(I) < 1.5$ ) となっている場合は、回折スポットが観測されていないか強度が非常に弱いことを表しているため、その分解能領域を除いて処理をす

ることが必要となる。

## 6. まとめ

データ測定と処理では、検出器の進化、X線発生機の高輝度化、ソフトウェアの発達により、測定可能な結晶の範囲が飛躍的に広がっている。しかし、タンパク質結晶の選別、ピックアップや凍結のステップには実験者が介在する場面が多く存在する。このステップをしっかりと行うことで、同じタンパク質結晶でも飛

躍的に良いデータを収集することが可能となる。結晶の選別には“in situ”スクリーニング装置やアタッチメントを活用することで効率よくタンパク質結晶の品質をチェックすることができる。結晶のマウントや凍結処理は繰り返し行うことで上達するため、リゾチームやサウマチン結晶を用いて十分練習することが望ましい。凍結条件の検索は地道な作業であるが、目に見える結果として表れる。このため根気よく複数のクライオプロテクトントの探索を行うことを勧める。