

「生物系研究者のためのタンパク質結晶構造解析に関する教育セミナー」報告

日時：2011年1月24日（月）13：30～17：10

場所：生物科学研究棟 鈴木梅太郎ホール

講師：バイオ解析チーム 宮武 専任研究員

生命系放射光利用システム開発ユニット 平田 技師、上野 専任技師

内容：第1部 タンパク質結晶解析入門（宮武 専任研究員）

- ・タンパク質とは何か
- ・タンパク質構造を解析する重要性
- ・X線結晶構造解析の原理
- ・X線結晶構造解析の今後の課題

第2部 BL32XU 利用講習（平田 技師）

- ・微小結晶からのタンパク質結晶構造解析の必要性
- ・高フラックスマイクロビームおよび精密センタリング方式の開発
- ・最適な微小結晶構造解析の測定条件および成功例
- ・今後の開発

リモート測定システム講習（上野 専任技師）

- ・現状の遠隔実験支援システム（メールイン）について
- ・新システム（リモート）で可能なこと
- ・リモート実験のしくみ
- ・実際にビームラインへの接続

理研ビームライン利用の手引き

- ・課題申請、ビームタイム申請
- ・持ち込み試薬申請
- ・従事者登録
- ・リモート実験手順

第3部 リモート実験デモンストレーション（上野 専任技師）

セミナー参加者：30名

基幹研究所：3 研究室、5 チーム

脳科学総合研究センター：1 チーム、2 ユニット

社会知創成事業：1 特別研究室

播磨研究所：1 室、JASRI：2 室

今回は初めて SPring-8 利用システム開発研究部生命系放射光利用システム開発ユニットと共同開催で「生物系研究者のためのタンパク質結晶構造解析に関する教育セミナー」を行った。第1部のタンパク質結晶解析入門でX線構造解析の未経験者でも分かり易い説明があった。第2部前半のBL32XU 利用講習では、2 μ mの微小結晶から2Åデータを収集できたことや回折分解能に対するX線強度の最適化などの具体的な話があった。後半のリモート測定システム講習では自動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）の紹介があった。第3部では実際にリモート測定で測定装置が動くことをリアルタイムで観測を行ったことは、参加者に変な興味を与えた。参加者がX線構造解析に興味を持つ方が多かったので、質疑応答の時間では積極的に質問があり、内容ある講習となった。

以上

ケミカルバイオロジー研究基盤施設 SPring-8利用システム開発研究部門

コラボ教育セミナー

生物系研究者のためのタンパク質 結晶構造解析に関する教育セミナー

今回のセミナーは3部構成になっていて、タンパク質結晶構造解析の入門講習と実際にSPring-8ビームラインを利用するための講習（微小結晶の構造解析およびリモート測定方法）を行います。興味ある講習だけでも参加できますので、奮ってご参加願います。

日時 2011年1月24日（月）13：30～17：00（流れ解散）

場所 生物科学研究棟 鈴木梅太郎ホール

内容 第1部（13：30～14：20）宮武 専任研究員

・タンパク質結晶構造解析入門

第2部（14：30～16：00）平田 技師、上野 専任技師

・BL32XUでの高フラックス・マイクロビームを利用した微小タンパク質結晶（膜タンパク質やタンパク質複合体の10 μ m以下の結晶やクラスター状の結晶等）の構造解析

・最新の遠隔実験支援システムを利用したリモート測定方法

第3部（16：10～17：00）上野 専任技師、宮武 専任研究員

・リモート測定のデモンストレーション

※ 詳細内容はWebページ(<http://www.riken.jp/BiomolChar/sp8-seminar.html>)をご覧ください。

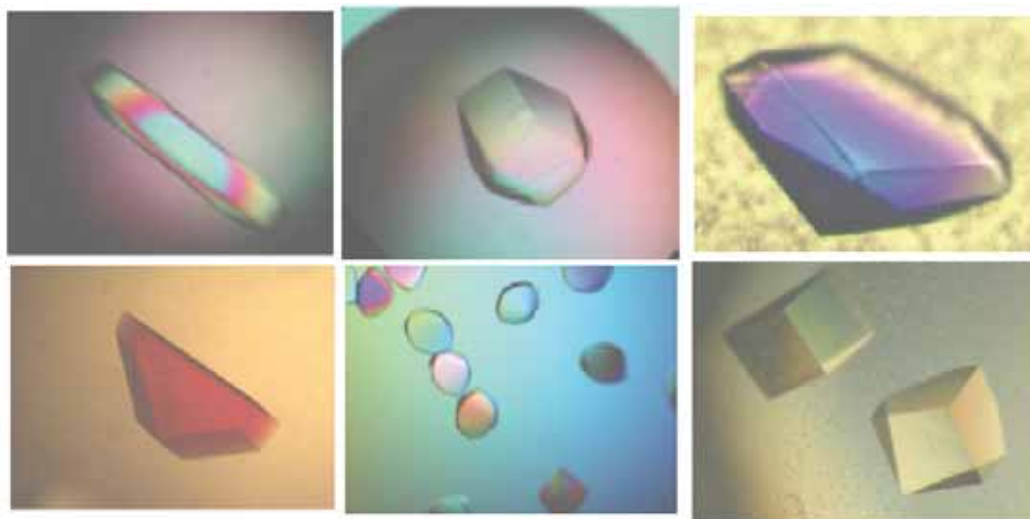
主催 ケミカルバイオロジー研究基盤施設

バイオ解析チーム

SP8コラボ教育セミナー X線結晶構造解析基礎

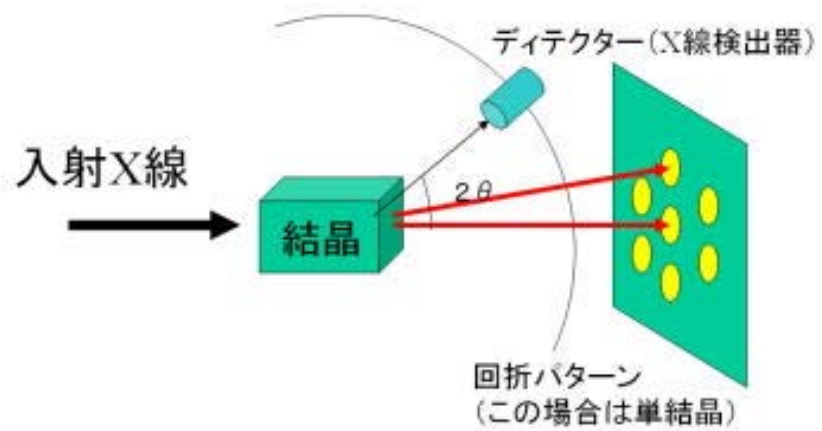
バイオ解析チーム 宮武秀行

2011/01/24



つまり、タンパク質結晶とは

- タンパク質分子内で発生する球面波の**増幅装置**
- **見たい分子が空間内に規則的に整列する必要がある**

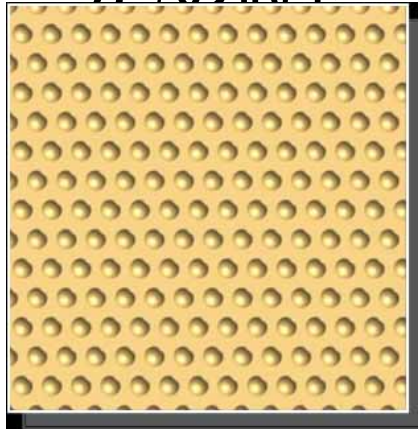


ここまでのまとめ

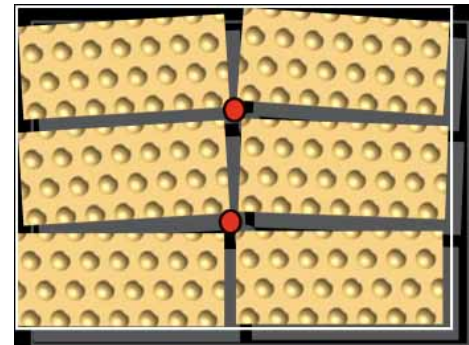
- 物質に電磁場を照射すると、内部の電子雲が強制振動して球面波を発生する
- 電子雲が規則正しく配列 (= 結晶) しているとき、それらの球面波が強め合う点が生じる
- その点の強度、波のタイミング (位相) が分かると、電子雲 (電子密度) が求められる
- 位相は各回折点に対して、MIR法、MAD法などで決める必要がある

最近のタンパク質結晶構造解析の問題点

- 対象が複雑化(高等生物、巨大分子、複合体)することに伴い
 - 結晶の増幅能力の低下
 - 結晶サイズ($<0.1\text{mm}$)
 - 結晶の質(どれだけ規則正しく分子が並んでいるか)の低下



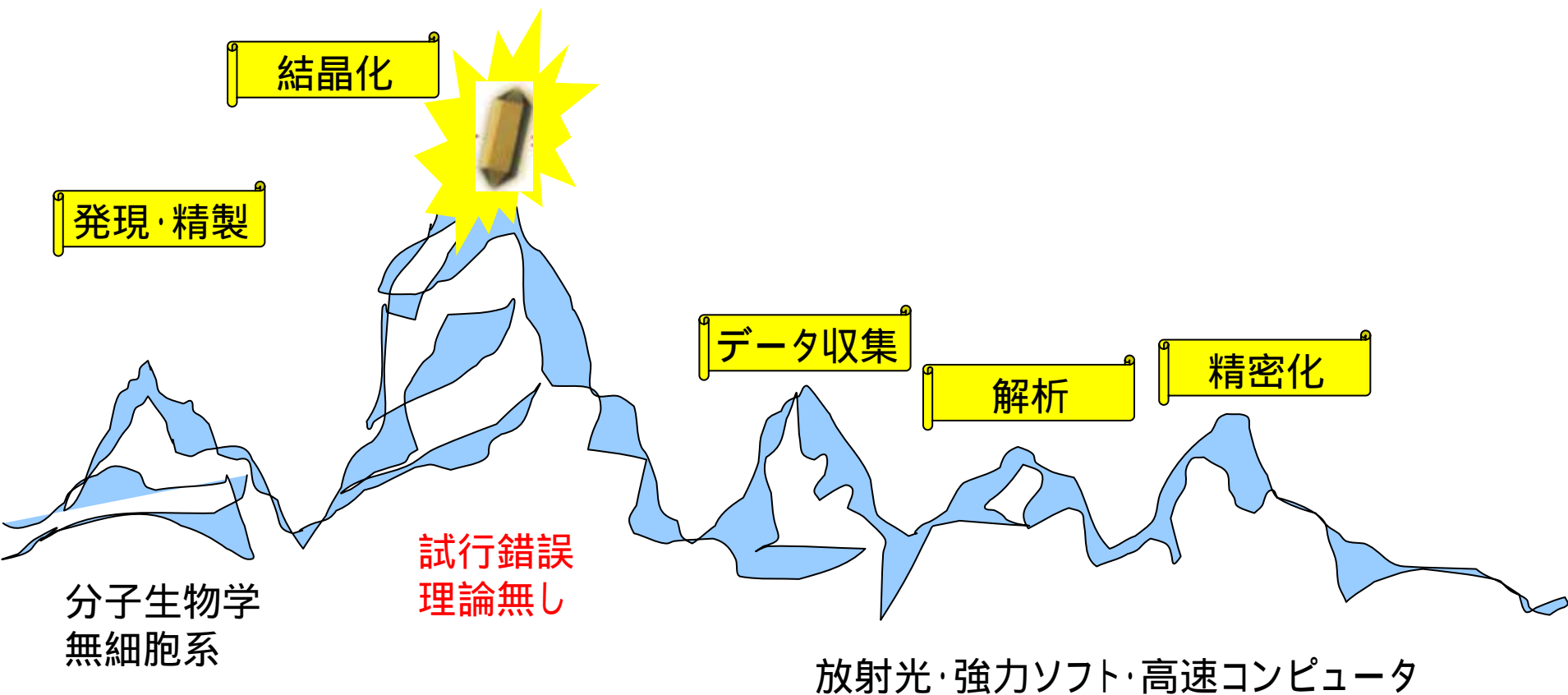
結晶性良



結晶性悪

構造解析までの道のり

- 現在では、タンパク質発現・結晶化が最大の難関



最近のX線結晶構造解析の状況

- 低品質結晶の中から中程度品質の結晶を探し出し
- 構造情報を絞り出す
- 放射光X線の高度化
- 測定の自動化

などが必須になってきている

回折データを遠隔収集

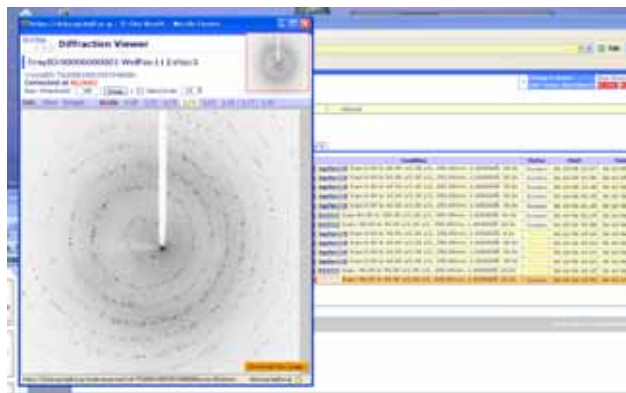
- 研究室に居ながらにしてデータを取得



SPring-8



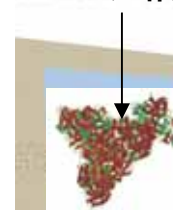
和光



インターネット



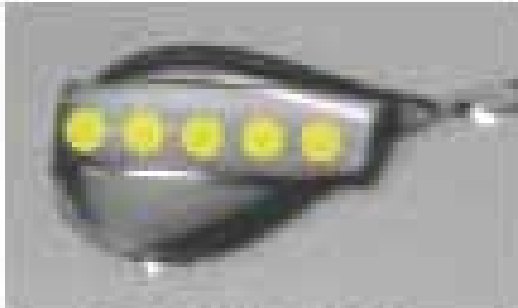
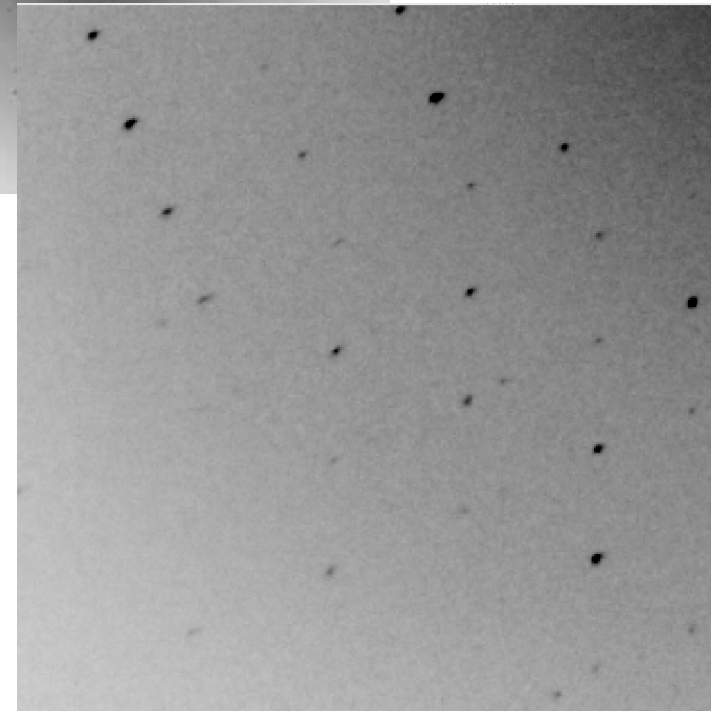
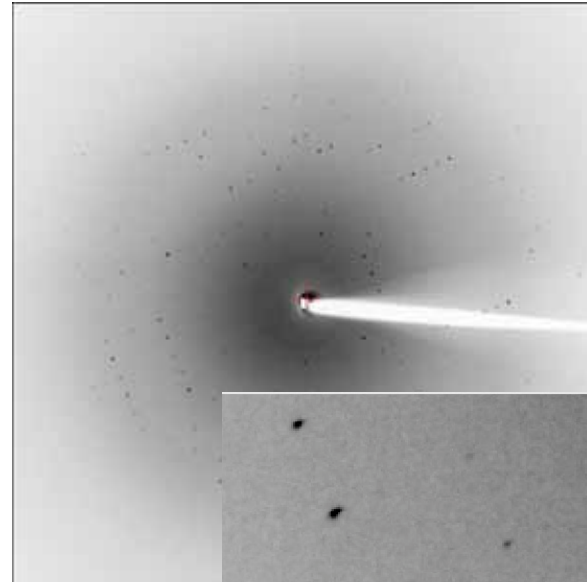
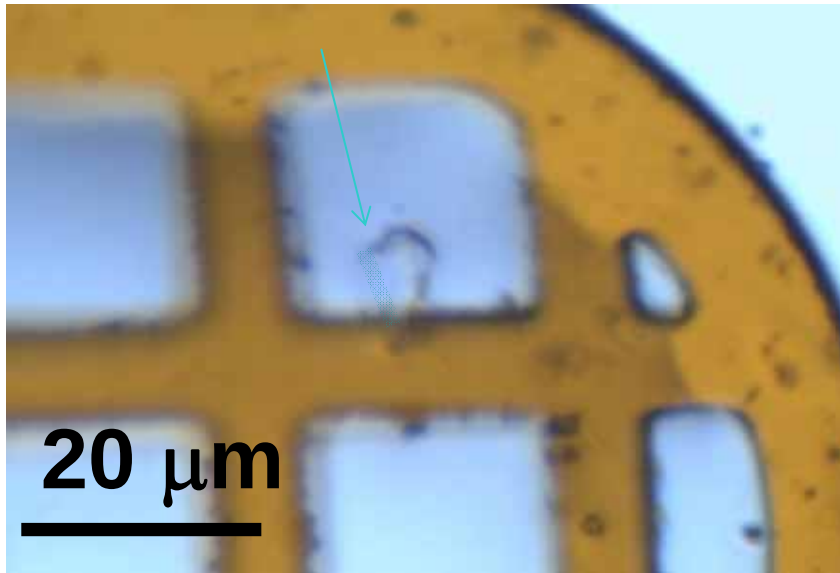
タンパク構造



研究者



マイクロフォーカスビームの開発



まとめ

- タンパク質結晶はX線によりタンパク質を可視化する際の増幅器として働く
- 解析対象のタンパク質の複雑化に伴い、結晶の品質は低下傾向、増幅力の低下
- 今後は結晶化技術、X線源、測定手法などのさらなる高度化が必要
- メールインシステム、マイクロビームラインなど

BL32XU利用講習

播磨・理研 平田 邦生

超微小ビームを利用

集光径1ミクロンの高フラックスビーム

文部科学省
ターゲットタンパク研究プログラム



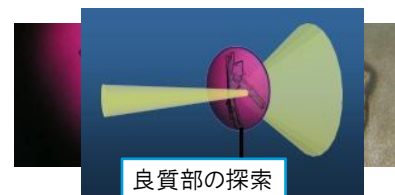
SPring-8 BL32XU

微小結晶から高精度データ収集

可変サイズビームによる効率的なデータ収集

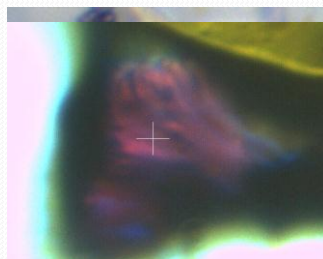


低品質微小結晶からのデータ収集



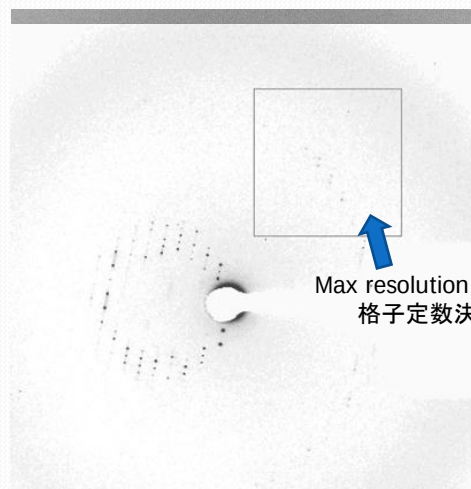
実験戦略をどう立てるか？

1. 構造解析の対象を見るために必要な分解能
2. 放射線損傷の見積もり
3. 複数結晶を用いるか否かの選択
→データ収集および同型性評価



クロスサイズ 5 μ m

波長: 1.28Å
 ビームサイズ: 2x2 μ m
 フラックス: 1.6×10^{10} photons/sec
 Detector: Rayonix MX225HE



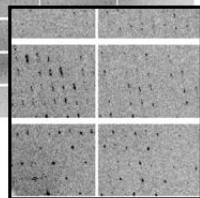
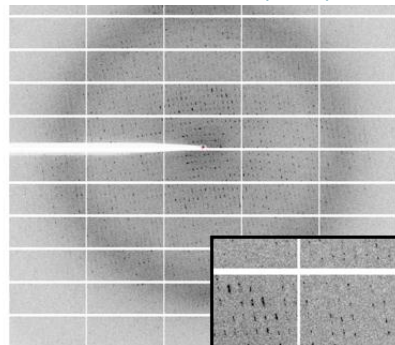
Max resolution ~ 5 Å
 格子定数決定

5.85Å

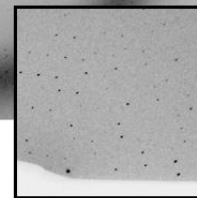
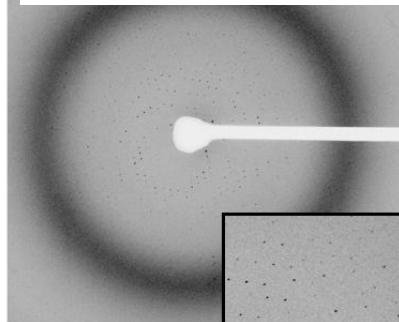
タンパク質複合体の低品質結晶の指数づけに成功

BL32XU 横浜理研・横山研

SLS(X06SA)の回折像 ($25\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$)



BL32XUマイクロビーム回折像 ($7\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$)



2010.4.24. - 4.26. 試験利用
山本雅貴先生（理研・横山研）
平田邦生先生
河野能廣先生らのご厚意により

微小ビームを用いて回折プロファイルの形状改善

1. 1~10 μm 角 10^{10} photons/sec/ μm^2 のビームが利用可能
2. 微小結晶や低品質結晶からの回折データが収集可能
3. helical scan法による回折データ収集が損傷軽減に有効
4. さらに簡便に微小結晶構造解析を可能にする開発を進める



SPring-8リモート測定システム を利用した タンパク質結晶構造解析データ収集

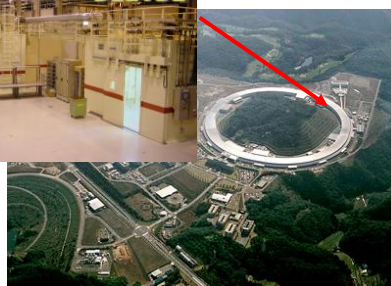
上野 剛
生命系放射光利用システム開発ユニット
利用システム開発研究部門 基盤研究部

ケミカルバイオロジー研究基盤施設 SPring-8利用システム開発研究部門コラボ教育セミナー 2011年1月24日

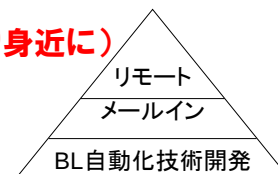
SPring-8 Structural Biology Beamlines



リモート実験システム開発の目的

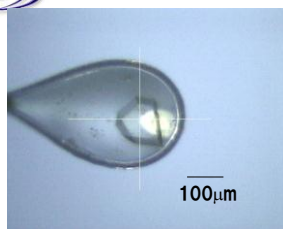


- ユーザの利便性向上(ビームラインをより身近に)
- メールインで出来ないことを可能に





タンパク質結晶のX線回折データ収集



クライオループ中の凍結結晶
(100K)

発現、精製、結晶化

実験室

結晶凍結

ビームラインへ輸送

データ収集できた結晶の数
= 584/2,618 (<20%)
(2010年 BL26B2統計より)

自動化による結晶スクリーニング
およびデータ収集効率化

予備測定

データセット測定





自動化技術の展開

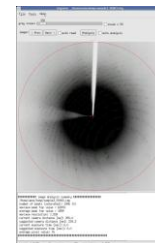
構造ゲノム研究に向けた迅速測定

ビームライン自動化

- ・ 実験ステーション機器自動化
- ・ 結晶交換の自動化、省力化
- ・ 結晶スクリーニングの効率化
- ・ 測定スケジュールリング etc.

微小結晶、膜タンパク等の
結晶スクリーニング、放射線損傷対策、
マイクロビームBLへ適用
リモート実験システム

Sample	Wavelength (Å)	Beam Size (μm)	Exposure (s)	Resolution (Å)	Intensity (a.u.)	Signal-to-Noise Ratio
Sample 1	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 2	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 3	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 4	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 5	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 6	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 7	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 8	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 9	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00
Sample 10	10.0000	1.00	0.10	2.50	1000000	10.00





リモート実験システム開発スケジュール

現在使用できるビームライン: BL26B1

テスト運用

来年度初期: BL26B2

共用BLへ

来年度中期: BL38B1

Undulator
BLへ

来年度中: BL41XU、BL32XU



<http://beamline.harima.riken.jp/>

理研ビームライン利用の手引き

上野 剛

生命系放射光利用システム開発ユニット
利用システム開発研究部門 基盤研究部

ケミカルバイオロジー研究基盤施設 SPring-8利用システム開発研究部門コラボ教育セミナー 2011年1月24日



<http://beamline.harima.riken.jp/>

利用手順

年度始め
(随時受付可)

利用課題申請

課題採否 & 課題番号を割り振り

各ビームライン
募集サイクル毎

ビームタイム利用申請

実験開始10日前

持ち込み試料申請 等

ビームライン実験

実験終了後

ビームタイム利用報告

年度末

利用課題成果報告

課題番号毎

