

微小結晶からの高精度/高効率データ収集に最適な測定条件を提案

公益財団法人高輝度光科学研究センター

放射光利用研究基盤センター 構造生物学推進室

馬場 清喜

Abstract

タンパク質結晶構造解析では、世界中で回折データ収集の自動化が進められている。SPring-8 構造生物学ビームラインにおいても自動測定の開発が進んでおり、BL32XU において開発された ZOO システムによる自動測定は、結晶の形状や数により、(1) ループ内の複数結晶から small-wedge (10°程度) のデータを測定する「small-wedge synchrotron crystallography (SWSX)」、(2) 結晶への照射位置を移動しながら測定する「Helical」(3) 単点露光データ収集「Single」の測定などを選択できる。凍結した単結晶からのデータ収集においては、吸収線量と放射線損傷、得られるデータ精度の議論が多くなされて、ある程度コンセンサスができてきた。しかし、複数のタンパク質の微小結晶から得られた small-wedge データをマージして完全データを得る SWSX では、X 線の吸収線量をどの程度まで制限すれば高精度な解析ができるか系統的な調査報告がなかった。そのため我々は、SWSX 測定における高精度、高効率なデータ取得の最適な吸収線量の条件を調査し、マージによる吸収線量の平均化の効果を明らかにすることができた。さらに、シグナル量と放射線損傷の効果の低減のバランスが重要であることを示し、特に位相決定などの高精度データを必要とする場合には、1 結晶あたり吸収線量 5 MGy での測定を提案できた。

1. はじめに

タンパク質結晶構造解析では、結晶サイズと照射する X 線のビームサイズの組み合わせにより、照射位置で回転させて測定する single データ収集、結晶がビームサイズよりも大きい場合に回転+横移動を組み合わせて測定する Helical データ収集、small-wedge synchrotron crystallography (SWSX)、serial synchrotron rotation crystallography (SSROX) 実験^[1]などのデータ収集方法が用いられている。SWSX は、複数の結晶をマウントしたクライオループを X 線でラスタースキャンし、多数の結晶から 5-20°の small-wedge データを収集し、統合することで、完全性の高いデータセットを作成する^[2] (図 1)。BL45XU は全自動測定が可能なビームラインであり、ビームラインの機器はビームライン制御ソフトウェア BSS^[3]によって制御されている。ZOO システム^[4]は、BSS と通信することにより、上記の全てのデータ収集の自動化を実現している。SPring-8 では、ZOO システムを用いて膜タンパク質の微小結晶を SWSX で測定している。しかし、SWSX における吸収線量が最終的にマ-

ジされるデータセットに与える影響については、これまで系統的な研究がなされていなかった。今回我々は、SWSX における高精度データ取得のため、各結晶に対する吸収線量 (露光条件) を変えて測定を行い、吸収線量のデータ精度への影響を比較した^[5]。

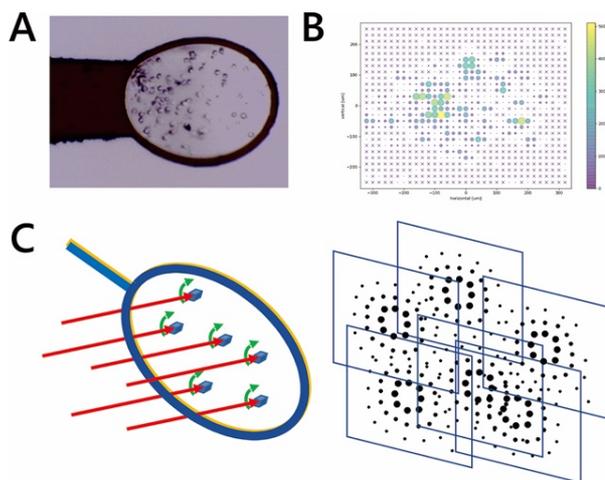


図 1 SWSX データ収集の流れ

A クライオループ内の微小結晶、B ラスタースキャンを行い、回折点の数で評価した結果、C ラスタースキャンの評価から結晶位置を決定し、各結晶から 5-20°の small-wedge データを収集。

2. SWSX における吸収線量のデータ精度への影響を比較した実験条件

SWSX の最適線量を評価する実験として硫黄-SAD (S-SAD) による位相決定を行った結果を解析し、高精度なデータを得るための最適な線量の検討を行った。実験には、約 20 μm の大きさにサイズをコントロールして作製したリゾチーム結晶を用いた。SWSX のデータセットは、SPring-8 BL45XU において、ZOO システムを用いた自動測定で行った。データ測定のためのビームサイズは 18 (H) \times 20 (V) μm^2 を使用した。波長は 1.0, 1.4, 1.7 \AA 、吸収線量は 1, 2, 5, 10, 20, 40 MGy の 18 種類で、各結晶から 10°分の条件で small-wedge データ測定を行い、各条件下で 400 以上の small-wedge データセットを収集した。small-wedge データの 1 結晶あたりの吸収線量は、RADDOSE 3D[®]を用いて計算した。各 small-wedge データの処理とマージは、XDS で KAMO[®]を用いて行った。マージのクラスタリング計算は BLEND[®]を用いた。マージされた各データセットについて、SHEL[®]の SHELXC, SHELXD, SHELXE を用いて、S-SAD の位相決定を行った。

3. 高効率/高精度なデータ収集に最適な SWSX の実験条件の提案

波長 1.0 \AA の条件では、5 MGy だけが S-SAD による位相決定に成功した。波長 1.4 \AA では、1, 2, 5, 10, 20 MGy で S-SAD による位相決定が成功し、40 MGy の条件では成功しなかった。波長 1.7 \AA では、すべての条件で位相決定が成功した。これは、S-SAD における硫黄 (S) の異常分散寄与 f' は、波長 1.0, 1.4, 1.7 \AA でそれぞれ、 $f' = 0.24, 0.46, 0.67$ であり、寄与が大きい長波長 (低エネルギー) であるほど S の異常散

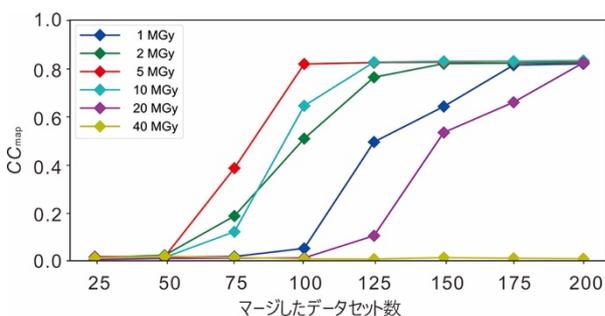


図 2 波長 1.4 \AA におけるマージしたデータ数と CC_{map} との相関。

乱強度が上がり、位相決定が容易となるためである。さらに位相決定におけるマージしたデータ数の寄与を調べるために、波長 1.4 \AA と 1.7 \AA の 2 種類の波長で、マージするデータの数 を 8 パターン (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 セット) とし、各マージデータの数に対してランダムにデータセットを抽出したマージ処理を各 10 回行い、位相決定直後のマップと正解のマップとの相関 (以下 CC_{map}) をプロットした (図 2, 3)。波長 1.4 \AA で 40 MGy のデータを除き、マージするデータセット数が増加するほど、両波長で CC_{map} が高くなった。すなわち、どの線量でもデータセット数が増加するほど、位相決定が容易になることが明らかになった。波長 1.4 \AA と 1.7 \AA 共に、5 MGy の吸収線量での測定条件が最も少ないデータ数のマージで CC_{map} の値が大きくなった。2 番目に良い条件は、2 MGy と 10 MGy であった。一方、波長 1.4 \AA で 20 MGy、波長 1.7 \AA で 20, 40 MGy の高 Dose 条件では、放射線損傷が激しく、データ精度は低下した。これらの結果から、S-SAD の位相決定には、どの波長でも 5 MGy 前後の吸収線量での測定条件が最もデータ数が少なく、短時間で測定できることがわかった。また、マージしたデータセット数が増えるほど、位相決定が容易になった。このことから、SWSX では、マージされたデータセット数が増えるにつれて、データの精度が向上していることがわかる。論文ではさらに、SWSX の大量データセットのマージの際に起きる吸収線量の実質低減の効果についても述べている。

上記の結果から、マージするデータ数を増やし、精度を向上させることで、より容易に S-SAD による位相決定が可能となることが明らかとなった。しかし、より高い線量条件である 40 MGy 波長 1.4 \AA では、

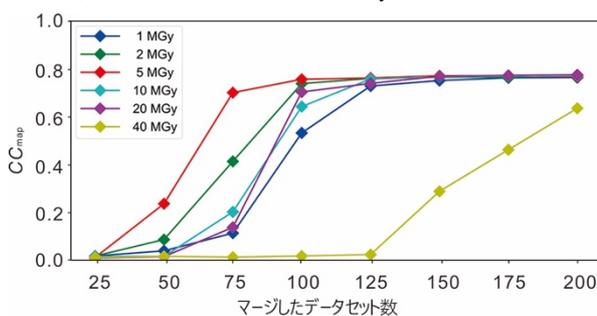


図 3 波長 1.7 \AA におけるマージしたデータ数と CC_{map} との相関。

放射線損傷のために低下したデータ精度をマージ処理で回復することができなかった。一方、低線量条件である 1 MGy と 2 MGy では、波長 1.4 Å と 1.7 Å とともに回折点の信号強度が不十分であるが、マージするデータ数を増やすことにより位相決定が可能であった。一般的なドーズスライシング測定では、ランダム誤差を低減するために、同じ結晶、同じ方位から X 線強度を N 分の 1 にして N 回回折データを測定し、N 個のデータをマージする方法である。我々の低線量 (1~2 MGy) の結果はこの測定法の模擬実験になっている。低線量実験では特に繰り返しの、測定時間が必要となり良いデータが得られても、効率的とは言えない。一方で、金属含有タンパク質の放射線損傷による局所的な損傷など、より低い吸収線量の条件での実験が必要な場合もある。解析する試料、目的に応じて最適な吸収線量を評価する必要があることは、留意する必要がある。

4. まとめ

SWSX を利用した高精度データ収集において、(1) マージ処理する結晶の数を増やすことで、位相決定は容易になる。(2) 波長 1.4 Å と 1.7 Å の両方で 5 MGy の条件が、放射線損傷による精度劣化とマージ回数による精度回復で最も効率的であることを明らかにした。この研究を通し、自動測定での特に位相決定などを目的とした SWSX の高効率・高精度なデータ収集の条件として、1 結晶あたり 5 MGy の吸収線量の測定条件での 1 データセットの取得を提案した。

参考文献

- [1] K. Hasegawa *et al.*: *J. Synchrotron Radiat.* **24** (2017) 29-41.
- [2] V. Cherezov *et al.*: *J. R. Soc. Interface.* **6** (2009) S587-S589.
- [3] G. Ueno *et al.*: *J. Synchrotron Radiat.* **12** (2005) 380-384.
- [4] K. Hirata *et al.*: *Acta Cryst.* **D75** (2019) 138-150.
- [5] S. Baba *et al.*: *J. Synchrotron Radiat.* **28** (2021) 1284-1295.
- [6] O. B. Zeldin *et al.*: *J. Appl. Crystallogr.* **46** (2013) 1225-1230.
- [7] K. Yamashita *et al.*: *Acta Cryst.* **D74** (2018) 441-449.
- [8] J. Foadi *et al.*: *Acta Cryst.* **D69** (2013) 1617-1632.
- [9] G. M. Sheldrick: *Acta Cryst.* **D66** (2010) 479-485.

馬場 清喜 BABA Seiki

(公財) 高輝度光科学研究センター
放射光利用研究基盤センター 構造生物学推進室
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
TEL : 0791-58-0833
e-mail : baba@spring8.or.jp