

# ナノビームを用いた構造生物学の 将来像

## Prospects of structural biology research using nano beam

高エネルギー加速器研究機構  
物質構造科学研究所 放射光科学研究施設  
構造生物学研究センター  
若槻壮市

# ERL戦略

- 何故ERLでなくてはならないか？
  - 人工光合成、触媒、スピントロニクスに集中
  - 10psecから100fsecのダイナミクスが必須
  - エネルギー・環境問題解決
  - 放射光コミュニティー外の強力な研究者をサポートに
  - 産業界への働きかけ
- 規模、予算、スケジュール： 3GeV、300億円、20年運転開始
  - ビームラインは競争的・外部資金、PF、PF-ARから移設
  - 運転は20～30MW、30億円/年
  - 2期計画として3.5GeV、200億円、7GeV XFEL-O

# アウトライン

1. イントロダクション
2. タンパク質複合体のダイナミクス: タンパク質翻訳後修飾と輸送
3. 生命素子アトミックイメージング研究イニシアチブ
4. 超高精細・高速2次元ピクセル検出器開発

# 構想生命科学研究

最終目標: 実時間、in-situ生体素子の原子座標ダイナミクスの解明

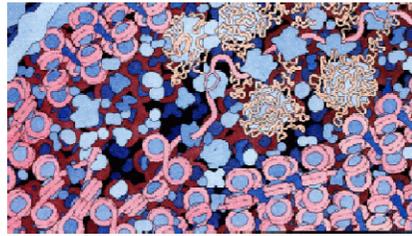
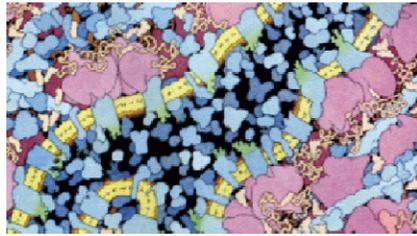
有核細胞内のオルガネラとタンパク質



タンパク質:青、リボソーム:マジエンタ、DNA:赤、RNA オレンジ、脂質:黄色、炭水化物:緑

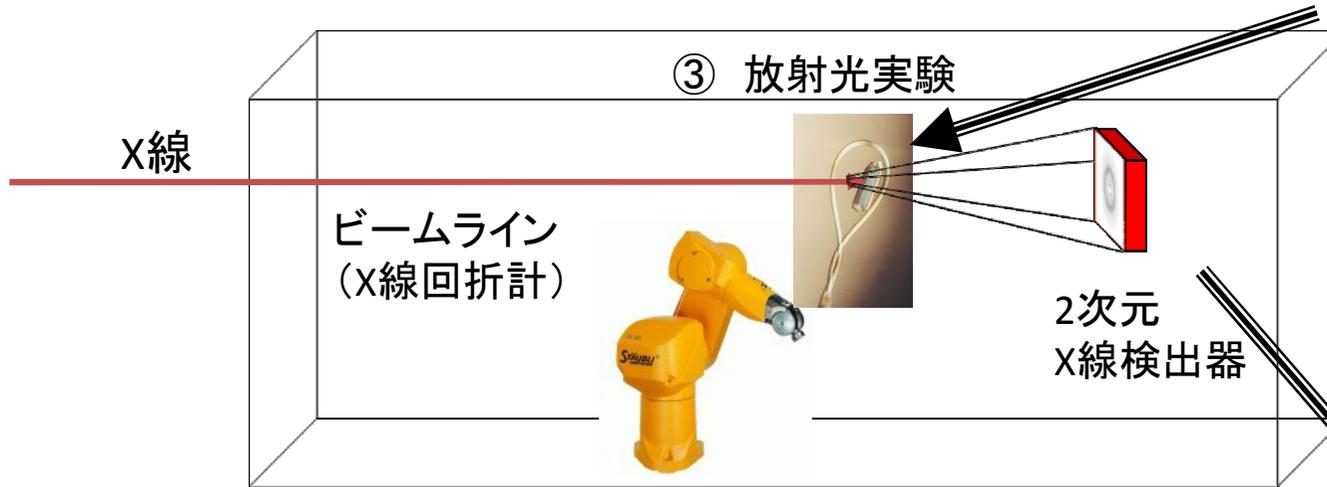
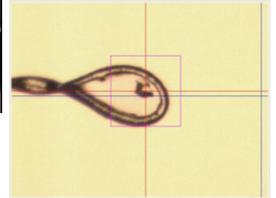
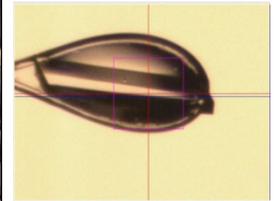
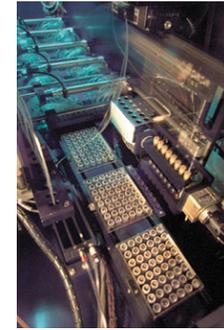
*David S. Goodsell, Scripps Institute,*  
<http://www.scripps.edu/mb/goodsell/>

# 生命科学研究に資する放射光X線構造生物学研究



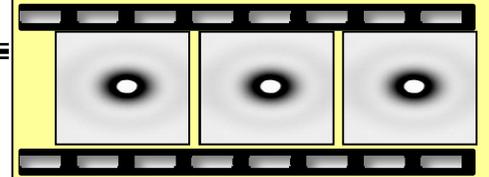
① 生体ナノマシン & 情報伝達ネットワーク

② タンパク質 発現・  
精製・結晶化



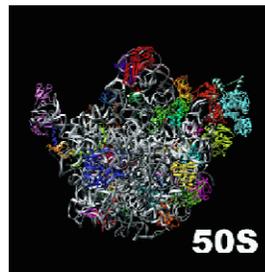
④ X線結晶構造解析

または



時分割X線溶液散乱

⑤ 超分子複合体構造・ダイナミクス



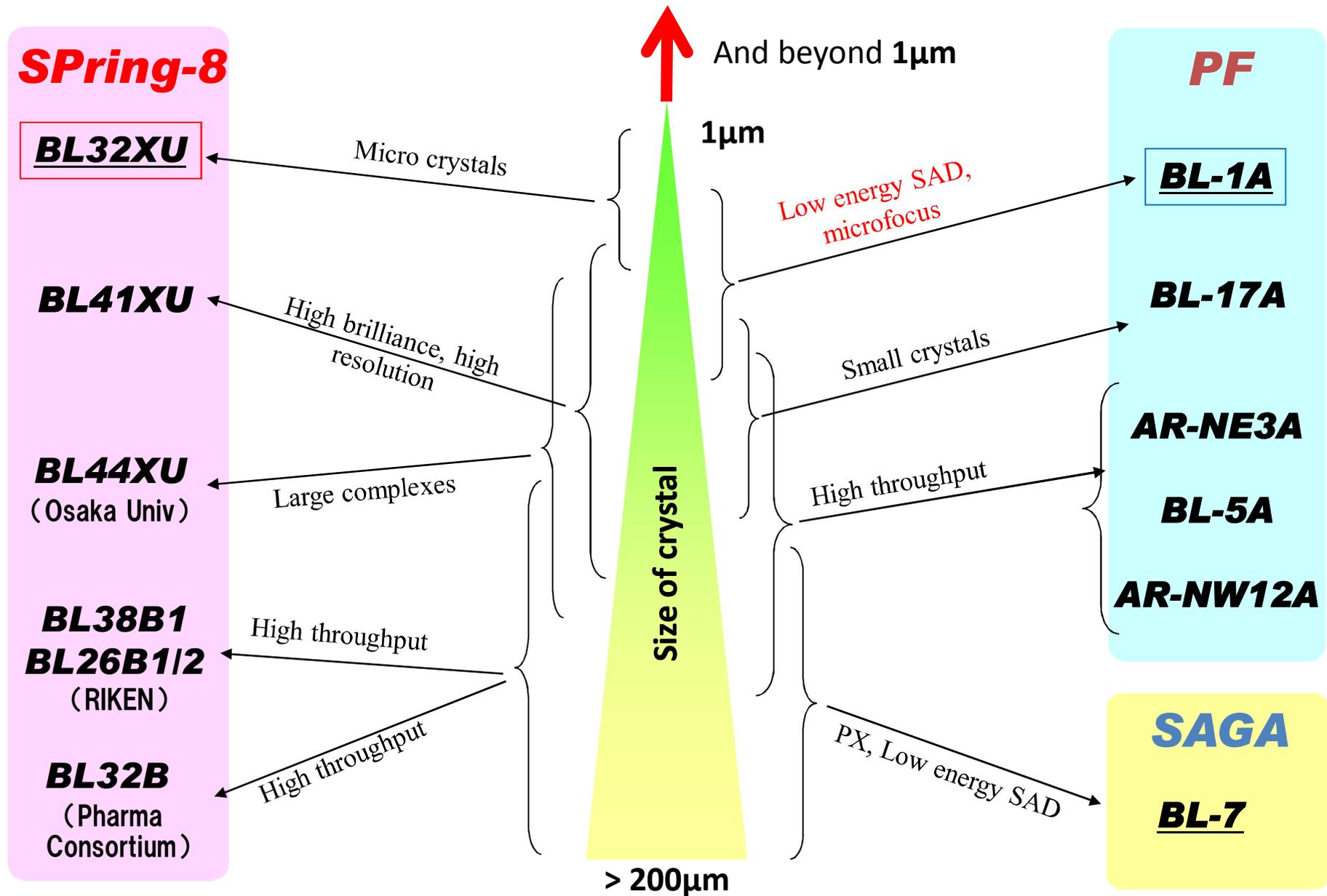
例：リボソーム構造解析 2009年ノーベル化学賞  
アダ・ヨナット教授(ワイツマン研究所)  
高エネ機構 特別荣誉教授

⑥ 波及効果

生命科学  
(基礎研究)

医療・創薬  
産業利用

# Roadmap of Japanese PX beam lines



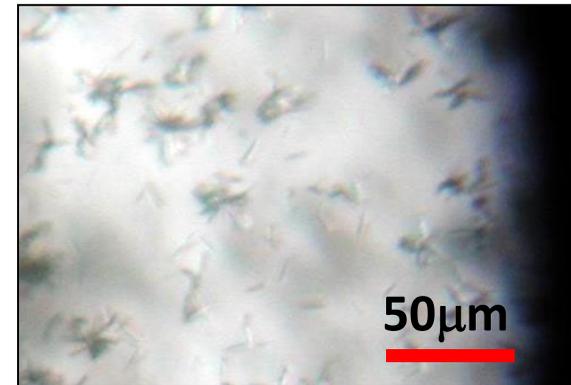
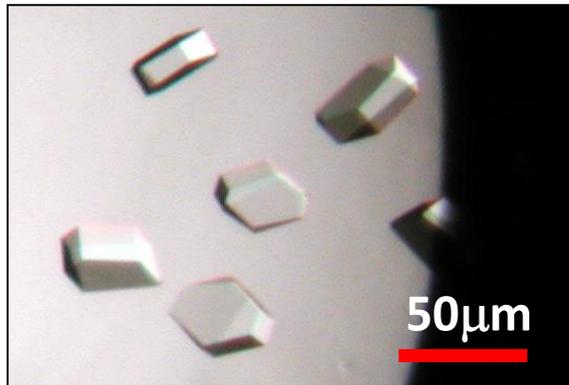
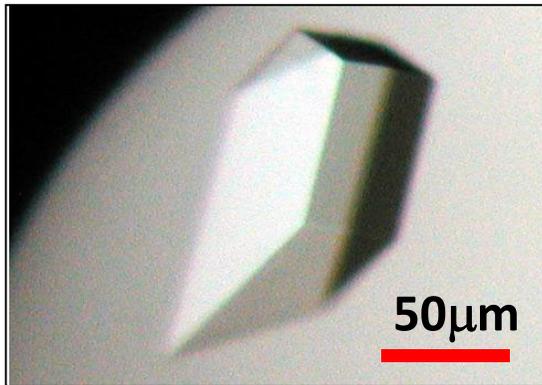
# ナノクリスタル応用研究

放射光X線を用いた生体高分子結晶の構造解析現状、課題、将来の課題

標準的な結晶  
100ミクロン程度  
タンパク質 $10^{12}$ 個

現状限界点  
10ミクロン  
タンパク質 $10^9$ 個

微小結晶  
ミクロン  
タンパク質 $10^6$ 個



解析ターゲット

微小結晶サイズに最適化したマイクロビーム (TPRP)

	現状	目標
・ ビームサイズ	100×100	1×1 μm <sup>2</sup>
・ ビーム輝度	10 <sup>13</sup> -10 <sup>14</sup>	10 <sup>16</sup> 光子/秒/mm <sup>2</sup>

タンパク質結晶学の  
限界への挑戦 ナノ結晶  
タンパク質数  
数十個~10<sup>3</sup>個  
平行性の高いナノビーム  
ERLやXFEL

# 高難度ターゲットタンパク構造解析のための2本の相補的な専用ビームライン開発および関係技術開発

H22年度よりマイクロビームビームラインの供用開始  
H24年度からは創薬等支援技術基盤プラットフォーム

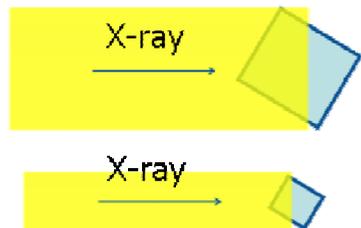
## 超高輝度マイクロビームビームラインの開発(理研)

世界最高 超高輝度  
マイクロビームの実現

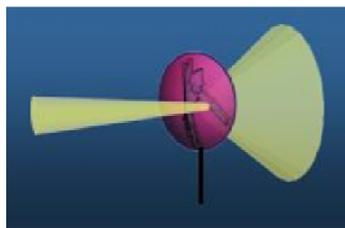


超微小結晶、不均質結晶・クラスター結晶の構造解析

マイクロビームを用いた微小結晶から高精度データ収集

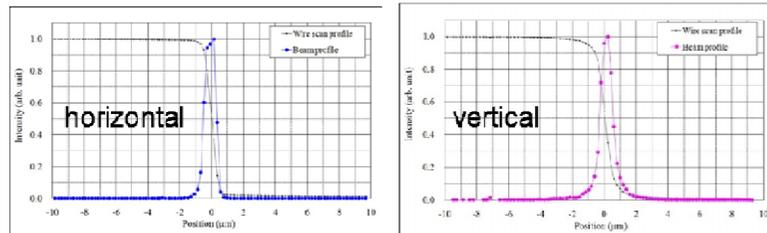


微小結晶に適合したサイズの高輝度ビームによるデータ収集



低品質微小結晶中の良質部からデータ収集

Beam profiles at sample position(12.4 keV)



Beam size(FWHM)

0.9  $\mu\text{m}$ (H) x 0.9  $\mu\text{m}$ (V)

Photon flux

$6.2 \times 10^{10}$  photons/sec

## 低エネルギーマイクロビームビームラインの開発(高エネ機構)

### 結晶構造解析における位相決定の現状

#### 重原子MAD法

異常散乱元素の導入

- 遺伝子工学 (SeMet等)
- 経験的手法 (浸漬法等)

$\lambda 1$   
 $\lambda 2$   
 $\lambda 3$   
X線照射

多波長異常散乱シグナル

- 重原子誘導体を作成する必要があるが、測定は比較的容易で位相を精度よく決定できる

多くのタンパク質の構造決定に成功

#### 軽原子SAD法

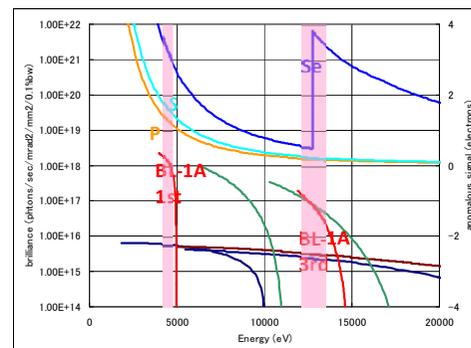
天然分子の結晶

$\lambda$   
低エネルギーX線照射

軽原子(硫黄等)からの異常散乱シグナル

- 異常散乱元素(重原子)の導入は必要なく、試料調整の手間を大幅に削減できる

測定・解析が難しく成功例は僅か



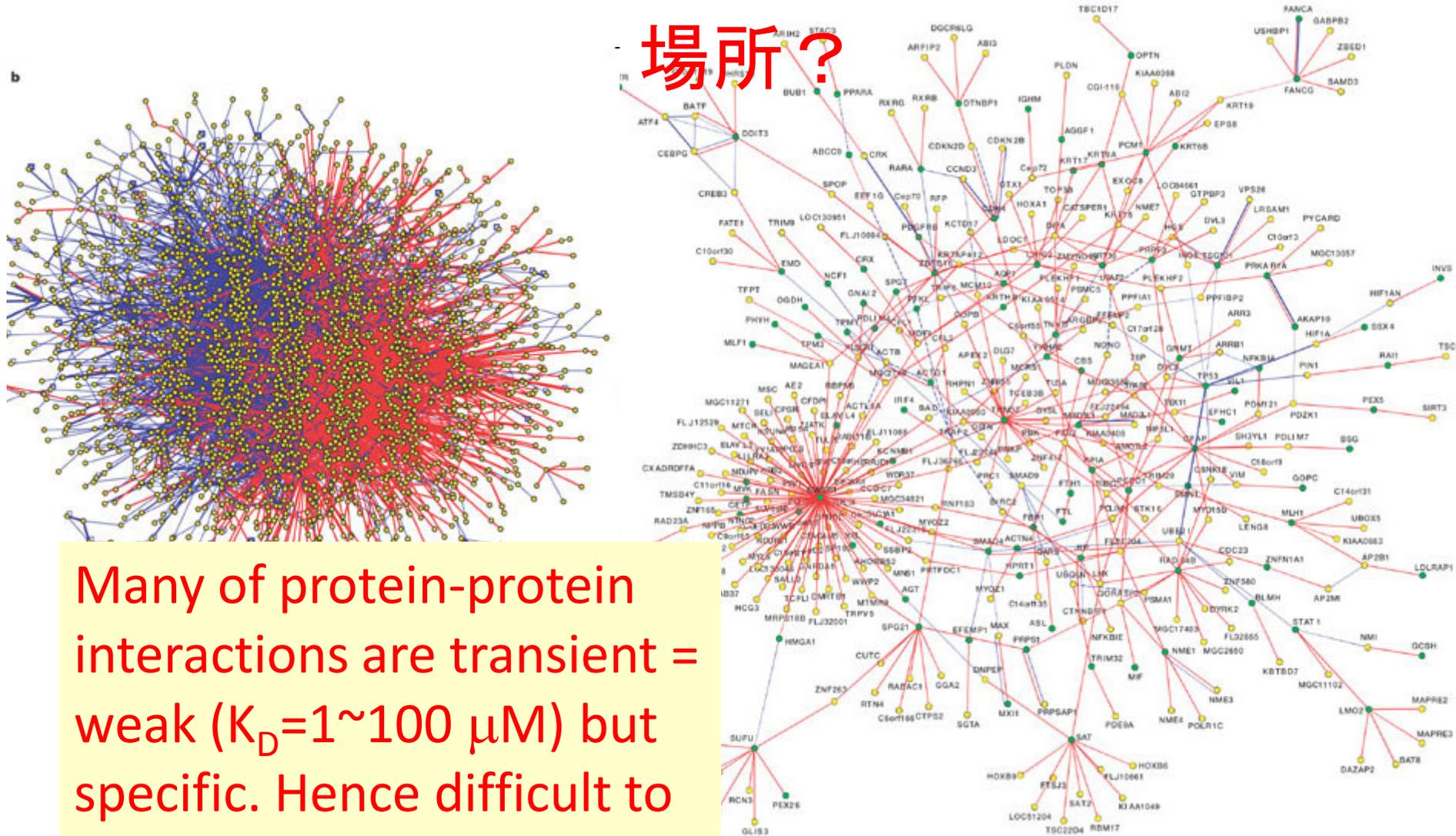
光源エネルギースペクトル

低エネルギー(4keV近傍)で  
高輝度ビームを実現



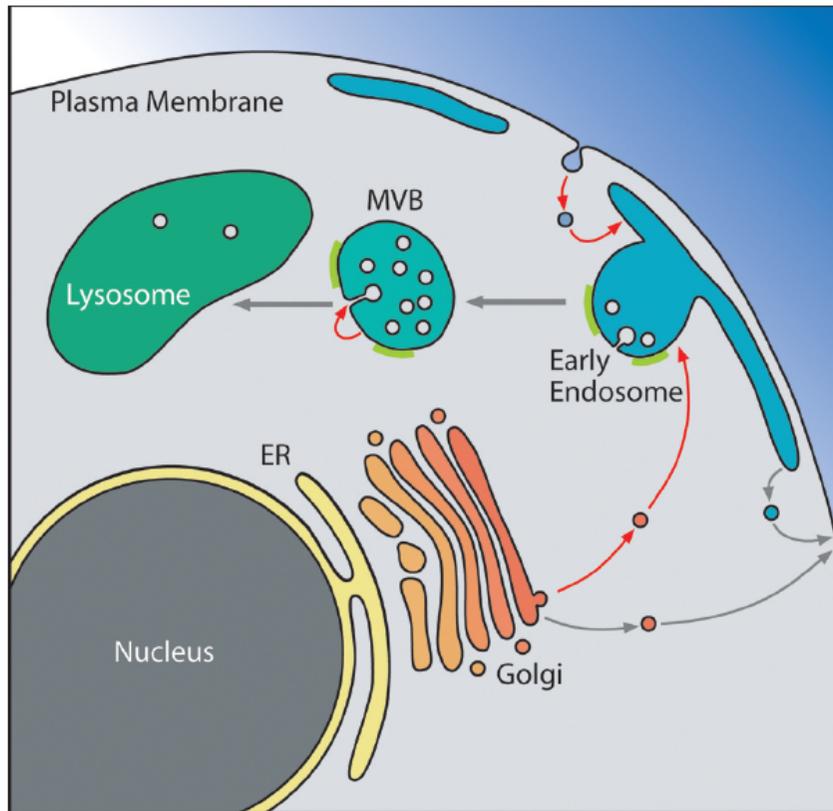
軽原子SAD法による標識  
結晶不要の構造解析

# Systems biology of protein-protein interaction network



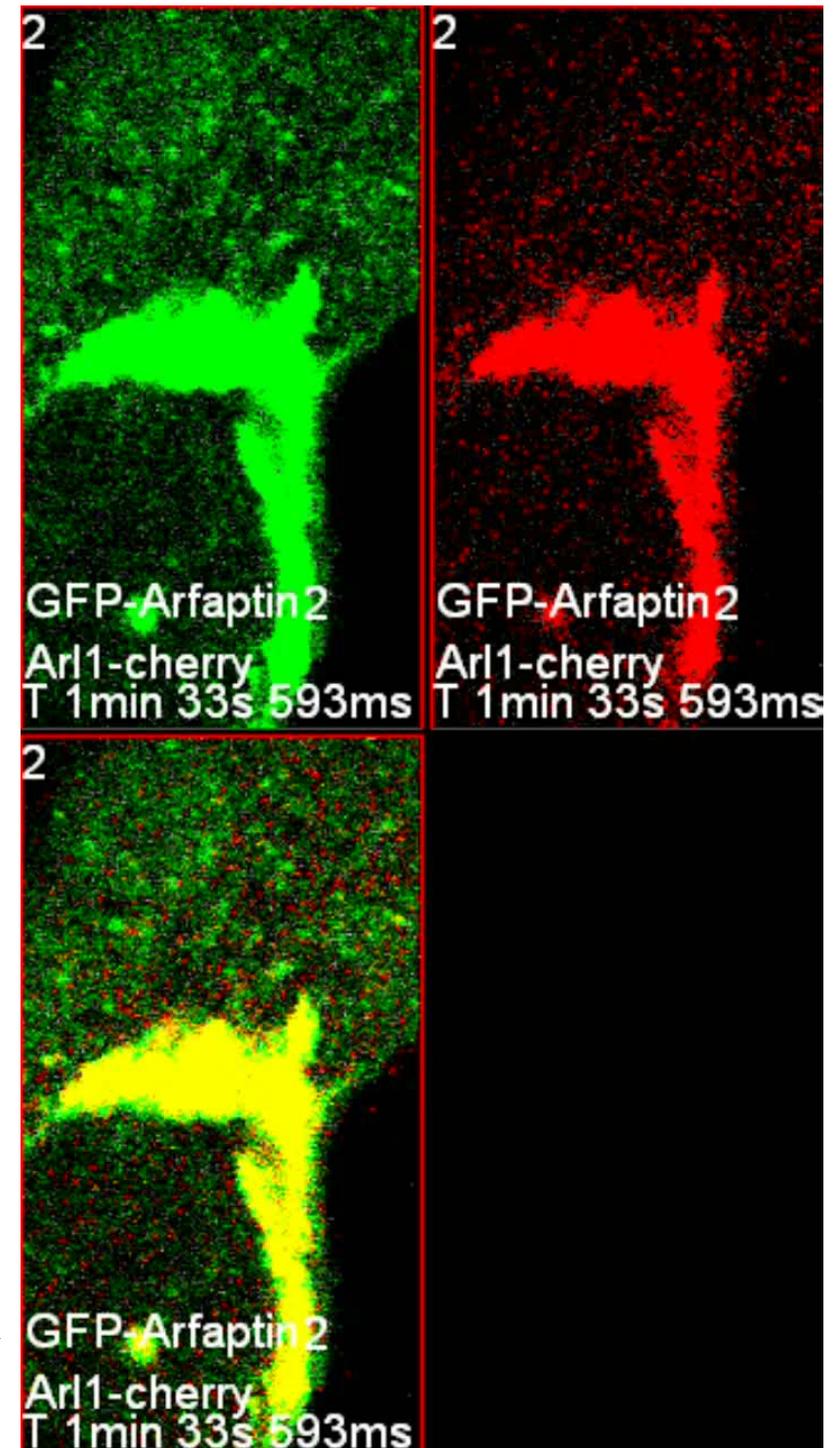
Taken from Rua et al., Nature 2005

## 2. タンパク質複合体のダイナミクス: タンパク質翻訳後修飾と輸送

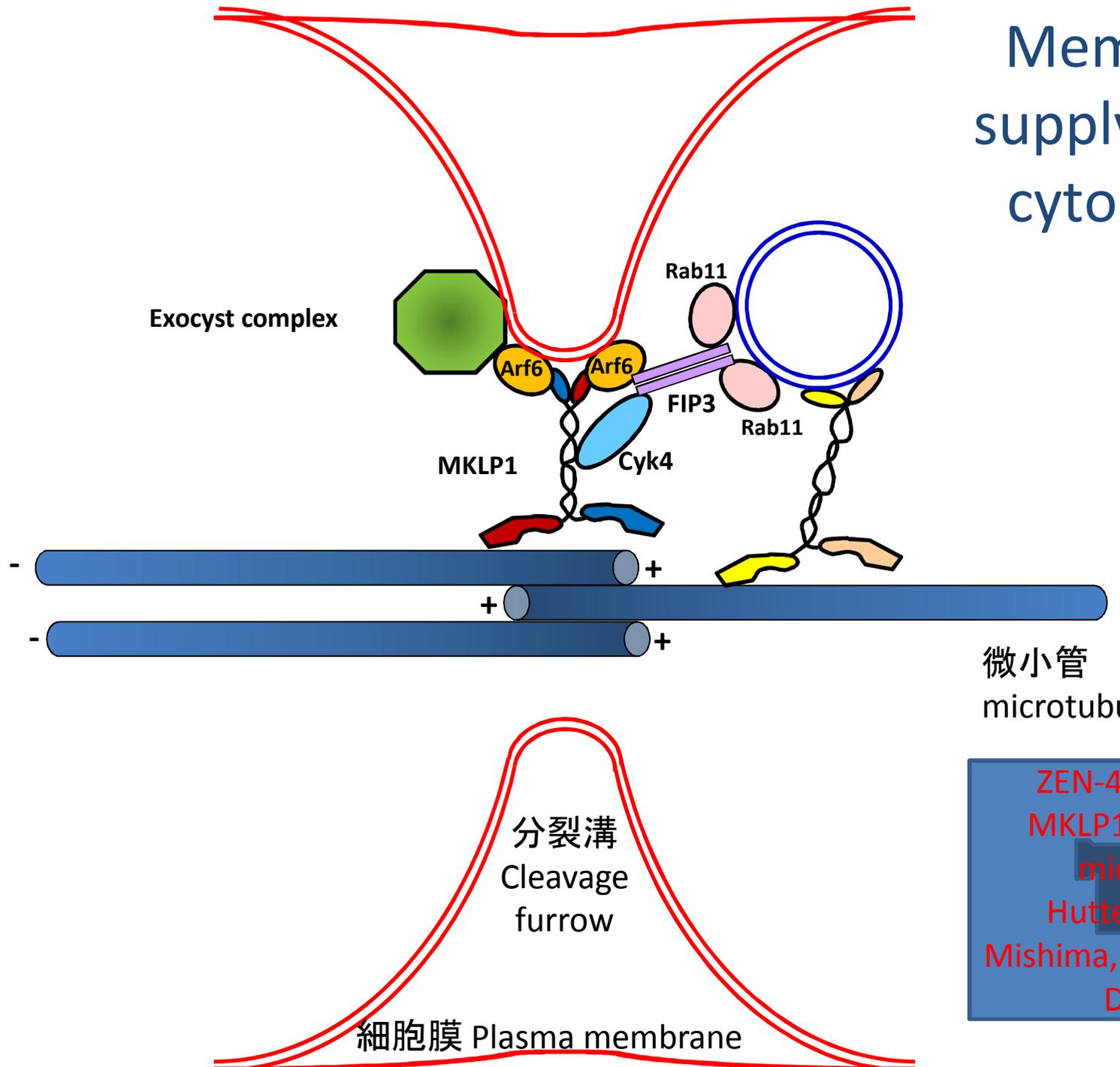


Tubulation by Arl1/Arfaptin

Time lapse imaging (1.5 min)



# Membrane supply during cytokinesis



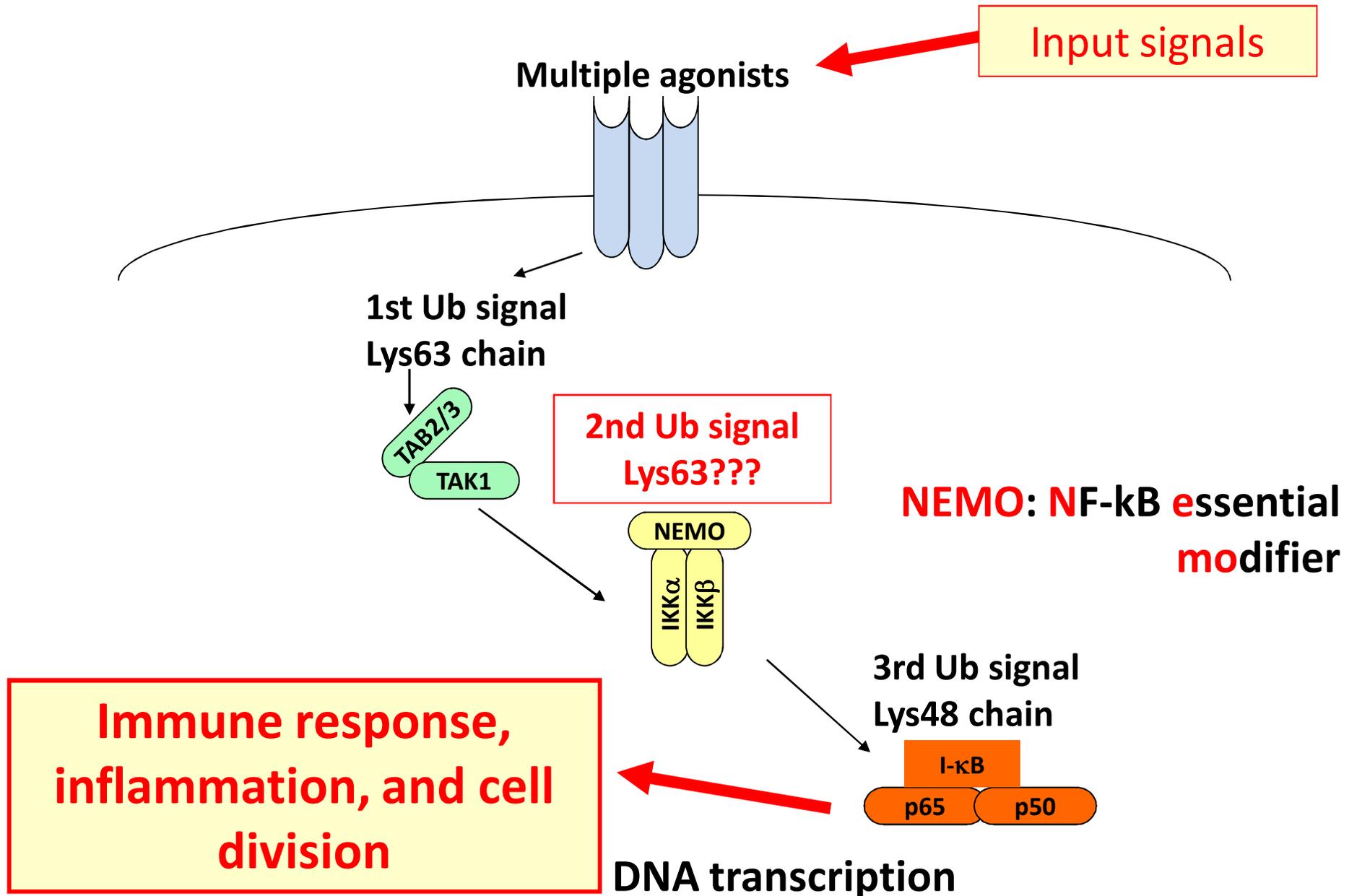
微小管  
microtubules

Double  
headed  
kinesin

ZEN-4 (*C. elegans* MKLP1) walks along microtubule:  
Hutterer, Glotzer, Mishima, *Current Biology*, Dec 2009

Movie

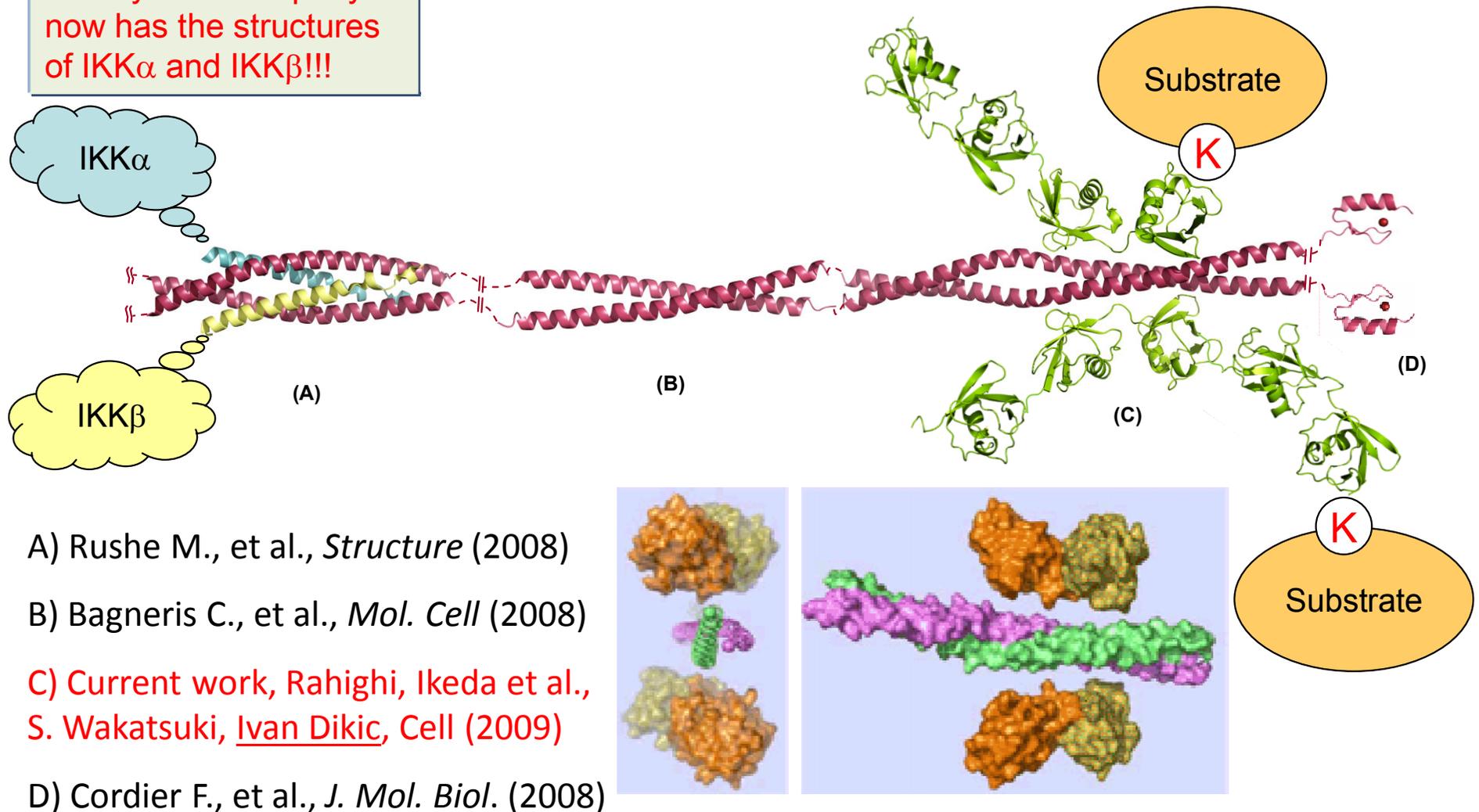
# Ubiquitin signals in NF- $\kappa$ B activation



# NEMO is a long alpha helical dimer

## How does linear ubiquitin binding activate IKK $\alpha$ and IKK $\beta$ ?

Eli Lilly and Company  
now has the structures  
of IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ !!!



# New Ubiquitin World with Accelerator Technologies

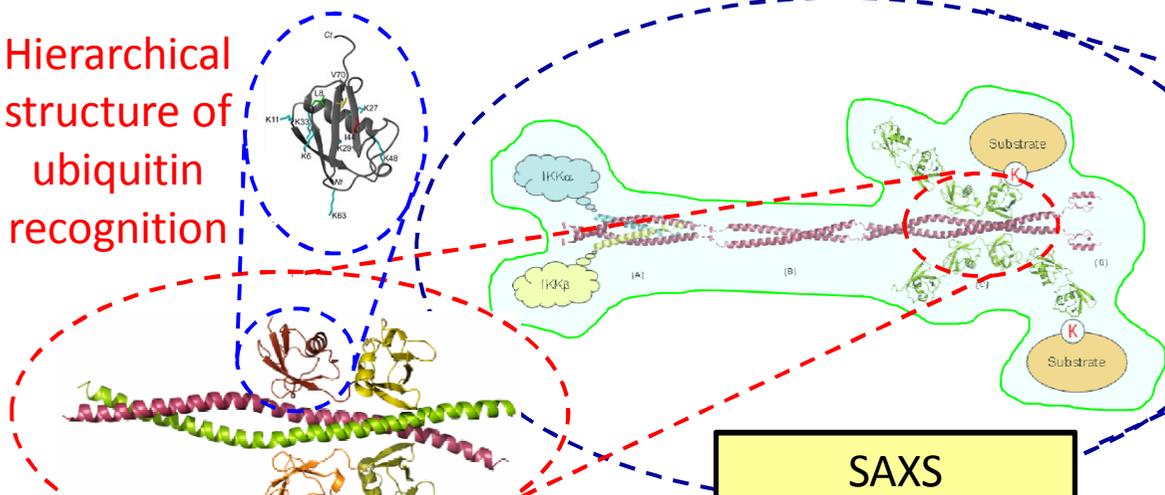
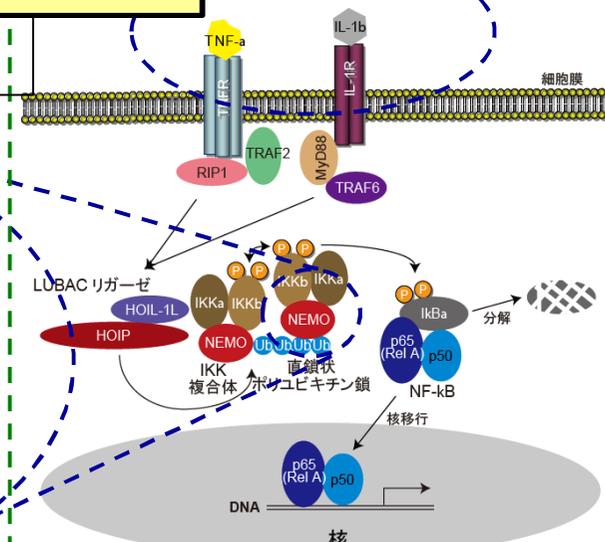
Analysis of receptors upon agonist binding

GI-SAXS& GI-SANS

NF- $\kappa$ B pathway

Macroscopic structural changes  $\leftrightarrow$  function

Hierarchical structure of ubiquitin recognition



SAXS

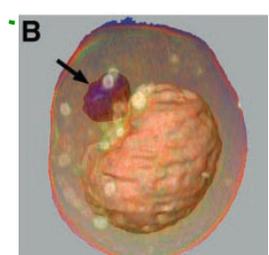
Protein Crystallography  
Rahighi et al., Cell 2009

Time resolved solution structural analyses of posttranslational modifications & complex formation

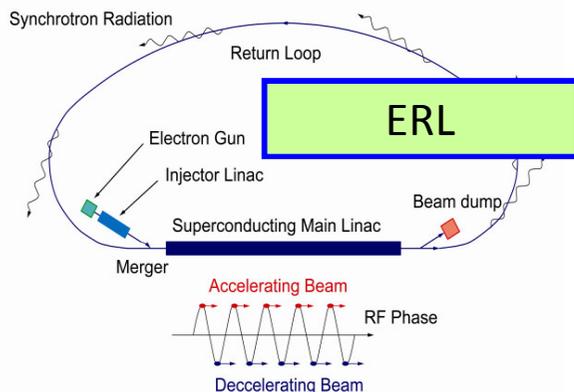
Accelerate developments of drugs

Imaging localization of protein complexes with high resolution and contrast

SR X-ray tomography  
Figure by Carolyn Larabell



Structural studies of polyubiquitin synthesis & recognition  
In vivo analysis of drug delivery and signal transduction



生命動態システム科学推進に資する原子座標ダイナミクス研究

### 3. 生命素子アトミックイメージング研究 イニシアチブ

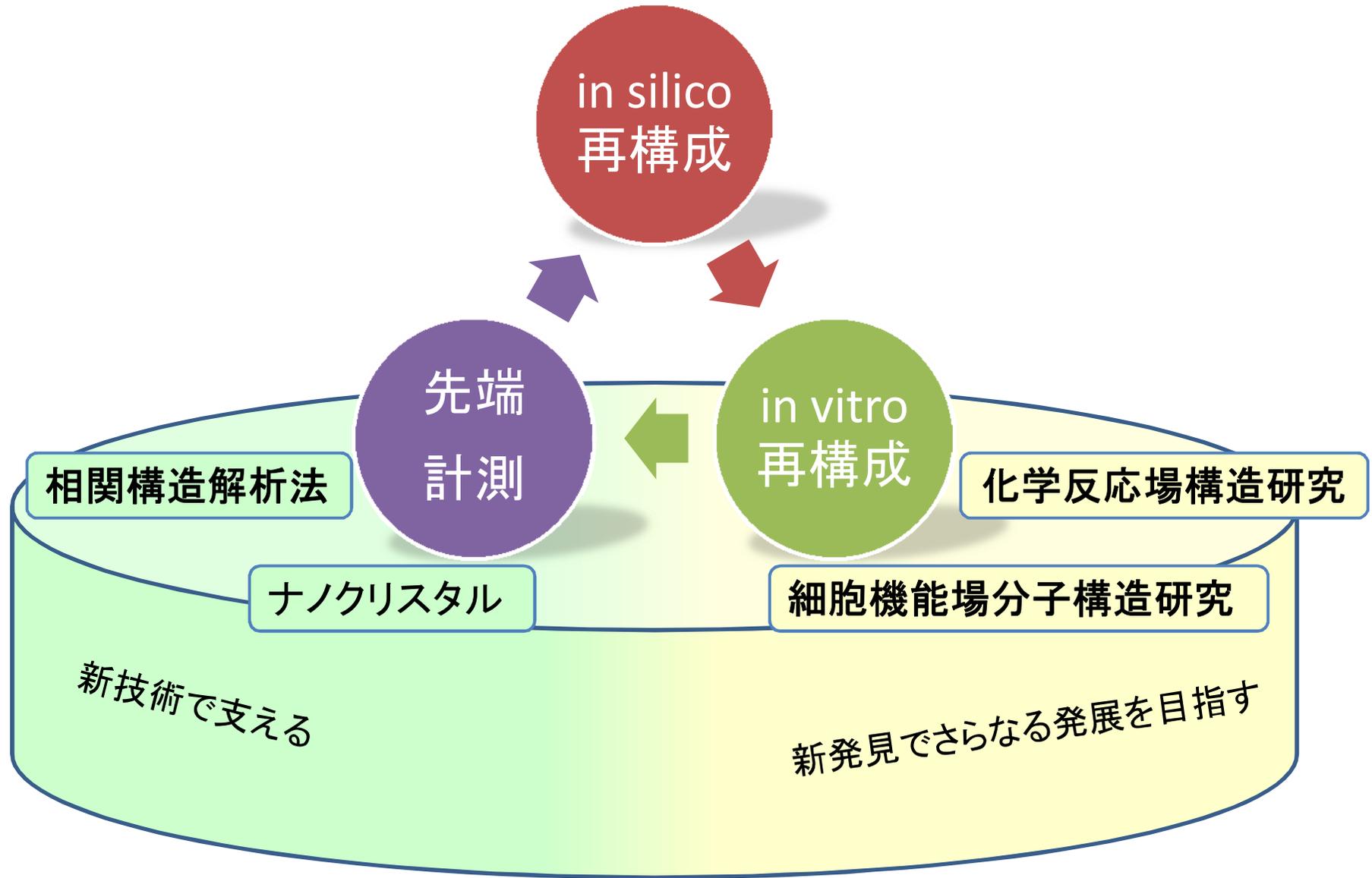
東京大学大学院 理学系研究科 濡木理

京都大学大学院 医学系研究科 岩田想

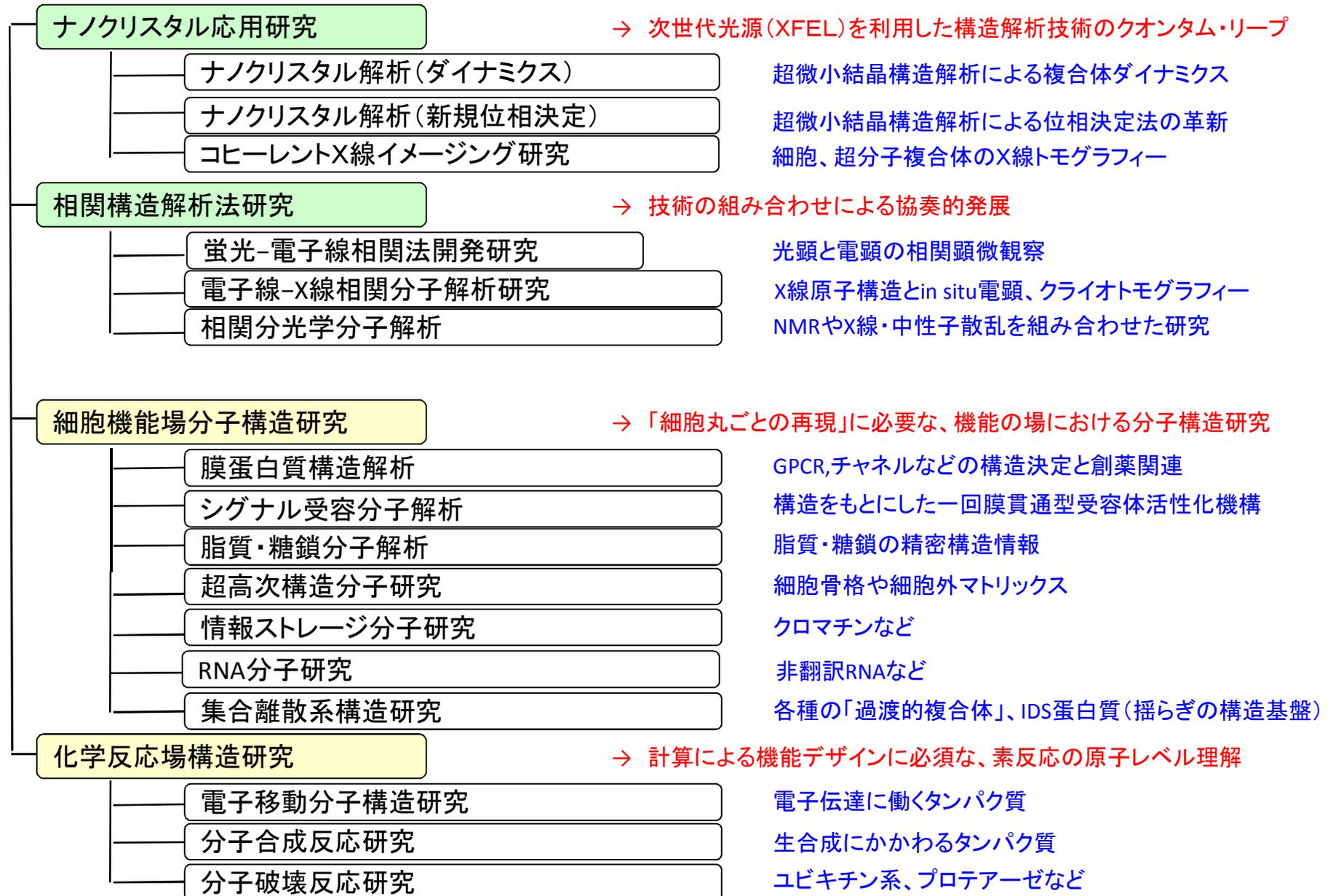
大阪大学 蛋白質研究所 高木淳一

高エネルギー加速器研究機構 フォトンファクトリー 若槻壮市

# 生命動態システム科学推進に資する原子座標ダイナミクス

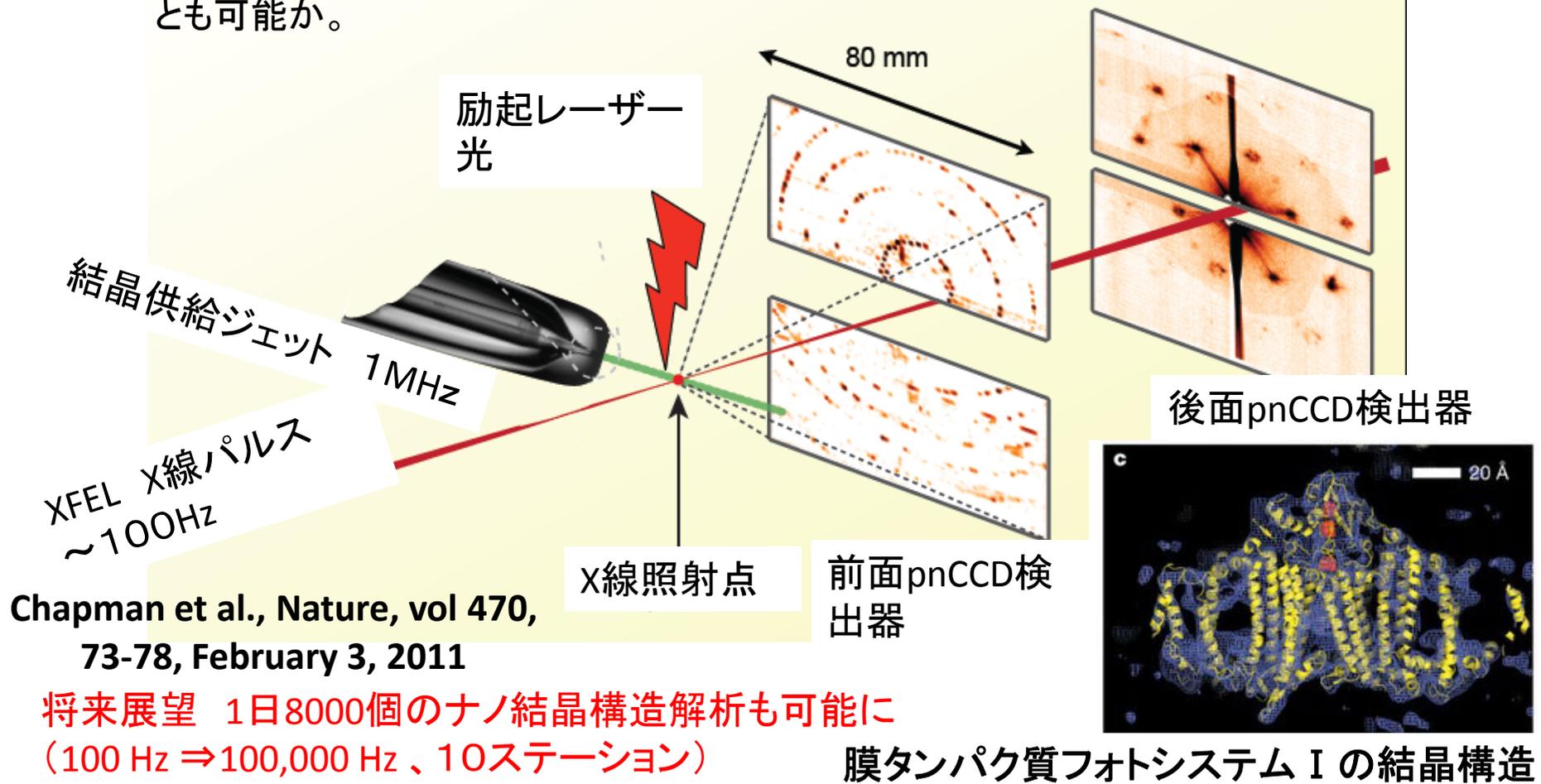


# 生命素子アトミックイメージング研究イニシアチブ



# ナノクリスタル応用研究

X線自由電子レーザー(XFEL)を用いて、これまで全く不可能であった数十個のタンパク質からなるナノクリスタルの結晶構造解析が可能になり、構造生物学にパラダイムシフトをもたらす可能性。励起光と組み合わせることで生体物質の構造ダイナミクスに迫ることも可能か。



☆XFELを利用したフェムト秒タンパク質ナノ結晶構造解析

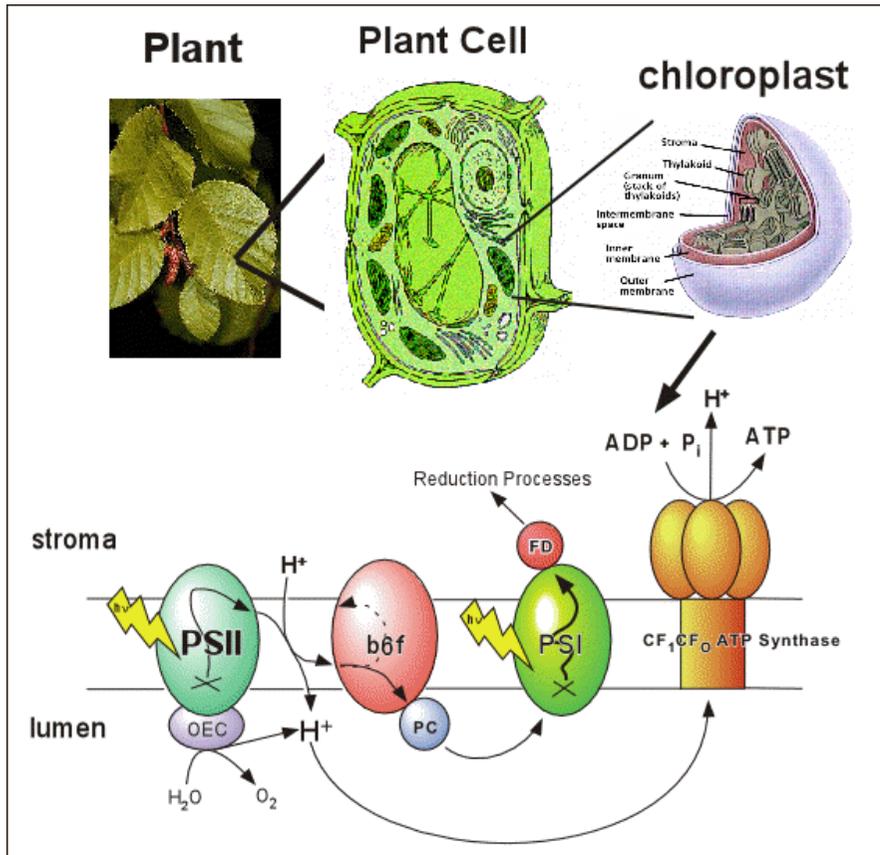
## ナノクリスタル応用研究

- ナノ結晶: 蛋白質を数十～数千個しか含まない超微小結晶
- 可視化、ハンドリング、構造解析ともにほとんど不可能とされていた。
- XFEL計画の副産物(単粒子構造解析がもともとの生物系プロジェクト)で、ごく少数のサイエンティストのみが細々とつづけていた。
- LCLS(スタンフォードのX線自由電子レーザー)で昨年来急激に進展
- 60人以上の国際チーム: スタンフォード、アリゾナ州立大学、バークレー、マックスプランク研究所(ドイツ ハンブルク、ミュンヘン)、ウプサラ大学(スウェーデン)、DESY/CFEL(ハンブルク)等
- Diffract & Destroy(放射線損傷で破壊されるまえに測定)
- 実験装置、解析手法とも新機軸: 研究が端緒についたばかり。開発要素が非常に多く、新規参入でも勝算大。
- 数十人の研究人口がここ半年で10倍に。今後数千人になっていく可能性大
- 既に米国製薬会社数社が2011年1月のバークレー会議に参加

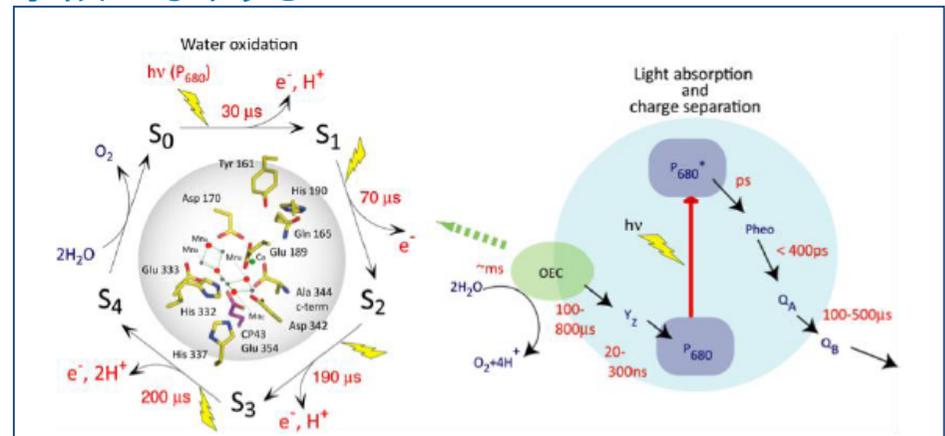
# 光合成:短パルス性能を活かした放射光研究

## 高速現象をスナップショット

## OR 非破壊連続露光で捉える



太陽光エネルギーを化学エネルギーに変換する光合成反応の理解は、エネルギー問題を解決する上で、基礎・応用面から極めて重要  
 しかし、最も重要な水を酸化して水素と酸素に変える反応機構がいまだに理解されていない  
 ⇒放射光時間分解測定は極めて有力な測定手段になりうる



Umena, et al. N. Kamiya, Nature, 2011

Kurisu et al., Science, 2003

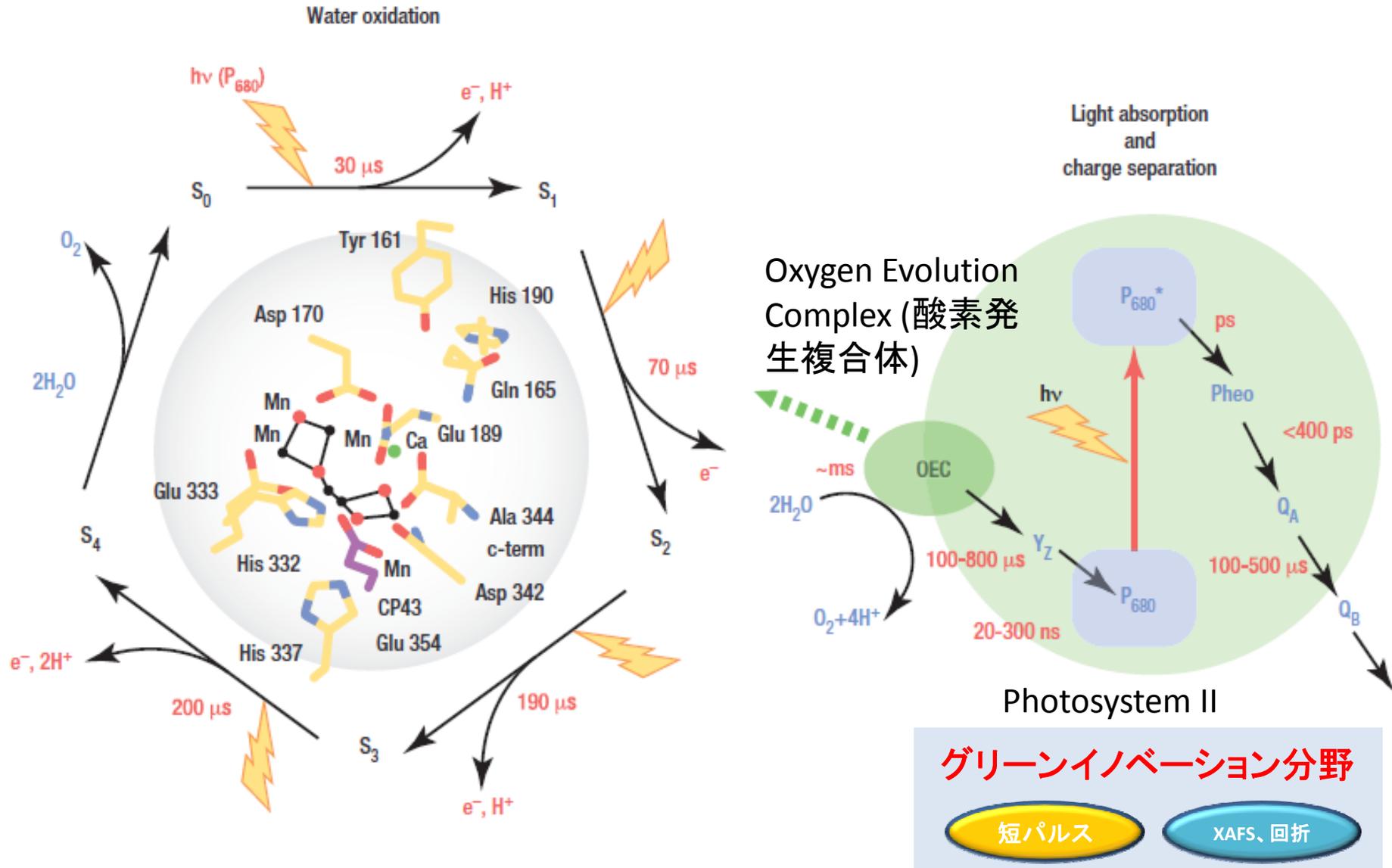
グリーンイノベーション分野

短パルス

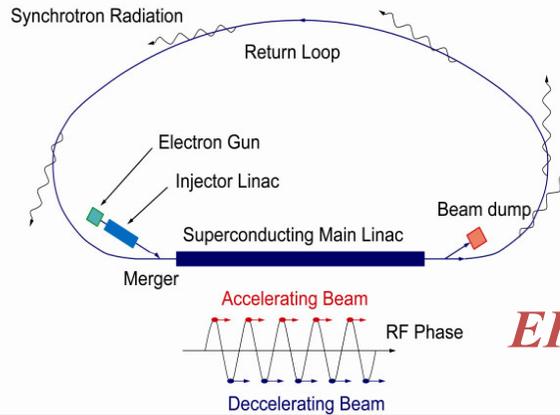
XAFS、回折

# 光合成: 短パルス性能を活かした放射光研究

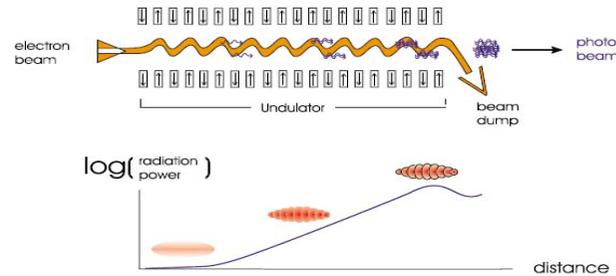
## 高速現象をスナップショット OR 非破壊連続露光で捉える



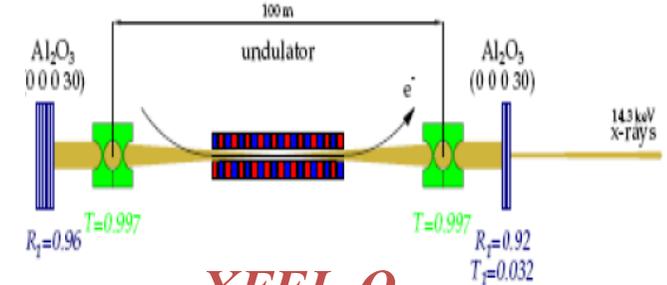
# Comparison of ERL, SASE-FEL and XFEL-O



**ERL**



**SASE-FEL**



**XFEL-O**

K.-J. Kim, Y. Shvyd'ko, S. Reiche,  
PRL. **100**, 244802 (2008).

	average brilliance	peak brilliance	repetition rate (Hz)	coherent fraction	bunch width(ps)	# of BLs	Remark
<b>ERL</b>	$\sim 10^{23}$	$\sim 10^{26}$	<b>1.3G</b>	$\sim 20\%$	<b>0.1~1</b>	<b>~30</b>	<b>Non-perturbed measurement</b>
<b>XFEL-O</b>	$\sim 10^{27}$	$\sim 10^{33}$	<b>~1M</b>	<b>100%</b>	<b>1</b>	<b>few</b>	<b>Single mode FEL (few meV)</b>
<b>SASE-FEL</b>	$\sim 10^{22\sim 24}$	$\sim 10^{33}$	<b>100~10K</b>	<b>100%</b>	<b>0.1</b>	<b>~1</b>	<b>One-shot measurement</b>
<b>3<sup>rd</sup>-SR</b>	$\sim 10^{20\sim 21}$	$\sim 10^{22}$	<b>~500M</b>	<b>0.1%</b>	<b>10~100</b>	<b>~30</b>	<b>Non-perturbed measurement</b>

(brilliance : photons/mm<sup>2</sup>/mrad<sup>2</sup>/0.1%/s @ 10 keV)

# XFEL-Oを使ったナノクリスタル解析の可能性

- XFEL-Oの高繰り返し1MHzはナノクリスタルジェット (100kHz~1MHz)とよくマッチ。 Cf: SASE-XFEL の 60~100Hz
- 1パルスに含まれる $10^9$ 光子を数十ナノメートルまで集光すれば、LCLS実験の光子数に匹敵するか？
- これが実現すれば毎秒 1データセット(100万イメージ)を収集し、構造解析。⇒ 1日86400データセット
- (cf: Neutze simulationで完全にcoulomb explosionの起こるレベル:  $4 \times 10^8$  photons/nm<sup>2</sup>)

# ナノクリスタル応用研究

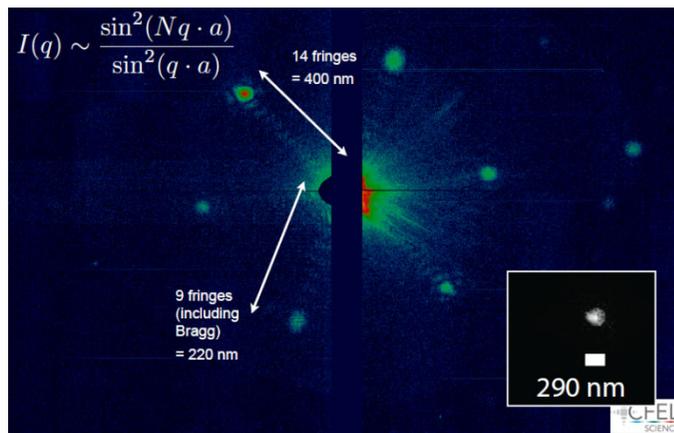
- ナノ結晶(蛋白質を数十~数千個しか含まない超微小結晶)構造解析法の開発
- 多様体解析を細胞イメージングに取りいえることで、不均一系の時・空間再構成を行う可能性
- 実験装置、解析手法とも新機軸: 研究がその端緒についたばかり。開発要素が非常に多く、新規参入でも勝算大。
- 全く新規な超高速構造決定法としての展開から創薬へも直結。

## ナノクリスタル ダイナミクス

可視光レーザーによるマイクロ秒ポンプ&プローブ実験。10マイクロ秒までの時間差。将来的にはテラヘルツ光による化学結合特異的な励起による動的構造解析にも応用

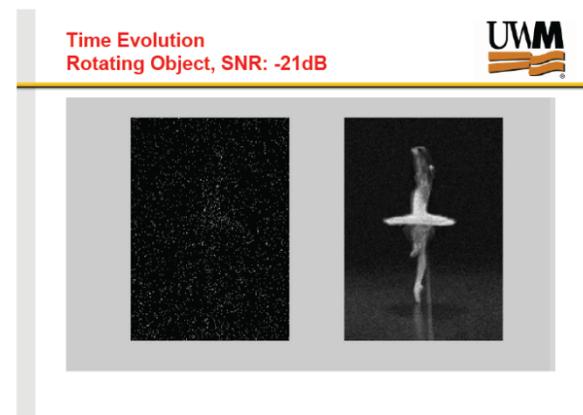


## ナノクリスタル 新規位相決定



結晶中タンパク質数の絶対数決定と新規位相決定法の確立

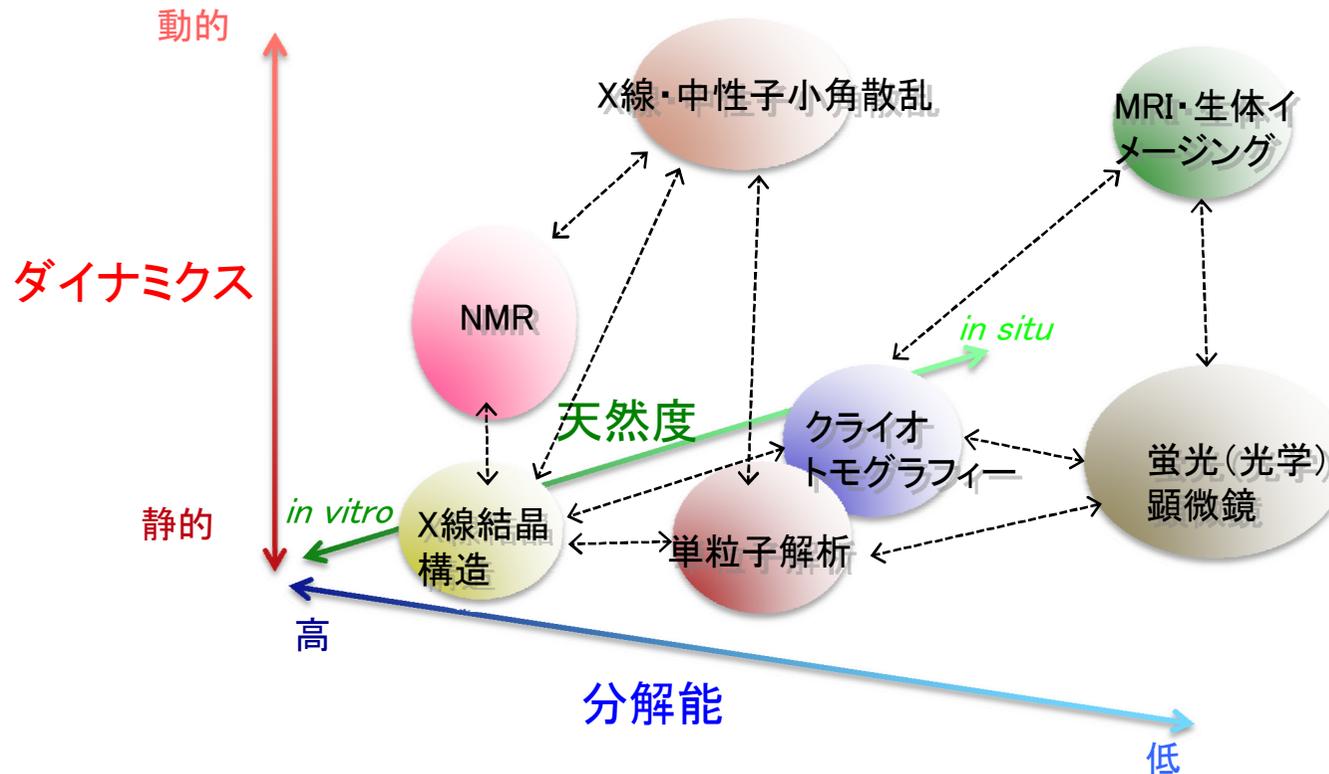
## コヒーレントX線イメージング



多様体解析によるランダムシーケンスデータからの動画再構成  
時空間ヘテロジェネイティー問題の根本的解決の可能性

# 相関構造解析法研究

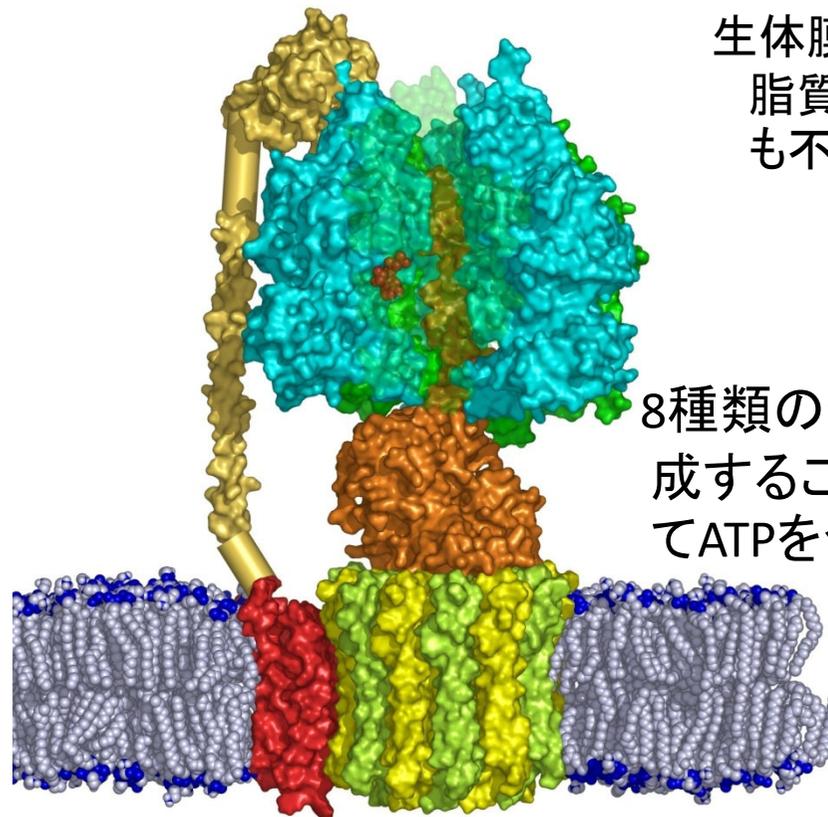
【目的】生命素子の現実の姿を捉えるには、分解能や特性の異なる複数の構造解析手法を組み合わせ、それらの「相関(correlation)」を用いて多面的に解析することが必要である。そのような「多次元」な方法論を確立するとともに、単一手法では到達不可能なレベルの生命機能解明を目指す。



☆独立した手法から得られたデータをシームレスにつなぎ合わせる

## 細胞機能場分子構造研究

【目的】細胞の中で生命素子は複合体、さらに巨大分子複合体を形成することで統合された生物機能を果たしている。巨大分子複合体は、調製や再構成、構造解析もきわめて困難であるが、その構造が生命機能と直結するためにきわめて重要なターゲットである。そのような巨大分子複合体の解析手法を確立することで、生命の本質的な理解を目指す。



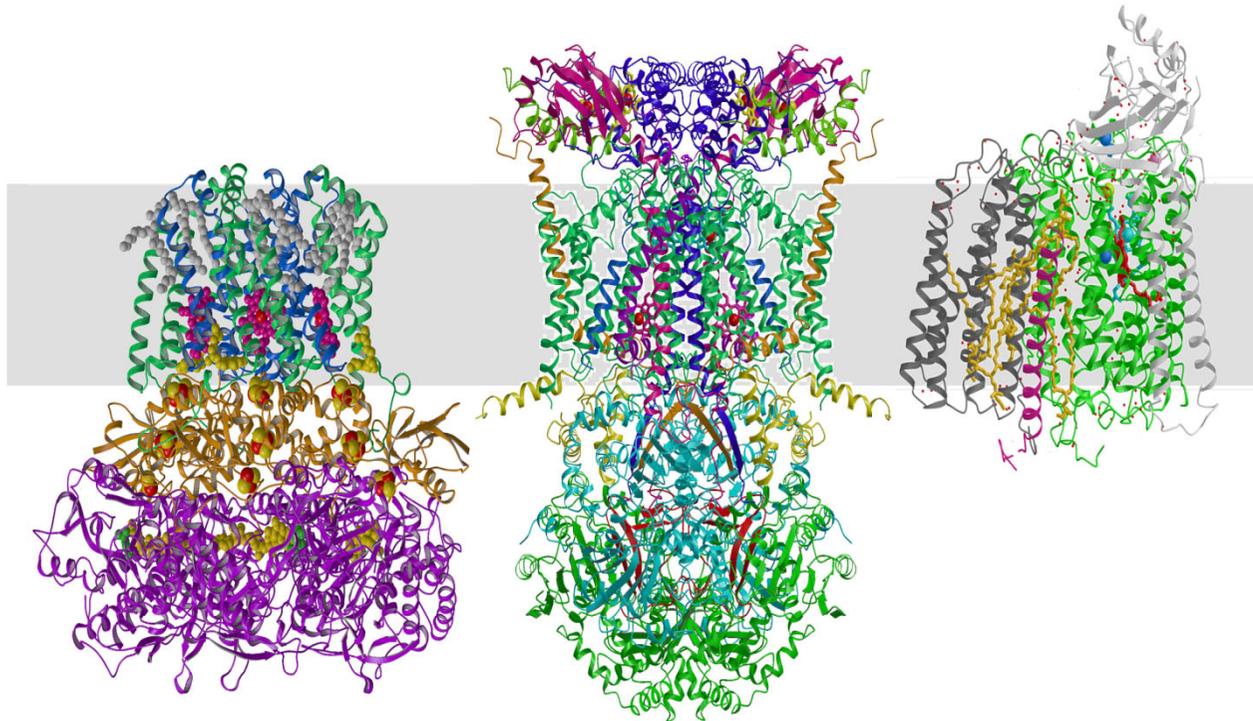
生体膜の機能を理解するためには  
脂質や細胞表面を覆う糖鎖の理解  
も不可欠

8種類の蛋白質が統合した複合体を形成することでプロトンの濃度勾配を使ってATPを合成する $F_1F_0$ ATPase

☆ 生きた状態に最も近い巨大分子複合体の構造解析手法を確立

# 化学反応場構造研究

【目的】細胞の中で生命素子は電子を伝達したり、化学反応を触媒することで新規の分子を創出したり分解・リサイクルを行うことで、生命機能を維持している。計算科学と連携し、グリーンサステイナビリティにも直結する化学反応場の解析手法を確立することで、生命の本質的な理解と応用を目指す。



電子の伝達を行い呼吸に働く生命素子群

☆計算科学と連携する化学反応場の構造解析手法を確立

# 4. 超高精細・高速2次元ピクセル 検出器開発 DEPFETプロジェクト

高エネルギー加速器研究機構

物質構造科学研究所  
若槻壮市、松垣直宏、清水伸隆

素粒子原子核研究所  
後田裕、田中秀治、樋口岳雄

Max Planck Institute for Physics, Munich  
Hans-Günther Moser

# 研究の現状と課題、新たな展開の必要性

## 結晶構造解析

現状 個々のタンパク質もしくは複合体の迅速な結晶構造解析

課題 微小結晶からの高精細な微弱回折像シグナルの検出は困難

## 溶液小角散乱

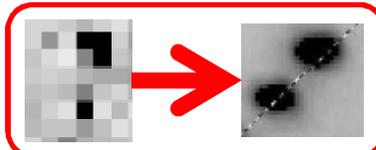
現状 分子の結合⇔解離またはタンパク質折りたたみ反応での形状変化

課題 連続的2次元データ収集実験の時間分解能はミリ秒が限界

今後の研究の方向性： 超分子複合体や膜タンパク質の構造・ダイナミクス解析

## X線検出器に求められる性能

- 高い位置分解能
- 高感度(低ノイズ)
- 大受光面積



- 高速データ読み出し
- 広いダイナミックレンジ

## 最高性能の市販X線検出器の性能と限界



CCD  
(Quantum315r)

検出器	有効ピクセルサイズ	読み出しスピード	ダイナミックレンジ	読み出し形式
CCD	90 $\mu\text{m}$	300 msec	4桁	時間積分型
ハイブリッドピクセル	170 $\mu\text{m}$	3 msec	6桁	高速連続型



ハイブリッドピクセル  
(Pilatus 6M)

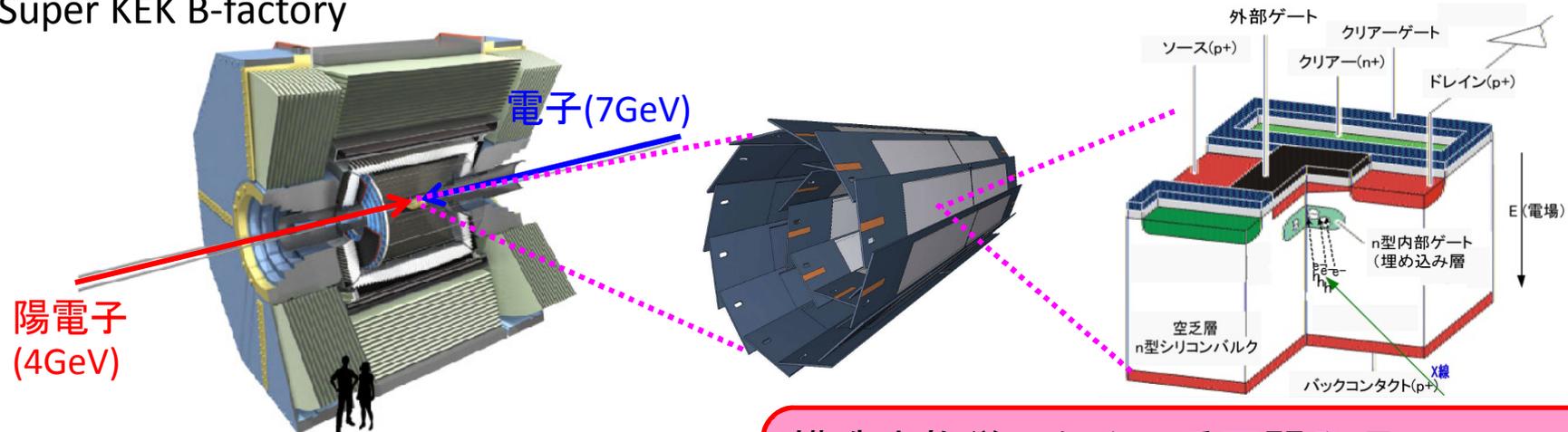
マイクロ・ナノビームに最適化した超高精細ピクセル検出器の開発が急務

# 研究開発目標

検出器	画素数	実効空間分解能	読み出しスピード	ダイナミックレンジ	読み出し形式
CCD	1600万	90 $\mu\text{m}$	300 msec	4桁	時間積分型
ハイブリッドピクセル	600万	170 $\mu\text{m}$	3 msec	6桁	高速連続型
DEPFET	800万	25 $\mu\text{m}$ (4~7倍Up)	20 $\mu\text{sec}$ (高速連続型) (150倍Up)	7桁 (積分型) 大桁数	時間積分型 高速連続型 切り替え可

## DEPFET (DEpleted P-channel FET) ピクセル検出器

Super KEK B-factory



小林・益川ノーベル物理学賞受賞の決め手となった実験のアップグレード計画 (2014運転開始)

### 構造生物学のための重要開発項目

- ① ピクセル小型化(50 $\mu\text{m}$ ⇒25 $\mu\text{m}$ )・大面積化
- ② 1サイクル20 $\mu\text{s}$ で高速連続読み出し

# ① 大型DEPFET開発のための準備研究

小型DEPFETを用いて構造生物学研究に最適な大型DEPFET開発のための準備研究を行う

## ① – I 極小ピクセルによるタンパク質微小結晶からのX線回折像の高精細測定

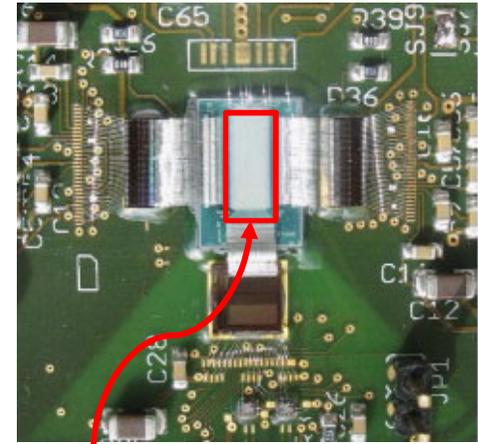
膜タンパク質や超分子複合体など構造生物学上重要な高難度タンパク質の微小結晶からの高精細回折パターン。

## ① – II 高速読み出しによるタンパク質溶液からのX線散乱像の時分割測定

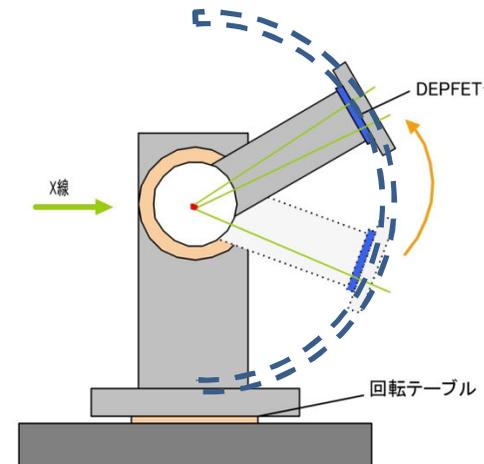
タンパク質フォールディングや光応答など数十 $\mu$ sオーダーでのタンパク質の構造変化を解析。

### 大型DEPFET検出器のためのパラメータ最適化

- 位置分解能、感度とその一様性、およびダイナミックレンジなどの評価
- 従来の検出器との性能比較



性能試験用小型DEPFET検出器  
6.4mm × 0.8mm、**25 $\mu$ m角**:  
256 × 64ピクセル



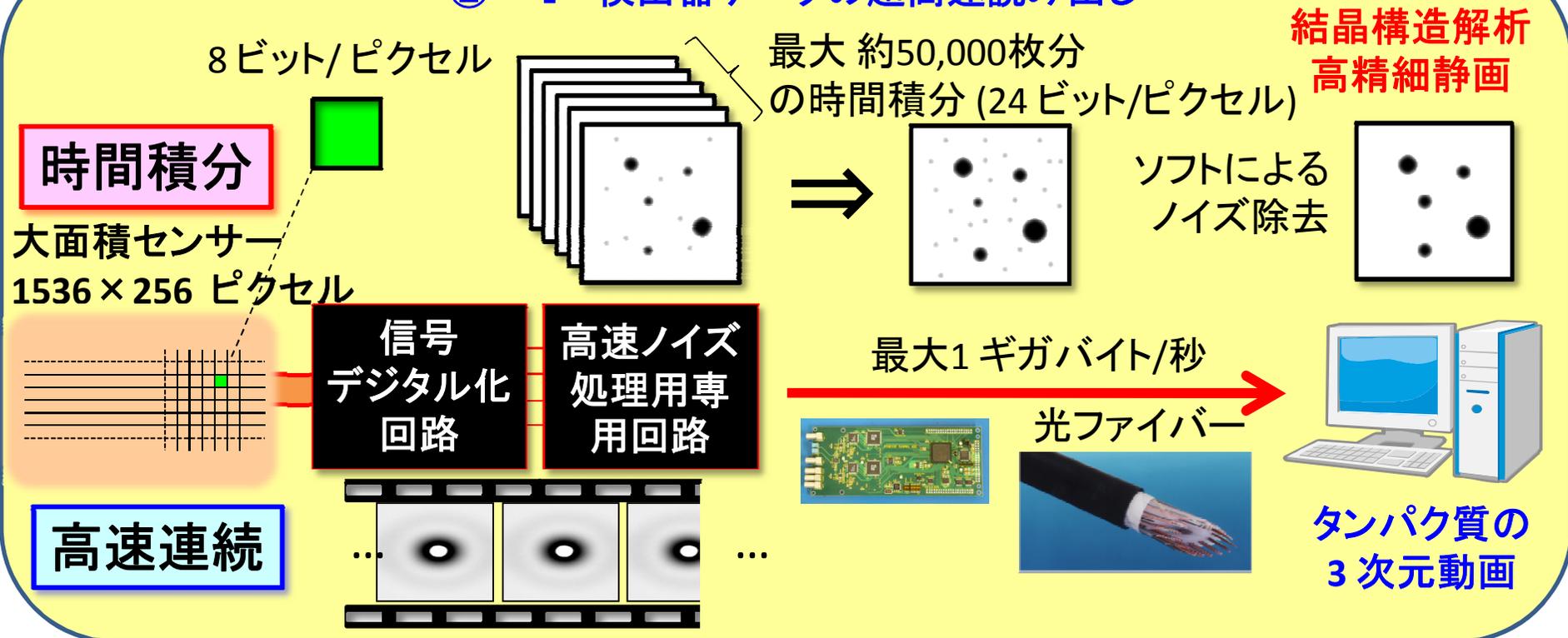
回転ステージと組み合わせること  
で疑似的に大面積測定を実現

# 20マイクロ秒溶液散乱によるサイエンス展開

- 蛋白質の折りたたみ初期過程
  - (現状) msecオーダーで変性状態(ランダムコイル状態)から主鎖構造が大きく収縮したコンパクトな状態が形成。ヘリックスなどの2次構造形成という従来のモデルを覆す結果。その形成機構は全く未解明。
  - (期待される効果) 20マイクロ秒溶液散乱測定により新たな折りたたみ機構の解明が可能に。
- 大面積化による高分解能ダイナミクスの解明
  - (従来) 溶液散乱の高速時分割測定の現状はあくまで小角領域(おおよそ25 Å 分解能)の解析のみ。分子の大きさ、分子量、かなり大きな外形情報のみ
  - (期待される結果) 高角度で一たにより「分子の結合 → ドメインの再配置 → 相互作用状態 → 解離」のダイナミクス

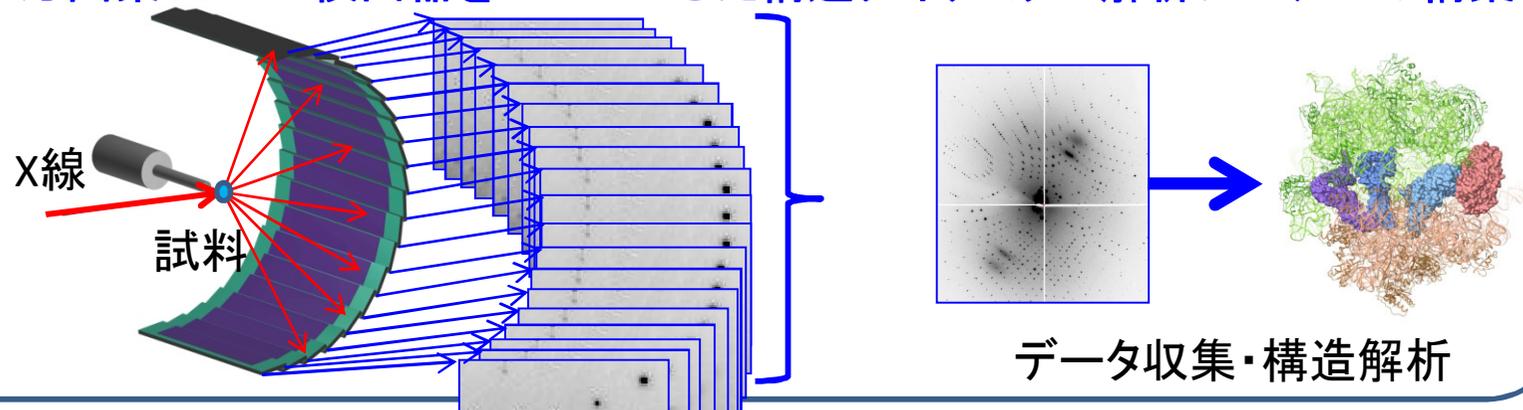
## ② 大型DEPFET検出器の設計・開発

### ②-I 検出器データの超高速読み出し



### ②-II 800万画素DEPFET検出器をベースにした構造ダイナミクス解析システムの構築

DEPFETを20枚シームレスに半筒型に配置し800万画素を実現

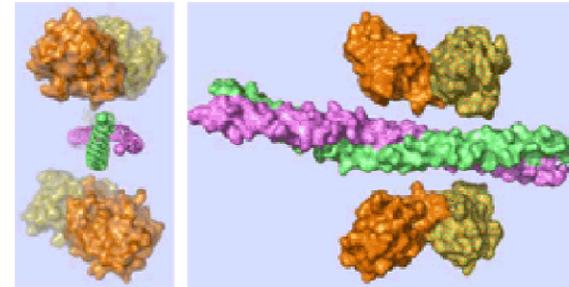


### ③ 構造生物学の新展開

③-I 膜タンパク質・超分子複合体などの結晶構造・ダイナミクス解析

③-II シグナルソームなど結晶化の極めて困難な複合体系のダイナミクス・キネティクス研究を展開

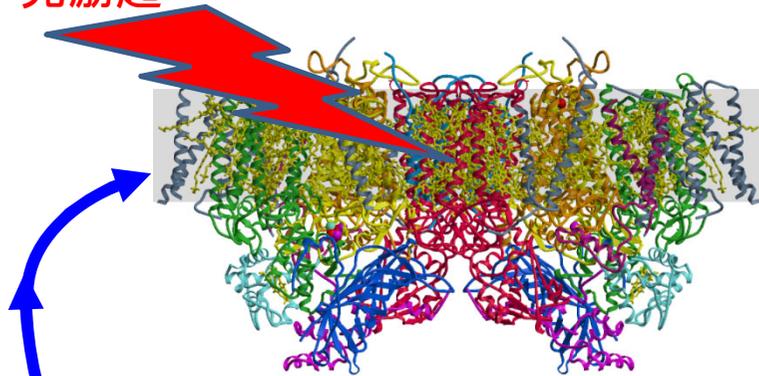
光合成や呼吸鎖において電子の移動を起こす分子の構造機能解析：光励起ダイナミクス



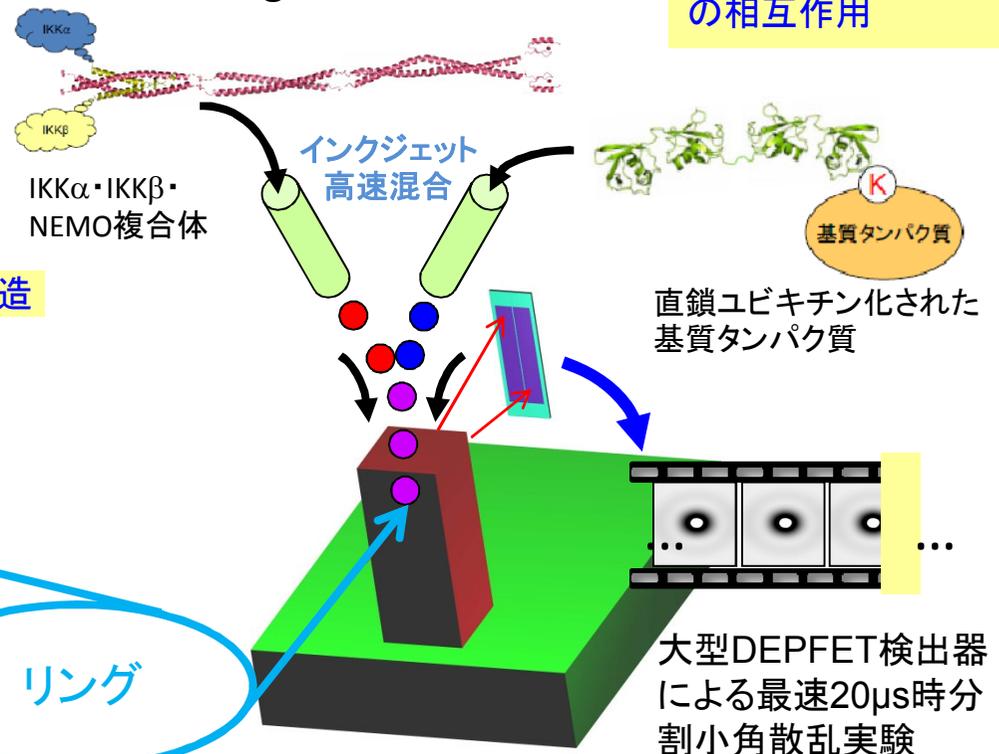
Rahighi et al. Cell, 2009

炎症反応や細胞死(アポトーシス)の抑制、がん細胞増殖などに関わるNF-kBシグナル伝達系NEMOタンパク質とユビキチンの相互作用

光励起



光のエネルギーで水を分解し電子の流れを作る構造

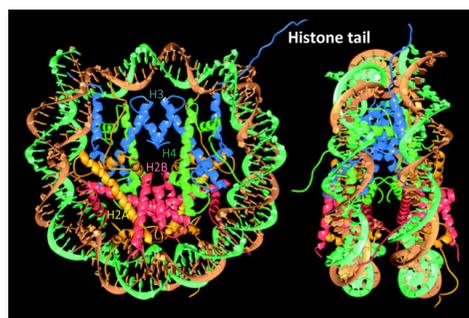


リング

光励起

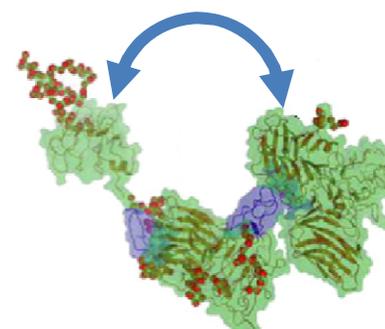
# まとめと展望

- サブミクロンビーム、短パルスX線ビームによる生命素子アトミックイメージング研究⇒原子座標ダイナミクスを生命動態システム科学と組み合わせて構造生命科学へ
- 1MHz XFEL-Oを使ってナノクリスタルから1日数千データセット(構造)収集の可能性?
- DEPFET: 素粒子物理学分野の最先端の測定技術を構造生物学に応用し、最高性能の検出器システムを構築することで構造生命科学研究を新展開
- XPCSへの応用



ヌクレオソーム超分子複合体の  
結晶構造⇒エピジェネティクス

翻訳後修飾の認  
識分子との超分  
子複合体の結晶  
化はさらに困難



シグナルソームなど複合体系の溶  
液中のドメイン間、複合体離合集  
散ダイナミクス、キネティクス

# KEK-PF 構造生物学研究センター

構造生物学

若槻壮市 センター長 (教授)

ビームライン & ロボティクス

加藤龍一 (准教授)

川崎政人 (助教⇒准教授 (5/1))

伊原健太郎 (ポスドク研究員)

工藤紀雄 (ポスドク研究員)

牧尾尚能 (ポスドク研究員)

Simin Rahighi (ポスドク研究員)

岡崎誠司 (ポスドク研究員)

Simon Miller (ポスドク研究員)

鈴木博紀 (ポスドク研究員)

上島珠美 (研究員)

青木民枝 (研究補助員)

太田智弥 (研究補助員)

総合研究大学院大学

大久保健

中村健介

松井拓人

東京大学

メディカル

ゲノム専攻

櫻井哲也

五十嵐教之 (准教授) X線ビームライン全般

清水伸隆 (特別准教授) SAXS

平木雅彦 (研究機関講師) ロボティクス

松垣直宏 (助教) BL-5, BL1

山田悠介 (助教) AR-NE3, BL17

Leo Chavas (助教) AR-NW12

笹島久美子 (研究補助員)

渡部正景 (研究補助員)

出村一貴 (研究補助員)

久保田孝幸 (研究補助員)

内藤眞志 (研究補助員)

田邊嶺 (研究補助員)

青木直哉 (研究補助員)

川崎健一 (研究補助員)

黒屋 浩太郎 (研究補助員)

小澤 雅司 (研究補助員)

秘書 銭谷智子 海老沢律子 鮭川理恵子 石川銀