

播磨科学公園都市



↓ X線自由電子レーザー施設
SACLA

シンクロトロン棟→

線型加速器棟→

SPring-8
蓄積リング棟↓

大型放射光施設 SPring-8

タンパク質結晶解析ビームライン利用のご案内

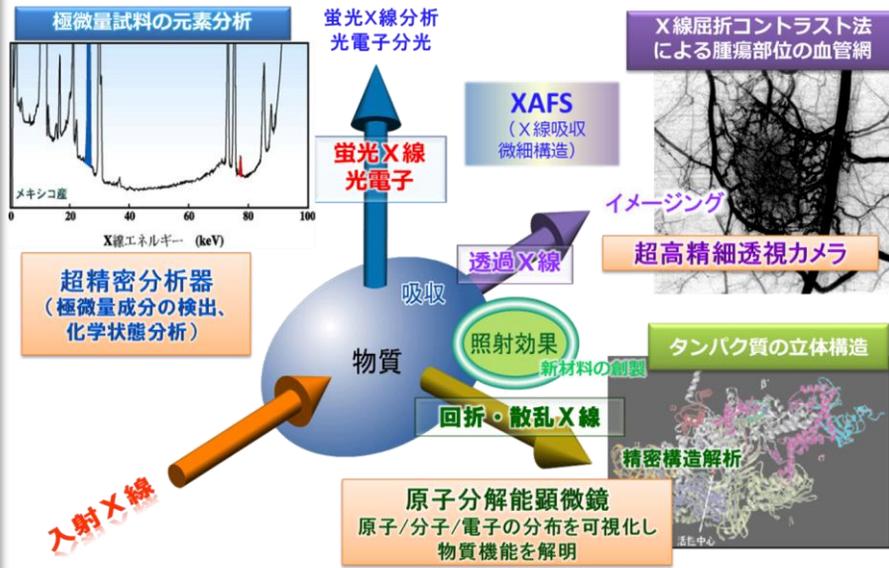
SPring-8は、兵庫県の播磨科学公園都市にある世界最高性能の放射光を生み出す大型施設です。

放射光は、ほぼ光速で運動する電子の進行を磁石により曲げた時に発生する細く強力な電磁波(光)で、ナノテクノロジー、バイオテクノロジーや産業利用など幅広い研究に利用できます。

SPring-8は国内外の産学官の研究者等に放射光を提供する共同利用施設です。課題申請手続きを行い、採択されれば、誰でも利用することができます。

SPring-8の施設者は国立研究開発法人理化学研究所で、施設の運転・維持管理・高性能化などの研究開発、並びに利用促進業務は公益財団法人高輝度光科学研究センター(JASRI)が行っています。

放射光と物質の相互作用と利用例



放射光を様々な実験に利用するため、SPring-8には約60本のビームラインがあります。JASRIは、利用支援業務として、共用ビームラインでのビームライン利用のための

情報提供、技術支援、調査研究などを行い、利用者を支援しています。

タンパク質結晶構造解析の利用支援について、今回ご紹介させていただきます。

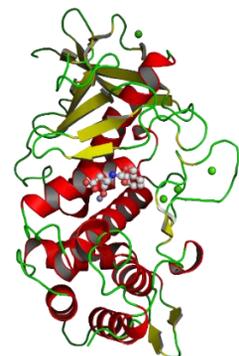
タンパク質結晶解析ビームライン



タンパク質の結晶
(写真はサーモリシン)



タンパク質結晶解析ビームライン
(写真はBL41XU)



タンパク質の立体構造
(モデルはサーモリシン)

タンパク質の結晶は、高純度に精製したタンパク質を用い、タンパク質の結晶化条件を探索し得られます。得られた結晶に、放射光の強力X線を当て、結晶構造解析のための回折写真を撮るのが放射光ビームラインの役割です。得られた回折写真から、立体構造の決定に必要な電子密度の情報が得られます。

JASRI 共用課題の申請

年度ごとに2回、新規課題募集を行っています(※)。主な課題の種類は以下です。課題申請を行い、審査を通過すれば、放射光利用実験を行うことができます。審査手続きにつきましては、SPring-8 UIサイト(<https://user.spring8.or.jp/>)をご覧ください。タンパク質結晶解析ビームラインのビームタイム運用につきましては、タンパク質結晶解析推進室HP (<http://bioxtal.spring8.or.jp/>)も併せてご参照ください。

※今年度は新型コロナウイルスの影響による実験停止期間の影響を受けまして、2020年B期はA期の追加募集の形で対応を予定しております。最新の情報は、SPring-8 HP <http://www.spring8.or.jp/> をご確認ください。)

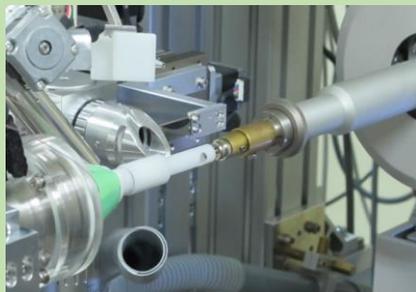
課題の種類	概要	ビーム使用料 (税込)
一般課題 (成果非専有)	放射光を利用した一般的な研究全般を対象とする課題。 タンパク質結晶解析ビームラインでは、年2回の課題募集のうち、 年5回程度 ビームタイム配分調査を行います。	免除 (成果公開が必須) (※※)
一般課題 (成果専有)	成果非公開研究を対象とする課題。 タンパク質結晶解析ビームラインでは、一般課題(成果非専有)に 先んじて 、年2回課題募集、 年5回 ビームタイム配分調査を行います。	120,000円 / 2時間
成果公開 優先利用課題	国内で公開された形で明確な審査を行う競争的資金を得た方が申請可能な課題。一般課題のビームタイム枠のうち、規定の上限のシフト数まで優先的に利用することができます。	32,750円 / 2時間 (※※)
成果専有 時期指定利用課題	随時申し込み可能で、速やかに審査が行われる課題。利用可能な時期については、予め利用予定のビームラインの担当者にご相談ください。	180,000円 / 2時間
大学院生 提案型課題	将来の放射光研究を担う人材の育成を図ることを目的とし、大学院生が主体的に立案、提案、遂行することを奨励する課題です。	免除 (成果公開が必須) 旅費支援制度あり

※※消耗品実費負担額として、2,680円 / 2時間をお願いしております。

タンパク質結晶解析ビームラインの利用技術

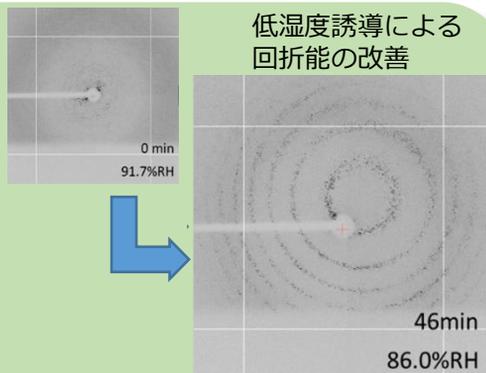
JASRI タンパク質結晶解析推進室では、一般的な回折測定だけではなく、新しい測定技術の開発と運用を行い、タンパク質結晶解析の利用価値を拡大し、成果の拡大を目指しています（以下は一例）。

HAG法：非凍結マウント 試料の調湿，調温（4 - 20 °C）



放射光実験で一般的である結晶凍結を行わず、タンパク質結晶を加湿により保持します。調湿を用いた温和な脱水による分解能の改善や、凍結の際の損傷軽減につながる場合があります。凍結には代替機構が利用できます。

非凍結結晶への様々な条件変化（湿度、温度等）を実現するための開発を行っています。（使用ビームライン：BL26B1他）



結晶化プレート回折測定 結晶に触れずに測定



結晶が析出した結晶化プレートを直接マウントすることで、結晶本来の回折能を評価できるようになりました。

取り出すことの難しい不安定な結晶や、底面に張り付いた結晶、プレート上の多数の結晶の回折能評価に適しています。

SBS規格の結晶化プレートに対応しています。振動角が限られますが、複数結晶からのデータをマージしてデータセットを作ることも可能です。

（使用ビームライン：BL26B1）



多軸ロボットによる
プレート自動交換

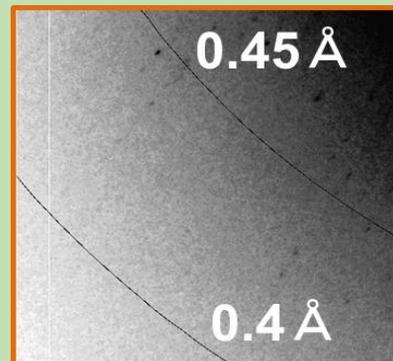
高エネルギーX線（波長0.35~0.6Å） 超高分解能（ $d < 0.8\text{\AA}$ ）データ測定など



タンパク質結晶の回折測定で使用される波長よりも、さらに短い波長での回折測定を行うことで、通常の波長で同定できない種類の重金属原子を結晶構造中で検出したり、超高分解能の回折データの測定が可能です（右は回折写真の例）。

装置切り替えのため、利用時期が限定される場合があります。希望の際は事前にご相談下さい。

（使用ビームライン：BL41XU）



Hirano et al. *Nature* (2016)

自動測定 来所せずに測定



ループで捌き凍結した結晶を、Uni-Puckに装填し、ドライシッパーにてHDDとともに送付してください。測定シートに記載いただいた条件で、自動的に回折データを収集し、返送します。裏面の紹介もあわせてご覧ください。

（使用ビームライン：BL45XU他）

そのほか、結晶化試料の調製から、結晶化、ビームライン技術、データ測定、構造解析まで、タンパク結晶のことならどうぞご相談ください。

新型コロナウイルスの影響により、ビームタイム利用についてご不便をおかけしております。

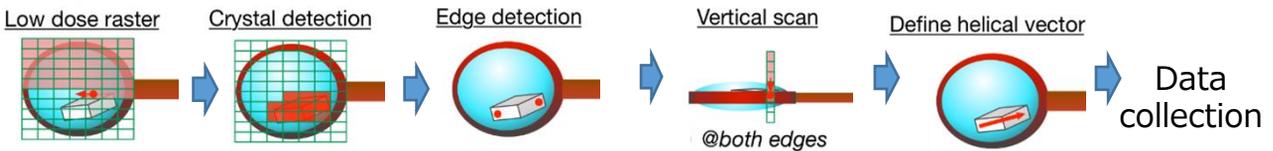
今後の対応等、最新の情報は推進室HP <http://bioxtal/spring8.or.jp/> でご確認ください。

自動測定の利用が始まっています

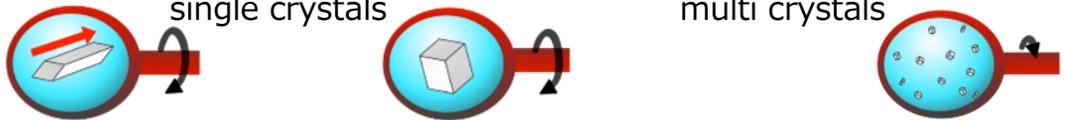
測定技術

(ZOO system, Hirata et al., (2019) Acta Cryst. D75, 1–13.)

- ・ ループ検出後にLow doseのX線で走査し、回折情報からセンタリングしデータ測定を実施



- ・ 測定スキームは結晶の形に応じてご指定下さい。以下の3つが選べます。



Scheme	Helical	Normal	Small Wedge	
Experiment condition @ Spring-8 BL45XU				
Number of pins	78 pins/ 7 pucks	128 pins/ 8 pucks	73 pins/ 6 pucks	
Measurement Parameter	Raster Scan	Typical scan area : 250 x 200 μm^2 400 x 300 μm^2	Typical scan area : 250 x 200 μm^2 300 x 250 μm^2 550 x 450 μm^2	Typical scan area : 600 x 550 μm^2 800 x 700 μm^2 1000 x 800 μm^2
	Data Collect	$\Delta \Phi = 0.1 \text{ deg. / fr.}$ Total $\Phi = 360 \text{ deg.}$	$\Delta \Phi = 0.2 \text{ or } 0.5 \text{ deg. / fr.}$ Total $\Phi = 360 \text{ deg.}$ * Includes helical mode 9 pins	$\Delta \Phi = 0.1 \text{ deg. / fr.}$ Total $\Phi = 10 \text{ deg.}$
Beam size	20 x 20 μm^2	20 x 20 μm^2	10 x 10 μm^2	
Typical crystal size	200 μm in length	50 – 150 μm	5 – 20 μm (Membrane protein - LCP)	
Time Required				
Total Exp. Time	6 hr 49 min (raster 78 pins, data collect 77 pins)	8 hr 13 min (raster 128 pins, data collect 121 pins)	11 hr 19 min (raster 73 pins, data collect 64 pins)	
Av. Exp. Time / sample	5 min 15 sec	3 min 51 sec	8 min 23 sec	

Automatic data processing by KAMO (XDS) (KAMO, Yamashita et al., (2018) Acta Cryst. D74, 441–449.)

P)rocessed	77 sets	121 sets	940 sets (small wedges to merge)	pins, data sets, [outer shell]
	Indexing failed: 1 set, Complete (compl. > 90%): 76 sets	Indexing failed : 5set, Complete (Compl. > 94%): 116 sets		Resolution, Completeness, CC1/2, and I / Sigma (I)
	Beyond 2.5 Å 36 datasets	Beyond 2.0 Å 33 datasets	Sample A: 30, 287, 1.92 Å, 99.6%, 57.2, 1.56	
	3.0 - 2.5 Å 35 datasets	3.0 - 2.0 Å 25 datasets	Sample B: 23, 446, 2.04 Å, 99.8%, 83.2, 1.42	
	Low resolution 5 datasets (12.4 - 3.8 Å)	Low resolution 58 datasets (9.17 - 3.03 Å)	Sample C: 9, 190, 4.78 Å, 99.8%, 64.0, 1.94	Sample D: 2, 17, Processing was not possible due to a small number of data sets

※2019年度に成果専有課題で実施された自動測定の実例です

※照射 X 線の強度は測定条件から放射線損傷を考慮して自動的に選択されます

ご利用いただいた成果 (～2020年6月17日)

- Yu, J. et al., (2020) *Science* **368** (6489), 428 – 433. PDB ID: 6W25.
- Wu, F. et al., (2020) *Nat. Commun.* **11**, 1272. PDB ID: 6LN2.
- Omahdi, Z. et al., (2020) *J. Biol. Chem.* **295** (17), 5807 – 5817. PDB ID: 6LKR.
- Minato, T. et al., (2020) *FEBS Open Bio* (Accepted). PDB ID: 6KLP.
- Watanabe, Y. et al., (2020) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in Press). PDB ID: 7BYW.

自動測定を用いた新型コロナウイルス感染症関連研究の支援を実施しています

http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2020/200407/

詳細についてはタンパク質結晶解析推進室ホームページをご参照下さい

http://bioxtal.spring8.or.jp/wiki/ja/auto_measurement

お問い合わせはPXBL@spring8.or.jpまで