学位論文題名

Development of a Two-Dimensionally Tunable
Focusing Monochromator for Protein
Crystallography at High-Energy Undulator Beamlines

(高エネルギーアンジュレータビームラインにおけるタンパク結晶構造解析の
ための波長可変型二次元集光モノクロメータの開発)

学位論文内容の要旨

生命科学の諸分野において構造生物学の果たす役割は大きい。構造生物学の基礎となるのは、生命活動を担う物質の精密な三次構造である。近年の DNA 塩基配列決定法の進歩は、きわめて興味深い機能を持つ多くのタンパク質の一次構造決定を可能にした。その三次構造がそれぞれ決定されれば、その機能解明にきわめて有力な手がかりとなる。しかしながら、現状における三次構造の決定数は、一次構造の決定数に対して 50 分の 1 以下であり、その差は開く一方である。

タンパク質の三次構造を決定するためにもっとも有力な方法は、X線による結晶構造解析である。しかしこの方法は、解析に長い時間を要するという点で、より迅速により多くの三次構造決定を願う構造生物学の立場からは決して満足のいくものではない。これまで解析時間を長引かせてきた最大の原因は、既存の手法で解析可能な大きさと結晶性を備えたタンパク質結晶の調製が容易ではないことにある。従来解析可能な結晶の大きさの限界は 0.1 mm とされてきたが、それは主に、十分な強度で利用可能な入射X線のエネルギーが低く制限されてきたことによっている。すなわち従来は 20 keV 程度までであった利用可能なX線エネルギーを 40 keV まで拡張できれば、結晶によるX線の吸収が減少し、結晶のX線損傷を低減させることができる。また結晶やそれを取り巻く結晶化溶媒、ガラスキャピラリなどによるX線の吸収に起因した回折強度測定データの系統誤差が取り除かれ、異常分散データや同型置換データの質を向上させることができる。さらに、重原子置換法に適用可能な重原子の範囲をカドミウムやヨウ素まで拡張することによって重原子置換体の選択に幅ができ、位相決定がより容易になると期待される。

近年、第三世代放射光施設と呼ばれる施設が相次いで建設されている。これらの施設では、アンジュレーターとよばれる挿入光源によって、既存の実験室系X線発生装置や放射光源よりも遥かに高輝度なX線を作り出す事ができる。日本でも SPring-8 と呼ばれる第三世代放射施設が作られている。この施設に設置されたアンジュレーターは 6 - 40 keV の高輝度X線を発する。この内 20 keV 以上の高エネルギーX線を利用すれば、X線損傷を特に受けやすい数十ミクロン程度のタンパク質微小結晶の構造解析を行うことができる。

X線の集光には、通常全反射ミラーか彎曲モノクロメータが用いられる。しかし、40 keV までの高エネルギーX線を全反射ミラーで集光するためには、1メートルを超える巨大なミラーを数キロメートルに及ぶ曲率半径で 0.1 ミクロン以下の精度で湾曲させなければならない。一方シリコンに代表される完全結晶モノクロメータを集光素子として利用する場合には、その長さや曲率半径を小さく押さえる事ができる。しかしながらこれまで

に、偏向電磁石の発する発散角の大きな放射光を集光するために開発されたサジタル集光モノクロメータは、発散角の小さなアンジュレーター放射光には適用できない。そこで本研究では、数十マイクロンまでのタンパク質微小結晶解析を目的として、SPring-8 アンジュレーターの発する高エネルギーX線を有効に集光できる新しい二次元彎曲モノクロメータの開発を行った。

通常、周辺を固定されていない薄板を小さな曲率半径で一方向に湾曲させると、それに直交する方向に、二次元集光に必要な向きとは逆に、鞍状の“そり”が発生する。本研究で開発したモノクロメータは、大きさ 40 mm × 100 mm、厚さ 0.5 mm のシリコン板をテーブル型に切り出した銅ブロックの表面に接着したものであり、周辺部の固定により鞍状の“そり”を小さく押さえることを意図している。また、テーブルの 4 本の足の間隔を広げることによって、水平、鉛直方向の曲率半径を独立に変化させてX線の二次元集光を実現させるものである。

本研究ではまず、有限要素法のプログラム ANSYS によるシミュレーションを行い、上記のシリコン板とテーブル型銅ブロックの組み合わせによって、シリコン板を水平、鉛直の二方向独立に円形に湾曲できる可能性を検討した。

次に、回転対称極型X線発生装置から得られる Mo K α_1 ($\lambda = 0.7093 \text{ \AA}$)線を利用して、本モノクロメータの水平方向における曲率変化の自由度とその再現性を実際に確認した。その結果、水平方向の曲率半径は 61 m から無限大まで変化し、その再現性も良好であることが判明した。鉛直方向の曲率変化の自由度とその再現性は、三次元形状測定器によって検定された。その結果、鉛直方向の曲率半径は 0.54 m から無限大まで変化し、その再現性も良好であることが確認された。これらの曲率変化の自由度と再現性は、タンパク質結晶解析用モノクロメータに要求される波長可変性を実現する上で必須のものである。

続いて本モノクロメータの集光特性を、高エネルギー物理学研究所の放射光実験施設 (PF)において、37.7 keV の高エネルギーX線を利用して検討した。その結果、大きさ 0.80 mm (水平方向) × 0.37 mm (鉛直方向)の光源から発せられる放射光を 0.2 mm × 0.3 mm まで集光する事に成功した。集光X線のピーク強度は集光しない場合の 21 倍に達し、本モノクロメータにより 40 keV までの高エネルギーX線が実際に高強度化されることが証明された。

本モノクロメータによって作り出された集光X線の発散角は、水平方向 0.003°、鉛直方向 0.014°であり、そのエネルギー分解能は 2×10^{-3} である。この集光X線を利用して卵白リゾチーム結晶の回転写真を撮影した。その結果、分解能 1.65 Å までの回折点を明瞭に確認することができ、本モノクロメータが、タンパク質結晶解析用として優れた性能を有することが実証された。

Spring-8 アンジュレーターと本モノクロメータの組み合わせによって得られる高エネルギーX線の強度は、PFの偏向電磁石から得られるものの 10^5 倍にも及ぶと予想される。この高強度・高エネルギーのX線を利用すれば、従来は測定不能であった数十マイクロン程度の微小結晶からでも、十分に解析可能な回折強度データを収集することができる。これまで多くの構造生物学者が結晶作成に挑戦し、その結晶化には成功しても、大きさが 0.1 mm に満たないという理由で解析を断念せざるを得なかったタンパク質の種類は多く、本モノクロメータの開発が今後の構造生物学に及ぼす影響には多大なものがあると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 引 地 邦 男
副 査 助 教 授 中 川 敦 史

学 位 論 文 題 名

Development of a Two-Dimensionally Tunable Focusing Monochromator for Protein Crystallography at High-Energy Undulator Beamlines

(高エネルギーアンジュレータビームラインにおけるタンパク
結晶構造解析のための波長可変型二次元集光モノクロメータの開発)

生命科学の諸分野において構造生物学の果たす役割は大きい。構造生物学の基礎となるのは、生命活動を担う物質の精密な三次構造である。タンパク質の三次構造を決定するためにもっとも有力な方法は、X線による結晶構造解析である。しかしこの方法は、解析に長い時間を要し、より迅速により多くの三次構造決定を願う構造生物学の立場からは決して満足のいくものではない。これまで解析時間を長引かせてきた最大の原因は、既存の手法で解析可能な大きさと結晶性を備えたタンパク質結晶の調製が容易ではないことにある。従来解析可能な結晶の大きさの限界は0.1 mmとされてきたが、それは主に、十分な強度で利用可能な入射X線のエネルギーが低く制限されてきたことによっている。すなわち従来は20 keV程度までであった利用可能なX線エネルギーを40 keVまで拡張できれば、結晶によるX線の吸収が減少し、結晶のX線損傷を低減させることができる。

近年、第三世代放射光施設と呼ばれる施設が相次いで建設されている。これらの施設では、アンジュレーターとよばれる挿入光源によって、既存の実験室系X線発生装置や放射光源よりも遥かに高輝度なX線を作り出す事ができる。日本でもSPring-8と呼ばれる第三世代放射施設が作られている。この施設に設置されたアンジュレーターは6-40 keVの高輝度X線を発する。この内20 keV以上の高エネルギーX線を利用すれば、X線損傷を特に受けやすい数十マイクロン程度のタンパク質微小結晶の構造解析を行うことができる。X線の集光には、通常全反射ミラーか彎曲モノクロメータが用いられる。しかし、40 keVまでの

高エネルギーX線を全反射ミラーで集光するためには、1メートルを越える巨大なミラーを数キロメートルに及ぶ曲率半径で0.1ミクロン以下の精度で湾曲させなければならない。一方シリコンに代表される完全結晶モノクロメータを集光素子として利用する場合には、その長さと同曲率半径を小さく押さえる事ができる。しかしながらこれまでに、偏向電磁石の発する発散角の大きな放射光を集光するために開発されたサジタル集光モノクロメータは、発散角の小さなアンジュレータ放射光には適用できない。そこで本研究では、数十ミクロンまでのタンパク質微小結晶解析を目的として、Spring-8アンジュレータの発する高エネルギーX線を有効に集光できる新しい二次元彎曲モノクロメータの開発を行った。

本研究で開発したモノクロメータは、大きさ40mm x 100mm、厚さ0.5mmのシリコン板をテーブル型に切り出した銅ブロックの表面に接着したものであり、周辺部の固定により鞍状の"そり"を小さく押さえることを意図している。また、テーブルの4本の足の間隔を広げることによって、水平、鉛直方向の曲率半径を独立に変化させてX線の二次元集光を実現させるものである。本研究ではまず、有限要素法のプログラムANSYSによるシミュレーションを行い、上記のシリコン板とテーブル型銅ブロックの組み合わせによって、シリコン板を水平、鉛直の二方向独立に円形に湾曲できる可能性を検討した。次に、本モノクロメータの水平方向、鉛直方向の曲率変化の自由度とその再現性を実際に確認した。その結果、曲率半径は水平方向では、61mから無限大まで、鉛直方向では0.54mから無限大まで変化し、その再現性も良好であることが確認された。これらの曲率変化の自由度と再現性は、タンパク質結晶解析用モノクロメータに要求される波長可変性を実現する上で必須のものである。続いて本モノクロメータの集光特性を、高エネルギー物理学研究所の放射光実験施設(PF)において、37.7 keVの高エネルギーX線を利用して検討した。その結果、大きさ0.80mm(水平方向) x 0.37mm(鉛直方向)の光源から発せられる放射光を0.2mm x 0.3mmまで集光する事に成功した。集光X線のピーク強度は集光しない場合の21倍に達し、本モノクロメータにより40 keVまでの高エネルギーX線が実際に高強度化されることが証明された。この集光X線を利用して卵白リゾチーム結晶の回折写真を撮影した。その結果、分解能1.65 Åまでの回折点を明瞭に確認することができ、本モノクロメータが、タンパク質結晶解析用として優れた性能を有することが実証された。Spring-8アンジュレータと本モノクロメータの組み合わせによって得られる高エネルギーX線の強度は、PFの偏向電磁石から得られるものの 10^5 倍にも及ぶと予想される。この高強度・高エネルギーのX線を利用すれば、従来は測定不能であった数十ミクロン程度の微小結晶からでも、十分に解析可能な回折強度データを収集することができる。

本研究は第三世代放射光施設の高エネルギーX線を有効に集光できる新しい二次元彎曲モノクロメータの開発に関するものである。本モノクロメータの開

発が今後の構造生物学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分な資格があるものと認めた。