

# タンパク質結晶構造解析とX線の波長

復習の便宜のため公開しています。渡邊がどこかから借りて来た画像もあるので、印刷は出来ませんが、画像のカット・ペーストには制限がかかっています。

名古屋大学  
小型シンクロトン光研究センター  
大学院工学研究科化学・生物工学専攻

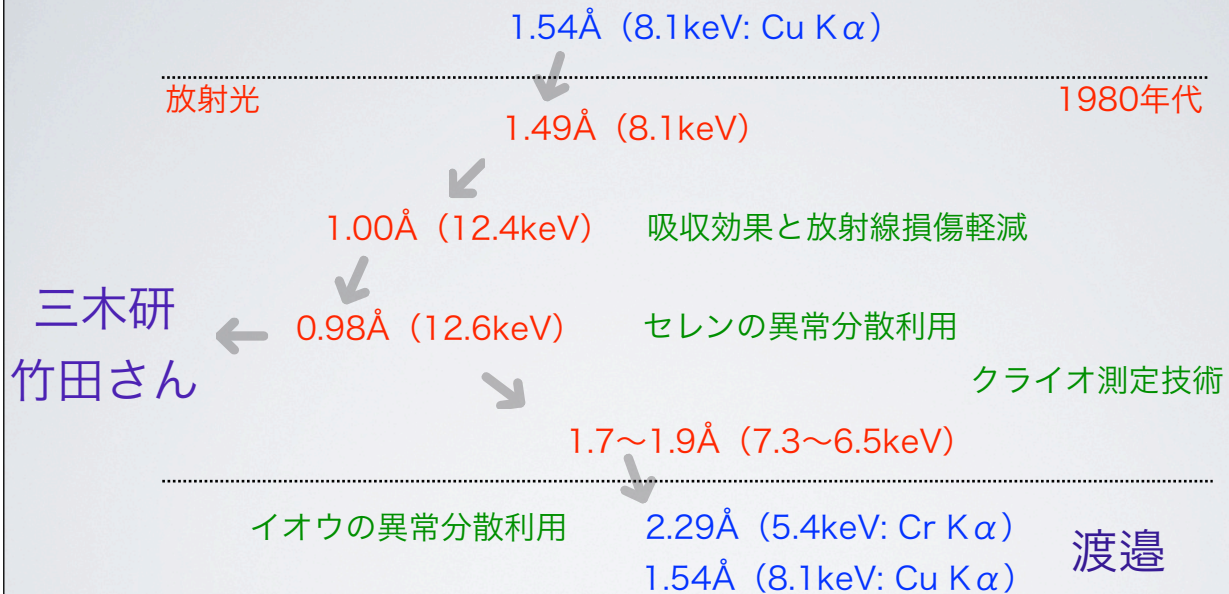
渡邊 信久

今日は、名古屋大学の渡邊です。

「タンパク質結晶構造解析とX線の波長」というタイトルで、講義をしたいと思います。実は、昨年(一昨年度)もやったのですが、出席者はほとんど三木研の学生だろうと、ちょっと勘違いしていて失敗しました。

今年は、半分くらいは三木研以外の人も居るかなと思って、準備をして来たのですが、どうでしょうか。...

# 「波長」の歴史



さて、X線結晶構造解析ですから、もちろんX線が使用されます。その際、どういう波長のX線を使うでしょうか。あるいは使えばいいでしょうか、というのが今日の話題です。最初に少し理屈があって、後半は、そのための装置とかの工夫を紹介しようと思います。

「X線の波長」ですが、実は、ちょっと前までは、あまり選択の余地はありませんでした。蛋白研の中川さんの講義でシンクロトロン放射光については、既に紹介されていると思いますが、その放射光が使われるようになったのは1980年代です。ちょうど皆さんが生まれたころです。

放射光が登場し、自由に使用出来るようになるまで、蛋白質結晶構造解析に使用されるX線の波長は、まず1.54Åでした。それが、放射光によって、使用する波長に自由度が出来たのですが、その後の歴史は、およそこんな感じではないかと思います。

「自由」があっても、人間は保守的なので、最初は1.54Åから離れることは出来ませんでした。そのうち、短い波長(つまり高エネルギー)の方がX線が吸収されないし、結晶にもダメージを与えないという主張で、短波長側にぶれ、区切りもいい1Åが使われ、さらに、これも中川さんの話にあったかも知れないセレン原子の利用で0.98Åが流行します。これよりもっと短い波長を竹田さんが使われています。

一方で、クライオ技術が発展して、結晶を液体窒素温度近くで凍結して測定することが主流になって、結晶のダメージが軽減されるようになって、ちょっと長めの波長も使い易くなって来ました。私の場合は北大に居たころ、2.29ÅのX線を使うことを(放射光ではないですが)始めました。

今日の話は、この「長め」の波長のX線のお話です。

# (蛋白質)結晶構造解析に使用されるX線

## X線回折と波長の関係

$$2d\sin\theta = \lambda$$

$$(2d_{hkl}\sin\theta_{hkl} = \lambda)$$

さて、X線回折と波長の関係という、この式をご存知でしょう。三木先生の授業で、もしかしたら()のように習ったかも知れません。

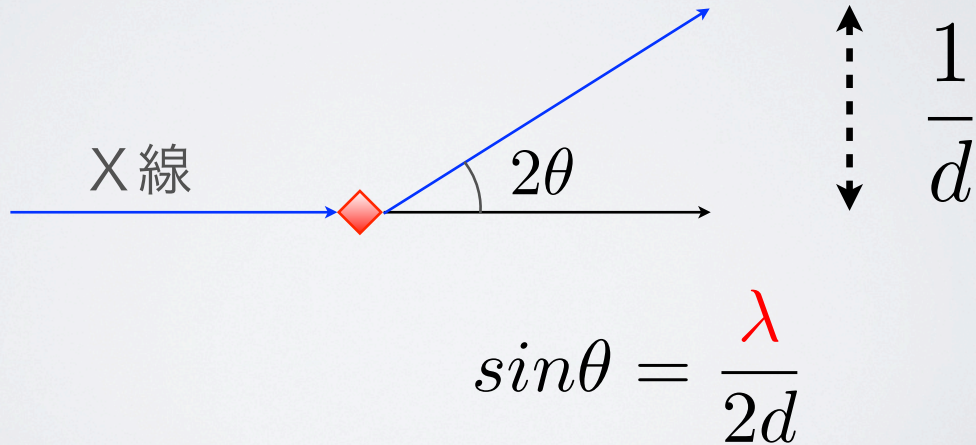
何ていう関係式?

Braggの式ですよね。これは三木研でなくても大丈夫と思います。



# 波長の意味

$$2d\sin\theta = \lambda$$



Braggの式に戻ります。この式は、この図のように、結晶にX線が入射した時の、回折X線の方  
向を説明しています。

ある波長のX線が入射した時に、結晶中の周期構造の間隔によって回折するX線の角度が変  
ります。書き直ただけですが、こうですから、波長が長くなると回折イメージは広がり、波長が  
短くなると狭まります。

このことも後でちょっとだけ問題にします。

# 波長の意味

$$2d\sin\theta = \lambda \text{ だけか?}$$

さて、波長に関する関係式は、このBraggの式だけでしょうか。

他に何か知っていますか？

# 波長の意味

$$2d\sin\theta = \lambda \text{ だけか?}$$

X線回折強度は  $\lambda^2$  に比例する

$$I \propto t^3 \lambda^2 \exp(-\mu t)$$

UW Arndt, *J. Appl. Cryst.* (1984) 17, 118-119

他には、例えば、こんな関係もあります。

もしかしたら、三木研の学生さんたちは、輪読でBlundel & Johnsonの教科書を読んでいるかも知れません。あれには $\lambda$ の3乗の式が書いてあります。

蛋白質結晶のような、あまり高角まで回折しない結晶の場合、近似的には、まあ2乗です。ということは波長が長いほど、その2乗に比例して回折X線は強いということになります。

# 波長の意味

$$2d\sin\theta = \lambda \text{ だけか?}$$

X線の吸収は  $\lambda^3$  に比例する

$$\mu \simeq a\lambda^3$$

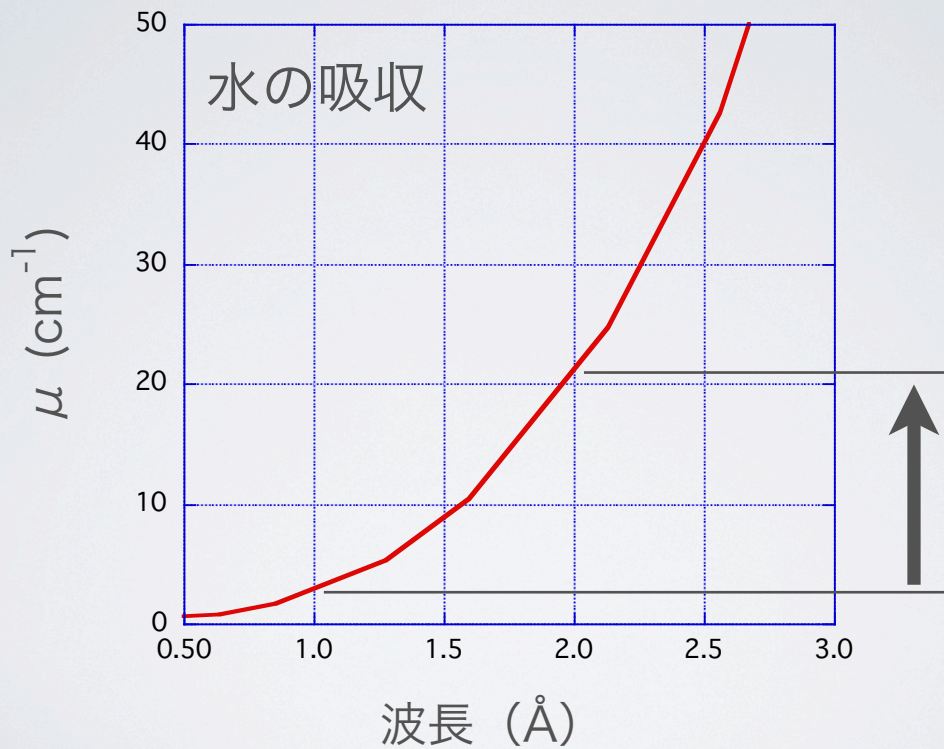
$$a = 0.22\text{mm}^{-1}\text{\AA}^{-3}$$

しかし、実は、X線の吸収も $\lambda$ の3乗で増加します。

ということは、長い波長のX線を使うと、結晶自身で回折X線も吸収されて出て来なくなってしまします。



# X線の吸収は $\lambda^3$ に比例する



これは水の吸収の例ですが、使用するX線の波長が1Åから2Åに2倍になると、吸収係数は8倍になってしまいます。



# 波長の意味

$$I \propto t^3 \lambda^2 \exp(-\mu t)$$

$$\lambda = \sqrt[3]{\frac{2}{3at}}$$

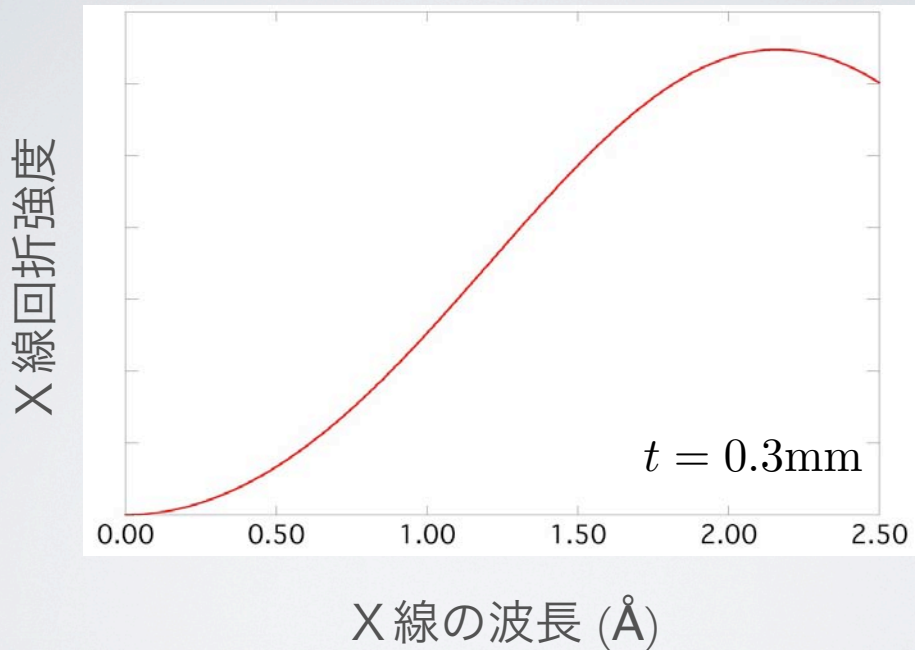
$$a = 0.22 \text{mm}^{-1} \text{\AA}^{-3}$$

Arndt, U.W., *J. Appl. Cryst.* (1984) 17, 118-119

今みたように、蛋白質結晶のような場合、積分反射強度(回折強度)は、波長の2乗で増加しますが、X線の吸収係数も波長の3乗で増加します、両方を考えるとどこかに極大があります。極大になる波長は、こうなります。

これを実際に 0.3mmの厚さの結晶で計算してみると、

$$I \propto t^3 \lambda^2 \exp(-\mu t)$$



Arndt, U.W., *J. Appl. Cryst.* (1984) 17, 118-119

X線の吸収係数も波長の3乗で増加しますから、もしも結晶の厚さが0.3mm程度だと、2.16Å程度の波長のX線を使用した時が積分反射強度が最大になります。じゃあ、2Åくらいの波長を使うと良いのか、というと、実はそう単純ではありません。

何が問題でしょう？

さっきも見たように、長波長のX線は、物質との相互作用が大きいので、実は測定値の吸収による誤差が無視できなくなってくるのです。これも後で議論します。

前置きが長くなりましたが、ではいったいどの波長を使用すると本当に良いのか(あるいは、そう思って渡邊がやっているか)が、今日の主題です。

# 「X線」の分類

ちょっと話がずれますが、X線を波長によって分類しておきましょう。

どういう分類でしょう？



# 「X線」の分類

	波長 (Å)
硬X線(短波長)	< 0.7
X線	0.7 ~ 3.0
軟X線(長波長)	> 3.0

どこで区切るかは、人によるところもありますが、まあ、だいたいこんな感じです。

あるいは、真ん中がなしで、硬・軟だけに分る人も居るかと思います。

さらに、最近の蛋白質結晶のデータ収集のトレンドを示すのに、「X線」をさらに2つに区分したりもします。

# 「X線」の分類

	波長 (Å)
硬X線(短波長)	< 0.7
X線	0.7 ~ 1.5
軟らかめのX線	1.5 ~ 3.0
軟X線(長波長)	> 3.0

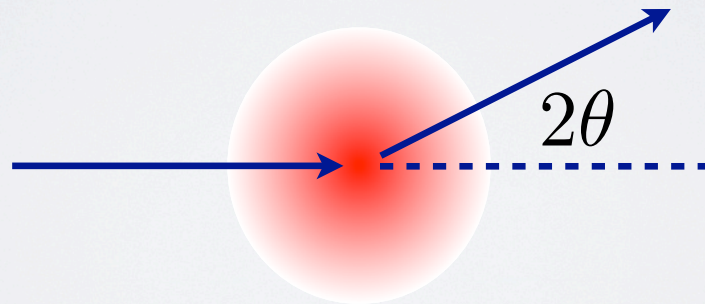
こんな感じです。

「軟らかめ」は英語で言うとsofterです。波長で言うのだと longer wavelength です。今日の話は、このsofterないしlonger wavelengthのX線を上手に使う工夫の話です。

# 原子散乱因子

$f$

一つの原子がどのようにX線を散乱するか



さて、話を進めるのに、X線回折の概念の説明が少し必要です。昨年はこのあたりをすっとばしたので、ちょっと失敗したのです。

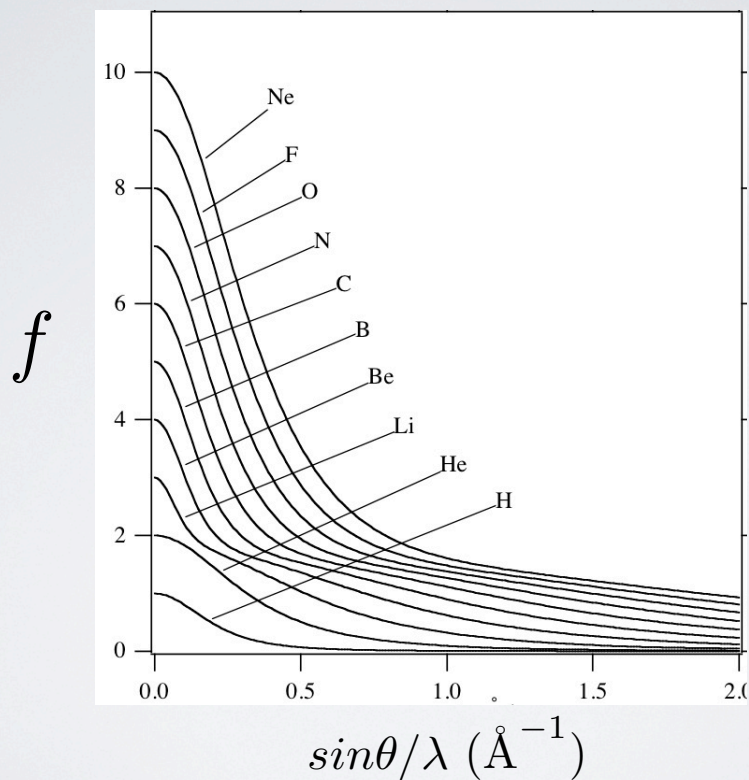
三木研以外の方は、もう忘れたかも知れないけど、原子がX線をどう散乱するかを示すのが「原子散乱因子」ですが、こんなふうに原子(原子核に束縛された電子)にX線が当たった時に、散乱されて来るX線はどうかということです。散乱角度と波長の関数になります。

我々の場合は、原子を問題にしている訳ではなく、原子がいっぱい詰まった結晶を問題にしているのです。そういう原子がいっぱい詰まった結晶では、どう考えるかという。





# 原子散乱因子の例



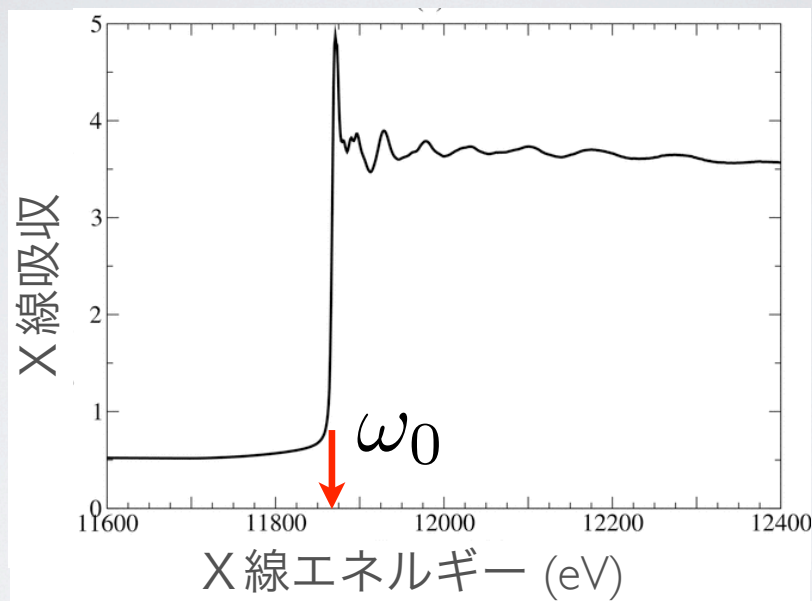
<http://www.crl.nitech.ac.jp/~ida/education/structureanalysis/3/3.pdf>

散乱角度の関数で、こんなふうになります。

y軸との交点,  $\sin\theta=0$ , つまり前方散乱の強さに対応するのは、各原子の電子数ですね。

このように原子散乱因子は散乱角度の関数なのですが、実はこの原子散乱因子には、波長依存があって、X線の波長が原子がX線を吸収するエネルギーに近づくと、ちょっと面白くなるのです。

# X線吸収スペクトル



$$\text{keV} = 12.4/\text{\AA}$$

これは、物質によるX線吸収スペクトルの例です。三木研以外の人は見たことが無いかな？

横軸が波長でなく、エネルギーで書いてありますが、原子に照射されるX線のエネルギーが、あるエネルギー以上になると、X線が吸収されるというスペクトルです。そこを「吸収端」と呼びます。実はこれは砒素のXAFSスペクトルです。

次のスライドの都合で、このエネルギーをX線の振動数で書きます。波長とエネルギーと振動数、全部同じことですが、いいですよね、 $\omega_0$ です。



# 異常散乱 (共鳴)

$$f = \frac{\omega^2}{(\omega^2 - \omega_0^2) - ik\omega}$$

↑  
damping term

$$\lambda = \frac{2\pi c}{\omega}$$

たぶん大学の1年生か2年生(あるいは高校?)のころに物理で調和振動子を教わったと思いますが、原子散乱因子も、X線の振動数(つまり波長)の関数として、こんな形に書くことができます。式は嫌いかも知れないので、ここで重要なのは「原子散乱因子はX線の波長の関数ですよ」ということだけです。

X線の波長(ここでは振動数で書いてある)が、束縛電子の固有振動数に近い時には、つまりX線の振動数 $\omega$ が $\omega_0$ に近づくと、この式で分るように共鳴によって強い散乱が起こります。これを異常散乱と呼びます。しかし、この複素数の減衰項があるので不連続になってしまうことはありません。

細かいことは抜きにして、この式で納得して欲しかったのは、原子散乱因子は

# 原子散乱因子(異常散乱)

$$f(S, \lambda) = f_{(S)}^0 + f'_{(\lambda)} + i \cdot f''_{(\lambda)}$$

$S$ : X線の散乱角

波長異存

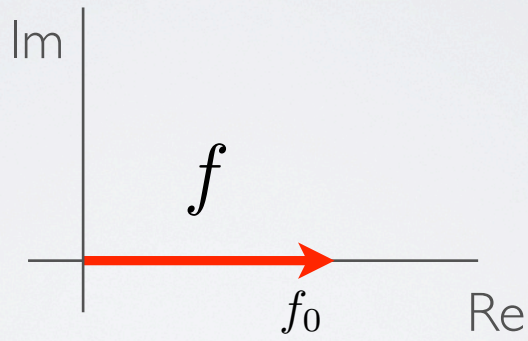
X線の波長に依存する項があるということで、それを分けて書けば、このように書くことが出来るだろうということです。

さっきのスライドで、原子散乱因子が波長に依存するということを見てもらうと、原子散乱因子を普通はこう書くことを納得してもらえるかなと思います。

原子散乱因子は、X線が散乱される角度による部分と、X線の波長に依存する部分があり、ここで、波長による部分、つまり異常散乱因子が複素数だということに意味があります。

# 原子散乱因子

自由電子

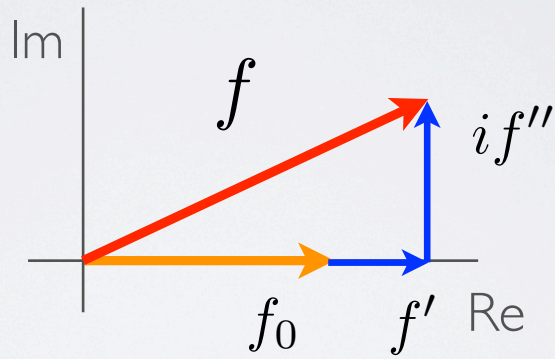


入射X線とは180度位相がずれませんが，吸収端の波長と離れているとき(あるいは自由電子の場合)は，原子散乱因子は実数です。複素平面で描くと，こんな感じ。

それが，吸収端に近付いてくると，虚数項が無視できなくなってきて，

# 原子散乱因子

束縛電子



このようになってきます。

要は、X線の波長が吸収端(つまり共鳴周波数)に近づいて来ると、原子散乱因子の虚数部分が有意な大きさになる、ということです。



# ここまでの復習. . .

$$F_{hkl} = \sum_{i=1}^n f_i \cdot e^{2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)}$$

$$f_{(S,\lambda)} = f_{(S)}^0 + f'_{(\lambda)} + i \cdot f''_{(\lambda)}$$

さて、原子散乱因子と結晶構造因子の関係と、原子散乱因子の異常散乱項の説明の話をしました。

原子によるX線の散乱は、X線の波長に依存する。原子のX線吸収波長付近で起ることを「異常散乱」という。

原子による散乱と結晶構造とは上の式のように関係している。ということです。

今日の私の話の中での異常散乱の有り難さは、実は、タンパク質中に始めから含まれているイオウ原子を利用することが出来るということにあります。

# タンパク質中の原子

通常のタンパク質には

C  
N  
O  
S  
H  
が含まれる。

通常のタンパク質中に含まれている原子は、こんなものです。

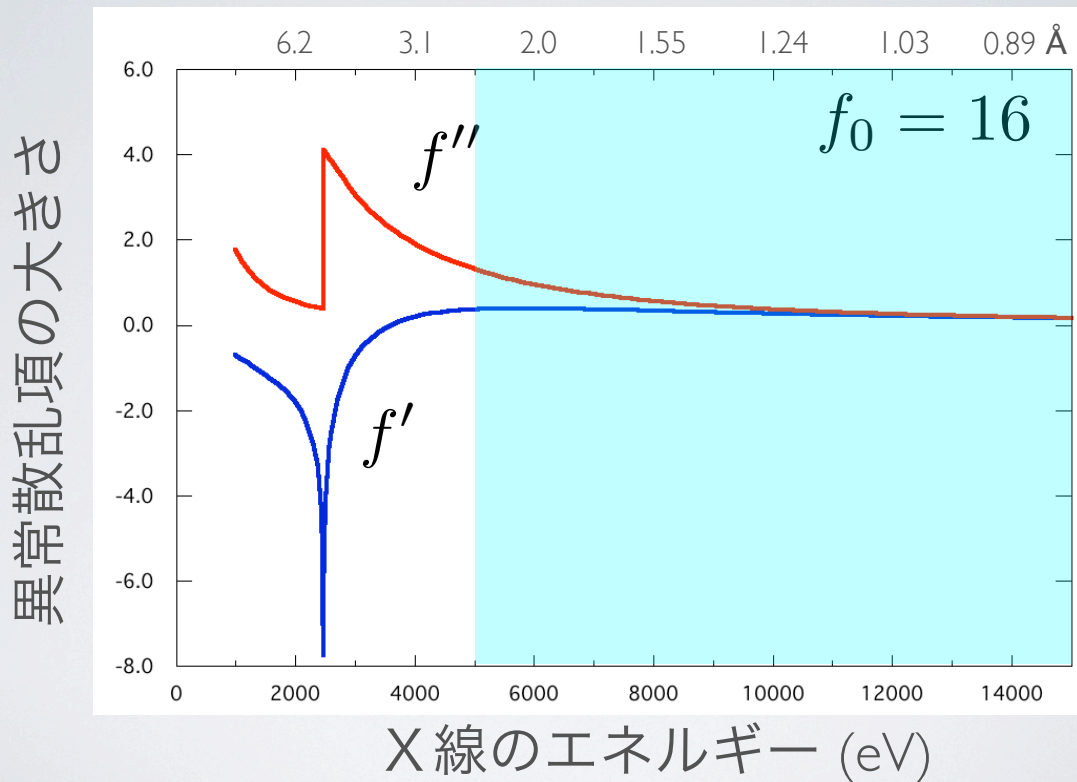
イオウ原子は何に含まれていますか？

システインやメチオニンですね。

炭素、窒素、酸素といった原子は、普通X線結晶構造解析に使用する波長領域では異常散乱の効果はほとんどありませんが、イオウ原子は、小さいけど、なんとかなる大きさを持っています。

次は、それを見てください。

# イオウの異常散乱因子の大きさ



<http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/>

横軸をX線のエネルギー(上に波長を書いています)でイオウの異常散乱因子をグラフにしたのがこれです。

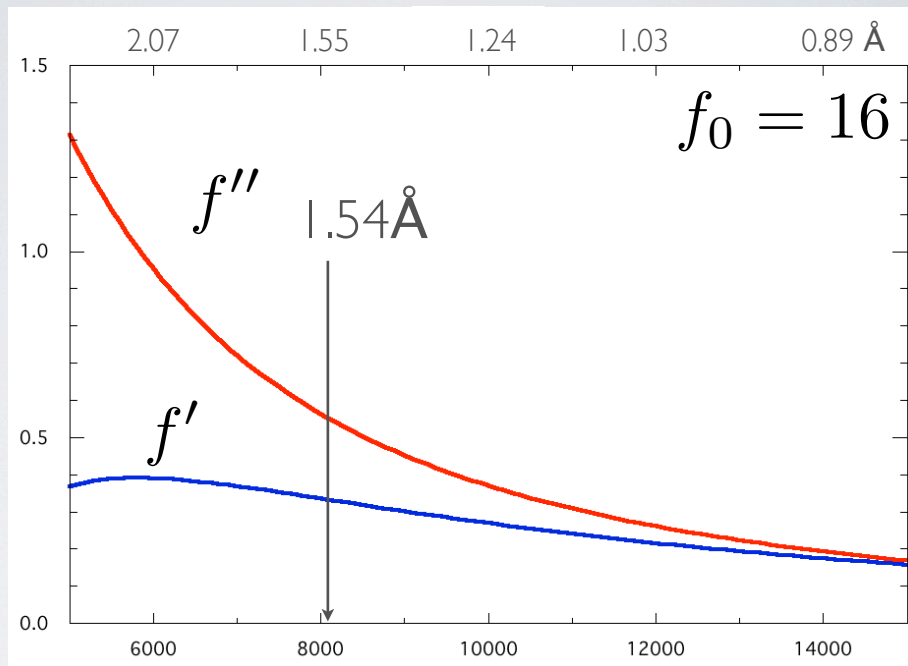
イオウ原子は、全部で16個の電子を持っています。さっきみたように $f_0$ は散乱角に拠る量ですが、角度がゼロのとき、つまり前方散乱のときは16です。

イオウ原子のX線吸収端は、ここに見られるように、 $5.0155\text{\AA}$ ( $2.4720\text{keV}$ )にあり、この波長で「共鳴」が起って、異常散乱因子が増大します。異常散乱因子は実部が最大で8(マイナスですが)、虚部が4程度です。

しかし、このグラフは、「X線の分類」で見た、通常使用する領域をはみだしています。通常使用する領域はこの辺ですが、ここを拡大してみると。

# 異常散乱因子の大きさ

異常散乱項の大きさ



X線のエネルギー (eV)

<http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/>

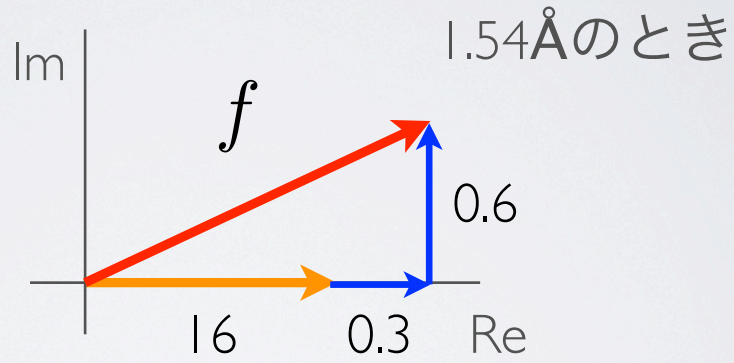
こんな感じです。

普通の研究室にあるCuターゲットのX線発生装置は1.54Åの波長のX線を使うので、ここでは、異常散乱因子が実際にどのくらいの大きさがあるかというと、



# 異常散乱因子

イオウ(S)の場合



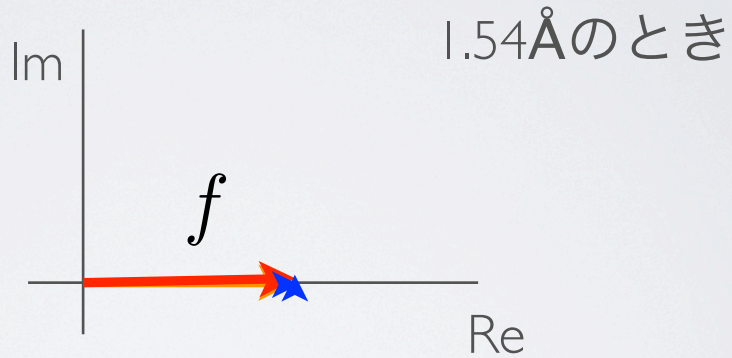
1.54Åの場合、それぞれの大きさは、約0.3と0.6です。

さっき言ったように、波長に依存しない部分は散乱角度が小さい場合で16です。

この図は実寸ではないので、実寸で描くと、

# 異常散乱因子

イオウ(S)の場合



こうです.

ほとんど実数ですね. まあ, 三木研以外の人達には, イオウ原子の異常散乱因子は「そんなに大きいものではない」ということだけ覚えておいてもらえば良いと思います.

ここまでは「原子」でしたが, 構造解析の実際には結晶中の分子からの回折を測定しますから「結晶構造因子」が問題になります.

# 異常散乱の寄与

$$\frac{\Delta F_{anom}}{F} = \sqrt{\frac{2N_A}{N_T} \cdot \frac{f''}{Z_{eff}}}$$

$N_A$  異常散乱原子数

$N_T$  全原子数

$Z_{eff}$  平均原子散乱因子

Hendrickson & Teeter, *Nature* (1981) 290, 107-113

平均的な結晶構造因子(測定値)に対する、異常散乱部分の大きさは、この式で見積ることが出来ます。ここで、 $N_A$ 、 $N_T$ 、 $Z_{eff}$ は、それぞれこういう数字です。蛋白質の場合、 $Z_{eff}$ は6.7です。やっぱり今日は話をしないのですが、この異常散乱の寄与分が構造解析に使えます。(蛋白研の中川さんの講義で出て来ているかも知れません。)

実際の蛋白質の結晶で、異常散乱の寄与分がどんな感じになるか見てみます。

# リゾチームの場合

$$\frac{\Delta F_{anom}}{F} = \sqrt{\frac{2N_A}{N_T} \cdot \frac{f''}{Z_{eff}}}$$

KVFGRC**C**ELAA    AMKRHGLDNY  
RGYSLGNW**V**C    AAKFESNFNT  
QATNRNTDGS    TDYGILQIDS  
RWW**C**NDGRTP    GSRNL**C**NIP**C**  
SALLSSDITA    SVN**C**AKKIVS  
DGNGM**M**NAWVA    WRNR**C**KGTDV  
QAWIRG**C**RL

例は、みなさんもよくご存知の卵白リゾチームにします。

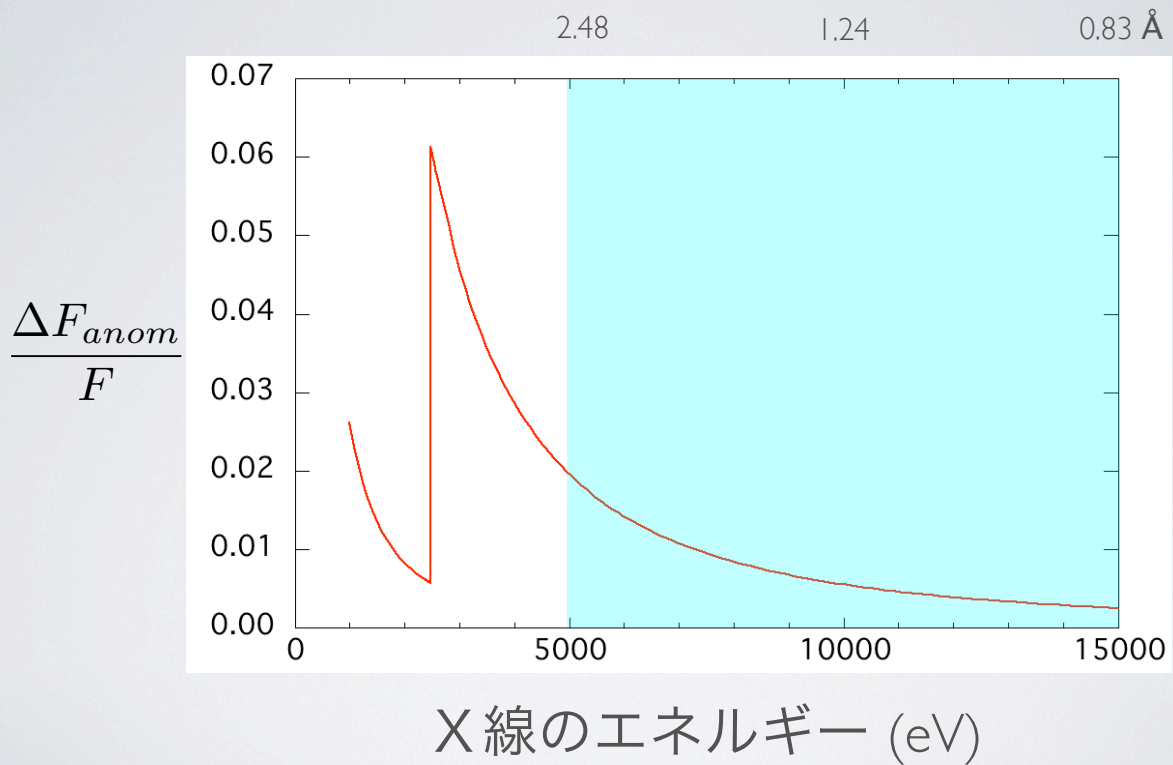
これは、リゾチームの一次構造です。イオウ原子があるのはシステインとメチオニンですから、それぞれ色をつけてあります。

さっきの式に必要な原子の数 $N_A$ と $N_T$ を数えてみると、 $N_A$ は10、 $N_T$ は1957です。

これで、計算してみると、



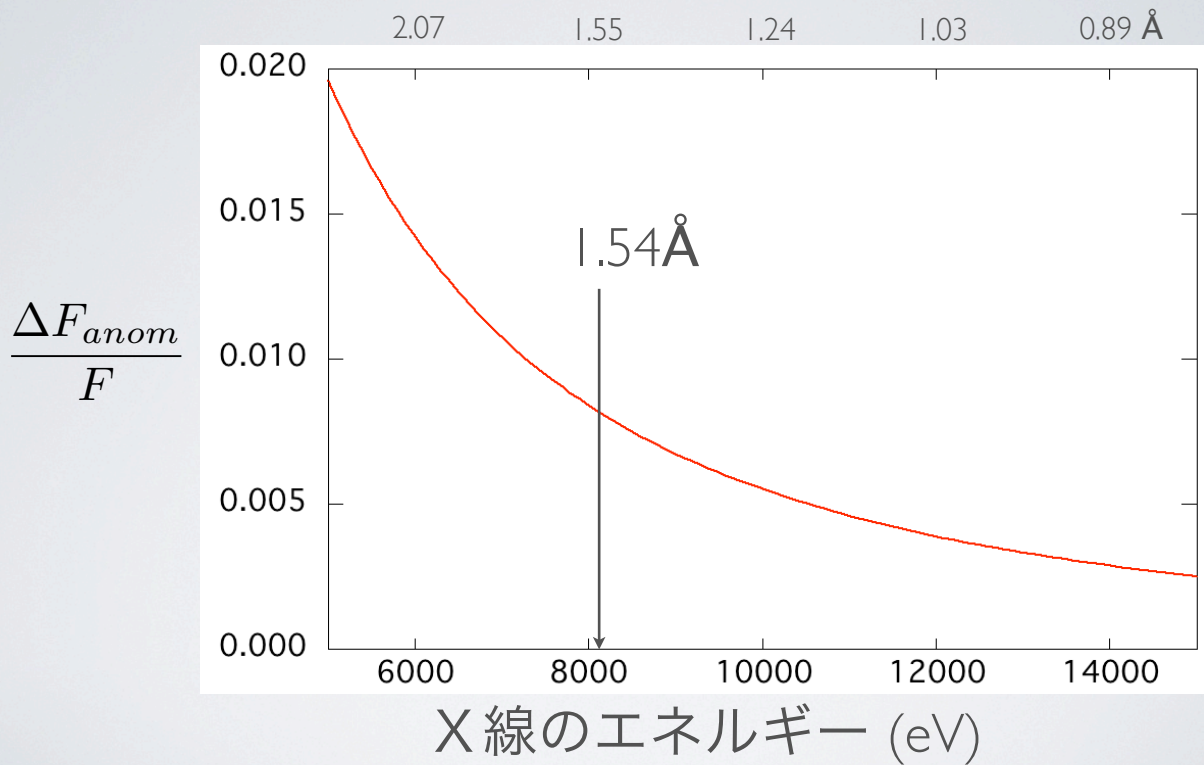
# リゾチームの場合



こうなります.

原子散乱因子と同じ(あたりまえですね)ように、やはりイオウの吸収エネルギーのところで大きくなりますが、通常使用するX線領域はここなので、そんなに大きな割合にはなりません。せいぜい2%です。この領域を拡大してみると、

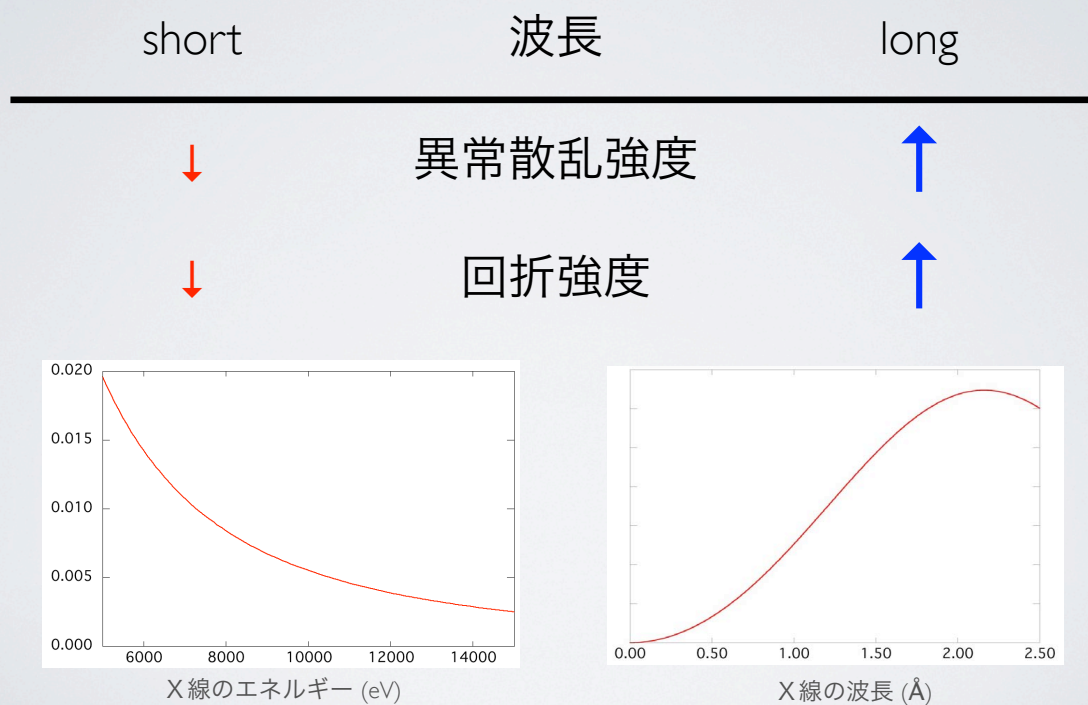
# リゾチームの場合



こんな感じで、やはり普通の研究室にあるX線発生装置(1.54Å)だと、イオウの異常散乱の寄与は約0.8%しかありません。

物理的な実験をやっている人がどのくらい居るか分かりませんが、測定値の平均強度の、せいぜい0.8%程度を問題にしようというのは、まあ、そんなに楽ちんなことではない、と思ってもらえれば良いかなと思います。

# 使用するX線の波長と得失



いままでみてきたことをまとめると、こんな感じになります。

ここで「赤」は良くないことを、「青」は良いことを示し、矢印の向きは増減を示しています。

詳細は説明しなかったけど、イオウの異常散乱強度は構造解析に使えるので大きいほど良い。そもそもX線回折測定をするので、回折強度も大きいほど良い、という意味です。

つまり、いままでみてきた範囲では、長めの波長を利用した方が良さそうということです。

# イオウの異常散乱利用の歴史

Ramagopal *et al.*, *Acta Cryst.* (2003) **D59**, 1020.

1.54Å Cu K $\alpha$

1981年 *Crambin* (6S/344原子) Hendrickson & Teeter

1982年 *Rhe* (2S/833原子) Wang



(1985年)さらに長波長の利用を提案している

放射光 1.54Å

1999年 *Lysozyme* (10S+7Cl/1001原子) Dauter *et al.*

放射光 1.74Å

2000年 *Obelin* (8S/3043原子) Liu *et al.*

1.77, 1.91Å...

さて、イオウ原子の異常散乱の構造解析への利用は、実はみなさんの生れる前からの歴史があります。

最初の提案は1981年にHendrickson&Teeterによって小型のタンパク質crambinの構造解析がされています。そのあと1982年にWangがベンス・ジョーンズタンパク質Rheという小さいタンパク質を計算機実験で解析の可能性を示しました。WangはCu K $\alpha$ の1.54Åよりも長い、Cr 2.29Åの可能性にも言及しています。

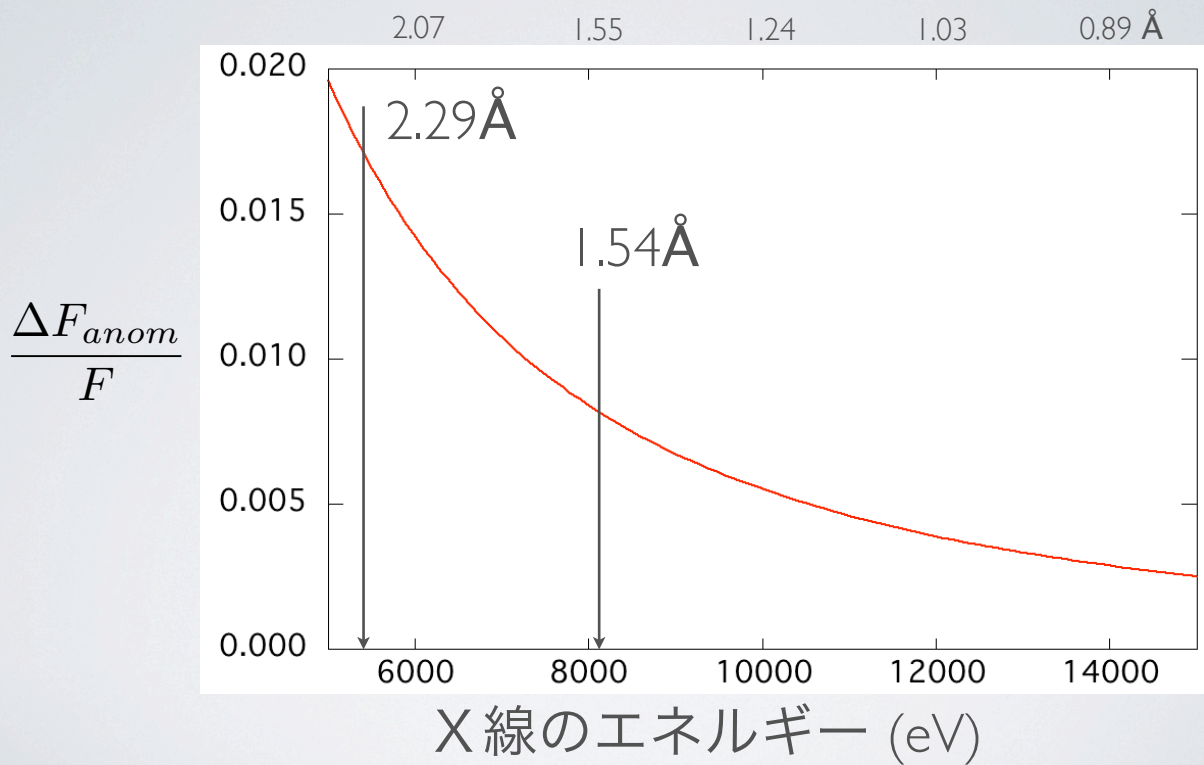
しかし、その後、なかなかこの方法は実用化されることはなく、1999年にDauterがシンクロトロン放射光の1.54Åでリゾチームの構造解析をやってみせるまで、17年かかっています。そして、翌2000年にBC Wangのグループですが、Obelinの構造解析がイオウの異常散乱を利用して「新規」なタンパク質を解析した最初です。この時は1.74Åの波長が使用されています。

その後は、1.77, 1.91といろいろな波長が使用されています。

さて、BC Wangが1985年に提案した、Cr K $\alpha$ 線(2.29Å)ですが、リゾチームの異常散乱のグラフで再検討してみましよう。



# リゾチームの場合



さっきは普通の研究室にあるX線発生装置(1.54Å)だと、約0.8%しかありませんと言ったのですが、ターゲットをCuからCrにすると、2.29ÅのX線を使用することが出来るので、異常散乱の寄与はちょっと大きくなります。

CuとCrの波長のX線を比較すると、

## リゾチームの場合

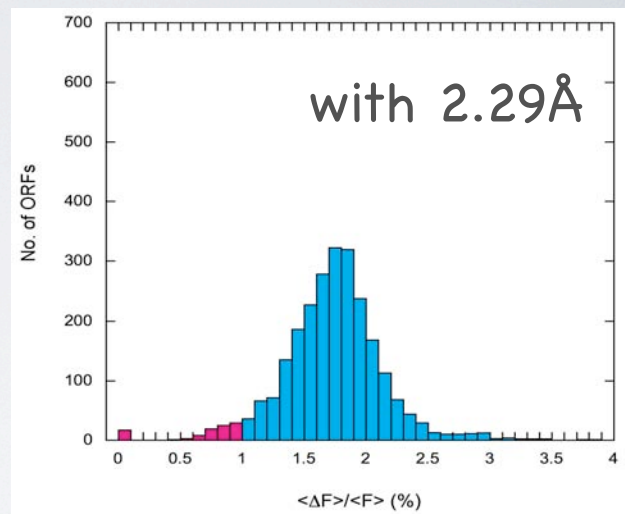
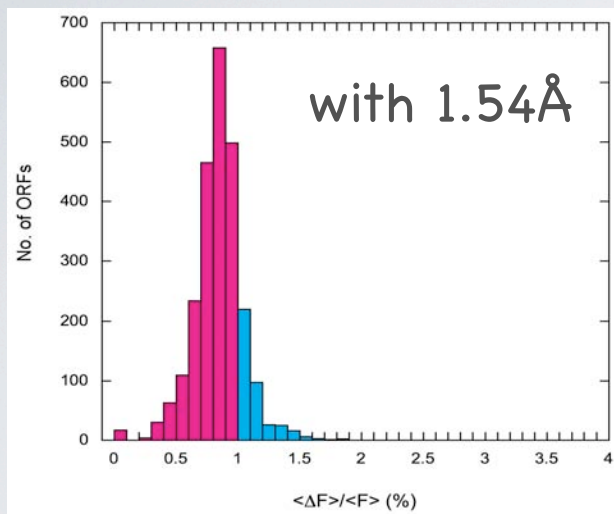
	波長 (Å)	$f''$	$\frac{\Delta F_{anom}}{F}$ (%)
Cu $K\alpha$	1.54	0.56	0.84
Cr $K\alpha$	2.29	1.14	1.7

こんな感じになります。異常散乱の寄与の大きさは、およそ倍になっています。

この比較の限りでは、CuからCrの波長に、つまり長波長(低エネルギー)にすると、相対的に大きい異常散乱効果を構造解析に利用することが出来る、ということになります。

リゾチームの他に、普通のタンパク質で、どのくらいイオウの異常散乱の寄与が期待できるかですが、

# タンパク質の $\frac{\Delta F_{anom}}{F}$ の見積と解析可能性



calculated for the Chromosome I of *C. elegans*

試しに、線虫 *C. elegans* のクロモソーム1にコードされているタンパク質で、見積ってみたのが、このグラフです。

左がCuの1.54Å、右がCrの2.29Åの波長で、それぞれの時にタンパク質中のイオウの数を数えて、異常散乱の寄与を計算してみました。色分けしてあるのは、もしも異常散乱寄与が1%あったら構造解析出来るとすると、青で示した部分のタンパク質は構造解析することが出来るというものです。

2.29Åの長波長を使用すれば、ほぼ全てのタンパク質の構造解析が可能になるだろうということが期待できます。

ところが、長波長のX線には問題もあります。

# 使用するX線の波長と得失

short	波長	long
↓	異常散乱強度	↑
↓	回折強度	↑
↓	吸収	↑
↓	空気散乱	↑

ということかということ、結晶自身を含む吸収効果が大きくなり、また結晶周辺のX線の通り道の空気からの散乱が大きくなります。吸収が大きいとそのためのX線強度の減衰が問題になり、空気の散乱はノイズになります。

ここまで、この上のポジティブな方の「理屈」を説明して来たのですが、これからは、長波長X線の実用にあたって、この下のネガティブなことにどうして来たかという話です。

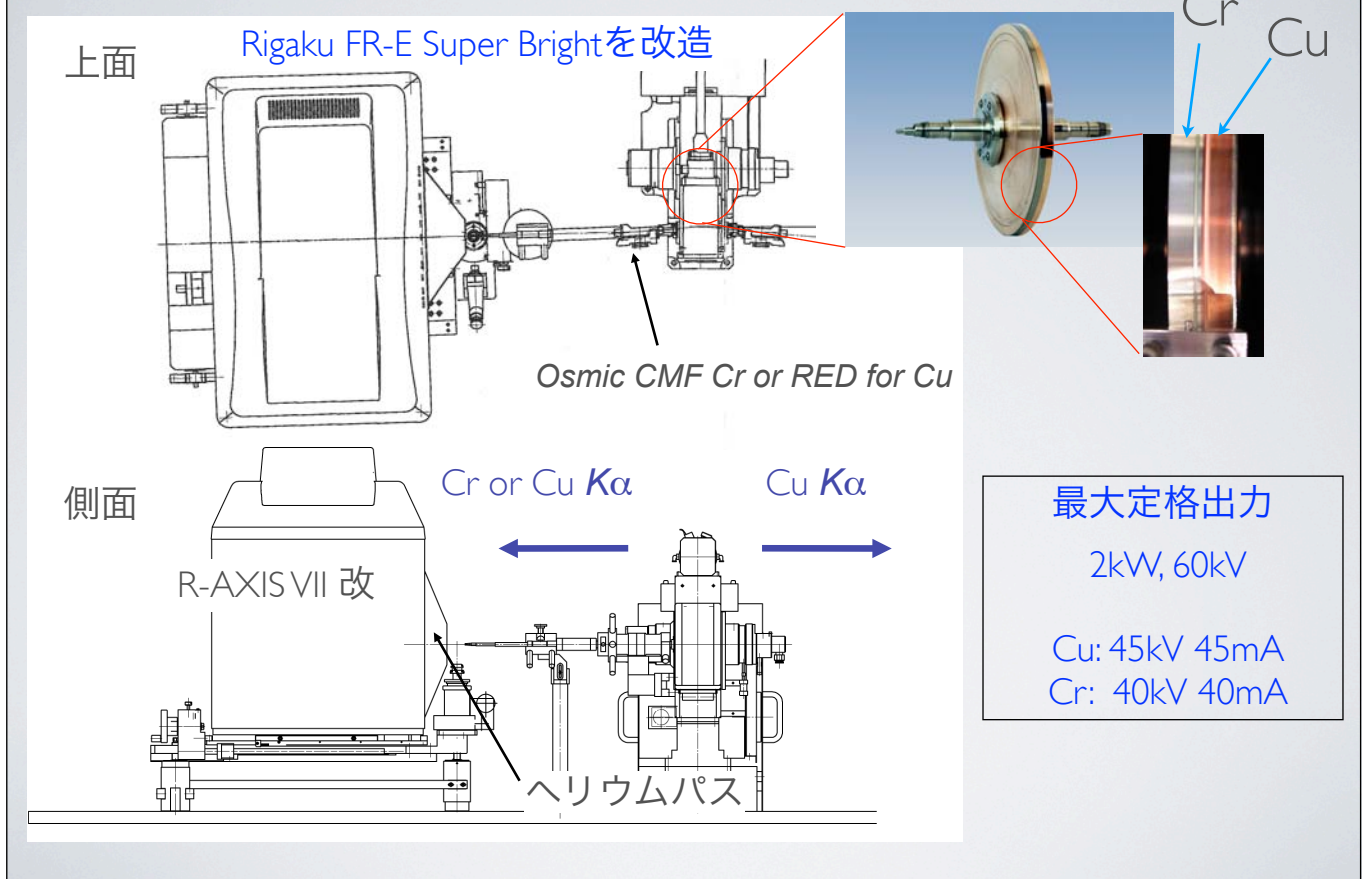


# Cr $K\alpha$ の利用

ということで、2.29Åという長波長のX線であるCrの波長のX線の利用の実際に話題を移します。

まずはX線発生装置を開発しました。

# Cr/Cu $K\alpha$ 利用結晶構造解析システム



これが、Crの特性X線を利用できる装置として、北大で開発した装置の模式図です。

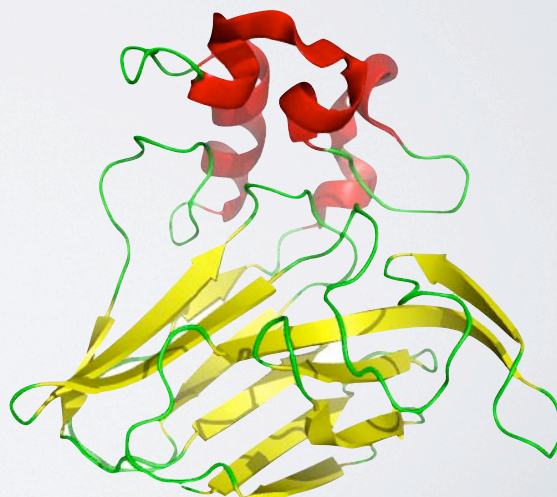
今日はCrの利用だけしか話しませんが、実は、この装置は、Cuの特性X線も使用できる、つまり2つの波長のX線を利用できるシステムとして開発しました。

その後、製品化されています。どのくらいの台数が売れているのかはちょっと知りません。

# Cr K $\alpha$ X線利用の試み

標準タンパク質でのテスト

		$\frac{\Delta F_{anom}}{F}$
Trypsin	220/223残基を自動構築	3.5
Thaumatin	203/207残基を自動構築	2.5



2004年に装置を導入して、さっそく2つの標準的なタンパク質でデータを取って、イオウの異常散乱を使って構造解析を試みた結果がこれです。

やっぱり、今日は「どういう計算をしたら解析出来るか」は話さないのですが、とにかく、この2つのタンパク質では、Crの波長のX線を使えば、イオウの異常散乱で解析が出来た、ということです。

ちなみに、この2つのタンパク質の異常散乱寄与の大きさは、ここにあるようにそれぞれ3.5%と2.5%です。



# 構造未知のタンパク質

---

PH1109 from *Pyrococcus horikoshii*

---

分子量	16,721
残基数	177
S原子/分子	7 (5 Met, 2 Cys)
分子数/ASU	1
$\Delta F_{\text{anom}}/F$	1.72%

---

それで気を良くして、構造の分っていなかった、こういうタンパク質の構造解析を試みようとしたのです。

このタンパク質は、異常散乱寄与が1.72%です。さっきの3.5%や2.5%より、ちょっと小さいです。

まあ、やってみようということで、測定してみたのですが、



# ところが . . .

PH1109 from *Pyrococcus horikoshii*

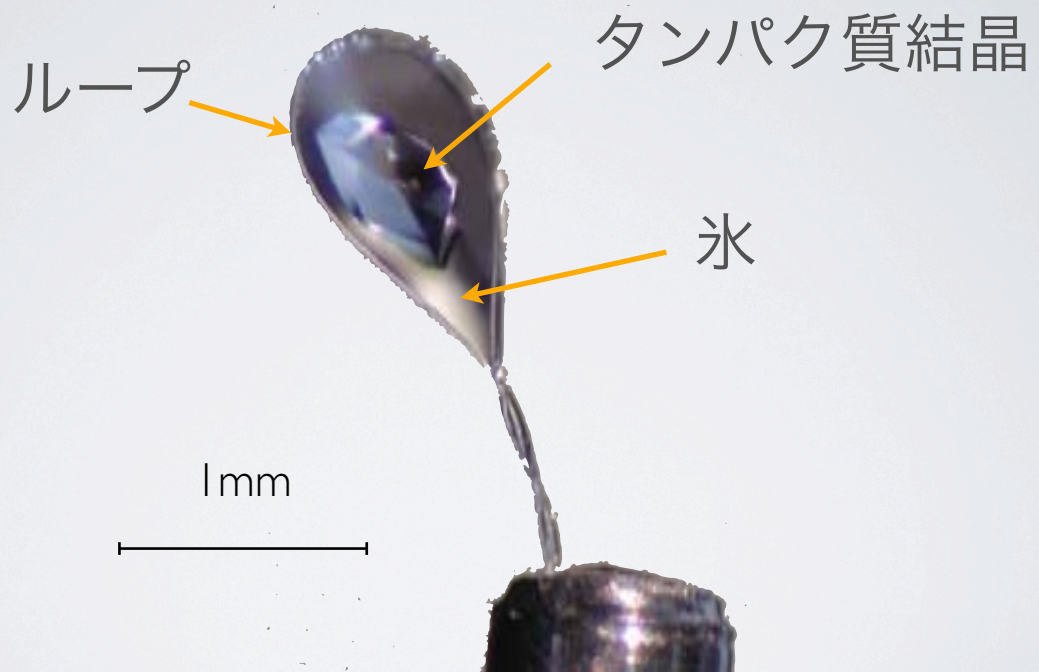


そうしたら、構造解析が、どうもうまく行かなかったのです。

ここにあるように、頑張っても、分子の一部の構造しか解析出来ませんでした。

何が問題なのかということです。で、考えてみました。

# 結晶マウント法の問題

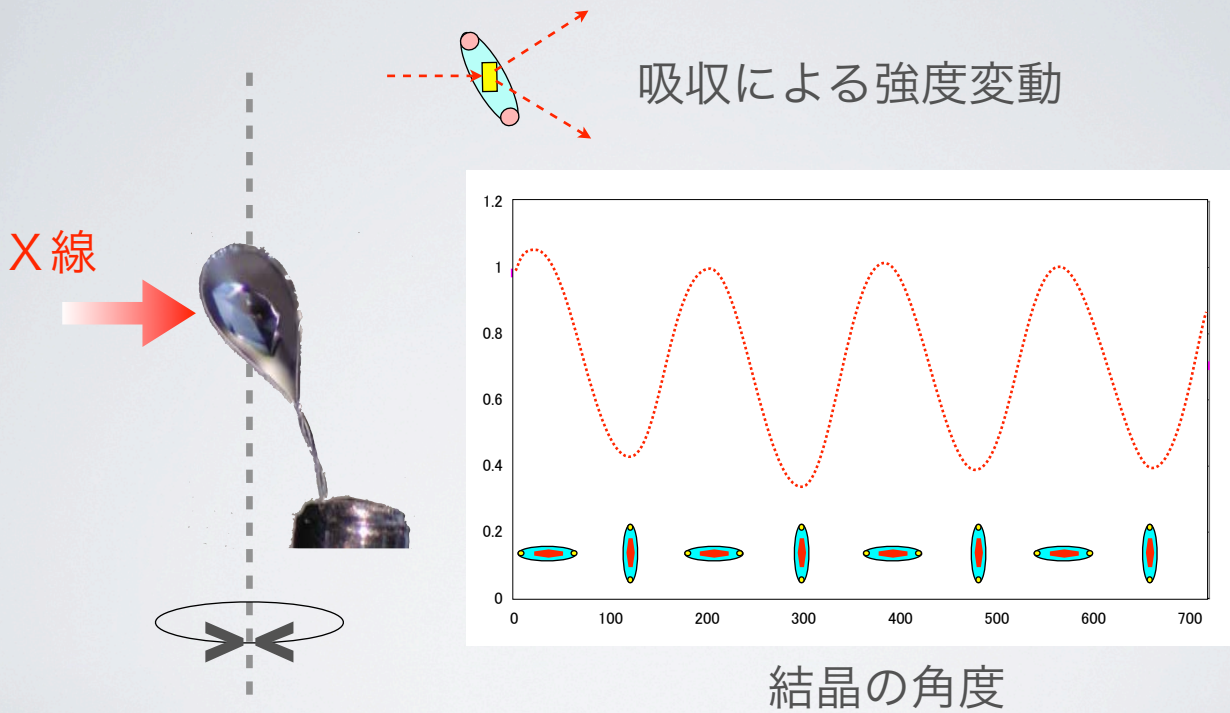


ちょっと前に話したように、長波長のX線は吸収が大きくなります。

現在では、タンパク質結晶の回折データ測定をする際は、この写真のようにタンパク質の結晶を溶液ごとループですくって、凍結して測定します。

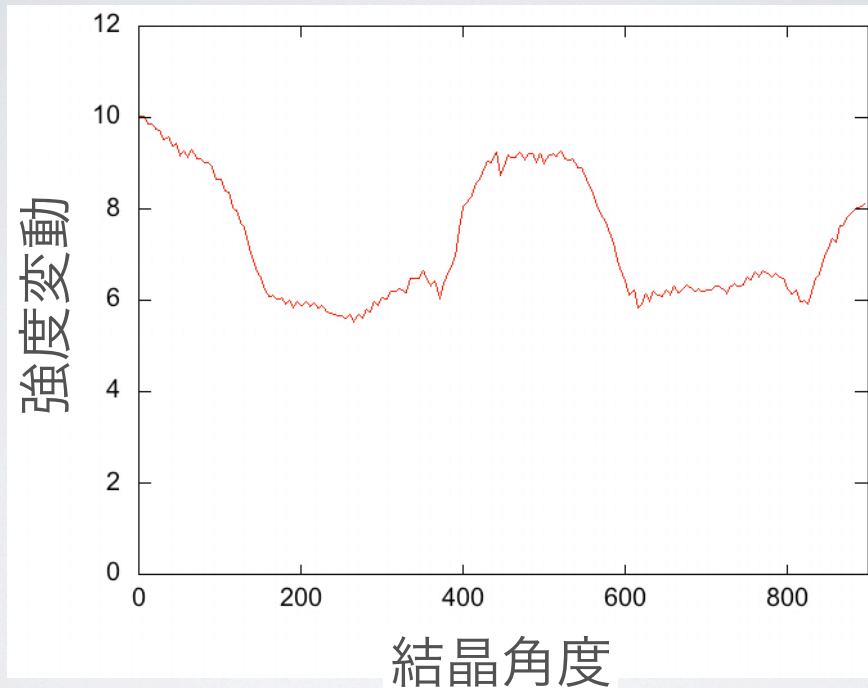
なので、タンパク質の結晶の周辺には氷があります。

# 結晶マウント法の問題



このため、X線を当てながら測定する際に、結晶だけでなく、氷の部分もX線が通過します。氷の部分がこの絵のようにレンズ状の形なので、X線を当てる方向で吸収の影響が変化して、そのために測定精度が悪くなっているのだろうと考えました。

# 実際の例

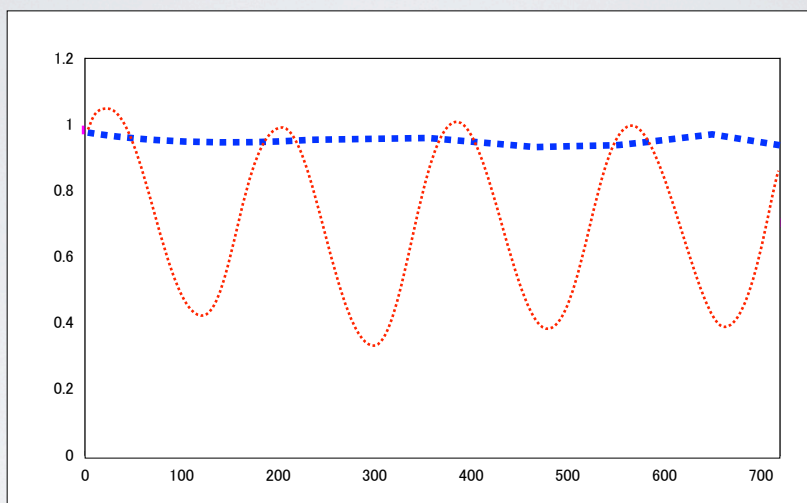


実際に測定データの強度を結晶の角度でみてみると、このように倍くらいの強度変動があることが分ります。

これでは測定精度が足りないかなということです。



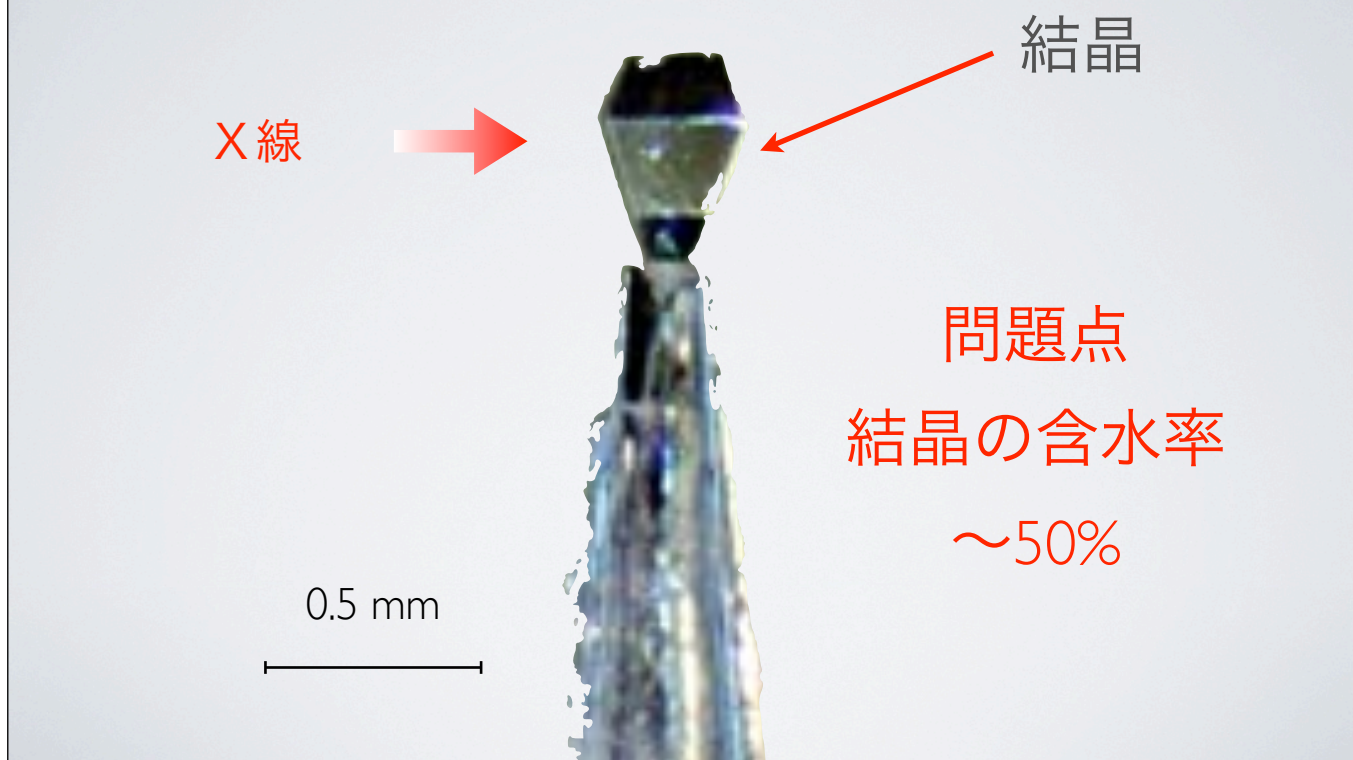
# 吸収による強度変動を軽減したい



結晶の角度

このグラフのように、氷の吸収による強度変動をなくする工夫が必要だろうということです。

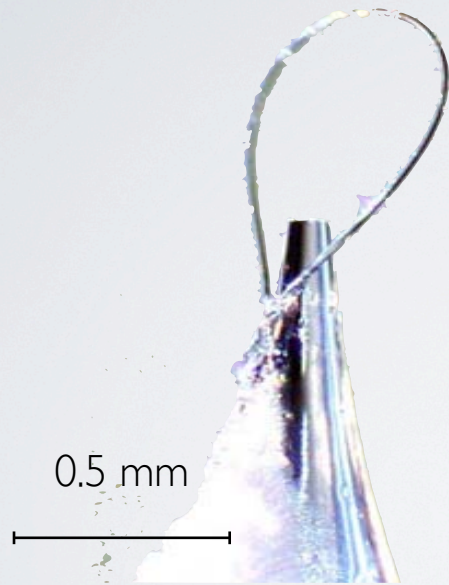
# 対策：結晶を裸状態にすれば良い



どうしたかという、話は単純で、このように、タンパク質の結晶だけを取り出して凍結してしまえばいいんじゃないか、ということです。

ただ、タンパク質の結晶は、結晶の50%程度が水なので、溶液から取り出してもたもたしていると乾燥して結晶性が悪くなってしまうということがあり、それをどうやって解決するかということが問題でした。

# 我々の工夫：新規結晶マウント法

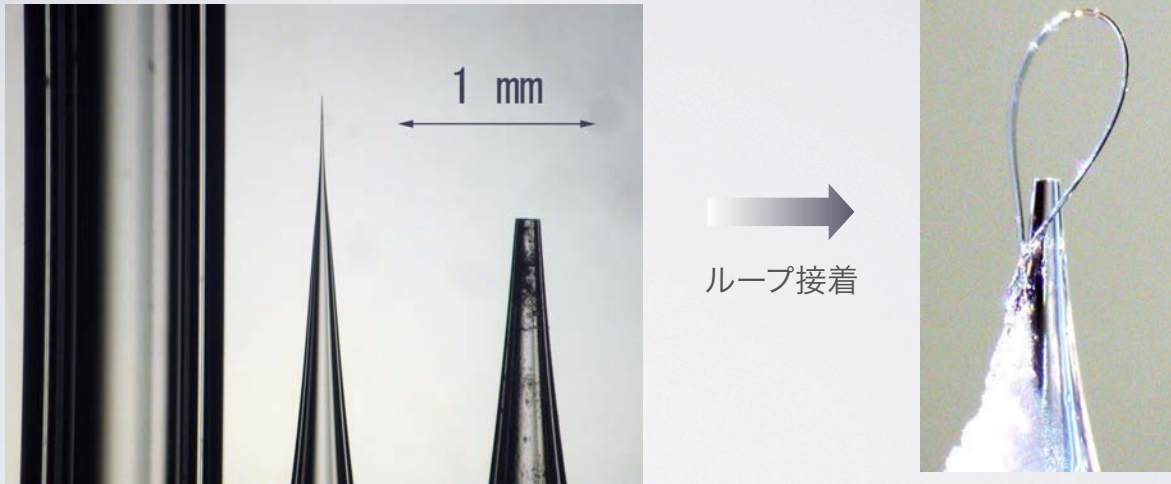


先端にループを付加した  
キャピラリー

Kitago, Y., Watanabe, N. and Tanaka, I., *Acta Cryst.*, **D61**, 1013-1021 (2005).

どうしたかというところ、このように、ガラスのキャピラリーの先端にループを接着したものを考えました。

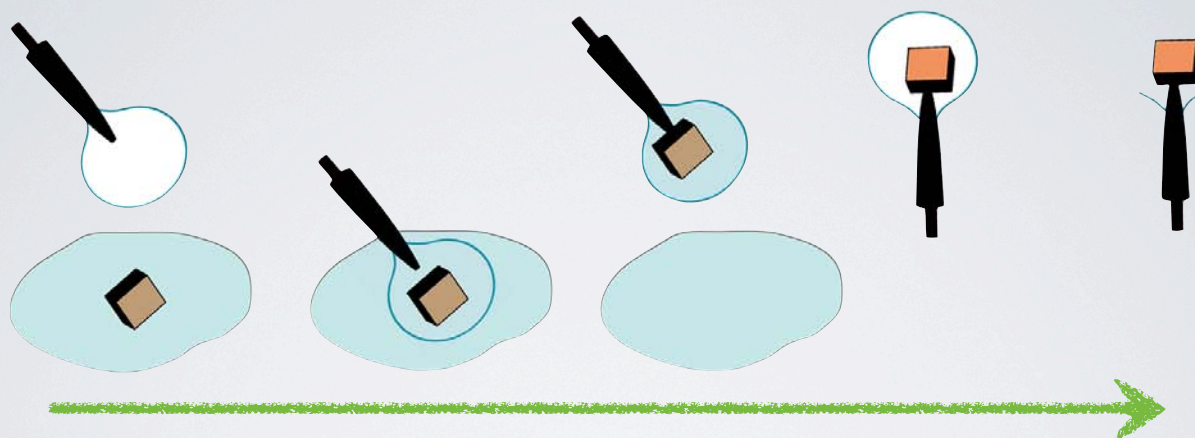
# マウントキャピラリーの製法



1mmのガラス管を引き伸ばして、先端を切断して研磨し、それにループを接着しただけです。



# 結晶マウント法の実際



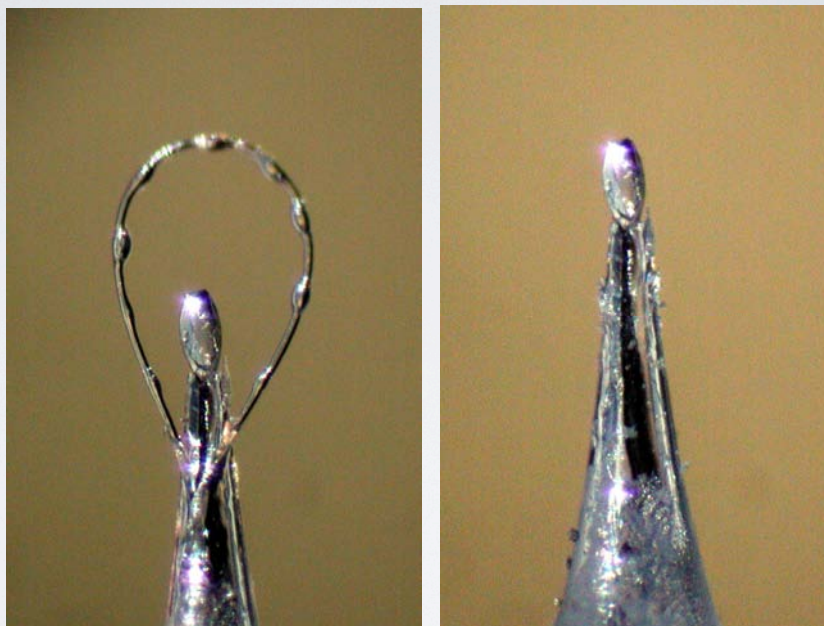
結晶をピックアップ

ループ中の溶液を吸引除去  
同時に急速凍結

使い方は、このように、ループで結晶をすくい出して、その後、キャピラリーを通してループ中の溶液を吸引除去して、その瞬間(つまり乾燥する前)に凍結してしまいます。

# 結晶マウント法の実際

0.5 mm  
└──────────┘



Kitago, Y., Watanabe, N. and Tanaka, I.,  
*Acta Cryst.*, **D61**, 1013-1021 (2005).

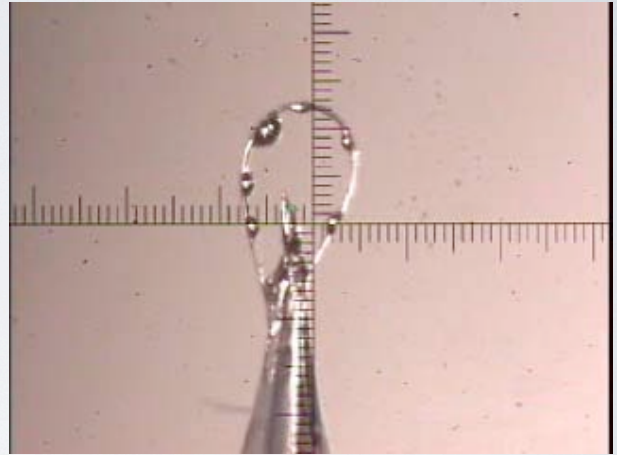
実際に、こうやって凍結した結晶の例ですが、このように、ループの内側に氷はありません。結晶だけが凍っていて、必要ならループも取り除くことができます。

# マウント実際のビデオ

顕微鏡画像



ループプレスマウント法でフラッシュ  
クーリングをしている様子

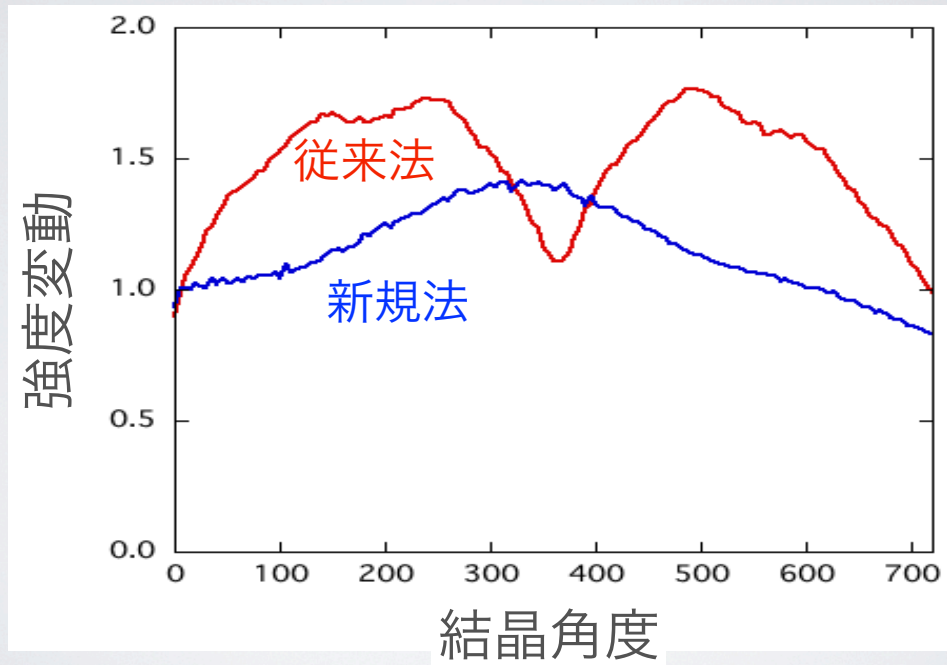


凍結結晶がキャピラリー先端にちゃんと立っ  
ている様子

実際の操作のビデオを見て下さい.

# 従来法と新規マウント法の比較

Hypothetical protein PH1109 from *Pyrococcus horikoshii*



こうして測定すると、まあ期待どおり、強度変動が軽減されていて、



# 従来法と新規マウント法の比較

従来ループ法



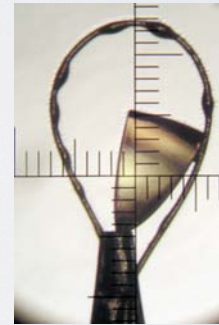
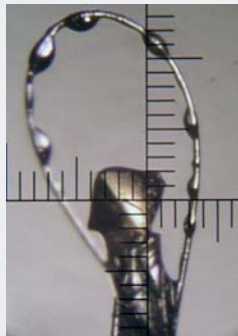
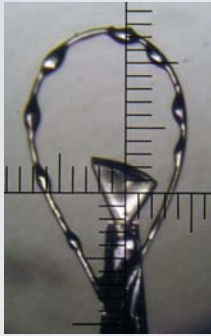
新規マウント法



無事に構造解析が出来るようになりました.

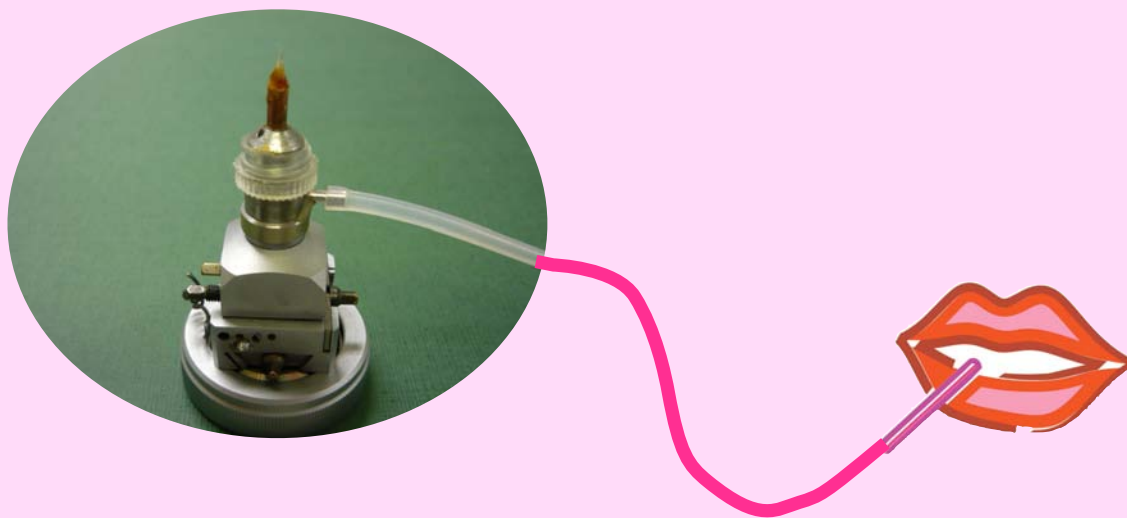
左がさっきみた、ループで測定した結果で、右がこの方法で裸にして凍結した結晶で測定した結果です.

## 実際の結晶マウント例



こうして、その後、いろんな結晶を、この方法で解析することが出来ました。  
これは、構造解析した結晶の写真の例です。

# 自動化の試み



ということで、うまく行ってめでたい、のですが、残された大きな問題点は、結晶をドロップから広い出して、凍結するまでの短い時間で結晶周辺の微量な溶液を除去しないといけないということです。

私たちの場合は、これを口で吸ってやっていますが、同時に凍結のことも考えないといけないし、慣れないとなかなかうまく行きません。

たとえば、三木研でこの方法を使ってもらえているかということ、残念ながらそうではないということです。

解決策

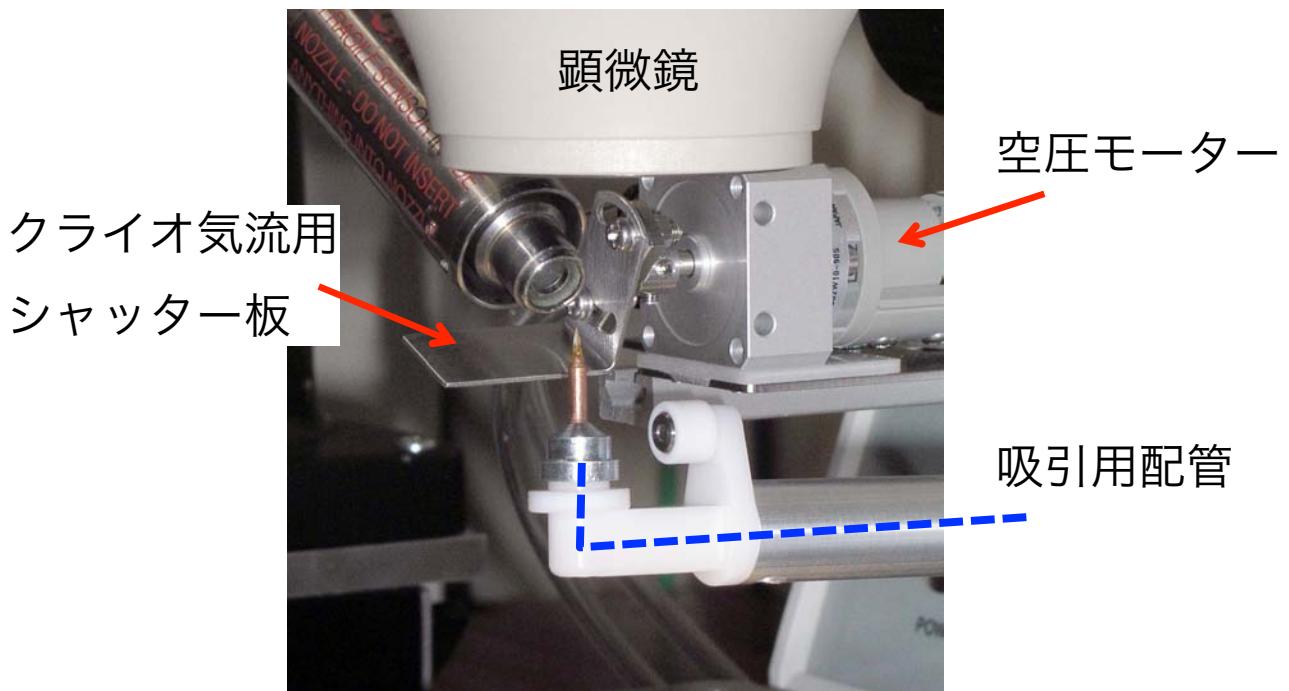
# 半自動結晶凍結マウント装置



そこで、こんな「半自動化」装置を作りました。  
最後はこれを紹介しておしまいにします。



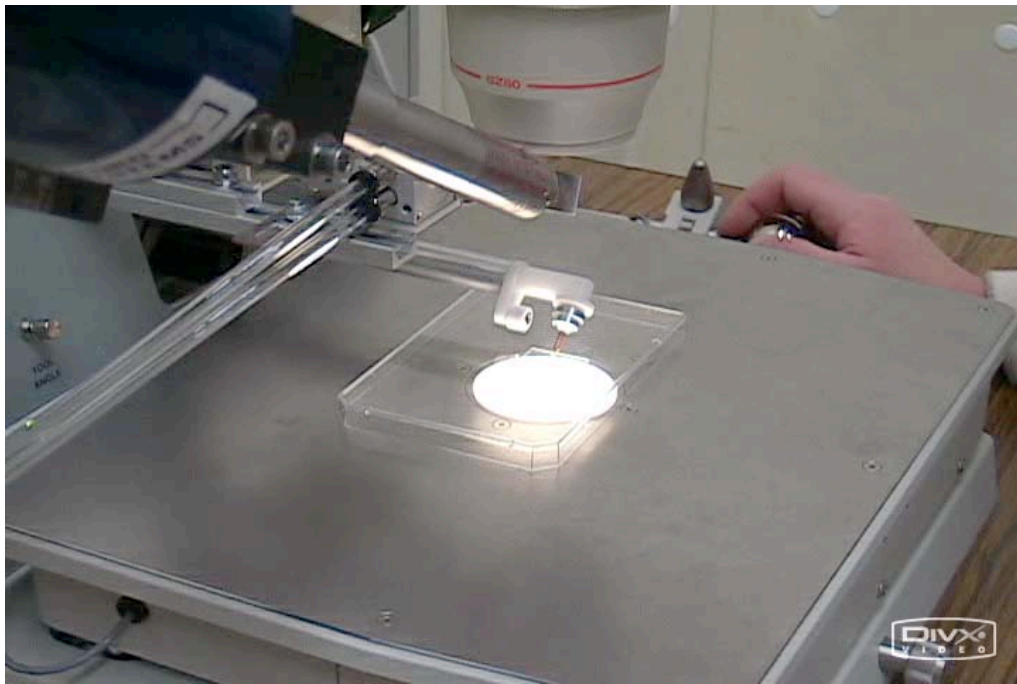
# マニピュレータ先端部



中心部分はこうなっています。

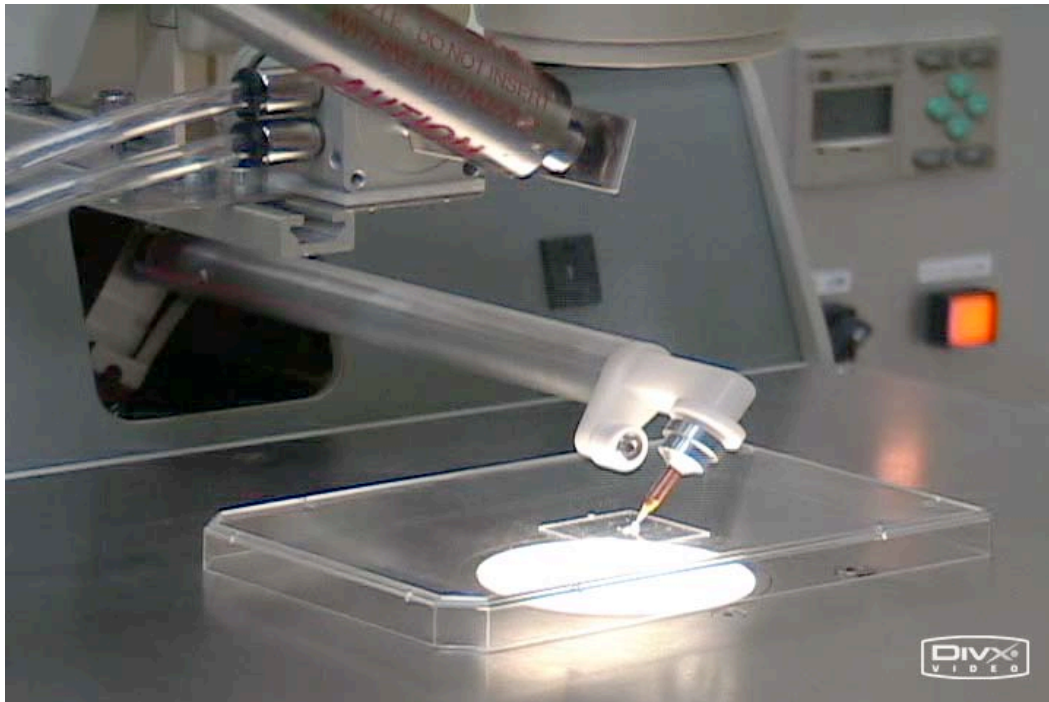
ループ部分の微量溶液の吸引除去のための配管があり、ソレノイドバルブを経て真空ポンプに繋がっています。また、圧空モーターでシャッターの開閉が出来るようになっています。

## 実際の動作(1)



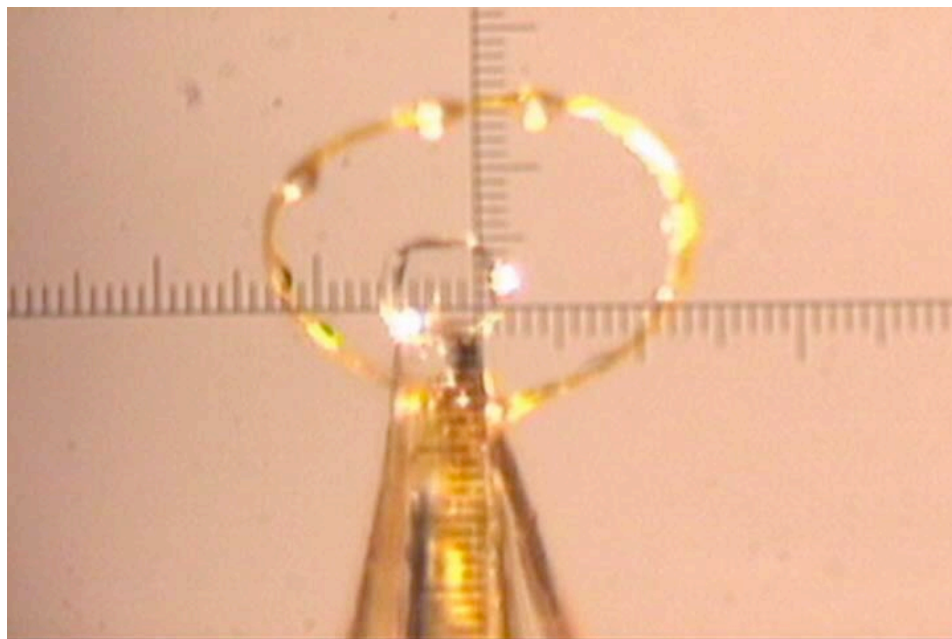
実際の動きをビデオで見て、納得して下さい。  
これは北郷君の手ですが、手でアームを動かすと、  
マニピュレータがどんな感じで動くかが分ります。

## 実際の動作(2)



今度は結晶を拾ってみているところです。  
モーターコントロールと違って、動かしているのは  
「手」なので、しゃくるような動作とか、通常結晶  
を拾う時にやっているような動きが簡単に出来ま  
す。  
慣れれば誰でも出来ます。

## 溶液除去と凍結の様子



1/10のスロー再生

最後は、結晶周辺の溶液を自動で除去して凍結させている所です。

これはそのままではちょっと早くて分りにくいので1/10のスロー再生にしてあります。

基本的には例えばこれが普及してあちこちにあったら、長波長利用がもうちょっと流行らないかなあと期待しています。



## X線結晶学の道程



山の高さは時代によって変わって来た...

次は「みなさん」の出番！

下げるべき山はまだまだある...

さて、おしまいです。

# レポート

結晶が出来た。

さあ、どんな波長のX線を使って測定しよう。

使用する波長と、簡単な考察を、A4 1ページで  
まとめて、三木先生に提出して下さい。

なんとなく私の意見の押し付けになりそうですが、レポート課題です。 . . .