

タンパク質結晶構造解析グループ (PX-UG) 紹介

茨城大学・海野昌喜 (PX-UG 代表)
 北海道大学・尾瀬農之 (PX-UG 幹事)
 東京理科大学・西野達哉 (PX-UG 幹事)
 産業技術総合研究所・沼田倫征 (PX-UG 幹事)
 京都大学・藤橋雅宏 (PX-UG 幹事)
 量子科学技術研究開発機構・平野優 (PX-UG 幹事)
 東京大学・鯨井智也 (PX-UG 幹事)
 富士フイルム株式会社・藤川乃り映 (PX-UG 幹事)

1. PX-UG の歴史

タンパク質結晶構造解析グループ (PX-UG) は、1999 年度に三木邦夫先生 (京都大学・現名誉教授) を代表として発足しました。その当時、PF 所内には坂部知平先生のグループがあり、タンパク質結晶用ビームラインのユーザーには仮想的なグループ意識はあったようですが、正式にユーザーグループを立ち上げることになったようです。三木先生はその後 2016 年 3 月まで長きにわたって PX-UG の代表を務められましたが、その年の量子ビームサイエンスフェスタの時に、清水敏之先生 (東京大学) に代表職が引き継がれました。また、そのタイミングで若手ユーザーを中心とした「幹事会」が発足し、ユーザー側の意見や要望を吸い上げ実質的に PF の装置グループに伝えたり、装置グループと協力して講習会を企画・開催するようになりました。幹事会は、全国の大学や研究機関の若手、企業のユーザー 8 名で構成されました。幹事会では PX-UG のホームページを作製し、活動記録や講習会の資料を適宜公開して、ユーザーが情報を共有できるようにしました。清水先生が PF-UA 会長に就任された 2018 年 4 月からは海野 (茨城大学) が PX-UG の代表を仰せつかっております。また同時に、幹事会のメンバーのうち 3 名が入れ替わり、現在、第二期の新たな幹事会 (上記) を構成しています。今後、一定期間ごとにメンバーを少しずつ入れ換えながら多くのユーザーに活動に関心を持っていただき、活動の幅を広げていきたいと考えています。

2. PX-UG の活動

PX-UG は PF-UA の下にあるユーザーグループの中でも最大の会員数から構成されています。正確なメンバー数を把握することはできませんが、有効課題数を参考に換算すると、700 名程度であると考えられます。これまで PX-UG では量子ビームサイエンスフェスタの開催に合わせて会合を開いてきましたが、その他に幹事会を中心として企画した講習会も開催してきました。

PX-UG のホームページの URL は (<http://research.kek.jp/group/pxpflug/>) で、そこにも紹介しておりますが、現在まで 3 回の「中級者講習会」を開催しました (表 1)。

中級者講習会には、毎回 100 名程度の人が参加します。学生も教員も研究員も、まさに「今更聞けない」ことを貪欲に学びたいという方々が集まります。写真は 2018 年 10 月に開催した第 3 回の中級者講習会の様子です (図 1)。今年は新たな試みとして、プログラムのインストールや実際にソフトウェアを使って実践的な構造解析を体験しました。参加者の皆さんには大好評だったと思います。この活動は今後も続けていきたいと思っています (本誌 p.22 参照)。

3. タンパク質結晶構造解析用ビームライン

PF、PF-AR には 5 本のタンパク質結晶構造解析用ビームライン (BL-1A, BL-5A, BL-17A, AR-NE3A, AR-NW12A) があります。それぞれのビームラインの特徴は以



図 1 第 3 回タンパク質結晶構造解析ビームラインユーザー中級者講習会の様子 (2018 年 10 月)

表 1 タンパク質結晶構造解析ビームライン中級者講習会

開催年月日	会場	講習会内容	講習会 HP
2016 年 6 月 24 日	東京医科歯科大学 湯島キャンパス	第 1 回「今更聞けないビームラインの使い方」	http://pfwww.kek.jp/tanpaku/chukyu/1st.html
2017 年 10 月 25 日	東京大学薬学部	第 2 回「今更聞けないデータ処理プログラムの使い方、上手な回折データの取り方」	http://pfwww.kek.jp/tanpaku/chukyu/2nd.html
2018 年 10 月 27 日	東京理科大学 葛飾キャンパス	第 3 回「タンパク質結晶構造解析ソフトウェアの使い方について学ぶ」	http://pfwww.kek.jp/tanpaku/chukyu/3rd.html

下です。

- BL-1A, BL-17A: 微結晶用および低エネルギー SAD (単波長異常分散) 法用ビームライン

- BL-5A, AR-NE3A, AR-NW12A: 巨大分子 (大型格子) 用・高分解能用・ハイスループット用ビームライン

タンパク質のX線結晶構造解析には、特徴的に格子定数が大きいことやX線による照射損傷の問題があります。また、反応を触媒する酵素の場合には、ただ単にタンパク質の構造を解明するだけでなく反応中間体など様々な状態の構造を明らかにする必要がある場合があります。それに加えて、結晶構造解析の普遍的な課題である「位相問題」があるため、これらのビームラインをうまく選択し駆使して構造を解析していきます。通常、タンパク質のX線結晶構造解析を行う場合、回折実験で用いる入射X線の波長は1 Å 近辺のものですが、位相問題を解決するために波長を変更して使います。また、重原子等、タンパク質結晶中に導入した特殊な元素由来の吸収端波長を実験的に求めるため、各ビームラインには蛍光X線検出器が備え付けられています。さらに、タンパク質中の天然の硫黄の異常散乱を利用したい時には長波長X線を用います。BL-1A では最長3.3 Å の波長のX線を利用することもできます。また、酵素の反応中間体やタンパク質結晶のX線照射ダメージを観察するため、AR-NW12A では、ビームライン近くに結晶用の分光光度計が備えられています。

各ビームラインには、低温室素吹付装置の他、結晶マウント用のロボットが標準で装備されており、それを制御するためのソフトウェアも GUI でユーザーが簡単に使えるようになっています。また、現在は全てのビームラインにピクセルアレイ型検出器が導入され、より速くより高感度にデータを収集することができるようになってきています。

4. 構造生物学分野を取り巻く状況とこれからのPX-UG

タンパク質結晶構造解析は「構造生物学」分野の中で最も強力な手法の一つです。構造生物学分野では2002～2006年度の文科省のプロジェクト「タンパク3000」、2007～2011年度の「ターゲットタンパク研究」、2012～2016年度の「創薬等支援技術基盤プラットフォーム (PDIS)」、2017年度～「創薬等先端技術支援プラットフォーム (BINDS)」というように大きなプロジェクトが動くことによって、装置や手法・ソフトウェアの高度化など、分野全体の進展がありましたし、現在も発展し続けています。特に、2013年にクライオ電子顕微鏡 (クライオEM) でのタンパク質構造解析において電子の直接検出カメラの導入などもあり「分解能革命」が起こったことで、構造生物学分野の様相が変わってきました。ご存知のように2017年には「クライオ電子顕微鏡の開発」がノーベル化学賞を受賞しています。PX-UGもこれに無関係ではなく、(溶液) 小角散乱やクライオEM、各種分光学的手法や量子化学計算・ビッグデータなどを相補的・複合的に使うことをより一層意識するようになってきました。PX-UGのメンバーは、加速する「生命の神秘の解明」に深くかかわっていると言

えます。

タンパク質の結晶構造解析には、より速くより精密に構造を可視化することが求められていると思います。PFでは構造生物学研究センターおよびビームライン担当者、PF施設側の不断の努力によって、ルーティンの測定については完全自動化が行われるようになりました。また、リモート制御における遠隔実験も行われています。今後、この流れは一層加速していくと思われます。

タンパク質結晶構造解析において放射光施設の利用は必要不可欠なものであります。しかしながら、予算削減に伴うビームタイムの減少はユーザーの皆が実感しているところではないかと思えます。ビームタイムの減少は、論文数にも反映されており、欧米と比較して遅れを取っていると言えますし、アジアの中の地位も相対的に下がってきているのが現状です。将来にわたって安定的に放射光施設を利用するためにも現在我々が真剣に考えていかなければならない問題が山積しています。PX-UGは設立の目的にもありますように、お互いの交流を通して構造生物学研究を推進することを第一の目的としていますが、このような昨今の状況にも目を向けざるを得ません。今後も高いアクティビティを保っていくためにも、PX-UGとして多くのユーザーの意見を集約して積極的に発言をしていく必要も出てくると思います。また、他のPF-UAのグループや新たな手法を用いるコミュニティとも積極的に交流し、情報を取り入れ、PX-UGを益々発展させていく必要があります。

X線発光ユーザーグループ紹介

弘前大学 手塚泰久

1. 概要

X線発光ユーザーグループ (UG) は、設立当初「軟X線発光UG」でしたが、後に硬X線発光ユーザーも含めて現在のUGになりました。現在使用している軟X線発光分光器は、1996年に物性研グループがS課題でBL-2Cに建設し維持管理していたものです [1]。それを、2003年に手塚が代表を務める軟X線発光UGが引き継いで今に至ります [2]。以降、発光分光器の維持管理及び共同利用の対応は、軟X線発光ユーザーグループが行っています。また、UGの有志メンバーによって装置の改造がなされ、データ取得の効率化や、使いやすさの向上が図られました。2010年からはBL-2Cの発光分光器をUG運営ステーションとして運営していましたが、BL-2Cの廃止とともに終了してしまいます。その後、発光分光器は移動可能に改造され、BL-16やBL-13での実験を行っています。PFでの共同利用実験に関しては引き続きUGが運営をしています。PFでの責任者として足立純一さんに維持管理をお引き受けていただいています。

硬X線発光分光装置 (通称エスカルゴ) は、BL-2Cの発光分光器とほぼ同時期に当時PFの職員だった岩住さん(大

阪府立大)によって建設されました。しばらくは共同利用に供されていましたが、岩住さんが異動されるとともに、維持管理をUGが行うこととし、UG名も広くX線発光UGとすることにしました。ここでもPFでの責任者を杉山弘さんにお引き受けいただいています。以前は、BL-28やBL-15での実験も行っていました。現在はBL-7Cでの利用のみになっています。

軟X線発光、硬X線発光共にUGが維持管理を行い、共同利用への提供にも尽力しています。装置の利用には移動・立ち上げが必要なためUGの関与が必要であることや、共同利用のやり方が外から見えづらいためでもあります。発光分光器の利用をお考えの方はUGにご相談いただければと思います。以下、これまでの成果をいくつかご紹介いたします。発光分光は、photon-in/photon-outの実験ですので、試料の伝導性がなく、絶縁体や表面処理が難しいナノ粒子の電子構造の研究に適しています。

2. 軟X線発光

BL-2Cの発光分光器は、偏光依存性測定のために作られた分光器です[3]。BL-2Cは直線偏光のアンジュレータビームラインでしたので、偏光依存性を測定するために発光分光器は放射光ビームを軸に回転するように作られています。励起光と同じ偏光を含んでいる発光(偏光保存/polarized)と、同じ偏光を含まない発光(偏光非保存/depolarized)の2配置で測定できます。ただし、現在は偏光可変のビームラインで実験していますので、分光器の回転は使用していません。

図1は、 Ti_2O_3 のTi 2p共鳴発光スペクトルの偏光依存性です[4]。(a)はTi 3d → 2p発光(図のエネルギー範囲)をプローブする部分発光収量法で測定したTi 2p吸収スペクトル(PPY)とそこに含まれている弾性散乱成分を除いたもの(EOPY)です。それぞれ、実線が偏光保存(pol.)配置、青丸が偏光非保存(depol.)配置でのスペクトルを示しています。(b)、(c)は吸収の各エネルギーで励起した発光スペクトルで、それぞれ偏光保存と偏光非保存配置での測定結果を等高線表示にしたものです。図の横軸は励起エネルギー、縦軸が発光エネルギーで、図を縦にスライスしたものが、個々の発光スペクトルに対応しています。吸収端以上の励起エネルギーで観測される蛍光線($L_{\alpha_{1,2}}$, L_{β_1})が発光エネルギー一定で観測されているのに対して、ラマン散乱が励起エネルギーの変化とともに発光エネルギーを変化させて観測されています。弾性散乱ピークは、(b)の偏光保存配置でのみ観測され、偏光非保存配置では観測されていません。ラマン散乱には2種類の励起が観測されており、低エネルギーの励起はdd励起、やや高エネルギーに観測されているのは電荷移動(CT)励起とみなされ、それぞれさらに複数のピークが観測されています。これらのデータから、特定の蛍光線の部分だけを切り取れば、寿命フリーの高分解能吸収スペクトルが得られ、ラマン散乱の素励起の部分を取り除くとその素励起の励起エネルギー依存性が得られます。吸収スペクトルだけでは判然としない

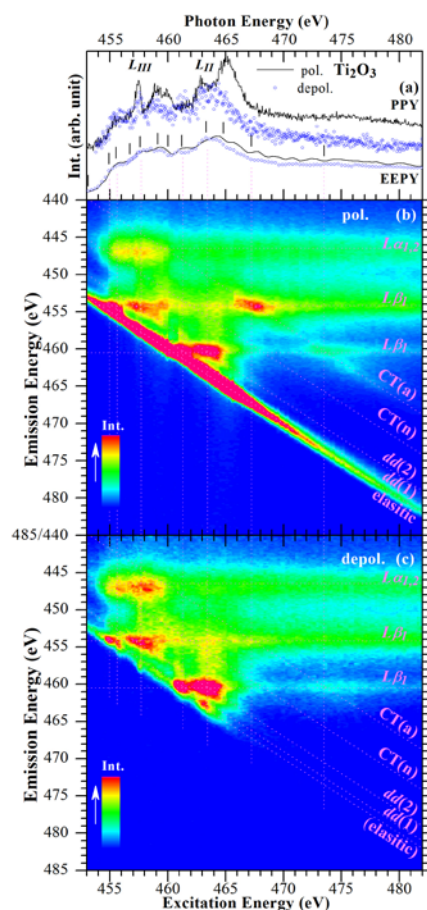


図1 Ti_2O_3 のTi 2p共鳴X線発光スペクトル。異なる偏光配置で測定したスペクトルを等高線表示にしてある。

素励起の挙動が明らかになり、物性研究上貴重な情報が得られます。

この結果は、以前にビームラインとの同期が取れていたBL-2Cで測定したもので、現在はこのような細かい測定はできないのが現状です。今後、BL-16やBL-13でもビームラインとの同期の可能性を探り、また詳細測定が可能になるように努めていきたいと考えています。一方で、BL-2Cは直線偏光のみであり、偏光依存性は分光器を回転させることで測定しました。現在BL-13やBL-16は偏光可変のビームラインですので、分光器との同期が取ればより精度の高い実験が可能になると考えられます。

図2は、酸化バナジウム V_2O_3 ナノ結晶(粒径: 10 nm程度)の、O K XAS(発光収量)とSXESスペクトルです[5]。同時に測定したミクロン粒子については、室温と低温(65 K)のXASスペクトルで明瞭なスペクトルの変化が見られ、約160 Kで起こる金属絶縁体転移の発現が確認できる一方で、ナノ結晶については、室温と低温(58 K)でスペクトルに変化が見られず、金属絶縁体転移が消失していることが示されました。また、ナノ結晶では、530 eVの $\text{V } 3d a_{1g}$ ピークの幅が大きく変化しており、低エネルギーの e_g^* バンドとの重なりを大きくし、金属相の安定化を促し、金属絶縁体転移を消失させたと考えられます。

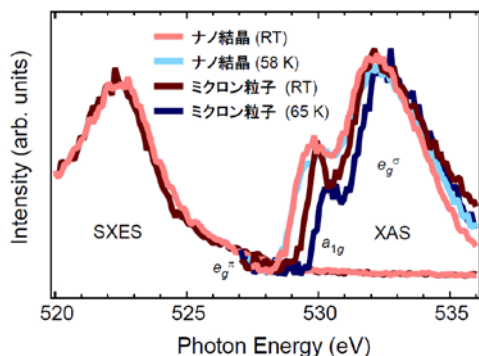


図2 V_2O_5 ナノ結晶の、 OK XAS と共鳴 SXES スペクトル。

3. 硬X線発光

図3は、硬X線発光分光装置で測定した、 TiO_2 の $Ti K$ 共鳴X線ラマン散乱 (XRS) の結果と種々の分光スペクトルの比較です [6]。(e)は、以前に測定した逆光電子スペクトルですが、XAFS スペクトルと構造が対応していて、電気双極子遷移 (ED) と言われている構造がバンドの $3d$ 構造に対応していることがわかります。(d)が $Ti K$ 端における XAFS スペクトルです。主構造は $Ti 4p$ の状態を示していますが、吸収端には $Ti 3d$ への四重極遷移 (EQ) が観測されています。その吸収端直下と、更に $4 eV$ 低いエネルギーで励起した XRS が、それぞれ (b) と (c) に示されています。(b) は $3d$ 状態への共鳴条件で、(c) は非共鳴条件に近いスペクトルになります。このラマン散乱で観測している素励起は、内殻 $2p$ から非占有準位への励起で、エネルギー損失は $450 eV$ 程度になります。エネルギーが一定である内殻からの励起を観測することで、非占有準位の状態密度を反映したスペクトルが得られます。ラマン散乱の選択側から非共鳴条件では非占有 $4p$ への励起 (単極子) が観測され、 $3d$ に共鳴したときには本来禁制である $3d$ への

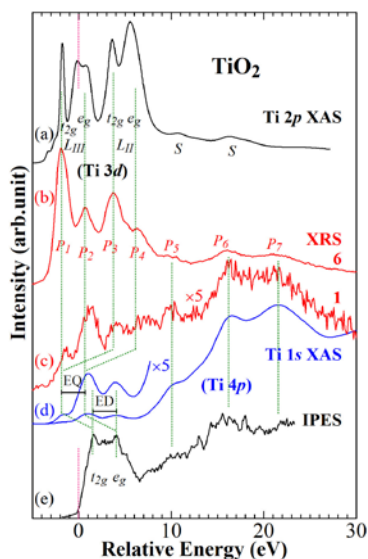


図3 TiO_2 の $Ti K$ 共鳴X線ラマン散乱スペクトルと種々の分光スペクトルとの比較。

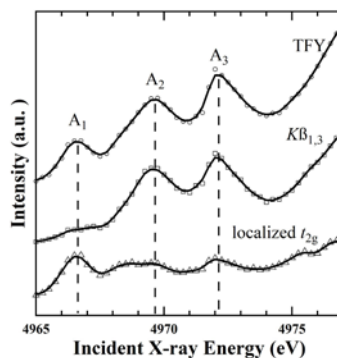
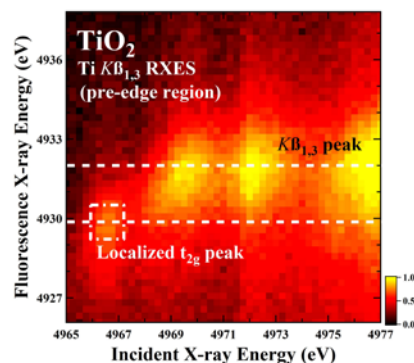


図4 TiO_2 の $Ti L\beta_{1,3}$ 共鳴発光スペクトルの二次元強度図(上図)と、全蛍光収量 (TFY) および各蛍光線強度で得られるX線吸収スペクトルの比較 (下図)。

励起 (双極子) が活性化され共鳴増大しています。(a)のスペクトルは、 $Ti 2p$ 吸収スペクトルで非占有 $3d$ 状態を示していますが、(b)のスペクトルが非常に似ていることがわかります。このように内殻励起によるXRS測定は、非占有準位の状態密度の測定に有効で、異なる状態を同じ条件下で測定できることが大きな利点であります。また、XAFS スペクトルでは高エネルギー側に EXAFS 振動が重なりますが、XRS ではそれがなく、生のバンド構造が観測されていると考えられます。XRS は、単結晶の測定ができたり、絶縁体の測定ができたりすることを考えると、応用範囲はかなり広く、物性研究に有効に適用できるものと考えています。

硬X線発光では最近、自動測定が可能になりました。広島大の中島さんを中心に、PFの野澤さんの協力のもと、ビームラインとの同期がとれるようになり、連続で発光スペクトルの測定が可能です。図4は TiO_2 での結果です。上図は、 $Ti K$ 端のプリエッジ近傍で観測した $Ti L\beta_{1,3}$ スペクトルを、入射光エネルギーを横軸に、蛍光X線エネルギーを縦軸にして示したカラーマップです。下図は、全強度を横軸 (入射X線軸) に射影して得られる全蛍光収量スペクトル (TFY) と、 $L\beta_{1,3}$ 線近傍の強度だけをトレースしたスペクトル、さらに局在 $3d t_{2g}$ 準位近傍の強度だけをトレースしたスペクトルです。蛍光X線を高分解能で測定することで、これまで実験的に明らかにできずにいた局在的な電子状態などを効率的に選別して議論することが可能になります。これは HERFD-XAFS (High energy resolution

fluorescence detection XAFS) として、昨今欧米を中心に、新たな物性研究へのアプローチとして利用されています。

- [1] Y. Harada, *et al.*, J. Synchrotron Rad. **5**, 1013 (1998).
- [2] PF NEWS Vol. **27** No. 1 MAY 2009
- [3] http://pfwww.kek.jp/users_info/station_spec/apparatus/softxray_bunkoki.html
- [4] Y. Tezuka, *et al.*, J. Soc. Phys. Jpn. **86**, 124713 (2017).
- [5] Y. Ishiwata, *et al.*, Phys. Rev. **B86**, 035449 (2012).
- [6] Y. Tezuka, *et al.*, J. Soc. Phys. Jpn. **83**, 014707 (2014).

平成 30 年度第 2 回 PF-UA 幹事会・運営委員会 議事録

日時：平成 30 年 11 月 12 日 15:00 ~ 17:00

場所：高エネルギー加速器研究機構つくばキャンパス
4 号館 1 階セミナーホール

出席者：[幹事会] 清水敏之 (会長), 植草秀裕 (庶務), 伏信進矢 (行事), 平井光博 (戦略・将来計画), 阿部善也 (推薦・選挙管理), 上久保裕生 (共同利用), 奥田浩司 (教育), 北島昌史 (書記・行事) [運営委員会] 東善郎, 一國伸之, 鍵裕之, 小林寿夫, 腰原伸也, 佐藤友子, 志村考功, 鈴木昭夫, 手塚泰久, 宮脇律郎, 山口博隆, 横谷明德, 足立伸一, 雨宮健太, 船守展正

・会長挨拶 (清水 会長)・議事次第紹介 (植草 庶務幹事)

【報告事項】

- ・行事報告
 - ・量子ビームサイエンスフェスタ (QBSF) 日程 3/12 ~ 13 会場 エポカルつくば
 - ・PF-UA の集い 日程 1 月 11 日 会場 JSR2019 福岡国際会議場
- ・編集・広報報告 PF news の PF-UA だよりでの UG 紹介を掲載再開
- ・施設報告
 - ・PF highlight2017, 年報 2017 を公開
 - ・平成 30 年度 PF, PF-AR の運転時間
 - ・PF-AR の 5 GeV 運転の検討について
 - ・PF BL-19 建設について
 - ・物構研と加速器の改組について

【協議事項】

- ・新 UG 設立申請
 - ・原子力基盤研究 UG の新設について PF 側担当者より説明があり, 承認された。
- ・PF-UA 会則・細則について, 下記の方針に従った改定案が提案され協議を行った。
 - ・個人情報の取扱の厳格化
 - ・会員資格の整理, 実態に即した項目, 文言の整理・修正協議の結果, 改定案に示された改定の方向性を認め, 引き

続き細部の検討を進めることとした。

- ・今後の予定
- ・会則・細則の改定について, 意見を 12 月中に集約し, 運営委員会による改定案を決定
- ・2019 年 3 月の総会で改定案議決
- ・JSR2019 で PF-UA の集い開催 (2019 年 1 月 11 日)
- ・量子ビームサイエンスフェスタ (2019 年 3 月) にて PF-UA 総会開催

平成 30 年度第 3 回 PF-UA 幹事会・運営委員会 議事録

日時：平成 31 年 1 月 11 日 10:30 ~ 11:30

場所：福岡国際会議場 会議室 1 (404)

出席者：[幹事会] 清水敏之 (会長), 植草秀裕 (庶務), 奥田浩司 (教育) [運営委員会] 横谷明德, 手塚泰久, 雨宮健太, 足立伸一, 船守展正

- ・会長挨拶 (清水 会長) に続き, 庶務幹事が議事次第を紹介し, 進行役を務めた。

【報告事項】

- ・行事報告
 - 2018 年度 量子ビームサイエンスフェスタ (<http://qbs-festa.kek.jp/2018/>) の開催について報告した。日程は 2019/3/12 ~ 13, 場所はつくば国際会議場である。3/11 に UG ミーティング, 3/12 に幹事会・運営委員会, 3/13 に総会を予定している。企業展示・協賛会員の現状について報告した。
- ・施設報告 (船守 委員)
 - PF-AR の 5 GeV 運転, 次年度の運転に係る事項, 物構研と加速器の改組について, BL-19 整備状況について報告した。
- ・PF-UA の集いの議事の確認
 - 1/11 日午後に開催される PF-UA の集いの議事を確認した。

【協議事項】

- ・PF-UA 会則・細則について
 - 2018 年 11 月 12 日の PF-UA 幹事会・運営委員会で協議し改定の方向を認めた原案について, さらに細部を検討して改定案とし, 2019/1/7 まで運営委員による意見を集約した経緯を紹介した。協議の結果, 先の改定案を PF-UA 総会に提出することとした。総会に先立って改定案は PF-UA ホームページで公開する。
- ・IMSS と PF-UA の相互協力に関する覚書について
 - 覚書の内容を紹介し, 会則・細則の改定後に物質構造科学研究所所長と取り交わすこととした。
- ・その他
 - 総合討論を行い, 今後の予定を確認した。

平成 30 年度 PF-UA の集い 議事録

日時：平成 31 年 1 月 11 日 12:00 ～ 13:00

場所：福岡国際会議場 C 会場

- ・ 会長挨拶（清水 会長）に続き、庶務幹事が進行役を務めた。
- ・ 2018 年度 量子ビームサイエンスフェスタ (<http://qbs-festa.kek.jp/2018/>) の開催について報告した。
- ・ PF-AR の 5 GeV 運転，次年度の運転に係る事項，物構研と加速器の改組について，BL-19 整備状況について報告した。
- ・ PF-UA 会則・細則改定について，運営委員会における協議の経緯と改定の概要を説明した。改定案は PF-UA ホームページに公開される。
- ・ IMSS と PF-UA の相互協力に関する覚書について紹介した。
- ・ その他総合討論を行った。