

シリアルフェムト秒結晶構造解析における結晶導入法

菅原道泰

国立研究開発法人理化学研究所放射光科学総合研究センター SACLA 利用技術開拓グループ
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

登野健介

(公財) 高輝度光科学研究センター XFEL 利用研究推進室先端光源利用研究グループ実験技術開発チーム
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

南後恵理子

国立研究開発法人理化学研究所放射光科学総合研究センター SACLA 利用技術開拓グループ
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

岩田 想

国立研究開発法人理化学研究所放射光科学総合研究センター SACLA 利用技術開拓グループ
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
国立大学法人京都大学大学院医学研究科 〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町

■ 解説

X線自由電子レーザー (XFEL) を用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX) は、ランダムな配向の微結晶を X線レーザー照射ポイントに連続的に供給し、多数の結晶からの回折イメージを収集して構造解析を行う。XFEL の非常に強力な X線パルスにより、照射後試料は崩壊するが、放射線損傷によって化学結合が切断されるより短い時間 (<10 fs) でデータを測定するため、放射線損傷が無視できる構造を得ることが可能である。XFEL 施設 SACLA ではタンパク質結晶の連続供給から回折イメージ収集まで行うことができる SFX 実験システム DAPHNIS を開発し、結晶を含む液状試料をそのまま液体ストリームとして吐出する液体ジェットインジェクターに加え、最近では高粘度媒体で結晶を懸濁させることで低速で安定に吐出できる手法を見出し、その高粘度試料専用インジェクターを導入した。結果として、従来の液体ジェット法と比べて試料消費量が 1/10~1/100 の 1 mg 以下でのタンパク質結晶構造の決定が可能になった。

1. はじめに

X線自由電子レーザー (XFEL: X-ray Free-Electron Laser) は超高輝度、極短パルス、高空間コヒーレンスという特徴を有している。生物試料を対象とした研究では、XFEL によるタンパク質結晶の X線構造解析、非結晶試料からのコヒーレント X線回折イメージング等の研究が展開されている。現在、稼働中の XFEL 施設は、理研の「SACLA (SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser)」と米国 SLAC 国立加速器研究所の「LCLS (Linac Coherent Light Source)」があり、また欧州やアジアの国々で XFEL 施設の建設計画が進行中である。SACLA の光は SPring-8 と比較して 10 億倍もピーク輝度が高いため、1 パルスの照射により測定試料は崩壊してしまうが、10 フェムト秒以下という超短パルスゆえに、試料が壊れる前の回折イメージを検出できる (diffraction-before-destruction と呼ばれている)。この XFEL の特性を利用した主なタンパク質の構造決定法として、シリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX: Serial Femtosecond

Crystallography)¹⁾が注目されている (Fig. 1a)。SFX ではランダムな配向のタンパク質結晶を X線レーザー照射ポイントに連続的に供給しながら、多数の結晶からの各回折イメージを収集して構造解析を行う。その特徴として、①連続して試料を供給するために微小結晶 (一般には 30 μm 以下) を用いる。②試料の放射線損傷低減のために 100 K 程度の条件下で行う従来の回折実験とは異なり常温で行う。そのため、生理条件 (生体内) に近い条件でタンパク質立体構造を得ることができる。また、極短パルスの X線レーザーを使用するため③放射線損傷が無視できる状態での構造解析が可能であり、④フェムト~ピコ秒単位での時分割実験が行える。しかしながら、SFX は新しいタンパク質構造解析法であるため、その手法・技術はまだ開発段階にあり、特に X線レーザー照射ポイントに微結晶を一定の流速で安定に無駄なく導入することは難しく、結晶導入法の確立が急務であった。そこで本稿では現在 SACLA での SFX 実験で導入されている連続結晶供給法について紹介する。

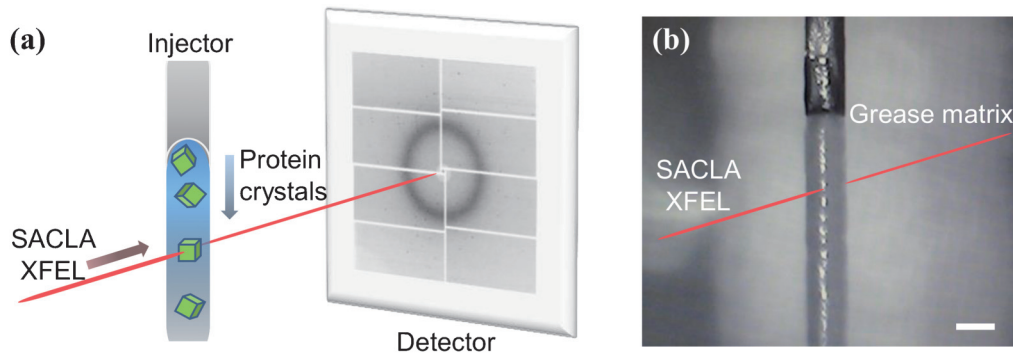


Fig. 1 (Color online) Serial femtosecond crystallography. (a) Fresh nano-/micro-crystals are supplied for subsequent X-ray pulses to continue data acquisition. (b) Sample extrusion of the grease matrix through an inner diameter $110\ \mu\text{m}$ nozzle. Grease matrix was extruded as a continuous column to intersect with the XFEL beam. Scale bar represents $240\ \mu\text{m}$.

2. SFX における結晶導入法

SFX では、主に液体ジェットインジェクターと呼ばれる装置から噴出される多数の微結晶を含む液体ストリームに X 線レーザーを照射する（液体ジェット法）。液体ジェットインジェクターは、世界で最初に行われた SFX 実験に導入され、LCLS では現在でも主流のインジェクターとして用いられている。本インジェクターでは、吐出された液体ストリームの径をヘリウムガスにより絞り込むことで、溶液からの散乱バックグラウンドノイズ、および試料消費量を低減でき、さらに試料が途切れることなく直線状の安定した液体ストリームを形成できる。我々は SACLA で開発した液体ジェットインジェクターを用いて、これまでサイズ $1\ \mu\text{m}$ のリゾチーム結晶から $2.4\ \text{\AA}$ 分解能での構造解析に成功している。ただし、液体ジェット法ではサンプルストリームを安定に保つために速い流速（ $10\sim 300\ \mu\text{l}/\text{min}$ 程度）で試料を吐出する必要がある。この方法では、一般に結晶構造を決定するには $10\sim 100\ \text{mg}$ のタンパク質を必要とする。しかしながら、回折イメージを収集する際、X 線レーザーにヒットする結晶の数は全結晶の 0.01% 程度のため、ほとんどの結晶が無駄になる。さらに、ガスフォーカスで用いるヘリウムガスが常時試料溶液に吹き付けられるため、高濃度塩を含む試料ではインジェクターノズル付近で塩結晶が析出し、その結果、サンプルストリームを乱すことも問題である。

最近になって、高粘度試料をそのままインジェクターから吐出することで、大幅に試料消費量を低減した結晶導入法が報告された²⁾。Lipidic Cubic Phase (LCP) 法は膜タンパク質をターゲットとした結晶化法の 1 つであり、サイズが小さいが高分解能の回折能を有する結晶を多数析出する傾向があるため、SFX に適した結晶を得ることができる。この方法では、モノオレインなどの脂質と膜タンパク質を LCP へと再構成し、沈殿剤を加えて結晶化を行うことから、一般的に結晶は高粘度環境下で析出する。試料

をインジェクターから $0.3\ \mu\text{l}/\text{min}$ 以下の低速で吐出すると、低粘度の溶液では液滴になってしまい連続に出すことは困難であるが、析出した結晶を含む LCP は高粘度ゆえにカラム状で連続的に押し出すことが可能である。結果として、この方法で試料導入を行うと、非常に少量の試料（ $1\ \text{mg}$ 以下）で構造決定に必要なデータが収集できる。一方で、全てのタンパク質結晶を LCP 法により得るのは困難であり、他の結晶化法から得た結晶でも少ない試料消費量で SFX 実験ができる結晶導入法が必要である。

そこで我々は、蒸気拡散法などで結晶化した水溶性、および膜タンパク質結晶試料を高粘度化するための技術開発を行った。具体的には、結晶輸送媒体としての高粘度物質とタンパク質微結晶を混ぜ合わせることで、結晶を X 線レーザーの照射ポイントに低流速で供給する手法を検討した。その際、高粘度物質に必要とされる以下の条件を考慮した。タンパク質結晶と混合しても結晶に損傷を与えないこと。高濃度の塩や多種多様の試薬を含む結晶溶液と混合しても、インジェクターから安定に試料を流せること。結晶輸送媒体由来の散乱バックグラウンドノイズが低いこと。また、インジェクターノズルでの目詰まりを起こさないために、結晶輸送媒体内で微結晶が凝集せず均一に分散すること。最初に我々は結晶輸送媒体としてハイドロゲルの導入を試みたが、水溶性媒体の使用は浸透圧により結晶に損傷を与えることが問題となった。そこで、水溶性物質とは異なる高粘度媒体を調査した結果、タンパク質結晶の輸送媒体として鉱物オイルベースのグリース（#761, AZ Co.）が利用できることを見出し、これを高粘度試料専用インジェクターに充填して測定する方法「グリースマトリックス法」³⁾を開発した（Fig. 1b）。従来の X 線結晶構造解析においては、タンパク質の放射線損傷を低減させるために結晶の凍結処理を行う。その際、オイルはタンパク質結晶の汎用的クライオプロテクタントとしてよく用いられており、多くの場合タンパク質結晶に損傷を与えないことが知られている。したがって、オイルベースのグリースは、SFX

における汎用的高粘度結晶輸送媒体となることが期待できた。

3. DAPHNIS を用いた SFX

SACLA での SFX は、汎用的実験システム DAPHNIS (diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA) を用いて行っている⁴⁾。DAPHNIS システムは、サンプルチャンバー、各種サンプルインジェクター、および multi-port charge-coupled device (MPCCD) 検出器⁵⁾ により構成されている (Fig. 2)。これら一連の装置を一つのシステムとして構築したことで、SACLA 実験ハッチ内への迅速な搬入・設置を可能にし、限られたビームタイムを効率よく利用することができる。また、米国 XFEL 施設の LCLS では空気散乱を防ぐために真空サンプルチャンバーを導入しているのに対し、DAPHNIS のサンプルチャンバー内は大気圧ヘリウム雰囲気環境下のため、迅速、かつ容易に測定試料を交換することができる。そのチャンバー内は温度 26°C、湿度 80~99% に保たれているが、実験目的、または測定試料に応じて調整が可能である。また、MPCCD 検出器は、測定試料の飛散、および不要な光の入射を防止するために、サンプルチャンバーとベリリウムウィンドウで仕切られている。

現在、我々は液体ジェットインジェクターに加えて、LCP、およびグリースマトリックス法で使用する高粘度試料用インジェクターを開発し、DAPHNIS を用いた SFX で使用している。初期型の高粘度試料用インジェクターにおいては、ハミルトンシリンジに試料を充填し、プランジャーをモーターで駆動することでニードルから試料を吐出するというシンプルな機構を導入した。また、最近開発した第二世代の高粘度試料専用インジェクターでは、HPLC ポンプにより水圧でシリンダーを押すことで試料を吐出する機構になっている。このインジェクターはヘリウムガスによるストリームガイド機能を有しているため、

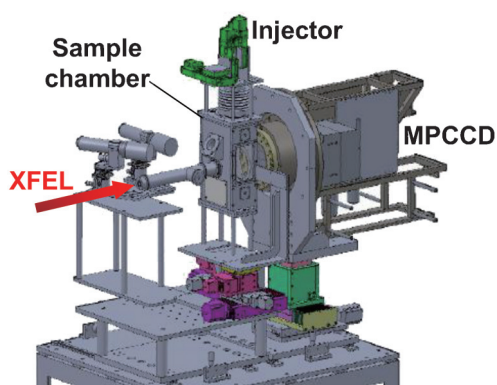


Fig. 2 (Color online) The DAPHNIS system. The experimental system DAPHNIS consists of a sample chamber, injectors and an MPCCD detector with eight sensor modules.

ノズル先端部での試料の巻き付きを防止し、直線状のストリームを形成することができる。さらに、サンプルカートリッジにより試料の充填を行うため、効率良く測定試料を交換することができる。また、恒温水循環システムにより、試料充填部は 4~20°C の任意の温度で保持できる。

4. グリースマトリックス法を用いた回折実験、および室温結晶構造

我々は SACLA で独自に開発したグリースマトリックス法の実用性を確かめるため、リゾチーム、グルコースイソメラーゼ、ソーマチン、および脂肪酸結合タンパク質 (FABP3) の 4 種類の水溶性タンパク質の結晶 (サイズ約 7~30 μm , その一例 Fig. 3a) を用いた SFX 実験を試みた。測定は SACLA ビームライン BL3 にて DAPHNIS を用い、測定波長 1.24 Å, 繰り返し周波数 30 Hz で行った。集光したビームのスポットサイズはサンプル位置で約 1.5 μm 径 (半値全幅), パルスあたりの光子数は 7×10^{10} photons/pulse であった。各試料 30 μl 程度を内径 110 μm のノズルから吐出させ、約 1 時間の測定で約 10 万枚の回折イメージを収集した (試料流速 0.46~0.48 $\mu\text{l}/\text{min}$)。グリースマトリックス法を用いることで、良質な回折イメージ

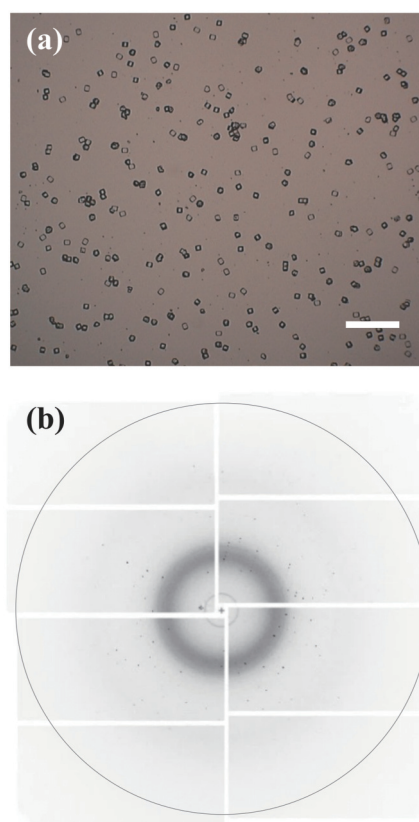


Fig. 3 (Color online) (a) Lysozyme microcrystals used for SFX measurements. Scale bar represents 100 μm . (b) A typical XFEL single diffraction pattern from grease matrix. Resolution at the edges corresponds to ~ 1.6 Å (lined circle).

ジを得ることができた (Fig. 3b)。SFX で回折イメージを処理するためのプログラム CrystFEL[®] を使用し、最終的に各試料で 1 万～3 万枚の指数付け可能な回折イメージを得た。

各タンパク質において、結晶構造の評価に十分な回折分解能 2 Å 以上の回折データセットの収集に成功し、構造を決定した。使用した各試料タンパク質は 1 mg 以下であり、従来の液体ジェット法に比べ 1/10～1/100 の試料消費量の少量化に成功した。また内径 110 μm のノズルを使用した場合、測定に最適な試料の結晶密度は 10⁷ 個/ml であった。使用した各試料は高濃度塩、もしくは高濃度のポリエチレングリコールを含んでいたが、本グリースマトリックス法においてはそれら溶液の組成に大きく影響されることなく安定に試料を流すことができた。

次に、結晶サイズ 7～10 μm のリゾチーム結晶を用いて、内径 50 μm のノズルからの試料吐出を行った。その結果、内径 50 μm のノズルでも安定にタンパク質結晶を X 線レーザー照射ポイントに供給することができ、回折分解能 2.0 Å のデータ収集、および構造決定に成功した。細い径のノズルの使用は試料消費量の大幅な低減 (内径 110 μm ノズルの場合と比較して約 1/10 の 0.1 mg 程度) に加えて、グリース由来の散乱バックグラウンドノイズの低減にも寄与する。

現在、さらなる SN 比向上を目指して、よりバックグラウンドノイズの低い結晶輸送媒体を調査している。一例として、鉱物オイルベースのグリースと比較して散乱バックグラウンドの低い合成グリース (Super Lube, #21030, Synco Chemical Co.) を導入した SFX 実験を行っている。本合成グリースを利用することで、我々は同サイズの結晶、および内径 110 μm ノズルを用いて、より高分解能の 1.6 Å 回折分解能でのリゾチームの結晶構造を得ることに成功した (Fig. 4)。一般に、クライオ条件下で 1 個のタンパク質

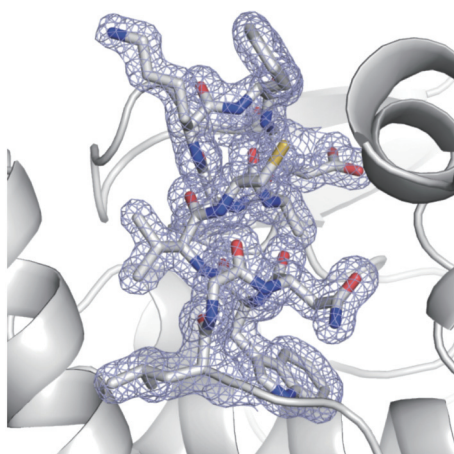


Fig. 4 (Color online) A close-up view of the lysozyme structure with a $2F_o - F_c$ electron density map (contoured at the 1.0σ level) at 1.6 Å resolution.

結晶から回折データを収集する従来の結晶構造解析法と比較し、室温環境下での数万個の結晶からの回折データを平均化する SFX では、結晶のクライオ処理による影響がなく、また各結晶固有の誤差がキャンセルされる。さらに結晶が放射線損傷を受けないため、ジスルフィド結合の解離などのない“より天然状態を反映した”電子密度マップが得られる傾向がある。SFX により得られる結晶構造の特徴の詳細は今後徐々に明らかになるであろう。また、グリースマトリックスを用いた SFX を進めていく中で、グリースが結晶に損傷を与える試料も幾つか見つかっている。その対策として、我々は浸透圧による結晶損傷を与えにくい水溶性高粘度結晶輸送媒体を既に見出している。これら油性、および水溶性媒体を使い分けることで膜タンパク質を含む様々なタンパク質の SFX 実験が可能になりつつある。

5. 終わりに

我々は、タンパク質結晶を高粘度物質のグリースに混ぜて試料供給を行う「グリースマトリックス法」の開発に成功し、高粘度試料専用インジェクターを導入した汎用的実験システム DAPHNIS を用いることで多種多様のタンパク質試料の SFX 実験を可能にした。その高粘度試料を用いることで、必要なタンパク質試料が 1 mg 以下と従来の液体ジェット法の 1/10～1/100 程度での結晶構造解析が可能になった。これまで、グリースマトリックス法により、膜タンパク質を含む 20 種以上のタンパク質試料からの良質回折データを収集し、幾つかの試料で結晶構造の決定に成功している⁷⁻⁹⁾。また中津亨博士 (京都大学) らの研究グループは、グリースマトリックス法を用いて、重原子の水銀の異常分散効果を利用した単一重原子同型置換 (SIRAS) 法による新規タンパク質結晶構造の決定に成功している¹⁰⁾。加えて我々は、重原子化が難しい試料のために、タンパク質が有する硫黄原子を利用した単波長異常分散 (S-SAD) 法による構造決定にも成功した¹¹⁾。このように SACLA では各タンパク質に応じて様々な構造解析法が利用できることを実証している。

世界各国でも SFX で使用するインジェクターの高度化が行われており、今日では XFEL のフェムト秒という超短パルス幅を活かした時分割実験が展開されている。酵素反応、また光励起などに伴うタンパク質、およびリガンドの状態変化が起きるフェムト秒～マイクロ秒間の動的過程を観察する実験が積極的に行われている。現在、SACLA では光励起に伴う一連の構造変化を観察するポンプ-プローブ実験が進行中である。DAPHNIS の高粘度試料専用インジェクターは、低速から高速までの広い領域で安定した試料の吐出が可能であるため、試料供給速度の安定性が重視されるポンプ-プローブ実験に適している。また最近では、放射光施設の X 線を利用して 10～100 ミリ秒オー

ダーの露光時間で行うシリアルミリ秒結晶構造解析 (SMX) も行われており^{12,13)}, 高粘度結晶輸送媒体を用いて行われた構造解析例も報告されている。近い将来, 実験目的に応じて手法・実験施設を選べるようになるであろう。最後に, 本研究で開発した高粘度媒体を用いたSFXは, 今後さらに重要度を増すことが期待され, また本手法はタンパク質結晶のみを研究対象として限定するものではなく, 有機, 無機物質を問わず幅広い研究対象への応用が期待できる。

謝辞

本研究は文部科学省・X線自由電子レーザー施設重点戦略研究課題の「創薬ターゲット蛋白質の迅速構造解析法の開発」(研究代表者: 岩田想)¹⁴⁾において, 理化学研究所, 高輝度光科学研究センター, 東京大学, 京都大学, 大阪大学, 兵庫県立大学, 高エネルギー加速研究機構の共同で実施された成果の一部である。特に, 高粘度媒体を用いた研究については, 溝端栄一博士(大阪大学), 鈴木守博士(大阪大学), 梶田哲哉博士(京都大学), 井上茂之博士(東京大学)らに深謝する。

参考文献

- H. N. Chapman, P. Fromme, A. Barty, T. A. White, R. A. Kirian, A. Aquila, M. S. Hunter, J. Schulz, D. P. DePonte, U. Weierstall, R. B. Doak, F. R. Maia, A. V. Martin, I. Schlichting, L. Lomb, N. Coppola, R. L. Shoeman, S. W. Epp, R. Hartmann, D. Rolles, A. Rudenko, L. Foucar, N. Kimmel, G. Weidenspointner, P. Holl, M. Liang, M. Barthelmess, C. Caleman, S. Boutet, M. J. Bogan, J. Krzywinski, C. Bostedt, S. Bajt, L. Gumprecht, B. Rudek, B. Erk, C. Schmidt, A. Homke, C. Reich, D. Pietschner, L. Struder, G. Hauser, H. Gorke, J. Ullrich, S. Herrmann, G. Schaller, F. Schopper, H. Soltan, K. U. Kuhnel, M. Messerschmidt, J. D. Bozek, S. P. Hau-Riege, M. Frank, C. Y. Hampton, R. G. Sierra, D. Starodub, G. J. Williams, J. Hajdu, N. Timneanu, M. M. Seibert, J. Andreasson, A. Rocker, O. Jonsson, M. Svenda, S. Stern, K. Nass, R. Andritschke, C. D. Schroter, F. Krasniqi, M. Bott, K. E. Schmidt, X. Wang, I. Grotjohann, J. M. Holton, T. R. M. Barends, R. Neutze, S. Marchesini, R. Fromme, S. Schorb, D. Rupp, M. Adolph, T. Gorkhover, I. Andersson, H. Hirsemann, G. Potdevin, H. Graafsma, B. Nilsson and J. C. Spence: *Nature* **470**, 73 (2011).
- U. Weierstall, D. James, C. Wang, T. A. White, D. Wang, W. Liu, J. C. H. Spence, R. B. Doak, G. Nelson, P. Fromme, R. Fromme, I. Grotjohann, C. Kupitz, N. A. Zatsepin, H. Liu, S. Basu, D. Wacker, G. W. Han, V. Katritch, S. Boutet, M. Messerschmidt, G. J. Williams, J. E. Koglin, M. M. Seibert, M. Klinker, C. Gati, R. L. Shoeman, A. Barty, H. N. Chapman, R. A. Kirian, K. R. Beyerlein, R. Stevens, D. Li, S. T. A. Shah, N. Howe, M. Caffrey and V. Cherezov: *Nature Commun.* **5**, 3309 (2014).
- M. Sugahara, E. Mizohata, E. Nango, M. Suzuki, T. Tanaka, T. Masuda, R. Tanaka, T. Shimamura, Y. Tanaka, C. Suno, K. Ihara, D. Pan, K. Kakinouchi, S. Sugiyama, M. Murata, T. Inoue, K. Tono, C. Song, J. Park, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, M. Yabashi and S. Iwata: *Nature Methods* **12**, 61 (2015).
- K. Tono, E. Nango, M. Sugahara, C. Song, J. Park, T. Tanaka, R. Tanaka, Y. Joti, T. Kameshima, S. Ono, T. Hatsui, E. Mizohata, M. Suzuki, T. Shimamura, Y. Tanaka, S. Iwata and M. Yabashi: *J. Synchrotron Radiat.* **22**, 532 (2015).
- T. Kameshima, S. Ono, T. Kudo, K. Ozaki, Y. Kirihara, K. Kobayashi, Y. Inubushi, M. Yabashi, T. Horigome, A. Holland, K. Holland, D. Burt, H. Murao and T. Hatsui: *Rev. Sci. Instrum.* **85**, 033110 (2014).
- T. A. White, R. A. Kirian, A. V. Martin, A. Aquila, K. Nass, A. Barty and H. N. Chapman: *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 335 (2012).
- J. P. Colletier, M. Sliwa, F. X. Gallat, M. Sugahara, V. Guillon, G. Schirò, N. Coquelle, J. Woodhouse, L. Roux, G. Gotthard, A. Royant, L. M. Uriarte, C. Ruckebusch, Y. Joti, M. Byrdin, E. Mizohata, E. Nango, T. Tanaka, K. Tono, M. Yabashi, V. Adam, M. Cammarata, I. Schlichting, D. Bourgeois and M. Weik: *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 882 (2016).
- Y. Fukuda, K. M. Tse, M. Suzuki, K. Diederichs, K. Hirata, T. Nakane, M. Sugahara, E. Nango, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, C. Song, T. Hatsui, M. Yabashi, O. Nureki, H. Matsumura, T. Inoue, S. Iwata and E. Mizohata: *J. Biochem.* **159**, 527 (2016).
- Y. Fukuda, K. M. Tse, T. Nakane, T. Nakatsu, M. Suzuki, M. Sugahara, S. Inoue, T. Masuda, F. Yumoto, N. Matsugaki, E. Nango, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, C. Song, T. Hatsui, M. Yabashi, O. Nureki, M. E. P. Murphy, T. Inoue, S. Iwata and E. Mizohata: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 2928 (2016).
- K. Yamashita, D. Pan, T. Okuda, M. Sugahara, A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Murai, K. Gomi, N. Kajiyama, E. Mizohata, M. Suzuki, E. Nango, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, J. Park, C. Song, T. Hatsui, M. Yabashi, S. Iwata, H. Kato, H. Ago, M. Yamamoto and Toru Nakatsu: *Scientific Reports* **5**, 14017 (2015).
- T. Nakane, C. Song, M. Suzuki, E. Nango, J. Kobayashi, T. Masuda, S. Inoue, E. Mizohata, T. Nakatsu, T. Tanaka, R. Tanaka, T. Shimamura, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, T. Hatsui, M. Yabashi, O. Nureki, S. Iwata and M. Sugahara: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2519 (2015).
- S. Botha, K. Nass, T. R. Barends, W. Kabsch, B. Latz, F. Dworkowski, L. Foucar, E. Panepucci, M. Wang, R. L. Shoeman, I. Schlichting and R. B. Doak: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 387 (2015).
- P. Nogly, D. James, D. Wang, T. A. White, N. Zatsepin, A. Shilova, G. Nelson, H. Liu, L. Johansson, M. Heymann, K. Jaeger, M. Metz, C. Wickstrand, W. Wu, P. Bath, P. Berntsen, D. Oberthuer, V. Panneels, V. Cherezov, H. Chapman, G. Schertler, R. Neutze, J. Spence, I. Moraes, M. Burghammer, J. Standfuss and U. Weierstall: *IUCrJ* **2**, 168 (2015).
- その詳細は <http://www1a.biglobe.ne.jp/sfxproject/>

著者紹介

**菅原道泰**

理化学研究所放射光科学総合研究センター
SACLA 利用技術開拓グループ 特別研究員

E-mail: msuga@spring8.or.jp

専門：構造生物学

【略歴】

2000年大阪大学大学院工学研究科物質・生命工学専攻博士後期課程修了，工学博士。米国リーハイ大学化学科博士研究員，理化学研究所研究員を経て，2015年7月より現職。

**登野健介**

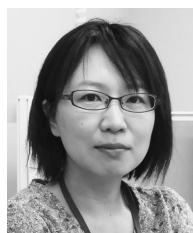
高輝度光科学研究センター XFEL 利用研究推進室先端光源利用研究グループ実験技術開発チーム チームリーダー

E-mail: tono@spring8.or.jp

専門：物理化学

【略歴】

2002年東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了，理学博士。東京大学博士研究員，東京理科大学助教，理化学研究所研究員を経て，2011年4月より現職。

**南後恵理子**

理化学研究所放射光科学総合研究センター
SACLA 利用技術開拓グループ 研究員

E-mail: nango@spring8.or.jp

専門：構造生物学，生物有機化学

【略歴】

2004年東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻博士課程単位取得満期退学，理学博士。2004年同大学助手，2007年同大学助教などを経て2013年4月より現職。

**岩田 想**

理化学研究所放射光科学総合研究センター
SACLA 利用技術開拓グループ グループディレクター

E-mail: s.iwata@spring8.or.jp

専門：X線結晶学，膜タンパク質構造生物学

【略歴】

1991年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了，農学博士。インペリアルカレッジロンドン生命科学科（イギリス）教授，ダイヤモンド放射光実験施設（イギリス）ダイヤモンドフェローなどを経て，2012年6月より現職。京都大学大学院医学研究科教授兼任。

Method of sample loading for serial femtosecond crystallography

Michihiro SUGAHARA SACLA Science Research Group, RIKEN SPring-8 Center, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan

Kensuke TONO Japan Synchrotron Radiation Research Institute, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198, Japan

Eriko NANGO SACLA Science Research Group, RIKEN SPring-8 Center, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan

So IWATA SACLA Science Research Group, RIKEN SPring-8 Center, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
Department of Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8501, Japan

Abstract Serial femtosecond crystallography (SFX) using ultrashort pulses from X-ray free-electron lasers (XFELs) allows structures to be determined with minimal radiation damage at room temperature. We have developed a sample loading method for SFX using an experimental system DAPHNIS. This method enables structure determination with a sample amount of less than 1 mg, which is one to two orders of magnitude smaller than typical amounts in a conventional liquid-jet method. In this article, we introduce our sample loading method and its applications to SFX experiments at SACLA.