(様式2) 議事録番号

提出27年8月13日

会合議事録

研究会名:放射光構造生物学研究会

- 日 時:2015年6月27日9:30-12:00
- 場 所:徳島大学工学部 共通講義棟4階 K401 号室

出席者:(議事録記載者に下線)

計25名

波多野啓太・中村希・江藤勇樹・大畠海人・島田敦広・山際来佳(兵庫県立大)・ 栗栖源嗣・山下栄樹・中川敦史(大阪大)・中石雄一郎・板東政彦・辻憲悟(大 塚製薬)・杉本宏・宮武秀行・山下恵太郎(理研)・田中良和・丹澤豪人(北海 道大)・山縣ゆり子(熊本大)・小段篤史(京都大)・真板宣夫(徳島大)・村木 則文(分子研)・上垣浩一(産総研)・山田雅胤(Meiji Seika ファルマ)・<u>馬場</u> <u>清喜・熊坂崇</u>(JASRI)

議題:

- 1. 共用ビームラインの運用方法等の説明と意見交換
- 2. SPring-8-II に向けた研究会としての取り組み等について
- 3. 遠隔実験・測定代行に関する意見交換
- 4. 測定した回折データの処理について意見交換

議事内容:

今回の SPring-8 ワークショップは、SPRUC の放射光構造生物学研究会の第4 回会合として開催した。第2,3回は SPring-8 シンポジウムに合わせて行ったが、 今回は第1回と同様により広い分野の研究者の参加を期待して、日本蛋白質科 学会年会に合わせ、徳島市内で開催した。

開会挨拶の後、3 件の話題提供を行った。まず、JASRI・熊坂よりビームラインの現状報告を行った。新しくなった課題募集制度について説明した後、ビームラインでの BSL1 対応とビームライン周辺機器を紹介し、最近の高度化の現状と次期計画の状況を報告した。次に、メールイン測定の現状について、理研の 宮武氏から紹介がなされた。研究室のある埼玉県和光市から、サンプルチェン ジャーSPACE を用いたメールイン測定について、実体験に基づいて詳細かつ分か りやすい説明がなされた。最後に、理研の山下氏より、回折像を処理するソフ トウェアとその処理自動化への取り組みについて紹介があった。ビームライン で最も利用されているものとは若干異なるインターフェースをもつこのソフト ウェアは、ややとっつきにくい印象があったものの、多くの関心が寄せられた。 これらの話題を受けて行った議論について、以下に抜粋して報告する。

・共用ビームラインの運用に関して

1: 新しい運用方法はどうですか?(利用者に向けて)

>> 半年に一度の申請よりも進展具合に合ったビームタイムの申請ができているのでありがたい。

>> PFのビームタイムの配分と時期が同じなので、ずらせないか?

2: グループ運用はどうか?

>> BL44XU(阪大ビームライン)では、阪大蛋白質研究所の内部ユーザーにはグル ープとしてまとめて配分している。

3: (企業ユーザーから)成果専有課題で利用しているが、複数グループで1課 題として利用しているため、ビームタイムが直前に決まると他に予定に左右さ れてしまう。従来のように事前に長い期間で予定が決まっている方が予定を決 めやすい。しかし、各社の都合があるので、全体の総意ではない。

>> BL41XU ではより小さな単位での配分が進みつつある。各社の都合が聞ける ようになるだろう。配分時のキャンセルなどにも対応しやすいかもしれない。

>> 使えなくなったときにキャンセルが可能であれば、企業個別での対応も可能 ではないか。しかし、配分方法はシンプルな方が公平になる。

4: 測定試料として Biosafety level 2 (BSL2)のものが増えている。ビームラインとして対応をどのように考えているのか。

>> 物理的封じ込め P1 レベル (= BSL1)の対応は施設として準備中である。BSL2 については、BL44XU で過去に実績があるが、現状では実施されておらず、必 要に応じて対応を行うほかない。しかし、32XU,41XU はハッチ内で精密空調を 使っているため、対応が可能かは検討が必要である。

5: 世界の大型放射光施設では、今後どのようなアップグレードが行われるのか? SPring-8 も同じような方向性で進むのか?

>> 微結晶(1 µm 以下)の結晶には複数結晶からのデータ収集の方法開発が進んでいる。

>> このような測定ではマウント方法が課題であり、SPring-8 でも種々開発を進

めている。試料交換ロボットの高速化は不可欠になるだろう。

>> ソフトウェアに関しては、XFEL で Serial femtosecond crystallography (SFX)に 対する開発が進んでいる。5 年後にはかなり実用的になっているのではないか。

・遠隔測定および測定代行(メールイン)に関して

 1: 遠隔測定について、通常利用と比べどのような点で異なるか。
 >> 試料を運ぶためのドライシッパーは SPACE ピンに対応した特殊仕様を使う。 ビームラインオペレータとは適宜電話などで相談しながら進める。
 2: 測定代行(メールイン)の成果非専有利用はどうしているのか?
 >> 共同研究ベースで利用可能です。個別にご相談ください。
 3: データの処理はどうしているのか?
 >> 現在はデータをダウンロードしてから処理している。自動である程度処理で きれば、より便利になると期待している。
 4: リモート、メールインは主流になるのか?X を飛ばす方法での利用が可能に

なれば、ビームラインのオンラインでの操作と同じになり、効率的な実験やデ ータ処理ができるのではないか。

>> 施設の性格上、ネットワークセキュリティーポリシーが厳しくならざるを得ない。SPRUC など利用者からの声が大きければ検討されるのではないか。

・回折データの処理に関して

1: 成果専有ユーザーはソフトウェアライセンスを別途購入するとしても、ビー ムラインでも使用しやすい形態にしてほしい。

>> ライセンスを所有していれば、ビームラインでの使用は可能ではないか。 2: 使いやすい GUI がないのでとっつきにくい。

>> 作者の自動化についての考え方として、GUI は重要でないと考えているようだ。

3: 複数結晶からのデータのマージの方法はコツがありますか?

>> 現在開発中の自動化ソフトウェアでデータの取捨選択を行う予定。

4: 最初の指数付けが弱いような気がする

>>既存のソフトウェアと比べても遜色ないが、使用するイメージの枚数やどの イメージを使用するのかが重要なので、試してほしい。

5: 開発中のソフトウェアは公開されていないようだが、どうやって要望を? >> SPring-8 の計算機クラスターにインストール済み、使ってみてください。

・研究会等の開催について

1:参加しやすい学会年会に合わせて実施するのはよい。

2: SPring-8 シンポジウムはユーザーにポスター発表の機会がないので、学生を連 れて行きにくい。

以上

*A4 縦

*会合で使用した 資料(差し支えないもの)を添付してください。





		利用	有効期間	原有	PF	イン	周正 代行
JASRI	BL41XU	80%	JASRI/1年	0	0		
共用	BL38B1	80%	JASRI/1年	0		0	0
理研	BL26B1	80%	JASRI/1年	0	0	0	0
	BL26B2	20%	JASRI/1年	0	0	0	0
	BL32XU	20%	JASRI/1年	0	0		
阪大	BL44XU	50%	阪大/年度		0		
NSSRC	BL12B2	50%	NSSRC/2年				
JASR JASR	I共用課 I共用枠	題: 1 先着	年間有効 順利用制度	复の導	入		





バキュロウイルス発現系で作製した試料の扱い

バキュロウィルス/昆虫細胞タンパク発現系 パキュロウイルス発現系より精製した製品あるいはパキュロウイルスメンプ レンは、その製法上、組み換え型パキュロウイルスの残存が否定できない ため、カルダヘナ法該当製品として取り扱うこととしています。(某社サイト)

ある民間企業において生じた遺伝子組み換え生物等の不適切な使用等に 対して厳重注意

文科省の考え方

遺伝子組換えパキュロウイルスを含む可能性がある試薬を用いる場合、法令に基づきP1レベルの拡散防止措置が必要であり、その廃棄に当たっては不活化処理を行う必要がある。

1

ビームラインのP1実験環境整備

実験責任者は事前に遺伝子組み換え生物を用いた実験を行うための申請を行う.原則として安全マニュアルに則って実験を行う.

実験ハッチを区画された立ち入り制限区域として表示を行う.

入退室扉にはビニールカーテン、ケーブルダクト等にはアルミ箔等の詰め物 を設置し、外部からの昆虫等の侵入を防ぐ.

試料のマウント操作等は実験ハッチ内でカーテンを閉めた状態で実施する.

汚染防止のため実験中は手元に75%エタノールやキムタオル、オートク レーブパッグ等を用意しておく.

2015B期から実験ハッチの立ち入り制限区域化を準備中

ビームライン周辺機器

BL41XU内側室 低温室 BL38XU内側室 微小結晶観察システム サンプルチェンジャー用試料マウント装置 (SPACE) Fine needle キャピラリマウント装置+ガス加圧装置 UV光源 Molecular dimensions X-taLight100 要問合せ: 深紫外レーザー加工装置 調湿気流装置 溶媒レスマウント 準備中:

結晶化ロボット、プレート観察装置



Keyence デジタルマイクロスコープ VHX-2000



BL38B1内側室

観えなかった物が観える 超解像観察 波長の短い青色光を用いた 超高解像度画像を取得 従来の解像度を最大25%向上させた 「超解像観察」

ハイダイナミックレンジ(HDR) 機能 シャッタースピードを変更しながら 異なる明るさの画像を複数枚取得し 高階調のデータを持った画像作成

3軸(X•Y•Z)電動制御による超簡単操作 ジョイスティックによるXY電動ステージ制御 レンズ・倍率自動認識機能

超高速画像連結機能

ステージ移動と撮影を繰り返し、 短時間で広範囲の自動連結が可能 縦20000ピクセル×横20000ピクセル

Molecular Dimensions X-taLight 100 顕微鏡用UV光源ユニット



X-taLight(クリスタライト)100は蛋白結晶と実 験において、対象となる結晶のトリプトフアン の蛍光特性を利用し、蛋白結晶か進かを判定 するために用いるUV光源です。既存の顕微 鏡に接続し光源として活用できるため、非常 に手軽にUV光観察を行うことができます。 ご使用の顕微鏡に装着して使用することが できます。本体もしくはソフトウェアから可視光 源とUV光を切り着えることができます。 顕微鏡の光学系を使用できるため、従来の

顕微鏡観察と変わらない扱いやすさです。 UV光の波長特性と照射強度を段階的に調 整することが可能です。 UV光と白色光を混合し観察像を最適化で

きます。 UVには水銀ランプを、白色光にはハロゲン ランプを使用しています。 UV-RIPにも使用可。

成果専有利用の利便性向上 成果專有利用 すべての課題 成果非專有利用 (成果発表義務) 一般課題(通常利用) 消耗品費実費負担 定額分: 一般課題 480.000円/シフト 10.560円/シフト 無償 時期指定利用/測定代行 消耗品費実費負担従量分 成果公開優先利用課題 180,000円/2時間 必要に応じて使用した 131,000円/シフト 消耗品費を算定 ※1シフト=8時間





【背景】						
タンパク質結晶の回折測定にお Fluxが不足するケーマもみられる	いて、BM-BLは BI 38B1でけ		4.00F+11	高輝度化の効果(計算値)		
ミラー集光系の最適化などFlux D 進めてきたが、BM-BLの利用拡大	ensityの向上を にはさらなる高	(Yuu	3.00E+11	●現状 ■改造後		
輝度化が喫緊の課題である。 【目標】	<u>-</u>	/sec/100	2.00E+11		and the second second	
分光器の改造により高輝度化を 倍のFluxを実現する。この技術は、 への水平展開も期待できる。また、 装置の高度化により上述の試料へ	実施し、最大3 、他のBM-BL 合わせて測定	(Photon.	1.00E+11 0.00E+00	6 10	oton Energy(keV)	
時間の短縮を目指す。						
時間の短縮を目指す。 Beam size (H x V) (mm) Photon flux (photons/sec) Flux density (photons/sec/mm^2)	BL38B1 Bending Magnet 0.18 x 0.09 9.3 x 10^10 (@ 1. 5.7 x 10^12 (@ 1.	.0 Å) .0 Å)	1.9 x 1 1.2 x 1	高輝度化 0^11 (@ 1.0 Å 0^13 (@ 1.0 Å	後の性能) 2.8 x 10^11 (@ 0.8 Å) 1.7 x 10^13 (@ 0.8 Å	















理研・和光地区での メールイン測定の実際

第4回SPRUC <u>2015.6.27@徳島</u> 理研·宮武 秀行













R

RIKEN



人が何度も行くのは、時間・コスト共負担大







結晶情報 Webデータベース D-Chaを仲立ちとする遠隔実験 ⇒ 遠隔地から実験スケジュール編集、結果の閲覧、データダウンロード可能



SPring-8 Structural Biology Beamlines



SPring サンプルトレイ 52本収納可















- ・クロネコヤマト
- 100回以上の送付で、1~2回しか遅延なし
- 1680円(和光→SP8) V.S. ~2万円 (人が行 く場合)

17:0 キマト運輸
17:0
10:0
SPring・8

17:00 ビームタイム前前日 可能ならこの日までに発送した方が良い

17:00 ビームタイム前日 発送最終締め切り 午前中着指定

10:00 ビームタイム当日





構造ゲノム研究にむけた迅速回折データ収集

- ビームラインの自動化:
- · SPring-8の偏向電磁石ビームライン標準光学系
- ・ 自動サンプルチェンジャー <u>SPACE</u>(SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger)

他、実験ステーション機器の自動化

・ビームライン制御ソフトウェア <u>BSS</u> (Beamline Scheduling Software)の開発

位置再現性が必要

X-線

管理している関連機器類

実験室系X線回折装置 @生物棟N105B

結晶構造解析用コンピュータ @生物棟C352

SPring-8 Structural Biology Beamlines

測定データダウンロード

- takeoutコマンドでダウンロード
 - ダウンロードに、数時間~半日ほど必要 - TeamViewer等を使用し、遠隔処理は可能か?

・その他、メールイン測定の個別事案

SPACE ピンの 作成 方法

ボンド ウルトラ多用途

セメダイン 2液混合

- 霜に注意
- ・エアコンの利用
- ドライシッパー中の液体窒素量

トレイが漬かりきる程度、液体窒素を入れる

Si-PIN PD検出器

6

Count time (sec.) 3 Wait time (msec.) 30

Start (Å) 1.2760000

End (Å) Step (Å) 1.2760000 1.2900000 0.000100

Znの存在が確認された

Edge = 1,2838230 Peak = 1,2024000 Attenuator = None

タンパク質溶液

Sample loop (φ=0.3 mm)

微小結晶の測定は?

6

RIKEN

SPring-8 Structural Biology Beamlines

リモート実験用GUI

プラットフォーム: WindowsXP、Vista、7 (Webサイトでインストーラを配布) PCスペック: CPU Pentium4以降、メモリ 1GB以上、モニタ解像度1300x1000以上 ネットワーク環境: インターネット下り10Mbps以上

Spring-& Structural Biology Beamlines

特開2009-115652)

ハンプトン型サンプルピン

V1 uni-puck

ACTOR[™] magazine

SPring-8 Structural Biology Beamlines

ビームタイム申請方法

1) 理研枠での利用(理研に身分を持つ人) <u>http://beamline.harima.riken.jp/</u>

2) 共用枠での利用(誰でもOK) <u>http://www.spring8.or.jp/ja/users/procedures/</u>

3) 創薬等支援技術基盤プラットホームでの利用 (誰でもOK)

http://pford.jp/

まとめ&展望

- SP8メールイン測定システムは、特に、多数の 結晶サーチ(良結晶、重原子、など)に最適
- SP8遠隔測定システムは、通常の放射光測定
 を in houseで実現
- 遠隔データ処理は可能か(XDSなど利用)?
- 結晶の保存&BL41XU、BL32XUでの再測定は 可能か?

謝辞(敬称略)

- ・ 理研・リガク(株)
 仲村勇樹
- 理研・生命系放射光システム開発ユニット
 - 上野 剛
 - 引間 孝明
 - 河野 能顕
- ・ 理研・利用システム開発研究部門
 山本 雅貴
- JASRI

- 熊坂崇、ビームライン担当者の皆様

	XDS vs Aim	less	反射強度の誤差の見積もり
補正因子	XDS	Aimless	対称反射との強度のバラつきと一致するように, 個々の測定値のσ(lm)の補正を行う.
放射線損傷	各分解能・フレームブロックご とに独立に係数を決定	フレームごとにB-factorを決定	Error model XDS $\sigma^2(I_{hl}) = a \left[\sigma_0^2(I_{hl}) + b \cdot I_{hl}^2\right]$
X線吸収	検出器位置・フレームブロック ごとに独立に係数を決定	結晶からの回折方向をパラメー タとした球面調和関数によるモ デル	Aimless $\sigma^2(I_{hl}) = \text{SdFac} \left[\sigma_0^2(I_{hl}) + \text{SdB} \cdot \langle I_h \rangle + \text{SdAdd} \cdot \langle I_h \rangle \right]$ a (SdFac)はcounting errorの補正 (Gainの見積もり誤差に由来)
検出器感度	検出器位置を区切り独立に係数 を決定	補正係数を入力 (経験的な補正はできない)	b (SdAdd)は、強度に比例する(強度に対して同じ割合で存在する)誤差を補正 SdBは、物理的な妥当性は無いが、一致が良くなることから入れている
 Aimlessはよ 実際のところ S-SAD等の関 たという話は 	り物理的なパラメータを使って 3.普段はあまり差は出ない 祭どいケースはAimlessでスケ- まよくある模様 (XSCALEのzer	て補正している −リングした方が成績が良かっ o-dose extrapolationも有用) ₂₂	* Gain (検出器カウント→光子数の係数)の補正 パックグラウンド領域を用い,ポアソンノイズを仮定してGainは見積もられる. CCDの場合, Point Spread Function (PSF)が大きいため,Gainを過小評価する傾向があり, a~4程度の値になることが多い (PILATUSの場合a~1).

XDS.INP	XDS.INP
 ・XDS (xds, xds_par)の実行に必要なインプットファイル ・XDSは基本的にイメージのヘッダを見ないので、処理に必要な情報は全てXDS.INPに書く. ・他の名前にはできない(XDSは自動的に作業ディレクトリ内にあるXDS.INPを読み込む). ・処理結果は同一ディレクトリに書き出されるので、データセットごとに違うディレクトリを用意する必要あり. ・以降は無視される(コメント) ・JOB=の内容によって読まれるパラメータは異なるので注意 	JOB= XYCORR INIT COLSPOT IDXREF INTEGRATE CORRECT ORGX=1536.00 ORGY=1536.00 DETECTOR_DISTANCE=190.000 OSCILLATION, RANGE=1.000 X-RAY_MAVELENGTH=1.0000 NAME_TEMPLATE_OF_DATA_FRAMES=//sample_0000??.img DATA_RANGE=1 55 SPOT_RANGE=1 28 SPACE_GROUP_NUMBER=19 ! 0 if unknown UNIT_CELL_CONSTANTS=72.53 82.19 104.04 90.000 90.000 90.000 INCLUDE_RESOLUTION_RANGE=50 2.3 FRIEDEL'S_LAW=TRUE TRUSTED_REGION=0.00 1.2 VALUE_RANGE_FOR_TRUSTED_DETECTOR_PIXELS=7000. 30000. ! often 8000 is ok STRONG_PIXEL=4 MINIMUM_NUMBER_OF_PIXELS_IN_A_SPOT=3 REFINE(INTEGRATE)=CELL BEAM ORIENTATION ! AXIS DISTANCE DETECTOR= CCDCHESS MINIMUM_VALID_PIXEL_VALUE= 1 OVERLOAD= 65500 SENSOR_THICKNESS= 0.01 NX= 3072 NY= 3072 QX=.0732420000 QY=.0732420000 DIRECTION_OF_DETECTOR_Y-AXIS=0 1 0 INCIDENT_BEAM_DIRECTION=0 0 1 ROTATION_AXIS=-1 0 0 FRACTION_OF_POLARIZATION=0.98 FOLARIZATION_PLANE_NORMAL=0 1 0 27

とあるデータ処理の例 対称性の推定と統計値	とあるデータ処理の例 c軸の長さ,本当?
\$ pointless INTEGRATE.HKL Laue Group Lklhd NetZc Zc+ Zc- CC CC- Rmeas R- Delta ReindexOperator	
<pre>>1 P -3 m 1 ** 0.669 5.41 8.11 2.71 0.81 0.27 0.20 0.54 0.1 [h,-k,-l] 2 C 1 2/m 1 0.131 4.18 8.75 4.57 0.88 0.46 0.16 0.41 0.1 [-2h+k,k,-l] 3 C 1 2/m 1 0.058 3.76 8.42 4.66 0.84 0.47 0.17 0.41 0.0 [h-k,-l] 4 C 1 2/m 1 0.057 3.66 8.34 4.68 0.83 0.47 0.19 0.40 0.1 [h,-k,-l] 5 P -3 0.42 3.61 8.29 4.69 0.83 0.47 0.19 0.40 0.1 [h,-k,-l] -6 P -1 0.030 4.02 9.03 5.01 0.90 0.50 0.13 0.38 0.0 [-h,-k,l] Best Solution: space group P 3 2 1 Unit cell: 89.79 89.90 955.96 90.01 89.99 119.94 \$ more CORRECT.LP Subset of INTENSITY DATA WITH SIGML/MOISE >= -3.0 A5 FINCTION OF RESOLUTION RESOLUTION NUMBER OF REFLECTIONS COMPLETENESS R-FACTOR OF REFACTOR ONPARED I/SIGMA R-meas CC(1/2) LIMIT OBSERVED WUIQUE POSSIBLE OF DFLETENESS R-FACTOR R-FACTOR MPARED I/SIGMA R-meas CC(1/2) LIMIT 05500 2663 2934 97.6% 6.7% 7.6% 25586 26.39 7.2% 99.8* 7.15 46910 4672 4674 100.0% 10.4% 9.5% 46999 22.04 11.0% 99.4* 5.5.6 51672 513.5 10.5% 26.5*</pre>	240 X Aday Line 10 Langth: 7.5 mm Lattice: 322.6 A 0.0 2000 4000 5000
5.08 (2522 0.749 0.749 104.04 21.3% 20.9% 72522 12.37 22.3% 98.1* 4.55 2075 7569 7569 100.0% 23.0% 23.4% 2275 11.20 25.0% 99.0* 4.16 310462 8385 8385 100.0% 31.5% 32.1% 510462 6.36 32.7% 96.4* 3.60 10420 9401 9401 100.0% 83.1% 93.2% 144200 2.77 87.2% 76.5* 3.40 109390 10105 10283 98.3% 125.0% 146.2% 109373 1.74 131.2% 59.0* total 692297 64599 64852 99.6% 21.6% 22.9% 692275 9.01 22.8% 99.8* 32	これらがc軸上反射であり, 螺旋(3₁ or 3₂)が存在するなら, c ~ 960はリーズナブル (実際, 螺旋ありで構造決定成功とのこと) ₃₃

マノ	レチ	デーダ	タ収集・	処理の	の自重	加化	まとめ		
BDJのデータ処理 「RDFのデータ処理 「RDFの第一タ処理 「RDFの第一タの理 「RDFの第二 「RDFの 「RDFの 「RDFの 「RDFの 「RDFの 「RDFの 「RDFの 「RDFの 「RDFの 「RDFの 「RDF 「RDFの 「RDF 「RDFの 「RDF 「RDFの 「RDF 「RD									 XDSの特徴 他のプログラムでは処理が難しいデータでも、ほぼ自動的に処理できてしまう事が多い 高速かつパラメータの調整も行いやすい 頻繁なアップデートによるバグ修正・機能強化
 16 loops 	d _{max} –	d _{min} (Å)	Redundancy	Cmpl (%)	$\langle I/\sigma(I) \rangle$	R_{meas}	$CC_{1/2}$		 • XDSを用いた自動データ処理
• 10°×82	42.40	5.58	16.55	100.00	22.1	0.101	0.999		
datasets	5.57 4.43	4.43 3.87	16.67	100.00	17.0	0.185	0.993		● SPring-8のジオメトリ・検出器に正式対応
• space group C2	3.87	3.51	16.67	99.95	10.1	0.410	0.977		
 75 datasets 	3.51	3.26	12.41	100.00	6.6	0.541	0.951		● 分かりやすい出力の提供を目指す
indexed w/	3.26	3.07	9.13	100.00	4.5	0.630	0.906		
compatible cells	2.07	2.92	9.15	100.00	3.5 2.6	1 1 9 3	0.849		• 開発中につざ、フィートハック・ご要望を熱く歓迎
• 40 datasets	2.79	2.68	9.07	100.00	2.0	1.539	0.640		
merced	2.68	2.59	9.04	99.95	1.6	1.924	0.563	29	
lineigea	42.40	2.59	12.47	99.99	8.4	0.291	0.993	30	3