

生物・医学グループ

1. ビームラインにおける利用支援

1-1 BL20B2 (医学・イメージング ビームライン)

本ビームラインは、ビームタイムの約2/3が医学利用研究に用いられており、本グループはその利用支援を行った。主な実験手法は、血管造影、CT (computed tomography)、X線イメージングである。CT法については、利用研究促進部門の顕微・分析グループと共同で、視野の拡大、高速化などを行った。特に、広視野化のためにビームモニターとCCDカメラの改良を行った。カメラは横4024×縦2648画素のCCD素子で構成される。ビームモニター4 (蛍光体は厚さ10 μ mまたは20 μ mのP43 (Gd₂O₂S : Tb)) との組み合わせでは、蛍光板上で横24mm×縦16mmのX線視野 (画素サイズ6 μ m) が得られる。また、ビームモニター5 (蛍光体は厚さ20 μ mのP43) との組み合わせでは、横48mm×縦32mmのX線視野 (画素サイズ12 μ m) となり、大視野高解像度を可能にした。高速CT法の高度化の詳細については、顕微・分析グループの報告を参照されたい。

新しい画像検出器として、CMOS型フラットパネル検出器の開発も行っている。2003年度に用いたものは、ピクセルが50ミクロン角、検出面積は約12cm²角である。ピクセル数は500万以上であるが、毎秒2フレーム以上を読み出すことが出来る。現在BL20B2で使用されているものは、低エネルギーX線に対して感度が低いが、理化学研究所との共同研究で、窓材や蛍光体 (針状CsI) を改良したものを試作し、その性能評価を行った。蛍光体は薄いほど空間分解能が高いが、高エネルギーX線に対する検出効率率は蛍光体が厚いほどよく、本ビームラインのように高エネルギーでの利用の多い場合には、放射線損傷を考慮すると蛍光体は厚い方が適当と思われる。

1-2 BL28B2 (白色X線回折ビームライン)

本ビームラインは、利用研究促進部門の構造物性グループと分光物性グループが担当しているが、共同利用課題として血管造影実験が行われているため、これに限っては本グループが実験の支援を行った。

本ビームラインで開発を行ったX線検出器はX線サチコンを使った直接変換型検出器であり、X線がカメラへ直接に入射し撮像管の非晶質Se-As光導電膜で直接にX線を吸収し電荷信号に変換する。光導電膜でのX線吸収率は膜の厚さに依存するため、X線サチコンでは膜厚が25 μ mである。直接変換型検出器の場合は、撮像管の光導電膜での

撮像範囲である9.5mm×9.5mmがX線撮影視野となる。そして、1024×1024画素のデジタル画像として撮影した場合は1画素の大きさが9.5 μ mとなる。1024×1024画素×10ビット画像の場合は、最大で30frames/sの速度で撮影可能である。

1-3 BL40B2 (構造生物学ビームライン)

本ビームラインは、タンパク質結晶構造解析と小角散乱の二つの実験目的に使用されている。前者の利用支援は利用研究促進部門の構造生物グループが担当しており、本グループは後者に関する利用支援を行った。ビームタイム比率は、おおざっぱにいて1:2の比率で小角散乱が多い。測定の対象は高分子とタンパク質溶液がほとんどである。

本年度も前年度に引き続いて光学系の検討を行った。前年度に導入した円形コリメータはよく機能しており、寄生散乱がほぼ完全に除去できている。現在はカメラ長の延長 (最長5m程度) による小角分解能の向上を検討しており、Bragg spacingで1500程度を目指している。来年度には、実験ハッチ内の機器の交換を行って、これを達成する見通しである。さらに、集光ミラーの交換によって、実験ハッチ内の焦点位置を下流に移動して焦点位置でのビームを小さくすることや、ミラーで反射せずにビームを実験ハッチに導入できるような改造も計画している。

X線検出器に関しては、X線イメージングインテンシファイアとCCDカメラの組み合わせを使用する利用者が増えており、秒単位での時分割実験に使用されている。

1-4 BL40XU (高フラックスビームライン)

本ビームラインは、モノクロメータを使用せずにアンジュレータの一次光をそのまま活用する高フラックスビームラインである。従来に引き続き、時分割実験を中心とした共同利用実験が実施され、その支援を行った。実施内容は、骨格筋、心臓、紫膜などの回折実験が従来どうり多いが、タンパク質溶液散乱実験でも骨格筋実験の技術を導入してケージ化合物を使用することにより、3ミリ秒程度の時間分解能での実験が試みられた。まだ実験条件を模索している段階ではあるが、実施の可能性が明確になったという点で進歩があった。また、特定利用課題におけるシングルパンチを用いた粉末回折実験も行われている。この実験では、シングルパンチシャッターが十分に機能している。時分割実験としては、これらの他に高分子や骨、樹木など、数10ミリ秒の時間分解能ではあるが、実験の対象が広がりつつ

ある。

一方で、本ビームラインの高いフラックス密度を利用して、ピンホールを用いたマイクロビーム回折実験も行われており、毛髪や骨格筋原線維の微細構造の研究が行われている（下記「3. 高度化利用技術開発」を参照）。

その他、蛍光X線分析や放射線計測のR&D、ゾーンプレートを用いた時分割X線顕微鏡のR&Dなど、本ビームラインの実験的な性格を反映した共同利用実験が行われている。本ビームラインで実施されている共同利用課題は、そのほとんどがJASRIスタッフとの共同研究であり、ビームラインの革新性を生かすための努力が続けられている。

2. 生物試料準備室と実験動物維持施設の維持管理

共同利用実験者の利用支援に関して、ビームラインでのサポートと並んで重要なのが試料準備の施設や実験動物の授受・短期飼育など、いわゆるインフラ設備によるサポートである。2003年度は特に、従来の生物試料準備室（リング棟D24号室）のほかに、実験動物維持施設と医学利用研究棟にある生化学・生理学の各準備室を新たに広義の生物試料準備室と位置づけ、従来の生物試料準備室では不可能であった高度な試料調製の要望に対応すると同時に、同室ホームページの大幅な改定を行って共同利用実験者に対して利用可能設備などの詳細な情報を提供した。共同利用実験者からの実験動物授受の依頼、また各準備室の利用申し込みは同室ホームページの送信フォームによりオンラインでできるようにした。現在これらのシステムは順調に稼働しており、共同利用実験者と施設者の間の情報伝達はスムーズに行われている。

また、生化学準備室と実験動物維持施設の処置室には各種試薬を収納する保管庫が設置されている。最近利用者が増加し、薬品の管理を厳正に行うことが望ましい。そこで2003年度から薬品保管庫の鍵を一括してPCで管理するようにした。鍵へのアクセスは制限され、利用ごとに使用者と利用日時が記録される。このシステムを実験動物維持施設の処置室にも導入したことで同室における麻酔用エーテルの保管が可能になり、引火性薬品を使用毎に生化学準備室から移動する必要がなくなった。

3. 高度化利用技術開発

3-1 微小試料の回折実験法

2003年度も、第3世代の高輝度放射光施設に固有の課題として、水を含んだ生体試料の微小領域（ビーム径2マイクロメートル）X線回折技術の確立に取り組んでいる。これは所内の高度利用技術開発プロジェクトの1つとして行っているものである。目標はこれまで体積が極端に小さいためにX線回折の対象とならなかったような、微小な細胞小器官からX線回折像を記録することである。当施設の高輝度放射光から生成したマイクロビームを用いて微小な

生体試料から回折像を得るためには、照射損傷を避ける意味で試料を急速凍結することが必須との認識に立ち、含水生体試料を液体窒素温度で凍結したまま微小領域回折像を記録するための技術開発を行った。マイクロビームはピンホール列により生成したものが寄生散乱も少なく、小角分解能も優れるが、フラウンフォーファー回折の悪影響を防ぐためピンホールと試料との距離は極力小さくする（10mm以下）必要があり、試料とピンホール間の熱絶縁が大きな課題であった。2003年度は、真空封止型薄型クライオスタットの導入により、試料を常温のピンホールの至近距離に置きながら液体窒素温度（ $\sim 74\text{K}$ ）に長時間安定に保つことができるようになった。現在はアッテネータを入れた状態でも、数100 μm の厚さの試料から検出器が飽和するほどの強度の回折像が1秒以下の露光で安定して得られる。さらに小さい試料から回折像を記録するにはクライオスタットの構造に起因する試料位置のドリフトが問題となり、その克服が2004年度の課題である。

3-2 X線1分子計測法

現在、生体分子が示す動的構造変化をリアルタイムで1分子計測できる手法は非常に限られており、可視光を用いた方法が主流であるが、測定精度に問題がある。目的となる生体1分子が有する分子内構造変化を安定的に、かつ目的部位の運動を $\sim \text{pm}$ の精度で計測できる手法は、X線1分子計測法以外に今のところ存在しない。本手法においては、金ナノ粒子でタンパク質分子を修飾し、白色X線による金ナノ粒子からの回折の動きを測定することにより、タンパク質分子の運動を追跡する。本年度は、(1) バクテリオロドプシンの光応答構造変化、(2) 蛋白質フォールディングプロセス、(3) ATP活性分子の構造変化、などの実験系にこの手法を適用することにより、本手法の可能性を検討した。(1)においては、機能発現時にバクテリオロドプシンのA-Bループ部分が約73pmの構造変化を示すことが分かった。この数値は結晶状態時に得られたバクテリオロドプシンの構造情報と比較しても非常に良く一致する数値である。本結果は、X線1分子計測法が精度良く、かつ信頼できる計測法であることを示した。(2)においては、₂ミクログロブリンの運動を、天然状態、SS結合酸化変性、およびSS結合還元変性などの条件下で測定し、天然状態と変性状態の運動を区別して計測できることが判明したと同時に、本手法が構造形成反応の1分子測定に有効である事を示した。(3)においては、秒オーダーでATP依存性シャペロンタンパク質GroELの動きを測定し、ヌクレオチド存在下で揺らぎが小さいことを見いだした。これは分子内の安定性がヌクレオチドの結合によって高くなるためと考えられる。このように本手法は多くの実験系（タンパク質分子）において利用可能であり、汎用的なタンパク質研究の手法となりうると考えられる。なお、本研究は科

学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業による支援を受けたものである。

- [1] Y. Okumura, T. Oka, M. Kataoka, Y. Taniguchi, Y. C. Sasaki : Picometer-Scale Dynamical Observations of Individual Membrane Proteins : the case of Bacteriorhodopsin, **Phys. Rev. E**, in press.
- [2] Y. Okumura, T. Miyazaki, Y. Taniguchi, Y. C. Sasaki : Fabrications of Dispersive Gold One-Dimensional Nanocrystals **Thin Solid Film**, in press.
- [3] Y. Okumura, T. Oka, Y. Taniguchi, Y. C. Sasaki : Dynamical Observations of Membrane Proteins : In The Case of Bacteriorhodopsin, **American Physical Society**, in press.

利用研究促進部門 生物・医学グループ
八木 直人