

3-4 利用研究促進部門

構造生物グループ

1. はじめに

構造生物グループはタンパク質など生体高分子の結晶構造解析ビームラインでの共同利用支援とビームライン利用の高度化にむけた研究を進めている。2004A期より、BL38B1の蛋白質結晶構造解析への専用化およびBL40B2の小角散乱専用への移行準備を進め、2004B期より蛋白質結晶構造解析の共同利用実験はBL41XUおよびBL38B1の2本のビームラインに集約した。また、従来溶液散乱および蛋白質結晶構造解析に利用されていたBL40B2は小角散乱実験にほぼ専用化され、結晶構造解析での利用は重点たんぱく500領域での限定的なものへと変更された。ビームライン利用の高度化では、従来解析に大きな困難をともなったサンプル解析範囲の拡大と構造決定の迅速化にむけた改良を進めている。BL41XUでは、昨年度に引き続きサンプル位置でのビーム高輝度化および高精度化を中心に、ビーム強度の安定化も含めたビームライン整備を行った。偏向電磁石光源を持つBL38B1では、回折強度データ収集の迅速化にむけて、実験ステーション制御システムの改良を進めている。これら構造生物グループの担当する2本のビームラインと高度化研究を中心に、2004年度の活動状況を担当者が分担してまとめたものが本報告である。

また、2004年度も前年度より引き続き重点たんぱく500領域に指定されたタンパク3000プロジェクトにおけるタンパク質の個別解析プログラムの課題を実施している。

利用研究促進部門
構造生物グループ
山本 雅貴

2. BL38B1 (R&D)

2-1 はじめに

従来BL38B1では、R&Dビームラインの一般課題利用枠を利用して蛋白質結晶構造解析実験を実施していた。SPring-8ではBL38B1を構造ゲノム研究を重点的に支援するためのビームラインと位置づけ、昨年度蛋白質結晶構造解析用の迅速データ収集システムの導入を行い、2004B期より蛋白質結晶構造解析の専用ビームラインに変更した。迅速データ収集システムは、実験ステーション制御にSPring-8のビームライン制御に用いられているVMEシステムを用いることにより、制御の一元化と安定化が図られた。また、回折データ測定にSPring-8標準のタンパク質結晶解析用回折データ測定ソフトBSS (Beamline

Scheduling Software)^[1]を使用して、従来のように波長変更とデータ測定を別々のコンピューターで行う必要がなくなり、ユーザーにとって使い易く、また、効率よく実験できるシステムになっている。

2-2 検出器の更新

今年度は、測定システムで使用しているCCD検出器、Imaging Plate (IP) 検出器をそれぞれ最新型のものに交換した (図1)。新しいCCD検出器はRigaku/MSC Jupiter210で、これまで使用してきたADSC Q4Rと比較して有効検出面積が188×188cm²から210×210cm²に大きくなり、画像読取り速度も4秒以上速くなった。これにより、波長1、最短カメラ長(130mm)で測定した場合の測定可能分解能が1.62 から1.50 に向上して、測定時間も1データセットあたり(180フレーム測定した場合)10分以上短縮された。新しいIP検出器は、新型RAXIS-Vで、これまで使用していたプロトタイプRAXIS-Vに無かったシングルヘッド読取機構を有し、測定精度が要求される測定に対応することが出来るようになった。また、以前頻発していた検出器のトラブルに伴う測定中断が、新しい検出器が導入された2004B期以降は解消した。



図1 BL38B1の回折計

2-3 回折強度自動測定システムの立ち上げ

今年度は、試料交換の自動化を図るためサンプルチェンジャーSPACE^[2]の立ち上げを行った。サンプルチェンジャーSPACEの最大の特長は、ねじ込み式の専用サンプルピンを使用することで、試料を再マウントした時の位置

再現性が $10\mu\text{m}$ 以下である。この特長により、結晶のスクリーニング時に決定したセンタリング座標を用いて、試料を再マウントした際の自動センタリングが可能であり、試料を交換しながらの連続自動データ測定を実現する。現在、サンプルチェンジャーSPACEに装着する専用トレーに結晶試料をマウントする試料マウンターの立ち上げを行っており、2005年度中には試料交換ロボットを用いた自動測定を、ユーザーに開放できる予定である。

将来、本ビームラインの運用面での大きな目標は、研究者から凍結状態のタンパク質結晶試料を宅配便で受け取り、測定を代行するMail-inデータ測定システムの導入である。BSSを用いた測定システムやサンプルチェンジャーSPACEの導入は、そのための基盤整備である。来年度以降、Mail-inデータ測定システム運用にあたって不可欠な、測定条件や測定データを保存するためのデータベースの構築を予定している。

利用研究促進部門
構造生物グループ
長谷川 和也、酒井 久伸

3. BL41XU (構造生物学 ビームライン)

3-1 はじめに

BL41XU (構造生物学 ビームライン) は、SPRING-8の標準アンジュレータを光源としたタンパク質結晶構造解析用の共用ビームラインである。本ビームラインでは、2003年度に特に光学系に大きな改良を行い、試料位置でのビーム高輝度化および光学調整の高精度化が実現された。本年度も引き続きビームラインの特性を活かした測定を実現するために、光学系・測定系の改良を行ったので報告する。

3-2 コンプトンシールドの導入による強度安定化

2003年度夏期停止期間中に分光結晶を更新した結果、強度自体はそれ以前の2倍以上になったものの、試料位置でのX線強度が蓄積電流値よりも速く減衰するという現象がみられるようになった。これはアンジュレータ光からの熱負荷によって分光器の二結晶平行度がズレてしまうためと考えられた。そこで、2003年冬期停止期間中にMOSTABを導入し、X線強度の減衰をある程度抑えることに成功した。2004年度では更なる対策として、夏期停止期間中に第2結晶クレイドルにコンプトンシールド(図2)を設置し、第1結晶からのコンプトン散乱によって発生した熱を系外に排出することを試みた。その結果、X線強度の減衰がほとんど観測されなくなった。これには、蓄積リングのTopUp運転によってモノクロメータ自体の熱安定性が増したことも大きく影響していると考えられる。現在、MOSTABを使用しない状態で、 $100\times 100\mu\text{m}^2$ にビームを切り出した試料位置での強度変動度は、5時間で2%以内となっている。



図2 第2結晶クレイドルに取り付けたコンプトンシールド。シールドの冷却水は第2結晶の冷却水流路より分岐させている。

3-3 集光光学系の変更 - 水平集光ミラーの更新

BL41XUでは、これまで3種の反射材(Rh/Pt/スーパーミラー)を持つミラー2枚によるK_B集光光学系を採用していたが、ミラー表面のカーボン固着による反射率の低下が大きな問題であった。そこで2004年夏期停止期間中に水平集光ミラーを全面ロジウムコートされた70cm長単結晶シリコンミラーに交換し、集光方式を水平集光光学系に変更した(図3)。試料位置でのビームサイズは垂直 $350\mu\text{m}$ \times 水平 $150\mu\text{m}$ (FE Slit: $0.3\text{mm}\times 0.5\text{mm}$)と垂直方向に大きくなったが、ミラーの反射率回復により試料位置での光子密度はミラー変更前と同程度となっている。

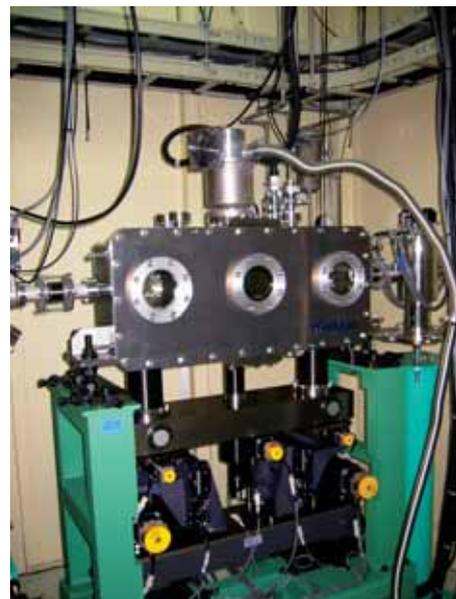


図3 更新した水平集光ミラー

3-4 大型X線CCD検出器の導入

ビームラインでのX線回折実験に標準的に使用されるX線CCD検出器を、小型のmar research社製marCCD165からADSC社製Quantum315に更新した(図4)。このQuantum315は、受光面積315mm×315mm、総画素読取り時間1.2秒という現在市販されているなかで最高の性能を持っている。この高速なCCD検出器を用いることで、一般的な実験条件で立体構造決定に必要な回折データを約12分で収集することが可能となった。



図4 新設されたX線CCD検出器Quantum 315 (ADSC社)

3-5 TC・ST制御の高速化・共通化 - MADOCA&BSSの導入

BL41XUでは、経年劣化によって失われていたビームライン本来の性能を取り戻すために、昨年度から本年度にかけて光学系・測定系にさまざまな改良を施してきた。一方、これらの改良を生かした測定を実現するために、ビームライン全体の制御をより高速で安定なシステムに変更する必要があった。そこで、2004年夏期停止期間中にビームラインの光学系と実験ステーションの機器制御をこれまで利用していたGP-IB制御のPM16Cから、SPRING-8標準のVME制御のMADOCAシステムに更新した。これによって各光学素子及び実験ステージの制御が高速化され、波長変更とそれに伴う自動ステージ調整が約4分で完了するようになった。また、回折データ測定ソフトウェアをBL26B1・B2やBL38B1で利用されているBSS (Beamline Scheduling Software)^[1]に更新した。これにより、異なるビームライン間での光学機器構成の違いなどをソフトウェアで吸収し、結晶構造解析ビームラインでのユーザインタフェースを共通化した。上記システムを使用して標準試料のMAD法での実験を行った場合、サンプルをマウントし、XAFS測定によってEdge、Peak波長などを決定し、最終的にPeak、Edge、Remoteの3波長でX線回折測定を行うまでの一連の実験に要する時間は1時間であり、実験時間を従来の半分以下に短縮した。

構造生物グループ・結晶構造解析チーム

清水 伸隆、河本 正秀

4. 極限構造解析

4-1 はじめに

BL41XUはアンジュレータを光源としたビームラインであり、その高輝度・高平行性が大きな特徴といえる。我々のグループでは、このBL41XUの特性を活かして、今まで困難だった超高分解能構造解析や微小結晶構造解析にむけた研究を行っている。

4-2 蛋白質の超高分解能構造解析

生体内相互作用の多くは、反応に関わる分子同士が反応中心でプロトンや電子の授受を行うことで達成される。従って、そのメカニズムを理解する為には、反応に関わる原子の位置を特定するだけではなく、そのプロトン化状態や電荷の分布状態をも明らかにしなければならない。蛋白質のX線結晶構造解析でそのような情報を得る為には、少なくとも0.8 Åを超える超高分解能での構造決定が必要である。今回我々は、すでに1.0 Å分解能で構造を決定しているリング銀葉病菌由来エンドポリガラクトツロナーゼI-ガラクトツロン酸複合体結晶^[3]を用いて実験を行った。測定には波長0.6 Å (En=20.7keV)のX線を使用し、それに合わせてビームラインの光学素子を最適化した。検出器には、大きな受光面積(400×400mm)と高いダイナミックレンジを持つIP検出器R-AXIS V (Rigaku)を使用し、カメラ

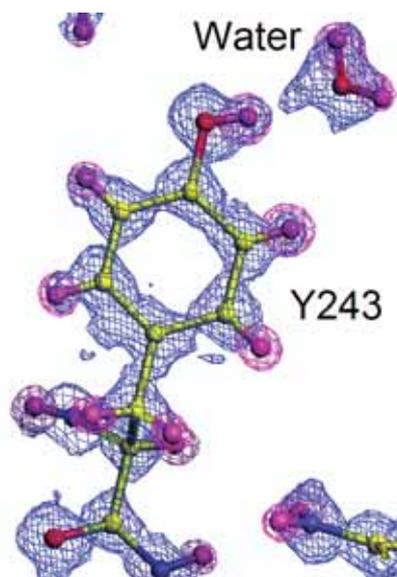


図5 Y243近傍の2Fo-Fcマップ(シアン、 $\sigma > 1$)とFo-Fcマップ(マゼンダ、 $\sigma > 3$)。Fo-Fcマップでは、水素原子をモデルから省略して計算されている。モデル中で炭素は黄色、酸素は赤色、窒素は青色、水素はピンク色で示されている。

長を最短の160mmとした。測定の結果、最大で0.62 の回折点が確認された。プログラムMosflmを用いたデータ処理の結果、最大分解能0.68 で $R_{sym}=3.2\%$ (最外殻=30.0%) の回折強度データを得た。プログラムSHELXLを用いた構造精密化の結果、 R -factorと R_{free} -factorがそれぞれ9.72%、10.78%の構造モデルが得られ、非水素原子3,416個と水素原子2,181個が含まれていた。図5に243番目のアミノ酸残基であるチロシン近傍の電子密度マップを示しているが、差フーリエマップ上だけではなく直接的に水素原子が観測されているのが分かる。次年度以降もこのような超高分解能構造解析を様々なサンプルに適用して、より幅広い議論を行いたい。(エンドポリガラクトナーゼの研究は、京都大学農学研究科加藤研究室との共同研究である。)

[3] T. Shimizu, T. Nakatsu, K. Miyairi, T. Okuno and H. Kato :
Biochemistry **41** (2002) 6651-6659.

構造生物グループ・結晶構造解析チーム

清水 伸隆、長谷川 和也、酒井 久伸

河本 正秀、山本 雅貴

4-3 微小蛋白質結晶測定のためのBL41XUの最適化

放射光利用や計算機科学の進歩に伴う測定技術や解析技術の急速な進歩により、多くの蛋白質構造解析において、如何にして解析可能な結晶を得るかが研究の律速段階となっている。特に、今後の重要な課題である膜蛋白質をはじめとする発現・精製及び結晶化が困難な試料に関しては、微小サイズ(~ 10 μm)の結晶は得られても、回折実験に適した大きさの結晶(~ 100 μm)が得られない場合が多い。従って、このような微小結晶段階での回折強度データ収集を可能にする事は、結晶構造解析の適用範囲を広げ、より効率的な研究の遂行に繋がると考えられる。そこで今年度より20 μm 以下の微小結晶測定に適したビームラインの構築を目指して、その調整法、測定法、解析法の研究開発を進めている。2004B期に行った実験では、試料位置でのビームプロファイルやサイズを評価しながらビームラインの光学素子の最適化を行った。その結果、最終的に1 で試料位置でのサイズが25 \times 25 μm^2 、フォトンフラックスが 1.2×10^{10} photons/secのビームを成形し、20 μm 角の結晶からX線回折測定を行うことができた。しかしながら50 \times 50 μm^2 以下のビームサイズの場合、試料位置でのビーム強度変動の増加が観測された。通常ユーザー実験で使用している50 ~ 100 μm のビームでは、試料位置での強度変動は5時間で2%以内であるが、今回使用した25 μm ビームでは2時間で最大20%の減少が見られた。これはBL41XUの強度安定化の項目で見られた熱ドリフトによるものと考えられる。今後、コンプトンシールドの改良を含めたさらなるビーム安定度の強化を行い、微小ビームサイズに耐えるビーム強度安定性を実現していく予定である。

参考文献

- [1] G. Ueno, H. Kanda, T. Kumasaka and M. Yamamoto : J. Synchrotron Rad. **12** (2005) 380.
[2] G. Ueno, R. Hirose, K. Ida, K. Kumasaka and M. Yamamoto : J. Appl. Cryst. **37** (2004) 867.