

構造生物

1. はじめに

構造生物学グループは、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。また、本年度も重点たんぱく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。

SPring-8では、膨大な数に及ぶタンパク質結晶構造解析分野の課題数への対応と、構造ゲノム研究の重点的な支援のため、BL38B1のタンパク質結晶構造解析専用ビームライン化を昨年度から進めてきた。その結果、2004B期には全てのタンパク質結晶構造解析の共同利用実験をBL41XUとBL38B1の2本のビームラインに集約することができた。これに伴い、2005年5月1日付でBL38B1の名称がR&D(Ⅲ)から構造生物学(Ⅲ)に変更され、名実ともにタンパク質結晶構造解析専用ビームラインとなった。

ビームラインの高度化では昨年度に引き続き、解析に大きな困難を伴う試料への対応と構造決定の迅速化・省力化に向けた改良を進めている。BL41XUでは、微小なタンパク質結晶による回折実験を可能とするために、試料位置に高輝度なマイクロビームを安定的に供給するためのビームライン整備を行った。BL38B1では、タンパク質結晶解析の迅速化・省力化の究極的な形態として、メールインデータ測定システムの実現に向けたハードウェア・ソフトウェア両面の整備を行ってきた。以下に、各ビームラインにおける2004年度の活動状況及び高度化の報告を述べる。

2. BL38B1 (構造生物学Ⅲビームライン)

2-1 はじめに

われわれは、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、2003年以降、データ測定ソフトウェアBSS(Beamline Scheduling Software)^[1]の導入や、新型CCD検出器・大面積IP検出器の導入を行い、ユーザー実験の利便性を高め、効率よく実験を行えるシステムの構築を図ってきた。またメールインデータ測定システムの構築に向けて、サンプルチェンジャーSPACE(SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger)^[2](図1)の立ち上げと導入も行ってきた。

2-2 メールインデータ測定用データベースシステムの開発

メールインデータ測定は、ビームラインオペレーターが遠隔地の研究者に代わってデータ測定を行うシステムで、

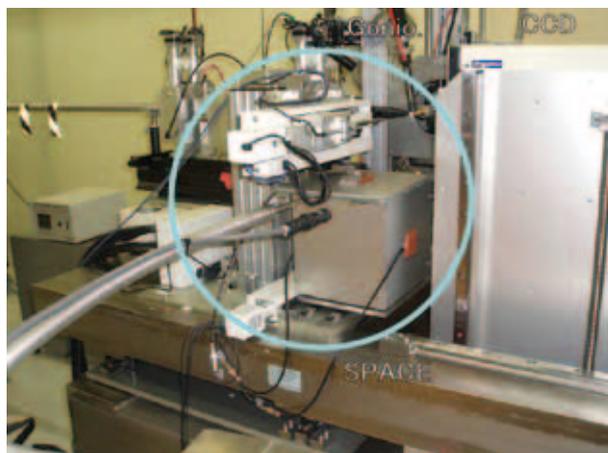


図1 サンプルチェンジャーSPACE

研究者は自らの研究室に居ながらにしてSPring-8の高輝度X線を用いた回折実験が可能となる。我々が目指しているメールインデータ測定システムでは、オペレーターはSPACEへのサンプルトレイのマウントやBSSの操作などを行い、ユーザーの実験のサポートをする。またユーザーは、測定条件の決定や結晶評価実験の結果判断などの実験デザインを自ら行うため、本システムは、いわば「オペレーターの手を借りたりリモートデータ収集」というべきものである。このシステムを実現するためには、ビームラインとユーザーの研究室との間で試料情報や測定条件などの情報を共有する仕組みが必須である。我々はこのために、ビームラインデータベースシステムD-Cha (Database for Crystallography with Home-lab Arrangement)の開発を行った。D-Chaは、結晶試料情報、センタリング座標情報、測定データを保存するリレーショナルデータベースと、インターネットを通じてデータベースにアクセスするためのWebサーバーより構築される。ユーザーはD-ChaのWebインターフェース(図2)を用いて試料情報、測定条件の登録や回折データの閲覧を行う。オペレーターはLANを通じてD-Chaから測定スケジュールをBSSへとダウンロードし、ユーザーの決めた測定条件でデータ測定を実施する。

2-3 メールインデータ測定システムの予備的な運用

我々のメールインデータ測定ではSPACEを用いた測定を行うため、ユーザーはSPACE用サンプルピンにマウントした結晶を専用サンプルトレイに詰めてビームラインに送付する。この際必要なメールイン用試料マウントツールキットの開発も行ってきた(図3)。本年度12月に大阪大学甲斐

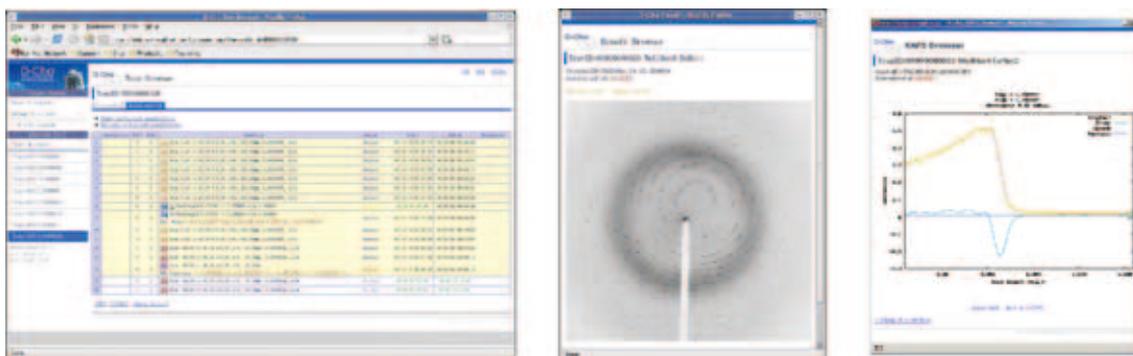


図2 D-ChaのWebインターフェイス

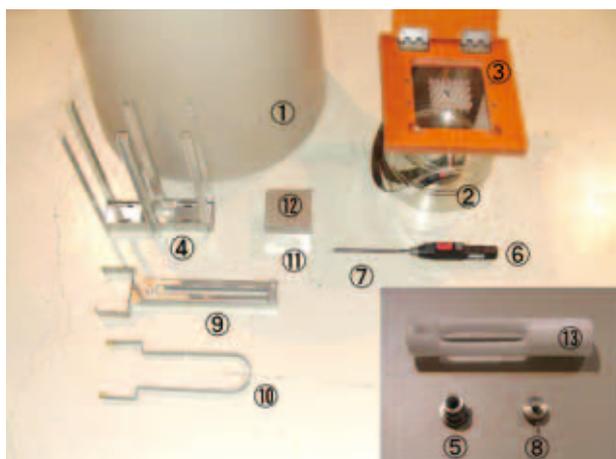


図3 メールインデータ測定システム用試料マウントツールキット。
①Cryo Shipper Mini(およびクライオブロック)、②液体窒素デューワー、③トレー容器(ED)、④トレー固定金具、⑤ハンプトン用アダプタ、⑥充電ドライバー、⑦ビット型マウントソケット、⑧タブ付きマグネット、⑨トレー脱着トング、⑩トレーフタ用トング、⑪サンプル保管トレー、⑫トレーフタ、⑬マウントソケット用ガイド(オプション)。

研究室の協力を得て、大阪大学-BL38B1の間でメールインによるデータ測定テストを実施し、メールインデータ測定システム全体が上手く機能することを確認した。

今後は、他の研究グループとの間でメールイン測定テストを繰り返し、システムの改善を進めるとともにSPACE用サンプルピンや試料マウントツールキットの普及を進めていく予定である。また、将来的には、創業企業などを対象とした有償依頼サンプル測定の導入も視野に入れている。

利用研究促進部門

構造生物グループ・結晶構造解析チーム

長谷川 和也、酒井 久伸、岡崎 伸生

3. BL41XU (構造生物学 I ビームライン)

3-1 はじめに

BL41XU (構造生物学 I ビームライン) は、SPRing-8の標準アンジュレータを光源とするタンパク質結晶構造解析

用の共用ビームラインである。我々はBL41XUを、従来のベンディングマグネットビームラインでは困難な試料(膜タンパク質、超長格子結晶や微小結晶など)や測定方法(超高分解能測定、高S/N比測定、マイクロビームによる回折実験)を実施するためのビームラインと位置づけ、そのための整備や改良を行ってきた。

3-2 微小ビーム利用のための分光器の熱安定性の向上

BL41XUでは、2004年度より微小サイズ($\sim 10\mu\text{m}$)の結晶を用いた構造解析を実現させるため、ビームラインの高度化を実施している。このような微小結晶から精度良く回折強度を得るためには、バックグラウンドの寄与を極限まで抑えるために結晶と同じサイズか、もしくはそれよりも小さなサイズのX線を照射することが必須である。これまでに実施してきた様々なStudyの結果、試料位置で $25 \times 25\mu\text{m}^2$ のビーム形成には成功したもの、その強度安定性に問題があることが判明している。例えば、 $100 \times 100\mu\text{m}^2$ のビームサイズであれば、試料位置での強度変動度は5時間で2%以内であるのに対し、 $25 \times 25\mu\text{m}^2$ では2時間で最大20%減少した。これは分光器の熱安定性に起因する物であった(2004年度年報参照)。これを改善するために、分光器第2結晶クレイドルにコンプトンシールドを導入したところ、通常利用している $100\mu\text{m}$ サイズのビームに対しては一定の効果を上げる事ができたが、さらに小さなビームの利用に対してはまだ改善が必要であると考えられた。

そこで、本年度では上記コンプトンシールドを改良し、冷却効率の改善を試みることにした。改良型のコンプトンシールドは、シールドの冷却水流路を第2結晶の冷却水流路から並列に分岐させるのではなく、第2結晶冷却水流路の下流に直列に接続するように変更した(図4)。この接続方法では、シールドへの配管径が変更されないため十分な冷却水流量と流速が確保できるだけでなく、分岐ポイントを起因とする振動も発生しにくいと考えられる。またこの改良とあわせて、2005A期からはフロントエンドスリットの開口度を $0.5 \times 0.5\text{mm}^2$ から $0.3 \times 0.3\text{mm}^2$ に変更し、分光器に導入する放射光のサイズそのものを小さくした。これ

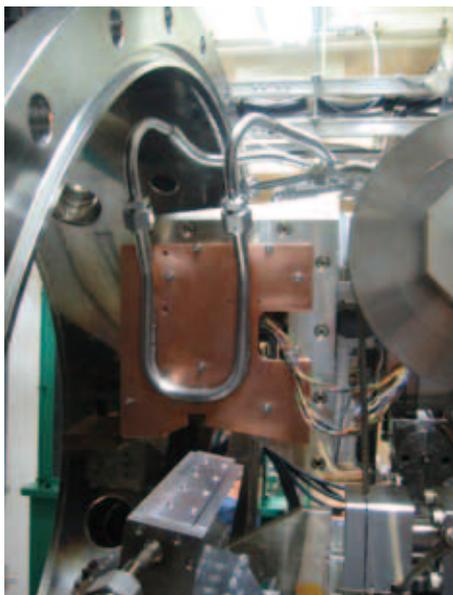


図4 改良型コンプトンシールド

らの結果、 $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ビーム利用時でも強度変動を4時間で0.2%以内に抑えることができた(図5)。その際の試料位置での光子数は 1\AA で 8.0×10^{10} photons/sec、光子密度は 1.3×10^{14} photons/sec/ mm^2 を達成した。

3-3 マイクロビームを用いた微小結晶によるテスト測定

上記の高度化の結果、実際に微小サイズの結晶を測定する環境が整ったことから、2005B期では実際に $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ のマイクロビームを用いて、 $20 \mu\text{m}$ 角クラスのタンパク質結晶を使っていくつかのテスト測定を実施した。実験にはマイクロシールド法で作成した $20 \times 20 \times 15 \mu\text{m}^3$ サイズのニワトリ卵白リゾチームの結晶(図6)を使用し、露光時間10秒、振動角1度の実験条件で計180枚のイメージを取得することに成功した(図7)。その解析結果は、分解能 1.76\AA で R_{merge} が8.0%(最外殻30.3%)であり、これまで用いられてきた大き

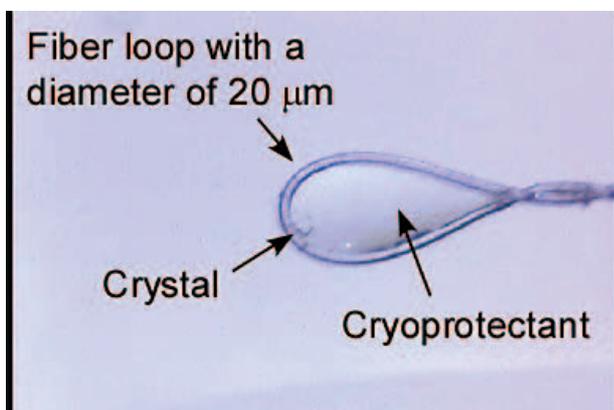


図6 実験に用いたニワトリ卵白リゾチームの微小結晶。写真中のループ繊維の直径が約 $20 \mu\text{m}$ 。

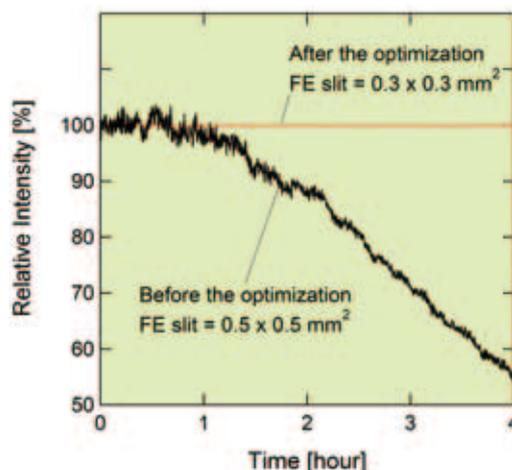


図5 コンプトンシールド改良前後でのビーム強度変動の様子。黒線が改良前、赤線が改良後のビーム強度の相対減少量を示す。

さの結晶からのデータと遜色ない結果であった。

このような微小ビームの利用が一般的になれば、もともと小さなサイズまでしか成長しない結晶だけではなく、クラスタ状に成長してしまった結晶の単結晶部分をねらってX線を照射するなどの測定も可能となると考える。また、放射線損傷が激しいサンプルなどは、微小ビームを使って同じ結晶上の異なる複数箇所に照射することによって、損傷によるデータ劣化の少ないデータを得ることも可能になると期待される。今後は、さらなるデータ精度の向上を目指して、特に試料周りの改善を実施し、構造未決定のサンプルを用いた多波長異常分散法による位相決定なども行っていく予定である。

利用研究促進部門

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



図7 撮影された回折イメージ(高分解能領域の一部を拡大したもの)。矢印の部分が 1.75\AA 分解能。

4. その他の高度化

4-1 ビームライン共通データストレージシステムの整備

従来、ビームラインで測定された回折イメージは、ビームライン毎に整備・管理されるデータストレージに保存されていた。しかしその利用率はビームライン毎にかなり異なり、保存データの整理やストレージ増設などをグループで一元的に管理するには若干面倒な点があった。また、ユーザーは1つのビームラインだけで実験を行うわけではなく、同一の試料を複数ビームラインで分けて測定することがあるため、データが各々のビームラインに分散されてしまい、あるビームラインから別のビームラインに保存してあるデータを参照できないことに対する不満もあった。そこで結晶構造解析用ビームラインで共通して使えるようにデータストレージシステムの集約を行った。

我々が採用した米国Isilon社製のクラスタストレージシステム（10TB構成）は、

- ・全ディスク容量を1つのファイルシステムとして取り扱うことができる
- ・クライアントに影響を与えることなく容量の追加増設が容易に行える
- ・全てのビームラインから同時にかつ考えられる最大限の負荷に耐えられる

という特徴を持つ。性能面では、書込み性能としてQuantum315のノンピングモードに必要な300Mbpsを優に上回り、最大値としておおよそ800Mbpsに到達するものであった。これは現状考えられる最大限の負荷に対してもかなり余裕のある性能である。また、このストレージシステムの導入に伴い、BL38B1では新規に光ファイバーを敷設してネットワーク上流との接続を1Gbps化した（BL41XUは既に1Gbps化されている）。また個々のビームラインに独立分散されていたアカウント管理システム（NIS）の集約を行い、データの保存と管理を一元化することができた。

利用研究促進部門

構造生物グループ・結晶構造解析チーム

酒井 久伸

参考文献

- [1] G. Ueno, et al.: J. Synchrotron Rad. **12** (2005) 380-384.
- [2] G. Ueno, et al.: J. Appl. Cryst. **37** (2004) 867-873.