

構造生物学研究分野

BL38B1

構造生物学Ⅲ

BL38B1は偏向電磁石を光源とし、回折能の大きな結晶を用いてルーチン的に回折データ測定を行うのに適したビームラインである。これまでに、データ測定ソフトウェアBSS (Beamline Scheduling Software) ^[1] の導入、新型CCD検出器と大面積IP検出器の導入を行い、ユーザー実験の利便性を高め、効率よく実験が行えるシステムの構築を図ってきた(図1)。また、2005年には、自動サンプルチェンジャーSPACE (SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger) ^[2] の導入を行い測定の自動化を図るとともに、メールインデータ測定を実現する際に必要となるWebデータベースD-Cha (Database for Crystallography with Home-lab. Arrangement) の開発を行い、試料情報、測定条件、回折データなどの管理を行う環境を整えた。今年度は、メールインデータ測定を実運用するための準備を行うと共に、実験ホール内側と外側にある側室を、それぞれ試料準備室と計算機室として使用するための環境整備を行った。また、将来的に高輝度化を図ることを視野に入れて、光学系の高度化にも着手した。

1. メールインデータ測定のテスト運用

我々が導入を進めているメールインシステムでは、サンプルチェンジャー SPACEを用いた自動データ測定を活用する。したがって、ユーザーはSPACE用サンプルピンに取り付けた結晶試料を専用サンプルトレイにマウントし、ドライシッパーを用いてSPring-8に送付する。試料に関する情報や回折データ測定条件などビームラインでの実験に必要な情報は、Webインターフェースを用いてネットワーク越しにD-Chaに登録する。ビームラインでは、D-Chaに登録された情報を

BSSにダウンロードすることで、ユーザーが指定した条件で回折データ測定を行う。データ測定は、2モード運転^[2]を利用し、日中に全ての結晶試料のスクリーニングを行い、良好な回折パターンを示す試料を用いて、夜間に自動測定を行う。D-Chaを利用することで、SPring-8に来所することなく、自由に測定条件を選択して放射光を用いた回折データ測定を行えることが、我々のメールインデータ測定の特徴である(図2)。今年度は、凍結試料をトレイにマウントするに必要なツール類の整備や、D-Chaの高度化、メールイン測定のマニュアル類の整備を行った。ツール類の整備はユーザーに貸し出すことを目的として、計4セット整備した(図3)。これは、ユーザーに余分なコスト負担を課さずにメールインを運用する上で重要である。次年度以降、数を増やし、常時10組程度のユーザーに貸し出しを行える体制を整える予定である。

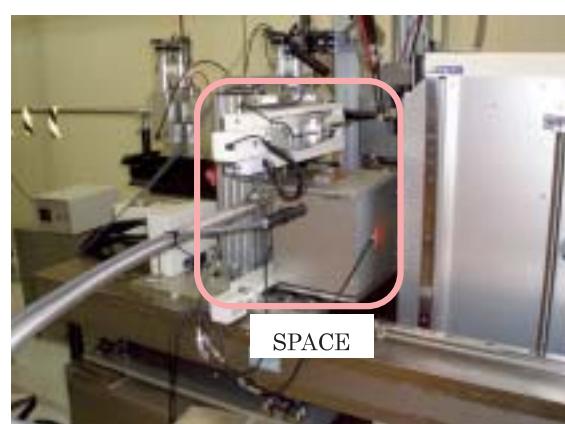
これらの整備を行った上で、ユーザーの需要を喚起することと、立ち上げたシステムのパフォーマンスを調べることを目的として、8組のユーザーを対象にメールインデータ測定

表1 2006年度のメールインデータ測定のテスト運用実績

| ユーザーグループ | 送られてきた試料の数 | スクリーニングのための測定の数 | 回折データセット測定数 |
|----------|------------|-----------------|-------------|
| ① | 24 | 26 | 6 |
| ② | 22 | 22 | 10 |
| ③ | 41 | 47 | 8 |
| ④ | 7 | 18 | 2 |
| ⑤ | 17 | 19 | 17 |
| ⑥ | 26 | 34 | 4 |
| ⑦ | 40 | 44 | 12 |
| ⑧ | 42 | 43 | 8 |



(a)



(b)

図1 (a) BL38B1の回折計、(b) 回折計に設置したサンプルチェンジャー SPACE

のテストを行った。表1は今年度に実施したメールイン測定テスト運用の実績をまとめたものである。多い日には、50個近い結晶のスクリーニングを行い、そのうち12個のデータセット測定を実施した。テストはいずれも成功裏に終了し、これまで整備したシステムの有効性を証明するとともに、協力していただいたユーザーからは非常に便利であるとの評価を得ることができた。

2. ビームライン側室の整備

2-1. SPACE用試料準備室

実験ホール内の側室（D09）に、サンプルマウンターと吹き付け低温装置を整備した。サンプルマウンターは、ビームラインに導入したSPACEと同様の構造を持つロボットで、結晶化プレートから拾い上げた試料を低温吹き付け装置で急速凍結した後、SPACE用サンプルトレイに試料をマウントするために使用する。SPring-8に来所してSPACEを用いた自動データ測定を行う場合は、メールインデータ測定で使用するマウントツールではなく、このサンプルマウンターを用

いて試料の準備を行うことができる。来年度には、BL41XUにSPACEを導入することが計画されており、将来的には、BL38B1の実験準備室をタンパク質結晶解析ビームラインで共通に使用する試料準備室として運用する予定である。

2-2. タンパク質結晶解析用計算機室

また、実験ホール外側の側室（D10）には、これまでタンパク質結晶解析データプールとして8TBのIsilon1920iクラスタストレージを整備してきた。今年度は、ノードの追加を行い、ストレージ容量を14TBまで増強した。これにより、ユーザーが測定した回折データの長期保存が可能となるばかりでなく、測定のスループット向上に伴うデータ量の増加にも対応可能となった。さらに、回折データ処理用のコンピューターの高度化（高速化）を行うため、LinuxによるPCクラスターシステムを5ノード導入した。これらのクラスターは、ビームラインの端末からリモートログインすることにより使用する。

理化学研究所のタンパク質結晶解析ビームライン



図2 WebデータベースD-Chaを用いたメールインデータ測定。D-Chaは試料情報、測定条件、回折データなどの情報を保存するデータベースである。ユーザーの研究室からはインターネットを通じて、また、ビームラインからはLANを通じて情報のやり取りを行う。D-Chaが研究室とビームラインのインターフェースとしての役割を果たすことで、メールインデータ測定が可能となる。



図3 (a) メールインデータ測定用マウントツールキット、(b) 凍結試料輸送用ドライシッパー

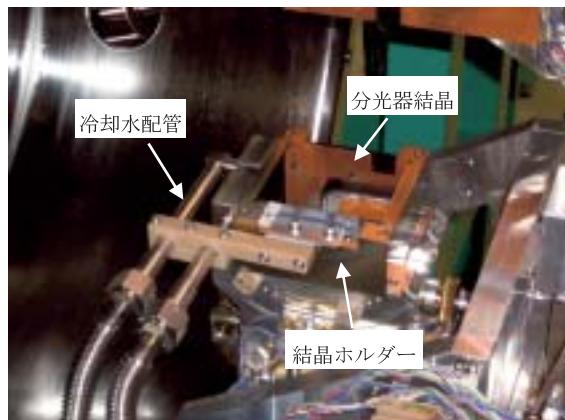


図4 分光器に取り付けられた、新型の直接冷却結晶

(BL26B1、BL26B2、BL44B2) も、この部屋と同じ仕様のストレージ及びクラスターを整備している。SPring-8のタンパク質結晶解析ビームラインのストレージや計算機をこの部屋に集約することで、ユーザーはビームラインの違いを意識することなくデータの管理や処理を行うことができる。また、一箇所で集中管理するため、保守・管理にかかるコストの軽減も図られる。

3. 光学系の高度化

将来的に、サジタル集光による高輝度化を実施することを見据えて、分光器結晶を間接冷却型のSi(311)結晶から直接冷却型のSi(111)結晶に取り替えた。これは、ビームライン技術部門で新しく開発された偏向電磁石ビームライン用直接冷却型結晶で、従来の直接冷却型結晶と異なり、冷却水の出入り口を結晶側面に設置することで、結晶をホルダーに装着する際に発生する歪の軽減が図られている。また、Oリングに放射光が直接さらされない構造になっているため、Oリング劣化による漏水などの事故が起きにくく、安定なビームライン運用が可能である。現在、年2回の長期停止期間中にOリングを交換して運用している。

参考文献

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

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、
岡崎 伸生、清水 伸隆、
河本 正秀、熊坂 崇、
山本 雅貴

BL41XU

構造生物学I

BL41XUはタンパク質結晶構造解析用の共用ビームラインで、光源であるSPring-8標準アンジュレータの持つ高輝度・高平行特性を活かして、高難度試料(600Åを超える超長格子結晶、 $\sim 10\mu\text{m}$ サイズの微小結晶など)の測定や、高精度な測定(高S/N比データ収集、0.8Å分解能を超える超高分解能解析など)を実現する為の整備や高度化を行っている。

1. 垂直集光ミラー・回折装置架台の更新

本ビームラインの集光光学系は、K/B配置の水平・垂直の両ミラーで構成されている。本光学系の経年劣化に伴う諸問題を改善するために2004年度から更新を行ってきたが、2006年夏季停止期間中の垂直集光ミラーの更新により完了した(図1)。本ミラーは水平集光ミラー同様にSi製でRhによりコートされている。あおり角は、アンジュレータの1次光使

用時(6.5~17.5keV)は3.5mrad、3次光使用時(19.5~35keV)では1.5mradに設定している。この結果、試料位置で垂直方向 $70\mu\text{m}$ 、水平方向 $80\mu\text{m}$ まで集光できることを確認した。これにより、試料位置での光子数、光子密度が上昇し、 $25\times 25\mu\text{m}^2$ サイズで光子数 $2.5\times 10^{11}\text{photons/sec}$ 、光子密度 $4.0\times 10^{14}\text{photons/sec/mm}^2$ を達成することができた。

また、同期間に回折装置架台を新設計のものに更新した(図2)。回折計本体と検出器搭載部を分離して2つの検出器に個別の架台を導入した結果、検出器の切り替えは架台 자체を交換する形態となったため、リスクや時間的コストが軽減した。また、歪みがなくなったことで回折計全体が高い位置再現性及び駆動精度を有するようになった。

2. 吸収線量に基づくタンパク質結晶試料の放射線損傷評価

高輝度放射光を利用したX線回折測定では、結晶試料の放射線損傷により構造決定が不能となる現象がしばしば見られる。その詳細なメカニズムは明らかになっていないが、試料のX線吸収によって共有結合が解離し、それによって発生した反応性電子(ラジカル)が周辺の共有結合や水分子を励起させる反応が連鎖して、格子を形成する分子間相互作用を破壊して結晶性を低下させることが原因と考えられている。現在、世界の放射光施設を中心にして、このメカニズムの評価実験と吸収線量(Absorbed dose、単位:Gy = J/kg)に基づく議論が行われている。そこで我々は、6.5~33.0keVの間の複数のエネルギーで測定を行い、放射線損傷に対する測定エネルギーの効果に関して吸収線量に基づく評価を行った[1]。



図1 新垂直方向集光ミラー。



図2 新回折装置架台。
左はCCD検出器使用時で、右はIP検出器架台。



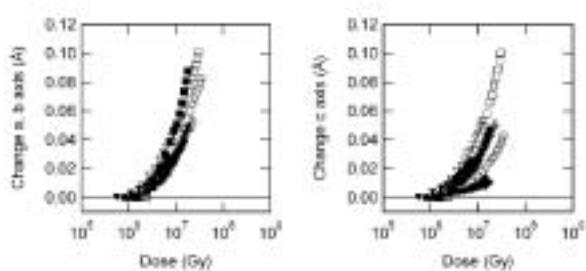


図3 格子定数の放射線損傷に伴う変化。全てのエネルギーで吸収線量の増加に伴い格子が長くなっていく様子が分かる。

試料位置でのビームサイズ $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ 、試料温度100Kに設定し、ニワトリ卵白リゾチーム結晶（サイズ $100 \times 150 \times 150 \mu\text{m}^3$ ）を用い、測定エネルギー毎に露光1秒、振動角 1° 、 180° 分を1データとして1つの結晶から12~15データセットを収集した。その結果、すべてのエネルギーで 10^6 Gy 以上の吸収線量で、放射線損傷による変化が生じることが示された。また、結晶学的パラメータの変化に明確なエネルギー依存性は示されず、基本的に吸収線量に依存することが示された（図3）。4つのジスルフィド結合の構造についても、すべてのエネルギーで結合の解離が観測された（図4）。したがって、測定エネルギーに依存した放射線損傷の違いはなく、あくまで精密な構造を得るために吸収線量を抑制したデータ収集が必要であると考えられる。

3. アンジュレータビームを利用した高度な測定法の開発

3-1 放射線損傷を考慮した微小結晶測定法の開発

2005年度後半から $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ サイズの微小ビームを利用して、 $25 \mu\text{m}$ 角程度の微小結晶（ニワトリ卵白リゾチーム結晶など）のデータ収集法の検討を開始している。これまでの結果から、試料結晶サイズが小さくなるほど放射線損傷の影響が致命的になることがわかっている。そこで、タンパク質結晶試料の吸収線量計算プログラムRADDOSE^[2]を利用して、吸収線量の予測限界値（ヘンダーソン限界）を目安に1フレーム当たりの露光時間を設定して実験を行った。その結

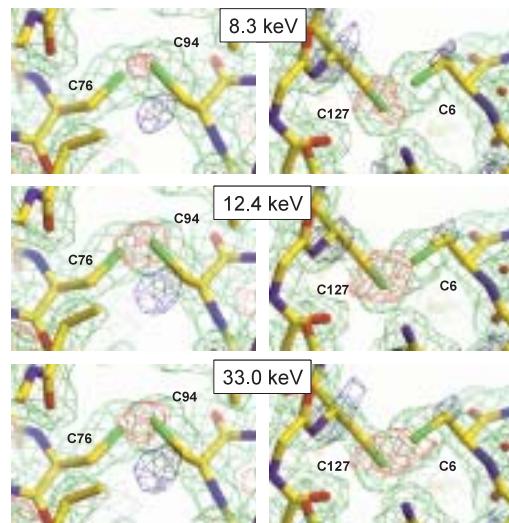


図4 典型的な3つの測定エネルギーにおける 2.33 \AA 分解能の電子密度図。観測された電子密度（緑色）にモデル構造を重ねている。黄緑色はイオウ原子でジスルフィド結合を形成しているが（損傷前）、損傷後の電子密度では負電荷（赤色）と正電荷（青色）が生じ、結合の解離が観測されている。

果、結晶学的統計値に明確な改善が見られたが、この方法では高い分解能の回折データが得られないという問題がある。そこで、位相決定が可能となる分解能の下限を検討するため、いくつかのSe-Met化タンパク質を用いて解析を行った。

最初に露光時間を短くしてデータを収集したところ、6つのサンプルにおいて $3.0 \sim 3.9 \text{ \AA}$ という低い分解能でもSAD法での位相決定に成功した。一方、BL41XUには、測定ソフトウェアBSS^[3]に以前より連続測定中に結晶を一定方向に動かしてビーム照射位置を変更するツールが導入されている。そこで、放射線損傷を抑制しながら露光時間を伸ばすために、一定枚数毎に照射位置を2点以上変更しながらデータ収集を行った。その結果、先の6つのサンプルのいずれも分解能が向上しながら位相も決定した。うち1つに関しては $20 \times 20 \times 300 \mu\text{m}^3$ という結晶形状を活かし、露光時間を1秒から3秒に伸ばして360枚のイメージを60枚ごとの6箇所にビーム照射して測定した（図5）。その結果、1箇所で1秒の露光では 2.9 \AA だった分解能が 2.3 \AA まで向上した。したがって、結晶形状

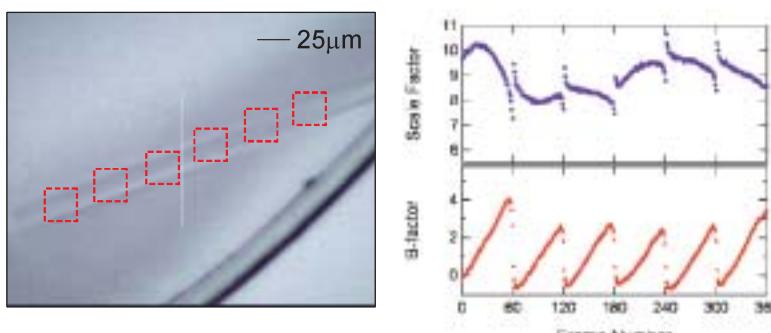
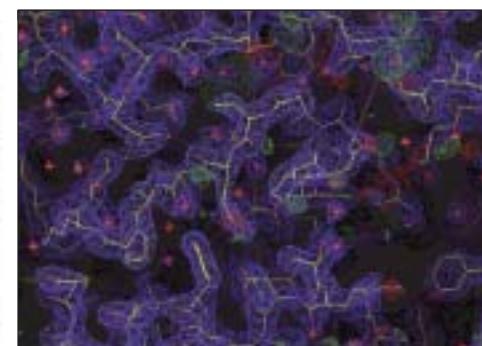


図5 $20 \times 20 \times 300 \mu\text{m}^3$ サイズの結晶の測定。左図のように $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ビームを60枚ずつ6箇所に照射して測定している。中心の図は強度のスケーリング時のスケール因子と温度因子の変化の様子を示している。60枚ごとに温度因子が下がっており、ビーム照射位置の変更が放射線損傷に対して有効な効果を示していることがわかる。右図は、初期位相決定後の 2.3 \AA 分解能の電子密度図。



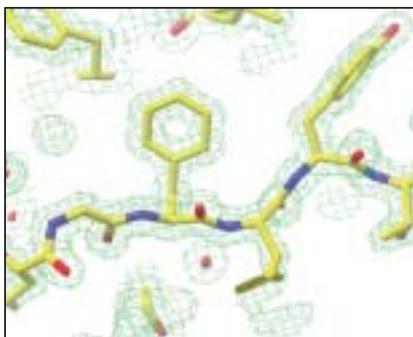


図6 測定波長0.9 Å で位相決定されたウシインスリンの
2.1 Å 分解能での電子密度図。

に依存するが、ビーム照射位置を複数設定することができれば、放射線損傷を抑制し構造決定に対して非常に有効であると考えられる。

3-2 硫黄原子の異常分散効果を利用したSAD法解析

近年、天然タンパク質中のシステインやメチオニンに含まれるイオウ原子の異常散乱効果を利用して、無修飾のネイティブ結晶から単波長での回折実験で位相を決定するS-SAD法が注目されている。しかし、イオウは軽原子であり、かつX線吸収端がかなり長波長（K吸収端：5.02 Å）にあるため、放射光BLで利用可能な波長領域（1.9~0.7 Å）では、その異常散乱シグナルは非常に小さい。そのため、放射光BLでS-SAD法を行うことは難しいとされてきた。BL41XUは非常に高いSN比で回折データ収集が行えるBLである。そこで、本BLで、どの波長領域までS-SAD法が適用できるか検討するため実験を行った。

ウシ由来インスリン結晶 (I213, $a=78\text{ Å}$) を用いて、波長0.71、0.90、1.10、1.30、1.50、1.70、1.90 Å、露光時間1秒／フレームで回転角360° 分のデータセットを収集した。得られた各波長の回折データ（分解能範囲50~2.1 Å）について、プログラムHKL2MAP^[4] (SHELXC•D•E^[5]) を用いてイオウ原子の位置決定と電子密度修飾による位相改良を行い、プログラムARP/wARP^[6]による自動モデル構築を試みた。その結果、0.90 Å 以上の波長において、1データセット（回転角360° 分、冗長度~20）でS-SAD法により位相が決定し、N・C両末端残基以外のほとんどの残基を側鎖も含めて自動構築することができた（図6）。この結果は、従来の「放射光BLでS-SAD法を行うことは難しい」という常識を覆し、BL41XUにおける回折データの高いS/N比を証明していると考える。

4. 最後に

BL41XUはSPring-8におけるタンパク質結晶構造解析分野のフラッグシップビームラインであり、その高度な利用を実現するために、BL担当者のみならずJASRI構造生物グループ、制御・情報部門、光源・光学系部門、理化学研究所

研究技術開発室のメンバーがその性能の維持と高度化に寄与している。また、図5で示した結果は、理化学研究所放射光システム生物学研究グループとの共同研究である。

- [1] Shimizu, N. et al. (2007) J. Synchrotron Rad. 14, 4-10.
- [2] Murray, J. W. et al. (2004) J. Appl. Cryst. 37, 513-522.
- [3] Ueno, G. et al. (2005) J. Synchrotron Rad. 12, 380-384.
- [4] Pape, T. et al. (2004) J. Appl. Cryst. 37, 843-844.
- [5] Sheldrick, G. et al. (1997) Methods Enzymol. 277, 319-343.
- [6] Perrakis, A. et al. (1999) Nature Struct. Biol. 6, 458-463.

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、長谷川和也、酒井 久伸
岡崎 伸生、熊坂 崇、山本 雅貴