

BL41XU 構造生物学 I

BL41XUは、SPring-8標準真空封止アンジュレータを光源に持つ共用のタンパク質結晶構造解析用ビームラインである。2009年度もビーム性能を活かした高精度・高難度測定を実現させるために、以下の高度化を実施した。

1. 高難度試料の高速スクリーニングを実現するサンプル交換ロボットの導入

膜タンパク質やタンパク質複合体などの解析が困難な試料(高難度試料)をターゲットとする場合、得られる結晶のサイズが微小(～20 μm)なだけでなく、サイズに関わらず1つの結晶内で多くのモザイク片が混在する多結晶体が得られることも多い。このような試料で構造解析を成功させるためには、作成された多くの結晶の中からデータ収集に値する結晶(または結晶中の領域)を効率よく選び出し、過不足無く測定することが重要である。特に、BL41XUでは10～30 μm程度の高輝度微小ビームを用いて、微小サイズの結晶や多結晶体のモザイク片からでも良質な回折強度データを収集することが可能である。しかし、試料結晶のゴニオ上への設置(マウント)は手動で行っているため、実験ハッチの開閉動作を始めとして効率的なスクリーニング環境を提供できていなかった。そこで、理化学研究所基盤研究部で開発された凍結試料交換ロボットSPACE(図1)を導入し、2009A期及び夏期停止期間中のテストを経た上で2009B期より正式にユーザー利用を開始した。ユーザーは、実験開始前にサンプルピンを詰めたトレイをロボットにセットしておけば、実験ハッチの開閉を行わずにハッチ外からサンプル交換を行うことが可能である。ロボットのサンプル格納容器には液体窒素が充填されているが、2007年度に既に導入済みの液体窒素自動供給システムから過不足無く液体窒素が供給される仕組みとなっている。

SPACEはこれまで専用に開発されたジュラコン製のねじ込み式ピンのみをサンプルホルダー(サンプルピン)として利用していた。一方、タンパク質結晶解析の分野では金属製のマグネット式ピンが一般的に広く流通しており、2つのタイプのサンプルピンを共に使用できる環境が要望されていた。今回、BL41XUに導入したSPACEでは、新たに開発されたマグネット式ピンを利用可能とするアタッチメントを正式採用し、ねじ込み式ピンとマグネット式ピンの利用は、アタッチメントとサンプルトレイ用の変換アダプタを付け替えるだけで簡単に切り替えられるようにした。ねじ込み式ピンの大きな利点はマウント時の位置の再現性にあり、一度人の手でマウントし、その座標情報をデータベースに記録しておけば2回目以降はそのデータベ-

スに基づくセンタリングが可能である。従って、昼間のうちに人の手でスクリーニングをしておけば、夜間は無人での連続データ収集を実行させることが出来るため、BL26B1/B2、BL38B1等では多くのユーザーがこの形態でSPACEを利用している。しかしながら、BL41XUのマシントイムは1.5シフト単位が基本となっているため、夜間の無人測定などは実施されておらず、ねじ込み式ピンの利点が理解されにくい環境にある。そこで、ねじ込み式ピンよりは汎用性の高いマグネットピンの利用をメインに整備を進めている。2009Bでは1回のマシントイム中で「全てのサンプルをロボットでマウントした」もしくは「ロボットと手動マウントを併用した」マシントイムは全体の8%に留まっているが、今後さらに積極的なプロモーションを行い、利用者数の拡大を目指す。

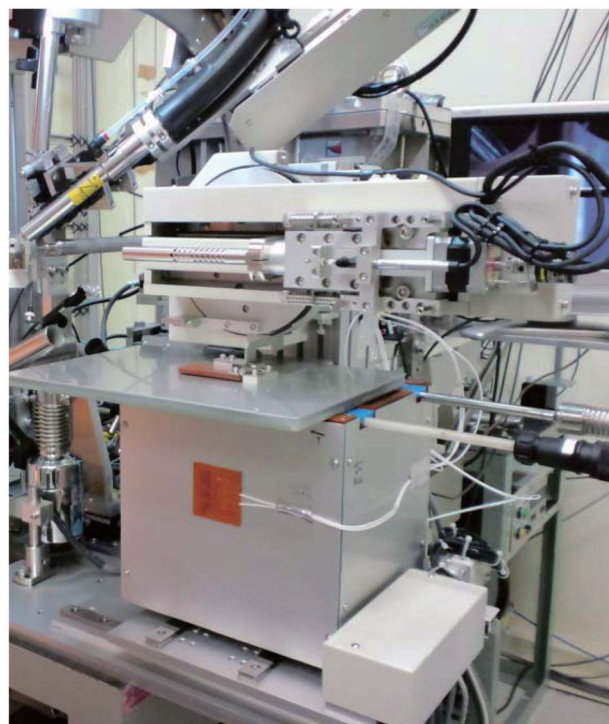


図1 凍結サンプル自動交換ロボット。マグネットピン用のアタッチメントを取り付けている。

2. 微小ビーム形成のためのピンホールスリットの改良

BL41XUでは、通常2つの4象限スリットを用いたビーム成形を行っており、最小30×30 μm²サイズが利用可能であったが、昨年度にさらなる微小ビーム形成を目指して試料直前に直径10 μmのピンホールスリットを導入し、テ

ストを実施している。昨年度の段階で問題であったのは、ピンホール自体から発生する寄生散乱であり、回折イメージ上ではダイレクトビームストッパー周辺に円形の散乱パターンとして記録されていた。そこで、この寄生散乱を除去するための散乱ガードを開発した。(図2)。ピンホール直下にはアルミ製のドーム形状の第1段目のガードがあり、等方的に散乱される寄生散乱の多くを除去することが出来る。一方、ダイレクトビーム方向には内径550 μm 、長さ10 mmの真鍮製のパイプが接続されており、ダイレクトビームの進行により発生する空気散乱を可能な限り一方向に制限する効果が得られている。その結果、ビームストッパー周辺の低角領域だけではなくイメージ全体の角度領域でバックグラウンドレベルが押さえられる結果が得られた。



図2 ピンホールスリットに追加された散乱除去ガード。ピンホール部にキャップするように被せて取付ける。ピンホール自体はパイプ先端から12 mm、試料から16 mmの位置に存在している。

図3では直径10 μm と50 μm のピンホールをそれぞれ使用した結果を比較している。ニワトリ卵白リゾチームの多数の微小結晶を多結晶体に見立ててマウントし、同一の場所へ50 μm と10 μm のビームを照射した。その結果、50 μm ビームでは複数の結晶やサンプルループ由来の回折パターンが検出されたが、10 μm ビームでは1つの結晶からの回折パターンが検出され、ループ由来のリングパターンも検出されていない。現在、テストフェーズとしてユーザーにも10 μm ピンホールスリットの利用を開放しているが、その設置と調整は、その都度担当者が実施している。来期以降にはピンホールの自動交換を含む全自動システムの導入を予定している。

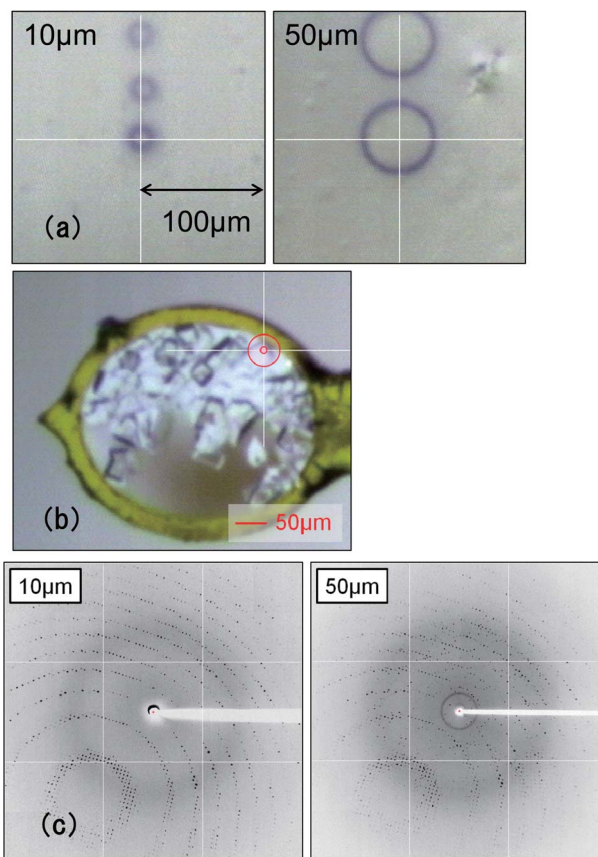


図3 (a) 10 μm と50 μm ビーム。ビーム照射により抗凍結溶液が放射線損傷を受け、ビームサイズに合わせて変色している。(b) リゾチームの微小結晶を塊のままサンプルループ内にマウントし、擬似的な多結晶体としている。クロスワイヤーの位置に正面からビームを照射した。(c) 測定された回折イメージ。50 μm では複数の結晶からの回折パターンだけでなく、横にあるループ由来のリングパターンも記録されている。10 μm では単一の結晶からのパターンのみ記録され、リングパターンも検出されていない。

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、牧野 正知、伊藤 廉

長谷川 和也、熊坂 崇