

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。挿入光源からの高輝度X線を用いた回折データ測定ができるため、これまでに膜タンパク質・超分子複合体などの数々の高難度試料の構造決定に貢献してきた。2010年度は、ビーム性能を活かした高精度・高難度測定を効率よく実現するため、以下の高度化を実施した。

1. 6連式コリメーターの装備

BL41XUでは2009年度までに、微小ビーム形成を目指してピンホールコリメーターの開発を行ってきた。これは、ビーム形状の整形を行うピンホールとピンホールから生じた寄生散乱を除去する散乱ガードパイプから構成される。このピンホールコリメーターの導入により、最小直径10 μm の微小ビームを形成できるようになり、また、イメージ全体の角度領域でバックグラウンドレベルが抑制される効果もあった。しかしその一方で、ピンホールコリメーターの設置は自動化されておらず、ユーザーの要望によりスタッフが設置し位置の微調整を行う必要があった。また、結晶サイズに応じてビームサイズを使い分けることができるように、直径10 μm 、30 μm 、50 μm のピンホールコリメーターを用意していたものの、これらの切り替えもスタッフによる作業が必要であり運用上の柔軟性を欠いていた。2010年度はこれらの問題点を解決するために6連式コリメーターを導入した。

6連式コリメーターは、一枚の板に取り付けられた6種類のコリメーターを、自動ステージにより切り替えて使用することができる装置である。ビームライン調整時に6種類全ての位置調整を行い、自動ステージの座標を測定プログラムBSSに記録しておくことで、自由に切り替えができる。

使用するコリメーターの基本的な設計は、2009年度まで使用していたものと同じで、真鍮製の台座にタンタル製のピンホールを取り付け、その上に散乱ガードと、長さ10 mmのガードパイプを置いて台座との間にピンホールを挟む構造になっている(図1)。ピンホールの軸とガードパイプの軸のずれは、ダイレクトビーム周辺の非等方的な散乱を生じ、ビームストップで遮られなくなるため、2つの軸の中心誤差がピンホールサイズの10%以下になるように作成した。ピンホールのサイズは、10 μm 、30 μm 、50 μm 径のものを用意している。これに加え、上流の4象限スリットでビーム整形を行って得られる50 μm ×50 μm 以上の矩形のビームを使用する場合に備え、先端に300 μm 、800 μm の穴のあいたコリメーターも用意した。この場合は、ピン

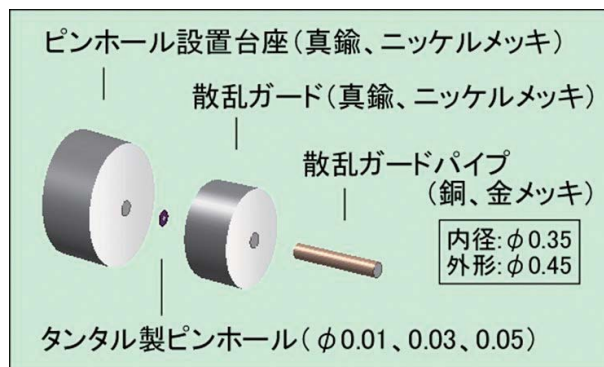


図1 微小ピンホールコリメーターの模式図
散乱ガードと散乱ガードパイプによりピンホールからの空気散乱の広がりを抑制している。

ホールはビーム整形をするのではなく、専らスリットからの寄生散乱を抑制することと、空気の散乱を抑制するために利用している。現状では6個のコリメーター取り付けポートの内、5つしか利用していないが、将来的には5 μm のピンホールコリメーターを取り付け、数 μm 程度の結晶からの測定を可能にする予定である(図2)。

6連式コリメーターの導入のメリットは、10 μm のピンホールビームが定常的に利用できるようになったことである。これにより、10 μm 程度の微小結晶からの回折データ測定ができるようになっただけでなく、クラスター状になった結晶・不均一結晶の単結晶部にX線を照射して測定することが容易になった。また、10 μm の他に30 μm 、50 μm

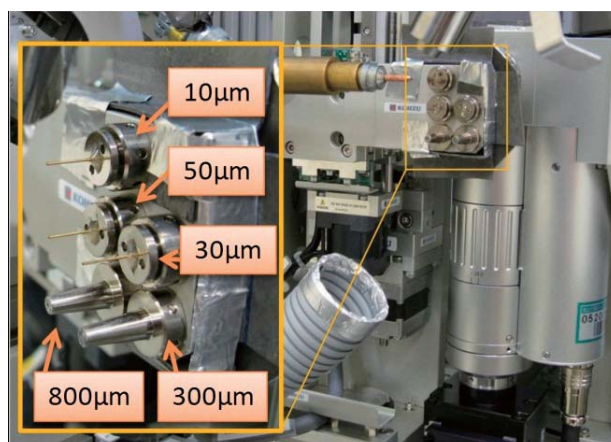


図2 微小ピンホール自動交換システム
6連のコリメーターを台座に備え、ソフトウェア上から自動的に交換できる。現状では6個の取り付けポートの内5つを利用している。

のピンホールビームも自由に切り替えて使うことが可能になり、試料の大きさなどに応じて最適なビームサイズを選択することができる。これらのピンホールビームはこれまで利用していた4象限のスリットでビーム整形していたビームと異なり、ビームの裾野の広がり小さい。このため、ユーザーが意図する照射位置以外にはX線がほとんど当たらず、SNの向上や照射損傷の低減といった効果も期待できる。

2. 微小試料観察のための同軸顕微鏡の装備

微小結晶からの回折データ測定は、BL41XUのターゲットの1つである。上述の6連式コリメーターの設置により、10 μm 程度の微小結晶の測定も可能になった。その一方で、これまで光軸から25°傾いた角度に設置した顕微鏡で試料のセンタリングを行っていたため、センタリングのわずかな誤差などが原因で、10 μm サイズの微小ビームを10 μm サイズの結晶に確実に照射することが困難であった。そこで2010年度はX線の光軸方向から試料を観察できる同軸顕微鏡カメラの導入を行った。

今回導入した同軸顕微鏡カメラには、対物レンズの中心にX線が通るための ϕ 1.5 mmの穴が開いている。そのため、X線を遮ることなく入射X線の方から試料を観察することが可能である。試料のセンタリングを行うにあたっては、5 μm 程度の焦点深度は必要となるためNAを0.2とした。またゴニオメーターに試料を載せ下しするには、周

辺に40 mm以上の空間が必要であるため、W.D.を46 mmとした。カメラには位置調整のための自動軸と傾き調整のための手動軸が取り付けられている。

また、10 μm 程度のサイズから数百 μm までの大きさの異なる試料のセンタリングや、ユーザーによって使用する結晶保持ピンの高さにmmオーダーで違いがあるため、顕微鏡の倍率の変更は必須である。そのため、本装置にはズーム比12のズームレンズを装着した(図3)。ズームレンズには自動軸が取り付けられており、BSSからの遠隔操作によるズームの変更が可能である。現状では、2.6倍から26倍までの4段階で切り替えられるように実装しており、最高倍率で観察した場合は10 μm の結晶のセンタリングも容易である(図4)。

同軸顕微鏡カメラの導入により、利用者が意図する位置に確実にX線を照射できるようになった。このため、微小結晶、クラスター状結晶、不均一結晶などセンタリングが難しい試料からの回折データ測定が容易になった。また、結晶内の品質良好な部位を探索するために、試料を2次元に動かしながら同じ振動角で回折像を測定するラスタースキャンを行うに当たっても、顕微鏡で観察した試料の像とX線照射位置の関係が直観的であるため、操作や結果の解釈が簡便になったといえる。



図3 X線同軸電動ズーム鏡筒

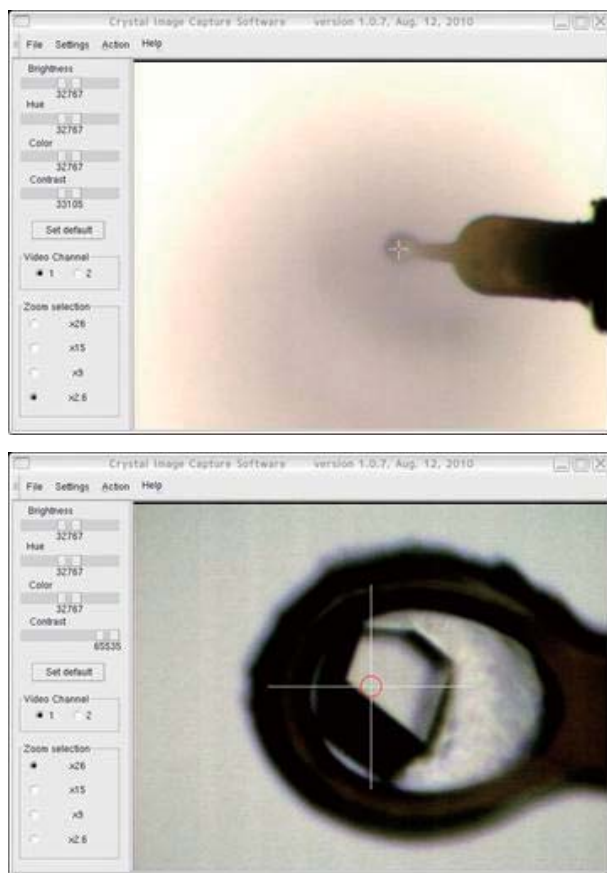


図4 データ測定プログラムBSSで観察した試料のズーム画像
試料の画像を4段階の倍率で変更できるようになった。

3. 自動サンプルチェンジャーSPACE利用率の向上

BL41XUでは、試料交換にともなう時間と労力を低減し、効率の良い回折データ測定を行うために、2009年度に自動サンプルチェンジャーSPACEの導入を行った。現在のところ、SPACE専用のネジピンを用いた利用ではなく、多くのユーザーが使い慣れたマグネットピンでの利用拡大を進めている。実験に来たユーザーへのPRや講習会を行った結果、2009Bでは8 %であったユーザーの利用率が、2010A期で47 %、2010B期では57 %に向上した。自動サンプルチェンジャーの利用は、現在進めているリモートデータ測定において必須であり、将来のリモート測定の普及を見据え、今後更に利用率を高めていきたい。

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、山本 雅貴、熊坂 崇