

BL38B1 構造生物学Ⅲ

BL38B1では、偏向電磁石を光源とした安定性の高いビームを利用し、効率的かつ高精度な回折データ測定を行うことを主な目的としている。特に、挿入光源のビームラインに比べ放射線損傷の影響を小さくした測定が容易で、安定なビームと相まって高精度に異常散乱のシグナルを利用した位相決定が可能である。

2003年以降ユーザー実験の利便性を高める効率的な実験環境を整備するため、データ測定ソフトウェアBSS^[1]の導入、新型CCD検出器、大面積IP検出器の導入によりシステム構築を進めた。2005～2010年には自動サンプルチェンジャーSPACE^[2]の導入とマグネットピン対応の高度化を行うとともに、自動運転のための試料情報、測定条件、回折データなどの管理を行う環境を整え、メール測定システムを導入、さらにこれを発展させた遠隔実験システムの共用利用を開始している。

さらに、より高精度な測定、データ収集時間の短縮と実験の高効率化、より長波長での測定を実現するため、大面積のCCD検出器の導入と試料周りの高度化、集光系の改善による高集光化を行った。その結果、波長1 Åでは信号が微弱なため利用が難しかった硫黄(S)の異常分散効果を高精度に観測できるようになり、0.85 Åの短波長で卵白リゾチーム結晶のSAD (Single-wavelength anomalous diffraction) 法による位相決定が可能となった。

2012年度は、CCD検出器のS/N比改善、読み出し速度の高速化を目的とした検出器の改修を行った。また、ビーム

ライン調整作業の効率化を目指し、BL41XUで運用を開始していたBL調整プログラムをBL38B1用に調整し、導入した結果、調整時間の短縮に成功している。その他、Fine-needleキャピラリーマウント法を応用した高圧下でのタンパク質結晶凍結法の開発および水溶性高分子と湿度調整を用いたマウント手法の開発を行った。

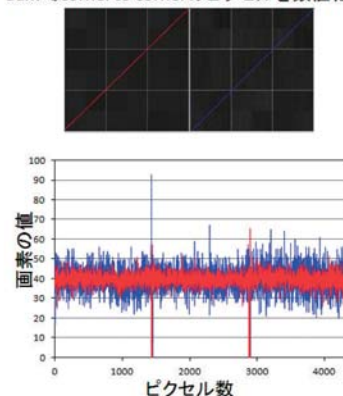
1. CCD検出器の高度化

これまで進めてきた集光系の改善による高輝度化、大面積の2次元X線検出器Quantum 315の導入により、以前にも増して微小な結晶がビームラインに持ち込まれるようになり、さらなる測定精度向上が求められている。また、当グループで開発中の湿度調整と水溶性高分子を組み合わせたマウント方法であるHAG法の利用を進めるなかで、室温での回折実験がタンパク質構造のゆらぎなど動的構造に関する新たな知見を得るために有効であることが分かってきた。室温での測定は試料の放射線損傷の影響が大きいため、入射X線量を制限して行う必要がある。このため、高角側のS/N比の弱い回折スポットを高精度で観測する必要が生じてきていた。

そこで、さらなるS/N比改善のための検出器の低ノイズ化対応として、現有のADSC Quantum 315 CCD検出器をCCD読み出し系およびデータ処理システムのS/N比改善が行われたQuantum 315rに改修した(図1)。この改修作業により、CCD検出器のノイズの振幅が改修前

Q315rとQ315の バックグラウンドの比較

advxでcornerto cornerのピクセルを数値化



ヒストグラム解析

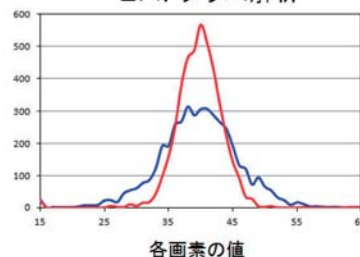


図1 CCD検出器の改修による検出器のバックグラウンドノイズの低減効果

と比較して約1/2に低減、高感度化され、データ精度が向上した。

また、改修により CCD 検出器の読み取り時間が0.42 sec から0.25 secへ高速化されたことを受け、サンプルチェンジャー SPACE のマグネットピン対応トリモート測定の開発を進め、データ収集時間の短縮と実験の高効率化を行った。その結果、より高精度なデータを限られたシフト数の中でこれまでよりも多く測定できるようになった。

2. ビームライン自動調整ソフトウェアの開発

ビーム調整はビームの微小化や利用するエネルギー範囲の拡大により、精密さが要求されるようになってきている。BL38B1 ではマンガン等の吸収端である長波長 (約 1.9 Å) 領域を使用する際にビーム位置が水平方向に変位 (約 100 μm) していたが、最近実施した高集光化により水平方向のビームサイズが小さくなったため、波長変更時に必要な実験定盤の位置調整の精度をさらに向上させる必要があった。また、波長毎に定盤やスリットの位置を調整する必要があり、調整時間が長くなる傾向が生じていた。

そこで、BL41XU 用に開発したビームライン自動調整ソフトウェアを、BL38B1 用に改造して導入、運用を開始した。改造点は以下のとおりである：1) 高集光化によって生じているビーム位置の微小変動を考慮した位置調整を可能にするため、複数回ビーム位置を観測し、その平均位置を基に位置調整が行える機能を追加した。2) インターフェースを変更し、編集機能を追加することで、スケジュール調整を容易に行えるようにした。3) エラー発生時の対応を簡略化した。4) エラー発生時のメール送信機能を追加することで、より自動調整の安全化を図った。以上の結果、5時間程度必要であった調整時間が1時間程度まで短縮され、さらに手作業による誤差がなくなることで、各波長での位置調整精度が向上した。

3. ガス加圧下での結晶凍結手法の開発

ガス吸着タンパク質や希ガスによる重原子位相決定の際に、結晶を高圧ガス下において回折実験を行う必要があるが、室温での回折実験では X 線損傷が激しくなるため、凍結する必要がある。そこで、微小結晶を取り扱う際に用いる Fine-needle キャピラリーを用いることで、高圧下での Flash-cooling を可能にする手法を開発した。Fine-needle キャピラリーの持つテーパー形状が、圧力に対して強い形状であるため、2 MPa 加圧下での凍結に成功した。さらに自動サンプルチェンジャー SPACE との組み合わせにより、大量の試料保管も容易になった。

4. 水溶性高分子と湿度調整を用いたマウント手法の開発

タンパク質結晶は溶媒水を多く含んでおり、周辺環境の変化 (温度変化、結晶化している密閉状態からの解放によ

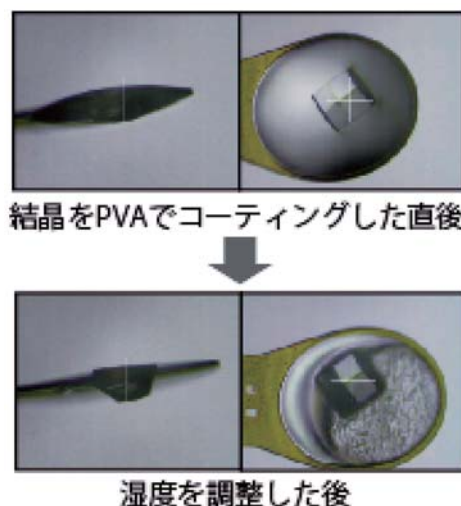


図2 水溶性高分子 (PVA) 溶液で結晶をマウントした様子

る結晶化溶媒の水分の蒸発など) によって結晶の質が損なわれやすい。また、低温凍結時に溶媒水が結晶化して体積膨張し、タンパク質結晶の損傷が起きることも多い。したがって、最適な試料保持条件や凍結条件を検討する必要があるが、溶媒結晶の析出を防ぐ抗凍結剤への浸漬によって起こる損傷や凍結時の溶媒水由来の損傷、結晶自体の質の問題などが複合的に関与しているため、凍結後に結晶の質を評価して最適な条件を見つけるのは一般に難しい。このため、抗凍結剤の低減と結晶の評価を的確に行う方法の開発が求められていた。

この問題を解決するため、試料結晶を水溶性高分子であるポリビニルアルコール (PVA) の水溶液でコーティングし、その周辺の湿度を制御する新たなマウント手法と装置を開発した (図2)。この方法により、結晶を室温で保持した回折実験が可能となるだけでなく、湿度調節によって結晶の質の改善や結晶間の同形性が得られることが明らかとなった。また、保持した条件のまま凍結することも可能で、幅広い応用が考えられる。今後この手法の開発をさらに進めていく予定である。

参考文献

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

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

馬場 清喜、水野 伸宏、宮野 菜央

長谷川 和也、奥村 英夫

山本 雅貴、熊坂 崇