

## 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り、高フラックスビームを利用して、膜タンパク質・超分子複合体などの高難度試料からの回折データ測定を行うことを目的の一つとしている。

しかしながら、ビームラインに持ち込まれる試料の微小化、回折能の低下など、測定の高難度化はますます進んでおり、これらの試料からより効率的に、より精度高く構造決定を行うために継続的な高度化が必要である。2012年度は、微小ビーム形成に使用しているピンホールコリメーターの改造など既設実験装置の高度化に加え、2013年度以降に計画している光学系・回折計の大改造の準備を進めた。

### 1. 微小ビーム形成用ピンホールコリメーターの改良

BL41XUでは、KBミラーの集光で得られるビームを試料直前のピンホールで整形して微小ビームを作成している。これまで使用していたピンホールコリメーターは、ピンホール部と、そこからの寄生散乱を抑制するガードパイプが一体となった形状をしていた。このため、ガードパイプの長さを十分にとることができず寄生散乱が残るため、結果として低角分解能が低く、バックグラウンドが高いという問題があった。また、一体構造に由来する方位調整に時間がかかるほか、試料操作時にガードパイプに接触して破損する事故が数回あった。

そこで、これらの問題を解決するため、ピンホール部とガードパイプ部を切り離した新しいコリメーターシステム

を開発した(図1(a))。ピンホール部は、図1(b)に示すようにタンタル製のピンホールと、それを挟み込んで固定するカバー部、およびベース板から形成される。このユニットには最大で6個のピンホールを取り付けることが可能で、現在のところ直径10, 20, 30, 50  $\mu\text{m}$ の4種類のピンホールを装着し、様々な測定試料サイズに対応している。

ガードパイプは、長さが30 mmあり、その先端に直径100  $\mu\text{m}$ のピンホールが取り付けられている。パイプ先端は試料から僅か6 mmの位置にあるため、寄生散乱を十分に抑制することができた。これによりビームストップは、そのサイズを直径2 mmから0.5 mmに小さくできた上、これまでよりも数cm試料に近い位置に設置しても、ピンホール部からの寄生散乱が回折画像上に映らなくなった。この結果、低角分解能が向上するとともに、バックグラウンド散乱を低減することができた。

### 2. 新規He/N<sub>2</sub>クライオ装置の導入

2012B期より、新しいHe/N<sub>2</sub>クライオ装置(Cryo Industries社)の運用を開始した。これまでは40~100 Kの温度範囲をカバーするために、2種類のガスそれぞれに対応した装置を2台利用していたが、本装置はHe/N<sub>2</sub>両用型であり、1台の装置で吹き付けガスを変更できる。このため、これまでスタッフが行っていた装置の交換作業が不要になり、ユーザーが窒素冷却とヘリウム冷却を自由に切り換えることができるようになった。さらに、本装置は以前の装置に比べて冷却能力が向上し、Heガスを使った場合、試料位置で約20 Kまで冷却できるようになった。

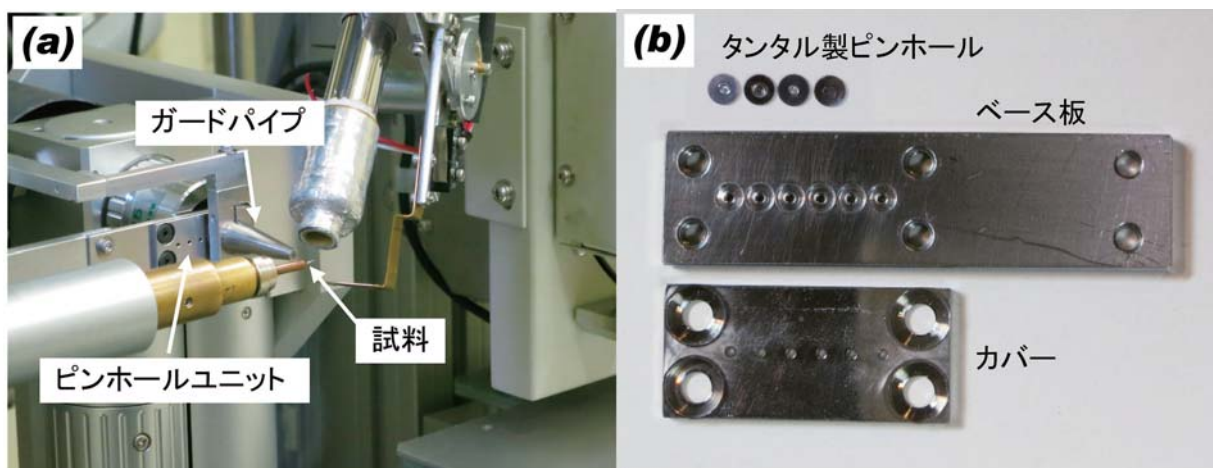


図1 (a) 新しいピンホールコリメーターシステム (b) ピンホール部の分解図

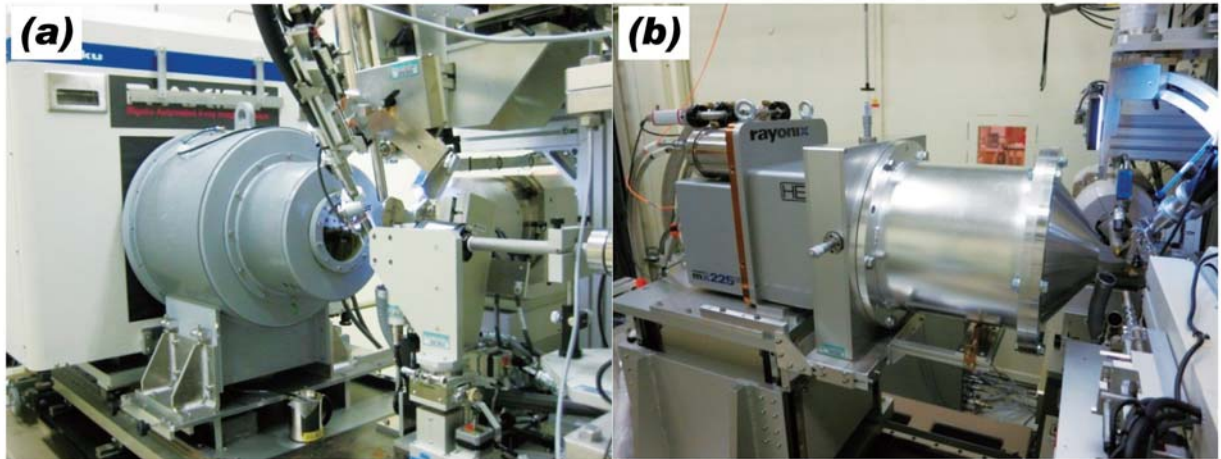


図2 極低分解能測定系 (a) IP検出器 (b) CCD検出器

### 3. 極低分解能回折反射測定系の整備

BL41XUでは、結晶中の溶媒構造など曖昧構造の決定やウイルス結晶の *ab initio* 構造解析に有用な極低分解能回折データ測定系を構築している。東京大学豊島研究室の協力の下、IP検出器RAXIS VとHeチャンバーを組み合わせた測定系を提供しているが(図2(a))、IP検出器ステージに傾斜機構がないため縦集光ミラーを用いた実験ができず、CCD検出器使用時に比べてビーム強度が弱かった。また、検出器切替え作業時に光学系の再調整が必要なことなど、測定環境の改善の余地があった。

そこで、2012年度はIP検出器ステージに傾斜調整機構を追加する改造を行った。これにより、検出器切替に要する時間が約3時間短縮され、また、縦集光ミラーを利用できるようになったことから、ビーム強度が約4倍になった。

また、CCD検出器MX225HEに対しても、Heチャンバーと組み合わせた極低分解能測定系の構築を進めた(図2(b))。このHeチャンバーの長さは100 mm単位で変更でき、250～550 mmまでの任意のカメラ長に対応可能である。現状では、波長1 ÅのX線を用いて、300 Åまでの低角反射を観測することができる。なお、セットアップには、Heチャンバーの設置とHe充填に要する時間を含め、2時間程度を要する。

### 4. プレートスクリーニング装置の開発

タンパク質結晶の回折実験において測定結晶の評価は重要であるが、下記のような問題にしばしば遭遇する。

- ・結晶化条件の検討時に析出する微小な結晶様物質がタンパク質の結晶なのかどうか。
- ・良質な回折像が得られない原因が、元々の結晶の質が悪いのか、凍結条件や結晶のハンドリングに問題があるのか。

そこで、X線による試料評価を迅速に行い、結晶化実験やクライオ条件探索へのフィードバックをするために、タ

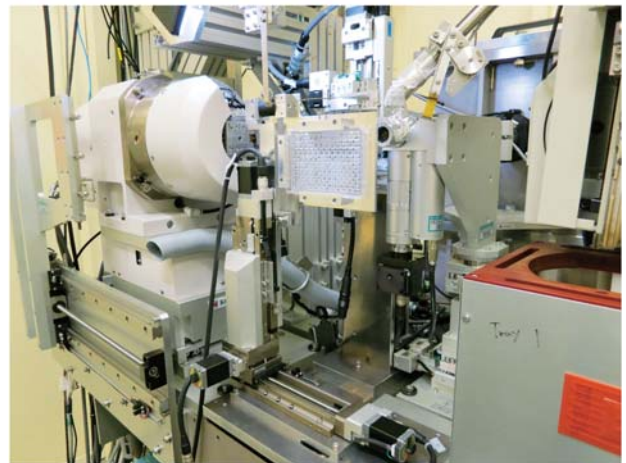


図3 プレートスクリーニング装置

ンパク質の結晶化に用いられるプラスチックプレート(結晶化プレート)のままX線を試料に照射するプレートスクリーニング装置の開発を進めている。2012年度は装置の設計、製作を行った。

まず、2011年度作製した簡易型プレートホルダーをベースにXYZ-3軸の自動並進軸を持つステージを作製した。さらに、通常型・ロープロファイル型の2種類の厚さのプレートに対応し、あおり角の微調整が可能なプレートホルダーを作製し取り付けを行った。テスト測定として、LSP法で析出させた結晶を用いて回折実験を行ったところ、顕微鏡による視認の不可能なドロップから～3.4 Åの分解能で回折斑点を得ることができ、その有用性を示すことができた。

現在、ユーザー利用に向けて、データ測定ソフトウェアBBSに本装置の制御ルーチンの実装を進めている。

### 5. 光学系の高度化

ピンホールによるビーム整形は、最小10 μmのビームの利用を可能にするものの、不要な光を廃棄している点で

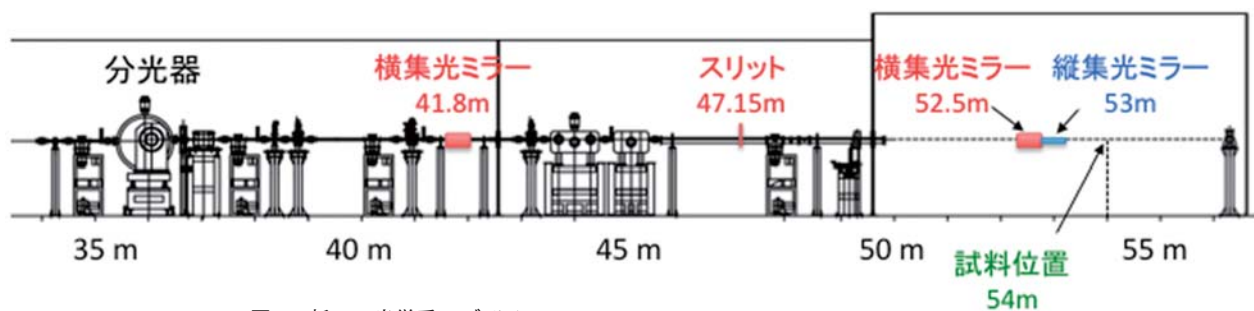


図4 新しい光学系のデザイン  
現在の光学系のCAD図の上に、新しい光学コンポーネントを重ねている。

光源性能を最大限に生かしていないといえる。微小結晶・低品質結晶からこれまで以上に迅速かつ高精度でデータ測定を行うには、新しい光学系への改修が必要であり、光源・光学系部門の協力の下で高度化計画を進めている。

2012年度はその第一弾として、ビームのさらなる安定化と分光器調整の簡素化を図るため、分光器結晶の冷却方式を水による直接冷却から、液体窒素による間接冷却に変更する改造を行った。

また、2013年度以降に導入する新しい集光光学系の設計も行った。設計にあたっては、(1) 現状より一回り小さい5  $\mu\text{m}$  ビームを使用できること、(2) 最大50  $\mu\text{m}$  のビームを利用できること、(3) フォトンフラックスを現状の1~2桁アップさせ $10^{13}$  (ph/s) 台を目指すことを目標にし、最終的に図4に示す2段集光光学系を採用することにした。今後はこの設計に基づき光学機器を調達し、2014年度中に改造を実施する計画である。

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  
長谷川 和也、奥村 英夫、水野 伸宏  
馬場 清喜、宮野 菜央、熊坂 崇