

## 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。さらに、機能解析のための多様な測定を目的として、オンライン顕微分光装置を導入して運用している。

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、2003年以来データ測定ソフトウェアBSS<sup>[1]</sup>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てきている。2005～2010年には自動サンプルチェンジャーSPACE<sup>[2]</sup>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、メールイン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。2011～2012年においては、大面積のCCD検出器の導入・改修と試料周りの高度化、集光系の改善による高集光化を行うとともに、ビームライン調整作業の効率化を目指し、BL調整ソフトウェアを開発した。さらに、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及び湿度調整と水溶性ポリマーを用いたマウント手法の開発を行った。

2013年度は、試料位置でのX線照射位置の高精度化、オンライン顕微分光装置の高速化・安定化、XAFS検出器の更新、SPACE調整治具の開発、液体窒素吹き付けによる霜除去装置の開発を行った。また、Fine needle キャピラリーによるマウント方法の開発、湿度調整と水溶性ポリマーを使用した結晶マウント法の開発については、2012年度に引き続き開発を行った。

### 1. ビーム位置安定化のための高度化

これまで、実験中のビーム位置調整は実験定盤の移動のみで行っていたが、水平方向で最大50 μm程度のずれが残っていた。この問題を解決するため、調整方法を見直すこととした。実験ハッチに設置した2つのスリットの開口サイズ、ビーム強度計測用イオンチャンバの位置を変更し、当グループで開発しているビーム自動調整ソフトウェアのパラメータの最適化を行った。その結果、ずれは最大で10 μm程度となり、改善が見られた。なおこの過程で、寄生散乱を抑制する回折計上の第2スリットの動作に再現性が得られない現象が見られた。経年劣化が疑われたため改修した。

また、ゴニオメーター制御の最適化を行った。従来は動作精度の確保のため、各軸の動作にバックラッシュを取る動作を設定していた。しかし、結晶を連続的に動かしなが

ら回折実験を行うなど、複数軸の同時駆動の際、同期性が悪く余分な時間がかかるため、操作性に問題があった。そこで、制御アルゴリズムを見直して、この動作をなくした。

### 2. オンライン顕微分光装置の高速化・安定化

本ビームラインに設置している顕微分光装置は、光源からの光を2枚のグレーティングで分光するダブルモノクロメータにより、目的の波長のみを試料に照射して測定できるような構造を持っている。このため、装置は大振りとなり、利用する際に光路にユーザーの手などが接触し、装置の再調整が必要となることがしばしばあった。そこで、光路に触れないように保護カバーを追加した。

また、動作軸の駆動速度の最適化と、経年劣化対策としてオーバーホールと補強を実施した。その結果、分光測定開始時における顕微分光装置の結晶観察ポジションから分光測定ポジションへの移行動作が従来で5分必要であったところ、1分へ短縮でき、効率的な実験が可能となった。

### 3. XAFS用検出器の更新と設置位置の最適化

新型検出器の導入と設置位置の最適化を行った。検出器と周辺の機器との接触等がないこと、及び標準のSe溶液でXAFSが問題なく測定できることを確認した。この高度化により、検出されるシグナルの線幅が狭くなり、より高精度な測定が可能となった。

### 4. SPACE調整治具の開発

サンプルチェンジャーSPACEは顕微分光装置と同時設置はできないため、入れ替えるたびに調整を行う必要がある。そこで、調整時間を短縮するための治具を開発した(図1)。これにより、2時間程度を要したSPACEのトレイ位置合わせ作業が30分程度で行えるようになった。



図1 SPACEトレイ位置調整用治具

### 5. 液体窒素吹き付けによる霜除去装置の開発

現状本ビームラインのみで利用可能なHAG法(後述)<sup>[3]</sup>

では、得られた凍結結晶を回収して他のビームライン等で測定することも必要となる。そこで、凍結後にSPACEで安全に自動回収できるシステムの構築を行った。このとき凍結した結晶を再マウントするが、しばしば結晶の周辺に液体窒素中の霜が付着して散乱源となり、測定精度が低下する原因となる。そこで、マウント後に液体窒素を結晶に振りかけて霜を除去する装置の開発を行った。基本動作は実現できたが、振りかけ後に試料近くの液体窒素吹き出し口が低温となり、結露し凍結するために、気流が塞がる問題が発生している。今後、この問題を改善してビームラインへの実装を予定している。

## 6. fine needle キャピラリーによるマウント方法の開発

微小結晶マウント及び結晶へのガス加圧が行える fine needle キャピラリーによるマウント方法<sup>[4]</sup>をBL38B1で利用可能とするためのテスト測定を行った。卵白リゾチーム結晶を使用して、Xeガス加圧下でX線回折実験を行い、開発中であるガス加圧下結晶凍結装置の性能評価と、結晶中にXe等のガス分子が吸着する様子を観察した。その結果、タンパク質分子に結合するガス分子の状態は、圧力や加圧時間、ガスを凍結直前に開放したかどうかなどのパラメータに依存することが分かった<sup>[5]</sup>。

## 7. 水溶性高分子と湿度調整を用いたマウント手法の開発

### ・様々な試料への対応

ビームライン評価に通常我々が使っている結晶以外のタンパク質結晶について、HAG (Humid Air and Glue coating) 法<sup>[3]</sup>が適応可能なのかテストを行った。HAG法で使用する湿度調整装置は、現在は室温でのみ動作する。しかし、結晶化は4℃などの低温で行われることもある。これらの結晶について、室温で実験を行ったが条件の最適化ができなかった。これには室温への温度上昇によって結晶の質が悪化している可能性もある。このため、現行機種を改造し低温に対応させる試験を行った。これによって、10℃まで温度を下げることに成功している。今後さらに高度化を進める。

### ・気流自動切替装置の導入

湿度調整気流を吹き付けながら実験を行うHAG法では、この気流をクライオ気流に瞬時に切り替えることで結晶凍結を行う。この切替機構を自動化するための機器を作成し、動作試験を行った。その結果、他の機器と干渉せずに動作可能であることが確認できた(図2)。さらに、自動切替をユーザーが簡便に行えるように、当グループでBL調整ソフトウェアとして開発したBOSS (Beamline Operating Scheduling Software) に機能を追加した。BOSSは各動作軸を予め組んだスケジュールに従い動作させることができるため、容易に実現できた。その機能を利用して、卵白リゾチーム結晶を用いて切り替えタイミング

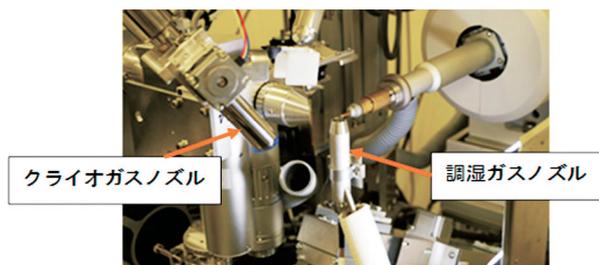


図2 水溶性高分子 (PVA) 溶液で結晶をマウントした様子

の最適化を行った。環境変化に対して安定であるリゾチーム結晶では問題なく凍結操作が可能となるタイミングを得ることができた。今後、他の結晶試料についても最適な切り替えタイミングを調査していく。

### ・湿度調整装置の安定運用の確認

試験運転の結果、本装置の連続運転時間は20時間未満であることが分かった。3シフト(24時間)での運用に対応するため、加湿用の貯水タンクの大容量化を検討する。また、不定期に突然の湿度変動(1-2%)が見受けられたため、原因調査を進める。

### ・BL38B1でのX線トポグラフィーの実験

HAG法をさらに発展させるために、調湿した際の結晶の質(内部構造)の変化を観測することは意義がある。この観測が可能なX線トポグラフィー法をBL38B1で実施可能かどうかの試験を行った。その結果、X線集光ミラーを退避させた状態の光軸に対して、実験定盤の高さは追従でき、大幅な装置変更を伴わずに実施できることがわかった。

しかし、Be窓由来と考えられるX線の強度ムラが見られており、トポグラフィー像を高精度に得ることは難しかった。Be窓交換など装置の改造が必要であることが判明した。

### 参考文献

- [1] G. Ueno, et al.: *J. Synchrotron Rad.* **12** (2005) 380-384.
- [2] G. Ueno, et al.: *J. Appl. Cryst.* **37** (2004) 867-873.
- [3] S. Baba, T. Hoshino, L. Ito and T. Kumasaka.: *Acta Cryst.*, **D69** (2013) 1839-1849.
- [4] M. Makino, I. Wada, N. Mizuno, K. Hirata, N. Shimizu, T. Hikima, M. Yamamoto and T. Kumasaka: *J. Appl. Cryst.*, **45** (2012) 785-788.
- [5] N. Mizuno, M. Makino and T. Kumasaka: *J. Synchrotron Rad.*, **20** (2013) 999-1002.

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