

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タンパク質結晶構造解析ビームライン(MXビームライン)である^[1]。高フラックスビームを利用して回折データ測定を行えることから、主として膜タンパク質・超分子複合体など、良質な結晶を得ることが困難な高難度試料の構造決定に利用されている。また、アンジュレータを光源とする唯一の共用MXビームラインであり、国内の大学・研究機関をはじめ、海外の研究グループ・製薬会社など幅広いユーザーに利用されている。

BL41XUはこれまでも数々の高難度試料の構造決定に貢献してきたが、近年、ビームラインに持ち込まれる試料の高難度化がますます進んできている。このような試料から高精度かつ迅速に構造決定を行うためには、ビームの微小化および高フラックス化による高精度化、そして、高速検出器による迅速測定の実現が必要であった。そこで、2011年より抜本的な高度化の準備を進め、2014年1～3月の長期点検調整期間を利用して集光光学系・回折計・検出器の更新を行った。

2014年度は、2013年度末までに導入した新しい集光光学系・回折計・検出器について、X線を用いたコミッションングおよびこれらの調整法の確立、並びに高エネルギーモードの立ち上げを行った。

1. 集光光学系の高度化

新しい光学系の目標として、高難度試料からの高分解能データ測定をするためにフォトンフラックス 10^{13} (photons/s) 台の高強度ビームを実現すること、また10 μm 以下の微小結晶や数百 μm 以上の大きな結晶など、もろもろビームラインに持ち込まれることから5 μm ～50 μm のビームを自在に切り替えて利用できる環境を構築することを設定した。そしてこれらを実現し、かつユーザー利用の利便性も担保するために、微小ビームを安定に利用するためにできるだけシンプルな光学系にすること、ならびに幅広いビームサイズ領域を速やかに切り替えて使えるようにすることを光学系のコンセプトとして設計した。

新しい集光光学系は、第1水平集光ミラーとKBミラーを組み合わせた2段集光光学系を採用し、光源より54 m離れた測定試料位置において微小ビームを実現している(図1)。3枚のミラーは何れも曲率固定のEEMミラー^[2]を使用しており(図2)、ビームサイズ変更は、仮想光源のサイズ変更・試料位置のデフォーカス点への移動・縦集光ミラーの角度変更を組み合わせで行う。

集光光学系のコミッションングの結果、波長1 \AA においてFEスリットを0.5 mm (V) \times 1 mm (H) の開口にし



図1 新しく導入した集光光学系の模式図



図2 新しい集光光学系
2段集光光学系を採用し、ミラーには曲率が固定されたEEMミラーを使用した。

たとき、試料位置でサイズ $2\ \mu\text{m}$ (V) \times $20\ \mu\text{m}$ (H)、フラックス 4.3×10^{13} (photons/sec) のビームが得られた。また仮想光源スリットの開口の変更・試料位置の変更・縦集光ミラーの角度変更を組み合わせることで、最大ビームサイズは $50\ \mu\text{m}$ (V) \times $35\ \mu\text{m}$ (H)、最小ビームで $2\ \mu\text{m}$ (V) \times $2\ \mu\text{m}$ (H) と幅広い範囲でのサイズ変更が可能となった。また、仮想光源点のスリットの開口を $9\ \mu\text{m}$ にした最小ビームの時でもフラックスは 1.7×10^{12} (photons/sec) を得られており、ビームサイズ・フラックスともに高度化の目標通りの性能を達成することができたといえる。

FEスリットを $0.5\ \text{mm}$ (V) \times $1\ \text{mm}$ (H) の開口にしたときは、波長を変えなければ高強度ビームを安定して利用することができる。BL41XUではタンパクの構造決定やタンパク質内の金属元素の位置決定に幅広い波長を利用するが、このFEスリット開口で波長変更を行った場合、ビームが安定するまでに数十分程度を要することが明らかとなった。そこで、利用の利便性のために、強度を妥協し、波長変更後の安定性を優先することとし、FEスリットの開口を高度化前と同じ $0.3\ \text{mm}$ (V) \times $0.3\ \text{mm}$ (H)にした。この時、ビームサイズは最小 $5\ \mu\text{m}$ (V) \times $2\ \mu\text{m}$ (H) ~ 最大 $45\ \mu\text{m}$ (V) \times $22\ \mu\text{m}$ (H) の範囲で変更可能である。試料位置のオフセットによるサイズ変更の際はビームの位置ズレが発生するが、自動的に補正することで自由に切り替え可能としている。その一方で、縦集光ミラーによる変更後はスタッフによるビーム位置調整が必要である。そこでユーザー利用頻度の高いビームサイズをカバーするため、ビームの縦サイズが $12\ \mu\text{m}$ になるようにMvの角度を固定して運用している。この時 $12\ \mu\text{m}$ (V) \times $2\ \mu\text{m}$ (H) ~ 最大 $35\ \mu\text{m}$ (V) \times $22\ \mu\text{m}$ (H) で自由にビームサイズ変更可能であり、その変更時間も最大で20秒程度である。また、最大ビーム強度は 1.0×10^{13} (photons/sec) であり、高度化前に比べて1桁程度アップしている。また、ユー

ザーの要望があればスタッフがMvの角度を変更しこれ以外のビームサイズ利用を可能としている。今後、自動アライメントの実装などをした上で、ユーザー利用に提供する予定である。

BL41XUの利用可能なビーム波長は $0.7 \sim 1.9\ \text{\AA}$ であるが、新しい光学系では $1.5\ \text{\AA}$ 以上の長波長を用いた場合に高次光の影響が回折像に見られた。そこで、高次光を除去するため、 $1.5\ \text{\AA}$ よりも長い波長を利用する時には、モノクロメータ結晶の角度をデチューンさせるようにした。波長変更に伴う一連の操作はビームライン制御ソフトBSS^[3]が一括して自動的に行うため、ユーザーは $0.7 \sim 1.9\ \text{\AA}$ までの波長を自由に切り替えて使えるようになっている。

2. 回折計の高度化

回折計は、ビームサイズ変更のための試料位置の光軸方向の併進移動、微小結に対する高精度測定のための低振動化、データ測定の効率化および試料周辺機器の利便性の向上を目的として高度化を行った。

ビームの微小化に伴い、試料の振動が回折データ精度に与える影響がより深刻になることから、回折計の定盤には安定な石定盤を採用し、床面の樹脂製インシュレータ上に設置されている。回折計定盤の定盤面は、試料をデフォーカス位置へ並進させるため光軸に沿って $60\ \text{mm}$ のストロークで移動可能となっている。吹き付け低温装置のノズル部は回折定盤上にクランプされており、試料位置の移動に対し追従するようになっている。低温装置ヘッド部の振動がノズル部を通じて回折計に乗ることは回折計設計時から懸念されたが、定盤のテーブル面を石製にしたことや、ノズルのクランプ部に振動対策を施すことにより振動の影響は抑えられている。また、標準試料のデータ測定では振動の影響は見られなかった。試料周辺部の様子を図3に示す。試料観察用同軸顕微鏡下流

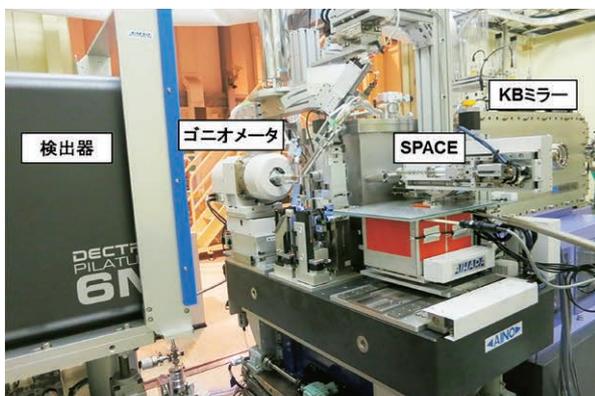


図3 新しい回折計と検出器

試料をデフォーカス位置に動かすため、石定盤のテーブル部は最大 $60\ \text{mm}$ 下流側に移動することができる。

に寄生散乱除去用コリメーターを配置している。穴の直径は100 μm であり、定盤位置およびミラー角度を変更しても位置調整することにより良好に機能している。ビームストップは直径0.5 mmのものを試料下流26 mmの位置に設置しており、低角域の回折データは波長1 \AA ビームで75 \AA 分解能まで測定可能である。また、ビーム位置調整用にPINフォトダイオード、蛍光体を試料下流側に設置し、自動で出し入れ可能となっている。今後ユーザーが必要に応じて自由にビーム強度を測れるように、ソフトウェアを準備中である。

3. サンプルチェンジャー SPACEの高度化

試料周辺部の密集化により、手による試料マウントが困難になること、および測定効率の向上のため、BL41XUはサンプルチェンジャー SPACE^[4]の利用による自動マウントを原則とすることとした。このためサンプルチェンジャー SPACEを大容量化し、収容できるサンプル数の増加が必要となった。

サンプルチェンジャー SPACEは、大容量の最新モデルに置き換え、UniPuckカセットをこれまでの倍である4個の設置が可能になった。これに加え、マウント動作を高速化するため、マウントアームの回転軸・並進軸の駆動の高速化も図り、測定の高スループット化に対応した。また、ビームサイズ変更時の試料位置の変更に追従するため、サンプルチェンジャー SPACEも定盤上に設置した。

4. 検出器の高度化

新しい検出器として、DECTRIS社製のPILATUS3 6Mを導入した。画素サイズは172 μm \times 172 μm 、画素数は2463 \times 2527ピクセルであり、有効検出面積は423.6 mm \times 434.6 mmである。読み取り時間はわずか0.95 msecであり、最高100 Hzの高速読み取りを活用し、X線シャッターを開いたまま、結晶試料を回転させ回折データを取りきるシャッターレス測定が可能である。また、高強度X線を用いたデータ測定を行う際には、結晶へのダメージ抑制するために、結晶を併進移動させながら測定するヘリカルスキャンが重要となる。シャッターレス測定およびヘリカルスキャン測定の実施にはゴニオメータ4軸とX線シャッター、検出器の同期制御が必要となる。そこで、制御・情報部門で開発された同期制御システムBlanc8を導入しこれらの動作を実現している。

標準試料リゾチーム結晶を用いたテストデータ測定では、分解能55.5-1.2 \AA (1.24-1.2 \AA)、 R_{merge} 4.8% (39.9%)、 $\langle I/\sigma I \rangle = 33.9$ (3.7) のデータを僅か36秒で得ることができた。さらに同じくリゾチーム結晶を用いたFine slice法による高精度データ測定(回折画像

9000枚、露光時間0.1秒、振動角0.01 $^\circ$)では、分解能55.5-1.28 \AA (1.30-1.28 \AA)、 R_{merge} 2.1% (8.2%)、 $\langle I/\sigma I \rangle = 41.9$ (7.5) のという良好なデータも900秒で得ることができている。

また高速ラスタースキャンによる試料位置探索も可能となり、視認が困難なLCP試料のセンタリングなどに威力を発揮している。

5. 高エネルギーモードの立ち上げ

今回の高度化は利用頻度が高いエネルギー領域6.5 keV \sim 17.7 keVに対応したものであった。しかし、20 keV以上のX線を利用した回折データ測定は、水素を可視化する超高分解能データ測定や、この波長域に吸収端をもつ核種の位置の同定、そして、それらを利用した位相決定を目的として一定のニーズがある。そこで、20 \sim 35 keVの高エネルギーX線を用いた回折データ測定を行うため、2013B期まで実験ハッチ2内で使用していた回折計を実験ハッチ1内に設置した(図4)。これらの機器の制御は、制御・情報部門の協力の下で立ち上げたVMEとBlanc8を組み合わせた制御システムで行われる。

高エネルギーX線ビームは、モノクロメータ結晶から、ミラー集光をせず直接試料位置へ導入され、回折計のスリット位置でのビームサイズは340 μm (V) \times 370 μm (H)であった。スリットを用いて試料位置でのサイズが30 μm \times 30 μm や50 μm \times 50 μm になるようにビーム整形をしたところ、ビーム強度が2013B期までと比べて約1桁低かった。2013B期と同程度の性能を得ることを目指して、現在屈折レンズの導入を進めている。

検出器としては、高エネルギー用に改良したCMOSフラットパネルをセットアップしており、従来のCMOSと比較したところ、感度が上がり精度が向上していた。

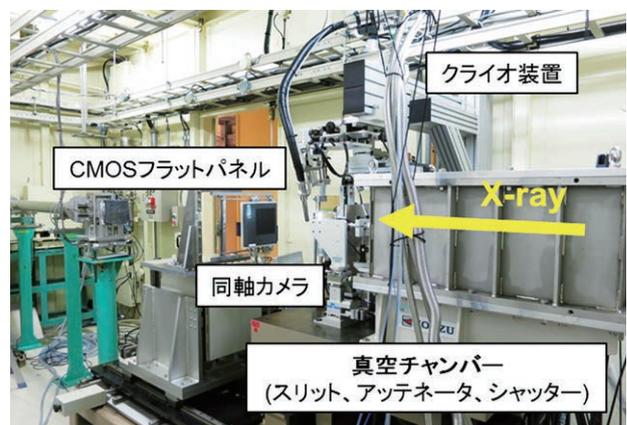


図4 高エネルギーモード測定用回折計
回折計は第1実験ハッチにセットアップされている。

参考文献

- [1] K. Hasegawa *et al.*: *J. Synchrotron. Rad.* **20**(2013) 910-913.
- [2] K. Yamauchi *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) 7129-7134.
- [3] G. Ueno *et al.*: *J. Synchrotron. Rad.* **12** (2005) 380-384.
- [4] G. Ueno *et al.*: *J. Appl. Cryst.* **37** (2004) 867-873.

タンパク質結晶解析推進室

タンパク質構造解析促進グループ

測定技術開発チーム

長谷川 和也、奥村 英夫、水野 伸宏、馬場 清喜
Nipawan Nuemket、山本 雅貴、熊坂 崇

テクニカルスタッフ

福居 知樹、早賀 紀久男

光源・光学系部門

仙波 泰徳、湯本 博勝、小山 貴久、大橋 治彦