

BL38B1 構造生物学Ⅲ

偏向電磁石を光源とするBL38B1では、安定性の高いビームを利用した効率的かつ高精度なタンパク質結晶回折データ測定環境を中心に、試料の化学状態をモニターするオンライン顕微分光装置や生理条件での構造解析を可能にする室温測定環境など、多様な実験環境の提供と開発を行っている。

ユーザー実験の利便性や効率性を高めるため、2003年以来ユーザーフレンドリーなデータ測定ソフトウェアBSS^[1]、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た。2005～2010年度には自動サンプルチェンジャ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た。2011～2014年度には、X線集光系の改善、高感度型CCD検出器、ビームサイズ可変機構、回折計/検出器分離型定盤の導入を行った。試料雰囲気湿度調整と結晶の水溶性ポリマーコーティングを用いた室温および凍結条件下での試料マウント手法(HAG法)の開発を行った。2015年度は、高精度/高効率なデータ収集のための高性能化、非対称配置結晶を用いた高輝度化、X線トポグラフィ測定システムの構築、解析環境の整備を行った。2016年度も2015年度に続き高性能化を進めている。HAG法については、引き続き開発を行っている。

1. 高精度/高効率な実験を可能とするための高性能化

BL38B1では、HAG法を用いた室温でのデータ収集が可能であるが、その際の試料の放射線損傷は100 Kのクライオ温度とは異なり、無視できない状況にある。この問題を軽減するため測定系の高速化を進め、6 Hzでの連続読み出しが可能な新型のCMOS検出器と高精度高速回転が可能なゴニオメータ、同期制御システム、10 Gbps接続の高速ストレージを組み合わせることで、180枚分の回折データ収集が30秒～1分程度で可能となった。2016年度は、放射線損傷の回避を目的として、試料へのX線照射位置を精密に移動させるために、ゴニオメータ上のXZ方向の動作軸のストローク拡張と高剛性化を実施した。さらに、CMOS検出器の距離が150 mm固定であったため、より高分解能での測定を可能とするために、50 mmまでの検出器距離変更機構を追加し、分解

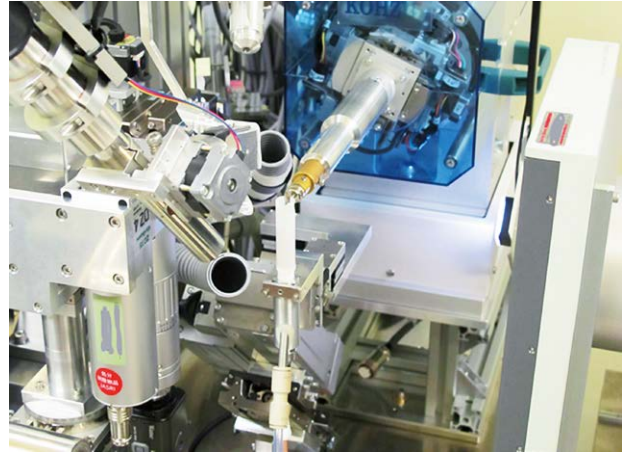


図1 高精度高速回転ゴニオメータとCMOS検出器によるシャッターレス測定

能 1.6 \AA @ $\lambda = 1.0 \text{ \AA}$ での測定を可能とした(図1)。また、老朽化により動作が不安定であったX線シャッタの制御部を更新した。

2. 非対称配置結晶を用いた高輝度化

これまでに、ミラーによるX線集光の最適化、回折計上機器の光路真空化などにより高輝度化を進めてきた。2015年度より、結晶サイズのさらなる微小化に対応するため、光源・光学系部門光学系グループの協力のもと、分光器内結晶の非対称配置化(図2)による高輝度化の検討と評価実験を行った。現在、結晶の歪みに由来すると考えられる縦方向のビーム発散を抑える間接冷却方式の第1, 2結晶ホルダーを製作した。今後、この結晶ホルダーの評価と運用に向けた改良をさらに進めていく予定である。

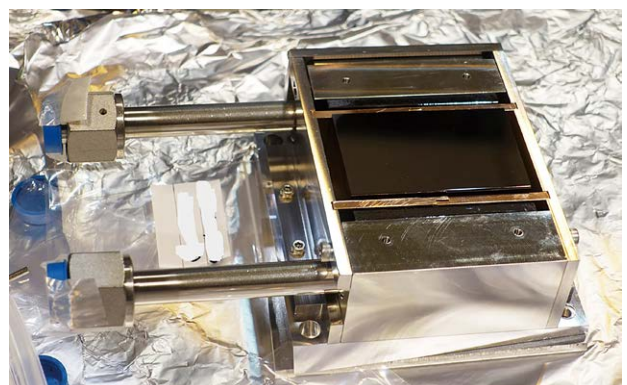


図2 二結晶分光器に設置する非対称配置結晶

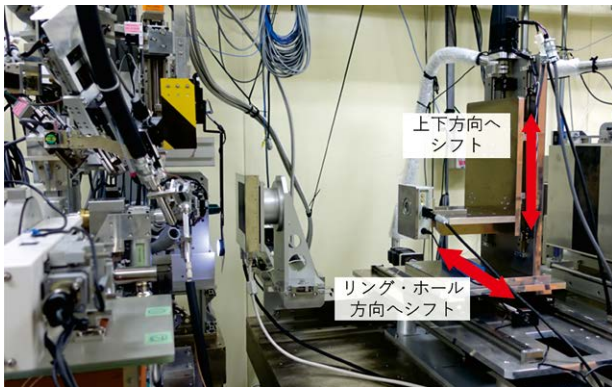


図3 X線トポグラフィー実験系

3. X線トポグラフィー測定システムの構築

X線結晶構造解析では、できるだけ高分解能なデータを取得することで、より精密な構造を解析することが求められる。そこで我々は、タンパク質結晶内部の転移、積層欠陥、成長縞、不純物の混入などによる回折への影響を確認するために、X線トポグラフィー法(XRT)の測定系の構築と測定手法の開発を行った。これまでに、高空間分解能の二次元検出器を用いて、狙った回折点の内部構造の測定を半自動で行える実験系が構築できた。2016年度は、より小型な浜松ホトニクス社製高感度・高分解能CMOS検出器(C12849-101U)を導入し、自動化システムを再構築した(図3)。その結果、従来はZ方向の可動範囲が光軸を中心に-30 mmから+60 mmであったが、 ± 100 mmの動作が可能となり、より高角の回折点を測定することが可能となった。これを用いたXRT測定手法の開発をさらに進める。

4. HAG法の高度化

先述したHAG法^[3]は、これまでの高度化で温度制御型調湿装置、温度制御ワークベンチを開発することで、適用可能な温度が4～20℃まで対応可能となった。さらに高精度な実験を可能とするために、装置の高性能化を進めた。さらに、生体内の活性温度での構造解析を可能とするために、より高温での調湿を可能とする高温対応の調湿装置開発を行った。

・4-20℃対応温度制御型調湿装置の高性能化

温度湿度測定の高速化と、計測値算出に時間差平均法を導入し、測定の高精度化を進めた。さらに、熱交換器の高効率化を実施し、装置の小型化を進めた(図4)。2016年度よりユーザー利用を開始している。

・温度制御ワークベンチの高性能化

結晶観察用のCCDカメラとLCDの解像度を800×600ピクセルから1920×1020ピクセルへ向上させるとともに、結晶観察用の光源を改良し、ハンドリング時の視認性を向上した。2016年度よりユーザー利用を開始して

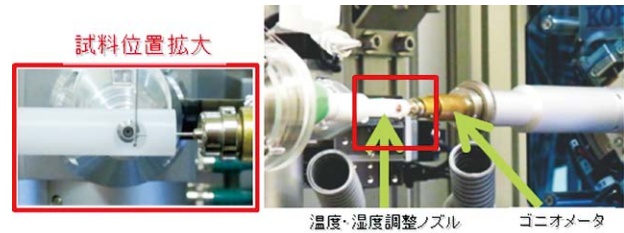


図4 低温対応調湿装置を試料位置に設置した様子

いる(図5)。

・高温対応調湿装置の開発

タンパク質の活性温度や生理条件温度は結晶化温度や回折測定温度と一般に異なっている。生体内での活性状態に近い環境で構造解析を行うことは、機能解析に重要な構造情報を得るために重要である。このため温度制御可能な調湿装置の開発を進め、20～40℃範囲での制御が可能となった。2017年度以降、この装置を利用した実験手法の開発を進める。

参考文献

- [1] G. Ueno, et al.: *J. Synchrotron Rad.* **12** (2005) 380-384.
- [2] H. Murakami, et al.: *J. Appl. Cryst.* **45** (2012) 234-238
- [3] S. Baba, et al.: *Acta Cryst.* **D69** (2013) 1839-1849.

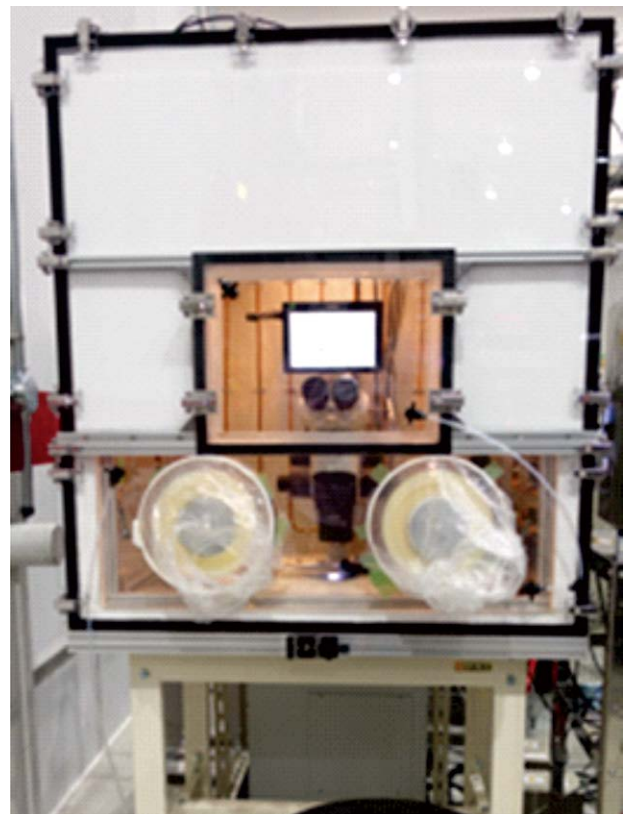


図5 温度制御ワークベンチ

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

馬場 清喜、水野 伸宏、仲村 勇樹

長谷川 和也、奥村 英夫、村上 博則

Nipawan Nuemket、尾崎 愛美、津田 奈美

熊坂 崇、八木 直人

利用研究促進部門

技術支援グループ

福居 知樹、入江 崇起、早賀 紀久男