

BL41XU 構造生物学 I

BL41XUは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。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。アンジュレータを光源とする唯一の共用MXビームラインであることから、海外の研究グループ・製薬会社などを含む幅広いユーザーに利用されている。また20～35 keVのX線を利用した回折データ測定ができることもBL41XUの特徴の一つである。2016年度は、回折実験やビームライン調整の迅速化・効率化、微小試料からの新たなデータ測定方法の開発等を目的として下記5項目の高性能化に取り組んだ。

1. サンプルチェンジャーの高速化

2014年度からPILATUS3 6Mを運用し始めたことにより標準的な測定時間が3分にまで短縮された。その一方でサンプルチェンジャー SPACEによる試料交換に1分要しており、さらなる効率的なビームライン利用のためには試料交換の高速化が必要であった。そこで20秒以下での試料交換を目指して次のようなSPACEの高性能化を行った(図1)。

(1) マウントアームの2重化

これまでマウントアームは1本であったためサンプル交換のためにゴニオメーターへ2度アクセスする必要があったが、マウントアームの2重化により1度のアクセスで試料交換が可能になった。

(2) ダイレクトドライブモータ、サーボモータの利用



図1 高性能化後のサンプルチェンジャー SPACE

従来のステッピングモータでは高速駆動に限界があったため、マウントアームの回転軸にダイレクトドライブモータを、並進軸にサーボモータを用いた。

(3) マウントアームの長ストローク化

マウントアームのストロークを長くすることでSPACE本体と光軸の距離を長く取れるようにした。これにより検出器とSPACEの干渉がなくなり、試料交換前の検出器の退避や交換後のSPACEの退避が不要になった。

このようなSPACE本体の改造に対応して、制御ソフトウェアやデータ収集ソフトウェアBSSの改造も進め、試料交換時間を18秒にまで短縮することができた。1000回以上の試料交換テストを行ったところ、安定性についても高速化前と同等であることを確認している。また、SPACEの近くにエリアセンサを設置し、動作中に人が近づいた場合に緊急停止する仕組みも設けた。高性能化したSPACEは2017A期よりユーザー利用に提供する。

2. Serial Synchrotron Rotation Crystallography (SS-ROX)法による測定技術の確立

近年は大きくて良質な結晶を得ることが難しいタンパク質へと構造解析の対象が変わってきている。このような試料から高精度な回折データ測定を得るためには高強度微小ビームを用いた回折データ測定が有効であるが、X線照射損傷による結晶の品質の低下(回折能の低下)を招くため1つの結晶から必要なデータ全てを測定するのが困難である。このようなケースでは多数の微小結晶から得た部分的なデータを合わせて完全性を高めざるをえない。そこで多数の微小結晶から効率よく測定する方法としてSS-ROX法による測定技術の確立を進めた。

この方法ではタンパク質の微小結晶懸濁液を直径約1 mmの汎用のサンプルループをすくい上げ、凍結した後に回折計に載せる。従来の測定方法のように結晶の位置合わせをした後でX線を照射するのではなく、サンプルループを動かして2次元走査することでループ上の結晶に網羅的にX線を照射する(図2)。露光時間が数十ミリ秒から数百ミリ秒の露光で回折データを測定することから、SFX法と異なり無損傷データ測定を行うことはできないが、露光の間に結晶を回転することができることから、回折強度を効率よく測定できると期待できる。

このようなSS-ROX法の有効性を実証するために、ルシフェリン再生酵素(Luciferin-regenerating enzyme; LRE)

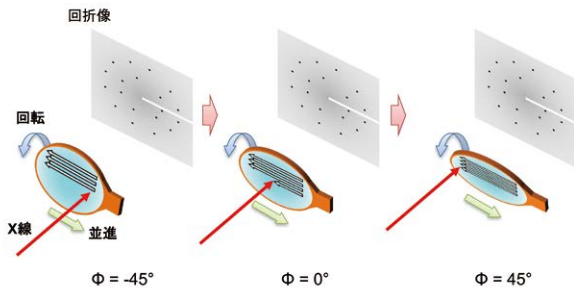


図2 SS-ROX法による回折データ測定の様式図

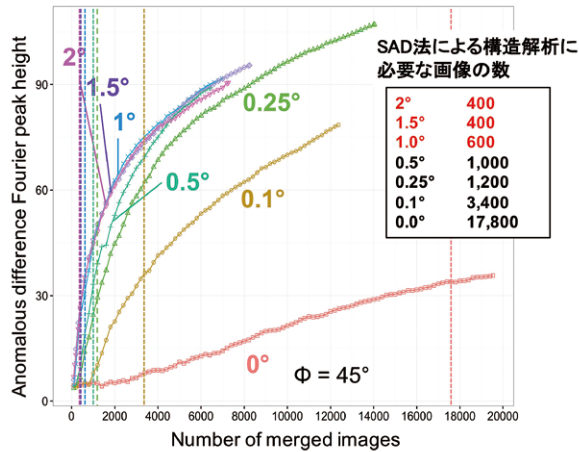


図3 1枚あたりの回転角を変えて測定し、異常分散のシグナルの大きさおよびSAD法による構造決定に必要な回折画像数を比較^[1]

の水銀誘導体の微小結晶(太さ3~5 μm, 長さ20~50 μm)を用いて測定を行った。1枚の回折画像あたりの回転を0°から2°まで変えてデータ測定を実施し、独自のデータ処理方法を用いて解析したところ、回転角0°(静止写真)では単波長異常分散法による構造決定に17,800枚の回折画像が必要であったのに対し、1°以上回転すると400~600枚の回折画像で構造が決定することができた(図3)。さらに、様々な露光時間で測定して照射損傷の影響について調べた結果、LREの場合は吸収線量3 MGyまでであれば、長時間の露光で得られたデータは照射損傷による劣化よりもS/N比向上によるメリットが大きいことが分かった^[1]。

SS-ROXの利用法の一つとして期待されるのが室温構造解析である。非凍結状態ではX線照射損傷が70倍以上速く進行することから微小結晶をもちいた室温データ測定は困難であるが、多数の結晶から効率よく測定できるSS-ROXであれば可能であると期待される。2016年度はこのために必要な高速シャッターや高速ステージの整備も進めた。

3. ビームラインのソフトウェア開発

ビームライン操作スケジュールソフトウェア(BOSS)は、電動軸の制御、強度モニタリングと校正、X線ビー

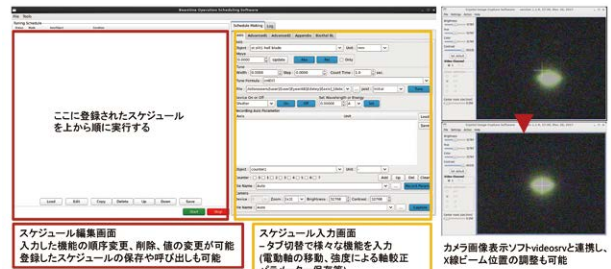


図4 自動調整を行うBOSSの画面構成

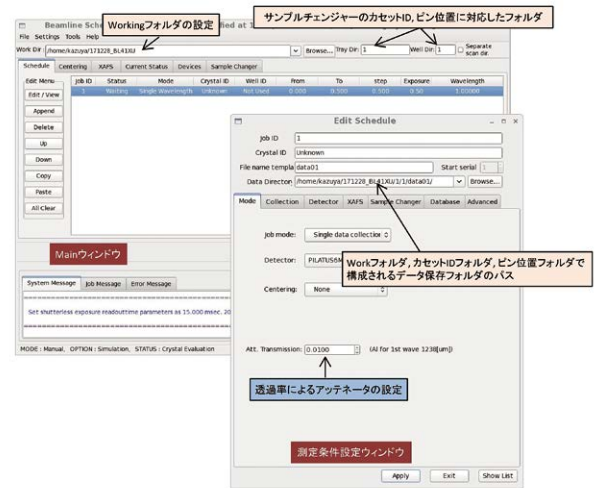


図5 BSSのメインウィンドウおよび測定条件設定ウィンドウ

ム位置の調整などの作業をスケジューリングし、自動で実行することが可能なソフトウェアである。BOSSの導入により通常のビームライン調整作業の時間および作業量を大幅に短縮することや人為的なミスが減少することが期待できる。これまでにBL38B1において実用化されていたが、BL38B1に比べて複雑な集光光学系をもつBL41XUにおいてもアライメントの自動化を図るためにBOSSの高性能化を進めた(図4)。これにより各期のビームライン立ち上げ作業におけるスリット、ミラーの位置調整やビームサイズ測定などの作業が自動化された。また、ユーザー運転期間中に2週間に1回行っている波長ごとの回折計位置の微調整は、手作業で2時間以上かかっていたものが1時間に短縮された。今後は、ユーザービームタイム中に毎朝手作業で行っているビーム位置の確認等の作業の自動化も行う予定である。

この他SPring-8タンパク結晶解析ビームライン標準のソフトウェアBSSの高性能化を行い、フォルダ名・ファイル名を自動設定する機能や、透過率によるアッテネータの設定する機能を実装した(図5)。

4. 高エネルギーモード高性能化

BL41XUでは20 keV以上のX線を利用した回折データ測定を行うために、実験ハッチ1内に専用の回折計を

設置している。2015年度よりユーザー利用に提供しているが、メカベアリングを用いた旧式のゴニオメーターを使用していたことから、回転スピードはせいぜい25°/s程度であり偏芯精度も数ミクロンであった。2016年度は直動型モータを利用した低偏芯ゴニオメーターを導入し、これまでの10倍以上の360°/sで試料を回転することが可能になり、偏芯精度も1 μm未満にまでに減少した。これにより、結晶の位置合わせが迅速化され、また、小さな結晶を用いたデータ測定にも対応できるようになった。

5. 結晶化実験環境の整備

X線結晶構造解析法によるタンパク質の構造決定において、解析のターゲットとなる試料の結晶の品質は構造解析を成功に導くために最も重要なファクタの一つである。そこでSPring-8を用いて結晶の品質の評価を行いつつ結晶化条件の探索を行うために、BL41XUの測定準備室に結晶化セットアップ装置、結晶観察装置、インキュベータなどの整備を2015年度まで進めてきた。2016年度はユーザー利用に向けてこれらの機器の調整、および試薬分注装置などの装置周辺環境の整備をすすめ、試験運用を開始した。

参考文献

- [1] K. Hasegawa, K. Yamashita, T. Murai, N. Nuemket, K. Hirata, G. Ueno, H. Ago, T. Nakatsu, T. Kumasaka, M. Yamamoto : *J. Synchrotron Rad.*, **24**, (2017) 29-41.

JASRI 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

長谷川 和也、水野 伸宏、村上 博則、河村 高志

馬場 清喜、奥村 英夫、仲村 勇樹

Nipawan Nuemket、尾崎 愛美

熊坂 崇、八木 直人

JASRI利用研究促進部門

技術支援グループ

福居 知樹

理化学研究所 放射光科学総合研究センター

生命系放射光利用システム開発ユニット

山下 恵太郎、山本 雅貴