

## 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<sup>[1]</sup>、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<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、遠隔実験システムの共同利用を開始した。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。2015～2016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線トポグラフィー測定システムの構築、解析環境の整備を行った。2017年度も引き続き高性能化と開発を進めている。さらに、試料雰

囲気の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での試料マウント手法(HAG法)は、2011年より開発を開始しておりユーザー利用も開始しているが、測定可能な領域を拡大するために、開発を継続している。

### 1. 高精度/高効率な実験を可能とするための高性能化

BL38B1においては、HAG法を用いた室温でのデータ収集の利用が増加している、そこで2016年度は、放射線損傷の回避を目的とした試料のX線照射位置を精密に移動するための高性能化とCMOS検出器による6 Hzでの高速データ収集システムの構築を行った。2017年度は、P1やC2などの対称性の低い空間群の結晶から効率的に完全なデータを収集するための小型軽量の自動kappa, phi軸ゴニオアタッチメントの開発を行い、プロトタイプを開発した(図1)。今後評価と改良を行い、ユーザー利用に供出予定である。さらに、最小でφ 20 μmサイズのX線を正確に試料に照射するために、自動調整機構で利用する小型ビームモニタの開発を開始した。また、老朽化により動作が不安定であった空調設備を更新した。

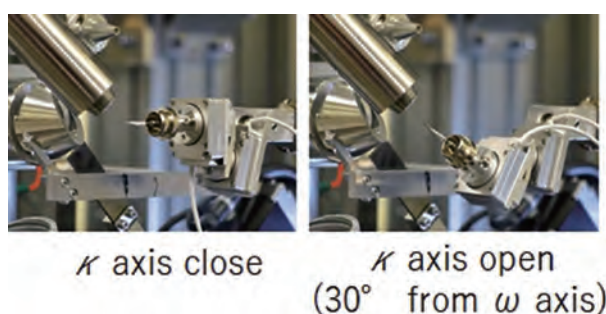


図1 小型軽量の自動kappa, phi軸ゴニオアタッチメント

### 2. 高輝度化のための高性能化

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。結晶サイズのさらなる微小化に対応するため、2015年度より継続して、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)による高輝度化を実施した。縦方向のビーム発散を抑える間接冷却方式の第1、2結晶ホルダーの採用により、波長1 Å

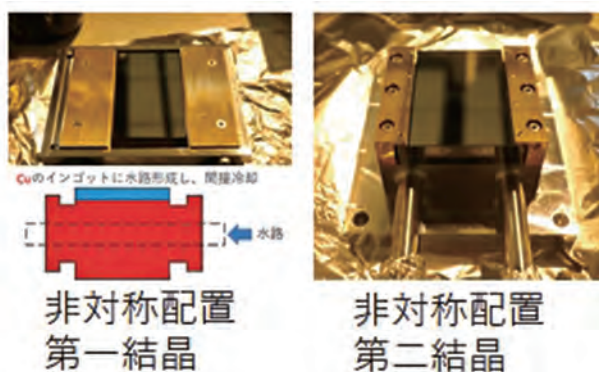
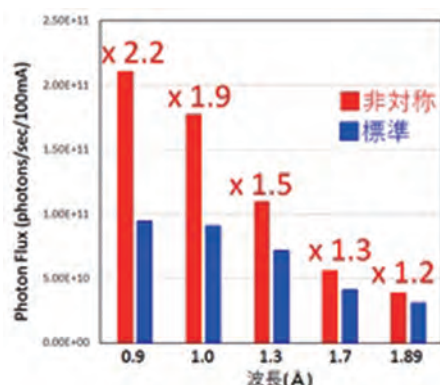


図2 二結晶分光器に設置する非対称配置結晶と高強度化

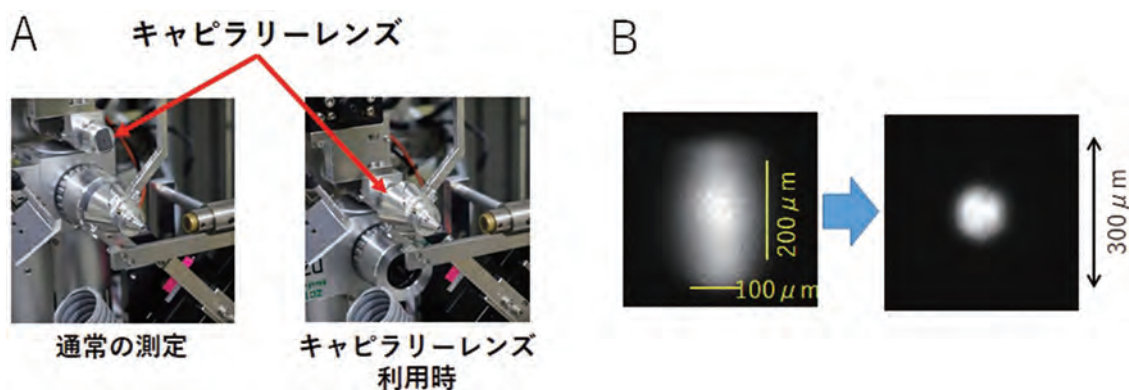


図3 キャピラリー集光によるX線の高集光化

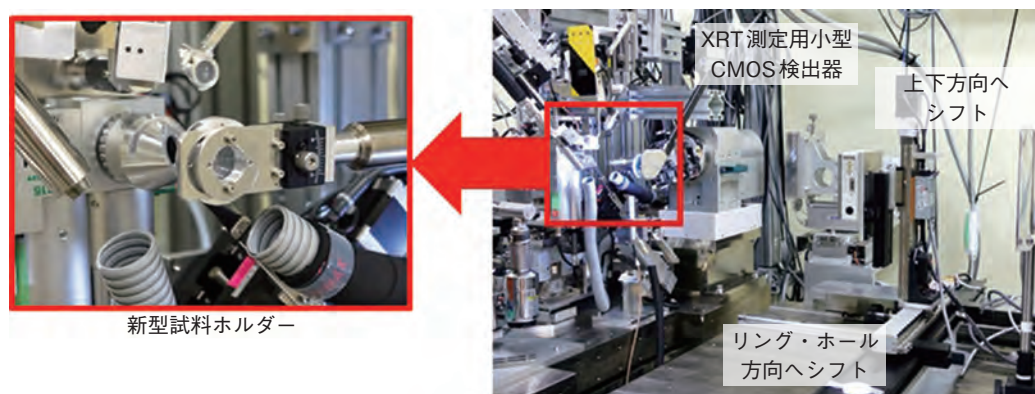


図4 X線トポグラフィー実験系

で2倍程度の高強度化に成功し、2017A期よりユーザー利用を開始した。引き続き、安定な運用に向けた高性能化を進めていく。さらに、試料位置直前にキャピラリーレンズによる集光系を導入した高集光化の評価を行った(図3)。その結果、ビームサイズが $100 \times 200 \mu\text{m}^2$  (横×縦) から $\phi 80 \mu\text{m}$  への高集光化に成功し、3倍のFlux densityを得ることに成功した。今後、ユーザー利用に向けて準備を進めていく。

### 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位、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い、これまでに、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)を導入した自動化システムを構築した。2017年度は、実験ハッチの光軸レイアウトを改良することでビームサイズを $4 \times 4 \text{ mm}^2$ まで利用可能とし、大きなビームサイズのダイレクトビームから低角の回折点をより分離するために、CMOS検出器の位置調整機構を小型化して検出器の距離を400 mm程度から600 mmまで拡張した(図4)。さらに、高精度な試料ホルダー



図5 温度制御ワークベンチ

を開発することで、安定な試料保持を可能とした。

### 4. HAG法の高度化

先述したHAG法<sup>[3]</sup>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。さらに多様な実験を可能とするために、以下の装置の高性能化を進めた。

#### ・温度制御ワークベンチの高性能化

光吸収による結晶中での反応を避けるために、作業中にワークベンチ内を照らす照明を白、緑、赤LEDを選択して利用可能とした。さらに、液体窒素をワークベンチ内に供給するシステムを構築することで内部での結晶

凍結作業と、窒素ガスの補助供給に利用した低酸素環境での作業環境を実現した（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。2016年度に引き続き、20-40℃範囲での湿度制御を目的とした調湿装置の開発を進めた。2018年度以降、この装置を利用したオンラインでの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.

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

馬場 清喜、奥村 英夫、仲村 勇樹

長谷川 和也、水野 伸宏、村上 博則

Nipawan Nuemket、尾崎 愛美

熊坂 崇

利用研究促進部門

技術支援グループ

福居 知樹、入江 崇起