

タンパク質結晶構造解析ビームライン BL-17A の高度化

放射光科学第二研究系 山田悠介, 松岡亜衣, 小山篤, 松垣直宏, 千田俊哉

放射光科学第一研究系 五十嵐教之

機械工学センター 平木雅彦

Abstract

BL-17A は 2005 年に行われた PF リング短直線部増強計画の後、最初に設置された短周期アンジュレータを光源としたビームラインである [1]。その光源性能とそれを生かした光学系設計により、試料位置において 50 μm 径の X 線ビームが利用可能であったビームラインは建設当時は画期的であり、2006 年のユーザー利用開始以降、共同利用、および施設利用で多くの成果を上げてきた。しかしながら構造解析の対象はより複雑で結晶化が困難なものへとシフトしており、より小さな X 線ビームが求められる最近の構造生物学研究においてその競争力の低下は否めず、ユーザーからも更なる高輝度化が求められてきた。2010 年にはより高輝度なタンパク質結晶構造解析用マイクロビームビームライン BL-1A が開発され、PF 全体としては競争力のある程度保つことができたものの、その光源性能から利用可能な波長範囲は 1 \AA および 3 \AA 近傍と限られており、それ以外の波長範囲でのマイクロビームを必要とする声が大きくなってきていた。これらの要望を満たすべく、波長 0.9 ~ 2.1 \AA の範囲でより高輝度なビームを生成可能とするよう BL-17A の高度化を行なった。

高度化は大きく以下の 3 つに分けて行われた。1) 光学系更新による試料位置でのビームのさらなる微小化、2) 大面積ピクセルアレイ型検出器の導入、3) 微小ビームのメリットを最大限に生かす新規回折計の導入。これらについて順に解説したい。

ビームのさらなる微小化

BL-17A の光学系はこれまでは二結晶分光器下流に設置された、2 つの集光ミラーを用いて鉛直方向、および水平方向に集光させることで、試料位置において $250 \times 50 \mu\text{m}^2$ の集光ビームを生成していた。今回の高度化では、二結晶分光器で単色化された X 線ビームを試料位置の 5~6 m 上流で一旦集光させてそこを仮想光源点とし試料直前に追加した集光ミラーによって試料位置に再集光させる二回集光光学系にレイアウト変更することとした(図 1)。このため、既存の 2 つの集光ミラーは 1~2 m 上流に移動させ、ミラーベンダーによって曲率半径も変更して仮想光源を作るよう調整を行った。試料直前には Thales SESO 社製のバイモルフミラー 2 枚を KB 配置で設置した。両ミラーともに 16 個の電極を備え、自由度の高い形状補正で良質な微小集光ビームを生成することが可能である。仮想光源点にはスリットを設置し、このスリット幅を変更することで、試料位置でのビームサイズを可変にしている。2016 年 5 月現在、水平方向は 20~40 μm 、鉛直方向は 20 μm のサイズ

表 1 高度化前後でのビームサイズと強度の比較

		Beam size (μm)	Flux (phs/s)	Flux density (phs/s/ μm^2)
BL-17A	Before upgrade	Φ 50	4.5×10^{10}	2.3×10^7
	After upgrade	40 x 20	3.2×10^{11}	4.0×10^8
BL-1A		13 x 13	4.5×10^{10}	2.6×10^8

のビームを利用することが可能である。表 1 に高度化前後での試料位置でのビームサイズおよび強度の比較を示す。高度化によって、より小さく強いビームが得られるようになったことが分かる。フラックス密度も BL-1A に匹敵するものであり、この強度を波長 0.9~2.1 \AA の領域で得られることから当初の目的は達成することができたと考えられる。なお、今回導入したバイモルフミラーは X 線照射面を Rh または SiO_2 と切り替えることが可能であり、これを利用して高次光をカットすることでより長波長の領域までカバーしていく予定である。

ビームの微小化を行うにあたっては、各光学系の安定性が極めて重要な要素となる。PF 実験ホールの床は通常、網目構造の梁の上に厚さ 200 mm のコンクリートが乗ったような構造をしているが、場所によっては周囲からの振動や荷重の変化の影響を受けやすい。高度化以前の BL-17A でも二結晶分光器や集光ミラー周辺に人間が立ち入ることによってこれらの装置のアライメントに影響を受け、試料部での X 線ビーム位置および強度が変動するということが観測されていた。そこで今回の高度化では光学系のレイアウト変更に合わせて床補強工事を行った(図 1 参照)。床の補強

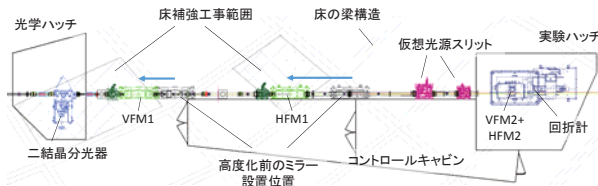


図 1 高度化前後の光学系レイアウト



図2 床補強工事の様子

工事は二結晶分光器および1つ目の水平および垂直集光ミラーを設置する場所について、コンクリートの厚みを500 mmへと変更し、さらにその部分を梁構造に強固に接続すると同時に他の床から切り離す、ということを行った(図2)。この補強工事により、周囲からの振動の伝播が軽減したことや、周辺の荷重変化が光学系に及ぼす影響が抑えられたことを確認している[2]。

大面積ピクセルアレイ型検出器の導入

これまでBL-17Aでは高感度型のCCD検出器であるADSC社のQuantum 270を2次元検出器として利用していた。今回の高度化ではDectris社のピクセルアレイ型検出器Pilatus3 S6Mを導入した。本検出器は検出面積が $423.6 \times 434.6 \text{ mm}^2$ と大きく、かつ読み出し速度が2.03 msと高速で最大25 Hzでのシャッターレス測定が可能である。これは回折データ収集中の検出器の読み出しによるデッドタイムを排除し測定のスループットを向上させるのみならず、高精度なデータ収集法として知られるファインφスライス測定や、後述するin-situ測定などで必要となる常温測定を行う際にも極めて有効である。検出器前面には回折X線の減衰を最小限に留めるためのヘリウムパスを装着するため鋭意開発を行っている。このヘリウムパスは長さ方向に自在に伸縮可能であり、試料-検出器間距離は185~600 mmの間で任意に変更が可能である。最小検出器距離185 mmは、波長 0.98 \AA のX線を用いた場合には最大分解能 1.18 \AA に相当し、大半のタンパク質結晶構造解析実験の要求をカバーすることが出来る。

新規回折計の導入

微小となったX線ビームをより有効に活用して実験を行う為に回折計を新規に設計し導入した(図3a)。微小ビームを適切に取り扱うため、設計には細心の注意が払われた。周辺の振動が試料位置のビームに影響を及ぼすことを最小限とするために、第二集光光学系と回折計とが共通のグラナイト製架台上に設置されている。第二集光光学系にはCINEL社製のミラー調整機構が用いられ、巨大で重量もあり振動によるビーム不安定性の原因になりやすい真空チャンバーとその内部のミラー調整ステージとの間は物理的に切り離されている。回折計はX線位置モニターやシャッター、アッテネータなどを備えたX線ビームコンディショニング部と、試料をX線と同方向から観察することが出来る試料観察部、試料をマウントするゴニオメータ他、散乱ガードやダイレクトビームストップなどを備えた試料部からなる。新規回折計の最大の特徴は試料部に水平方向お

よび垂直方向の2つのゴニオメータが備わっていることである(図3b, c)。前者はクライオピンを用いた典型的なタンパク質結晶構造解析実験を行うためのものであり、後者は後述するin-situ測定のためのものである。回折計上の限られた空間にこれらの機器を収納するため、試料部付近は精密なアライメントが必要な機器が密集し、かつむき出しの状態となっている。実験中ユーザーが手動で試料交換を行った場合、これらの機器に不用意に接触する恐れがあり、ユーザーが実験を継続することが困難になる可能性がある。このためユーザーには結晶交換ロボットPAM[3]を利用することを積極的に勧めている。PAMは高度化以前からBL-17Aで使用され、BL-1Aを除く他の3本のタンパク質結晶構造解析ビームラインでも使用されているものであり、特にビームラインの違いを意識することなく実験を行うことが可能である。

回折計は恒温ブースで覆い、精密に温度調節された空気を送風することで回折計周辺の温度変化を ± 0.1 度程度と最小限に抑えている。これによって回折計の各コンポーネントの温度変化に伴う変形を防ぎ、結果試料に安定した強度のX線ビームを照射することが可能となっている。

in-situ 測定

タンパク質結晶構造解析ビームラインにおけるin-situ測定とは結晶化プレート上の結晶化ドロップに直接X線を照射し、その中にある結晶からの回折データを収集することである。BL-17Aの新規回折計には専用ゴニオメータが備えられ、in-situ測定を行うことが可能である。これまで我々のグループで既存の回折計上に載せて使用する小型のin-situ測定用回折計PLEX[4]を開発してきていたが、セットアップに約1時間を要することから、ユーザーが自身の限られたビームタイム(タンパク質結晶構造解析ビームラインでは連続して配分されるビームタイムは8~16時間が一般的である)中に通常のクライオピンによる測定(クライオピンモード)と結晶化プレートによるin-situ測定(プレートモード)を切り替えて行うことは現実的でなく、PLEXの利用は非常に限定的であった。BL-17Aの新規回折計では、上述の通り2つのゴニオメータが備わっており、それぞれのゴニオメータや、低温吹き付けガスのノ

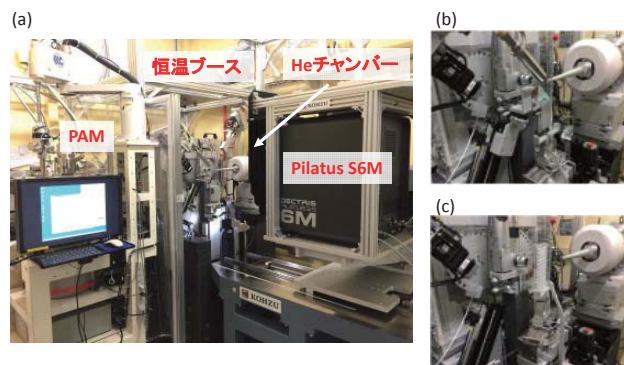





図3 新規回折計。(a) 全体写真、(b) クライオピンモード、(c) プレートモード。

表2 in-situ 測定によって得られた回折データセットの統計値。

	HEW Lysozyme	Glucose Isomerase	Thaumatococcus
Picture of crystals			
Crystallization plate	In Situ-1	KEK	KEK
Wavelength (Å)	0.9800	0.9800	0.9800
Flux (ph/s.)	3.2×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9
Osc. width (deg./frame)	1.0	0.2	0.2
Exp. time (sec./frame)	1.0	0.2	0.2
Osc. range (deg.)	-15 to +15	-10 to +10	-3 to +3 (approx.)
Number of crystals	10	10	15
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	I222	P4 ₃ 2 ₁ 2
Resolution (Å)	39.6 – 1.66 (1.69 – 1.66)	41.1 – 1.42 (1.44 – 1.42)	41.4 – 1.90 (1.99 – 1.90)
R _{merge}	0.063 (2.11)	0.053 (0.496)	0.144 (0.841)
I/sigma(I)	37.1 (2.4)	16.2 (3.0)	8.8 (2.4)
Completeness (%)	100 (100)	99.4 (99.3)	99.6 (99.8)
Multiplicity	20.8 (21.3)	3.7 (3.7)	5.9 (6.0)

ズル等は電動ステージによって試料位置から退避させることが可能である。ユーザーはソフトウェアよりこの退避状態を制御することで、自在にクライオピンモードとプレートモードとを切り替えることが可能である (図 3b, c)。なお、この切り替えに要する時間は約 5 分と十分に現実的である。in-situ 測定用ゴニオメータヘッドには結晶化プレートを保持するためのプレートハンドが備わっており、SBS 規格の結晶化プレートを保持することが可能である。現状取り扱い可能な結晶化プレートの種類は、KEK 構造生物学研究センターが開発した大規模自動結晶化システム (PXS) で使用しているオリジナルの KEK プレートの他、市販の MRC-2(Swissci), Intelli plate(ARI), Crystal Quick X(Greiner), In Situ-1(Mitegen) などがあるが、ソフトウェアにプレート上のウェル配置を定義することで SBS 規格に則ったプレートであれば任意のものに対応することが出来る。なお、ゴニオメータにマウントする際には結晶化プレートは 90 度傾けるため、リザーバー溶液が結晶化ドロップにコンタミする恐れのないシッティングドロップ蒸気拡散法、もしくはバッチ法が本回折計には適している。また、この in-situ 測定用ゴニオメータは回転ステージ上に長作動の XY 並進ステージが搭載されており、結晶化プレートの任意の位置を回転中心にセンタリングすることが出来る。回転ステージは ± 15 度の範囲で回転することから、この範囲で連続回折データセットを収集することも可能である。常温測定であるため放射線損傷の影響は大きいですが、複数の結晶からのデータセットを足し合わせることで完全な回折データセットを取得することが可能である (表 2)。

まとめ

2006 年に利用が開始されたタンパク質結晶構造解析用ビームライン BL-17A は、より微小なビームへの要望が強くなったことを受けて、大規模な高度化を実施した。その結果、波長 0.9 ~ 2.2 Å の範囲で BL-1A に匹敵する微小ビームを利用することが可能となった。また、新規回折計や

検出器を導入することでより精密な回折データ測定が可能となったほか、in-situ 測定という新しい測定方法が利用可能となった。in-situ 測定は回折データ測定における結晶のハーベスティングを必要としないことから、効率的であることや析出した結晶の素の状態を評価できることなど多くのメリットを有する。PXS と組み合わせて結晶化から回折データ収集までを施設内で一貫して行うシステム作りが進めば、タンパク質結晶構造解析における放射光施設の在り方を変える可能性をも秘めていると考えている。

謝辞

本高度化は 2013 年度補正予算および文部科学省及び国立研究開発法人医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業) によって実施されました。厳しい財政状況の中予算獲得にご努力いただき高度化の機会を作っていただいた PF 執行部および KEK 関係者の皆様に大変感謝いたします。ビームラインの高度化に際し、多岐に渡り多大なるご支援をいただいた PF 関係者の皆様、構造生物学研究センターの皆様にも大変感謝申し上げます。

参考資料

- [1] N. Igarashi, N. Matsugaki, Y. Yamada, M. Hiraki, A. Koyama, K. Hirano, T. Miyoshi and S. Wakatsuki, BL-17A, A New Protein Micro-Crystallography Beam Line of the Photon Factory, AIP Conf. Proc. **879**, 812 (2007).
- [2] 松岡垂衣, 山田悠介, 小山篤, 大田浩正, 五十嵐教之, BL-17A における床補強工事によるビーム変動の改善, 放射光学会年会 (2016).
- [3] M. Hiraki, S. Watanabe, N. Honda, Y. Yamada, N. Matsugaki, N. Igarashi, Y. Gaponov and S. Wakatsuki, High-throughput operation of sample-exchange robots with double tongs at the Photon Factory beamlines, J. Synchrotron Radiat. **15**, 300 (2008).
- [4] Y. Yamada, M. Hiraki, N. Matsugaki, R. Kato and T. Senda, In-situ data collection at the Photon Factory macromolecular crystallography beamlines, AIP Conf. Proc. (2016), in press.