

## BL41XU 構造生物学 I

BL41XUはアンジュレータを光源とする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た回折データ測定を行うことができ、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。2017年度は、回折実験やビームライン調整の迅速化・効率化、微小試料からの室温データ測定方法の開発等を目的として下記項目の高性能化に取り組んだ。

### 1. 高エネルギーモード回折計の高性能化

BL41XUでは通常モード（6.5~17.7 keV）に加え、20~35 keVのX線を利用する高エネルギーモードも運用し、0.8 Åを超える超高分解能データ測定や、この領域に吸収端をもつ核種の位置の同定および構造決定への利用などに用いられている。このようなX線が利用できるタンパク質結晶構造解析ビームラインは世界的にも希有かつ国内唯一である。

2013年度から2014年度に掛けて高性能化した集光光学系・回折計は6.5~17.5 keVの通常モードに特化したものであった。そのため、高エネルギーモードは、2013B期まで用いていた回折計を実験ハッチ1に設置して実施していた。通常モードの利用時は光軸から回折計を退避しており、モード切り替えの際にビームパイプとその支柱をハッチ外に出し、空いたスペースに回折計を移動していた。このため、切り替えには労力と時間がかかり必ずしも利用しやすいものではなかった。また、ビーム調整の際にビーム位置や強度を確認するための位置モニタ・強度モニタを必要に応じて設置する必要がある、効率的なビーム調整ができなかった。

そこで2017年度は高エネルギーモードでの測定精度の向上と実験の効率化を目指し、高エネルギーモードに特化した回折計定盤の導入と試料周辺装置の一新を実施した（図1）。新しい回折計定盤・検出器架台は自動軸を用いて光軸上に出し入れを行う。このためマイクロメータオーダでの位置再現性が担保され、切り替え後の調整時間が短縮できると期待される。また、ビームパイ

プの支柱はリニアガイド上に設置するようにしたため、上下流のフランジの連結を取り外した後はスライドするだけで光軸から退避可能である。回折計定盤には新たに設計した試料周辺装置を設置している。この試料周辺装置では、通常モードとの互換性を極力担保しつつ、顕微分光装置の設置など特殊な実験に対応できるように試料の周辺に広いスペースを確保している。回折計のアライメントの迅速化のために、強度モニタ・蛍光体を常設し自動軸により出し入れを行えるようになっている。また、試料交換の迅速化・省力化を目的として、2015年度まで通常モードで使用していたサンプルチェンジャーSPACEを設置した。

新しい回折計は2018年の2月末にハッチ内に設置され、3月末までにオフライン調整を完了した。2018A期にX線を用いた調整を行いユーザー利用を開始する予定である。サンプルチェンジャーSPACEは、2018B期よりユーザー利用ができるように調整を進めている。

### 2. 微小結晶を用いた室温測定方法の開発

近年、室温でのタンパク質の構造解析が注目されているが、非凍結状態ではX線照射損傷が70倍以上速く進行するとされ<sup>[1]</sup>、従来の測定方法では数十μm以下の微小結晶の室温データ測定は困難であった。そこで、SS-ROX法<sup>[2]</sup>とHAG法<sup>[3]</sup>を組み合わせた微小結晶からの室温データ測定方法の開発を進めた。

SS-ROX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ですくい上げて回折計に載せ、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。これまでは凍結した微小結晶を極低温気流下で測定していたが、HAG法を用いて室温で測定

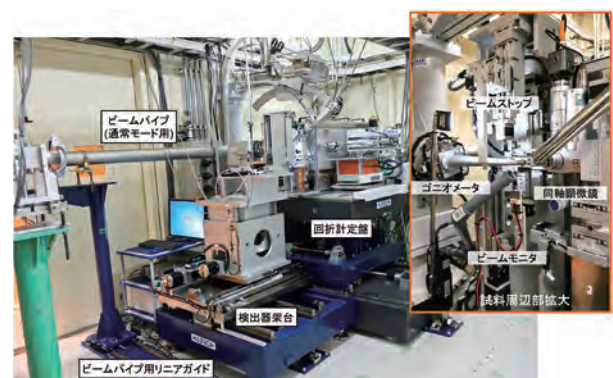


図1 実験ハッチ1に導入した回折計

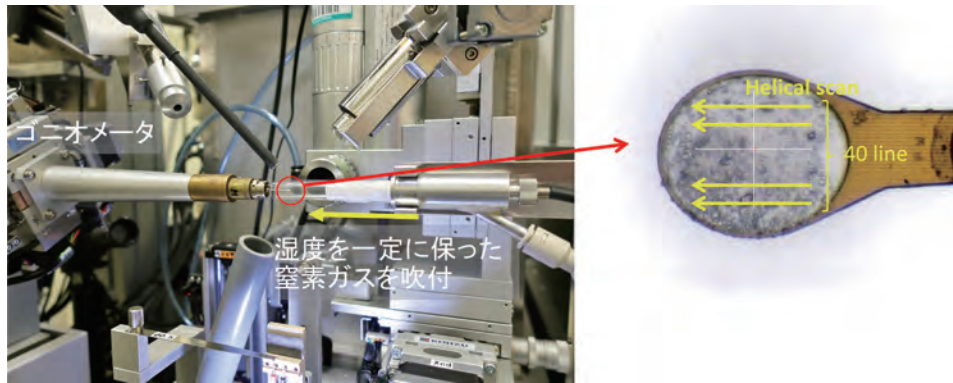


図2 SS-ROX法による室温回折データ測定

するために、ポリビニルアルコール (PVA) 水溶液を張ったループで多数の微小結晶をすくいあげ調湿気流下で測定を実施した (図2)。標準試料であるリゾチームの微小結晶を用いて測定したところ、1個のループから2 Å分解能を超えるデータを得ることができ構造解析にも成功した。

### 3. SPACEの高速化

2014年度にPILATUS3 6Mを導入した後、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37秒かかっており、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2016年度にSPACEに(1)マウントアームの2重化、(2)サーボモータの利用、(3)マウントアームの長ストローク化の3点の改良を行い、試料交換の時間を13秒にまで短縮した。

2017A期より運用を開始し、2017A期と2017B期合わせて22,279個のサンプルの交換がSPACEを用いて行われた。この内、サンプルピンの不良やサンプルカセットの設置ミスを除いた失敗の割合はわずか14回 (0.06%) であり、スピードだけではなく信頼性も極めて高いといえる。交換に失敗した事例の中にはサンプルピンがアームから離れない事例が見られた。その原因として、1時間以上の長時間にわたりアームを液体窒素中に浸していたために1度の乾燥で付着した水を完全に除去することができなかったことが考えられた。現在では50分以上液体窒素につけばなしにした場合は自動で乾燥するように制御プログラムを改良しており、さらなる失敗の軽減が期待される。

また、高速化したSPACEの運用開始にともない、アームの乾燥中であっても試料の位置合わせや測定ができるよう回折データ測定ソフトウェアBSSの改良も行った。これにより、アームの乾燥と乾燥後の予冷に要する時間の約2分のデッドタイムを解消することができた。

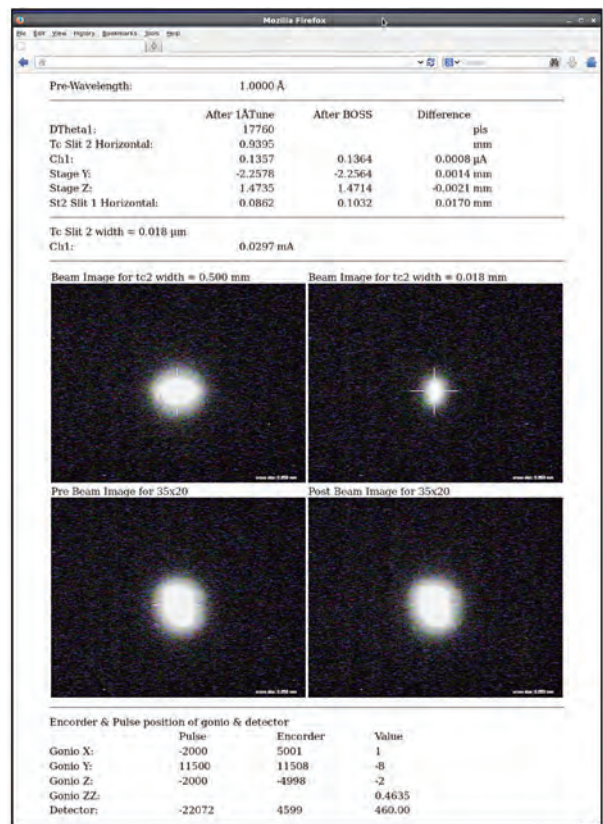


図3 BOSSによる自動アライメント後にブラウザに表示されたレポート

### 4. 自動ビームアライメント技術の確立

BL41XUにおけるマイクロビームの位置精度を保持するために毎朝行う調整は、これまで担当者が一つずつ調整軸の制御や記録作業を行っていたため非効率な部分があった。そこでビームライン調整の省力化と調整時間の短縮を目的として、Beamline Operation Scheduling Software (BOSS) を利用したビーム調整の自動化を行った。BOSSは各種調整作業をスケジューリングし実行可能なソフトウェアとして開発を進めてきた。また事前に入力したスケジュールを簡易に読み込むことが可能であり、毎朝行う調整作業を設定することで自動調整を実現した。これにより、20分以上必要だった毎朝の調整



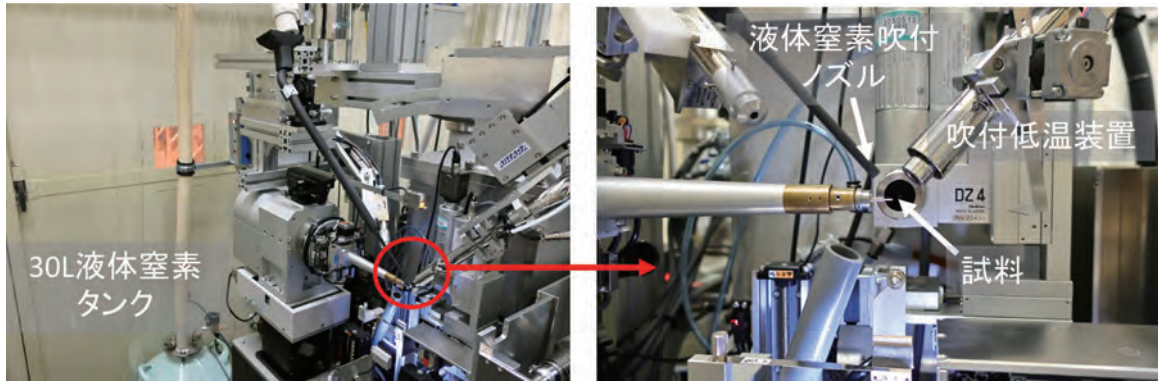


図4 実験ハッチ2に導入した凍結結晶の霜除去装置

時間が10分程度にまで短縮された。また、記録結果表示用のスクリプトも実装し、自動調整終了後に結果をWebブラウザで表示できるようになっている(図3)。

#### 5. 凍結結晶の霜除去装置の導入

回折計に載せた凍結試料には霜が付着していることがある。このような霜は試料の位置合わせを妨げるだけでなく、アイスリングとよばれる粉末回折パターンを生じるため回折データの精度にも影響を及ぼす。液体窒素を振りかけることで霜を除去することができることが多いが、液体窒素を汲み実験ハッチ内に入る必要があることから実験の効率化の点から改善が望まれていた。そこで、遠隔操作で結晶に液体窒素をかけて付着した霜を除去する装置を導入した。この装置は、30 Lの液体窒素容器に入れた液体窒素を、試料の方向を向いたガイドパイプを通して流すことで結晶に液体窒素を振りかける(図4)。本装置の導入により、回折データ測定を行うPCの近辺に設置したコントローラのボタンを押すだけで、結晶に付着した霜を除去することが可能になった。

#### References:

- [1] Nave and Garman, *J. Synchrotron Rad.* (2005). 12, 257-260
- [2] Hasegawa *et al.*, *J. Synchrotron Rad.* (2017). 24, 29-41
- [3] Baba *et al.*, *Acta Cryst.* (2013). D69, 1839-1849

JASRI タンパク質結晶解析推進室

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  
八木 直人、熊坂 崇

利用研究促進部門  
技術支援グループ

福居 知樹