

SPring-8 構造生物ビームライン

熊坂 崇,^{*,a} 清水伸隆,^a 馬場清喜,^a 長谷川和也,^a 上野 剛,^b 山本雅貴^b

SPring-8 Structural Biology Beamline

Takashi KUMASAKA,^{*,a} Nobutaka SHIMIZU,^a Seiki BABA,^a Kazuya HASEGAWA,^a
Go UENO,^b and Masaki YAMAMOTO^b

^aJapan Synchrotron Radiation Research Institute, 1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 679-5198, Japan,
and ^bRIKEN SPring-8 Center, 1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 678-5148, Japan

(Received October 16, 2009)

Nowadays, three-dimensional structure of protein becomes important to understanding and application of molecular mechanisms in enzyme reaction, signal transduction and other various biochemical processes. The amount of the information is now growing quantitatively and qualitatively, supported in part by the technical development of macromolecular crystallography. In the development, brilliant synchrotron radiation greatly contributes to enhance the accuracy and precision of diffraction data and the throughput of data collection. At SPring-8, JASRI and RIKEN collaborate to utilize the macromolecular crystallography beamlines and actualize these improvements. High throughput and routine analysis of protein structures is achieved by the development of automation system composed of sample exchange robotics and control software. The remote data collection system using the automation system and internet technology enhances efficiency and convenience of the beamlines. Moreover, the development of a rapid-readout complementary metal oxide semiconductor (CMOS) detector will improve throughput in data collection. On the other hand, data collection with high accuracy and precision is achieved by the utilization of brilliant X-ray produced from the in-vacuum undulator. Its brightest and stable beam enables high resolution data collection and 10 μm microbeam for microcrystals. Although the high brilliance severely damages protein samples, the users can estimate the degree of the damage and plan best data collection strategy.

Key words—macromolecular crystallography; synchrotron radiation; microbeam; laboratory automation; complementary metal oxide semiconductor detector; radiation damage

1. はじめに

タンパク質の立体構造は、今や生命現象の理解や応用において一般的に参照される基盤情報となっている。近年ではそのニーズの高まりに応じて解析が盛んに行われており、明らかとなる構造は毎年6千件を超えているが、その解析の大半はX線結晶解析によって行われたものである。この数の増加は関係する様々なキーテクノロジーの開発が支えているが、中でも放射光の強力なX線は、試料のX線回折像に十分な統計精度を与え、高精度の結晶回折データを収集する上で最も重要な要素の一つである

と言える。現実には、X線解析による構造決定の大半は放射光利用による結果となっている。

このような解析対象の量的かつ質的拡大に、限られた放射光施設のリソースで対応するために、スループットを高めるための高速化・自動化の取り組みが進んでいる。このように今や望む分子の解析はほとんど障害なく行える感さえあるが、現実には結晶化の難易度が高い試料が多く存在している。このため、結晶が全く得られないものはともかく、微小結晶しか得られないために回折データの精度不足で解析が不可能なものにも対応する必要に迫られている。

本稿では、最近のSPring-8におけるタンパク質結晶解析への取り組みについて紹介する。

2. SPring-8とタンパク質結晶解析

放射光は高速度に加速された荷電粒子（電子ない

^a高輝度光科学研究センター（〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1-1-1）、^b理化学研究所SPring-8センター（〒678-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都1-1-1）

*e-mail: kumasaka@spring8.or.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムS30で発表したものを中心に記述したものである。

し陽電子) の制動放射によって失われるエネルギーが光子に変換されたものである。¹⁾ この光は、指向性が高く明るいため、微小な試料を用いた実験に適している。この放射光の優れた特性をより適切にタンパク質結晶解析に利用することによって、解析手法の拡充と解析対象の拡大を進めることができる。その観点から求められる利用技術の方向性がいくつか考えられるが、主に二つの方向性で開発を進めてきた。一つはタンパク質構造の網羅的研究—構造ゲノム研究に対応した迅速なルーチン測定法の開発であり、もう一つは解析が難しいタンパク質試料に対応した微小結晶・巨大格子結晶のための高精度データ測定システムの構築である。

この方向性を一つの光源若しくはビームラインで両立させることは効率的であるが、一方で限られたリソースであらゆる方向を追求することは最適化を難しくする。そこで、SPring-8 に設置されている種々の光源と光の性質に応じ、それぞれに適した目的に集中して開発を進めてきている。

3. ルーチン測定と偏向電磁石ビームライン

偏向電磁石は一様磁場によって電子を円弧状に運動させる装置である。この電子運動の結果、水平面内に等方的な光を放出するため、後述する他の光源と比べ指向性が低いが、準白色光が得られる特徴を持った光源である。明るさが相対的に低いため、単色光を小さな結晶に照射する実験では入射強度が低くなる難点があるが、光の取り扱いが容易で、シンプルな光学系装置で安定な光を得ることができる利点がある。このことから装置の自動制御に適しており、理研構造ゲノムビームライン BL26B1/B2 と創薬産業ビームライン BL32B2、さらに共同利用ビー

ムライン BL38B1 では、一般的な結晶試料を中心としたルーチン測定を目指して開発を行ってきた。²⁾

3-1. ロボットによる自動化 回折実験において人手の多くかかる操作は、結晶試料を X 線回折計に脱着する部分である。この操作には、取り付け取り外しだけでなく、放射線の安全管理がなされた実験ハッチに作業者が入退室する動作も含んでおり、大きな時間のロスになっている。

限られた時間で効率的な実験を行うため、この操作の自動化を目指して独自開発した試料マウントロボットが SPACE (SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger) である (Fig. 1).³⁾ この装置は、試料を取り付けたピンを収容するアルミ製のトレイから、コンピュータ制御でピンを自動で回折計にセットする機構を持つ。

この機構は試料ピンによって特徴付けられる (Fig. 2)。ピンの両側にはそれぞれ右ねじと左ねじが切られたターンバックル構造を持っており、一方向の回転でピンの取り付けと取り外しが同時に行える独自のものである。また、ねじ式固定のために、マグネットで取り付ける従来のものと比べて試料の取り付け精度や再現性が高く、自動制御に適しているほか、小型のピン形状のために高密度に試料を保持できる利点がある。

ピンには結晶をすくい取るためのナイロンループなどを接着するが、ピンが樹脂性であることもあって、自身の熱膨張のために液体窒素中から取り出した際に結晶位置が静止するまでに若干の時間を要し、すぐに実験が開始できなかった。しかし、Fig. 2 に示した新型ピンではループの取り付け方法を改

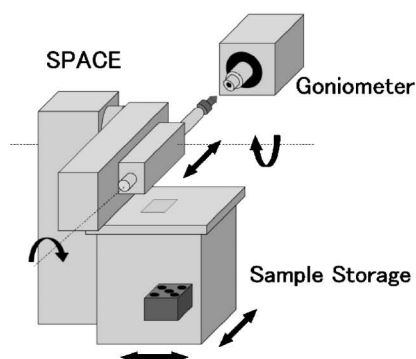


Fig. 1. Sample Mount Robot, SPACE

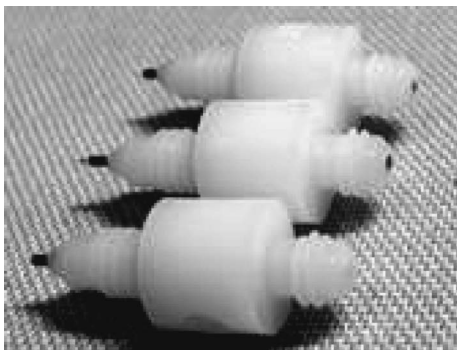


Fig. 2. Sample Pins of SPACE

The pin size is 17 mm and 7 mm in length and diameter, respectively. Sample loop to mount crystals is attached at left side of the pin.

良して問題を解決し、1つの試料の回折を確認するのに要する時間を2分短縮して、5.5分で完了するようにした。

併せて開発したソフトウェア⁴⁾により、無人での連続自動測定が可能になり、深夜のビームタイムも有効活用できるようになったほか、良質な結晶を多数の結晶の中から探索するスクリーニング実験でも威力を発揮している。また、独自のピンだけでなく、汎用性の高い市販のマグネット式ピンを着脱できるアタッチメントの開発も行い、利用が可能となっている。

3-2. 遠隔データ収集 ロボットを利用した自動運転が実験者の思い通りに行えれば、あえて放射光施設に出向かなくても、試料をビームラインに送付して遠隔でデータ収集をすることも可能になってくる。

SPring-8 では当初、放射線安全を担保するために、ビームシャッター操作を遠隔で行うことを禁止していたこともあり、オペレータを介した遠隔実験システムを構築した。⁵⁾ この中枢を担う D-Cha (Database for crystallography with home-lab arrangement) システムは、データベースや Web を用いて、実験者にビームラインで行われている実験の状況や結果を報告しつつ、実験者の実験計画をオペレータに伝えるソフトウェアである (Fig. 3)。実験者は試料の回折像や蛍光スペクトルを画面上で確認することができ、それに基づいてデータの測定条件を入力し、これに基づいてオペレータが実験を行う。

この結果、利用者は SPring-8 キャンパスへ出かける必要なく実験可能なばかりか、放射光実験に習熟していない利用者にとっては簡便に実験が行える

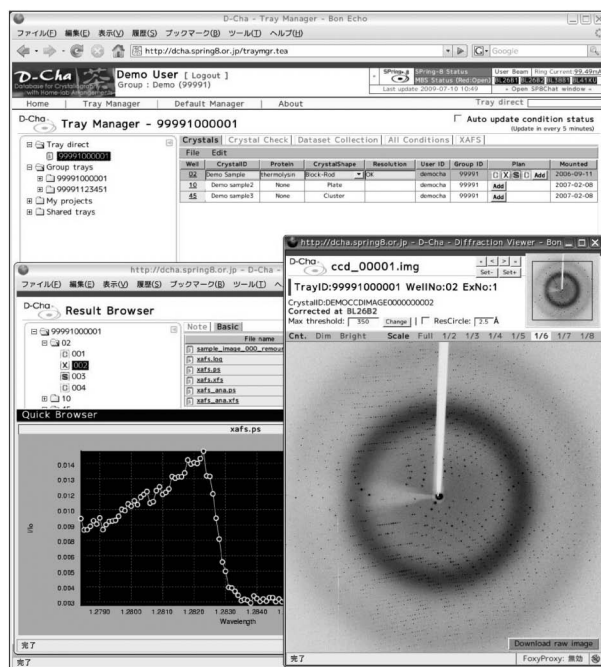


Fig. 3. Snapshot of D-Cha

Main window, diffraction viewer and result browser with XAFS spectrum are shown.

メリットがある。利用者はあらかじめ試料をロボット用トレイに詰める必要があるが、その操作を簡便に行うためのキットも併せて開発し、利便性に配慮した。

しかし、このメールインシステムは実験者が自ら機器操作することはできないため、エキスパートには物足りない仕様となっている。このため、現在、ビームラインを遠隔操作するシステムの開発も行っており、近い将来にはどこからでも (原理的には海外や新幹線車内からでも) 実験が行えることになる。

3-3. 高速検出器 データ測定の自動化・迅速化や後述する高精度化の中で、重要な位置を占める機器に X 線検出器がある。これまでにも、シンチレーションカウンターを用いた 4 軸回折計からイメージングプレート、そして現代の CCD 検出器に至るまで、新しい検出器の登場は飛躍的にデータの質的かつ量的な向上をもたらした。高輝度放射光は、回折像を収集するための正味の露光時間の短縮にもつながるものの、X 線検出器の感度や読み取り速度のために、その威力を十分に生かしきれていない側面がある。この対策として、浜松ホトニクス社製 CMOS 検出器 (Fig. 4) を活用した短時間で高精度のデータ収集が可能な測定系の開発を行って

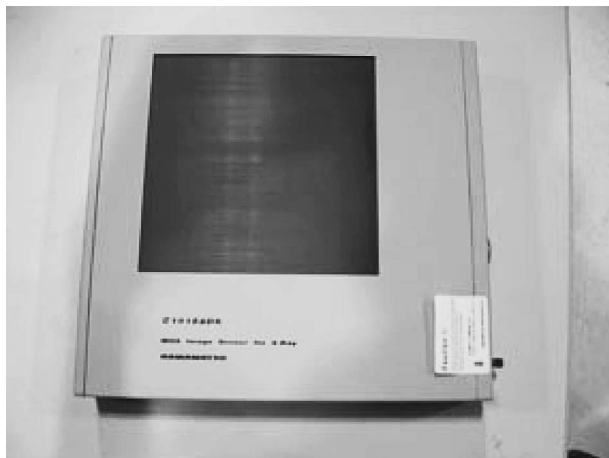


Fig. 4. X-ray CMOS Detector, Hamamatsu Photonics C10158DK

Its active area of 117.6 mm×117.6 mm is covered with single CMOS image sensor chip. The maximum frame rate of 3 frames/s is available.

いる。⁶⁾

CMOS イメージセンサーは、現在 X 線検出器に頻用されている CCD イメージセンサーに比べ、原理的に画質などで性能が劣るとされてきた。しかし、製造プロセスのシンプルさから安価な上、開発がしやすいため、民生用デジタルカメラでも明らかのように CCD に比肩し得る性能を獲得するようになってきた。さらに読み出し方法の多様さなど、機能の豊富さも魅力である。また、このセンサーはチップの大型化も比較的容易なため、高分解能測定に必要な大面積の受光面を実現し易く、画像歪みなどの原因となるレンズや光ファイバーの集光素子などが不要となり、回折実験に適した装置開発が可能となってきた。

ところで、データ収集を高精度に行うためには、雑音に対する信号の割合 (SN 比) を大きくする必要がある。検出器に由来する雑音として、X 線が可視光を経て電気信号に変換される際の 1) 感度に依存した統計誤差や、2) 画像の歪みや滲みと感度むらがある。さらに、電気ノイズとしては、3) 信号蓄積中の温度に依存した熱雑音 (暗電流) と、4) 蓄積電子を電気信号に変換する過程で起こる読み出し雑音が主たる原因である。回折計に由来する雑音としては、結晶を回転させる際のむらと、シャッター開閉と回転の同期むらがある。

これらの問題や CMOS の欠点を補う方法として、ビデオカメラのように画素を連続的に読み出す

モードを利用し、シャッターを開放したまま連続的に結晶を回転させてデータ収集する連続回転法に特化してシステムの開発を行っている。この方法はシャッターと回転の同期むらを考慮しなくて済むことに加え、振動角の狭い回折像を測定するファインスライス法と組み合わせることで、一枚の画像あたりの露光時間を短縮して暗電流の低減に成功している。また、連続読み出しのため、検出器の読み出しによるデッドタイムが見かけ上ゼロであり、高速化が可能である。実際に高速回転のゴニオメータと高輝度 X 線を用いた場合、測定が 30 秒少々で完了する結果も得られている。現在、ビームラインでの利用に向けて準備を進めており、近々公開する予定である。

4. 高難度解析とアンジュレータビームライン

アンジュレータは永久磁石列が作る周期磁場によって電子を蛇行させ、各周期から発生する光をコヒーレントに足し合わせることで高輝度の光を作り出す挿入光源である。その輝度は実験室の装置の 10^{10} 倍以上、偏向電磁石と比べても 10^4 倍明るい。この明るさは統計精度が必要な実験において大きな武器となり、微小結晶・巨大格子結晶などの解析が難しいタンパク質試料に対応した高精度データ測定システムの構築に適している。ここでは、その効用と問題について述べたい。

4.1. 微小ビーム 3-3. でも述べたが、データ収集を高精度に行うときには、SN 比を大きくする必要がある。高輝度ビームは信号量の増大に貢献するが、回折に寄与しない雑音となる散乱光も合わせて増大させる。結晶が小さくなるにしたがって照射するビームも小さくしなければ、結晶に当たらない光が雑音を発生させることになる。このため、指向性の高いアンジュレータ光が利用できる共同利用 BL41XU では、その特性を生かして微小ビームを作る取り組みを進めている。

これまでの開発により、高輝度光科学研究センター (JASRI) 光源光学系グループで開発された高精度な分光器に K-B 配置集光ミラー、スリットを組み合わせ、 $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ サイズのビームを安定に供給することができた。⁷⁾ これによりスリットなしの状態でも 2×10^{13} 光子/秒から $30 \mu\text{m}$ サイズで 3×10^{12} 光子/秒の高輝度光を作り出していたが、光の安定性を生かして、さらに直径 $10 \mu\text{m}$ のピン

ホールコリメータを導入し、 2.8×10^{11} 光子/秒の光を安定供給することができるようになった。さらに微小結晶のセンタリングを正しく行うために、結晶の回転ぶれが少ない高精度の回折計として神津精機製のエアベアリングタイプゴニオメータを導入することで、同等サイズの結晶からも雑音源となる散乱の少ない高精度のデータ収集が可能となっている (Fig. 5)。また、微小ビームは微小結晶以外にも恩恵がある。単結晶であっても結晶内の領域によって質が変化する不均一なものも見い出されているが、微小ビームを用いて質のよい領域を探し出すことも可能となり、薄い膜タンパク質の結晶などにおいて高精度データ収集に貢献している。

4.2. 放射線損傷への対処 高輝度ビームは統計精度の向上、ひいては微小結晶への対応やデータの高分解能化という恩恵があるが、一方で放射線損傷の深刻化を招く原因でもある。⁸⁾

この損傷の原因は主として光電効果にあると考えられている。放射線はタンパク質試料や溶媒と相互作用して電子を奪い去り、反応性の高いラジカルを発生させる。さらに、ラジカルがジスルフィド結合の開裂や Asp/Glu の脱炭酸反応などの二次的な反応を起こし、タンパク質分子は形を変えていくことになる。損傷を抑え、構造をできるだけ損なわずに解析するためには、露光時間の上限を考える必要がある。その放射線量の上限として、例えば Garman Limit (= 30 MGy)⁹⁾ が提唱されていたが、光電効果は長波長ほど大きくなる一方で、回折に寄与するトムソン散乱も増加するため、波長依存性については不明であった。われわれのグループで、波長を変化させたデータを収集して損傷の度合いを調べたと

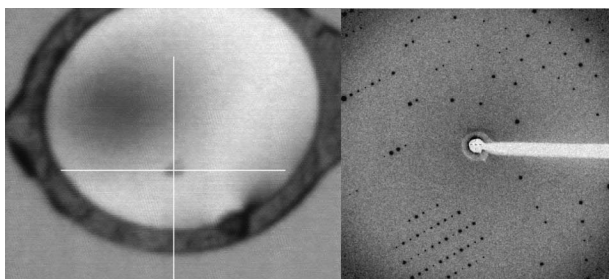


Fig. 5. Effect of a 10 μm Pin Hole and a Guard Collimator (Left) A lysozyme crystal of 10 μm size located at the center of the crosshairs. (Right) A diffraction image taken with 10 μm beam. Installation of the devices effectively reducing the scattering around direct beam position. Diffraction spots were recorded beyond 2.75 \AA resolution.

ころ、ほぼ吸収線量に依存して損傷が増加することが明らかとなった。¹⁰⁾

したがって、損傷への対策は、適切に放射線量を予測かつ制限したデータ測定をすることにある。ビームと結晶の大きさが決まれば、露光時間に対応した線量が確定する。検出器のダイナミックレンジを活用できる範囲で、なるべく線量を高めることが統計精度や分解能の向上につながることは明らかであるが、その分放射線損傷も増大する。その折り合い点は最終的に利用者が判断するが、その目安として上野らが開発した imgview¹¹⁾ や Garman らが開発した RADDOSE¹²⁾ を併用するのがよい。RADDOSE については、簡便に利用できる GUI を河本らが開発し、利用者に提供している (Fig. 6)。

また、結晶の大きさに対してビームサイズを十分に小さくすると、照射位置を変更することで損傷を受けていない新しい部分を利用した測定ができる。棒状の結晶などでは非常に有効で、トータルの分解能が向上した例もある。これらの機能はデータ測定

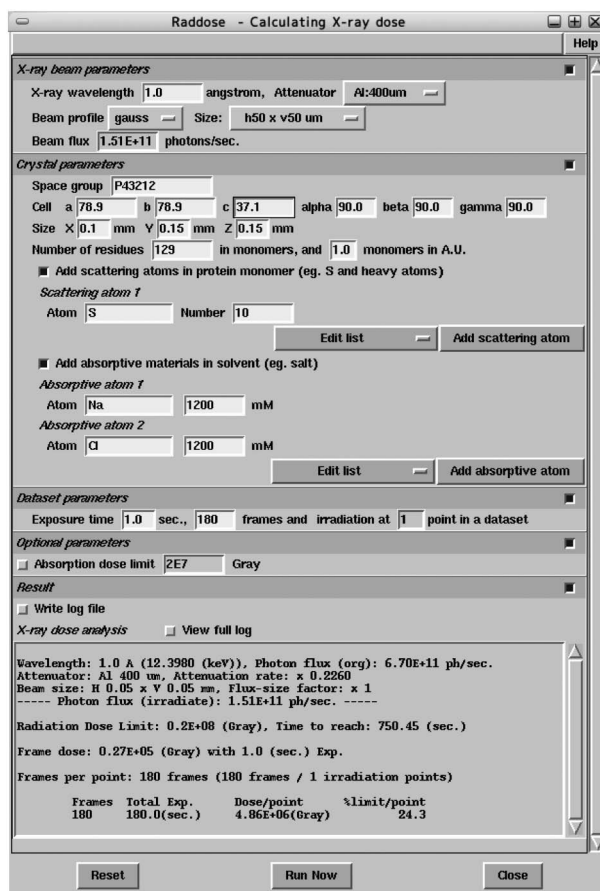


Fig. 6. RadDOSE GUI for CCP4

プログラム BSS⁴⁾に組み込まれており、簡便に利用できるようになってきている。

5. 効率的なビームライン利用のために

このように、SPring-8では各ビームラインを光源の性能に応じた高度化を進めて目的別に使い分けることで、リソースの効率的活用ができ、全体として幅広い試料に対応できるようになっている。また、近年では利用者がビームラインの利用経験が深まり、試料に適したビームラインを選択する傾向が強まってきた。本稿では取り上げなかったが、SPring-8の専用ビームラインである大阪大学蛋白質研究所ビームライン BL44XU や台湾ビームライン BL12B2とも密接な連携を取りながらビームラインの高度化を進めており、利用者の相互乗り入れが一部行われている。現在建設が進められている BL32XU は極微小ビームに特化しており、既存のリソースとの棲み分けが可能であると考えている。

放射光の利用を促進するためには、目的や研究対象に応じた様々な利用の形態の用意も重要である。利用者の過半数は半年単位で行う比較的短周期の審査をパスした者が利用できる一般課題で採択されるが、重要な研究の中には息の長い支援が必要なものもあり、3ヵ年単位で審査を行う長期課題がある。これらの課題は、成果を公開することが条件であり、研究の妥当性などに関するレフェリー評価により選抜される。また、有償ながら無審査で優先的な利用を認める成果公開優先利用制度も用意されており、競争的資金等の獲得を裏付けとして採択され、プロジェクト研究に利用されている。さらに、研究成果の非公開を求められる営利目的の研究でも、有償かつ無審査で利用できる。これらの課題では利用者自らが装置を使って実験を行うため、経験の少ない利用者には敷居が高いが、前述のメールイン測定を利用して測定を代行する制度も JASRI により開始された。いずれについても SPring-8 のホームページ¹³⁾を参照されたい。

6. おわりに

本稿では SPring-8 で進めてきた最近数年間の開発について、測定の自動化・高速化によるルーチン測定と、高輝度微小ビームによる高難度解析の視点からまとめた。得られた成果については触れなかったが、確実に静的な構造情報を量的にも質的にも豊かにしてきている。しかし、タンパク質構造研究の

あらゆる要求を満たすには程遠い。現在、放射光利用研究一般において、ナノビームや放射光以外の計測手法を組み合わせた同時計測の開発への取り組みが進んでおり、フィードバックを進めねばならない。また、新たな放射光光源が加われば、構造生物学もより多面的な研究環境が期待できるだろう。

謝辞 ビームラインにおける開発は、高輝度光科学研究センター利用研究促進部門構造生物グループ並びに理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター基盤研究部のメンバーと河本正秀氏（現所属：九州シンクロトロン光研究センター）並びに岡崎伸生氏（現所属：創晶）によって行われた。また、遠隔操作の開発においては高輝度光科学研究センター制御情報部門の古川行人氏、ビームラインの建設及び運営においては SPring-8 のスタッフに多くを負っており、ここに感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) “Hoshako Beamline Kogaku Gijyutsu Nyumon,” eds. by Ohashi H., Hirano K., The Japanese Society for Synchrotron Radiation Research, 2008.
- 2) Ueno G., Kanda H., Hirose R., Ida K., Kumasaka T., Yamamoto M., *J. Struct. Funct. Genomics*, **7**, 15–22 (2006).
- 3) Ueno G., Hirose R., Ida K., Kumasaka T., Yamamoto M., *J. Appl. Crystallogr.*, **37**, 867–873 (2004).
- 4) Ueno G., Kanda H., Kumasaka T., Yamamoto M., *J. Synchrotron Rad.*, **12**, 380–384 (2005).
- 5) Okazaki N., Hasegawa K., Ueno G., Murakami H., Kumasaka T., Yamamoto M., *J. Synchrotron Rad.*, **15**, 288–291 (2008).
- 6) Hasegawa K., Hirata K., Shimizu T., Shimizu N., Hikima T., Baba S., Kumasaka T., Yamamoto M., *J. Appl. Cryst.*, **42**, 1165–1175 (2009).
- 7) Kawamoto M., Hasegawa K., Shimizu N., Sakai H., Shimizu T., Nisawa A., Yamamoto M., *AIP Conf. Proc.*, **879**, 1920–1923 (2007).
- 8) Kawamoto M., Sakai H., Ida K., Ueno G., Yamamoto M., *J. Jpn. Soc. Synchrotron Rad. Res.*, **17**, 330–337 (2004).
- 9) Owen R. L., Rudino-Pinera E., Garman E. F.,

-
- Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4912–4917 (2006).
- 10) Shimizu N., Hirata K., Hasegawa K., Ueno G., Yamamoto M., *J. Synchrotron Rad.*, **14**, 4–10 (2007).
- 11) ImgView Web: http://bioxtal.harima.riken.go.jp/BL26/BSS_manual/ImageView.htm), cited 28 February, 2010.
- 12) Paithankar K. S., Owen R. L., Garman E. F., *J. Synchrotron Rad.*, **16**, 152–162 (2009).
- 13) SPring-8 Web: <http://www.spring8.or.jp/>); cited 28 February, 2010.