

タンパク質試料ごとに異なり、それぞれに最適な方法を探索する必要がある。

### 4.3. 放射光ビームラインでの MAD データ収集

現在の放射光ビームラインでは、データ収集の高精度化および迅速化に向け様々な工夫が施されている。回折計には大量のタンパク質結晶を自動交換するサンプルチェンジャーを設置している。図 9 に SPring-8 の理研構造ゲノムビームライン I & II (BL26B1 & BL26B2) <sup>13)</sup> の実験ステーションに設置したサンプルチェンジャー SPACE (SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger) <sup>14)</sup> を示す。利用者は専用サンプルトレイ (最大 52 個/トレイ) に凍結結晶をセットして、測定時は SPACE が個々の結晶を回折計に正確にマウント & アンマウントする。これにより、回折強度測定時に実験者は、実験ハッチに立ち入ることなく凍結結晶の交換が可能となった。

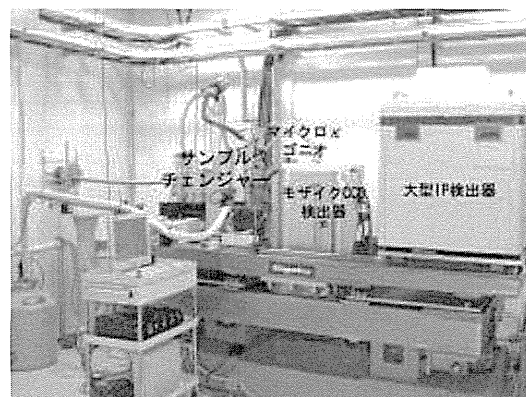


図 9 理研構造ゲノムビームラインの全自動回折計

ゴニオメータに対面して設置したサンプルチェンジャー SPACE により、実験ハッチに立ち入ることなく凍結結晶の交換が可能である。

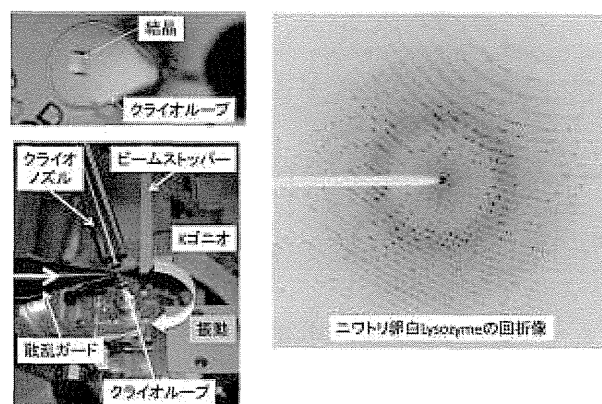


図 10 ニワトリ卵白 Lysozyme を用いた回折実験例

クライオループですくいとった結晶 (図左上) をゴニオメータ上で凍結後 (図左下)、X 線モザイク CCD 検出器により回折像を得た実験例 (X 線は左下図の黄色矢印)

放射光ビームラインの異常分散を利用した測定では、位相決定のために十分な異常分散差のデータ収集が重要であり微小な異常分散効果を精度良く測定するには、波長選択の要であるモノクロメータの波長分解能・波長再現性・安定性に関する十分な注意が必要である。もし、異常分散測定時に放射光ビームに不安定性が見られた場合には、再度モノクロメータの調整を行う必要がある。一般的に MAD 実験では異常散乱原子の吸収端（エッジ）・吸収極大（ピーク）と遠隔点（リモート）の3波長を SAD 実験では吸収極大（ピーク）の波長を選択する。これらの波長決定では、吸収端の化学シフトや放射光ビームラインの装置の設定によって理論値とは若干異なる値をとることがあるため、実験的に決定すべきである。測定波長は、モノクロメータ（X線分光器）の波長スキャンによりサンプル結晶からの蛍光X線スペクトルを測定して、吸収端近傍の異常分散効果

を見積って決定する。図 11 には亜鉛タンパク質結晶から得られた蛍光X線スペクトルと MAD 法での解析に使用した測定波長を例示した。

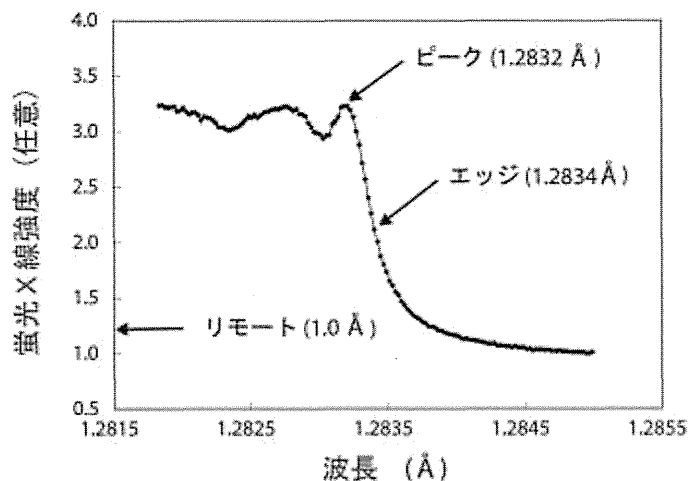


図 11 亜鉛タンパク質結晶からの蛍光 X 線スペクトル

異常散乱原子の蛍光 X 線スペクトルを測定することにより、MAD 解析で使用する測定波長（ピークとエッジ）を正確に決定できる。

微小な回折強度変化を正確に測定するには、S/N 比の高い回折イメージの収集が重要である。そのため、サンプル結晶凍結時には、X 線散乱の原因となるサンプル周りの過剰な結晶化母液や

母液中の重原子等の異常散乱原子の除去が重要である。

MAD 法の実験では、放射光ビームからモノクロメータを使って3波長を1つ1つ切り替えることで、複数の波長での回折強度測定を行っている。この方法では、複数波長（3波長）での回折強度測定中に引き起こされるサンプル結晶の放射線損傷が測定データに大きな系統誤差をもたらす可能性があるため、不必要な長時間のX線露出時間を避けるとともに、同一振動範囲を出るだけ近い条件下で測定する必要がある。また、測定中は回折イメージの状態をチェックして、放射線損傷の影響を最小化した測定条件を心がける。

また、異常分散効果の最適化では、Hendricksonらは吸収の異方性を減らし、 $f''$ を精度よく収集する目的で Inverse Beam Geometry Setting を提案した<sup>15)</sup>。

この方法は、振動写真法によるデータ収集において、Friedel 対が180度異なる角度で収集できることに着目し、 $a$ 度

の回折像と $(180+a)$ 度の回折像を交互に取り進める。これにより、吸収の効果をほぼ等しく、また、関連する Friedel 対を近接した時間内に収集することで、放射線損傷による経時的な系統誤差を減らそうとするものである。

#### 4.4. 回折強度データ処理と位相決定

タンパク質結晶からの得られた回折像を計算機によって処理して、各回折斑点への指数付けと回折強度を積分することにより、回折強度データセットを取得する。回折像から結晶指数付けと回折強度積分を求めるソフトウェアとして、CCP4 パッケージ<sup>16)</sup>と相性の良い Mosflm<sup>17)</sup>や HKL2000<sup>18)</sup>が一般的に利用されている。また、微小回転角振動法の実験では、3次元プロファイル積分に対応した XDS<sup>19)</sup>がその解析に用いられている。

3波長の回折強度データの測定後、異常分散効果から結晶中での異常散乱原子位置を決定して、計算的にサンプル

ルの構造を示す電子密度図を求める。  
MAD 法では完全に同一の結晶から回折強度データが得られるため、いわゆる同型性など複数結晶間の系統誤差がなく、明瞭で高精度の電子密度を与え、自動計算においても扱いやすい。実際、自動化ソフトウェア SOLVE<sup>20</sup> や autoSHARP<sup>21</sup> は異常散乱子の部分構造決定から位相精密化まで自動的に行える。また、部分構造決定ソフト (SHELX<sup>22</sup>) などと位相計算ソフト (SOLVE<sup>20</sup>) などの組み合わせでも高精度の電子密度を得ることができる。

異常散乱原子の位置情報を基にして得られた電子密度図を図 12 に示したが、明瞭にサンプルタンパク質の主鎖や側鎖の立体構造を示している。明瞭な電子密度が実験的に得られれば、後は一般的なタンパク質 X 線結晶構造解析の手順に従い、分子モデルの構築・構造精密化を進めて解析を完了させるだけである。

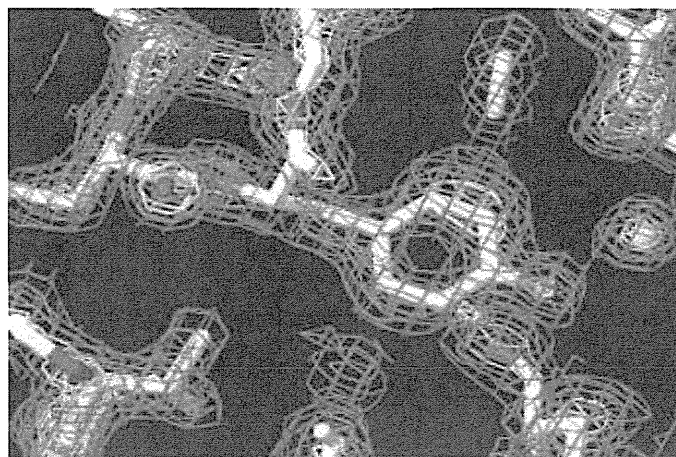


図12 MAD法による初期電子密度図

スティックモデルで示した分子モデルを取り囲むカゴ状の物が MAD 法で実験的に求めた電子密度で、サンプルタンパク質の主鎖や側鎖の立体構造を明瞭に示している。

## 5. モデル構築と構造精密化

明瞭な電子密度が実験的に得られれば、分子モデルはコンピュータグラフィックスを利用したソフトウェアによって手動あるいは半自動的に構築することができる。しかし、タンパク質結晶の解析では高分解能のデータが得られない場合も多く、ぼんやりとした電子密度から、大まかな形をもとに、構造化学的な解釈をしながらまず主鎖を組み立て、側鎖、可能であれば結晶中

にふくまれる溶媒分子を定義して分子モデルを組み立てる。解析の目安として、3 Å 程度の分解能があれば主鎖だけではなく側鎖まで含めた分子モデルが構築可能である。また、2 Å 分解能程度の回折が得られれば、側鎖の枝分かれまではほぼ正確に区別できる。さらに 1 Å 分解能であれば、原子 1 つ 1 つが球状の電子密度として明瞭に識別できる。

この初期的に得られた分子モデルは必ずしも回折データとよく一致しておらず、また必ずしも立体化学的な諸要件を満たしているわけではない。従って、この分子モデルの近似構造をなんらかの方法で修正して、構造因子の測定値と計算値の一致度を高める操作が必要になる。最もよく使われる方法は最小二乗法である。この方法では、次式(8)で表される目的関数  $E_{\text{xray}}$  を最適化パラメーターで偏微分して最小になるような極値を求める。

$$E_{\text{xray}} = \sum_{\mathbf{h}} |F_{\text{O}}(\mathbf{h}) - kF_{\text{C}}(\mathbf{h})|^2 \quad (8)$$

その一致度の指標が、次式で定義される  $R$  因子 (信頼度因子, Reliability factor) である。

$$R = \frac{\sum_{\mathbf{h}} |F_{\text{O}}(\mathbf{h}) - F_{\text{C}}(\mathbf{h})|}{\sum_{\mathbf{h}} F_{\text{O}}(\mathbf{h})}$$

ここで、 $F_{\text{O}}$  は実際に測定によって得られた構造因子振幅であり、 $F_{\text{C}}$  は式(1)に従って分子モデルから計算した値である。この値を最適化するように原子座標および温度因子を最小二乗法により精密化することになる。また、計算後は精密化されたモデルとそれを元に計算した電子密度図を重ねて、モデルの誤りを電子密度に合わせて修正作業を行う。実際の構造精密化では、分子モデルの修正と精密化計算を交互に行いながら、 $R$  因子が十分低い値 ( $R$  因子 < 20% を指標とする場合が多い) となるまで精密化を行うことになる。精密化された構造の正確さは解析の分解能に依存しており、1 Å 程度の高分解能解析では  $R$  因子 < 10%

の解析結果が得られる。

構造精密化には一般的な非線形最小二乗法のアルゴリズムのほかに、Powell 法などの手法、あるいは測定値の誤差に正規分布を仮定しない最尤推定 (Maximum Likelihood; ML) 法も用いられている。これらの計算を行うソフトウェアとしては、REFMAC<sup>23)</sup>や TNT<sup>24)</sup>などが知られている。また、Brünger らが開発した分子動力学シミュレーションを利用した構造精密化ソフトとして CNS パッケージ<sup>25)</sup>も利用されている。モデル修正および電子密度図表示のためのソフトウェアは幾つか存在しているが、CCP4 プログラム Coot が非常に操作性の良いソフトウェアとして、初心者でも利用しやすいインターフェースを提供している。

現在のタンパク質結晶構造解析では、放射光利用の普及により、MAD 法・SAD 法など異常分散を利用した位相決定法が一般化した。これは、新規構造解析における位相問題の障壁をより小

さなものとして、構造解析の迅速化・ルーチン化に大きく寄与してきた。また、構造ゲノム研究の発展に伴うビームラインへのサンプルチェンジャー等の導入によりビームライン実験の自動化が促進されつつある。このようなビームラインの技術開発によってタンパク質結晶構造解析の簡便化と普及が期待される。

一方で、既存技術では簡単に解析できない微小結晶や超巨大タンパク質複合体などへの取組みも進められており、分子量 1000 万を超える細胞内にある最大の超分子であるボルト<sup>26)</sup>の構造解析にも成功している。SPring-8 では第三世代放射光の高輝度放射光を生かした 1 ミクロン集光サイズの微小結晶解析用の理研ターゲットタンパクビームライン (BL32XU)<sup>27)</sup> が建設され、ミクロンオーダーのタンパク質微小結晶からの構造解析技術の開発が進められている。タンパク質結晶構造解析における、これら放射光ビームラインを始めとした

高度化研究は、今まで不可能であった  
難解サンプルの解析可能性の助けとな  
るものであり、タンパク質結晶構造解  
析の一層の拡大と発展が期待される。

#### 参考文献

- 1) Helliwell, J.R.: "Macromolecular  
Crystallography with Synchrotron  
Radiation", Cambridge University Press  
(1992).
- 2) McPherson, A.: "Crystallization of  
Biological Macromolecules", Cold  
Spring Harbor Laboratory Press(1999).
- 3) Rossmann, M.G.: *Acta Cryst.* **A46**,  
73(1990)
- 4) Hendrickson, W.A., Ogata, C.M.:  
"Methods in Enzymology", Academic  
Press Inc., New York (1997), **276**, 494,
- 5) Boles, J.O., Tolleson, W.H., Schmidt,  
J.C., Dunlap, R.B., Odom, J.D.:  
*Biochemistry* **30**, 11073(1992)
- 6) Ueki, T., Yamamoto, M.: *Structure* **7**,  
R183(1999)
- 7) Sasaki, S.: "KEK Report", 88-14,  
1(1989).
- 8) Karle, J.: *Int. J. Quant. Chem.* **7**,

357(1980)

- 9) <http://pfweis.kek.jp/index.html> を参  
照
- 10) <http://www.spring8.or.jp/ja/> を参  
照
- 11) Rodgers, D.W.: "Methods in  
Enzymology", Academic Press Inc.,  
New York (1997), **276**, 183
- 12) <http://www.hamponresearch.com/> を  
参照
- 13) Ueno, G., Kanda, K., Hirose, R., Ida,  
K., Kumasaka, T., Yamamoto, M.: *J.  
Struct. Funct. Genomics*, **7**, 15(2006)
- 14) Ueno, G., Hirose, R., Ida, K.,  
Kumasaka, T., Yamamoto, M.: *J. Appl.  
Cryst.*, **37**(6), 867 (2004)
- 15) Hendrickson, W.A., Horton, J.R.,  
LeMaster, D.M.: *EMBO J.* **9**,  
1665(1990).
- 16) Collaborative Computational Project,  
Number 4. *Acta Cryst. D* **50**, 760(1994)
- 17) Leslie, A.G.W.: "Joint CCP4 +  
ESF-EAMCB Newsletter on Protein  
Crystallography", **26**(1992).
- 18) Otwinowski, Z., Minor,  
W.: "Methods in Enzymology",

Academic Press Inc., New York (1997),  
276, 307

19) Kabsch, W.: *Acta Cryst. D* **66**,  
125(2010).

20) Terwilliger, T.C., Berendzen, J.: *Acta  
Cryst. D* **55**, 849(1999)

21) Fortelle, E.L., Bricogne, G.:  
“Methods in Enzymology”, Academic  
Press Inc., New York (1997), **276**, 472

22) Sheldrick, G.M.: “Methods in  
Enzymology”, Academic Press Inc.,  
New York (1997), **276**, 628

23) Murshudov, G.N., Vagin, A.A.,  
Dodson, E.J.: *Acta Cryst. D* **53** ,  
240(1997)

24) Carter, E.C., Sweet, R.: “Methods in  
Enzymology”, Academic Press Inc.,  
New York (1997), **277**, 306

25) Brunger, A. T., Adams, P. D., Rice,  
L. M.: *Structure* **15**, 325(1997)

26) Tanaka, H., Kato, K., Yamashita, E.,  
Sumizawa, T., Zhou, Y., Yao, M.,  
Iwasaki, K., Yoshimura, M., Tsukihara,  
T.: *Science*, **323**, 384(2009)

27) Hirata, K., Ueno, G., Nisawa, A.,  
Kawano, Y., Shimizu, N., Kumasaka, T.,

Yumoto, H., Tanaka, T., Takahashi, S.,  
Takeshita, K., Ohashi, H., Goto, S.,  
Kitamura, H., Yamamoto, M.: *AIP  
Conference Proceedings* **1234**,  
893(2010)

<そのほか日本語参考文献>

- 桜井 敏雄 (著) ”X線結晶解析” (裳  
華房)
- J.ドレント (著) ”タンパク質のX  
線結晶解析法” (訳: 竹中 章郎, 勝  
部 幸輝, 笹田 義夫, 若槻 壮市) (シ  
ュプリンガー・ジャパン)
- 佐藤衛 (著) ”タンパク質のX線解  
析” (共立出版) など

<SPring-8 高フラックス微小ビームビ  
ームラインBL32XUの現状について>

21世紀はポストゲノムの時代をむか  
え、タンパク質生産・結晶化技術の向上  
や放射光利用による回折データの高精  
度化、さらにはより使いやすいソフトウ  
ェア等の解析技術開発により、タンパク



質結晶構造解析は飛躍的な進歩をとげた。タンパク質立体構造データベース (PDB) では 2011 年の年間登録構造が 8,000 件を越え,またその登録総数も 2012 年前半には 80,000 件を越えた。その登録構造の 90%は X 線結晶構造解析によるものである。この様にタンパク質の結晶構造解析は広く普及しておりプロテオーム研究における最強のツールとなった。

しかし,このような状況にもかかわらず 2012 年現在,PDB に登録されている膜タンパク質の種類は僅かに 300 種 1,500 座標,高等生物由来では約 30 種の膜タンパク質の構造が判っているにすぎない。膜タンパク質の X 線構造解析は,1985 年,Deisenhofer らによる紅色細菌の光化学反応中心が初めて報告されたが<sup>1</sup>,その構造解析は困難を極め,いま

だ可溶性タンパク質と比べ少数の解析例しか報告されていない。我が国では,月原らにより 1994 年にチトクロム酸化酵素<sup>2</sup>,2000 年には豊島らによる筋小胞体のカルシウム ATPase<sup>3</sup>,岡田・宮野らによるウシロドプシン (Rhodopsin) の構造解析<sup>4</sup>などが報告されている。

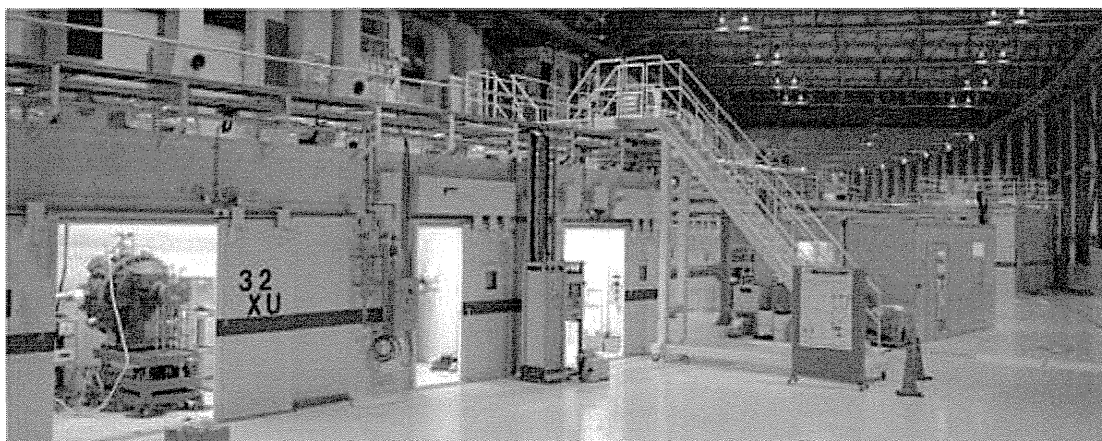
困難を極める膜タンパク質の結晶構造解析には,三つのハードルがある。第一および第二のハードルは,目的の膜タンパク質の大量生産と結晶化である。

この二項目は他の章に詳細は譲るが,特に最も主要な薬剤ターゲットである G タンパク質共役受容体 (GPCR) では,2007 年に Kobilka らによる抗体との複合体や T4-Lysozyme の挿入によるタンパク質の安定化と LCP (Lipidic cubic phase ; 脂質立方相) 法による結晶化法が開発され,構造解析に革新がも

たらされた<sup>5</sup>。残された第三のハードルは本節で取り扱う X 線による回折データ測定である。膜タンパク質の結晶化では LCP 法をもってしても解析に十分なサイズの結晶を得る事が難しい。また大きなサイズの結晶が得られた場合でも結晶の品質が悪く十分な回折能を

得られない膜タンパク質やタンパク質複合体等の構造解析がなかなか進捗しない状況であった。そこで、数ミクロン程度の微小結晶から構造解析を可能にするため、微小結晶と同程度以下のビームサイズかつ高い光子密度を実現する高フラックス微小ビームビームライン

示さない場合が多い。そのため、微小かつ低品質の結晶か



の開発がすすめられた。

ら解析可能な回折データを得るために、輝度の高い（高フラックス）小さな X 線が必要になる。2000 年代の技術水準では、第三世代放射光施設の高輝度アンジュレータビームラインでさえ、構造解析可能な結晶サイズは 20~30  $\mu\text{m}$  角が限界であり、10  $\mu\text{m}$  以下の微小結晶しか

ここでは、微小ビームラインでの微小結晶構造解析を実現するため装置技術、データ収集法や問題点について紹介する。

高フラックス微小ビームビームラインの共通点としては、放射光施設、挿入

光源を利用していることが挙げられる。放射光施設を利用すれば低エミッタンス（エミッタンス：ビームサイズと発散角の積）電子ビームが利用可能であるため、平行性が高く小さなX線ビーム（放射光）を作り出すことが可能である。さらにアンジュレータなどの挿入光源装置を用いることによってさらに高輝度光源を創りだすことが可能である。

微小ビームを用いるビームラインの場合、ビーム位置や強度変動は測定精度を悪化させる最大の原因であるため、常に安定させなければならない。強度の安定化には放射光施設のトップアップ運転<sup>6,7</sup>（リング蓄積電流値を常に一定に保つ運転）は大きな技術革新であった。

また微小ビームの位置ずれ（短周期・長周期）に対しては、ビーム位置モニタ

ーを用いてビーム位置を測定し、ミラーやモノクロメーターなどの光学素子へフィードバックするビーム位置安定化システムが主流となりつつある。

タンパク質結晶構造解析ビームラインでは微小ビーム化を実現するための集光光学系で大きく3つの選択肢がある。第一にX線集光ミラーを用いた光学系<sup>8,9</sup>、第二にミラー集光したビームを切り出して微小ビームを作り出すいわゆるミニビーム光学系<sup>10</sup>、第三にゾーンプレートなどの回折集光系である<sup>11</sup>。特に集光ミラーを用いる場合には、白色X線を単色化するための二結晶分光器の結晶を湾曲させて水平方向のビームを集光するサジタル集光を併用した集光光学系が採用される場合もある。

現在、最も主流であるミラー集光光学系においては、集光ミラー表面の凹凸

(以下,形状誤差)を改善する劇的な技術革新があった。ミラーの形状誤差は集光ビームプロファイルに直接影響するため,可能な限り小さいほうが良い。例えば,1  $\mu\text{m}$  集光を実現している SPring-8 BL32XU (図 1) では縦横集光を独立に行う Kirkpatrick-Baez ミラー配置で集光を行なっているが,この集光ミラーの表面は大阪大学で開発された Elastic Emission Machining Technique<sup>12</sup>で研磨されたものである。この研磨技術による形状誤差(表面の凹凸)は  $\text{\AA}$  オーダーという原子一層分に相当する驚異的な数値であり,BL32XU の初めての集光実験では1  $\mu\text{m}$  集光はわずか数時間の調整で達成することができた。

また回折点を検出器上でシグナル/ノイズ比(以下 S/N 比)よく分離させる目的で,ビームサイズや発散角をフレキ

シブルに変更できる集光ミラーや集光方法の開発も進んでいる。国内では,Photon Factory BL-1A で採用されているアダプティブミラーではミラー本体に組み込んだピエゾ素子の印加電圧の制御により反射面の形状を任意に変更してこれを実現できる。またイギリス Diamond Light Source では光源のサイズと位置を変更することにより,試料位置でのビームサイズと発散角をより幅広く調整可能なユニークな集光方式を採用している<sup>13</sup>。

このような放射光施設のアップグレード,集光素子や集光方法など,の技術革新により,現在では多くの放射光施設で微小ビームを実現できるようになってきている。

集光した微小ビームを微小結晶に確実に当て,微弱な回折強度をより迅速に

精度よく計測する,至極簡単ではあるが微小結晶構造解析を実現するビームライン回折計の仕様はこのようにまとめることができる。このために必要な要素は,サブミクロンの精度で微小結晶を正確に「見て」「移動し」「固定し」「より高感度に回折強度を計測する」,という技術である。これに加えていかに「より速く多く評価するか」も解析困難な結晶では重要な鍵となる。

### 【見る】

微小結晶を正確に「見て」微小ビームへ位置合わせする(以下、センタリング)ためには少なくともミクロンオーダーの微小結晶を可視化する高倍率顕微鏡が必須である。また多くの微小結晶用ビームラインでは「X線の視点」で結晶を見ることができる,いわゆる同軸顕微鏡(もしくは同軸カメラ)が採

用されている。利点は結晶の位置を斜視よりも容易かつ正確に把握できると,さらに,試料位置にシンチレータ(X線の照射により可視光を発する物質: Ce-YAG結晶など)を挿入してビーム位置の確認が容易に可能であることである。

また可視光以外にもタンパク質中に含まれるトリプトファンを280 nm波長で励起して発生する蛍光を認識するUV顕微鏡<sup>14-16</sup>,さらに最近ではSONICC<sup>17</sup>といった新しい技術による微小結晶可視化への取り組みも行われている。結晶を取り巻く環境(抗凍結剤や後述の脂質など)に依存せずあらゆるタンパク質結晶を「見る」ことができる顕微鏡が実現できれば実験効率の大幅な向上をもたらすだろう。

微小結晶から回折データを収集する

場合には、センタリングのため、試料をマウントするゴニオメータにサブミクロンオーダーの回転精度と並進精度が必要となる。多くの微小結晶ビームラインでは、高い回転精度を実現するため、圧縮した空気の潤滑による高精度軸受を利用したエアベアリングゴニオメータが採用されている。例えば BL32XU のエアベアリングゴニオメータでは回転による試料位置誤差（回転偏心誤差）はわずか  $0.5\ \mu\text{m}$  程度である。またゴニオメータの回転子上に搭載する試料用並進自動軸にエンコーダー（絶対位置測定が可能な計測器）を取り付け、試料位置の再現性をサブミクロンオーダーで保証することも可能になってきている。

微小結晶からの微弱な回折強度シグナルの取得、高速スクリーニング、位置

決定のためのラスタースキャン（後述）など微小結晶構造解析に必要な測定において、検出器に求められる仕様は「高感度・低ノイズかつ読み出し速度が速いこと」である。またビームラインでターゲットとなる結晶の格子サイズや回折分解能により、最善の素子、素子サイズ、検出面サイズの選定を行うことも重要である。

X線 CCD 検出器では例えば、X線を可視光に変換する蛍光体の材質・厚みの最適化、CCD 素子の S/N 比向上、光ファイバーによる画像縮小によるシグナル損失の低減などの組み合わせにより X線 1 光子を検出可能なものもある。例えば Rayonix 社の MX225HE では高感度な背面照射型の CCD 素子を利用することによりバックグラウンドノイズを劇的に低下させ、1 光子の観測が可能である。

一方、海外の複数の放射光施設で（国内では Photon Factory）利用されている DECTRIS 社の PILATUS は光子を直接数えるフォトンカウンティング方式の検出器であり、高いダイナミックレンジ、高感度、読み出しノイズがほぼない、1 イメージの読み出し不感時間が最速 2 msec、など、性能の高い検出器である。感度が高いゆえに単位放射線量あたりに取得可能なシグナル量が増えたという報告もある<sup>18</sup>。

SPring-8 での 3 Hz で読み出しが可能で汎用性の高いフラットパネル CMOS 検出器の開発を始め<sup>19</sup>、世界中で高感度かつ高速な検出器の開発が進められており、微小結晶構造解析の高速化が実現し始めている。

先に述べた検出器の高感度化に加えて、バックグラウンドの低下による S/N

比向上も極めて重要なビームライン技術の一つである。すべての微小結晶用ビームラインでは、試料直前に数  $\mu\text{m}$  ～数十  $\mu\text{m}$  径のピンホールコリメータと散乱防止用パイプ、試料に近い（5~10 mm）位置にビームストッパーを設置し、高強度 X 線が引き起こす空気散乱によるバックグラウンドを低下する工夫がなされている。微小径ピンホールの高精度加工や試料周辺装置の空間的配置によるバックグラウンド低減がデータ精度向上には必須である。

SPring-8 BL32XU や Photon Factory BL17 では回折計全体を隔壁で囲み、試料周辺雰囲気 He に置換してバックグラウンドを低減することに成功している。He を用いると 1Å 付近の波長でも通常の 1/10 程度までバックグラウンドが低減し、分解能や回折プロファイルの

改善が改善している。

ここまで述べた技術と一体化して利用し、より速く、より多くの結晶の品質を判定する（以下、結晶スクリーニング）補助的な測定技術・装置も重要である。微小結晶構造解析では膨大な数の結晶情報を管理しながら、一つ一つの結晶の回折データを取得し、最良な結晶もしくは結晶化条件を選択できることが必須である。この作業効率化のためには、自動試料交換ロボットは必要不可欠である<sup>20-24</sup>。ロボットの利用により得られるメリットは、ハッチドアを開閉せずに試料の交換ができること（時間短縮）、結晶を回収・再度測定することが容易であること（試料の選定が容易）、何よりもマシンタイム中に結晶を交換する体力を使わないですむことが挙げられる。とりわけ大量の結晶のスクリ

ーニングが必要な微小結晶構造解析では必要不可欠な技術であろう。またロボット利用によりハッチ扉開閉に伴う温度変化を低減できるメリットもある。装置の温度変化による熱伸縮はビームの位置ずれの原因となるため、試料交換ロボットとハッチ内精密温度制御の併用は微小ビームビームラインでは必須である。

従来、回折データ測定に用いるタンパク結晶は顕微鏡下で研究者の手技により結晶化ドロップから結晶ループですくい取り、液体窒素温度へ急冷凍結保存している。微小結晶は衝撃や乾燥、温度変化などでダメージを受けやすく、目的とする数ミクロンの微小結晶を手技ですくい取ることは非常に困難である。この問題を解決するため、微小結晶を自動で素早くダメージなしで X 線照射が



可能な状態にする技術開発も進んできている。

Diamond Light Source や SPring-8 では光ピンセットを用いて結晶化ドロップ中の微小結晶を結晶ループにすくい取る結晶ハンドリング装置の開発に取り組んでいる。SPring-8 では試料交換ロボット SPACE を改良し、すくい取った結晶の冷室素ガス吹付けによる急速凍結から液体窒素中トレイへの自動保管が可能となっている。現在、最大 30  $\mu\text{m}$  程度までの微小結晶のすくい取り自動化に成功している。

アメリカ NSLS-II(National Synchrotron Light Source II)では超音波で微小結晶を母液ドロップから叩き出して、ループ上へ液滴ごとマウントする、というユニークな技術を用いて大量の微小結晶を自動的にループにマウント

するシステム構築を目指している<sup>25</sup>。

また、結晶化プレートのまま微小結晶の品質を評価可能なプレートスクリーニング装置の開発についても世界中でその取組が進んできている<sup>26,27</sup>。この手法を用いる目的は初期結晶化条件を検討する、結晶凍結までのハンドリング過程における結晶の品質劣化の有無を確認する、などであり、特に構造解析初期に重要な手法である。最近ではさらにプレート中の常温結晶から構造解析に必要なデータ収集を想定している放射光施設もある<sup>28</sup>。

ここまで簡単に高フラックス微小ビームを実現する技術、効率良く測定を行う技術について述べてきた。では実際に、高フラックス微小ビームが実現してどのような効果が得られたか、また、高フラックス微小ビームを用いた実際の実

験事例に基づいて問題点を見てみる。

BL32XU の事例では, 1 個の結晶から原子分解能で構造解析ができた最小結晶サイズは  $5\ \mu\text{m}$  程度である。この結晶は空間群が  $I432$  と対称性が非常に高いことも助けとなり, 冗長度 10 程度 (同じ指数の強度を 10 回測定) ,  $1.7\ \text{\AA}$  分解能の構造解析を実現している。回折に寄与した結晶体積から結晶に含まれるコピー数を計算すると概ね  $10^6\sim 10^7$  コピーとなる。これは 2008 年に ESRF から報告されていた構造解析可能な限界結晶格子数  $10^8$  コピーという限界点を 1~2 桁下回っており<sup>29</sup>, 新たな高フラックス微小ビームがより小さな結晶を用いた高精度データ収集を実現していることを証明している。

微小結晶では多くの場合ビームラインの顕微鏡で視認が困難な場合が多い。

特に LCP 法で結晶化された場合, 脂質と共に結晶をすくいとられて凍結固定される場合が多いため, この事象は顕著である。この場合, ラスタースキャンが有効である<sup>30,31</sup>。ラスタースキャンは結晶を含んだループをゴニオメータで並進させながら X 線を照射し, その回折強度の有無によって結晶の位置を判断する方法である。広い範囲から高い精度で結晶位置を決定するには, 回折点を確認する検出器の読み出し速度が律速となる。

ラスタースキャンでは膨大な数のフレームを判定する必要があるため, 各回折イメージの評価を自動化しているビームラインも多い<sup>32</sup>。しかし我々の経験では, LCP 結晶の場合, 脂質から環状の回折パターンが生じるため, 回折点の有無の判定に誤りが多く, より安定に回折デ

ータの評価が可能なプログラムの改良・最適化が急務であると考えられる。

2007年に報告された human  $\beta_2$  adrenergic G-protein-coupled receptor の構造解析では<sup>33</sup>,著者らは「微小ビームを用いることが必須であった」と明言している。この論文中でのデータ収集は主にフランス ESRF(European Synchrotron Radiation Facility)/アメリカ APS(Advanced Photon Source)での微小ビーム(サイズ 4 x 6  $\mu\text{m}$  beam)を用いて 300 x 30 x 10  $\mu\text{m}$  の結晶からフルデータセット(182°分)のデータ収集を実現している。必要な分解能(ここでは 3.4~3.7 Å)を収集するためには一箇所の露光点からは振動範囲 5°~10°のデータ収集が限界であり,結晶の長い方向に露光点を次々と変えながらデータ収集することでデータ収集を実現している。

この報告で重要なポイントは3つある。第一に微小結晶構造解析には結晶のサイズにマッチしたビームが必要であること,第二に微小結晶ではより放射線損傷が重篤な問題となること,最後に微小ビームを用いれば露光点を変更することで放射線損傷を回避することが可能であること,である。

放射光ビームラインにおいて高精度回折データ収集を実現するには,タンパク質試料結晶の放射線損傷をよく理解し,定量化した上で最適な測定条件を選択する必要がある。放射線損傷の詳細は文献を参照されたいが<sup>34-37</sup>,この現象は大雑把には,X線の照射により結晶内部の分子配列が乱れ,その結果として回折強度の減衰や格子定数の変化などのデータ劣化が起きることと言って良い。様々な研究の結果,測定中の吸収線量

(単位重量あたりの結晶が吸収するエネルギー量 Gy (グレイ) =J/kg) を見積もることで損傷量はある程度正確に予測でき,回折強度の目減りも予測することが可能であることが分かっている。利用するエネルギーやビームサイズ,フラックス,用いているタンパク質の情報に基づいて実験中の吸収線量を見積もるプログラム RADDOSE<sup>38</sup>などを用いて露光条件を丁寧に決定することが,特に微小結晶を用いる場合には重要である。

結晶より小さなビームサイズを利用する場合には,複数の露光点を如何に展開するかが重要である.その一方法として,"helical data collection method"がある<sup>9</sup>。従来は,「ビームサイズより十分大きい距離」露光点間を離すことが主流であったが,この手法では「ビームサイズ

より短い距離でも可能な限り多く露光点をとる」ことがより高精度データ収集につながると結論付けられている。

これは「結晶の単位体積あたりの損傷量」を均一にすることにより,回折強度の損失量もデータを通して均一にし,精度を高めることを意味している。

BL32XU の通常測定では,この「ヘリカルデータ収集法」を標準測定法として採用している。これに加えて我々は標準タンパク質結晶を用いて損傷が伝播する距離をビームサイズごとに実測し,結晶のサイズと必要な回折データ量から放射線損傷の影響を最小限にする最適露光条件提案を行う測定コンセプトを確立した。このコンセプトにより LCP 結晶を用いた単波長・多波長異常分散法での位相決定にいくつか成功している<sup>39</sup>。現在はユーザフレンドリな