

## 新しい共用タンパク質結晶解析ビームライン BL45XU の 現状と運用計画

公益財団法人高輝度光科学研究センター

放射光利用研究基盤センター タンパク質結晶解析推進室

馬場 清喜、水野 伸宏

仲村 勇樹、長谷川 和也、熊坂 崇

公益財団法人高輝度光科学研究センター 光源基盤部門

竹内 智之、湯本 博勝、山崎 裕史

仙波 泰徳、大橋 治彦、後藤 俊治

国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学研究センター

平田 邦生、山下 恵太郎、坂井 直樹、山本 雅貴

### Abstract

BL45XU は、 $5.7 \times 10^{12} \sim 1.7 \times 10^{13}$  photons/sec@12.4 keV の高強度ビームを用いた自動での回折実験ができるタンパク質結晶解析ビームラインです。膜タンパク質を含む  $10 \mu\text{m}$  から数百  $\mu\text{m}$  までの様々な大きさの凍結結晶を対象試料とし、ビームサイズを  $5(\text{H}) \times 5(\text{V}) \sim 50(\text{H}) \times 50(\text{V}) \mu\text{m}^2$  の範囲で切り替えて、試料の交換・X線照射位置の決定・データ測定・データ処理を自動化した高効率な回折実験に対応します。

### 1. はじめに

SPring-8 には兼用も含めて 7 本のタンパク質結晶解析ビームライン (Macromolecular Crystallography (MX) ビームライン) がありますが、このうちの 2 本が共用ビームラインで、JASRI タンパク質結晶解析推進室が高度化・維持管理およびユーザー支援を行っています。共用 MX ビームラインは、国内のアカデミックユーザーに加え、海外のユーザー・産業利用 (成果専有) など幅広いユーザーに利用していただいている特徴があります。

近年、創薬ターゲットとなる膜タンパク質の結晶は、Lipidic Cubic Phase (LCP) 法<sup>1)</sup>により得られることもあって微小化しており、1 辺が数  $\mu\text{m}$ ~数十  $\mu\text{m}$  の結晶の測定が増えています。このような微小結晶からの回折データ収集は、複数 (何十~数百) の結晶からそれぞれ数度~10 度分程度の微小角での回折データを収集し、それらを統計学的に融合することで可能と

なりました。一方、これまでも一般的に行われてきた可溶性タンパク質の結晶構造解析では、創薬ターゲットに対するスクリーニング実験の増加だけでなく、機能解明のために様々な条件 (pH、基質結合など) で多様な構造変化 (構造多形) を明らかにすることが必要となってきました。こうした解析を実現するためには、大量の凍結結晶の回折データ取得からデータの解析までを自動化し、解析のスピードを加速することも重要となってきました。

こうした背景から、偏向電磁石ビームライン BL38B1 が担ってきた 1 辺が  $100 \mu\text{m}$  以上のサイズを測定の対象としたルーチン的なデータ測定をさらに発展させ、数  $\mu\text{m}$ ~数十  $\mu\text{m}$  の結晶から自動でデータ測定とデータ処理を可能とするために、この共用ビームラインをアンジュレータビームライン BL45XU へ変更しました。本稿では、2019 年から共用として運用を開始した BL45XU について報告します。

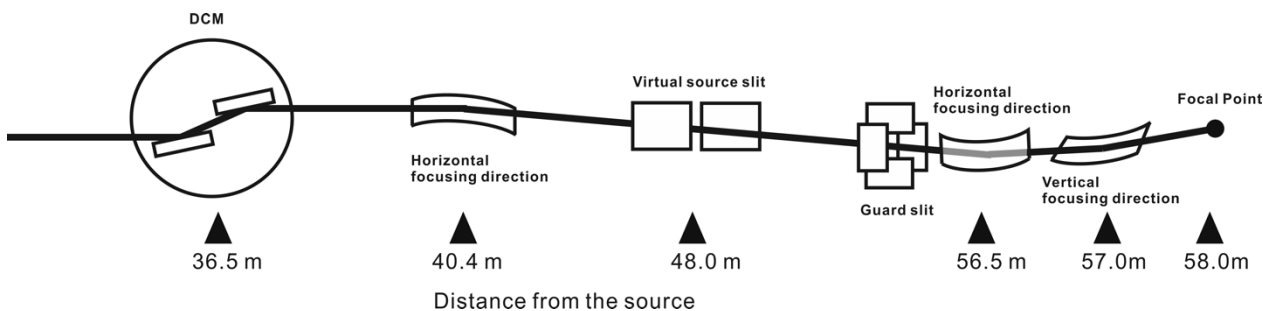


図1 BL45XUの光学配置

2. ビームラインの概要

BL45XUは、微小結晶・低品質結晶などの難易度の高い試料の測定が可能なアンジュレータビームライン BL41XU、BL32XU を基に設計されました<sup>12,3)</sup> (図1、表1)。真空封止型アンジュレータを光源とし、液体窒素冷却方式のシリコン2結晶分光器 (DCM、光源から36.5 m) を用いてビームを単色化します。さらに水平方向の集光ミラー (40.4 m) で1次集光 (48.0 m) し、実験ハッチ内に設置したKB配置の楕円筒ミラー (56.5 and 57.0 m) で試料位置 (58.0 m) へ集光します。1次集光位置に設置された仮想光源スリット (48.0 m) の開口サイズとKBミラーを調整することで、ビームサイズは、5(H) × 5(V) ~ 100(H) × 100(V) μm<sup>2</sup>の範囲で変更することができる設計です。利用可能なX線のエネルギー範囲は、6.5~16 keVです。

回折計はX線ミラーによるビームサイズ変更で生じる集光位置の変化に追従可能な設計としました。試料交換ロボットとして、自動測定を効率化するためにBL41XUに実装されたSPACE (SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger)<sup>14)</sup>の改良型である高速タイプのSPACE IIを導入し、検出器はDectris社製PILATUS3 6Mを搭載しました (図2)。

表1 典型的なビーム性能

エネルギー (波長) 範囲	6.5~16 keV (1.9~0.77 Å)
ビーム発散角	< 1 mrad
ビームサイズ	5(H) × 5(V) μm <sup>2</sup> ~100(H) × 100(V) μm <sup>2</sup>
ビーム強度	10 <sup>12</sup> ~10 <sup>13</sup> (photons/sec@12.4 keV)

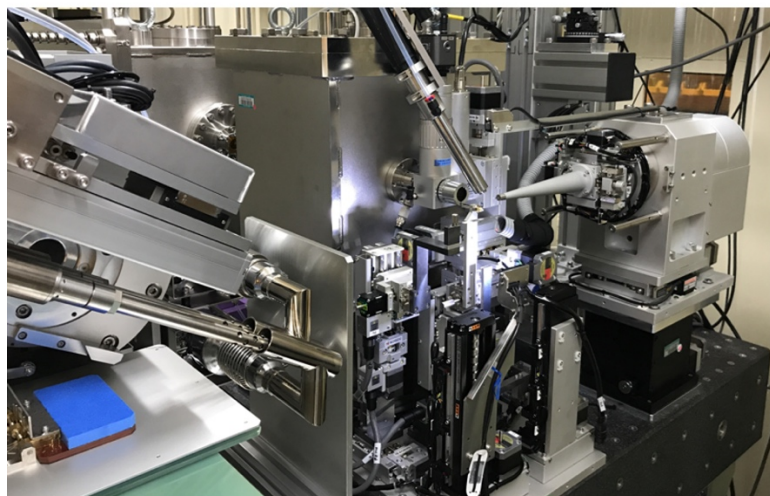


図2 BL45XUに設置された回折計 (左: 試料周辺環境、右: 装置へのアクセス部)

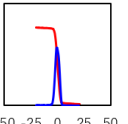
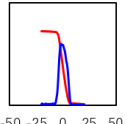
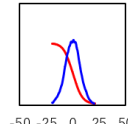
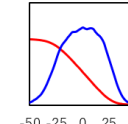
試料位置 ビームサイズ (FWHM, H × V)	5 × 5 μm <sup>2</sup>	10 × 10 μm <sup>2</sup>	16 × 20 μm <sup>2</sup>	50 × 50 μm <sup>2</sup>
Photon flux (photons/sec)	5.70 × 10 <sup>12</sup>	1.03 × 10 <sup>13</sup>	1.73 × 10 <sup>13</sup>	1.75 × 10 <sup>13</sup>
水平方向 ワイヤースキャン(赤) とビーム形状(青) @試料位置(μm)				

図3 試料位置でのビーム性状 (E = 12.4 keV)

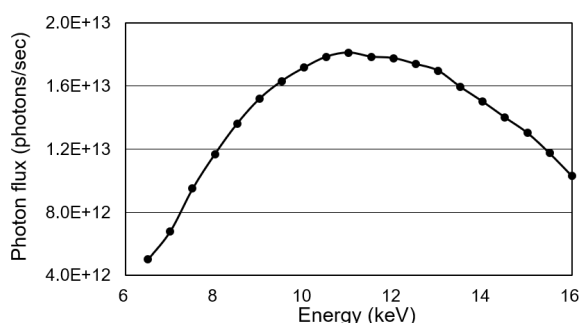


図4 各エネルギーに対する Photon flux (ビームサイズ 16(H) μm × 20(V) μm 設定)

立ち上げ調整は 2018 年度末から開始し、2019 年 5 月より共用を開始しました。ビームサイズは、5(H) × 5(V)~50(H) × 50(V) μm<sup>2</sup>の範囲で使用しており、利用可能な X 線のエネルギー範囲は、6.5~16 keV (1.9~0.77 Å)、ユーザーが最も利用するエネルギー 12.4 keV (波長 1 Å、ビームサイズ 16(H) × 20(V) μm<sup>2</sup>)での Flux は、1.73 × 10<sup>13</sup> (photons/sec)となっています(図 3、4)。

### 3. 結晶回折自動測定

本ビームラインの最大の特徴である自動測定を実現するために、理研ビームライン BL32XU で開発された自動データ収集/データ処理システム ZOO<sup>®</sup>を導入しました。ZOO システムでは、(1) SPACE による試料の自動交換、(2) X 線を用いた結晶位置の探索、(3) 重篤な放射線損傷を回避したデータ収集、(4) データ処理 KAMO の機能<sup>®</sup>を統合し、自動かつシーケンシャルに測定が行われます。データ収集においては、1 ヶ所で測定する「位置固定データ収集」、2 点間を移動しながら測定する「ヘリカルデータ収集」、複数の結晶から数度~10 度分程度の微小角で測定する「複数部分データ集積法」などが結晶の形状により選

択可能です。この自動測定では、結晶を収容する共通規格トレイ UNIPUCK (16 試料収容) の 1 トレイの測定を 1.5~2 時間で完了します。したがって、SPACE には UNIPUCK を 8 個搭載可能なので、最大で 128 試料を 12~16 時間でデータ収集ができることになります。現在さらに UNIPUCK 自動交換システムを準備中ですので、さらに多くの試料を自動で効率的に測定することができるようになる予定です。2019A 期に行われた実験の例として、成果専有一般課題の測定結果を表 2 に示します。

表 2 ある自動測定の例

測定条件	
- 試料数	78 試料/7 UNIPUCKs
- 全測定時間	6 時間 49 分
- 試料あたり平均測定時間	5 分 15 秒
- ビームサイズ	16 μm × 20 μm
- ビーム強度	1.73 × 10 <sup>13</sup> photons/sec@12.4keV
- 結晶サイズ	200 μm 長
• ZOO による自動測定	
- ラスタースキャン: 78 試料 (ピン)	
• スキャンエリア: 250 × 200 あるいは 400 × 300 μm	
• 露光時間 = 0.02 秒/フレーム	
• ビーム強度: 上記の 10%	
• カメラ距離 = 180 mm	
- データ収集: 77 試料	
• Δφ = 0.1°/フレーム、全振動角 = 360°	
• 線量 = 10 MGy	
• 露光時間 = 0.02 秒/フレーム	
• カメラ距離 = 250 mm	
• KAMO による自動処理	
- 全処理数: 77 セット、うち 76 セットで完全性 (得られるべき回折点に対して測定で得られた回折点) 90%以上のデータを取得	
- 2.5 Å 以上: 36 セット、3.5 Å 以上: 71 セット、5 セットは 12.4~3.8 Å	

また、これらを用いた自動測定の利用を当ビームラインにて 2019B 期からスタートします。UNIPUCK をドライシッパーに収容して SPring-8 に宅配便でお送りいただき、サンプル情報（測定条件など）をお知らせいただくことで、来所せずに自動測定を実施、測定後に試料と共に測定データと自動データ処理結果をお返しします。是非ご利用ください。

#### 謝辞

BL45XU の挿入光源の入れ替え、立ち上げには光源基盤部門挿入光源・フロントエンド G 田中隆次氏、光学系の立ち上げに際しては、光源基盤部門の皆様にご支援・ご協力をいただきました。機器制御システムの更新にあたっては光源基盤部門制御 G 古川行人氏にご支援・ご協力をいただきました。ビームラインの改造では竹下邦和 BL 装置責任者、光源基盤部門基盤技術 G 成山展昭氏、制御 G 石澤康秀氏にご支援・ご協力をいただきました。放射光利用研究基盤センター技術支援 G の皆様には実験ハッチの機器設置・立ち上げの全般にわたりご支援・ご協力をいただきました。BL45XU の自動測定の高性能化については、2019A2548 の課題を利用しました。

#### 参考文献

- [ 1 ] M. Caffrey: *Curr Opin Struct Biol.* **10** (2000) 486-497. (doi: 10.1016/S0959-440X(00)00119-6)
- [ 2 ] K. Hirata, Y. Kawano, G. Ueno, K. Hashimoto, H. Murakami, K. Hasegawa, T. Hikima, T. Kumasaka, M. Yamamoto: *J. Phys. Conf. Ser.* **425** (2013) 012002. (doi: 10.1088/1742-6596/425/1/012002)
- [ 3 ] K. Hasegawa, N. Shimizu, H. Okumura, N. Mizuno, S. Baba, K. Hirata, T. Takeuchi, H. Yamazaki, Y. Senba, H. Ohashi, M. Yamamoto, T. Kumasaka: *J. Synchrotron Radiat.* **20** (2013) 910-913. (doi: 10.1107/S0909049513022176)
- [ 4 ] H. Murakami, G. Ueno, N. Shimizu, T. Kumasaka, M. Yamamoto: *J. Appl. Cryst.* **45** (2012) 234-238. (doi: 10.1107/S0021889812003585)
- [ 5 ] K. Hirata, K. Yamashita, G. Ueno, Y. Kawano, K. Hasegawa, T. Kumasaka, M. Yamamoto: *Acta Cryst.* **D75** (2019) 138-150. (doi: 10.1107/S2059798318017795)
- [ 6 ] K. Yamashita, K. Hirata, M. Yamamoto: *Acta Cryst.* **D74** (2018) 441-449. (doi: 10.1107/S2059798318004576)

#### 馬場 清喜 BABA Seiki

(公財) 高輝度光科学研究センター  
放射光利用研究基盤センター タンパク質結晶解析推進室  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0833  
e-mail : baba@spring8.or.jp

#### 水野 伸宏 MIZUNO Nobuhiro

(公財) 高輝度光科学研究センター  
放射光利用研究基盤センター タンパク質結晶解析推進室  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0833  
e-mail : nmizuno@spring8.or.jp

#### 仲村 勇樹 NAKAMURA Yuki

(公財) 高輝度光科学研究センター  
放射光利用研究基盤センター タンパク質結晶解析推進室  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0833  
e-mail : y-nakamu@spring8.or.jp

#### 長谷川 和也 HASEGAWA Kazuya

(公財) 高輝度光科学研究センター  
放射光利用研究基盤センター タンパク質結晶解析推進室  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0833  
e-mail : kazuya@spring8.or.jp

#### 熊坂 崇 KUMASAKA Takashi

(公財) 高輝度光科学研究センター  
放射光利用研究基盤センター タンパク質結晶解析推進室  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0833  
e-mail : kumasaka@spring8.or.jp

#### 竹内 智之 TAKEUCHI Tomoyuki

(公財) 高輝度光科学研究センター 光源基盤部門  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0831  
e-mail : takeuch@spring8.or.jp

湯本 博勝 YUMOTO Hirokatsu

(公財) 高輝度光科学研究センター 光源基盤部門  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0831  
e-mail : yumoto@spring8.or.jp

山本 雅貴 YAMAMOTO Masaki

(国) 理化学研究所 放射光科学研究センター  
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-2839  
e-mail : yamamoto@riken.jp

山崎 裕史 YAMAZAKI Hiroshi

(公財) 高輝度光科学研究センター 光源基盤部門  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0831  
e-mail : yamazaki@spring8.or.jp

仙波 泰徳 SENBA Yasunori

(公財) 高輝度光科学研究センター 光源基盤部門  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0831  
e-mail : ysenba@spring8.or.jp

大橋 治彦 OHASHI Haruhiko

(公財) 高輝度光科学研究センター 光源基盤部門  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0831  
e-mail : hohashi@spring8.or.jp

後藤 俊治 GOTO Shunji

(公財) 高輝度光科学研究センター 光源基盤部門  
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-0831  
e-mail : sgoto@spring8.or.jp

平田 邦生 HIRATA Kunio

(国) 理化学研究所 放射光科学研究センター  
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-2839  
e-mail : kunio.hirata@riken.jp

山下 恵太郎 YAMASHITA Keitaro

(国) 理化学研究所 放射光科学研究センター  
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-2839  
e-mail : keitaro.yamashita@riken.jp

坂井 直樹 SAKAI Naoki

(国) 理化学研究所 放射光科学研究センター  
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL : 0791-58-2839  
e-mail : naoki.sakai@riken.jp