

## ヨーロッパの放射光タンパク質結晶解析ビームラインを視察して

公益財団法人高輝度光科学研究センター

タンパク質結晶解析推進室 長谷川 和也

### 1. はじめに

タンパク質結晶解析ビームライン (PX ビームライン) の高性能化・運用などに関する情報収集を行うことを目的として、8月下旬から9月上旬にかけて5ヶ所のヨーロッパの放射光施設 (Diamond Light Source、SOLEIL、Swiss Light Source (SLS)、MAX IV、PETRA III) のタンパク質結晶解析ビームラインの視察を行った。本稿では、今回見学した施設について報告する。

### 2. Diamond Light Source

Diamond には7本 (2本は建設中) のPXビームラインがある。今回はこのうち、I23、I24、VMXi、VMXmの4本のビームラインに加えて、付帯施設であるXChemを見学した。

I23は、硫黄・リンなどの軽元素の異常分散を利用した構造決定を目的として建設され、4Åまでの長波長が利用可能である。X線の吸収・散乱の影響を低減するため、PXビームラインでは世界で初めて真空中に試料を置いている。このため、試料の冷却方法、真空槽内での凍結試料のハンドリング方法などを独自開発していたが、大変な苦労があったようである。また、長波長X線を用いて高分解能領域まで測定するために、湾曲型のPILATUS検出器を真空槽内に設置している。現在、共同研究ベースでのユーザー利用を開始した状態であるが、既に硫黄の異常分散を利用した新規構造決定や、タンパク質に配位したカリウムイオン・カルシウムイオンなどの位置の決定などの成果が出ているとのことであった。

VMXmは、新しく建設中のマイクロ/ナノフォーカスビームラインである。完成すれば最小500nmのビームを用いた測定が可能になる (筆者の知る限りPXビームラインでは世界最小)。空気の散乱に由来するバックグラウンドを低減するため、このビームラインも試料を真空中において回折データ測定を行う。サ

ブミクロンサイズの結晶をターゲットにするため、測定試料の観察のための走査型電子顕微鏡 (SEM) を回折計に取り付けるということである。光学系の立ち上げは順調に進み現在コミッショニング中であったが、回折計については最終仕様決定に時間がかかっているということであった。

VMXiも、新たに建設中のビームラインである。通常のデータ測定ではタンパク質の結晶を結晶化プレートから1つ1つ拾い上げて凍結状態で測定するが、VMXiでは全てのデータ測定を結晶化プレート (*in situ*) のまま非凍結で行う。これにより結晶を拾い上げるステップをなくし、回折実験の自動化を目指したビームラインである。最小ビームサイズが5μmであり微小結晶の測定も可能である。通常のビームラインのようにいわゆる実験ハッチはなく、オペレーションを行う小部屋の中に放射線遮蔽用の囲いで覆われた回折計が設置されている (図1)。その近くには、結晶化プレートの長期保存と自動観察を行うロックイメージャーが置かれており、多軸ロボットがここからプレートを取り出し回折計まで運ぶ。回折計にはプレートホテル (短期保存場所) が備わっており、グリッパが順次プレートを取り出してゴニオメータに載せて測定を行うようになっていた。ロックイメージャーで観察した結晶の写真をもとに、あらかじめX線照射位



図1 VMXiの回折計

置を指定することができるソフトウェアの開発も進めており、測定は完全に自動化されるということである。

I24 は、5~60  $\mu\text{m}$  のビームが利用可能なマイクロフォーカスビームラインである。膜タンパク質の微小結晶のデータ測定によく使われているということである。通常のゴニオメータを用いた測定他、結晶化プレートのまま測定するためのゴニオメータも置かれている。両セッティングの切り替えは自動化され、わずか2分で完了するとのことであった。さらに、これらの両方を退避したスペースに、試料を載せるシリコングリッドを備えた並進ステージやインジェクタを設置すると、Serial Synchrotron Crystallography (SSX) による測定ができるということである。現状ではこれらは共同研究ベースの利用とのことであった。

XChem (X-ray structure-accelerated, synthesis-aligned fragment medicinal chemistry) は、Fragment-based screening (タンパク質に結合する小さな化合物 (fragment) のスクリーニング) を行うための設備 (システムといってもよいかもしれない) である。独自の化合物ライブラリ DSPL (Diamond-SGC Poised Library) を所有し、acoustic liquid handler ECHO (Labcyte 社) を用いて、結晶化プレート中の結晶にさまざまな化合物を効率よくソーキングする環境を整えている。確実に回折実験を行うために、結晶を凍結するための溶媒条件の検討や、結晶の DMSO (化合物を溶かしている有機溶媒) への耐性の確認など試料の準備を入念に行う。回折実験はビームライン I04-1 で行うが、測定や解析は自動化されておりユーザーは何もすることは無いということであった。なお XChem の利用は、他の Diamond のビームライン利用と同様に User Administration System (UAS) を通じて行うようである。

I23、VMXm、VMXi のように他の施設にないチャレンジングなビームラインを建設しているところが Diamond の特徴であった。

### 3. SOLEIL

SOLEIL には、PROXIMA-1、-2 の2本の PX ビームラインがある。2本は相補的な性能であり、PROXIMA-1 が平行の高いビームでウイルスなど長

い格子定数をもつ結晶を得意とする一方で、PROXIMA-2 はマイクロフォーカスビームラインであり微小結晶の構造解析を得意としている。

PROXIMA-1 のビームラインの運用は、毎週月曜日はビームが停止、火曜日はインハウスプロジェクト、水曜は産業利用で、残りの木~日曜日にアカデミックユーザーが利用している。ユーザーは原則1日1組であるが、Block Allocation Group (BAG) といって複数のユーザーがビームタイムを共同で利用する仕組みがあるという。BAG では知らないユーザー同士がビームタイムを共同で使うこともあり、また、BAG 中ではあるユーザーは来所せずに別のユーザーに測定を任せることもあるとのことである。ユーザー対応はスタッフ (4人ほど) が1日おきに Local Contact として順番に対応し、このうち1人は産業利用ユーザー専用のスタッフであった。ビームラインからの成果を確実に創出するために、スタッフは構造解析まで面倒をみているとのことである。産業利用ユーザーの場合では、希望があれば測定をスタッフが行うこともある他、構造解析までサポートをすることもあるようである。

この他、マイクロ流路加工の設備も SOLEIL には整っており、SSX 用の試料ホルダの開発などに利用されていた。

Diamond のような派手さはないものの手厚いユーザーサポートにより、成果をつくり出しているのが SOLEIL の特徴であった。

### 4. Swiss Light Source

SLS には3本の PX ビームラインがあり、いずれも Macromolecular Crystallography Group が面倒をみている。X06SA (通称 PXI)、X10SA (通称 PXII) は、アンジュレータを光源とし2段集光光学系を用いたマイクロビームが利用できるビームラインである。PXI が2段目の光学系として WinLight 社製 (フランス) の bender を利用した KB ミラーを用いているのに対し、PXII は、Paul Scherrer Institut (PSI) で開発されたキノフォームレンズを利用している。いずれも微小結晶に対応できるようにここ数年の間に光学系の改修をしたようである。

もう1つのビームライン PX06DA (通称 PXIII) は、偏光電磁石ビームラインである。ハッチの小窓から手

を伸ばして試料の交換ができることと、結晶化プレートのまま (*in situ*) で試料に X 線を照射できることがこのビームラインの特徴である。ビームラインのすぐ近くにはタンパク質の結晶化ロボットや自動結晶観察装置があり、SLS に課題をもつユーザーが利用しているということである。毎週水曜日が *in situ* 測定にあてられており、テクニシャンがオペレーションを行うということであった。今回訪れた多くのビームラインに *in situ* 測定の設定は整っていたが、このように定期的に利用されているのは PXIII だけであった。

データ測定ソフトウェアや回折データの自動データ処理システムなどはソフトウェアエンジニアらが作り上げた独自のものを使用している。サンプルチェンジャーは CATS (Cryogenic Automated Transfer System) とよばれるヨーロッパの PX ビームラインに多く導入されているロボットであったが、スピードと容量の改善を目的として現在新しいサンプルチェンジャーの開発を進めていた。この開発には Staubli 社 (スイスにある産業用ロボットの会社) 出身の技術者が担当していた。

3 つのビームラインのうち PXII はもともと製薬会社 2 社 (ノバルティス、エフ・ホフマン・ラ・ロシュ) とマックス・プランク研究所が出資して 2005 年に建設されたビームラインである。第 1 期が終了した後に新たに 4 社がパートナーに加わり、現在 7 つのグループがその出資比率に応じてビームタイムを分配しているということである。また、SLS でメールイン測定を行っていたスタッフが EXPOSE という会社をつくり、SLS を利用した依頼測定を請け負っていた。PXII の出資企業の中には、この会社にデータ測定を任せているところもあるとのことであった。

これらの 3 本のビームラインの運営は効率的である。各ビームラインに 2 人ずつの担当者が配置されているが、通常ユーザー対応はソフトウェアエンジニアやポスドクを含めたスタッフ全員でローテーションを組み、日替わりで Local Contact とよばれる当番になり 1 人で全てのビームラインのユーザー対応を行っていた。ユーザーからの質問やトラブルの連絡は Local Contact にゆき、Local Contact だけで対処できない場合は、ビームライン担当者やエンジニアなどと一緒に問題解決を行っていた。

SLS ではさまざまな分野から専門知識をもったス

タッフが集まり独自のハードやソフトを作り上げている。また、日々のビームラインの運用を効率的に行うことで、研究者が新たな測定方法の開発などに取り組みやすい環境を築いているようであった。

## 5. MAX IV

昨年より稼働を始めた MAX IV には BioMAX とよばれる PX ビームラインが 1 本ある。光学系は、横置ききの 2 結晶分光器が特徴的で、集光には WinLight 社製の bender を用いた KB ミラーを使用していた。実験ハッチ内の回折計などの機器は、ビームラインの立ち上げを迅速に行うために他の施設で開発されたものを導入したということである (図 2)。既にユーザーは入っているものの本格的なユーザー利用フェーズはこれからということであった。最新の低エミッタンスリングの PX ビームラインであり今後の楽しみである。

また新しいマイクロフォーカスビームライン MicroMAX の計画も進んでいる。計画ではビームサイズ 1~10  $\mu\text{m}$ 、強度が  $10^{13}$  (monochro beam)~ $10^{15}$  (wide band path beam) photons/s と野心的な性能を目指している。BioMAX が通常回折データ測定を行うビームラインであるのに対して、BioMAX は SSX 法による室温データ測定や時分割データ測定をターゲットに据え、インジェクタやマイクロ流路などを利用した様々な測定方法を切り替えて使用できるようにするとのことであった。

通常測定を行うビームラインと SSX のような先端的な測定を行うビームラインの組み合わせは将来の SPring-8-II 計画においても参考になるように思う。

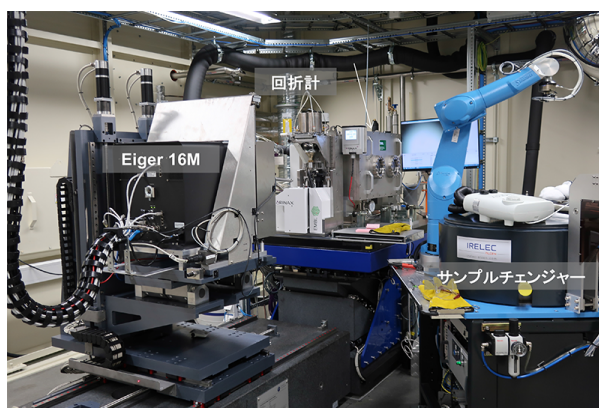


図 2 BioMAX の実験ハッチ

## 6. PETRA III

PETRA III では、欧州分子生物学研究所 (EMBL) が管理する2本のPXビームラインP13、P14と DESY が管理するビームライン P11 の見学を行った。

P14 は、微小結晶などの難しい試料をターゲットとし、KB ミラーを用いたマイクロビームが利用できる。また、PX ビームラインとしては珍しく屈折レンズを用いた集光ビームも利用でき、大きな結晶の場合は屈折レンズを用いて得られる矩形プロファイルの大きなビームを用いて測定を行っているということであった。ミラーを用いたときと屈折レンズを用いたときで光軸が変わるため、ビームサイズの変更にとまらぬ回折計や検出器が光軸に追従して動くようになっていくということであった。また、見学した際には通常の回折計の前にシリコン製の試料ホルダを用いた SSX 用のセットアップが設置されていた。現在の実験ハッチの下流側に SSX 専用の実験ハッチを新たに設け時分割構造解析を行う計画も進んでいるようである。

P13 は、広範な試料をターゲットとしたシンプルなセッティングのビームラインである。特徴の1つは硫黄の異常分散を用いた構造解析を行うために 4 keV までの長い波長も利用できることである。Diamond の I23 のように長波長に特化したビームラインではないので、長波長を利用する際には、(1) 試料と検出器の間に He パスを設置、(2) 検出器 (PILATUS) に乾燥空気 (窒素) の代わりに He ガスを供給用、(3) 吹付低温装置の気流をヘリウムガスに交換という3つの対応で吸収・散乱を低減している。このセッティングに要する時間はわずか10分ということであった。一度6 keV で測定を行い、構造解析が上手くいかない場合に4 keV を利用して測定しているということである。

P11 は、Imaging との兼用のビームラインであるが実質的にはPX専用に近いようである。10 m もあろうかと思われる長い石定盤の最下流にタンパク用の回折計が設置されていた。Serial Femtosecond Crystallography (SFX) 法で著名な Henry Chapman 先生と共同で SSX に取り組んでおり、PX の回折計の直前に、インジェクタやテープドライブを利用した SSX 用の新しい実験装置を置く計画があるということであった。

SSX 法による微小結晶解析や時分割測定に精力的に取り組んでいるのが PETRA III の印象であった。

## 7. おわりに

約2週間の間に5ヶ所の放射光PXビームラインを見学したことで、ヨーロッパにおける動向を感じることができた。Diamond の I23、VMXm のように独自の方向性を追求するビームラインもあるものの、全体の流れとして、(1) 膜タンパク質などの高難度試料のデータ測定や、創薬のためのリガンドスクリーニングの自動化・迅速化が進んでいること、(2) 高強度微小ビームを用いた SSX 法による室温での構造決定方法や時分割構造解析方法の開発に向かっていることを改めて認識した。

## 謝辞

今回の視察にあたっては、Diamond Light Source の Ramona Duman 博士、SOLEIL の Chavas Leonard 博士、Swiss Light Source の 富崎孝司 博士、MAX IV の Thomas Ursby 博士、PETRA III の Thomas R. Schneider 博士に各施設の見学をアレンジしていただきました。この場を借りて改めて感謝申し上げます。

長谷川 和也 HASEGAWA Kazuya

(公財) 高輝度光科学研究センター 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