ミニ特集 新しい「研究」様式放射光非来所実験の最前線と実践例

Photon Factoryのタンパク質X線結晶構造解析ビームラインにおける全自動測定とリモート実験

高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 山田悠介

Yusuke YAMADA: Fully Automated Unattended Data Collection and Remote Interactive Data Collection at the Photon Factory Macromolecular Crystallography Beamlines

There are five macromolecular crystallography beamlines at the Photon Factory. All beamlines support fully automated unattended data collection and remote interactive data collection, and users can select them when they submit beamtime requests. The beamlines also support browsing of results of the past experiments as well as the automated data analysis pipelines. The interactive data processing and raw data download from remote will be supported in the next autumn.

1. はじめに

高エネルギー加速器研究機構つくばキャンパスにある放射光施設 Photon Factory (PF) では5本のタンパク質X線結晶構造解析(MX) ビームラインが稼働している(表1)。長年にわたりビームライン装置の自動化に関する高度化を行ってきた結果、全自動測定やリモート実験といったユーザー非来所実験を実施することが可能となった。2020年度より非来所実験をアカデミック、企業問わずすべての利用形態でサポートし、ユーザーはビームタイム配分時に実験スタイルとして、全自動測定、リモート実験、来訪実験を選択することができるようになった(表1)。以降、全自動測定：リモート実験：来訪実験=3：4：3の割合で利用がされている。

2. PF-MXビームラインにおける非来所実験

2.1 自動結晶交換ロボット

全自動測定やリモート実験などの非来所実験を実現する上で最も重要な役割を果たすのが、自動結晶交換ロボットである。PF-MXビームラインでは、2種類の自動結晶交

換ロボット(PAM, PAM-HC)が稼働している(表1)^{1),2)}。PAMは米国放射光施設SSRLで開発されたSAM³⁾をベースにPF独自の改良を加えたもので、BL-5A, BL-17A, AR-NW12A, AR-NE3Aで稼働している。クライオピンを96個装填可能なSSRLカセットと16個装填可能なUni-puckに対応している。¹⁾ PAM-HCはBL-1Aの完全封止型ヘリウムチャンバー内に設置された回折計に対して試料交換を行う必要があることから、特別に設計されたロボットである。²⁾ PAM-HCはUni-puckにのみ対応している。自動結晶交換ロボットは国内外で多数の種類が存在するが、その多くがUni-puckに対応していることもあり、PF-MXビームラインでもほとんどのユーザーがUni-puckを使用している。

2.2 測定試料のビームラインへの送付

非来所実験ではユーザーは凍結した試料をUni-puckないしSSRLカセットに装填し、それらをドライシッパーに入れて、冷却状態を維持した状態でPFへ送付する。PFではビームラインスタッフが多数のユーザーからの試料を同時に扱うこととなるが、その取り違えは致命的なミスとなる。このミスをなくすために、ユーザー

表1 PF-MXビームラインの全自動測定とリモート実験への対応。(Automated data collection and remote data collection at the PF-MX beamlines.)

	BL-1A	BL-17A	BL-5A	AR-NW12A	AR-NE3A
使用可能波長範囲(Å)	0.96–1.07, 1.9, 2.7–3.25	0.9–2.1		0.75–1.9	
ビームサイズ(μm ² , FWHM)	13×13	40×20	200×200	200×130	φ100
ビーム強度(ph./sec.)	4.0×10 ¹⁰	1.5×10 ¹¹	1.5×10 ¹¹	1.3×10 ¹¹	2.5×10 ¹¹
検出器	EIGER X4M	EIGER X16M	PILATUS3 S6M	PILATUS3 S2M	PILATUS 2M-F
自動結晶交換ロボット	PAM-HC	PAM			
最大サンプル数	144(16×9)		192(16×12)		256(16×16)
(上段：Uni-puck, 下段：SSRL)	–		288(96×3)		576(96×6)
全自動測定			可		
試料センタリング時間(分)	6	6	3	3	3
ラピッドアクセスビームタイム	–	毎週火曜日	–	–	毎週金曜日
リモート実験			可		

は事前に試料発送情報をPF-MXビームライン実験情報管理システムPReMo (PF Remote Monitoring system) に登録し、発行される二次元バーコードをドライシッパーに貼り付けている。ビームラインスタッフが携帯端末でそのバーコードをスキャンしビームタイム情報を得ることで、ミスなくドライシッパーを目的のビームラインへ移送することができている。さらに、Uni-puckの16番ポートには底に別の二次元バーコードが印字されたクライオピンを装填し、そのバーコードとサンプルリスト上のUni-puck名との対応をPReMoに入力するようになっている。ビームラインスタッフがUni-puckを自動結晶交換ロボットにセットすると、ロボットがそのバーコードをスキャンしUni-puckを識別するため、ビームラインスタッフによる人為的なミスを防ぐことができています。⁴⁾

2.3 全自動測定

MXビームラインにおける実験作業は、主に回折計上の試料の交換、結晶のセンタリング、回折データ収集である。そして、現在ほとんどの実験がクライオピンを使って低温凍結された結晶について、回折データをルーチ的に収集していくものである。このためこれらの実験作業を自動化し、つなぎ合わせることで、全自動測定を実現することができる。PF MXビームラインでは2006年より創薬研究を想定した大規模な回折データ収集実験を行うために、PAMを用いた結晶交換とループ形状認識によるセンタリング、あらかじめ指定した測定条件によるデータ収集をつなげることで測定の全自動化を実現させ、⁵⁾一部のユーザーに供してきた。その後、シャッターレス測定が可能な高速検出器の導入や、回折計制御の改良により、X線ラスタースキャンが可能となったところで、高エネ機構の篠田氏らによりX線センタリングを用いた全自動測定ソフトウェアSIROCC (Sophisticated Interface for Routine Operation with Crystal Centering) が開発された。X線センタリングはループ領域全体にわたってX線ラスタースキャンを行い、タンパク質結晶由来の低分解能領域に現れる回折点の数をスキャン位置にマッピングすることで、タンパク質結晶の位置、および形状を認識するセンタリング方法で、現在は国内外の多くの放射光施設での全自動測定に採用されている方法である。^{6),7)}SIROCCは2018年からユーザー実験に公開されたが、公開以降も結晶の回折能評価のためのスナップショット測定の工程の追加や、1サンプルの複数個所からのデータセット収集を行う多点測定機能の導入などが行われ、現在でも改良が続けられている。

全自動測定はPF MXビームラインの測定ソフトウェアUGUISのメニューから実行することが可能であり、ビームラインスタッフがユーザーに代わって実行する以外にも、来所ないしリモート実験を行っているユーザー自身が実行することも可能である。また、全自動測定を

利用したラピッドアクセスビームタイムという制度が整備され、PF利用の有効課題をもっているユーザーであればビームタイム配分がなくとも最短4日でビームラインでの測定を行うことが可能である。

2.4 リモート実験

リモート実験はユーザーがPF MXビームラインの測定装置を遠隔から操作してデータ測定を行う実験である。この場合、自動結晶交換ロボットへの試料のセットや、放射線防護のためのシャッター操作は現地にいるビームラインスタッフ、ないしユーザーが行う。PF MXビームラインではNoMachineと呼ばれるリモートデスクトップソフトウェアを使用して、測定ソフトウェアUGUISが動作するコンピュータに遠隔にいるユーザーがリモートデスクトップ接続することでリモート実験を実現している。NoMachineは低帯域のインターネット接続でも効率良くデスクトップ情報を転送できるよう設計されており、遠隔のユーザーもほとんどビームラインで測定を行うのと同じような感覚で測定操作を行うことが可能である。

実際に遠隔のユーザーがリモート実験を行う際には、まず自身のコンピュータにNoMachine社が無償で提供する専用クライアント (NoMachine Enterprise Client) をインストールし、そのソフトウェアからPF MXビームラインが管理するNoMachineのゲートウェイサーバーにビームラインで使用するユーザー名とパスワードでアクセスする (図1)。ビームライン側でリモートアクセスの許可を出すと、該当するユーザーのNoMachineソフトウェア上でのみ、ビームラインアイコンが現れ、ビームラインの測定操作用コンピュータに接続できるようになる。この仕組みにより、ビームラインを利用するユーザーのみがビームライン測定操作用コンピュータにアクセスするようセキュリティを確保している。

2.5 回折データの処理・解析

PF MXビームラインで行われるすべての測定情報は来

図1 PF-MXビームラインへの遠隔からのアクセス。(Remote access to PF-MX beamlines.)

所、非来所実験にかかわらずPReMoのデータベースに格納される。さらにPReMoは測定終了後に回折データの処理・解析パイプラインを実行し、その処理結果もデータベースへと格納する。データベースへの格納は実験や処理と並行して行われ、データベースはWebを通じて閲覧が可能であるため、ユーザーはPReMoを通じてビームラインで行われている実験結果をほぼリアルタイムに世界中どこからでも確認することが可能である(図1).⁸⁾ PReMoが実行する回折データ処理・解析パイプラインは現在XDS⁹⁾を全ユーザーにDIALS,¹⁰⁾ SHELXCDE,¹¹⁾ DIMPLe¹²⁾を一部ユーザーに公開している。これらのパイプラインの有効・無効化、パラメータはPReMo上でユーザーごとに設定可能である。

また、遠隔から手動でデータ処理・解析を行えるようリモート専用解析環境の構築を行っており、2021年秋のビームタイムより運用を開始する予定である(図1)。リモート専用解析環境はリモート実験と同様にNoMachineを用い、複数の解析サーバーの仮想デスクトップにリモートデスクトップ接続するものである。

2.6 実験データのバックアップ

現在、回折実験の生データやデータ処理結果などはユーザーが持参ないし送付してきたUSB-HDDをビームラインのダウンロード用コンピュータに接続してバックアップしているが、2021年5月よりデータダウンロードサーバーの運用を試験的に開始した。このダウンロードサーバーにはビームラインの測定データおよび処理・解析結果が即時にアップロードされる。ダウンロードサーバー上ではNextcloudと呼ばれるミドルウェアが稼働しており、ユーザーはWebブラウザを通じて実験データをダウンロードすることが可能である。さらにNextcloudが提供する専用クライアントを使用すると、Dropboxなどのクラウドストレージと同様にダウンロードサーバーと自身のローカルディスクとの間でリアルタイム同期をとることができるため、ビームライン上で出力される実験データを少ないタイムラグでダウンロードすることが可能である。ダウンロードサーバーの一般公開は2021年秋を予定している(図1)。

3. 非来所実験の低エネルギー SAD 実験への応用

5本のPF-MXビームラインではさまざまな実験を行うことができるが、その中でも世界的に希有で特徴的な実験がBL-1Aを用いた低エネルギーSAD実験である。低エネルギーSAD法では微弱な異常散乱シグナルを利用するため、高精度な回折データ測定が必要である。その詳細については、松垣らの記事¹³⁾を参照いただきたいが、レーザー加工装置による溶媒除去ないし結晶形状加工と、多軸ゴニオを用いた高冗長度の回折データ収集が重要な役割を果たす。最近では、この一連の実験が非来所で行えるようになったので、その典型的な流れについ

図2 非来所で行う低エネルギーSAD実験。(Low-energy SAD experiments from a remote.)

て紹介する(図2)。

低エネルギーSAD実験では用意した試料の中で回折能に優れた結晶を選別すること、正確に結晶位置、形状を同定しレーザー加工で溶媒除去ないし結晶形状加工をすることが重要である。そのためにまず可能な限り多くの結晶試料を準備し、BL-1AやBL-17Aなどの小さなビーム径が選択可能なビームラインでループ正面、および+90度の角度で二次元回折スキャンを行うような全自動測定を行う。この結果から回折能の良い結晶を選択し、回折スキャンのヒートマップに基づき、結晶のレーザー加工を行う。特に+90度方向は可視光を用いた試料観察系では結晶位置を同定することが難しく、ヒートマップの情報はきわめて有用である。レーザー加工装置の操作端末はビームラインの操作端末と同様にNoMachineによるリモートデスクトップ接続が可能であるため、リモートから結晶加工を行うことが可能である。そして、レーザー加工された結晶について、BL-1Aで低エネルギーX線を用いて回折データ収集を行う。この際に1つの結晶から360度分の回折データセットを多軸ゴニオのKappa角を0, 30, 60, ...度と変えながら測定して冗長度の高いデータセットを得る。現在は多軸ゴニオのKappa角を変更した際の再センタリングが自動化されておらず手動で行う必要があるため、低エネルギーSAD実験もリモート実験で行う。これらの実験が非来所で行うことができるため、海外ユーザーでも容易に使用することが可能である。

4. おわりに

PF-MX ビームラインでは長年のビームライン高度化の結果非来所実験として全自動測定とリモート実験に対応し、ユーザーが自由に選択することができるようになったことからユーザーの利便性は向上した。しかしながら、非来所実験が普及することで、ユーザーの実験装置の形態や動作に対する実体験やビームラインスタッフとの交流の機会が減少し、その結果分野全体の知識の低下につながるなどの危惧もある。PF-MX ビームラインでは初心者講習会を開催したり、ユーザーグループがユーザー目線の講習会を開催したりするなどして、そのような機会の維持に努めている。ユーザーグループによる講習会の過去の試料はhttps://research.kek.jp/group/pxpfug/katsudo/shiryo_index.htmlにまとめられているので是非ご覧いただきたい。今後、さらに非来所化につながるようなビームライン高度化を継続していく予定であるが、それと同時にユーザーとの対話の機会も増やし、ユーザーにとって有用な測定環境の構築を目指していきたい。

謝 辞

本研究の開発においては、松垣直宏氏、引田理英氏、平木雅彦氏、篠田晃氏らが中心的な役割を果たしてきた。また、全自動測定およびリモート実験の運用は、PF-MX ビームラインスタッフ一同により行われている。

この場を借りて感謝申し上げる。本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）の支援を受けて行われた。

文 献

- 1) M. Hiraki, *et al.*: *J. Synchrotron Radiat.* **15**, 300 (2008).
- 2) M. Hiraki, *et al.*: *AIP Conf. Proc.* **1741**, 030029 (2016).
- 3) A. E. Cohen, *et al.*: *J Appl Crystallogr.* **35**, 720 (2002).
- 4) M. Hiraki, *et al.*: *AIP Conf. Proc.* **1234**, 673 (2009).
- 5) Y. Yamada, *et al.*: *AIP Conf. Proc.* **1234**, 415 (2009).
- 6) O. Svensson, *et al.*: *Acta Cryst.* **D71**, 1757 (2015).
- 7) K. Hirata, *et al.*: *Acta Cryst.* **D75**, 138 (2019).
- 8) Y. Yamada, *et al.*: *J. Phys.: Conf. Ser.* **425**, 012017 (2013).
- 9) W. XDS: *Acta Cryst.* **D66**, 125 (2010).
- 10) G. Winter, *et al.*: *Acta Cryst.* **D74**, 85 (2018).
- 11) I. Uson, *et al.*: *Acta Cryst.* **D74**, 106 (2018).
- 12) <https://ccp4.github.io/dimple/>
- 13) 松垣直宏ほか：日本結晶学会誌 **62**, 56 (2020).

プロフィール

山田悠介 Yusuke YAMADA
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所
Institute of Materials Structure Science
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: yusuke.yamada@kek.jp
専門分野：タンパク質X線結晶構造解析
現在の研究テーマ：放射光X線結晶構造解析