回折データの一貫処理システム

姫路工業大学工学部 藤井 功

㈱マックサイエンス 片山忠二, 大阪大学工業部 三木邦夫

姫路工業大学理学部 森本幸生, 樋口芳樹, 安岡則武

Isao FUJII, Chuji KATAYAMA, Kunio MIKI, Yukio MORIMOTO, Yoshiki HIGUCHI and Noritake YASUOKA: Application of Imaging Plate to Biological Crystallography — A Through Processing System of X-ray Diffraction Measurement

イメージングプレートは、新しい型の2次元検出器であり、空間分解能、ダイナミックレンジ、均一性等の基本的な性能については、すでにいくつかの報告がなされた^{1,2)}。このイメージングプレートの感度の高さは、特に放射線損傷を受けるタンパク質結晶の場合において有用であると考えられ、放射光実験施設において、坂部らの開発した巨大ワイセンベルグカメラとの組合せによる測定は多くの研究者に便宜をもたらしている³⁾。我々はイメージングプレートを用いた検出装置を実験室に導入し⁴⁾、X線測定から構造因子を求める一貫処理システムの開発を行った。また測定する上で注意を要する点や、得られた結果についての考察を報告する。本システムの効率と精度は本論で述べるように満足できるものであった。

システム構成

本システムは3つの部分からなっている。

- (1) X線発生装置 (RU300, 理学電機)
- (2) イメージングプレートを用いた積分型2次元検出装置 (DIP100, マック・サイエンス)
- (3) グラフィックスワークステーション (TITAN, クボタ)

イメージングプレート上に記録されたX線画像から出力を得る過程についての詳細を述べる。実験装置は第1図に示された設定になっている。0.15 mmの厚みに輝尽性発光物質を塗布したイメージングプレート⁵⁾から直径200 mmの円盤状に切り出されたものを用いた。試料結晶によるX線回折パターンはイメージングプレート上に色中心の分

布として蓄えられる。そしてHe-Neレーザ光でイメージングプレート上を走査し、その際励起された蛍光強度を測定することで回折画像を得ている。本装置では、読み取り時にイメージングプレートが一定の角速度で回転し、読み出しヘッドが、半径上を外部から中心に向かって移動する。この過程はちょうどレコードプレーヤにレコードをかけた時の操作に似ている(第2図)。強度データを得るための補正については後述する。X線画像が読み出された後、イメージングプレートの表面はフィルタされた強い光によって励起され、残っていた画像の消去が行なわれる。励起された輝尽発光は2つの光電子増倍管に集められる。これらは互いに感度を補完するように設定され、イメージングプレートのダイナミックレンジを確保している。光電子増倍管からの出力信号は第2図(a)に示されるように一定時間間隔で、うずまきに沿ってデジタル値に変換され、メモリに格納される。またこれらの値は第2図(b)に示されるように直交座標系の画素データに変換される。このうずまき状走査では、データは一定間隔でサンプリングされないために、同一スケールにのせるためにはモアレ様の幾何学的な数値を掛け合わせるという補正が必要である。最終的な各画素の強度の精度は16ビットに切り詰められる。第2図(b)に示すように、画素サイズは125 μ m $\times$ 125 μ mで、直径200 mmのイメージングプレートをカバーするために1600 $\times$ 1600画素になるように設計されている。それゆえイメージングプレートの各フレームを格納するための領域は約5MB必要である。

第1図 DIP 100

第2図 うずまき状に読み出したデータを直交座標系のピクセル値に変換

データ処理

データ測定を容易にするために、一連の操作をまとめて制御するプログラムを開発した。いくつかのコマンドとその動作について第1表に列記した。測定手順はこれらのコマンドを組み合わせることで、自由に測定手順を選ぶことができる。結晶のアライメントが終わった後、一連の振動写真が特定の振動角で測定される。構造因子を求めるには Schwager と Bartels によって開発されたプログラム FILME^{6,7)}を改良し用いた。プログラムの要請により、静止写真は振動写真の前後で測定される必要がある。

画素データをイーサネット回線経由で TITAN に転送し処理する。この一連の写真から構造因子を得る過程を第3図に示す。得られた画像データは圧縮され、一旦補助記憶装置に格納される。前駆プログラム STCONV, OSCONV により原画像から指数付けプログラム FILME で扱うことができる形のデータに変換される。前後に撮られた静止写真は逆格子の方位行列を精密化するのに用いられる。例えば1セットの振動写真を処理し構造因子を得るのに約7分程度を要する。

我々のシステムで用いるために以下の変更を加えた。

- 1) 画素サイズを 125 μ m に変更した。
- 2) 画素の強度のダイナミックレンジを保証するためにレコードサイズ等を多長バイト型に変更した。
- 3) 検出範囲の拡大に応じて、画数の数の配列を拡張した。
- 4) 命令語数と多量のデータ空間を節約するために用いられていた種々のプログラミング技法上の処理は不要になったので、高速化のために仮想記憶処理方式を用い、さらに最適化を行った。
- 5) 画素データから構造因子を求めるための一連の処理を制御するために X Window システムを導入した。対話的に処理ができ、画面上に回折反射イメージと計算された反射パターンとを表示できる。

X Window の使用並びに上記の変更により回折実験を行う為の環境が十分に整備された。

感度特性

放射性同位元素 (⁵⁵Fe, 30 μ Ci) を用いて均一露光を行った。イメージングプレートの中心から 93.6, 63.5, 36.2mm の3点を選んで第4図に示すように、放射性同位元素はシンチレーションカウンタによって強度を求めた。次のために感度差が

第1表 制御コマンドとその機能

INIT	: DIP 100 コントローラの初期化と座標変換テーブルの読み込み, およびイメージングプレートの消去, 定量測定に際して立ち上げまでに約1時間程度の待ち時間を要する。
OSC	: 振動写真を撮すために用いられる; 振動角, および露光時間, 振動回数を設定し測定を行なう。
STILL	: 静止写真を撮るために用いられる; 必要とする軸の回転角と, 露光時間を設定し露光を行なう。
ERASE	: イメージングプレートの消去と固定。
TITAN	: イーサネット回線経由でワークステーション TITAN に画像データを転送する。
DISP	: CRT に回折画像を表示するのに用いられる。必要ならハードコピーを作ることができる。

第3図 データ処理

第4図 イメージングプレートの感度
半径93.6mm (■), 63.5mm (▲), 36.2mm (●)。

生じたものと考えられる。外周部では走査面積が広く、サンプリング時に得られる蛍光は比較的強い。一方内周部では、単位面積当り強い励起が起

こるが、通過する面積は狭く1回のサンプリングで得られる強度は弱くなる。しかし結果として積算された回数は多いので、画素当りではより高い感度を示している。感度に大差がみられないことは、外周部での高速度でも、色中心が有効に利用できたものと考えられ、これ以上の励起光の強度増加はあまり意味をなさないと考えられる。

強度補正

強度の平面内のばらつきのテストを行った。回転させたイメージングプレートに円周に沿った露光を与えた。この時得られた平均強度とそのばらつきを第5図に示した。これによるとばらつきは主にX線のランダムエラーによるもので、システム固有の系統誤差は見いだされず、面内均一性は保証され、後述する半径方向の補正だけで良いと考えられる。

半径に依存する補正関数を求めるために次の実験を行なった。放射性同位元素 (^{55}Fe , $30\mu\text{Ci}$) を読み出しヘッドに取り付け、繰り返し走査することで一様露光を与えた。モアレによる局所的な分布を無くすため、強度データを各画素固有の積算回数で割ることで、第6図に示す光電子増倍管に入射した時の平均強度を得ることができる。第6図(b)に強い露光のデータに対する各データの相対強度比を示す。この修正曲線の形状は強度には依

第5図 測定強度と標準偏差

(a)

(b)

第6図 一様露光による補正曲線

- (a) 放射性同位元素による半径にそった一様露光。
 (b) 最大露光時間（600分）に対する相対強度比。

存しないこと、また2次元検出器として使用可能な領域をも示唆している。

観測の過程を考慮にいれて多くのモデルが考案されたが、残念ながら良い特定の関数型を決める

のはできなかった。幾分良いと考えられる関数は

$$I(r) = \frac{kr}{r+a} \quad (1)$$

で示され、 $I(r)$ はイメージングプレートからの半径を r としたときに得られる強度の関数であり、 k, a は各々定数である。この関数は、第7図に示されるように、うずまき状走査方式を補正するには満足できるものであると考えられる。

第7図 関数当てはめ

(1)式を用い有効範囲半径5~95 mmの範囲で計算した。パラメータ k, a は $3.74 \times 10^3, 1.22 \times 10^3$ に収束した。

励起状態（潜像）の減衰について

X線により生じた色中心は時間とともに減衰するのはよく知られている。一定強度の反射を用いて短時間に露光を行ない、読み取るまでの時間を変えて測定を行なった（第8図）。色中心の減衰を抑止するためには低温に保持することが有効であると考えられる。減衰曲線は次式が良く当てはまると考えている。

$$I(t) = I_1 \exp(-\lambda_1 t) + I_2 \exp(-\lambda_2 t) \quad (2)$$

$I_1 + I_2$ は露光された強度を示し、 λ_1 と λ_2 は減衰のメカニズムに起因すると考えられる定数である。そして t は露光後読み取るまでの時間である。なおこのメカニズムは残念ながらまだ完全には解明されていない。より正確な強度測定が必要と思われる。

(a)

(b)

第8図 潜像の減衰

- (a) 露光から読み出しまでの時間を様々に変化させたときの減衰。
 (b) 温度 $6 \pm 1^\circ\text{C}$ (●), $20 \pm 4^\circ\text{C}$ (▲) での相対強度比。

タンパク質結晶のデータ収集

タンパク質結晶のデータ収集に対する最適な条件を求めるために、卵白リゾチーム結晶を用いて回折実験を行なった。実験条件と得られたデータの統計量を第2表に示す。振動回数を1回としたDATA (I), 振動回数を5回にしたDATA (II)の2つのデータセットを得た。総反射数はDATA

32.5-28

(II)よりDATA (I)においてより多く見いだされた。等価な反射で、30%以上のばらつきを有するために削除された反射群は、DATA (I)で多数見いだされた。2つのデータセットを比較して、本装置では振動回数を複数回にすることが望ましいと考えられる。このことは第8図と関連して論議された色中心の減衰のためによるものと考えられる。各データセットを測定するに要した時間は約12時間程度であった。またイメージングプレート回折収集システムの性能を評価するために、4軸自動回折計により約25時間でリゾチームのデータを集めた。これらのデータは同様の質であると考えられる。

第2表 リゾチームの実験条件と測定結果

(DIP100)		
サンプル	Lysozyme (卵白) ($0.4 \times 0.3 \times 0.3 \text{ mm}$) ($P4_32_12$) $a = b = 79.1 \text{ \AA}$, $c = 37.9 \text{ \AA}$	
X線源	40 kV, 120 mA (fine focus)	
コリメータ (ϕ)	0.5 mm	
モノクロメータ	graphite	
カメラ長	100 mm	
分解能	2.0 $\text{\AA}$	
振動軸 ω	c^*	
振動角度	2.0°	
フィルム枚数	振動写真 23 静止写真 24	
	DATA (I)	DATA (II)
振動写真		
振動速度	0.002°/sec	0.010°/sec
振動回数	1	5
露光時間		
振動写真	1000 sec	200 $\times$ 5 sec
静止写真	600 sec	600 sec
反射数		
測定反射数	9786	7642
削除反射数	759	307
独立反射数	3822	3539
Rmerge	8.3%	8.3%
(4軸自動回折計)		
X線源	40 kV, 120 mA (fine focus)	
コリメータ (ϕ)	0.5 mm	
モノクロメータ	graphite	
カメラ長	400 mm	
走査速度: 2θ	4°/min	
分解能	2.5 $\text{\AA}$	
反射数		
測定反射数	4633	
削除反射数	206	
独立反射数	2672	
Rmerge	8.0%	

第3表 チトクローム C553 結晶の回折実験

サンプル	Cytochrome c-553 (<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F) ($0.8 \times 0.4 \times 0.4$ mm) ($P4_3 2_1 2$) $a = b = 42.7 \text{ \AA}$ $c = 103.4 \text{ \AA}$
X線源	50 kV, 300 mA (normal focus)
コリメータ (ϕ)	0.5 mm
モノクロメータ	graphite
カメラ長	100 mm
振動軸 ω	c^*
振動速度	$0.004^\circ/\text{sec}$
振動回数	3
振動角	2.5°
露光時間	
振動写真	$625 \times 3 \text{ sec}$
静止写真	300 sec
フィルム枚数	
振動写真	$18 \times 2 \text{ sec}$
静止写真	$19 \times 2 \text{ sec}$
反射数	
測定反射数	19619
削除反射数	470
独立反射数	4292
Rmerge	6.8 %

硫酸還元菌から得られたチトクローム c-553⁸⁾を用いて他の回折実験を行なった。結果を第3表に示す。2.3 Å 分解能の2つのデータセットが、互いに振動角が重なるように設定し、約28時間で測定された。

結 論

以上イメージングプレートを用いた回折装置を用いて構造因子を得るためのシステムについて報告した。一辺0.5 mmの標準的なサイズのタンパク質結晶を用いて振動写真法により、かなりの量の良質の反射を得る為には、30分程度の露光を必要とした。既に述べたようにイメージングプレートの色中心の減衰が、データ収集の過程で存在し、長時間の低強度での露光は無意味であると考えら

れる。なぜなら時間的、熱的な減衰と新たにつくられる色中心が平衡に達すると考えられるからである。30分の露光は定量的に1画面を得るのに適当な時間かも知れない。最後に、注意深く用いたとすれば、実験室系においても、イメージングプレートを用いた回折装置は、タンパク質結晶学において非常に実用的なものであると考えられる。

参考文献

- 1) Takahashi, K., Kohda, K. & Miyahara, J.: J. Luminescence **31** & **32**, 266-268 (1984).
- 2) Miyahara, J. & Kato, H.: Jap. Soc. Appl. Phys., 884-890 (1984).
- 3) Sakabe, N., Nakagawa, A., Sasaki, K., Sakabe, K., Watanabe, N., Kondo, H., & Shimomura, M.: Rev. Sci. Instrum. **60**, 2440-2441 (1989).
- 4) 藤井 功, 三木邦夫, 森本幸生, 樋口芳樹, 安岡則武: 日本結晶学会年会 7-35 (1988).
- 5) Miyahara, J., Takahashi, K., Amemiya, Y., Kamiya, N. & Satow, Y.: Nuclear Instruments & Methods in Phys. Res. A **246**, 572-578 (1986).
- 6) Schwager, P., Bartels, K. & Jones, A.: J. Appl. Crystallogr. **8**, 275-280 (1975).
- 7) Jones, A., Bartels, K. & Schwager, P.: The Rotation Method in Crystallography, Arndt, U. W. & Wanacott, A. J. eds., North Holland, Amsterdam, pp. 105-117 (1977).
- 8) Nakagawa, A., Nagashima, E., Higuchi, Y., Kusunoki, M., Matsuura, Y., Yasuoka, N., Katsube, Y., Chihara, H. & Yagi, T.: J. Biochem. **99**, 605-606 (1986).