実験室系の X 線回折装置への応用を考えたの 特性評価

大阪大学蛋白質研究所 佐 藤 衛
富士写真フィルム㈱ 岡 野 伸 一

Mamoru SATO and Shinichi OKANO: Application of Imaging Plate to Biological Crystallography — Characterization of Imaging Plate Concerning with X-ray Diffraction Experiments Using a Conventional X-ray Source

1. はじめに

イメージングプレート（以下 IP と略）は、高感度、動作範囲の広さ、低ノイズレベルなどの特性から、生体高分子の結晶構造解析において、X 線フィルムにかわる新しい二次元検出器として注目されている¹⁾。現在、高エネルギー物理学研究所の放射光実験施設を中心に、多くの研究者が利用しているのは周知の通りである^{2, 3)}。しかしながら、比較的不安定な生体試料を取り扱う以上、結晶性や重原子誘導体結晶の評価など生体高分子の結晶構造解析の成否を左右する重要な問題の解決には各自の実験室内でのデータ収集が不可欠となろう。このような観点から、本誌でも紹介されているように、ソフトウェアを含めて実験室レベルの測定装置の開発が行なわれている。

ところが、実験室系の装置を使ってデータ収集を行なう場合、いくつかの問題点がある。強度が強くしかも平行性のすぐれた放射光では、比較的弱い反射でも精度よく強度が測定でき、格子定数の大きな結晶における回折点の分離の問題も生じない。実験室系においても、格子定数の小さな結晶を対象にする場合は、強度も強く回折点の分離も容易で問題とはならないが、二次元検出器としての利点がほとんど生かされず、従来の四軸型自動回折計によるデータ収集と速度的に何ら変わらなくなる。したがって、本稿では、格子定数が大きく、回折計によるデータ収集が困難な結晶の強度測定を念頭において IP の特性評価を行なった。

IP の評価は、四軸型回折計と写真法⁴⁾から得られた回折強度データを互いに比較しながら行な

った。両方法とも信頼性が高く、これまで数多くの研究者がデータ収集のために使用しているからである。また、入射 X 線を直接 IP に照射するかわりに、結晶からの回折 X 線を使っているので、結晶の内部や表面に付着した母液、結晶を封入するために使用するキャピラリーなどからの散乱 X 線の評価にもつながる。尚、入射 X 線を用いた IP の定量的な評価については、本誌等で紹介されているので参照されたい^{5, 6)}。

2. 実験

評価の対象にした IP は、富士写真フィルム社製 Bio-image Analyzer BA100 で使用されるタイプ BA である。振動カメラに X 線フィルムと同じようにセットしてデータ収集に用いた。

2.1 結晶

測定には、卵白リゾチームおよびグルタチオン合成酵素⁷⁾の結晶を使用した。前者は、IP の動作範囲、強度データの一緻度、SN 比の評価に、後者は、単位格子が大きいので位置分解能の評価に用いた。以下に、それぞれの結晶の結晶学的データを示す。

a) 卵白リゾチーム

正方晶系，空間群 $P4_3 2_1 2$, $a = b = 79.1 \text{ \AA}$
 $c = 37.9 \text{ \AA}$

b) グルタチオン合成酵素

六方晶系，空間群 $P6_3 22$, $a = b = 88.0 \text{ \AA}$
 $c = 164.2 \text{ \AA}$

2.2 IP および X 線フィルムの読取り

I P (タイプBA)

Bio-Image Analyzer BA100

画素サイズ : 0.1mm

分解能 : 256 階調

収録ラチチュード : 4 桁

X線フィルム (コダック社製 DEF-5)

Optronics 社製 P-1000 Drum Scanner

Raster Step: 100 μ m (卵白リゾチーム)50 μ m (グルタチオン合成酵素)

3. 結果および考察

3.1 動作範囲

卵白リゾチーム結晶の (21 4 0), (23 5 0), (25 6 0), (27 7 0) の各反射に対して, 露出時間による回折強度の変化を調べた. 第1図から明らかなように, 最低4ケタの動作範囲が保障されていることがわかる. 蛋白質など生体高分子結晶の回折強度測定の場合, 通常4ケタの動作範囲が必要となるので, I Pは適度な動作範囲をもつと言えよう. しかし, 動作範囲は, 光電子増倍管(PMT)の動作範囲で制限されるので, I P固有のもつ5ケタの動作範囲は得られない. したがって, 強度分布の大きな低分子結晶の強度測定に適用する場合は注意を要する.

さらに第1図をみると, それぞれの回折強度が露出時間と45度の傾きをもつ直線に関係づけられていることがわかる. これは, I Pに入射した回折X線(バックグラウンド散乱を補正したX線)の光子数に比例した蛍光相対強度が測定されていることを意味し, 回折X線の二次元検出器としての定量性を示している.

3.2 強度データの一致度

3.1では, I Pの動作範囲およびその定量性について評価した. ここでは, それをさらに確認する目的で, I PおよびX線フィルムから得られた回折強度を回折計と比較して両者の一致度を調べた. 第2図の(a)に示したように, I Pの場合, 露出時間が11.25秒では多少のばらつきが認められるものの, 60秒露出ではもはや300秒, 1500秒, 7500秒露出のデータとほぼ同程度の一致度を示している. 一方, X線フィルムでは(第2図の(b)), 1500秒, 4500秒露出ともに同様の一致

度度を示している. したがって, I Pでは60秒, X線フィルムでは1500秒の露出で, 回折計と同程度の一致度を示すデータが得られると言える. また, I PとX線フィルムとでは, わずかながらI Pの一致度がよい結果が得られている. 後述のS N比が, 両者間で異なっているのが一因であろう.

3.3 S N比

生体高分子結晶にX線を照射すると, ラウエ関数に起因する回折X線とともに, 結晶内や表面に付着した母液, 結晶を封入したキャピラリー, 空気などによる散乱X線が観測される. 後者は, バックグラウンドで, 回折X線に非干渉的に寄与する散乱である. したがって, 理想的な検出器では, 回折X線とバックグラウンドの強度比は各反射で一定となる. 実際には, 回路上のノイズやX線フィルムのかぶりなどのためにある一定時間の露出が必要である. 生体高分子の結晶では, 回折X線の強度は弱くしかもバックグラウンドレベルが高いので回路上のノイズやかぶりはできるだけ抑える必要がある.

第3図は, I PおよびX線フィルムで検出された反射のS N比を露出時間に対してプロットしたものである. 回折強度によりS N比が一定になるのに必要な露出時間は異なるが, I Pでは, 300秒の露出ですべての反射のS N比は一定となる. ところが, X線フィルムでは, 一定のS N比に達するには, 4500秒以上の露出が必要である. したがって, S N比を指標にすると, 60秒露出のI Pデータは, 4500秒露出のX線フィルムデータを上回ることがわかる. 雨宮氏らの評価によれば⁹⁾, I Pの場合, PMTの暗電流などによるノイズは画素あたり3以下⁹⁾のX線光子に相当するが, X線フィルムの場合では, かぶり等によるノイズは画素あたり1000以上と見積もられている. I Pの場合, バックグラウンド以外のノイズがいかに低レベルかを如実に示す結果であろう.

3.4 位置分解能

位置分解能の評価は, 大きな格子定数をもつ生体高分子結晶の回折強度を測定する場合に特に重要となる. 反射点列が密になり, 分離しにくくなるからである. この問題は, 強力で平行のすぐれた放射光では, 結晶-I P間の距離を長くすることによって解

第1図

I Pの動作範囲. 卵白リゾチーム結晶の(21 4 0), (23 5 0), (25 6 0), (27 7 0)の各反射の回折強度を, 振動カメラを用いて露出時間11, 25, 60, 300, 1500, 7500秒(振動角 1.5°)で測定した. カメラ: ENRAF-NONIUS社製振動カメラ(コリメーター $0.3\text{mm}\phi$, 結晶-I P間距離70 mm), X線発生装置: 理学回転対陰極型FR-B (40KV 40mA, Focus Size on Cu Anode= $0.1 \times 1\text{mm}$), 単色化: $15\mu\text{m}$ Ni箔. 結晶のc軸を振動カメラのスピンドル軸に合わせた.

決できる問題であるが, 実験室系の線源では, 平行性も悪く強度も弱いので, 結晶-I P間距離にも限界がある. さらにI Pの場合は, X線フィルムとは異なり, レーザー照射によって発光する蛍光をPMTで検出するために, 反射プロファイルの広がりが無視できなくなる恐れがある⁶⁾. したがって, X線フィルム上では分離している反射点

列でも, I P上では分離できない可能性があり, 位置分解能の低下が懸念される. ここでは, グルタチオン合成酵素の結晶を使って位置分解能の問題について検討してみたい.

グルタチオン合成酵素の結晶は, c軸が長く($164\text{\AA}$), 通常回折計では高分解能の回折強度データを収集することができない⁸⁾. X線フィル

第2図

回折強度データの一致度。比較は、卵白リゾチーム結晶の(4 19 0), (21 4 0), (23 5 0), (25 6 9), (27 7 0), (29 8 0)の各反射を使って行なった。(a)回折計データ(I_1)と1; 11.25秒露出IPデータ(I_2), 2; 60秒露出IPデータ(I_2), 3; 300秒露出IPデータ(I_2), 4; 1500秒露出IPデータ(I_2), 5; 7500秒露出IPデータ(I_2)。 (b)回折計データ(I_1)と1; 1500秒露出X線フィルムデータ(I_2), 2; 4500秒露出X線フィルムデータ(I_2)。回折計データは、理学四軸型自動回折計C-5 (コリメーター1.0mm ϕ , ω -Scan, Scan Speed 5°/min, Scan Range (0.7+0.15tan θ)°, バックグラウンド3秒) および理学回転対陰極X線発生装置RU-200 (40KV 200mA, Focus Size on Cu Anode=0.5 $\times$ 10mm) にて収集。IPとフィルムデータは、露出時間以外すべて同一結晶, 同一条件で収集。図中に示したR値はデータの一致度を示す。データの一致度は,

$$R = \frac{\sum_{h=1}^2 |k_1 I(h)_1 - I(h)|}{\sum_{h=1}^2 k_1 I(h)_1} \quad (I(h) \text{ は } k_1 I(h)_1 \text{ と } k_2 I(h)_2 \text{ の平均値})$$

で定義した。

ムを使用し結晶のc軸をスピンドル軸に合わせて振動写真を撮影したところ、通常のコリメーター(0.3mm ϕ)を通しただけのX線では反射点列が c^* 方向に大きく重なっていたので、互いに垂直な二種

類の全反射ミラーで入射X線を集光させて θ' 振動写真を撮影した。こうして得られた回折写真から連続する三斑点を選び、反射のプロファイルを描いた(第4図)。コリメーター径が0.3mm ϕ と

第3図

SN比の評価. (a) IPを使った場合. (b) X線フィルムを使った場合. SN比は、卵白リヂチーム結晶の (4 19 0), (21 4 0), (23 5 0), (25 6 0), (27 7 0) の各反射について評価した. 測定条件は、第1図, 第2図の説明を参照.

0.1mm ϕ の二種類の場合について測定したが、X線フィルムでは両コリメーターともに反射点列を完全に分離することができたが、IPでは、0.1mm ϕ のコリメーターを用いても完全に分離することはできなかった。IPで測定したプロファイルの半値幅は、X線フィルムに比べて、0.1mm ϕ コリメーターで約20%, 0.3mm ϕ コリメーターで約30%, 広くなる傾向が認められる。蛍光をPMTで検出する際、蛍光の 2π 空間への分散がIPの位置分解能の低下につながると考えられる。

蛍光の分散を抑えるには種々の方法が考えられるが、蛍光の分散を完全になくすことはできないので、X線光学系を工夫してプロファイルの広が

りをできるだけ抑える必要がある。少なくとも、格子長が200 Å程度の生体高分子結晶までは、実験室系の装置で測定できたいものである。

4. おわりに

以上、実験室系の装置を使って回折強度データを収集することを念頭においてIPの特性を評価してきた。この実験を通してIPの二次元検出器としての有効性が再確認されたが、解決すべき問題点も残されているようである。今回は、読取り位置の精度については評価しなかったが、X線強度の面から結晶-I P間距離に制限のある実験室系の装置の場合、回折スポットが密になるとおの

第4図

位置分解能の評価。(a) X線フィルムで測定されたプロファイル; 上段 0.1 mm ϕ コリメーター使用, 下段 0.3 mm ϕ 使用。(b) IP で測定されたプロファイル; 上段 0.1 mm ϕ コリメーター使用, 下段 0.3 mm ϕ コリメーター使用。カメラ: ENRAF-NONIUS 社製振動カメラ (結晶-フィルム (IP) 間距離 70 mm), X線発生装置: 理学回転対陰極型 RU-200 (40 KV 100 mA, Focus Size on Cu Anode = 0.3 $\times$ 3 mm)。単色化: 15 μ m Ni 箔。使用した結晶は, グルタチオン合成酵素である。 c 軸をカメラのスピンズ軸に合わせ, 2 枚の互いに垂直なミラーで入射 X 線を全反射集光させて結晶に照射した。単色化は, 15 μ m Ni 箔と全反射ミラーで行なった。

ずと読取り位置の精度が問題になる。回折スポットの分離などと合わせてX線光学系の面での改良が問題解決への最も近道となろう。幸いなことに、X線小角散乱の分野で集光性のすぐれた光学系が開発され実験室レベルで使用されているので応用したい¹⁰⁾。時分割測定¹¹⁾は不可能であるが、静的な測定は実験室系のX線回折装置を使ってできるようにしたい。

最後に、本研究に進めるにあたり有益な助言をいただきました大阪大学蛋白質研究所勝部幸輝教授、富士写真フイルム㈱宮原諄二氏、また、測定にご協力いただきました研究室の職員ならびに学生諸君に心より感謝いたします。また、富士フイルム㈱山根啓久氏、林克巳氏には、IPの読取りにご協力いただきました。合わせて感謝いたします。

文 献

- 1) 宮原諄二：計測と制御 **26**, 657 (1987)。
- 2) N. Sakabe : J. Appl. Cryst. **16**, 542 (1983)。
- 3) N. Watanabe, K. Sakabe, N. Sakabe, T. Higashi, K. Sasaki, S. Aibara, Y. Morita, K. Yonaha, S. Toyama, H. Fukutani : J. Biochem. **105**, 1 (1989)。
- 4) U. W. Arndt, A. J. Wonacott : *The Rotational Method in Crystallography*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1977)。
- 5) 雨宮慶幸, 神谷信夫, 宮原諄二：応用物理 **55**, 957 (1986)。
- 6) 神谷信夫, 雨宮慶幸, 宮原諄二：日本結晶学会誌 **28**, 350 (1986)。
- 7) H. Kato, H. Yamaguchi, Y. Hata, T. Nishio-ka, Y. Katsube, J. Oda : J. Mol. Biol. **209**, 503 (1989)。
- 8) 三井幸雄, 伊藤晋, 飯高洋一：日本結晶学会講演要旨集 11-B2, 長岡 (1987)。
- 9) A. Franks : Proc. Phys. Soc. Lond. **B68**, 1054 (1955)。
- 10) 土井健治, 若林克三, 植木龍夫, 三井利夫：X線回折(高良和武編集) pp. 381-426. 共立出版, 東京 (1988)。
- 11) J. Hajdu, P. A. Machin, J. W. Campbell, T. J. Greenhough, I. J. Clifton, S. Zurek, S. Gover, L. N. Johnson, M. Elder : Nature **329**, 178 (1987)。