トリクロマティック多波長異常分散法および データ収集の自動化に関する開発研究

理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター研究技術開発室,
(兼) 高輝度光科学研究センター利用研究促進部門 山本雅貴

Masaki YAMAMOTO: Development of Trichromatic Protein Crystallography and High-Throughput Beamlines at SPring-8

At the SPring-8, we have developed and improved protein crystallography beamlines to achieve the data collection for High-Throughput Protein Crystallography. RIKEN Structural Biology Beamline I (BL45XU) is the first brunched Undulator beamline. The PX-station of BL45XU introduced the Trichromatic concept that optimizes for the multi-wavelength anomalous diffraction (MAD) method with three-colored and coaxial synchrotron X-ray beams. The concept enables rapid and flexible switching of three defined wavelengths and can be collected MAD data taking into account systematic errors such as radiation damage. RIKEN Structural Genomics Beamlines (BL26B1 and BL26B2) have implemented the automatic operation for rapid data collection of a vast amount of protein crystals to contribute to the structural genomics research. The automation has been achieved by developing the centralized control software BSS. The nonstop data collections for multiple samples have been achieved by developing the new-concept sample changer SPACE. The automatic operation has been satisfactorily performed, for more than two years since 2003.

1. はじめに

タンパク質は20種類のアミノ酸が直鎖状に並んだ高分子鎖であり、遺伝子情報をもとに作り出される生命現象の基本単位である。そして、その機能を発現するため複雑な、しかし合理的な三次元立体構造をもつ。構造生物学はタンパク質などの生体高分子について、その立体構造と機能の関係を解明することにより生命現象を明らかにしようとする分野である。このため、構造生物学において生体高分子の原子レベルでの立体構造決定は重要な役割を占めている。また、21世紀に入り人間の設計図であるヒトゲノムの全DNA配列の解読完了をうけたポストゲノム研究として、広範囲にわたるタンパク質の立体構造情報の蓄積をめざす構造ゲノムプロジェクトが世界各国で進められている。¹⁾ 日本でも「タンパク 3000 プロジェクト」がスタートし、²⁾ 多くのタンパク質についてその立体構造と働きを解明しようとしている。

タンパク質のX線結晶構造解析は生体高分子の原子レベル立体構造を明らかにすることができる。現在、実験室のX線発生装置に比べて数桁X線強度および輝度が高く波長可変の放射光 (Synchrotron Radiation) がタンパク質結晶構造解析にも利用され、その解析手法にも飛躍的な進歩をもたらしている。³⁾ 放射光の特徴である波長可変性に

より、金属など異常散乱原子を含んだサンプル結晶からの異常散乱の波長依存性を位相決定に利用した多波長異常分散法 (Multi-wavelength Anomalous Diffraction method, MAD 法) が開発され、構造決定において最大の難関であった位相決定の簡便化を実現した。⁴⁾ また、放射光とりわけ第3世代放射光施設であるSPring-8 ビームラインの高輝度放射光は、今まで強度不足で構造解析できなかった50 μm 程度までの微小サイズ結晶からの構造決定を可能にした。

タンパク質結晶構造解析において放射光ビームラインに期待されているのは、従来解析が困難だった対象サンプルの解析可能範囲拡大と構造決定の簡便化・迅速化である。われわれは、SPring-8の構造生物学研究用ビームラインの高度化を目標にビームライン利用技術の開発研究を行ってきた。本稿では理研構造生物学ビームラインI (BL45XU) でのMAD法を利用した位相決定簡便化に向けた試みと理研構造ゲノムビームラインでのビームラインデータ収集の自動化に向けた技術開発を紹介する。

2. 迅速構造決定に向けて

結晶構造解析は、三次元に周期的に並んだ結晶からの回折現象を利用して分子構造を決定する。回折線の振幅は原子散乱因子 f を使って表される。

$$F(hkl) = \sum_j f_j T_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (1)$$

構造因子を表す式(1)は、電子密度のフーリエ変換と同じであり、単位格子内の電子密度分布は構造因子の逆フーリエ変換式(2)として表される。

$$\rho(x, y, z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (2)$$

しかし、X線回折実験から得られる反射強度 $I(hkl)$ は、構造因子の絶対値の2乗 $|F(hkl)|^2$ に対応しており位相の情報は得られない。したがって、全回折強度を測定しても直接電子密度分布は計算できない。構造が複雑で計算による直接位相決定が不可能なタンパク質結晶構造解析の場合、 $F(hkl)$ の失われた位相をいかに実験的に求めるかが最大の課題である。

通常タンパク質の新規構造解析は重原子同型置換法(IR法; Isomorphous Replacement method)が利用されていた。タンパク質結晶を重原子溶液に浸潤(soaking)すると、その重原子がタンパク質の特定位置に結合することがある。重原子同型置換結晶はこの浸潤法により調製される。

ネーティブ結晶の構造因子を F_P 、重原子同型置換結晶の構造因子を F_{PH} 、 F_{PH} への重原子の寄与を F_H とすると

$$F_{PH} = F_P + F_H \quad (3)$$

これまで多くの試行錯誤により、重原子の F_H 導入によりタンパク質由来の F_P の変化しない同型置換結晶を調製してきた。複数の重原子同型置換結晶により式(3)の連立方程式の解として F_P を求める方法が、多重同型置換法(MIR法: Multiple Isomorphous Replacement method)であり、複数の同型置換結晶作成が位相決定の迅速化を阻んでいた。MAD法は異常散乱原子を含む唯一の結晶から、複数波長の回折強度により位相を決定する。このため、MIR法での結晶同型性問題を解決する効率的な位相決定法である。

2.1 多波長異常分散(MAD)法

MAD法は、異常散乱原子に見られるX線散乱強度の波長依存性(異常分散効果)を利用して、その波長依存性の極大が生じる吸収端近傍を含む複数波長での回折強度データ間での回折強度変化から立体構造を決定する方法である。²⁾⁻⁵⁾

異常分散効果は、固有振動をもつ特定の軌道電子が入射X線によって誘起される振動の共鳴現象であるが、入射X線の波長変化に伴ってその回折強度と位相を変化させる。波長 λ のX線での原子散乱因子 f_λ は

$$f_\lambda = f_0 + f'_\lambda + if''_\lambda \quad (4)$$

のように非異常分散項 f_0 と異常分散項の f'_λ と f''_λ からなる。異常分散項の実数項 f'_λ と虚数項 f''_λ の値は小さいが、波長への依存性を示す。タンパク質結晶の回折実験に使

われる 1.0 Å 前後の波長領域では、生体高分子の主要原子である炭素、窒素、酸素などの異常分散項はきわめて小さく、鉄・銅・亜鉛・水銀・白金などでは、その吸収端近傍で異常分散効果が大きなものとなる。そこで、複数波長での異常分散の利用が位相決定に利用できることが示され、その位相決定原理は Karle⁶⁾ によって定式化された。1種類の異常散乱子を含む結晶について、波長 λ における反射 h とその Friedel 対 $-h$ に対する構造振幅 $|F_\lambda(\pm h)|$ は、次式で与えられる。

$$|F_\lambda(\pm h)|^2 = |F_N|^2 + a(\lambda)|F_A|^2 + b(\lambda)|F_N||F_A|\cos(\alpha_N - \alpha_A) \pm c(\lambda)|F_N||F_A|\sin(\alpha_N - \alpha_A) \quad (5)$$

$|F_A|$ と α_A は異常散乱原子の構造振幅と位相、 $|F_N|$ と α_N はそれ以外の構造振幅と位相で、通常散乱因子 f_0 、異常散乱の実数項 f'_λ 、虚数項 f''_λ より次式が与えられる。

$$a(\lambda) = (f_\lambda'^2 + f_\lambda''^2) / f_0^2 \quad (6a)$$

$$b(\lambda) = 2f'_\lambda / f_0 \quad (6b)$$

$$c(\lambda) = 2f''_\lambda / f_0 \quad (6c)$$

式(5)から、2波長以上での回折強度測定を行い、式(6)の異常分散項 $a(\lambda)$ 、 $b(\lambda)$ 、 $c(\lambda)$ が与えられれば、異常散乱原子の構造振幅 $|F_A|$ 、それ以外の構造振幅 $|F_N|$ 、とそれらの位相角の差 $(\alpha_N - \alpha_A)$ の3変数が求められる。そうして得られた $|F_A|$ から異常散乱因子の部分構造を求めて位相角 α_A を計算すれば、最終目標である分子全体の位相角 α_N を求めることができる。

しかし、タンパク質への応用はただちには行われなかった。タンパク質のような巨大分子結晶の異常分散による回折強度変化は、核種によるが数%程度と微弱でその信号を正確に抽出して計算を進める必要がある。このため、MAD法は波長の最適化が可能な放射光施設により、初めて実現可能になった。Hendricksonらは1985年にLamprey Hemoglobinの鉄原子の異常分散効果を使って、位相決定に成功した。⁶⁾ その後、第3世代放射光施設の利用、タンパク質発現精製技術の展開、計算機の高速化とソフトウェアの充実などがあいまって、現在に至っている。

2.2 理研構造生物学ビームラインI (BL45XU)

理研構造生物学ビームラインI (BL45XU) は、図1にビームラインの概念図¹⁰⁾を示したが、2台の垂直偏光アンジュレータ(垂直タンデムアンジュレータ)と合成ダイヤモンドを利用した分光器をビームスプリッターとして利用することにより、生体高分子の結晶構造解析(BL45XU-PX)と溶液散乱(BL45XU-SAXS)での同時実験が可能なSPring-8初の挿入光源分岐ビームラインである。

SPring-8のような第3世代放射光施設のアンジュレータビームラインでは、高輝度放射光によるタンパク質結晶

図1 理研構造生物ビームラインI (BL45XU) の概念図. (RIKEN Structural Biology Beamline I (BL45XU).)

の放射線損傷は重大な問題である。なかでも、タンパク質や結晶中の溶液が放射線と相互作用して発生するフリーラジカルからの化学的損傷は放射光をプローブとして構造解析を進める限り避けることができない。このフリーラジカルは結晶中に広がり、さらなる化学変化によって分子自身の構造変化⁸⁾や結晶格子を作る分子間の相互作用を破壊する。回折データ測定では、放射線損傷によりデータ精度が低下する。また、放射線損傷によるタンパク質の構造変化や結晶格子の変化は、結晶の同型性をも失わせ回折データに重篤な系統誤差をもたらす。これは多くの場合、位相決定の障害となる。

MAD法において f'' を精度良く収集する目的で Inverse Beam Geometry Setting が提案されているが、放射線損傷の影響を受けやすい f' の高精度化法は提唱されていなかった。そこで、われわれは3つの波長を迅速に切り替えられるダイヤモンドトリクロメータ (3波長同時分光器) を開発して放射線損傷などの系統誤差を低減するトリクロマティックコンセプトを考案してBL45XU-PXに採用した。⁹⁾

2.3 トリクロマティックコンセプトとは

MAD法に最適化した実験ステーションで重要な点は、位相決定の決め手となる同一波長内および多波長間での微小な異常分散効果をいかに正確に測定するかである。

一般的なMAD実験では、偏向電磁石のような白色光源から分光器により、1波長ごとの回折データセット収集を行い、データセットごとに波長を切り替えてMADデータを集めていた。この方法では、波長の切り替えに伴う波長やX線強度の再現性・安定性などが回折強度データに影響を与えていた。そのうえ波長切り替えのデッドタイムが多く、1つの結晶で全波長 (3波長以上) の回折強度測定を行う場合、放射線損傷の影響がデータの質を悪化させていた。また、第3世代の放射光施設における最大の特色の1つであるアンジュレータは指向性の高い良質なX線を作り出す光源であるが、これを利用したビームラインにおいてはアンジュレータの迅速制御による波長切り

図2 トリクロマティックコンセプトの原理. (Trichromatic concept.)

替えという工夫が必要となる。

われわれは、従来の方法での測定誤差低減を目標に、同時に異なる3波長を用いた回折強度測定を可能にするトリクロマティックコンセプトを考案した。BL45XU-PXでは、従来のビームライン主要構成要素を見直し、光源には2つの基本波をもつ垂直タンデムアンジュレータ¹¹⁾、分光器にはトリクロメータと名付けた合成ダイヤモンド¹⁰⁾を用いた透過型の3波長分光器、また実験ステーションには高速二次元検出器を開発して、それらを協調的に組み合わせることによりMAD法での回折強度測定に最適化した。トリクロマティックコンセプトの概略は図2に示すよう

図3 トリクロメータ. (Trichromator.) a) 軸構成概念図, 3組の計算結合型2結晶分光器で構成され, 全ペアーの第1結晶は同一の並進軸を共有している. b) トリクロメータの真空槽内部の写真

に, タンデムアンジュレータからの異なる2波長のアンジュレータ基本波から, トリクロメータにより, 吸収端近傍の2波長と対照点としての1波長の合計3波長を同時に分光する. これを, 図3の示した構成のトリクロメータ内のビームチョッパーにより時系列に従って3波長を順次切り替えて, 各波長で回折強度測定を行う. トリクロメータは, 分光結晶に(100)表面の合成ダイヤモンドを使用し, ブラッグ配置による400反射を使用する. エネルギー範囲は7.5 ~ 14.0 keV (0.89 ~ 1.65 Å) で, この範囲内に吸収端をもつ異常散乱原子についてMAD法を適用できる. これにより, アンジュレータや分光器などのセッティングをまったく変更することなくビームチョッパーの切り替えだけで, ほぼ同じ条件下での3波長の回折強度測定が1つの結晶からできるようになり, MADデータ収集時の系統誤差を最小化することが可能である.

BL45XU-PXでは, 平成9年夏の試験調整運転以降, 光学系の安定動作やデータ収集系の整備などを進めてきた. 試料位置での光強度は 10^{11} 光子/秒程度, そして, $\Delta E/E = 3 \times 10^{-5}$ という異常分散効果利用に重要な高いエネルギー分解能を誇っている. また, 集光光学系により焦点サイズ200ミクロン以下を実現している. これまで解析が困難だった情報受容体として重要な7回膜貫通型のG

図4 異なるデータ収集法によるフレーム温度因子の変化. (Frame temperature factor dependency of different MAD data collections.) Cho11, Cho12, Cho13は迅速波長切り替え, Cho21, Cho22, Cho23は従来法によるRemote, Peak, Edgeのデータに対応する.

タンパク共役受容体¹²⁾や鞭毛のモータータンパク質¹³⁾などで位相決定に成功している.

2.4 トリクロマティックコンセプトの効果

MAD法では, 振動範囲と測定波長の時系列での組み合わせが, 結晶の放射線損傷などを含んだデータ精度を左右して最終的な位相決定にも影響を与える. トリクロマティックコンセプトの実際の効用¹⁴⁾について, 波長固定で振動角を変えながら各波長データを収集する従来の方法と, 同一振動角で波長を変更しながら全データをとり進める方法 (Trichromatic mode; 以下, 迅速波長切り替え法) で, そのデータの統計を求め, 位相計算を行った. 試料として, 六角柱状結晶が得られるセレノメチオニル化Chitosanase (ChoA)¹⁵⁾を用いた. これは最高で1.7 Åの反射を与え, 比較的放射線損傷を受けにくい良好な結晶である. また, 結晶形状が棒状のため結晶の異なる位置にX線を当てることができるため, 比較実験に都合が良い. 図4に示すように, 回折イメージごとの温度因子は, 経時変化は従来法のほうが若干高いものの, トータルではさほど変わらない. しかし, 新しい手法では等価なイメージ間で温度因子が一致しているのに対し, 従来法では, その差がある値をもっている. この結果, 新しい手法では, 波長間の一致度である R_{iso} ($=7.8\% \rightarrow 4.8\%$) がよい値を示した. 一方で, f'' については特段考慮していないため, Friedel対間の一致度を示す R_{ano} ($=7.6\% \rightarrow 8.4\%$) はかえって悪化している.

そこで, 最終的に得られた位相を比較すると, 精密化したモデルから得られる位相との差 $|\Delta\phi|$ では, 全体で3度強, 低分解能では最大で7度程度, モデルに近いことが示された. その結果, 電子密度図においても有意な差が出ている (図5). このことより, 波長の再現性・高速性を

図5 異なるデータ収集法による電子密度の違い。(Comparison of electron density maps.) a) 迅速波長切り替え法データから計算した電子密度図. b) 従来法データから計算した電子密度図. 前者では、チロシン側鎖の六員環の穴が開いて見えている。

確保したうえで、放射線損傷を考慮した適当な回転範囲ごとに波長を変えながらMAD実験を行うことで、よい解析結果が得られるものと理解できる。

3. ビームラインデータ収集の自動化

タンパク質結晶構造解析では構造ゲノム研究の拡大に伴い、膨大なサンプルの迅速構造決定が求められている。膨大なサンプルの迅速構造決定にはMAD法を最大の武器とした放射光利用が不可欠であり、放射光ビームラインでの測定自動化が重要¹⁶⁾である。

理研構造ゲノムビームライン (BL26B1&B2) では、タンパク 3000 プロジェクトをはじめとした構造ゲノム研究をターゲットとした迅速構造決定を目標に、サンプルチェンジャーとビームラインの一括制御システムの研究開発を行い、ビームラインの自動運転を実現している。

3.1 理研構造ゲノムビームライン

SPring-8の理研構造ゲノムビームライン I&II (BL26B1 & BL26B2) ではビームライン実験を迅速化するため、回折計には大量のタンパク質結晶を自動交換するサンプルチェンジャーロボット、SPACE (SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger) を開発し人手による試料交換を不要とした (図6)。¹⁷⁾ 利用者は専用サンプルトレイに凍結結晶をセットして (最大52個/トレイ) ビームラインへもち込む。測定時はSPACEが個々の結晶を回折計に正確にマウント & アンマウントする。これにより、回折強度測定時に実験者が実験ハッチに立ち入ることなく、また直接サンプルに触れることなく凍結結晶の交換が可能となった。さらに、コンピュータネットワークを介してビームラインの全機器を集中管理するソフトウェアBSS (Beamline Scheduling Software) の開発により、X線の波長変更など結晶ごとに異なる実験条件設定から回折データ収集に至るまで一連の作業を自動実行できる環境を作

図6 理研構造ゲノムビームラインII (BL26B2) 実験ステーションの全自動回折計。(Experimental station of RIKEN Structural Genomics Beamline (BL26B2).)

り上げた。¹⁸⁾ このBSSはデータベースと連携しており、SPACEの試料交換機能と併せて、複数試料の自動連続回折強度測定を行うことができる。

この自動化システムを利用したビームライン運用は、2モード運転と名付けた方法を採用した。2モード運転では前半のモードで、もち込まれたすべての試料に対するスクリーニング実験を行う。全試料の中から、構造解析可能な良質な結晶を選択して、残りのビームタイムの効率的利用を考慮した回折データ収集のスケジュールを立てるためである。後半のデータ収集モードでは、上記のサンプルチェンジャーやサンプル管理システムを活用することにより、実験者の介入をいっさい必要とせず、事前に登録したスケジュールに従って連続実験を行うことができる。先にすべての試料をスクリーニングすることにより、必ず最良の結晶を使用した回折データが取得でき、またそれ以外の試料のためにデータ収集の時間を費やす必要もなくなる。このように理研構造ゲノムビームライン自動化の技術開発は、従来人手で行ってきた作業の単なる自動化ではなく、限られたビームタイムを最大限に利用できる迅速実験手法の実現を目指したものである。

3.2 サンプルチェンジャー SPACE

回折計のサンプル交換を自動化するサンプルチェンジャーSPACEでは、試料取り付け位置の再現性を保証するために図7aに示したサンプルピンを新規に開発した。サンプルピンはその両サイドに右ネジと左ネジを配した全長25 mm、直径7 mmのコンパクトなデザインで、材質はプラスチック (poly oxy methylene) である。サンプルピンの左ネジ側、右ネジ側をそれぞれサンプルチェンジャーSPACE、ゴニオメータヘッドに固定する。左右逆ネジの構造によりサンプルピンを一方方向に回転させることによってゴニオメータへの付け外しができる。左ネジ側の先端に結晶試料を凍結するクライオループを装着する。SPACE

図7 サンプルチェンジャー SPACE 専用サンプルピン. (Sample Pin for SPACE.) a) サンプルピン. プラスチック製でサンプル側は右ねじ, ゴニオメータ側は左ねじをもつ. b) 専用サンプルトレイ. サイズは $75 \times 75 \times 50 \text{ mm}^3$ で 52 個の専用サンプルピンを収納できる.

によるマウント動作中は左ネジ側が試料ごとホルダーのネジ穴に密封され, 試料は温度上昇および大気中の湿気から保護される. サンプルピンのネジは ISO 規格 (M4) に基づいて設計している. 規格上のネジのあそびは $10 \text{ }\mu\text{m}$ であり, 繰り返しマウントを行った際の取り付け位置再現性も同範囲内に抑えられる.

サンプルトレイは面積 $75 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}$ および高さ 50 mm のアルミニウム製ブロックで, サンプルピンを収納するためのネジ穴を 52 個配したデザインとなっている (図 7b). 市販のドライシッパーにて運搬や長期保管が可能である. サンプルトレイはトレイごとにトレイ ID のバーコードを貼りサンプル管理システムのデータベースにより管理している. 各々の結晶の管理は, このトレイ ID とトレイ内の穴番号によって行う.

SPACE 本体はサンプルピン付け外しのための 3 軸ロボットアームと試料ストレージ用の XY ステージで構成されている (図 8). ロボットアームの先端はサンプルピンを固定するために左ネジタップを切った試料ホルダーロードである. 試料ストレージ内部は自動供給システムにより液体窒素レベルを管理した液体窒素デューワーになっており, サンプルトレイを 2 個まで設置できる. ストレージを XY ステージで駆動することによりサンプルトレイ内の任意の位置から結晶試料を拾い上げる. また実験室にて結

図8 サンプルチェンジャー SPACE. (Sample changer SPACE.) a) 軸構成概念図. b) 全自動回折計に組み込んだ状態のサンプルチェンジャー SPACE.

図9 サンプルチェンジャー SPACE 用サンプルトレイハンドリングツール. (Sample tray handling tools.)

晶試料を凍結しサンプルトレイへ充填する作業を効率化するために, 実験室用 SPACE システムや専用 tong など, 実験室からビームラインへ試料を輸送するためのツール類もあわせて開発した (図 9).

大量の試料情報はビームラインと実験室をネットワークで結ぶサンプル管理システムにより管理している. 実験室とビームラインは Web ブラウザで閲覧できる試料データベースとネットワークを介して結ばれ, 試料情報の登録, 取得がそれぞれの場所から可能となっている. 実験室での結晶凍結・トレイへの充填作業時にオンライン化さ

れた制御ソフトウェアとデータベースの連動により、対応するトレイ ID と穴番号の情報が随時登録されていく。トレイに対するビームラインでの実験スケジュール、すなわち充填された複数試料の一連の実験条件は、実験者が Web ブラウザを介して直接データベースに登録し、ビームタイム開始まで自由に編集することができる。実験室で登録した試料情報および実験スケジュールはビームラインにおいてトレイ ID を元にデータベースより取り出され、スケジュールに基づいて回折データ収集が行われる。測定データはネットワークを介して再びデータベースに登録され、実験者は任意の場所からダウンロードすることができる。

3.3 今までの運転状況

理研構造ゲノムビームラインは建設、立ち上げ調整を経て 2002 年 10 月より BL26B1 にて通常のユーザ運転を開始した。BSS による機器の一元管理により、実験者は試料交換を行った後の結晶センタリング、実験条件の入力など一連の作業を 1 つの端末から行うことができるようになった。BL26B2 ではその後サンプルチェンジャー SPACE を使用した自動運転のコミッショニングを行い、1 年後の 2003 年 10 月より 2 モード運転による自動測定を開始した。連日、平均 20 個以上の試料がビームラインにもち込まれ、実験者によるスクリーニングおよび自動データ収集が行われている。ビームラインにおける結晶スクリーニングの作業時間は試料 1 個当たり 10 分以内で、最大 52 個の試料がトレイに詰められた場合でも夕方までにスクリーニングを終了することができる。また夜間の自動運転時にはデータベースに登録された結晶位置より自動的にセンタリングが行われ、人手を介することなく回折データ収集を行っている。

これまで自動運転で測定した回折データにより、数々のタンパク質構造が新規に決定され報告されている。^{19),20)} これらはすべて BL26B2 において測定した MAD データにより構造解析されたものである。²¹⁾ また 2004 年度の終りから SPring-8 サイト内ではビームラインでの試料交換や実験室でのトレイ充填用のみでなく、X 線発生装置との組み合わせで結晶スクリーニングを行うラボ用 SPACE システムも稼動し始めた。これによりビームラインにもち込まれる試料を事前に評価し、ビームラインでのスクリーニングをさらに効率良くできるようになった。自動データ収集は夜間のみに限らず、例えば 3 日間ビームタイムを取得し初日をスクリーニングにあて、残り 2 日で連続データ収集を行うことも可能であり、またいったんトレイを回収して試料を別トレイに詰め替え、週末にまとめて無人データ収集を実行するなど、柔軟な運用を続けている。

また 2005 年 7 月よりサンプル管理システムのデータベースをサイト外のユーザに公開した。これを利用して外部からドライシッパーで送付したトレイを受付け、ビームラインでの作業をオペレータが代行するメールイン・デー

タ収集の試験運用を開始し、現在まで順調に成果を上げている。

4. おわりに

放射光施設のタンパク質結晶構造解析用ビームラインでは、MAD 法の一般化により構造決定が簡便になり、また理研構造ゲノムビームラインでのサンプルチェンジャー SPACE などの導入によりビームライン運転自動化が促進されつつある。このようなビームラインの技術開発によって、さらに放射光利用者の負担を軽減して、ビームラインの運用効率の向上とタンパク質結晶構造解析の一般化が期待される。

また、一方 SPring-8 のタンパク質結晶構造解析用ビームラインでは、アンジュレータビームラインを中心として、第 3 世代放射光の高輝度放射光を活かした微小結晶や超格子結晶にも解析対象の拡大を目指したビームラインの技術開発も進められている。タンパク質結晶構造解析における、これら放射光ビームラインの高度化は、今まで不可能であった難解サンプルの解析可能性の助けとなるものであり、タンパク質結晶構造解析の一層の拡大と発展が期待される。しかしながら、高輝度放射光の性能を最大限活用するには、原理的に避けられない放射線損傷をいかにコントロールしながら実験を進めていくかが重要である。

謝 辞

本稿に記述した BL45XU の建設、調整および初期の運転は理研の熊坂 崇氏（現東工大）、JASRI の森山英明氏（現ネブラスカ大）、阪大の山下栄樹氏の協力により実現したものです。また、理研構造ゲノムビームラインの建設、調整および運転は理研の上野 剛氏、二澤宏司氏、井田孝氏（現北里大）、神田浩幸氏（現リガク）、スプリングエイトサービスの福本祐史氏、村上博則氏、藤尾美紀氏の協力により進められました。また、多くのビームラインコンポーネントについては JASRI の後藤俊治氏をはじめ JASRI ビームライン技術部門の皆様にご協力いただきました。ビームライン全般では理研の石川哲也主任研究員および元 JASRI 利用促進部門 II の植木龍夫部門長の指導のもと研究を進めてきました。ここに述べた方々をはじめ SPring-8 のスタッフ、共同研究者の皆様およびビームラインユーザーの皆様へ深く感謝いたします。

ここに述べた理研構造ゲノムビームライン開発の一部は文部科学省「タンパク 3000 プロジェクト網羅的解析プログラム」から、支援を受けて実施したものである。

文 献

- 1) R. F. Service: *Science* **298**, 948 (2002).
- 2) S. Yokoyama, *et al.* and S. Kuramitsu: *Nat. Struct. Biol.* **7**, 943 (2000).
- 3) J. R. Helliwell: *Macromolecular Crystallography with Synchrotron*

- Radiation, Cambridge University Press, Cambridge (1992).
- 4) W. A. Hendrickson and C. M. Ogata: *Methods in Enzymology* (Sweet, R. M. and Carter, Jr., C. W. eds.) **276**, 494, Academic Press Inc., New York (1997).
 - 5) J. Karle: *Int. J. Quant. Chem.* **7**, 357 (1980).
 - 6) W. A. Hendrickson, J. L. Smith, R. P. Phizackerley and E. A. Merritt: *Proteins* **4**, 77 (1988).
 - 7) C. Nave: *Rad. Phys. Chem.* **45**, 483 (1995).
 - 8) W. P. Burmeister: *Acta Cryst.* **D56**, 328 (2000).
 - 9) M. Yamamoto, *et al.* and T. Ueki: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1833 (1995).
 - 10) M. Yamamoto, T. Kumasaka, T. Fujisawa and T. Ueki: *J. Synchrotron Rad.* **5**, 222 (1998).
 - 11) T. Tanaka, X. Marechal, T. Hara, T. Tanabe and H. Kitamura: *J. Synchrotron Rad.* **5**, 414 (1998).
 - 12) K. Palczewski, *et al.* and M. Miyano: *Science* **289**, 739 (2000).
 - 13) F. A. Samatey, *et al.* and K. Namba: *Nature* **410**, 331 (2001).
 - 14) T. Kumasaka, M. Yamamoto, E. Yamashita, H. Moriyama and T. Ueki: *STRUCTURE* **10**, 1205 (2002).
 - 15) J. K. Park, K. Shimono, N. Ochiai, K. Shigeru, M. Kurita, Y. Ohta, K. Tanaka, H. Matsuda and M. Kawamukai: *J. Bacteriol.* **181**, 6642 (1999).
 - 16) E. Abola, P. Kuhn, T. Ernest. and R. C. Stevens: *Nat. Struct. Biol.* **7**, 973 (2000).
 - 17) G. Ueno, R. Hirose, K. Ida, T. Kumasaka and M. Yamamoto: *J. Appl. Cryst.* **37**, 867 (2004).
 - 18) G. Ueno, H. Kanda, T. Kumasaka and M. Yamamoto: *J. Synchrotron Rad.* **12**, 380 (2005).
 - 19) S. Yoshida, *et al.*, S. Kuramitsu and R. Masui: *J. Biol. Chem.* **279**, 37163 (2004).
 - 20) K. Murayama, *et al.* and S. Yokoyama: *Acta Cryst.* **F61**, 26 (2005).
 - 21) A. Ebihara: Private communication (2005). Project information; Structural-Biological Whole Cell Project by RIKEN Structural Research Group, <http://www.thermus.org>.

プロフィール

山本雅貴 Masaki YAMAMOTO

理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター研究技術開発室、高輝度光科学研究センター利用研究促進部門

Division of Synchrotron Radiation Instrumentation, RIKEN SPring-8 Center, RIKEN Harima Institute 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 679-5148, Japan

e-mail: yamamoto@postman.riken.go.jp

最終学歴：1991 年大阪大学大学院理学研究科博士課程後期終了

専門分野：放射光構造生物学

現在の研究テーマ：放射光ビームラインを利用した極限結晶構造解析法の開発