フォトンファクトリー構造生物ビームラインにおける自動化に向けた取り組み

高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設構造生物学研究センター
五十嵐教之, 平木雅彦, 松垣直宏, 山田悠介, 若槻壮市

Noriyuki IGARASHI, Masahiko HIRAKI, Naohiro MATSUGAKI, Yusuke YAMADA and Soichi WAKATSUKI: Automation in Structural Biology Beamlines of the Photon Factory

The Photon Factory currently operates four synchrotron beamlines for protein crystallography and two more beamlines are scheduled to be constructed in the next years. Over the last years these beamlines have been upgraded and equipped with a fully automated beamline control system based on a robotic sample changer. The current system allows for remote operation, controlled from the user's area, of sample mounting, centering and data collection of pre-frozen crystals mounted in Hampton-type cryo-loops on goniometer head. New intuitive graphical user interfaces have been developed so as to control the complete beamline operation. Furthermore, algorithms for automatic sample centering based on pattern matching and X-ray beam scanning are being developed and combined with newly developed diffraction evaluation programs in order to complete entire automation of the data collection.

1. はじめに

高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設（フォトンファクトリー）では現在 PF, PF-AR と 2 つの放射光専用リングを運転している。PF リングは 1982 年に運転を開始した、世界的に見てもパイオニア的存在の放射光リングであるが、二度にわたる高輝度化改造および 2005 年の直線部増強化改造を経て、今でも最新の研究に対応した高性能な光を供給している。また、PF-AR リングは、当初ブースターリングとして使用されてきたが、1987 年から放射光利用が開始され、日本の挿入光源 X 線ビームラインの走りとなった。その後 21 世紀に入り、放射光専用的高エネルギー放射光リングとして生まれ変わった。フォトンファクトリーの構造生物学研究センターでは、現在これら 2 種類の放射光リングに 4 本の構造生物学研究用のビームラインを運用しているが、それだけでなく構造生物学研究全体にわたり、タンパク質発現から構造解析まで各プロセスの研究技術の高度化を進めている。本稿では、その中でもビームラインの自動化に向けた開発について焦点を絞り解説していく。

近年、構造生物学研究において、生体高分子の原子レベルの立体構造の重要度が高まっており、数多くの生体分子の構造を簡便にかつ素早く決定するというニーズが非常に高くなっている。放射光 X 線結晶構造解析においては、ビームラインの高輝度化、検出器の読み出し速度の向上、

制御装置の高性能化などにより、より短時間でデータ測定を行うことができるようになってきている。一方、測定試料を実験装置にセットするためには放射線防御のための実験ハッチへの入退出動作が必要であり、上記のようなハイスルーブットビームラインにおいては、最も時間と手間のかかる作業となっている。そこでわれわれは、ビームラインの高速化・自動制御化とともに、スタンフォード放射光研究所 (SSRL) の協力の下、結晶試料を自動で交換するロボットの開発を行った。^{1),2)} 以下、回折実験の自動化を目指した、ビームラインの開発、試料交換ロボットの開発、そして制御システム開発、遠隔実験の実現について述べていく。

2. ビームライン

現在、構造生物学研究センターでは、ハイスルーブットビームライン BL-5A, AR-NW12A, 微小集光ビームライン BL-17A,³⁾ および従来光源ビームライン BL-6A と、異なる 3 種類のビームラインを全国共同利用実験に公開しており (表 1)、ユーザーはそれぞれの試料の特性に合わせて、ビームラインを使い分けることができる。各ビームラインの実験ハッチには、コリメーションスリットや高速シャッター、電動 XYZ ステージ付きの高精度ゴニオメータ、二次元検出器、試料交換ロボットが設置されている。測定試料はゴニオメータ上にセットされ、X 線位置への駆動は電動 XYZ ステージで遠隔操作される。ほかの駆動軸もす

表1 フォトンファクトリーにおける構造生物学研究用ビームライン。(Structural biology beamlines of the Photon Factory.) 現在4本のビームラインを運用中. 計画されている2本のうち, BL-1Aについては設計中.

	BL-5A	BL-6A	BL-17A	NW12A	NE3A
共同利用開始年	2004年	1987年	2006年	2003年	2009年
放射光リング名	PF			PF-AR	
光源	多極ウィグラー	偏向電磁石	ミニボール アンジュレータ	アンジュレータ	アンジュレータ
波長範囲 (Å)	0.7~1.9	0.9~1.3	0.95~1.33 1.6~2.2	0.7~1.9	—
エネルギー分解能 ($\Delta E/E$)	2.5×10^{-4}	1.0×10^{-3}	2.5×10^{-4}	2.5×10^{-4}	—
フラックス (光子数@1.0 Å)	1.0×10^{11}	1.0×10^{10}	6.6×10^9 (@1.0 Å), 1.3×10^{10} (@2.0 Å)	2.0×10^{11}	—
スリットサイズ (μm)	200	100	20	200	—
検出器名	Quantum315	Quantum 4R	Quantum270	Quantum210r	—
型	CCD	CCD	CCD	CCD	—
検出器の面積 (mm^2)	315×315	188×188	270×270	210×210	—
読み出し時間 (秒)	1	8	1.1	0.9	—
典型的な露光時間 (1度当たり, 秒)	5	30	5	3	—
典型的なデータ収集時間 (1度振動, 180度範囲)	20分	2時間	20分	14分	—

べて電動化され, 遠隔操作可能となっている. 特に主要軸はエンコーダー補完により1ミクロン以内で制御され, 精緻な位置制御が実現されている. また, ガードスリットやビームストッパー, 試料観察用照明など試料近傍に配置される光学ユニットやXAFS実験用検出器は小さなボックス (ファンシーボックスと呼ばれる) 内に収納され, 回折実験時に自動的にセットされるようになっており, 回折実験の利便性と安定性が図られている. 二次元検出器はCCD検出器が設置され, 実験条件に応じてカメラ長やオフセットを変更できるようになっている. ビームラインを含むすべての機器は, 後述するSTARSモータークライアントソフトにより制御されており, ネットワークを介して集中管理されている. ビームラインの端末にはグラフィカルユーザーインターフェースがインストールされ, これらモータークライアントと通信を行いながら回折実験が進められる.

現在, NW12AやBL-5Aより高性能な新ハイスループットビームラインPF-AR NE3Aの建設準備が開始されている. NE3Aは, 立体構造を基にした薬剤設計に特化したビームラインである. アステラス製薬株式会社からの受託研究により設計・開発され, 2009年4月に運用を開始する予定である. ビームタイムの一部はアステラス製薬株式会社により専有的に利用され, 残りのビームタイムを全国共同利用実験に公開する予定である. また, 2007年度より開始されたターゲットタンパク研究プログラムの技術開発研究プロジェクトとして, PFリングにおいて微小集光ビームラインBL-1Aの開発を検討しており, 将来的には3本のハイスループットビームラインと2本の微小集光ビームラインを運用する予定である. これらのビームラインでは, 実験装置および制御システムが共通化さ

れるため, 開発作業を効率的に進めることができるだけでなく, 放射光利用者の負担も軽減され, ビームラインの運用効率の向上が期待される.

3. 試料交換ロボット

3.1 試料交換ロボットの開発

試料交換ロボットの開発にあたり最も重視したことは, フォトンファクトリーが大学共同利用機関法人であるということである. ビームラインを国内外の多数の研究者が利用するため, 標準的な試料ピンを使えること, ロボットを使用せずにマニュアルでも容易に試料交換ができることを考慮した. SPring-8で開発したSPACE[®]は専用のピン (現在はHampton Research社のピンも扱えるよう開発が進められている) を用いることにより, 試料交換の容易さ, 位置決め of 正確さを実現しているが, 大多数のユーザーはHampton Research社のCrystal Capを使用しているため, このピンを標準的に扱えることが重要である (現在はSPACEの専用ピンも互換で扱えるように開発を進めている). また, ユーザーによってはビームラインで試料を凍結して実験する場合もあり, マニュアルでの試料交換にすぐに切り替えることができるようにする必要がある. これは交換ロボットに不具合が生じた場合にも有用である. これらの観点から, フォトンファクトリーでは, 水平多関節ロボットを用いたSSRLのシステムをベースとして, ビームラインに合うように改良することにした.

図1に開発したロボットの写真を示す. 2004年にBL-5AとNW12Aに設置し, 動作テストを開始した. その後, 2005年度に開発専用のロボットを製作, 2006年度にBL-5AとNW12Aでユーザー運用を開始し, BL-17A用のロボットを製作した. 2007年度からはすべてのビームラインでユ

図1 BL-17Aに設置された試料交換ロボット。(Robotic sample exchanger installed at BL-17A.) ロボットは回折計の横に設置され、ロボットを使用しないときには退避している。また、ゴニオメータの下にはファンシーボックスが設置されており、同様に結晶操作中は光学系が退避して、試料交換時に容易に作業できるようになっている。

ーザー運用を開始し、いつでも実験ができる状態になっている。

ユーザーは標準ピンを使用して結晶をすくい、金属製のカセットの中に入れる。カセットはあらかじめ液体窒素中で冷やしておき、結晶をすくったループを凍らせてからカセットに入れることになり、そのためのツール類も準備されている。カセットは通常凍結試料運搬に使用されているドライシッパーに入れることができる大きさである。1個のカセットには、96個のピンを挿入することができる。カセットは試料交換ロボットに備え付けられている液体窒素デューワーに最大3個セットすることができ、合計288個のピンを一度にセットすることができる。セットされた標準ピンは、マニュアルでの付け外しと同様のトングを用いて、極低温に保ったままゴニオメータ上に運ばれマウントされる。その後、試料の位置決めを行って回折実験がスタートすることになる。

3.2 試料交換時間の短縮化

SSRLで開発されたロボットでは、トングは1つのピンしかもつことができない。そのため、実験が終わったピンを回収し、それから新しいピンをマウントすることになる。この一連の作業には約90秒もの時間がかかり、その間は次の実験が開始できない状況になる。今後フォトンカウンティングに近い検出器が利用可能になると、今まで以上に試料交換の時間の短縮が必要となり、この時間は無視できない。そこで、今までのトングを上下に重ねたような形状をした、ダブルトングを開発した(図2)。⁴⁾ 上下のトングはそれぞれ独立に圧空アクチュエータで開閉できるようになっており、新しいピンをもったまま古いピン

図2 開発したダブルトングシステム。(Double tongs system. (a) Overview of the double tongs. (b)-(e) The upper and lower tongs can be opened and closed separately.) (a) 全体図。(b)-(e) 実際の動作。

を回収し、その場ですぐに新しいピンをマウントすることが可能になる。実験の結果、10秒以内でピンの交換ができることが確認された。現在、BL-17Aの試料交換ロボットに導入し、試験運用を行っているが、大きな効力を発揮している。今後、ほかのビームラインのロボットにも導入していく予定である。

4. 制御システムと自動化、遠隔実験の実現

4.1 STARS制御システム

ビームラインや実験装置、試料交換ロボットの制御は、独自に開発したSTARS制御システムを用いて行われる。このシステムの中核には、フォトンファクトリーで開発されたメッセージ配信システム、STARS (Simple Transmission And Retrieval System) が利用されている。⁵⁾ STARSはもともとフォトンファクトリーのビームラインインターロックシステム用に開発されたもので、TCP/IPソケットを利用したテキストベースのメッセージ配信システムである。さまざまなテストと改良の結果、非常に簡便にビームライン制御のネットワーク化、統合化が可能であることがわかり、構造生物ビームラインの制御システムの核として導入した。このシステムのデザインとしては、分散型のシステムを採用した。実験はビームラインに散らばった装置を、異なるオペレーティングシステムの下で動作する種々のコントローラや計算機により協調して行われるため、これらをネットワークで統合して制御する分散型システムは自然で適している。のみならず、分散システムは、システムエンジニアや開発スタッフのグループによってシステムの異なる部分を同時に開発することを可能にしている。システムを各クライアントにモジュール化しておくことで、将来のソフトウェアのアップグレードおよび修正を容易に実行できる。STARS制御システムの場合、STARS

サーバー、モータークライアント、ユーザークライアント、システムクライアントから構成されている。各クライアントはSTARSサーバーによって結び付けられ、ユーザークライアントと各モータークライアントがコマンドを送受信することで実験が進められる。各クライアントはモーター位置やシステム情報を、STARSサーバーのイベント配信機能により共有することができ、接続管理もサーバーによって行われるため、どのクライアントも独立にシステム参加でき、いつでも統合的に実験を進めることができる。以上の特徴により、後述するデータベース管理や自動運転、遠隔実験についても、容易にシステムを拡張していくことが可能となっている。

ユーザークライアントソフト (GUI) はPerl/Tkでコードされており、基本機能はTCP/IPで通信されるため、ネットワーク接続可能な端末であればどこからでも利用可能となっている。これはプラットフォームに依存しないというだけでなく、例えばビームラインで不具合があった場合など、サポートスタッフが居室や自宅から直接トラブルシュートでき、素早く対応できるので非常に有用である。また、放射光施設では通常ユーザーは限られたビームタイムしか使用できず、ビームラインも試料の種類によって使い分けるため、直感的なインターフェースの開発はユーザーにとっても重要である。フォトンファクトリーではそのような観点から、ユーザーフレンドリーで、実験に必要な機能がわかりやすくまとめられた統合GUIを開発し運用している (図3)。これとは別に、膨大な実験データをデータベースにより統合管理する、実験管

理システムPCCS (Protein Crystallographic Control System) も平行して開発しており、テスト運用に入っている。⁶⁾ PCCSで用いられるインターフェースは、統合GUIの経験やノウハウを活かして開発が進められている。今後自動運転や遠隔実験が実現されるときには、このような実験管理システムが利用されていくであろう。

4.2 専用ローカルネットワーク

ビームライン制御においては、操作の安定性とデータの安全性が最も重要な課題の1つである。フォトンファクトリーの構造生物ビームラインでは、装置制御用とデータ転送用のローカルネットワークシステムを導入し、STARSシステムによるコミュニケーションサーバー方式を採用することにより、ビームライン制御とユーザー領域とを完全に区分けし、安定かつ安全性の高い実験ができる環境を実現している (図3)。ユーザー側からは、STARSサーバーとファイルサーバーのみが制御の窓口となり、STARSコマンドを送信し、実験データを取得するという構造になっている。また、ユーザー領域も構造生物専用の特別なネットワークの中にあり、データやユーザー管理をLDAP/NFS/Sambaによって一元的に管理されている。このネットワークでは、4本の放射光ビームラインや構造生物学研究センター関連の研究室と中央サーバーが、光ファイバーやレイヤー3スイッチで構築された高速ネットワークで結ばれている。これらの特徴により、どこの拠点にいても同じ環境でデータ解析、バックアップなどの計算機作業を行うことができるようになっている。⁷⁾

4.3 自動化と遠隔実験に向けた開発

ここまで、ビームラインの自動化と遠隔実験に向けて必要な、ベースとなるビームライン技術について述べてきた。この項目では、残るピースである、試料自動位置決め機能、回折能判定機能、実験スケジューリング機能、遠隔地からのアクセス技術について、現在の開発状況を紹介する。

自動測定において最もカギとなるのは試料位置決めであろう。振動写真法において試料をビームから外さずに振動させるには、回転軸の中心に試料を正確に位置決めする必要がある。試料の位置決めに関して、ループの形状を認識してビーム位置に駆動する方法は、われわれを含む各所のシンクロトロンですでに実装されている。今後は、ループ内の結晶試料を認識し、位置決めする技術が必要になる。特に試料サイズが小さくなり、高輝度ビームラインになるほどその必要性が増す。SPRING-8で開発された試料交換ロボットでは、再マウント時の再現性が非常に高くなるよう工夫されており、ピンを一度マウントして測定する試料の位置をデータベースにあらかじめ登録しておくことにより、半自動的に連続測定が実現されている。⁸⁾ われわれは現在、ループ画像を保存しておき、再マウント時にループ形状をマッチングさせることで同様の操作が可能

図3 ビームラインネットワーク構成と遠隔操作に向けた取り組み。(PF beamline network configuration.)

になる機能を開発中である。また、可視光での試料認識では、屈折効果や分解能の問題がありおのずと試料サイズに限界がある。そのため、X線ビームを用いて回折強度の統計値を評価することにより試料の位置決めをする機能も開発を進めている。最終的には、ループ形状でのラフな位置決めの後、データベースに記録された位置への半自動位置決めか、X線ビームを用いた位置決めか、どちらかを選択できるようにする予定である。

試料位置決めが完了したら、次は回折実験である。その際には、露光時間や分解能、測定角度範囲などの実験条件を決めなければならない。現在、STARS クライアントの1つとして、PROCESSOR クライアントを実装中である。⁹⁾ これは、回折像から LABELIT¹⁰⁾ で結晶方位を決定して結晶品質を評価し、Mosflm¹¹⁾ で測定範囲や角度を見積もるクライアントである。この結果から、測定するべきか否かを判断し、測定する場合には実験条件を自動でセットできるようになる。現在は上記2つのソフトだけ実装されているが、将来的にはさまざまな処理ソフトに対応し、測定と平行してデータ処理が行えるように改良し、ユーザーがソフトを選択できるようにする予定である。

測定が完了したら、違う試料に載せ換えて次の実験が開始される。試料によって、1つの実験条件の1データセットで済む場合や、MAD 法のように3波長測定する場合、XAFS により吸収端測定を行う場合などさまざまである。そこで、あらかじめどのような実験をするか予定しておく必要がある。この実験スケジューリング機能は、上記PCCSで実現されており、ここまでで一連の自動測定実験が可能になる。

さて、このように自動測定が可能になると、次のステップとして遠隔実験が現実化してくる。そこでわれわれは、STARS 測定システムの拡張として実験モニタリングソフトを実装し、テスト実験を開始した。⁹⁾ このソフトは、前述のPROCESSORとREPORTERと呼ばれる2つのSTARSクライアントからなる。PROCESSORは回折像の品質検査の結果や、データ処理の結果をREPORTERに出力し、REPORTERは実験状況をイベント監視によって情報収集し、PROCESSORからの結果と合わせてXML形式で公開ウェブサーバー上に出力する。これまで述べてきた自動化のための開発に加えて、この実験モニタリングソフトを利用することにより、ユーザーはビームラインに來なくても、凍結試料がセットされたカセットを搬送デューワーで送り、試料や実験に関する必要な情報をビームラインスタッフに受け渡せば、回折実験が可能になる。本機能の実現により移動のコストや時間が省かれ、ユーザーの負担を軽減することができる。特に遠隔地のユーザーにとっては、本機能の実現に対するリクエストが非常に

大きい。いくつかの施設でも同様のMail-in サービスが実現、あるいは予定されているが、フォトンファクトリーでも今秋からテスト実験を開始し、来年以降受け入れを開始したいと考えている。さらにこの次のステップとしては、ビームラインのユーザー遠隔操作化がある。前述のように、STARS 制御システムはネットワーク接続可能な端末であれば利用可能であるため、統合GUIをインストールした遠隔の端末からビームラインの遠隔操作は容易に実現できる。しかし、ビームラインの安全性やネットワークセキュリティ、データ保全性など解決しなければならない問題が多いため今後の課題である。

文 献

- 1) A. E. Cohen, P. J. Ellis, M. D. Miller, A. M. Deacon and R. P. Phizackerley: *J. Appl. Cryst.* **35**, 720 (2002).
- 2) M. Hiraki, S. Watanabe, Y. Yamada, N. Matsugaki, N. Igarashi, Y. Gaponov and S. Wakatsuki: *AIP Conf. Proc.* **879**, 1924 (2007).
- 3) N. Igarashi, N. Matsugaki, Y. Yamada, M. Hiraki, A. Koyama, K. Hirano, T. Miyoshi and S. Wakatsuki: *AIP Conf. Proc.* **879**, 812 (2007).
- 4) M. Hiraki, S. Watanabe, N. pHonda, Y. Yamada, N. Matsugaki, N. Igarashi, Y. Gaponov and S. Wakatsuki: *J. Synchrotron Rad.* submitted.
- 5) T. Kosuge, Y. Saito, K. Nigorikawa, H. Kawata, A. Shirakawa, H. Nakajima, K. Ito, I. Abe, J. Kishiro and S. Kurokawa: *PCaPAC2002 Proceedings*, Frascati, (2002).
- 6) Y. Gaponov, N. Igarashi, M. Hiraki, K. Sasajima, N. Matsugaki, M. Suzuki, T. Kosuge and S. Wakatsuki: *J. Synchrotron Rad.* **11**, 17 (2004).
- 7) N. Matsugaki, Y. Yamada, N. Igarashi and S. Wakatsuki: *AIP Conf. Proc.* **879**, 1936 (2007).
- 8) G. Ueno, R. Hirose, K. Ida, T. Kumasaka and M. Yamamoto: *J. Appl. Cryst.* **37**, 867 (2004).
- 9) Y. Yamada, N. pHonda, N. Matsugaki, N. Igarashi, M. Hiraki and S. Wakatsuki: *J. Synchrotron Rad.* submitted.
- 10) A. G. W. Leslie; in *Crystallographic Computing*, Oxford University Press. (1990).
- 11) N. K. Sauter, R. W. Grosse-Kunstleve, and P. D. Adams: *J. Appl. Cryst.* **37**, 399 (2004).

プロフィール

五十嵐教之 Noriyuki IGARASHI
高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所
放射光科学研究施設構造生物学研究センター
Structural Biology Research Center, Photon Factory,
IMSS, KEK
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: noriyuki.igarashi@kek.jp
最終学歴：1997年東京工業大学大学院生命理工学研究科博士課程修了、博士（理学）
専門分野：放射光構造生物学、蛋白質結晶学
現在の研究テーマ：放射光構造生物ビームラインの開発をベースとした構造生物学研究の高度化
趣味：スポーツ観戦、アウトドア、旅行