

# Spring-8 BL38B1の紹介

JASRI 馬場清喜

# 発表の流れ

- はじめに
- BL38B1の現状
- 高度化
- 低分子利用
- まとめ

# Spring-8の紹介

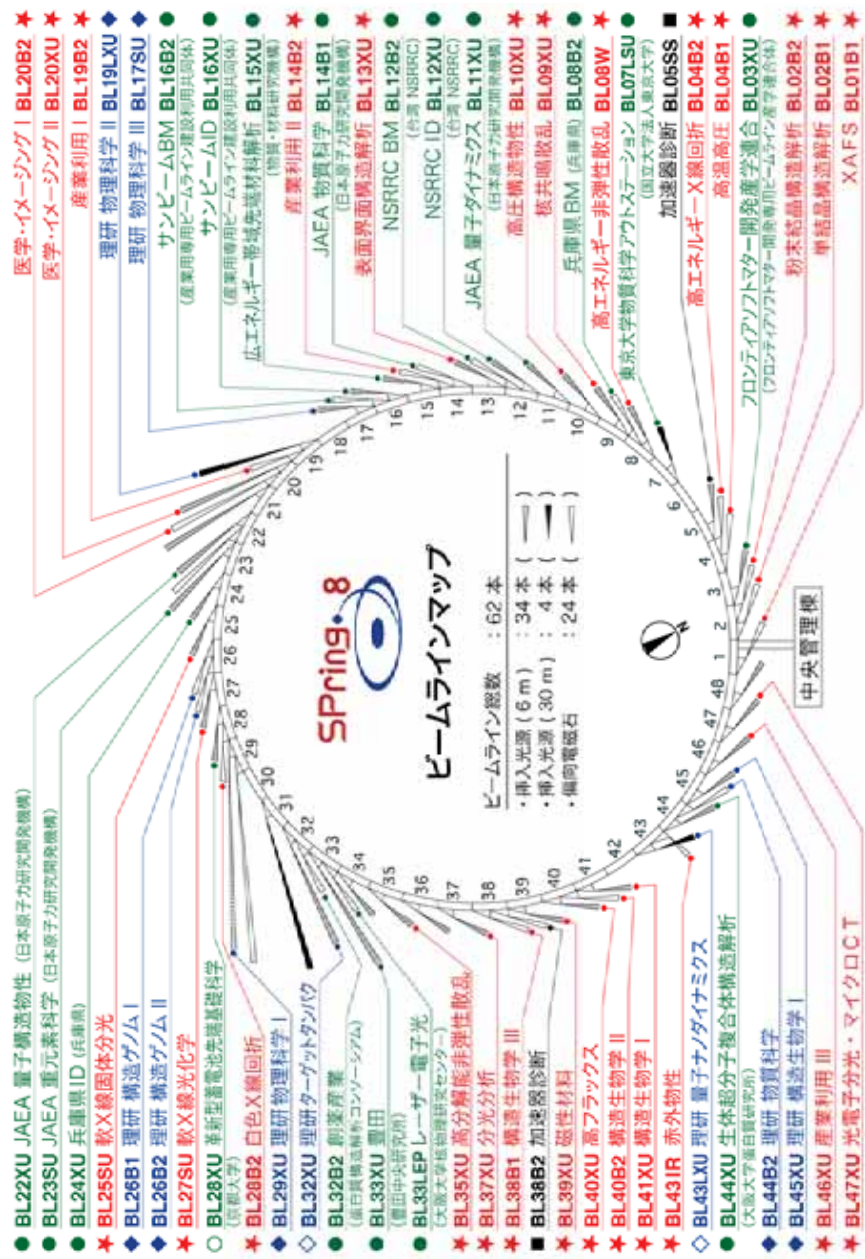
Super Photon ring-8 GeV (80億電子ボルト)

- ・極めて明るい光
- ・細く平行性が高い光
- ・広い波長領域の光



# Spring-8 ビームライン

## ビームラインの利用種別



- ・ ライフサイエンス  
蛋白質構造生物学
- ・ イメージング / 医学・生物学
- ・ 材料 / ナノテクノロジー
- ・ 環境科学 / 分析
- ・ 地球科学
- ・ 物理
- ・ 化学
- ・ 産業利用
- ・ ビーム診断

# 単結晶構造解析 ビームライン

- **BL02B1(共用)**

- 無機、有機物質 単結晶構造解析  
逆格子空間内の超格子構造の解析  
(磁気散乱、共鳴X線散乱、相転移観察)  
高エネルギーX線を用いた回折実験

- **BL32B2(創薬産業)**

- 創薬を目的とした  
タンパク質 結晶構造解析、  
粉末回折、  
有機低分子 結晶構造解析

- **BL26B1(理研)**

- **BL26B2(理研)**

- **BL32XU(理研)**

- **BL38B1(共用)**

- **BL41XU(共用)**

- **BL44XU(阪大蛋白質)**

- タンパク質 結晶構造解析

# タンパク質結晶構造解析ビームライン 共通化された標準ユーザーインターフェースを導入

## ルーチン測定

BL26B1 (理研)

BL26B2 (理研)

BL38B1 (共用)

十分な回折強度の結晶  
測定自動化  
測定高速化

## 高難易度測定

BL32XU (理研)

微小結晶

BL41XU (共用)

高精度データ測定

BL44XU (阪大)

巨大結晶格子対応

バンディングマグネットBL

Flux 8.0 x 10<sup>10</sup>

アンジュレータBL

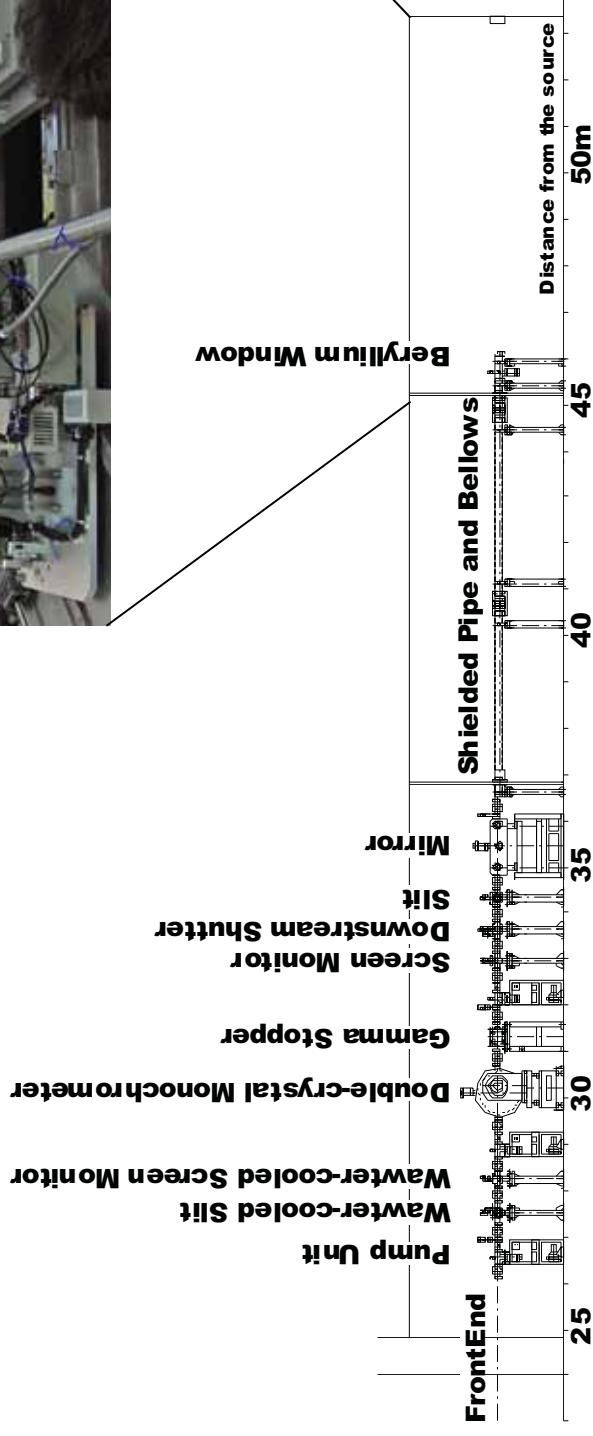
Flux 3.0 x 10<sup>12</sup>

# BL38B1の現状

# BL38B1のレイアウト

標準光学系：偏向電磁石光源 + 標準2結晶分光器 + 集光ミラー  
試料交換の自動化：サンプルチェンジャー SPACE の導入

X線の準備からデータ収集  
まで、一貫した自動化を実現





# スペックタ

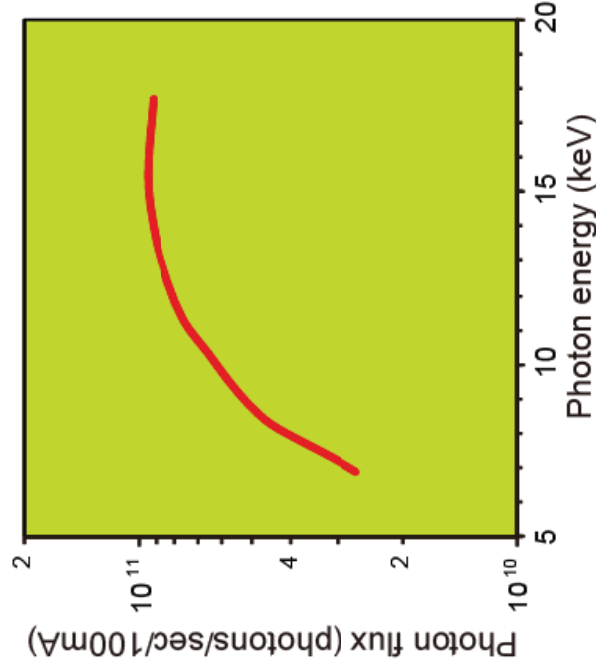
$\lambda: 1 \text{ \AA}$



Beam Size (F.W.H.M.)

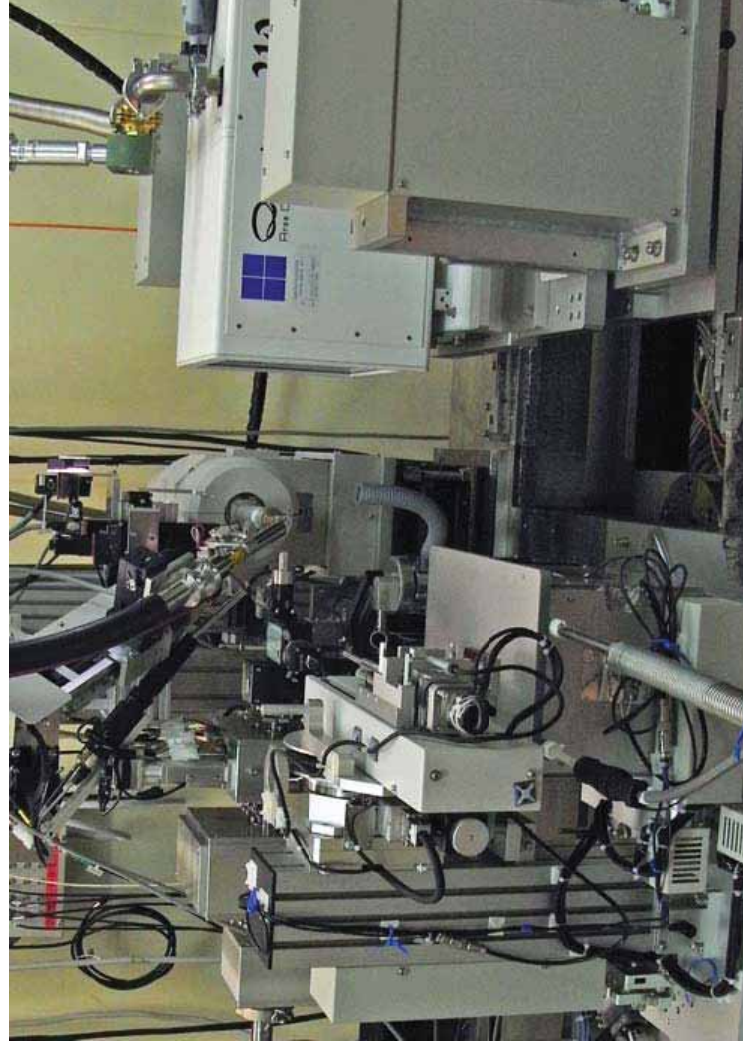
230 x 180  $\mu\text{m}^2$

Photon flux



Photon flux  $\geq 10^{10}$  (photons/sec/100mA)

- エネルギー範囲 : 6.5 ~ 17.7 keV (0.7 ~ 1.9  $\text{\AA}$ )
- カメラ長範囲 : 75 ~ 900 mm (Q210)
- 測定可能な最大分解能 : 0.75  $\text{\AA}$  (Q210)
- 振動角、振動範囲 :  $\geq 0.1^\circ$  ; 制限無し
- 露光時間 :  $\geq 0.5$  sec
- 低温吹付け装置の温度 :  $\geq 90$  K ( $\text{N}_2$ )



# 試料周りのレイアウト

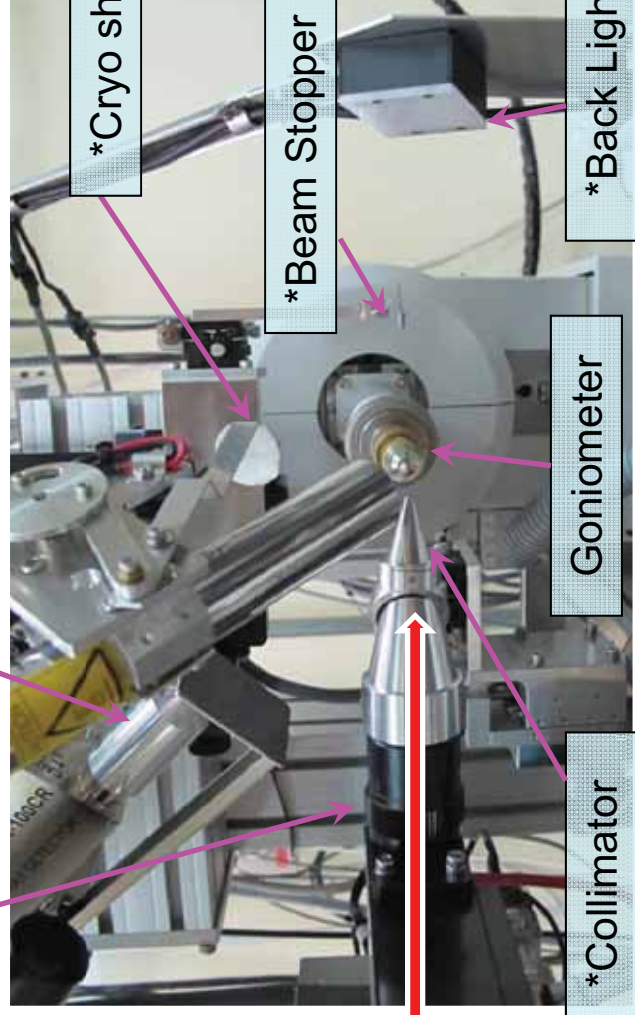
結晶センタリングや実験条件設定、実験スケジュールの管理機能などを一端末に統合し、制御している

同軸カメラ

X線入射方向から正確なセンタリングが可能

\*Si PIN

蛍光強度測定に使用



試料マウント時に気流を遮断

試料後のX線を遮断

試料マウント時には退避

X線

\*Collimator

Goniometer

\*Back Light

試料前の空気散乱を抑制  
試料マウント時には退避

センタリング時に使用

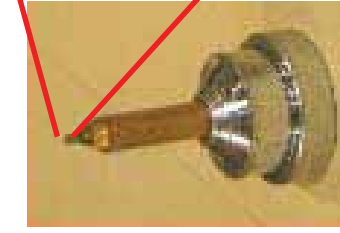
## タンパク質結晶の特徴

- 分子サイズが非常に大きい（1万～数10万の分子量）
- 溶媒を50%前後含んでおり、環境の変化に弱い
- 結晶格子のサイズは数10～数100オングストローム程度
- 非対称単位に複数の分子が含まれる場合もある
- 大きな結晶を得にくい
- 結晶性が悪く、分解能が得られない
- 放射線損傷を受けやすく、低温での測定が必須



限られた時間の中で、複数の結晶の中から効率的に最良の結晶を選択し、最良のデータを収集したい

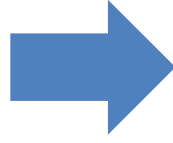
# 手動で行うタンパク質結晶の測定



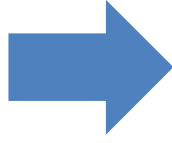
マグネットピン



結晶を溶液ごとループですくう

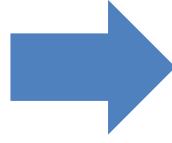


ゴニオ上にマウント



結晶を交換

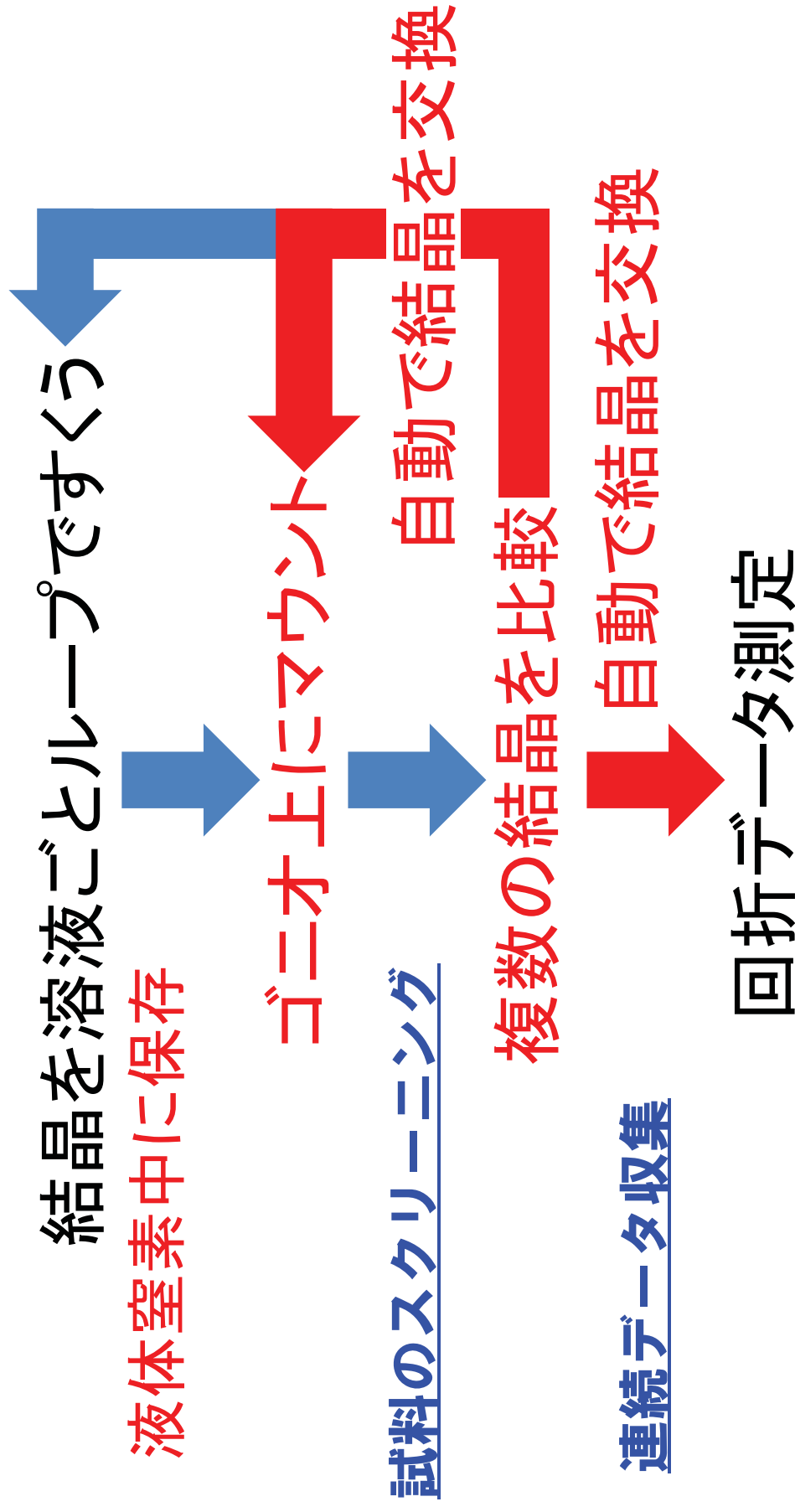
結晶の質の確認



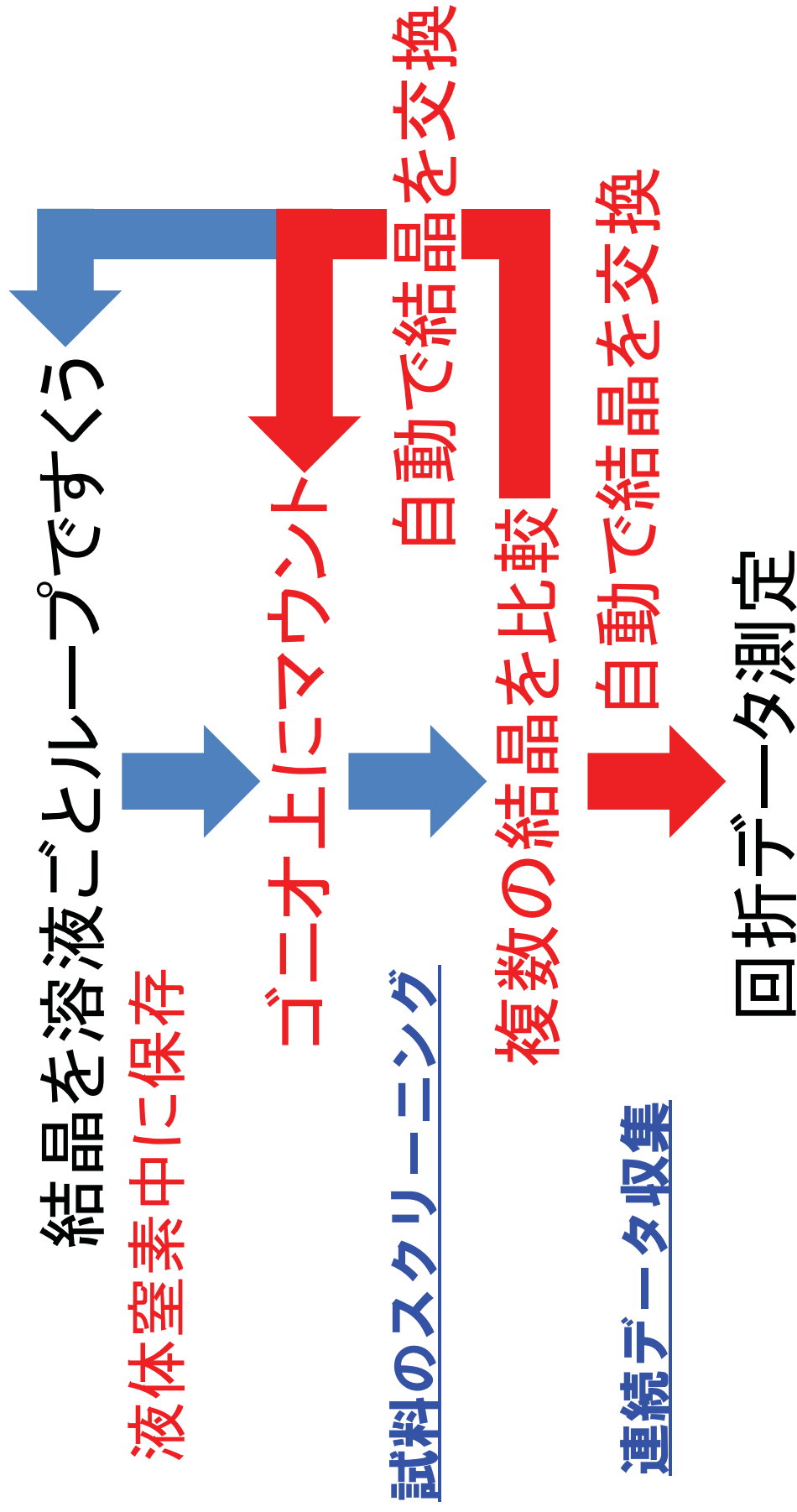
回折データ測定

結晶の質の確認をするのに、10分以上必要

# 効率的に最良の結晶で最良のデータを取得



# 効率的に最良の結晶で最良のデータを取得



高速化: より短時間での測定

高精度化: 測定可能な範囲の拡大

# 高度化

- 効率的な測定のための自動化
- 高速、高精度な測定を行うための改良

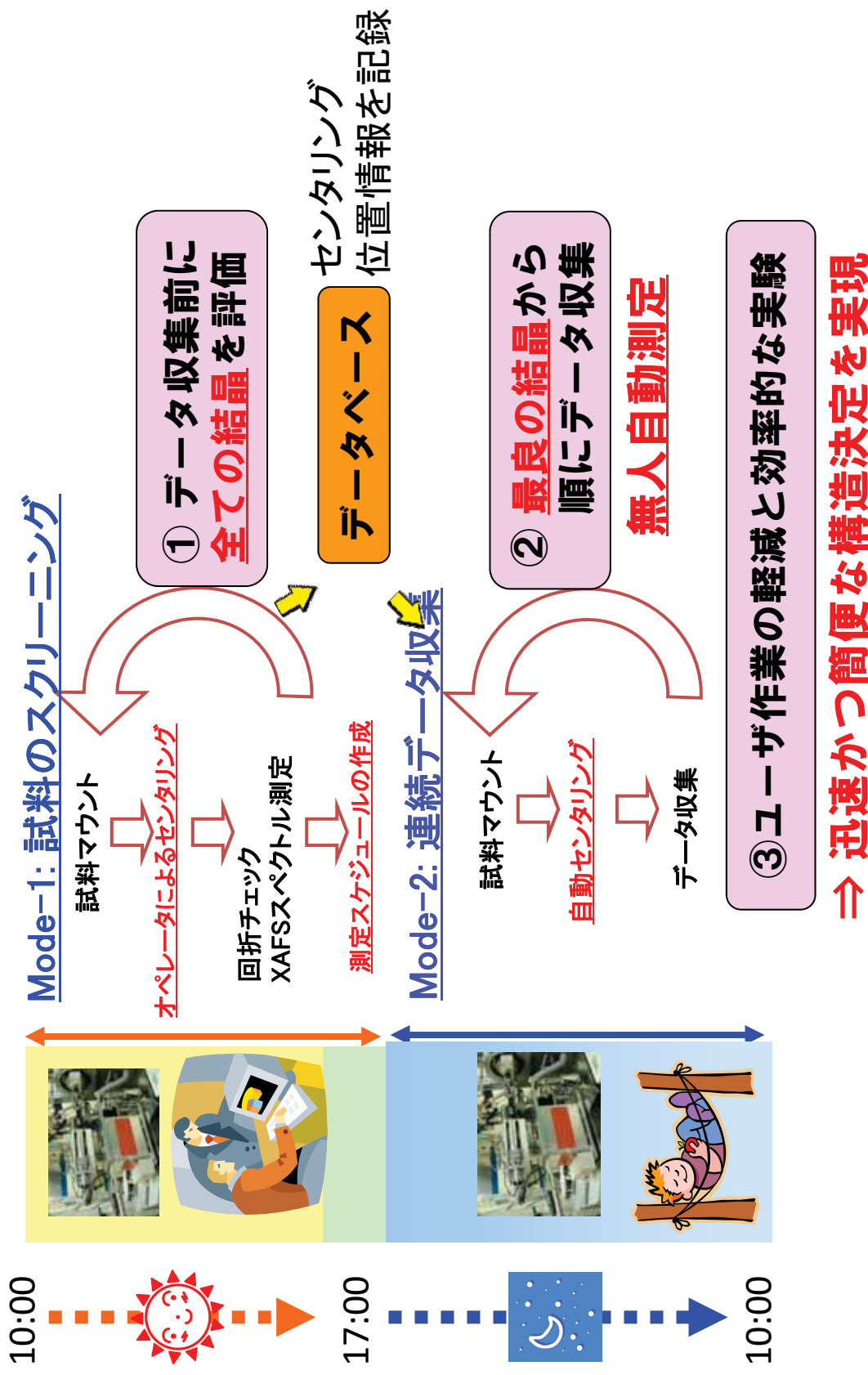
# 高度化

- 効率的な測定のための自動化
- 高速、高精度な測定を行うための改良



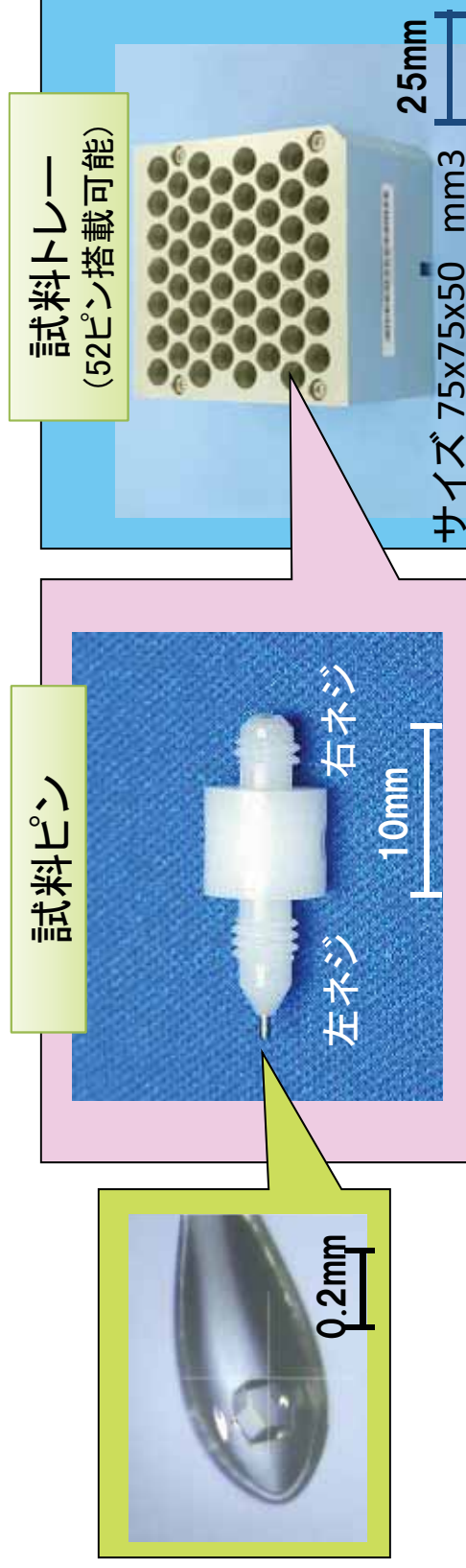
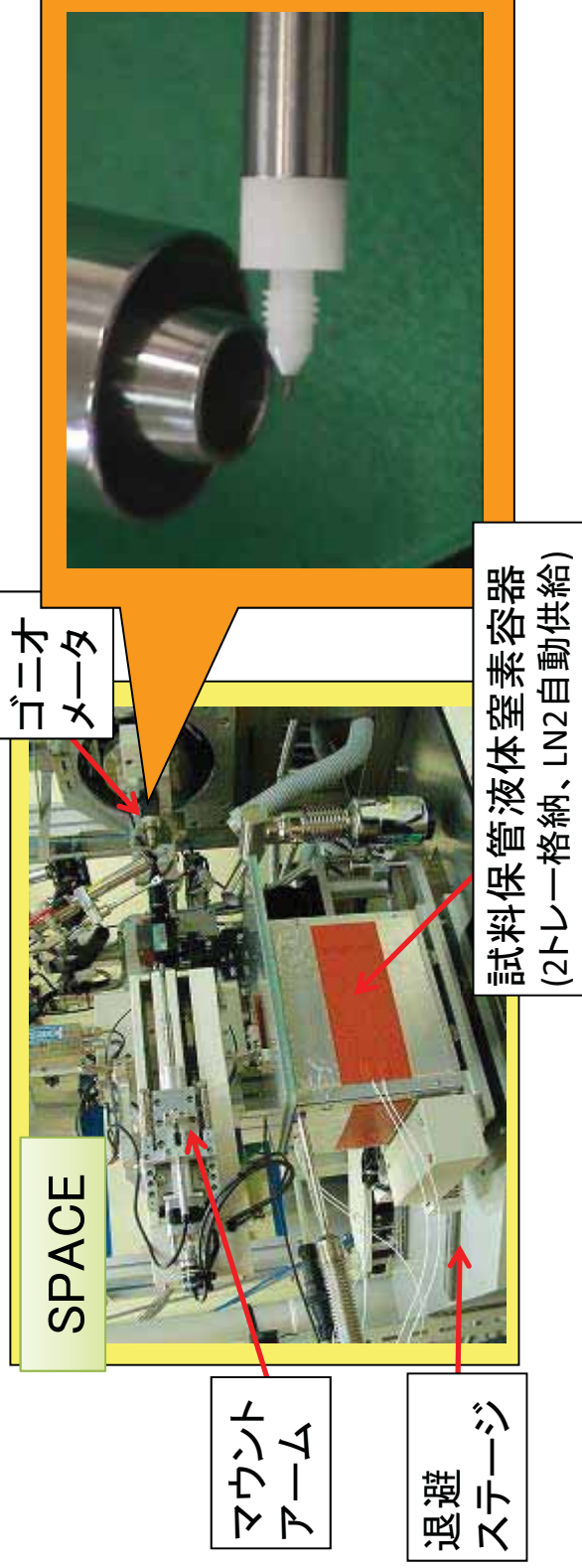
# 効率的な測定のための自動化

## ロボットを用いた2モード運転による自動測定



# 測定のための自動化のためのロボット SPACE

SPACE - **S**Pring-8 **P**recise **A**utomatic **C**ryo-sample **E**xchanger

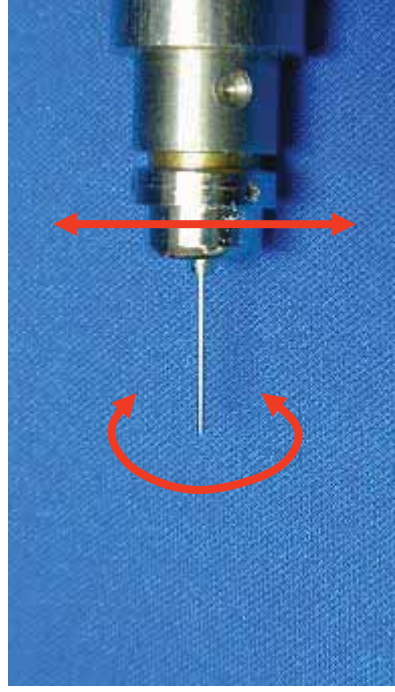


# SPACEピンの利点

## 試料マウント時の位置再現性が高い

回折チェック時にセンタリングした座標を記録する (12個 / 1時間)  
2回目からはセンタリング位置の再現が可能  
↓  
回折データ収集時の自動測定が可能

試料の位置や方向は、一意的に決まる



マグネットピン:  
位置再現性なし



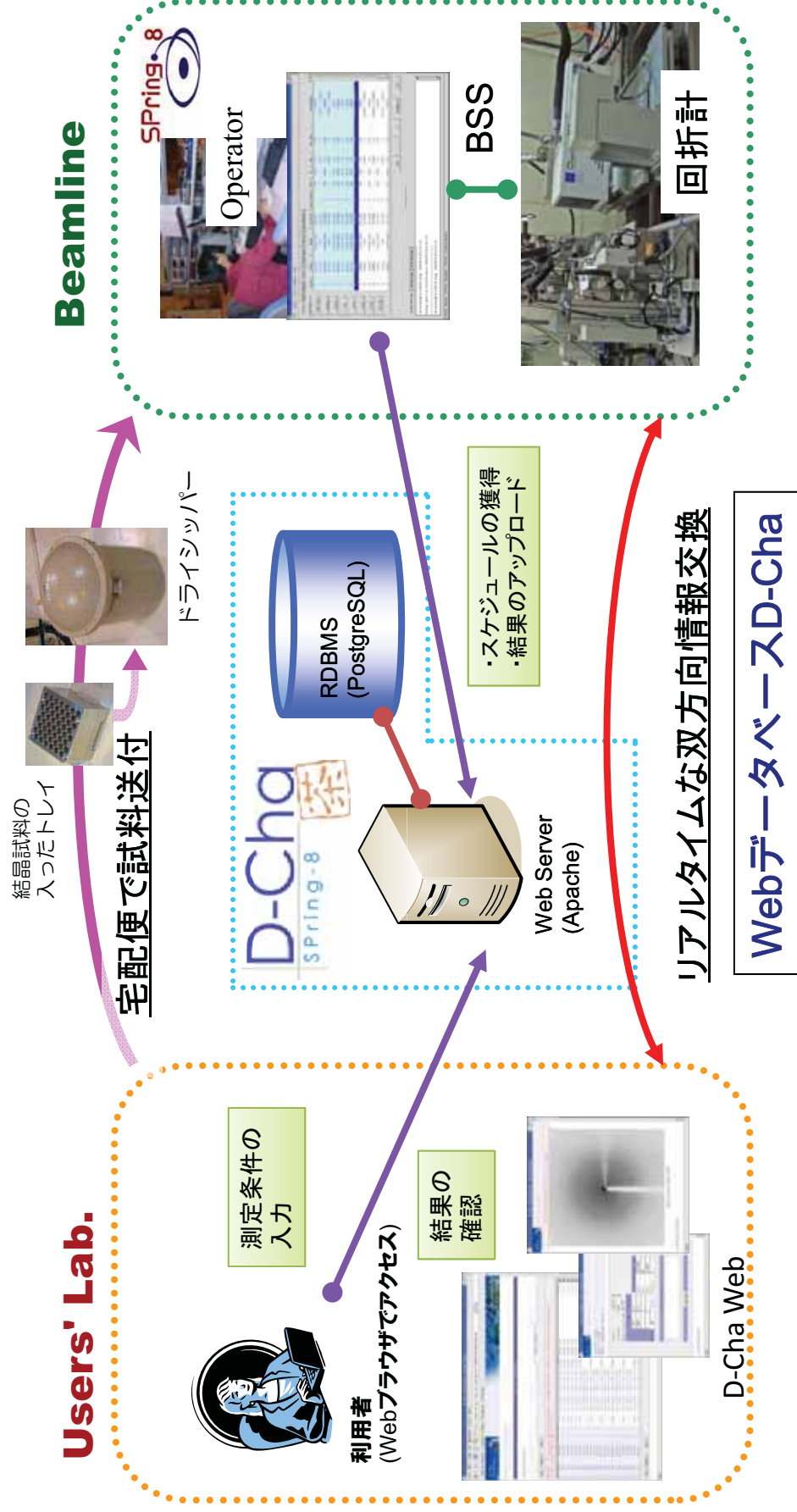
SPACEピン:  
高い位置再現性 ~10μm

- どちらのピンもSPACEで使用可能
- 2mode運転はSPACEピンのみ

# メールインデータ測定システム

## 2 mode運転とBLオペレータ補助による遠隔回折データ収集

- ・ 放射光施設にタンパク質結晶サンプルを送付
- ・ Web経由による測定条件の登録・測定結果の入手



# SPring-8タンパク質結晶 測定代行の流れ 1回/月実施

## 依頼者



測定代行を申し込む

申請内容の相談

担当者

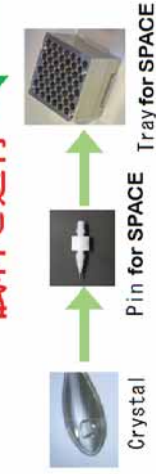


申請

利用業務部

試料を送付

担当者



マウントツールキットを送付  
(貸し出し可能)



[実施相談窓口]  
JASRI利用研究促進部門  
構造生物グループ 馬場 清喜  
TEL: 0791-58-0833  
e-mail: mail-in@spring8.or.jp

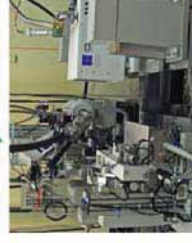


マウントツールキット  
で試料を保存



試料と仮照射条件を  
SPring-8へ送付

担当者が受け取る



結晶交換ロボット  
に設置

D-Chaでデータを確認



本照射条件の相談

担当者

仮照射

10秒露光、2枚撮影で5~6分/1試料  
各結晶のセンタリング情報を記録

本照射

10秒露光 x 180枚 = 約40分/1試料  
センタリング情報を基に連続測定

データと試料を送付

データと試料を受け取る

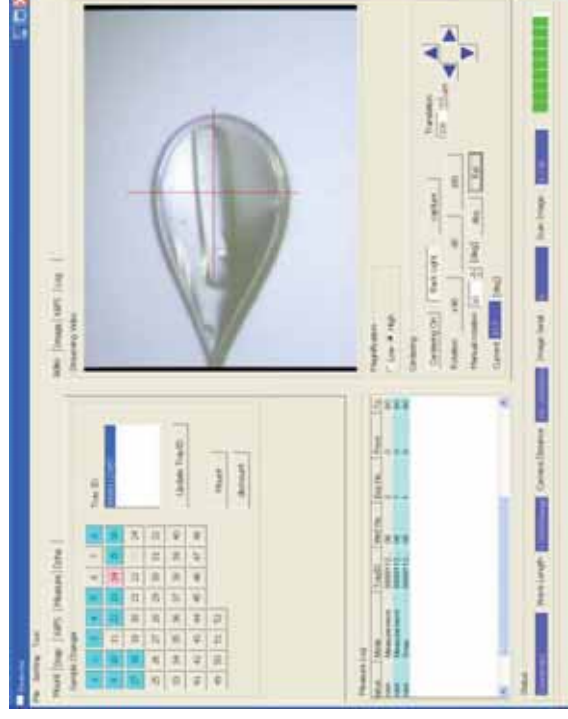
終了



# リモートデータ測定システムの開発

## もうひとつのメールインデータ測定システム

- アドバンスユーザーに対して、オペレーターを介さない、よりリアルタイムな操作による遠隔地からのデータ測定
- 試料を熟知した研究者が、試料センタリングを行うことが可能
  - 結晶スクリーニングやX線照射位置スクリーニングをリアルタイムで行い、最適な試料・X線照射位置・測定条件で回折データ測定を行うことが可能



# 高度化

- 効率的な測定のための自動化
- 高速、高精度な測定を行うための改良

# 高速、高精度な測定

- 人的誤差
  - 結晶のマウント、センタリング、測定の設定
  - ビームラインを自動化することで解消
- メカニカルな誤差
  - 振動写真法における機器同士のタイミングの精度
  - 自動調整の精度
- バックグラウンドの低減
  - 空気散乱や、ビームストッパーの大きさ、位置

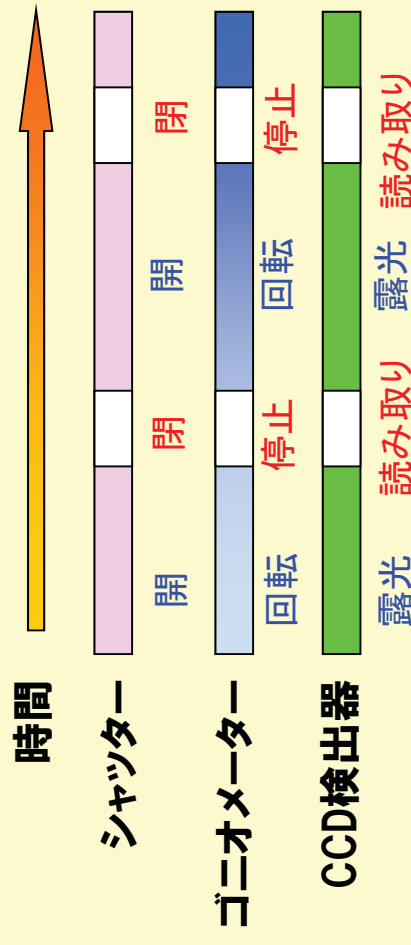
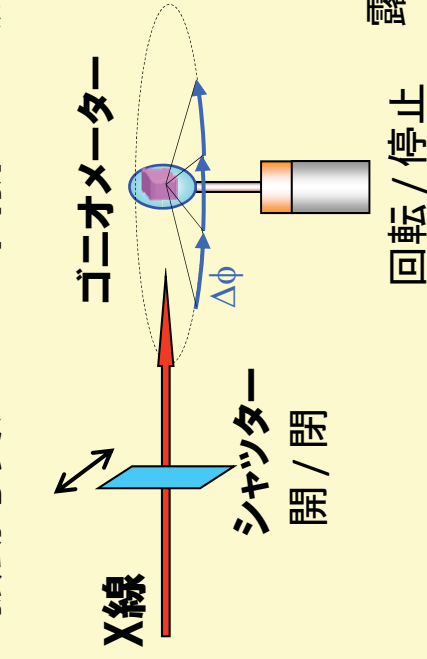


# 高精度な測定を行うための改良

## シャッター、ゴニオの同期精度の向上

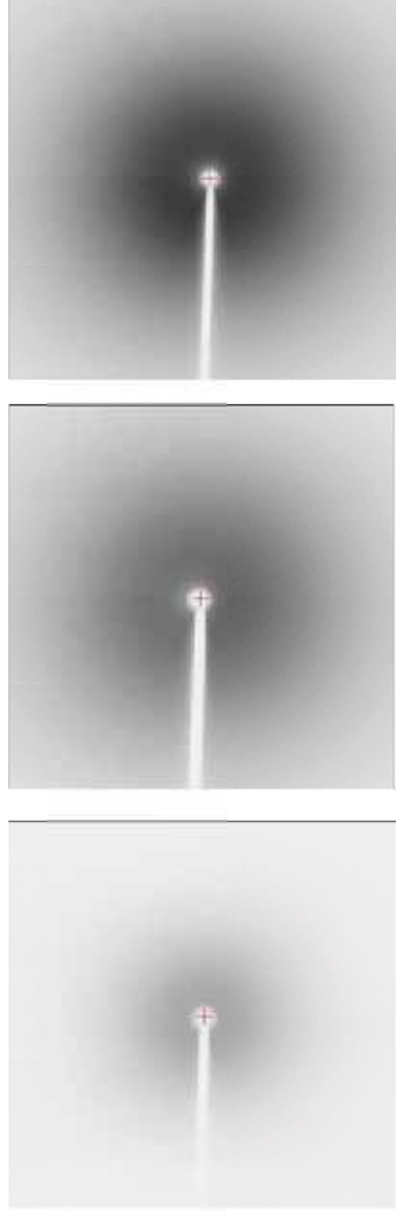
より細かいOscillation angle、より短い露光時間で測定が可能

振動写真法による回折データ測定の様式図



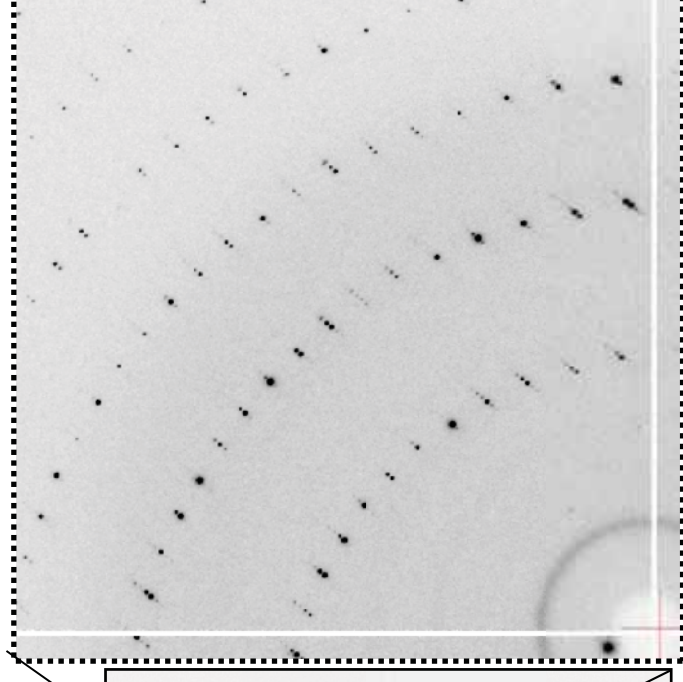
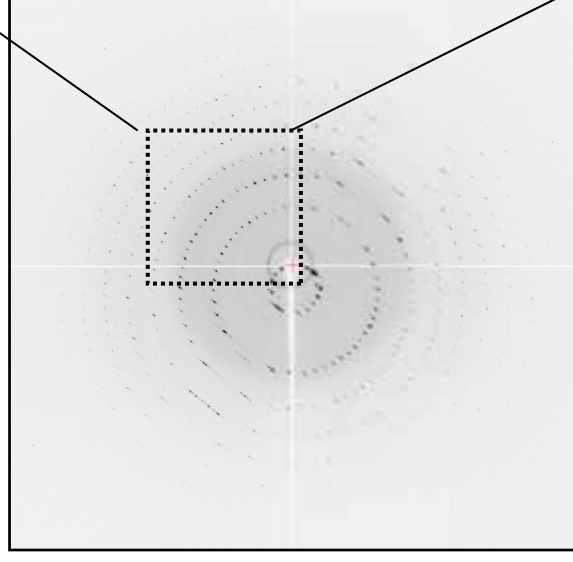
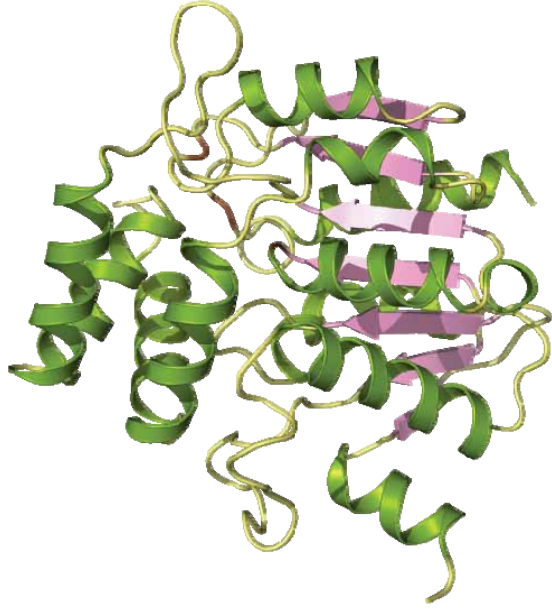
## 空気散乱の低減によるバックグラウンドの低下

より効率的に検出器のダイナミックレンジを利用した測定が可能

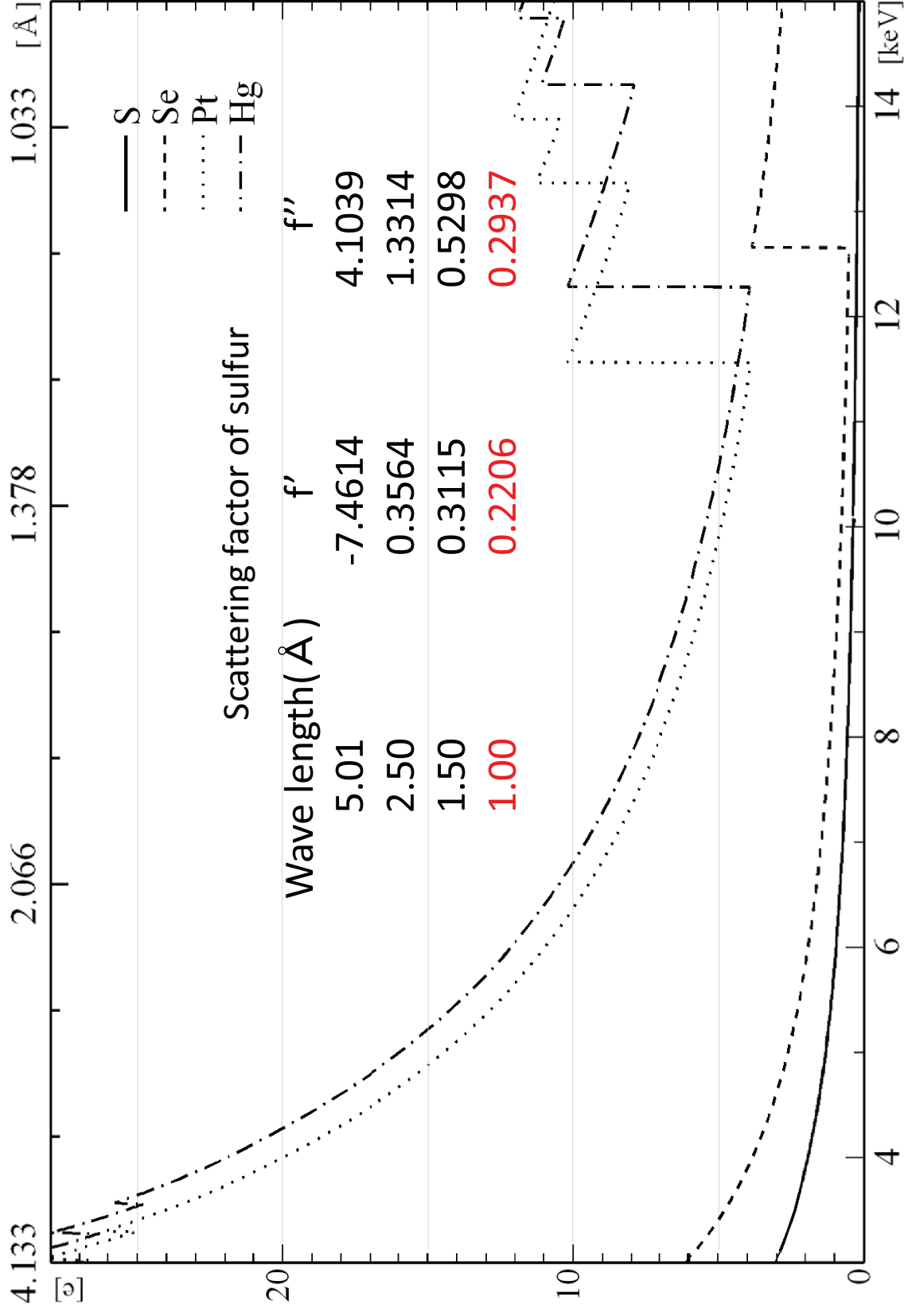


# 微小角振動による高精度データ収集例

- Space group  $P2_12_12_1$
- Unit cell parameters (Å)  $a = 42.3, b = 43.0, c = 257.0$
- Crystal size  $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$  ↓
- Wave length  $1.0 \text{ \AA}$  格子が  $200 \text{ \AA}$  超の結晶でも測定可能
- Oscillation range  $180 \text{ deg.}$
- Oscillation angle  $0.2 \text{ deg.}$  → 微小振動角での測定が可能
- Exposure time  $2.0 \text{ sec}$
- Camera distance  $130 \text{ mm}$
- Measurement time  $61 \text{ min}$



# 重原子の異常散乱効果 $f''$

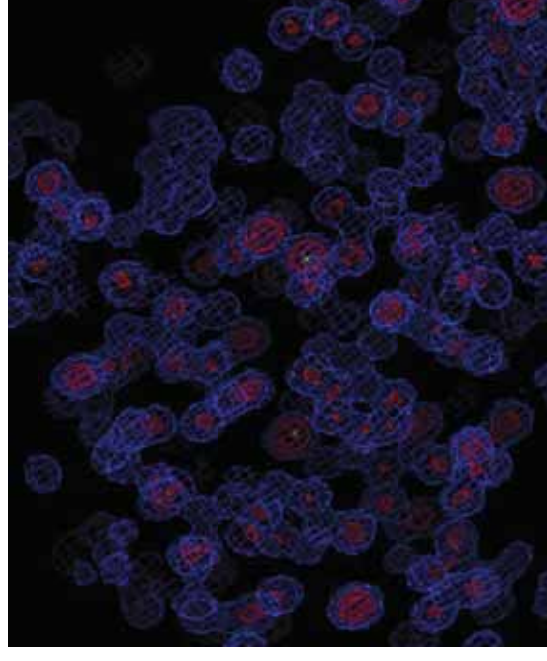
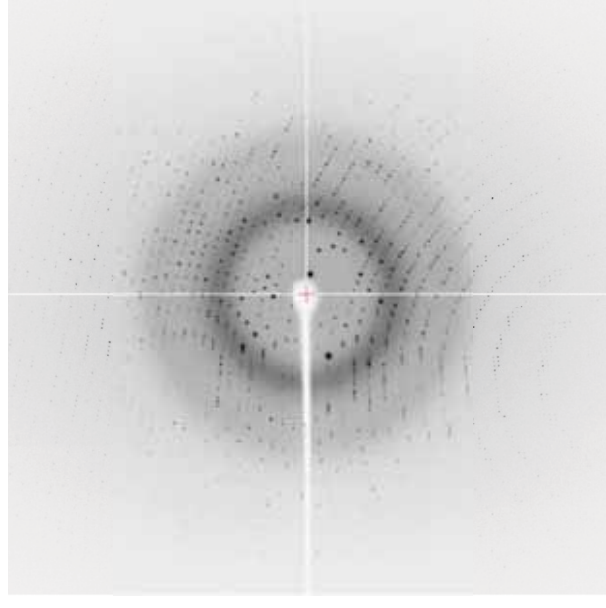


# より短波長でのS-SAD法による解析例



Lysozyme (hen egg white)

高精度でのデータ測定が可能



- Space group  $P4_32_12$
- Unit cell parameters (Å)  $a = b = 78.876$ ,  $c = 36.927$
- Crystal size  $200 \times 180 \times 100 \mu\text{m}^3$
- Wave length  $1.0 \text{ \AA}$
- Oscillation range  $360 \text{ deg.}$
- Oscillation angle  $1.0 \text{ deg.}$
- Exposure time  $2.0 \text{ sec}$
- Camera distance  $90 \text{ mm}$
- Measurement time  $22 \text{ min}$
- Intensity integration  $\text{HKL2000}$
- & Data scaling  $(\text{DENZO} + \text{SCALEPACK})$
- Heavy Atom Search  $\text{SHELX C/D/E}$
- & Density modification
- Model Building  $\text{ARP/wARP}$

# 低分子利用

# 有機低分子結晶とタンパク質結晶の回折強度

$$I \propto \frac{V_x}{V_2} \cdot n$$

$V_x$ : 結晶の体積、 $V$ : 単位格子の体積、 $n$ : 原子数/単位格子

Cytidine

分子式: C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

Space group  $P2_12_12_1$

$a=14.0$ ,  $b=14.8$ ,  $c=5.1$

$Z=4$

$$I = 14.5^3 \times (30 \times 4) / (14 \times 14.8 \times 5.1)^2$$

$$= 0.3$$



14.5 x 14.5 x 14.5  $\mu\text{m}^3$

1/3000の体積

Lysozyme

分子式: C<sub>616</sub>H<sub>963</sub>N<sub>193</sub>O<sub>182</sub>S<sub>10</sub>

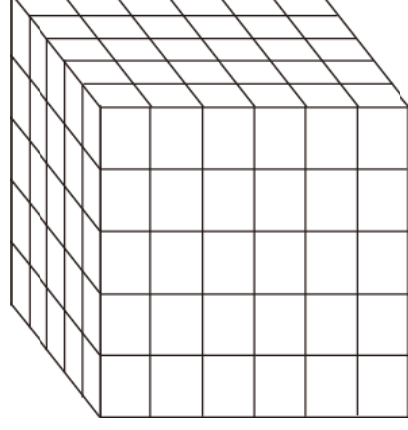
Space group  $P4_32_12$

$a=78.9$ ,  $b=78.9$ ,  $c=36.9$

$Z=8$

$$I = 100^3 \times (1964 \times 8) / (78.9 \times 78.9 \times 36.9)^2$$

$$= 0.3$$



100 x 100 x 100  $\mu\text{m}^3$

=

# 測定のポイント

CCD検出器のダイナミックレンジを有効に利用した測定

- ・適切なビームサイズを使用する
- ・直接法で解析を行う場合、高角のS/N比を重視  
(低角の回折点の飽和よりも)
- ・低角の情報が必要であれば、低角用のデータを再度測定
- ・解析に使用する高角側の分解能は統計値を基に判断

キャピラリーに封入して室温で測定

- ・溶媒を含んだ結晶の場合、低温測定が困難な場合がある

## まとめ

- 結晶センタリングや実験条件設定、実験スケジュールの管理機能などを一端末に統合し、制御しているため、ユーザーは測定に専念できる
- SPACEを用いたメールイン測定システムを利用することで効率的に連続データ測定が可能
- 測定代行(有償)を1回/月実施
- 格子が200 Å超の結晶でも測定
- 高難易度な有機低分子が、測定可能であった