

## PF 蛋白質結晶構造解析用ビームステーション(BL-6A , BL-18B)への CCD 自動データ収集システムの導入について

高エネ機構・物構研 鈴木守、五十嵐教之

<はじめに>

BL-6A は 1987 年に建設され、以来長年にわたり共同利用に使用されている。実験ハッチには 1989 年に作られたワイセンベルグカメラ 3 号機が設置されており、蛋白質結晶学のユーザー実験の中核として活躍してきた。ユーザー数も年々増加し、現在のような構造生物学の隆盛に多大なる貢献をしてきたビームラインである。データ測定は、イメージングプレート(IP)を検出器として用い、オフラインで読み出す方式で行われている。IP は、広いダイナミックレンジを持ち、大面積化の容易さ、良好な感度の均一性、取扱の容易さ、などの優れた特徴から、蛋白質結晶構造解析の分野で広く使用されている。しかし、読み出しの高速化・自動化を両立させることが難しく、シンクロトロンのような大強度 X 線源では、さらに高速な 2 次元検出器が要求されている。このような要求から、近年 CCD を撮像部に使用するタイプの検出器が注目されるようになり、すでに海外の放射光施設を中心に導入され、実績をあげている。そこで、BL-6A でも測定の高速度化・効率化を実現するため、CCD 型 X 線検出器を利用した自動データ収集システムを導入することとなった。

BL-18B は 1993 年に建設され、2 結晶分光器を備えた白色・単色兼用ビームラインとして利用されてきた。実験ステーションにはワイセンベルグカメラ 4 号機(兼ラウエカメラ)が設置されており、現在放射光研究施設では唯一多波長異常分散法(MAD 法)の実験が可能なビームラインとして利用されている。MAD 法は、近年とみに適用される機会が多くなった構造解析法であるが、この方法では多くの回折像を一つの結晶から測定しなければならない。そのため、データ収集の迅速化が要求されており、今回 BL-6A と同様の CCD システムを導入することとなった。この BL-18B のシステムに関しては、特定研究「フォトンファクトリーにおける生物マシーナリー研究のためのより効率的な放射光利用法」の予算により購入された。

本稿では、BL-6A と BL-18B に導入された CCD 自動データ収集システムについて、システム概要、実際の使用例、そして今後の予定について述べる。

<システム概要>

本システムは CCD 型 X 線検出器・ゴニオスタット及び制御装置の 3 点から構成され、現有のワイセンベルグカメラ 3 号機に搭載される。BL-6A 用の CCD 型 X 線検出器及びゴニオスタットを図 1 に示す。BL-18B 用も同様の設計となっている。測定は全てこのシステム上で行うことができ、ワイセンベルグカメラはビーム調整用架台として使用される。調整部(ワイセンベルグカメラ)と測定部(CCD システム)が完全に切り分けられているので、今後予定しているワイセンベルグカメラの改造・更新が可能な構造となっている(後述)。また、架台となるワイセンベルグカメラに大きな変更はないので、

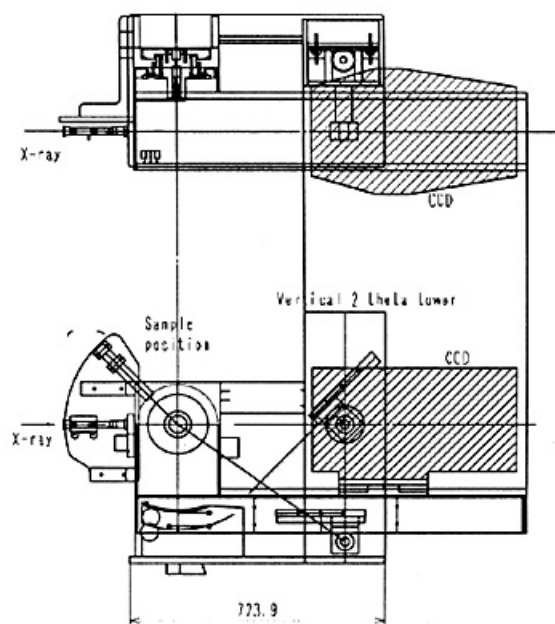


図 1. BL-6A 用 CCD 及びゴニオスタット  
BL-18B 用も同様の構造。

表1. ADSC Quantum 4Rの性能

CCDの数	2 x 2
受光面積	188 x 188 mm <sup>2</sup>
画素数	2304 x 2304
画素サイズ	82 μm
空間分解能	90 μm FWHM
読み出しノイズ	8 e <sup>-</sup> /pixel/s
ダイナミックレンジ	10 <sup>4</sup>
読み出し時間	9 sec

表2. 測定可能分解能 (波長1.0Åの場合)

	2θ = 0°	2θ = 20°	2θ = 45°
カメラ長 (mm)			
100	1.36 Å	0.95 Å	0.71 Å
150	1.81 Å	1.14 Å	0.80 Å
200	2.29 Å	1.30 Å	0.87 Å
250	2.80 Å	1.44 Å	0.92 Å
300	3.31 Å	1.56 Å	0.97 Å
400	4.34 Å	1.75 Å	1.03 Å
500	5.39 Å	1.89 Å	1.07 Å

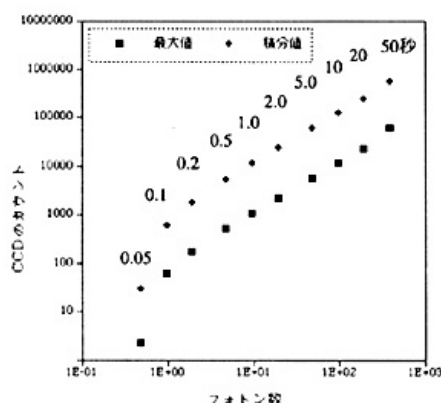


図2. CCDの応答性能

フォトン数はダイオード検出器で測定し、波長1.0ÅのX線だけとして算出した。適当な厚さのAl板でフォトン数を制限しているので、実際は高調波の割合が大きい。シグナルとフォトン数が合っていないのはその影響。シャッタースピードを0.05~50秒まで変えてフォトン数を変化させた。

CCD システム一式をカメラから降ろせば、これまで通りの IP 利用実験が可能となる。

今回導入した CCD 型 X 線検出器は、ADSC 社製の Quantum 4R である。この装置は縮小型光ファイバ(FOT)と CCD を組み合わせ、4 台の CCD をアレイ状に並べた構造で、大きな受光面積と十分な位置分解能を同時に満足する検出器である。性能を表 1 にまとめた。ゴニオスタットの特徴は、高分解能測定用に垂直駆動機構を有していることである。試料位置を回転中心として、重量約 50kg の検出器をモーター駆動により 45 度まで持ち上げて固定できる機構を持つ(BL-6A ではワイセンベルグカメラ 3 号機の強度不足から現在 20 度までの制限を設けているが、将来的には BL-18B と同様に 45 度まで駆動できるようになる)。カメラ長は、モーター駆動により、50~500mm まで設定することができる。表 2 に測定可能な分解能を示す制御は linux 計算機上で motif 画面に入力して行う。データ測定時には複数の測定条件をバッチのように書き込んでおくことができる。測定データは 100GB と 50GB のレイドディスクに書き込まれ(18B では 150GB が 1 台)、主に linux 計算機と alpha 計算機の 2 台で処理される(測定用の linux 計算機上でも可能)。今のところ処理ソフトは DPS/Mosfilm のみ利用可能である。データの保存は、DAT テープ、SCSI ハードディスク、またはユーザー持ち込みの計算機への PTP 転送のいずれかが選択できる。

CCD 及びゴニオスタットの性能テストは、時間的な制約もあったので、基本的な点についてのみ行った。まず、試料回転

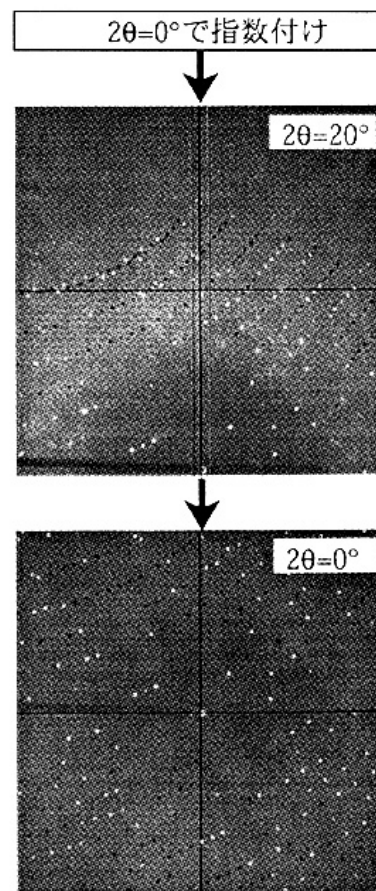


図3. 垂直駆動機構

予測点は最初の2θ=0°で計算した方位から発生させた。

軸の精度について、レーザーやマイクロゲージを用いて確認した。それによると、同方向に回転させる限りでは、任意の振幅で回転させても1回転で0.01度以下の誤差で一致していた。ただし、正回転・逆回転ともに、反転させると0.03度のズレがあり、バックラッシュによるものと思われる。実際の測定時には、振動はさせず、一方向に回転させて測定するので、バックラッシュは全く問題にならない。また、同軸性、回転時のプレもそれぞれ、15 $\mu$ m、10 $\mu$ m以下と、要求仕様を完全に満足する優秀な結果だった。次に、シャッター性能及び CCD の応答性能に関して、波長 1.0 の放射光を用い、ダイオード検出器やオシロスコープを用いて行った。これにより、シャッターの開時間は、0.5 秒程度までは精度良く、再現性が十分あることが確認できた。CCD の応答性能は、シャッターの開時間で CCD に入るフォトン数を調節することにより見積もった(図 2)。0.2 秒以下と、50 秒の所が外れているが、その間では非常に良い直線性を示している。前者はシャッター性能、後者はピクセル飽和によるものであり、CCD の応答性能は十分満足できる事が確認できた。最後に、垂直方向の検出器駆動機構について、実際の回折像を用いてテストした。図 3 は、 $2\theta = 20^\circ$  で測定した回折像について、最初に  $2\theta = 0^\circ$  の回折

像で指数付けした方位を用い、 $2\theta$  値と単純な幾何学計算による原点位置だけを入力し直し、予測点を表示させたものである。予測点は非常に良い一致を示しており、実際に容易に指数付けをする事ができた。また、再度  $2\theta = 0^\circ$  に戻した時にも同様に予測点は一致し、駆動精度は少なくとも処理ソフトウェアにおいて十分収束範囲内にある事が確かめられた。垂直駆動機構の制御は GUI 上で希望の角度を入力するだけで測定する事ができる。例えば高分解能データと低分解能データを続けて測定したい場合には、二つの条件を入力して測定開始すればあとは自動的に二つのデータが測定されるようになっている。カメラ長や露光時間、試料回転の設定も同様で、波長設定以外は GUI 上で設定値入力をして測定開始すればあとは自動で測定される。波長設定に関しても設定可能になる予定である。データの測定精度などについては、後段の実際の使用例を参照のこと。

各計算機上に使用方法や諸注意に関して、日本語のオンラインマニュアルが準備されている(図 4)。このマニュアルは、本年前半期に来て頂いたビームラインアシスタントの方々の多大なる協力によって作ることができた。この場を借りて御礼申し上げたい。処理ソフトに関しては、Mosf1m と DPS の英語版マニュアルをビームラインに備えているので、併せて参考にされたい。処理ソフトウェアは FTP サーバー上(ftp://pfweis.Kek.jp/pub/Dps-pf)にあるので、自由にダウンロード可能になっている。また、当面はビームラインアシスタントがいるので、分からないことがあれば気軽に相談して欲しい。



図 4. オンラインマニュアル

#### <実際の使用例>

本システムの BL-6A への設置は本年 2 月 1 日から行い、2 月 4 日からはもう共同利用を開始した。納入遅延のため、ほとんどぶっつけ本番だったが、ビームラインアシスタントの方々の献身的な助力もあり、大きなトラブルもなく 3 月のリング運転終了まで運用することができた。その後、4 月になってから CCD システムを降ろし、5 月中旬まで IP モード、その後 7 月中旬まで CCD モードとし、最後に IP モードへと戻した。BL-18B への設置は 4 月 4 日から行った。共同利用には 4 月 13 日から使用し始め、6 月の 3 週間だけ IP モードとして運用した。当初、どちらのビームラインでも CCD モードと IP モードを半々で運用しようとしていたが、利用希

望者の偏りから最終的には、7割を CCD モードとして運用した。本年夏までの半年で、のべ 89 グループと企業 10 社がこのシステムを利用し、回折実験を行った。ここでは、本システムの使用例として、昭和大学薬学部の田中信忠助手らによる亜鉛を含む酵素の多波長異常分散法による構造解析を例として紹介する。

この酵素は総分子量 17 万、4 量体構造で、一つのサブユニット中に 2 つの亜鉛を結合している。結晶は空間群

$P3_12$  に属し、格子定数  $a=b=85.89$  ,  $c:190.7$  , 非対称単位中に 2 サブユニット、4 つの亜鉛が存在する。最初に、BL-18B で CCD により測定された回折像を図 5 に示す。カメラ長は 120mm、波長は 1.283 , この条件だと垂直駆動機構を使わずに分解能 20 まで測定することができるこの時、最も回折点が近接している方向( $c^*$ 軸方向)で、回折点間隔が 0.9 mm となっており、図 5 から回折点がこの間隔で十分分離できていることが明瞭にわかる。この間隔で回折点を充填すると、188mm で約 200 点を記録する事ができる。実際にはもう少し回折点が近接していても分離することができ、通常の BL-18B のビームで約 300 点を記録する事ができると見積もれる(BL-6A の場合、もう少しビームサイズが小さいのでさらに多く記録できる)。さらに垂直駆動機構も利用できることから、格子定数 200 を超える格子を持つ結晶の原子分解能の回折実験が、このシステムで十分可能であることがわかる。

この結晶の回折データは全てクライオ凍結により測定され、IP と CCD、それぞれで測定されている。そして、それぞれのデータを独立に用い、多波長異常分散法による解析に成功している。表 3 に IP もしくは CCD を使用した 3 波長データの統計値を示す。IP のデータは Denzo で処理され、CCD のデータは DPS/Mosfilm で処理されている。IP のデータは、時間や労力の制約から、総振動角が少なく、分解能、完全性、多重度が全て低くなっている。しかし、分解能や測定反射数、処理ソフトの違いはあるが、 $I/\sigma$  や merging R の値は総じて良い。図 6 にこのデータを用い計算された

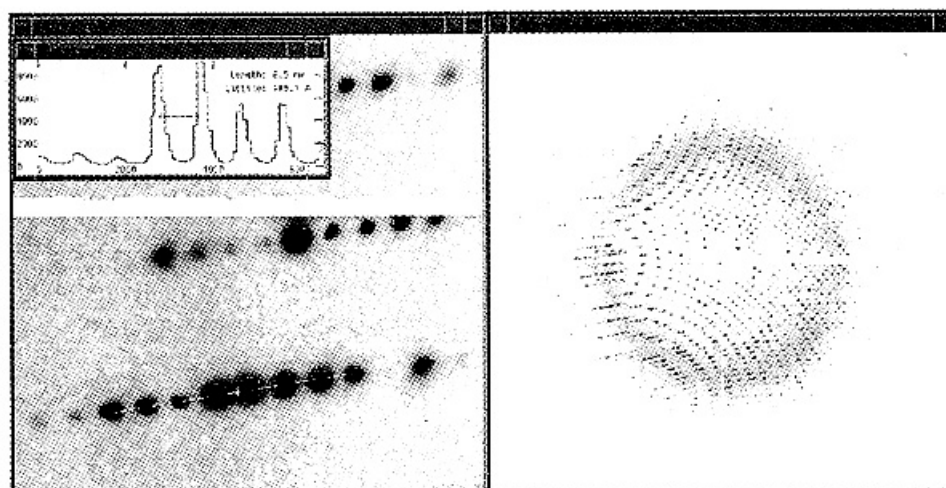


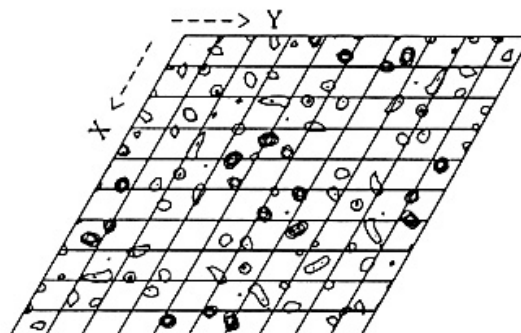
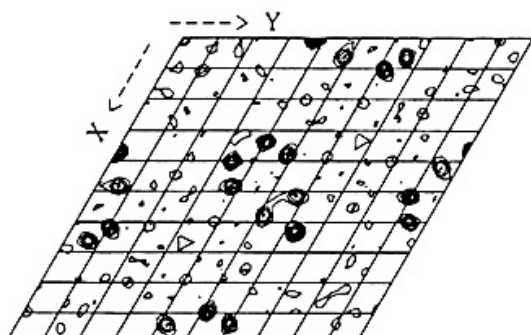
図 5. BL18BでのCCD回折像  
格子定数  $a=b=85.89$  Å,  $c=190.7$  Å,  $c$ 軸が回転軸。  
振動角  $1.0^\circ$ , 露光時間60秒。

表 3. CCD 及びIPによるMAD dataの統計値比較

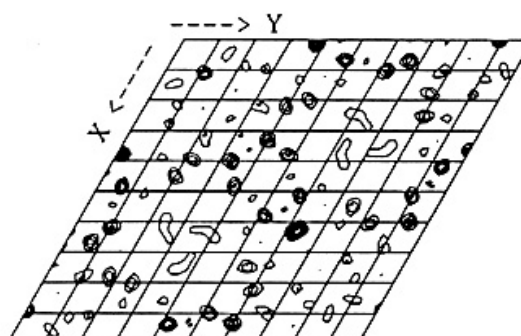
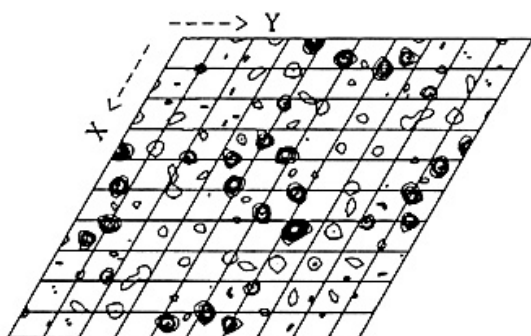
	small IP			CCD		
	1.0000	1.28255	1.28301	1.2000	1.28250	1.28301
wavelength (Å)	1.0000	1.28255	1.28301	1.2000	1.28250	1.28301
exposure time (sec)		30			60	
oscillation width ( $^\circ$ )		1.5			1.0	
oscillation range ( $^\circ$ )	51	123	90	180	180	180
resolution (Å)	2.5	2.8	2.8	1.9	2.0	2.0
multiplicity	2.9	4.2	3.2	10.9	10.8	10.9
completeness (%)	81.4	68.3	64.9	100	100	100
$I/\sigma$	24.0	35.2	31.3	7.9	8.2	8.3
R-merge (%)	5.0	4.3	3.7	7.4	7.1	6.9

CCD data

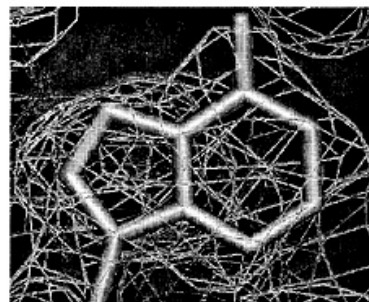
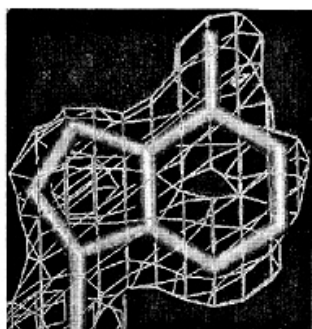
IP data



**Bijvoet difference Patterson MAP**



**Dispersive difference Patterson MAP**



**2Fo-Fc MAP ( A part of adenosine of NAD )**

図6. CCD dataとIP dataの各種マップによる比較  
Patterson Mapは1 $\sigma$ 毎, 2Fo-FcMapは2 $\sigma$ でcontourを切っている.

Bijvoet or DisPersive パターソン図を示す．ともに明瞭な垂鉛のピークが確認できるが，ピークの S/N は CCD のデータの方が高い．分解能，多重度，完全性による影響が大きいので単純に比較する事はできないが，CCD のデータを利用して，少なくとも多波長異常分散法を適用するのに十分な精度のデータを測定できている事がわかる．多波長異常分散法により決定された位相を用い，溶媒平滑化した後の電子密度図の図 6 に示す．補酵素である NAD のアデニン部分が明瞭に判別でき，十二分にモデル構築可能な質の電子密度図であることがわかる．このように，比較的シグナルが弱い垂鉛を用いても，総分子量 17 万の酵素の構造を十分に決定することができ，IP と比べても遜色のない性能であると言える．

<今後の予定>

現在 BL-6A で架台として使用しているワイセンベルグカメラ 3 号機の駆動機構は，CCD 装置のような重量物を載せる事を想定しておらず，老朽化も進んでいるため，当初の予想通り動作不良箇所が多々ある．このため，ビーム調整に不具合が生じており，現在は波長 1 固定で運用している．今後，カメラ架台部分の更新を行い，ビーム調整や波長変更も含めた全自動データ収集システムの構築を行いたいと考えている(図 7)．この架台は CCD 専用架台として設計しており，導入後は IP を使用した実験は全くできなくなる．今後 BL-6A，BL-18B を CCD 専用とする方針のため，予算制限，構造の安定化の観点からも CCD 専用のカメラ架台設計という方向を選択した．両ビームラインの CCD 専用化という選択は以下の経緯による．今年の初めに運用開始に先だって，どちらを利用するか希望調査を行ったところ，IP 利用希望者も相当数いるという結果だったので，取りあえず BL-6A，BL-18B ともに CCD/IP 共用とし，ビームタイム期間を CCD モードと IP モードと分けて運用することとした．しかし，実際に本年前半期に共用モードのビームタイム運用の結果，(1) IP 利用希望者の減少(蛋白ユーザーはほぼ全部)，(2) CCD を運用した際のトラブルの少なさ，(3) モード切り替え作業の煩雑さ，危険さ，(4) ほとんどの測定は CCD で可能，という諸々の理由から，本年後期から両ビームラインとも CCD 専用とすることとした．両ビームラインの CCD 専用化に関しては放射光研究施設に既に報告済みである．ユーザーグループには，今後どうしても IP を利用したい場合には，BL-6B で実験するようお願いしている．BL-6A，BL-18B 両ビームラインの CCD 専用化に伴い，IP 読み取り装置・消去器の転用が可能となり，BL-6B における読み取り装置不足も多少解消され，利用しやすくなるのではないかと

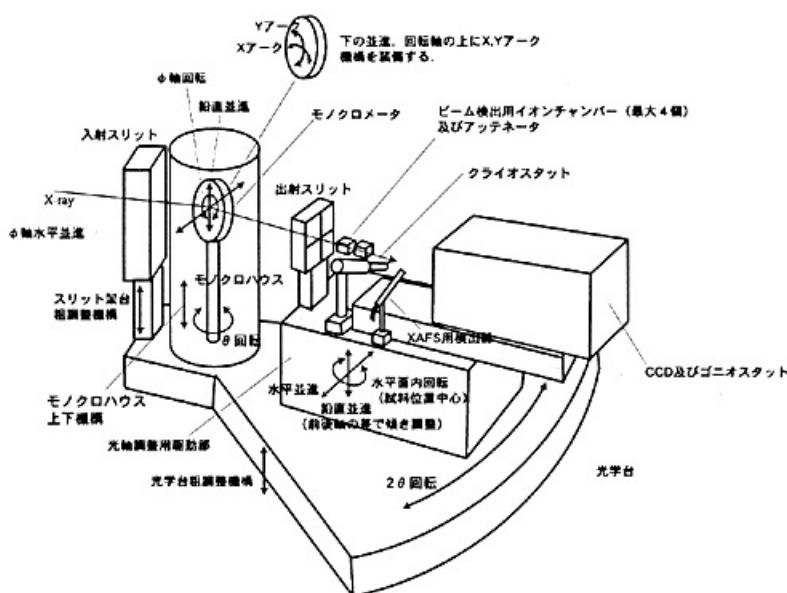


図 7. BL-6A CCDシステム用カメラ架台

と思われる．この半年，本システムを運用をしていて一番不評だったのが，試料周りのスペースのなさであった．そのため，ビームストッパーを動かしてしまったり，試料のマウントに失敗したり，シンチレーションカウンターの設置に苦労したりしていた．現在，可動式のビームストッパー，散乱スリットを作製し，この点については改善されている．実際ビームタイムの終わりにいくつかの

ユーザーグループにテスト使用してもらい、好評であった。その他には、BL-6Aの試料並進ハンドルが操作しづらい、英語版のマニュアルがないと言った声が寄せられた。これらについても順次対応していく予定である。

<おわりに>

本システムの導入によって、PFの各ビームライン特色がはっきりしてきた。すなわち、TARA(現SBSP)のビームラインも含めて、CCDによる高速自動データ収集のBL-6A、波長可変自動測定用のBL-18B、IPによる高精度測定用のBL-6B、そして来年から公開予定となっている自動IP測定装置のBL-6Cの計4本である(これに加えて大強度のPF-ARビームライン、NW2を建設中である)。当初1本しかビームラインがなかった時には、全ての測定をそのビームラインで行わねばならなかった。しかし、現在は分業化が進み、それぞれのビームラインがはっきりした特色を持っている。今後は、ビームラインを使用目的により使い分け、目的に合ったデータを測定する事が重要になるであろう。企業ユーザーのPF側ビームラインの使用は現在難しいが、このようにビームラインの分業化が進んでいる状況から、包括的なビームタイム運用を検討する事も重要に思われる。

最後に、貴重なサンプルデータを提供して頂いた、昭和大学薬学部田中信忠助手に感謝したい。