

SRI '97 特集

3 波長結晶構造解析ビームライン — SPring-8 理研ビームライン I —

山本 雅貴, 熊坂 崇, 植木 龍夫

理研 構造生物物理*

Trichromatic Concept at The SPring-8 RIKEN Beamline I

Masaki YAMAMOTO, Takashi KUMASAKA and Tatzuo UEKI

The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

At the SPring-8, RIKEN beamline I has been designed and developed for structural biology research by the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN). RIKEN beamline I consists of two experimental stations, protein crystallography (PX) and small-angle X-ray scattering (SAXS). Both experiments can be carried out simultaneously, with dichromatic synchrotron radiation emitted from two coaxial undulators with vertical polarization. The branched beams are generated by a transparent diamond crystal.

With synchrotron radiation, the multi-wavelength anomalous diffraction (MAD) method, which gives phases from a single anomalous scatterer, has been developed. Anomalous scattering contributes a small portion of diffraction intensity so that the accuracy of intensity data is definitely important. The PX branch of RIKEN beamline I has been designed based on a "trichromatic concept" to optimize for the MAD data collection. This concept is that three kinds of intensity data sets with three different wavelengths are taken quasi-simultaneously for the single protein crystal without changing any setting by "trichromator". The main feature of this concept is to minimize systematic errors in the measurements of anomalous diffraction for the MAD method. The construction of RIKEN beamline I had been progressed satisfactorily until June 1997. The initial commissioning successfully provided the three different monochromatized undulator beams were successfully observed on the phosphor screen, which located at the near end of the trichromator.

1. はじめに

構造生物学は、生体高分子の構造と機能の関連を研究することで、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は生体高分子の原子レベルでの立体構造解析が大きなウェートを占めており、1958年にはじめてミオグロビン¹⁾の立体構造が明らかにされて以来、X線結晶構造解析はその重要な手段のひとつである。しかし、現在の結晶解析法は、複数の重原子誘導体作成に多くの試行錯誤を伴う多重同型置換法や、構造既知分子モデルの必要な分子置換法がその主流を占めており、多くの"未知構造を知りたい"という要求には答えきれていない状況にある。

そこで、放射光利用に伴い従来法より簡便に未知構造を

解明できる可能性を持った多波長異常分散法 (MAD法)²⁾が提案され、さまざま改良が加えられてきた^{3,4)}。MAD法は異常散乱因子を含む結晶を用いて、多波長で異常分散効果を測定してその構造決定を行う。しかし、世界的にみても多波長異常分散法による解析例は少なく、依然として一般的な解析手法として用いられていない。その一因としては、異常分散効果による回折強度の変化は多重同型置換法のそれより微量であり、回折強度測定における様々な系統誤差をいかにして追放するかという問題に解答が与えられていない点が挙げられる。

そこで、理研ビームラインIの結晶構造解析実験ステーションでは多波長異常分散法をより標準的に利用可能にすることをめざして、"Trichromatic Concept"と名付けた

* 理研 構造生物物理 〒679-5143 兵庫県佐用郡三日月町三原323-4
TEL 07915-8-2815 FAX 07915-8-2816 e-mail yamamoto@postman.riken.go.jp

新たなビームラインのデザインを開発・採用している。

2. 多波長異常分散法とは

蛋白質 X 線結晶構造解析⁵⁾の最初の難関はなんといっても、試料の結晶化である。生体高分子の結晶化はこれまでも様々な手法が試みられているが、依然として試料の特性に沿ったさまざまな条件のスクリーニングが必要である。この過程を経て何とか目的とする試料の結晶が出来たとしても直ちに立体構造が得られるわけではなく、第二の難関として“位相問題”が控えているのである。

X 線結晶構造解析では、結晶を構成する原子中の電子により X 線が散乱され、その散乱波の干渉効果により引き起こされる回折現象を利用している。結晶構造解析において、唯一実験的に測定可能な回折強度 $I(hkl)$ は、複素数である結晶構造因子 $F(hkl)$ と結晶構造因子の複素共役 $F(hkl)^*$ の積で与えられる。

$$I(hkl) = F(hkl) \times F(hkl)^* \quad (1)$$

結晶構造因子 $F(hkl)$ は、単位格子内の全原子散乱因子の総和として、次式で与えられる。

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j(hkl) \quad (2-a)$$

$$F(hkl) = |F(hkl)| \exp \{i\alpha(hkl)\} \quad (2-b)$$

(2-b)式での $|F(hkl)|$ が構造振幅、 $\alpha(hkl)$ が位相角である。しかしながら、実験的には(1)式のように回折強度は構造振幅のみを与え、位相角が失われてしまう。この失われてしまった位相角を何らかの方法で決定するのが“位相問題”である。

蛋白質などの生体高分子の結晶構造解析における位相決定には、数学的に解を得る直接法は現状ではほとんどの場合有効ではなく、以下の2通りの方法が使われてきた。

(i) 同型置換法 (Multiple or Single Isomorphous Replacement: MIR or SIR)

複数個または一個の重原子誘導結晶を用意して、重原子を付加することによる回折強度の変化より、失われた位相を決定する方法。

(ii) 分子置換法 (Molecular Replacement: MR)

既に構造決定されている蛋白質の立体構造を参照モデルとして利用し、結晶内での目的とする蛋白質分子の配置を決めることにより、失われた位相を決定する方法。

放射光 (Synchrotron Radiation) の出現とその広範な応用により、実験室の X 線発生機にくらべて輝度が高く任意のエネルギーを持つ X 線が利用できるようになった。この特徴を生かして、金属イオン等の異常散乱原子を含んだ蛋白質結晶の解析には、多波長異常分散法 (Multiple wavelength Anomalous Diffraction Method) と呼ばれる

新しい位相決定法の適用が可能になった。

(iii) 多波長異常分散法 (Multiwavelength Anomalous Diffraction: MAD)

多波長異常分散法は異常分散効果を利用して、吸収端近傍を含むいくつかの波長での回折強度データを集めて、異なる波長データ間での強度差より反射の位相角を決定する方法である。

上記の手法(i)及び(ii)では、原子散乱因子は波長に依存しない値として処理されるが、厳密には束縛電子と X 線の共鳴効果による波長依存性がある。この効果が異常散乱 (Anomalous Scattering) であり、通常の原子散乱因子 f^0 との和によって次式のように表される。

$$f = f^0 + f^A = f^0 + f' + if'' \quad (3)$$

ここで、 f' は f^0 と同じ位相角を持ち、 f'' は f^0 と 90 度位相のずれた成分である。例として亜鉛の K 吸収端および白金の L 吸収端での異常散乱効果を図 1 に示すが、 f' は吸収端付近で急激な変化を示し小さな値となる。 f'' は吸収端より短波長側では値を持ち、長波長側ではほぼ 0 である。この傾向はすべての原子において同じである。

そこで、Karle は、異常分散の厳密な取り扱いを行い多波長異常分散法の基本式を示した。ここでは、分子内に 1 種類の異常散乱原子を含む場合の波長 λ における回折強度を以下に示す。

$$|F(\pm \mathbf{h})|^2 = |F_T|^2 + a(\lambda) |F_A|^2 + b(\lambda) |F_T| |F_A| \cos(\phi_T - \phi_A) \pm c(\lambda) |F_T| |F_A| \sin(\phi_T - \phi_A) \quad (4)$$

ここで、

$$a(\lambda) = (f'^2 + f''^2) / f^{02}$$

$$b(\lambda) = 2(f' / f^0)$$

$$c(\lambda) = 2(f'' / f^0)$$

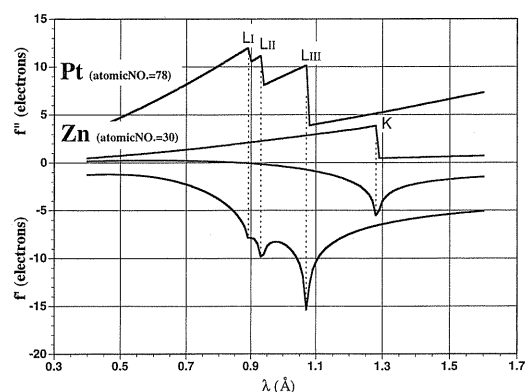


Figure 1. Calculated anomalous scattering factors near the absorption edge of Zn-atom and Pt-atom.

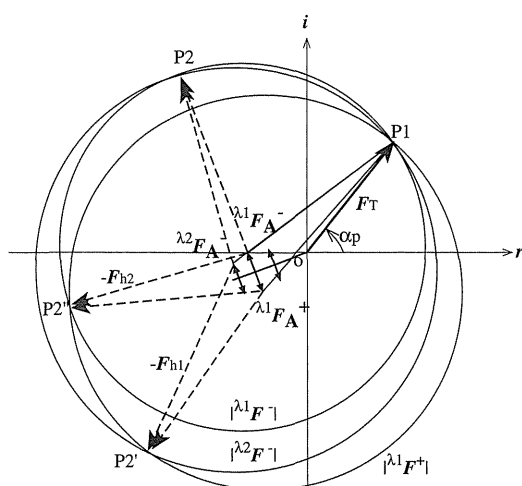


Figure 2. Harker diagram to illustrate phase determination using multiple wavelength anomalous diffraction methods. The intersection of the three circles of typical radii $\lambda^1 F^+$, $\lambda^1 F^-$ and $\lambda^2 F^-$ at P1 indicates that F_T has α_p .

ϕ_T …異常分散を含まない原子からの構造因子

ϕ_T …異常分散を含まない原子からの位相角

ϕ_A …異常分散を含む原子からの構造因子

ϕ_A …異常分散を含む原子からの位相角

(4)式より2波長以上で異常分散効果 $\lambda F(\pm \mathbf{h})$ の測定を行い、 $a(\lambda)$, $b(\lambda)$, $c(\lambda)$ が既知であれば、 $|\phi_T|$, $|\phi_A|$, $(\phi_T - \phi_A)$ の3変数を計算可能である。得られた $|\phi_A|$ より異常散乱因子の位置を求めて、 ϕ_A を計算すれば最終的に必要としている異常分散を含まない原子からの位相角 ϕ_T を得ることが出来る。この関係を複素空間(Harker Diagram)で幾何的に図2に示した。しかしながら、この異常分散差は回折強度に対して微小な量でありMAD法の成功にはさまざまな測定誤差を取り除くことが課題となる。

3. Trichromatic Concept とは

多波長異常分散法に最適化した実験ステーションの設計を進めるに当たって考慮しなければならない点は、上で述べたように位相決定の決め手となる同一波長内及び多波長間での微小な異常分散差による変化量(回折強度の数%)をいかに正確に測定できるかにある。現在の測定方法では、複数の波長での回折強度測定を十分な精度で行うことには大変困難を伴う。そこで、本実験ステーションでは、データに含まれる系統誤差をできるかぎり減らすために、同時に異なる3波長をもちいた回折強度測定を可能にする“Trichromatic Concept”を考案し採用した⁶⁾。

一般的に行われている多波長異常分散法の実験では、偏向電磁石のような白色光源のX線から、1つの分光器により波長を順次切り替えて、複数の波長で回折強度測定を行っていた。この方法は波長の切り替えに伴う波長やX

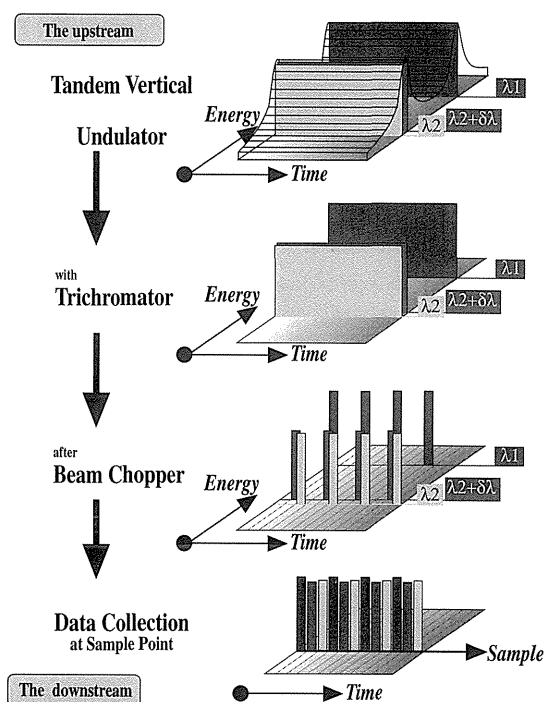


Figure 3. Summary of “trichromatic concept”.

線ビーム強度の再現性・安定性の点などで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必要であるため、1つの結晶で全波長(3波長以上)の回折強度測定を行う間に、X線照射による結晶の劣化によりデータの質を悪くしていた。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な制御による波長切替という新たな工夫が必要となる。

“Trichromatic Concept”では、ビームラインの主要構成要素を見直し、光源には2つの基本波を持つタンデムアンジュレータ、分光器にはトリクロメータと名付けたダイヤモンドを用いた透過型の3波長分光器、検出器にはCCDを利用した高速2次元検出器をそれぞれ新たに開発して、それらを協調的に組み合わせることにより多波長異常分散法による回折強度測定に最適化した。“Trichromatic Concept”の概略は図3に示すように、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波長を同時に切り出す。これを、トリクロメータに組み込んだ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、各波長ごとに秒から数十秒の露出時間で高速2次元検出器による回折強度測定を行う。これにより、アンジュレータや分光器等のセッティングを全く変更することなくビームチョッパーの切替だけで、ほぼ同じ条件下での3波長の回折強度測定が1つの結晶から出来るようになり、MAD法における回

折強度測定時の系統誤差を最小化することが可能である。

4. ビームラインの特徴

理研ビームラインIは図4に示すように、小角散乱と結晶構造解析の2つの実験ステーションでの同時使用を想定した SPring-8 ではじめての分岐ビームラインである。

挿入光源には同一仕様のアンジュレーターを2台直列に並べたタンデムアンジュレーターを採用している。個々のアンジュレーターは、磁場周期37 mm、磁場周期数37で長さ約1.5 m であり、水平配置の分光器に対応した垂直偏光仕様である⁷⁾。独立に制御できる2つのアンジュレーターは、“Trichromatic Concept”における吸収端近傍と対照点の2つの異なるエネルギーの使用と、2つの実験ステーションでの異なるエネルギーを使用した実験に対応する。図5に計算によるアンジュレータースペクトルの一例

を示す。

アンジュレーターからの放射光は、小角散乱用の透過型2結晶ダイヤモンド分光器をビームスプリッターとして使い、水平方向に分岐して小角散乱実験ステーションに導かれる。ビームスプリッターを透過した光はさらにトリクロメータに導かれて、3波長同時に単色化される。トリクロメータは、図6に示すように3対の計算機結合型の2結晶ダイヤモンド分光器を同軸上に配置したものである。それぞれの2結晶分光器は、第1結晶・第2結晶ゴニオメータとリニアガイドから構成されている。ゴニオメータは両結晶に共通の3軸(回折角調整のための回転軸[θ軸]、結晶の回転中心調整のための並進軸[dx軸]、結晶のあおり調整のための傾斜軸[φ軸])を持つほか、第1結晶側にはピエゾ素子による回転軸、傾斜軸の微調節機構を備えている。また、トリクロメータの全ての第1結晶ゴニオ

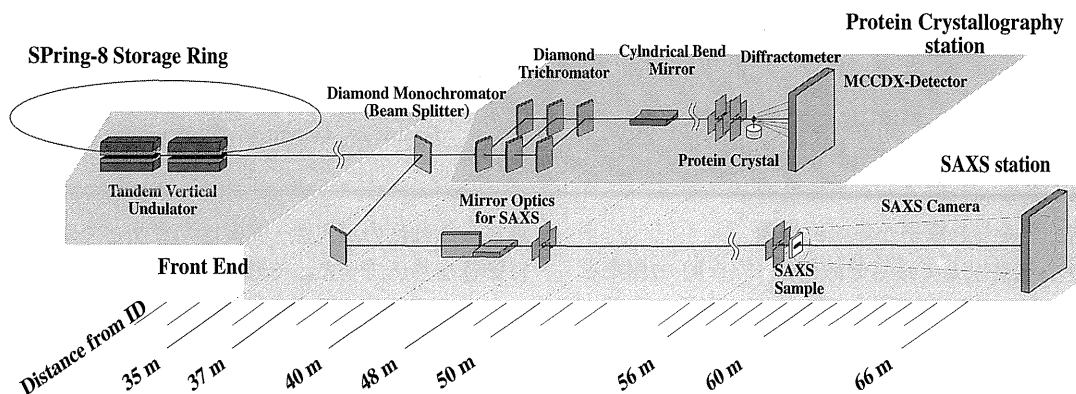


Figure 4. Brid's eye view of RIKEN beamline I for structural biology.

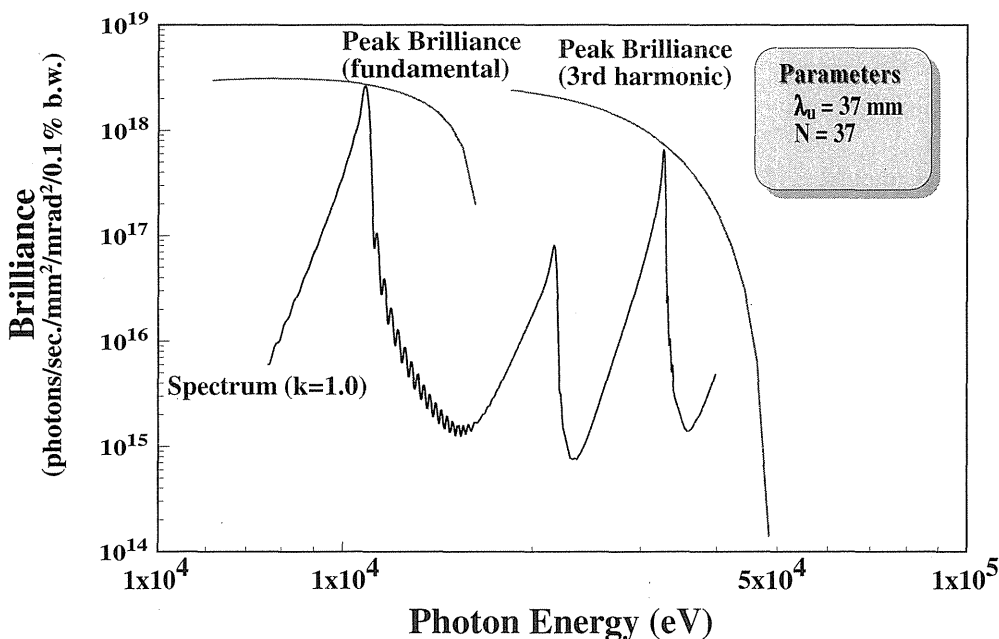


Figure 5. Spectrums of Vertical Undulator. These spectral data were calculated using Synchrotron Radiation Calculation Program, which was made by Prof. Hideo Kitamura at SPring-8.

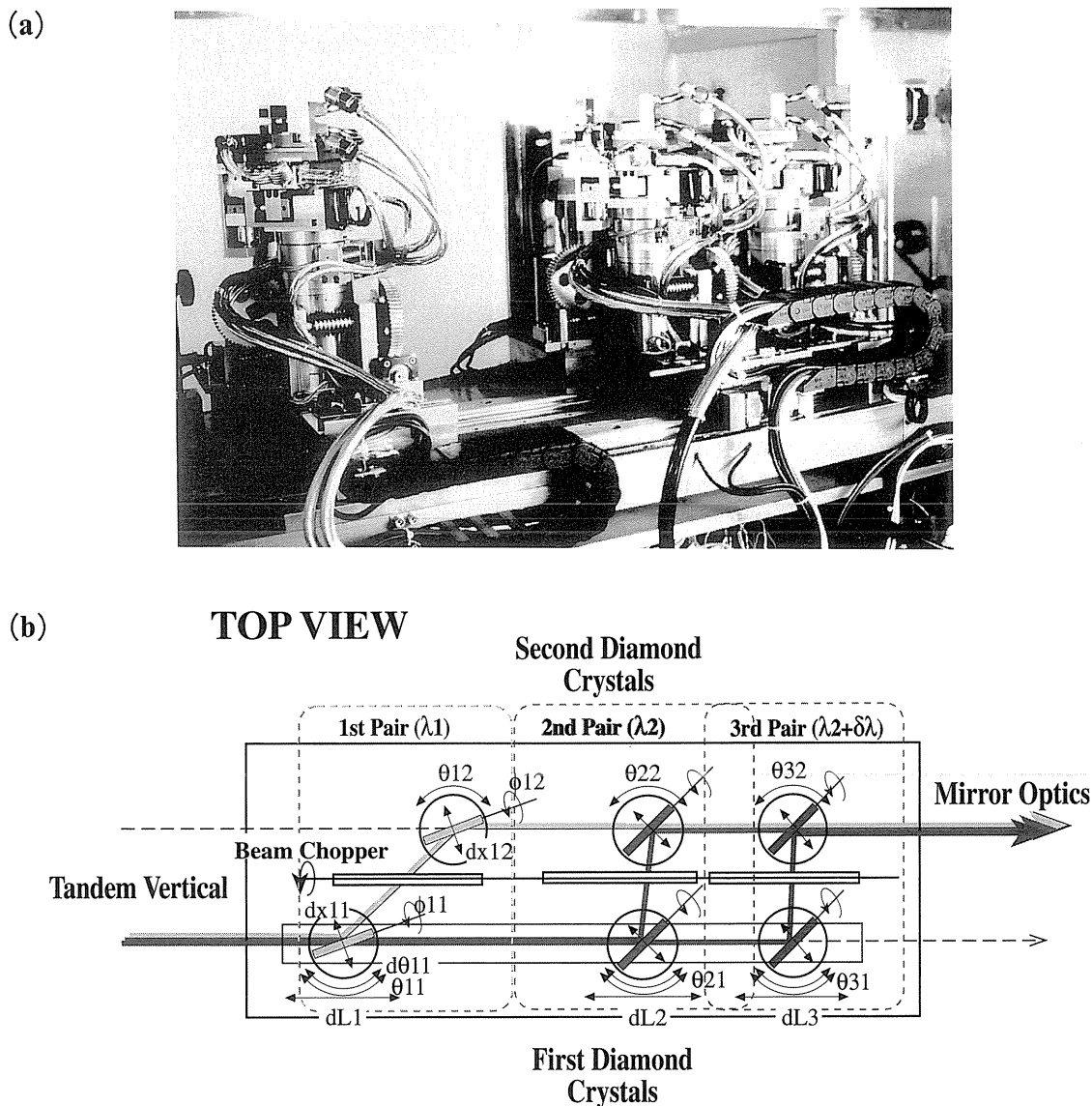


Figure 6. (a) A sideview photograph of the trichromator, and (b) a configuration of the trichromator mechanism. Trichromator contains 3-pairs of diamond double crystal monochromators. The first crystals and the second crystals are mounted on the 4-axis goniometer and the 3-axis goniometer, respectively.

メータは、機能的に一本のリアガイド上に配置した3台の独立なリアモータ駆動ステージ上に置くことにより、各2結晶分光器間の同軸性と全体のコンパクトさを確保している。波長切替を行うビームチョッパーは第1結晶と第2結晶の間に置かれた回転式のシャッターであり、1軸駆動により3波長のあらゆる組み合わせでの出射を制御できる。

図7に、分光結晶として使用しているダイヤモンド結晶を示す。本結晶は、住友電気株式会社により開発された高純度合成ダイヤモンド⁸⁾で、(100)面を表面とする7mm角程度の大きさのものを採用している。ダイヤモンドトリクロメータでは(400)反射を使用し、分光可能なエネルギー範囲は7 keV から15 keV である。第一結晶は熱負荷対

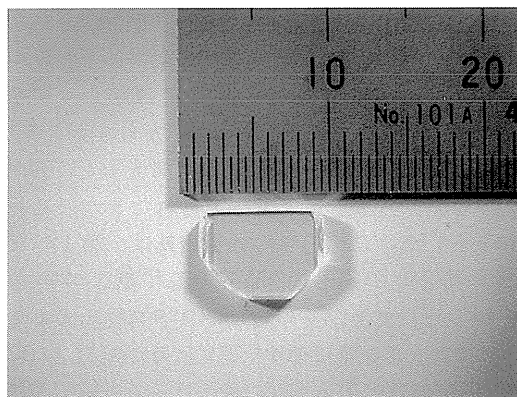


Figure 7. Photograph of a diamond crystal.

策として、水による間接冷却を採用している⁹⁾。

トリクロメータにより分光された放射光は、光源から40 mの地点にあるロジウムコートした円筒面湾曲ミラーにより高調波成分を除去しながら、擬似的に2次元集光して実験ハッチに導かれる。

結晶からの回折データの収集には、実験ハッチ内に設置した2つの検出器用の 2θ アームを備えた5軸回折計を使用する。また、放射光での回折実験には不可欠な吹き付け冷却装置を使用することで、試料の劣化を抑えることができる。

微小な異常散乱効果を有効に活用するために、検出器として異常散乱原子の吸収端測定用のシンチレーションカウンタ系と、回折強度測定効率化をめざした高速2次元検出器であるMCCDXシステム¹⁰⁾を設置する。MCCDXシステムは、16台のCCDX線検出器モジュールを 4×4 の格子状に配列して構成している。各モジュールはX線蛍光体、ファイバー・オプティクス・テーパ、CCD素子を主な構成要素としている。100万画素CCD素子16台は、1 MHzの速度で並列的にデジタル化を行うことができ、1イメージの読み出しは約1.6秒で完了する。

5. 3波長のアンジュレータ光の確認

理研ビームラインIの実験ホール側の建設は、平成8年8月より開始された。放射線遮蔽ハッチの設置を手はじめとして、ビームライン要素の並べ作業、インターロックシステムの設置・調整、制御システムの構築などを経て、分光器等の光学系の最終調整と作業を進めた。

平成9年7月からは、蓄積電流1 mAにおけるビームラインへの放射光の導入作業を開始した。ダイヤモンドトリクロメータの立ち上げ作業には、ダイヤモンド結晶の結晶フォルダーへのマウント法の開発を考慮にいて、厚さ1 mmの結晶を用いることとした。これは、当初の目標としている0.3 mm厚の結晶を用いた場合と較べて、実験ハッチにおける光の強度が、10 keVのエネルギーで1桁程度劣るが、トリクロメータの動作確認およびダイヤモンド結晶の評価においては、問題を簡単にして好都合であった。

1週間という限られた時間ではあったが、トリクロメータにより3波長同時に分光することに成功し、初めてアンジュレータ光の3波長同時使用の可能性を切り拓いた。図8にトリクロメータ直後に設置した蛍光板上で初めて観測したトリクロメータにより分光された3つのビームスポットを示した。このときの分光波長は、第1ペアが9.7 keV、第2ペアが10.2 keVそして第3ペアが9.9 keVであった。また、その時点での空気散乱によるエネルギースペクトルを半導体検出器により測定した(図9)。

2カ月の夏期運転停止期間の後、ビームラインの調整作業を再開し、3波長のアンジュレータ光の実験ハッチ内への同軸射出、実験ハッチ内の回折計の立ち上げ作業等が順

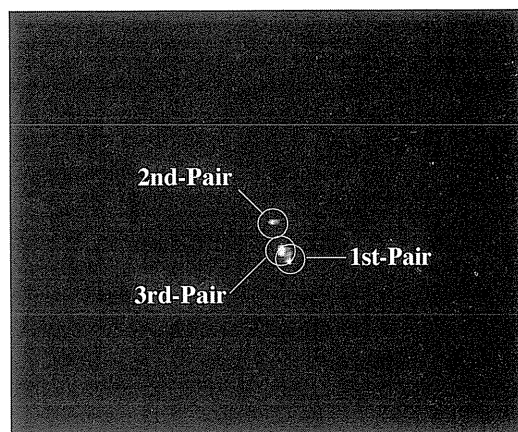


Figure 8. The first image of three undulator spots with three different wavelengths.

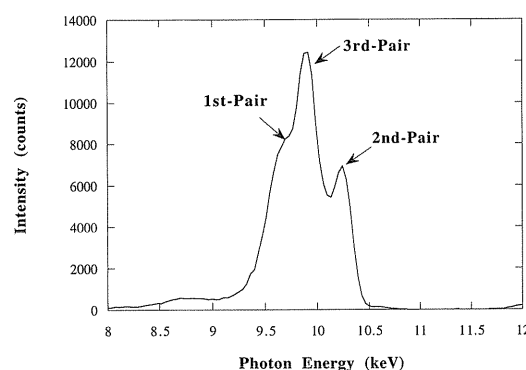


Figure 9. The spectrum of trichromatic undulator beam from the trichromator.

調に行われている。

6. 終わりに

多波長異常分散法では、金属蛋白質や一部の良質の重原子誘導体結晶だけを対象とするのではなく、広く一般の蛋白質結晶構造解析の“位相問題”解決に適用できるように、今後も測定技術の改良、部位特異的な化学修飾による金属ラベル蛋白質作成技術や、セレノメチオニンなどの非天然型アミノ酸を導入した蛋白質の生合成技術の開発が不可欠である。

放射光利用技術の進歩に伴い、蛋白質X線結晶構造解析¹¹⁾も飛躍的な進歩を遂げつつあるが、構造生物学において必要とされる原子レベルでの立体構造の要求に応えるためには更なる飛躍を遂げる必要がある。このためには、結晶構造解析の完全自動化をも視野に入れた技術革新に対する努力が今後とも必要不可欠である。

今回は“Trichromatic Concept”に基づいて建設・立ち上げを進めている理研ビームラインIの蛋白質結晶構造解析ステーションについて、主に設計思想について記述した。ビームラインはまだ立ち上げ途中であり、成果に

についてはもう少し進捗した段階で述べさせていただきたいと考えています。

本ビームラインの設計・建設を進めるに当たり、大変なご援助を頂いた石川哲也先生はじめ SPring-8・共同チームの皆様、ビームラインの立ち上げ作業に全面的にご協力頂いた東京工業大学森山英明博士、大阪大学山下栄樹博士にここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) J. C. Kendrew, G. Bodo, H. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff and D. C. Phillips: *Nature* **181**, 662 (1958).
- 2) J. Karle: *Int. J. Quant. Chem.* **7**, 357 (1980).
- 3) W. A. Hendrickson, J. L. Smith, R. P. Phizackerley and E. A. Merritt: *Proteins* **4**, 77 (1988).
- 4) W. A. Hendrickson: *Science* **254**, 51 (1991).
- 5) T. L. Blundell and L. N. Johnson: *Protein Crystallography*, Academic Press (1976).
- 6) M. Yamamoto, et al.: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1833 (1995).
- 7) T. Tanaka, X. Marechal, T. Hara, T. Tanabe and H. Kitamura: In preparation (1998).
- 8) T. Uruga, et al.: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 2254 (1995).
- 9) H. Yamaoka, K. Ohtomo and T. Ishikawa: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 2116 (1995).
- 10) T. Kumasaka, M. Yamamoto, M. Suzuki and T. Ueki: *Spring-8 Annual Report 1996*, 210 (1997).
- 11) J. R. Helliwell: *Macromolecular Crystallography with Synchrotron Radiation*, Cambridge University Press. (1992).