

SRI '97 特集

## ESRF における蛋白質結晶構造解析用 ビームライン ID14 “QUADRIGA”

若槻 壮市\*, H. BERLHALI\*, E. P. MITCHELL\*,  
W. P. BURMEISTER\*, S. M. McsWEENEY\*\*, R. KAHN\*\*\*,  
D. BOURGEOIS\*\*\*, M. YAO\*\*\*\*\*,  
富崎 孝司\*, P. THEVENEAU\*

\*ESRF, \*\*EMBL Outstation, \*\*\*IBS, \*\*\*\*マックサイエンス(株)・大阪大学蛋白質研究所

### Progress of ID14 “QUADRIGA”, A New Beamline for Macromolecular Crystallography at The ESRF

S. WAKATSUKI\*, H. BERLHALI\*, E. P. MITCHELL\*, W. P. BURMEISTER\*,  
S. M. McsWEENEY\*\*, R. KAHN\*\*\*, D. BOURGEOIS\*\*\*, M. YAO\*\*\*\*\*,  
T. TOMIZAKI\* and P. THEVENEAU\*

\*ESRF, \*\*EMBL Outstation, \*\*\*IBS, \*\*\*\*MacScience・Osaka University

The ESRF undulator beamline ID14 “Quadriga” is dedicated to monochromatic macromolecular crystallography. Using two undulators with 23 mm and 42 mm periods and a minimum gap of 16 mm installed on a high  $\beta$  section, it will provide high brilliance X-ray beams at around 13.5 keV, as well as a wide tuneability between 6.8 and 40 keV. Based on the Troika concept, this beamline has four simultaneously operating experimental stations: three side stations, EH1, 2 and 3, using thin diamond crystals, and an end station, EH4, with a fast-scan double-crystal monochromator. Station EH3 has a  $\kappa$ -diffractometer, and an off-line Weissenberg camera with a large 80 cm  $\times$  80 cm active area combined with a 2k by 2k CCD detector. During data collection, the image plates are placed and removed by a robot located inside the hutch using a casselle system. After the data collection the image plates are scanned with an off-line drum scanner. Station EH4 is designed for MAD applications including Xe K-edge anomalous experiments and is equipped with a 2k by 2k CCD detector on a pseudo  $2\theta$  arm. A common graphical user interface (GUI) and a database will be available to cover all aspects of data collection including strategy optimisation. First results on the performance of the optics elements and initial crystallographic results are presented.

ESRF のアンジュレータビームライン ID14 “QUADRIGA” は単色光蛋白質結晶構造解析のために供用されている。ハイベータセクションに設置された 23 mm と 42 mm の周期長を持つ 2 つのアンジュレータによって、13.5 keV 付近での超高輝度エックス線を供給すると同時に、6.8 keV から 40 keV までの幅広いエネルギー領域にも対応する。先行して供用が開始された TROIKA ビームラインの構想に基づき、この ID14 も 4 つの同時使用可能な実験ステーションを持つ。つまり、3 つの実験ステーション EH1, 2, 3 には薄いダイヤモンド結晶を用いて分光し、

EH4 では透過した白色光を高速スキャン 2 結晶分光器で単色化して使用する。実験ステーション EH3 は回折計として  $\kappa$  ゴニオメータ、検出器として 80 cm  $\times$  80 cm の大面積を持つワイセンベルグカメラと CCD を設置する。回折実験時にはハッチ内に設置されたロボットがイメージングプレートを自動的に交換し、スキャナに装着するカセット内に自動的に取る作業を行う。イメージングプレートはハッチの外に設置されたドラムスキャナで読み取られる。EH4 は多重異常分散法に最適化された実験ステーションで、Xe の K 端の吸収を利用した実験にも対応でき疑似

\* ESRF, BP-220 F-38043 Grenoble, France  
TEL 33-4-7688-2362 FAX 33-4-7688-2542 e-mail wakatsuki@esrf.fr

2 $\theta$ アームと CCD が配置される。実験方法の最適化を含むデータ収集のためのすべての局面で共通のグラフィカルユーザーインタフェース (GUI) とデータベースが使用できるようになる予定である。本稿ではコミッシュニングで得られた最初の結果について報告する。

## 1. イントロダクション

ビームラインの建設・運営はそれぞれの放射光施設の機構、インフラストラクチャによって様々な形態を取り得る。13カ国の共同出資によって運営されている ESRF は必然的に国際的な環境になっているが、蛋白質構造解析用のビームラインは EMBL グルノーブル分室との共同体制、隣接の IBS (Institute Biologique Structures) からの参画等によって、更に強化されている。ここではこれらの点をふまえて ESRF のビームラインの建設・運営がどのように行われているかを述べる。

ESRF は1998年末までに共用ビームライン30本の完成を目標としている。各分野に対するビームラインの配分は計画初期の段階で ESRF マネジメント、サイエンスアドバイザー委員会と協議され、更に各国の官僚によって構成される理事会で承認される必要がある。ビームラインの建設に当たっては最初に責任者が任命される。責任者はビームラインの建設計画を立て、その分野の代表的な科学者を招いてワークショップ開き、計画の是非を問われなければならない。また、ビームライン完成から2年後には、外部の科学者から編成された評価委員会によってビームラインの厳格な評価が行われ、その結果は以後の運営・将来計画等に反映される。

各ビームラインにはスタッフとしてサイエンティスト (任期5年)、ポスドク2人 (同3年)、技官 (パーマネント) が充てられる。ESRF には真空系、電気系、プログラミング系等のサービスグループと呼ばれる部署があり、各ビームラインに担当者が派遣され計画・建設の援助に当たる場合もあり、場合によっては他研究所のスタッフも共同研究者として参加することもある。構造生物学の分野では先に述べたように EMBL との密接な協力体制がしかれ

ているのでサイエンティストとして3人が参加しているだけでなく技官・エンジニア等の協力もある。特に ID14 では、EH4 の責任者として S. M. McSweeney が、また IP スキャナー、ロボットアシスタント、擬似 2 $\theta$ アーム、コリメータ、ビームストップ等を EMBL が担当している。

ビームタイムの申請は年2回 (3, 9月) ある。1000件以上にわたる課題申請は7分野 (生物学、化学、表面化学等) に分けられ各委員会で検討される。ビームタイムは均等に分配されるのではなく、誰もが高レベルと認める実験課題にのみ十分な時間が与えられるが、構造生物学に関連するユーザからのビームタイムの要求は年々増加する一方である。現在は BM14 を除いて蓄積リングの運転期間中を通していつでも使用できる蛋白質結晶構造解析用のビームラインは他になく、殺到する実験要求を消化するためにも新しいビームラインの建設が望まれていた (表1)。ID14 はこれらの要求に応えるために、たった一つの蓄積リングの直線区間を利用するだけで4つの同時使用可能な実験ステーションを稼動できるように設計された。

ID14 “QUADRIGA” (クアドリーガ、四頭だての戦馬の意) は ESRF の蛋白質結晶構造解析用の6番目のビームラインとして建設が進められており、名目上2本のビームラインに相当するのでサイエンティスト5人、共同研究者2人、ポスドク4人、エンジニア1人、パーマネントの技官2人、期限付き技官2人、ソフトウェアエンジニア2人の18人で構成されている。

ビームラインは2段階を経て建設される予定で、まず、光学系と下流の2つのビームライン (EH3, 4) の1997年末の供用をめざし、残りの2つを1998年中を目標に建設を進める。本稿では1997年8月時点でのビームラインの状況を述べる。

## 2. アンジュレータ光と光学系

### 2.1 アンジュレータ光

ID14は最小ギャップ長16 mm、全長1.65 m のアンジュレータを2基使用する。そのうちのひとつは周期長23

Table 1. ESRF beamlines concerned with structural biology

Beamline	Time dedicated to structural biology	Operation since	Specific applications	Detectors
ID2 (PX)	Half	Sep 1995	Monochromatic protein crystallography	IP
ID9	Half	Sep 1995	Time resolved Laue/monochromatic protein crystallography.	CCD, IP
ID13	one quarter	Sep 1995	Micro crystals	CCD, IP
ID14 A/B	EH1	1998	Monochromatic protein crystallography	CCD
	EH2	1998		CCD
	EH3	End 1997	Large proteins and viruses	IP, CCD
	EH4	End 1997	Multiwavelength anomalous diffraction (MAD)	CCD
BM14	Full	Sep 1996	MAD	CCD, IP
ID29	Full	End 1999	MAD on insertion device	(CCD/IP)

\* CRG beamlines are not included in the list.

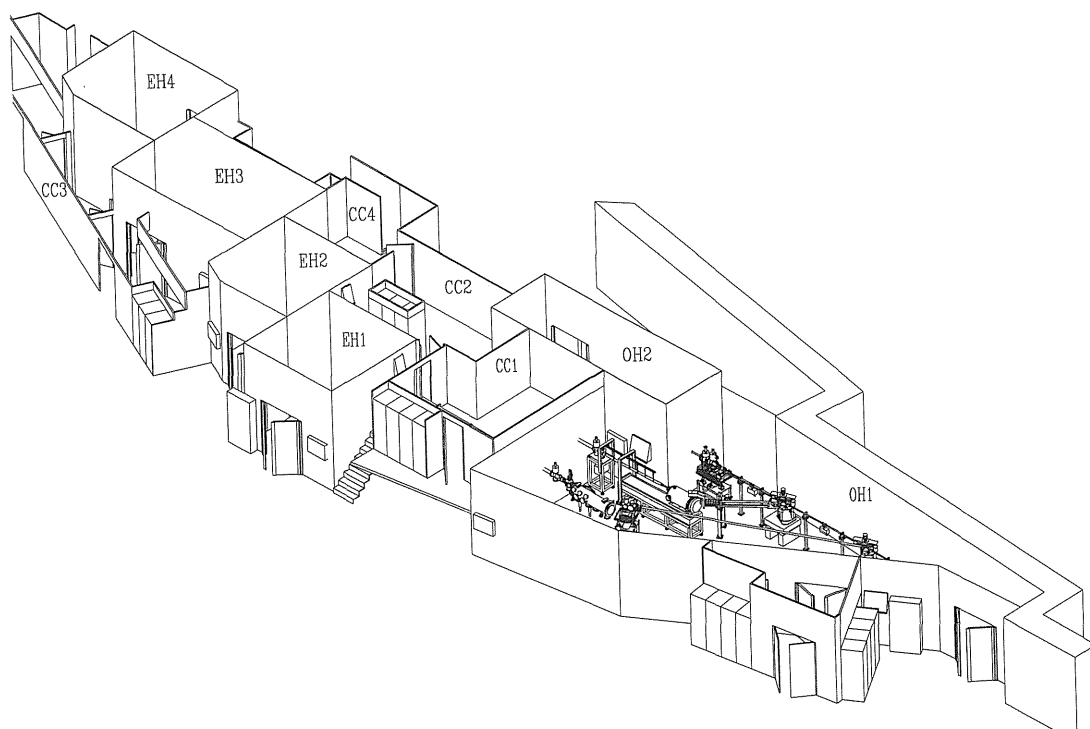


Figure 1. Layout of the four stations, three with diamond monochromators, second monochromator (and multilayer), and one end station. OH1: first optics hatch for pre-pump, primary, secondary slits, three diamond monochromators, and chambers for second monochromator crystals and mirrors; OH2: second optics hatch for the end-station; EH1-EH4 experimental hatches; CC1-CC4: control hatches for users; CCO: control hatch for the optics hatches.

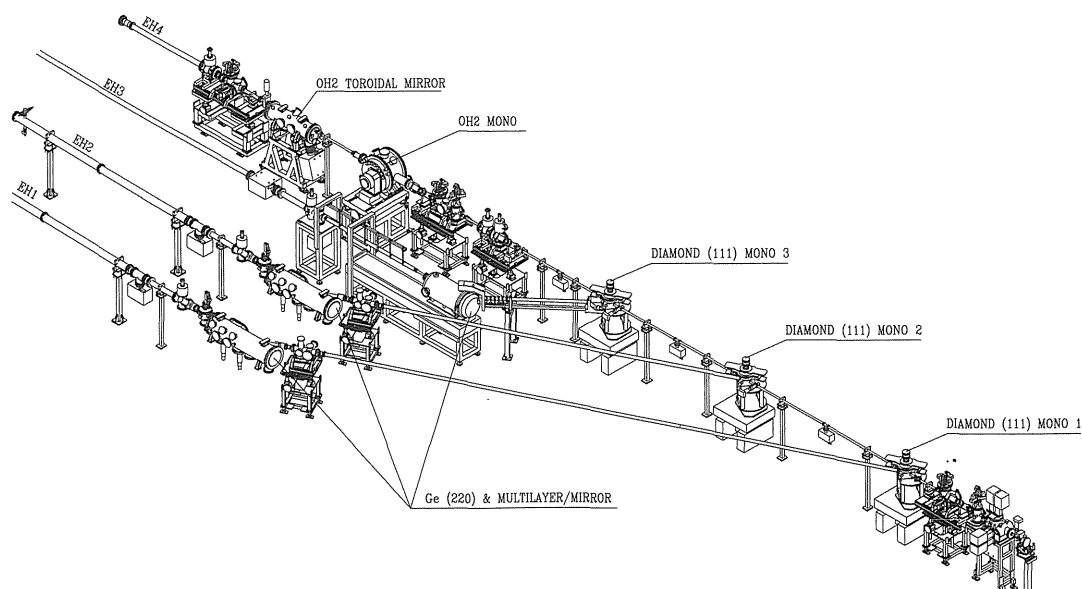


Figure 2. Layout of the optics. Walls of the optics hatches are not shown.

mm で、蛋白質結晶構造解析において多用される大部分の吸収端波長をカバーする11.5から13.5 keV までのエネルギー領域、もうひとつは周期長42 mm で、それ以外を用いる実験のために用意されている。波長領域は限定されているが非常に高輝度の光源を発生するように最適化されて

いる。このアンジュレータはあまり光学系に熱負荷を与えないので前述のアンジュレータと連繋して設置される。

## 2.2 ダイヤモンド光学系

ダイヤモンド光学系は高輝度のエックス線を分光するた

めにも必要不可欠なものである。ブラッグ条件を満たさないエックス線の吸収は微量であり、その優れた熱特性はアンジュレータ光の高いエネルギー密度のため発生する熱処理問題をも解消する。我々は可能な限り高フラックス光を得るため25度から43度の間の発散角が得られるダイヤモンド(111)を選んだ。その結果、(100)軸に沿って研削された非対称ラウエ結晶はほぼ完全結晶に近い挙動を示し、対称ブラッグ(111)結晶のそれとほぼ同等の積分反射を示した (Burmeister et al., manuscript in preparation)。ただし、理論的にはブラッグ結晶はラウエ結晶に対し2倍の反射強度をもつ。後述されるコミッションングのために、厚さ0.1 mm, 7 mm 四方のタイプ Ib (100)ダイヤモンド結晶がラウエモードで使用されている。

われわれの最終的な目標はブラッグモードで(111)ダイヤモンドを使用することである。これは下流の実験レーションのためにアンジュレータ光の減衰を抑えるため、結晶の厚さを100  $\mu\text{m}$  以下にする必要があることを意味する。なぜなら、(111)ダイヤモンド結晶内において、白色光の光路は対称ラウエ結晶のそれに対して4倍の光路を必要とするからである。(111)にそって配向され、要求される完全性を併せ持つ大型のダイヤモンド原材は依然希である。さらに、厚さ100  $\mu\text{m}$  程度の大きな結晶を研削することは困難である。6 mm  $\times$  10 mm 程度のダイヤモンド結晶から50  $\mu\text{m}$  程度の厚さの(111)ダイヤモンド結晶を、レーザーを使って研削する方法を模索している。また結晶の表面の質を向上させる目的で他のグループとの共同研究も行っている。(100)方向に向けられた分光結晶からの(111)反射のロッキングカーブを測定した結果、13.5 keVのエネルギー領域で半値幅の値は3.2 mdegであった。ここで、ダイヤモンド(111)とGe (220)からの組み合わせとして得られるロッキングカーブの半値幅の理論値は同条件で2.2 mdegである (図3)。

ダイヤモンド光学系全体の設計はESRF内で行われ、EH1, 2に使用される光学系の組立も進行している。同時に違うエネルギー領域を使用することによって発生するエネルギーのギャップを最小にするため、ダイヤモンド光学系の角度を最適化するためのソフトウェアを開発した。エネルギーギャップは実験によって確認された。その結果、7から14 keVのエネルギー領域でエネルギーギャップを最小化するために、(111)ブラッグ結晶の(010)軸を垂直方向から30度傾けるべきであることが確認された。

### 2.3 集光

ダイヤモンド光学系から分光された光源は鉛直方向の曲率が6から10 mのサジタルベンドのGe (220)結晶により再び分光される。また、この段階で光源は再びアンジュレータ光とはほぼ平行になる。さらに、水平方向に集光し、なおかつ高次反射を除くために湾曲多層膜ミラーを設置した。

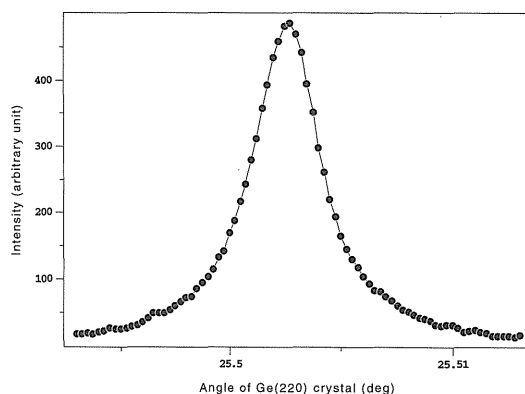


Figure 3. Rocking curve measurement of type Ib (100) diamond crystal using a Ge (220) as an analyzer crystal. The two undulators were operated: U23 16.3 mm, and U42 as 17.11 mm. The beam current was 134 mA with 3 by 3 mm<sup>2</sup> slits after two absorbers, 2.5 mm of carbon and 1 mm of aluminum. The theoretical rocking curve widths of diamond (111) and Ge (220) reflections are 0.9 mdeg and 1.9 mdeg, respectively, at 13.5 keV, which gives rise to a convoluted rocking curve width of 2.2 mdeg (Sanchez del Rio & Dejus, in press).

多層膜ミラーはバイモーフ圧電性のセラミック部材の上にシリコンを支持体として使用している。さらに68 Åの面間隔でルテニウムと炭化ホウ素を約100層蒸着している。最近の実験では13.5 keVにおいて約65%の高い反射率を示している。多層膜ミラーはバイモーフ素子に高電圧をかけて湾曲させることにより、集光の作業を容易にする。さらに、集光後のエックス線の位置が変化しないようバイモーフ素子を配置するため、特殊な架台が設計された。

この光学系は8.2 keVから13.8 keVまでのエネルギー領域で使用可能である。そのため、第2結晶と多層膜ミラーはダイヤモンド光学系から分光された光源に追従するため約2 m, ユニットごと並進することが可能である。サジタルフォーカスのモーター駆動ベンダと多層膜ミラーのバイモーフ素子ベンダはこの全てのエネルギー領域で位置を最適化することができる。

エックス線の強度と位置の安定性はユーザの実験において非常に重要であるが、これは光学系ハッチ内の正確な温度管理と御影石による頑強な光学系の架台によって達成されている。

これまで、1運転サイクル中の熱負荷の変化に対して、ビームの位置や強度には影響が見られていない。実験ハッチ内でサンプル位置 (0.3  $\times$  0.3 mmのスリットの downstream) でエックス線強度の測定を行った結果は満足のいくものであった。この時、ゲルマニウム結晶は湾曲されておらず、多層膜ミラーは集光のために用いていた。

### 2.4 第2光学ハッチ OH2

ダイヤモンド光学系はエックス線をほとんど透過させるので、このハッチ内の光学系はアンジュレータ光の強大な

エネルギーに耐えうる仕様でなければならない。そのため、2結晶分光器は液体窒素で冷却されている。分光のための結晶には対称・非対称研磨のSi (111)および、(311)を使用する。本分光器は分光用結晶を高速(0.5度/秒)に回転することができるので迅速にエックス線のエネルギーを変更することができる。また、これは上流のダイヤモンド光学系で発生するエネルギーの損失を検出するためにも不可欠な機能である。

エックス線はさらに光源から47 mの位置に設置されたトロイダルミラーによって集光される。ミラーの設計は光源から67 mの位置にあるEH4の試料位置で最適な集光効果が得られるように設定された。ミラーの全長は80 cmで10-15 keVのエネルギー領域の吸収端を回避するためにロジウムが蒸着されている。レイトレーシングによるシミュレーションで $0.5 \times 0.4$  mm(半値幅)まで集光可能であると計算されている。

### 3. 実験ステーション

ダイヤモンド光学系を使うことで4つの実験ステーションは同時に使用することができる。そのため、最初の3つの実験ステーションはお互いに干渉しないようにわずかに違う波長を使用することになる。EH3での波長はビームタイム中(各ユーザ3-6シフト, 24-48時間),あるいは24時間の間固定されるが, EH1, 2においては常に固定され変更されることはない。ダイヤモンド光学系のロックアップ幅は非常に狭く(数eV以下), これら3実験ステーションでの波長は $0.001 \text{ \AA}$ 程度の誤差になるはずである。

#### 3.1 実験ステーション EH1, EH2

これらの実験ステーションはビームライン建設計画の最終段階で建設される予定である。現在は設計が進行しており, 1998年初頭に光学系の設置が始まる予定である。光学系の設計はEH3のそれに倣って, EH3でのコミッションの経験が生かされるであろう。ただし, これらのステーションでは23 mm アンジュレータの $0.92 \text{ \AA}$ 付近のピークを使用する予定であるが, ダイヤモンド光学系から分光器の第2結晶までの光学系が現在のところ懸念事項となっている。その距離はそれぞれ9, 13 mであるが, その区間をできるだけ単純化することを念頭において設計を進めている。

EH2は分光器の第2結晶にゲルマニウム(220)を使用し, その下流にトロイダルミラーを配置する。波長が可変ではないのでミラーは固定形状とする。この事によって構造を単純化することが可能になるだけでなく, 経済的にも効果がある。EH1はEH3と同じくサジタルフォーカスのゲルマニウムかシリコン結晶を分光用の第2結晶として使用しメカニカルベンダーで駆動される多層膜ミラーをその後配置する。

これらの実験ステーションは立ち上げ時にCCD検出器と $\phi$ ゴニオメータが設置される予定である。

#### 3.2 実験ステーション EH3

EH3は $\omega$ 軸が水平の $\kappa$ ゴニオメータと, ヘリウムチェーンパーも使用できるワイセンベルグカメラ, 取り外し可能なP2レベルの実験を行うためのカバー,  $2\theta$ アーム上のCCDカメラなどで構成される(図4)。

ワイセンベルグカメラの検出器は $40 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$ のイメージングプレートが1枚, もしくは2枚使用できるので, 最大 $80 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$ の有感面積をもつ。結晶から検出器までの距離は360 mmから2000 mmまで自由に設定できる。実験中のユーザによる作業をなくすため, ハッチ内に設置されたロボットがロボットアシスタントと呼ばれる他のデバイスとともに, イメージングプレートを最高16枚収納可能なカセットから検出器に固定する作業を行う。それぞれのカセットとイメージングプレートにはバーコードが添付されており, データベースで管理するための認識番号として使用される。データベースは全てのイメージングプレート読み取りのためのデバイスで使用され, 実験中にユーザの手を介することなく読み取りを行うことを可能にしている。ロボットは面倒なインターロックの手続きを必要としないので実験時間を可能な限り短縮することができる。

イメージングプレートを使用した平板カメラはエックス線に垂直な, どの方向にでも並進させることが可能である。格子定数や結晶方位などが分かれば, 最適なカップリング定数やそれらに応じた振動角を計算することができる。この独特なワイセンベルグカメラの動きとスピンドル軸の同期によって, より有効な検出器の利用が可能となり, ほんの数枚のイメージングプレートで完全なデータ収集を達成することも可能である。

併せて設置されるCCD検出器は結晶の軸立て誤差角の補正やワイセンベルグ写真のためのパラメータの決定, イメージングプレートを使った実験中の結晶の回折能の減衰, 結晶の質の評価などに利用される。CCDは $2\theta$ アーム上に設置されているので間接的に移動することができる。後述するようにコミッション時の回折実験はワイセンベルグ運動を使用せず, 振動写真法によって行った。

ドラムスキャナは $40 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$ のイメージングプレートを最高16枚まで収納可能なカセットから自動的に読み出すために設計された(Cipriani et al., 1997)。イメージングプレートは読み出しの度に一枚づつカセットから取り出され, 圧搾空気を利用して円筒形のドラムに吸着される。また, それぞれのイメージングプレートはバーコードによって識別され, その状態や回折実験に関する情報とともにデータベースによって管理される。読み取りの後, イメージングプレートはカセットに戻され, データベースの更新が行われる。この一連のプロセスがカセット内のすべてのイメージングプレートが読み取られるまで繰り返される。

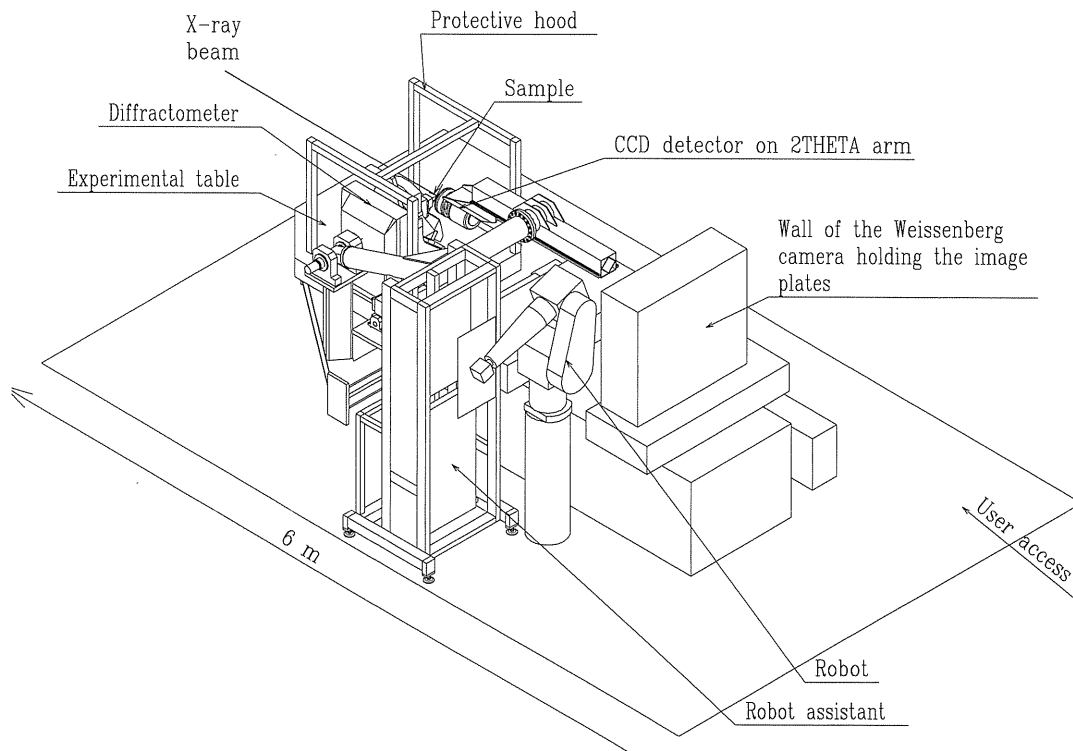


Figure 4. Schematic diagram of the experimental station ID14/EH3. The Weissenberg camera and the robot installed in the experimental hutch are shown together with an alignment table, the diffractometer, the CCD detector and the robot assistant.

る。

### 3.3 多重異常分散法用実験ステーション EH4

この実験ハッチ内の装置はアンジュレタ光の利点を全て利用することができる。EH3と同じ $\kappa$ ゴニオメータと、擬似 $2\theta$ アーム上に取り付けられた CCD が組み合わされる。この $2\theta$ アームには約1メートルの並進架台上に擬似 $2\theta$ 運動を行うための架台が装着される。CCDは $2000 \times 2000$ ピクセル四方のチップにテーパード光ファイバーを結合したもので有効面積は直径133 mmである。読み出し時間は約20秒でその内訳は16ビットアナログ・デジタル変換器を通してメモリ上にデータを読み込むのに5秒、ハードディスク上にデータを書き込むのに5秒、空間の歪みや検出器の誤差の補正に10秒となる。検出器はLinuxが稼動する、Pentium Proを中央演算装置とするPC互換機によって制御される。回折計はユーザの要求に柔軟に対応し、迅速なデータ収集を可能にするソフトウェアProDCと接続される予定である。

また、超短波長、たとえばXeK吸収端などを用いた回折実験では集光ミラーは使用できないので光軸からはずすことも可能である。これにより、集光されていないエックス線を使用することになる。同時に、実験台の高さも迅速に変更することができる。

### 3.4 試料調整室

シンクロトロン放射光を十分に使いこなすためにも、実験ステーションの側に試料調整室を設置する必要がある。ビームラインの付近には重原子誘導体の調整や、結晶のマウント、クライオ実験のための試料調整のために使用される部屋が建設中である。また、EH2にも試料調整用の区画が実験ハッチの前にあり、EH3は居室の一部を結晶マウントのための場所としている。EH4は隣のビームラインBM14の試料調整室を使用することになる予定である。EMBL グルノーブル分室はより総合的な生化学実験室をユーザのために提供している。

## 4. データ収集と解析

実験ステーションの大部分はヒューレットパッカード社のUNIXワークステーション上のGUIで制御され、装置の制御はOS9とSPECを稼動させたVMEにより行う。データ収集に用いられる計算機はさまざまにCCDの制御には前述したようにLinuxを稼動させたPC互換機、スキャナにはヒューレットパッカード社のUNIXワークステーションが使用される。データ処理のためにはシリコングラフィックス社のUNIXワークステーション(O2, Origin200)が用意されている。それぞれの計算機はビームライン内で100Base-T, 10Base-TによってLANを構築しており、また、ATMネットワークを介してESRFの

NICE システム (Networked Interactive Computing Environment) に接続されている。回折実験によって得られたデータはこの NICE 上に一時保存されることになるが、これはデータ処理がデータの質や完全性の評価から電子密度の作成までを考慮に入れているためである。実験の進行状況にもよるが、画像データの量は各実験ステーションに対して 1 日 1, 2 ギガバイトから多くて 150 ギガバイト程度と見積もっている。

ビームライン制御から、回折実験データの評価まで含めた総合的なソフトウェア ProDC の開発が進められている。その機能としては

1. 回折実験の進行に合わせて自動的にデータ処理を進行させる。
2. GUI によって、異なる計算機上で実行中の異なるプロセスを制御する。
3. 格子定数と結晶方位、空間群から最適な実験条件をユーザに提案する。この条件には実験台上の装置と  $\kappa$  ゴニオメータの干渉を考慮した異常分散の測定のために最適化された方位の検出や、過去に測定された同じ結晶の欠けたデータを補う条件なども含まれる。
4. DENZO, SCALEPACK, MOSFLM や CCP4 などのプログラムパッケージを共通のインタフェースでできるようにする。
5. ビームラインで大量に生成されるデータに対処するためのデータベースも利用される予定である。

ProDC は ID2 ですでに 1 年半にわたって使用されている。

データ収集条件最適化プログラム (Yao et al. in preparation) は多くの回折計 ( $\phi$  ゴニオメータ,  $\kappa$  ゴニオメータ, 4 軸型回折計) に対応し, MOSFILM, DENZO のどちらからでも必要な結晶学的パラメータを取り込むことができ完全性, 重複度, 異常分散測定などユーザの要求に応じて最適な実験条件を計算することができる。また, 過去に測定した回折データを補完するための条件も計算可能である。現在, ProDC に統合する作業が進められている。

## 5. 最初の構造解析の結果と考察

夏季シャットダウン前の限られた時間でマイロシネース, ルシフェラーゼ, トロピノンレダクターゼ II などの回折実験が行われた (表 2)。この目的のために, 簡略化されたゴニオメータとシャッターの同期システムが使用された。回折像は大型イメージングプレートで収集し, ワイセンベルグ運動は用いなかった。この時点ではロボットが稼動していなかったためイメージングプレートは手動で取り替えた。回折実験は室温で行われたが, どの結晶も高分解能まで回折を示した。回折像の例を図 5 に示す。データ処理は HKL パッケージ (Otwinowsky, 1993) と CCP4 パッケージ (CCP4, 1994) が使用された。

EH3 で最初に回折実験を試みられた結晶は斜方晶系のマイロシネース (Burmeister et al., 1997) で, 室温で振動角 14 度分の回折像を収集した。これが表 3 における完全性が低い (21.6%, 表 3) 理由である。しかしデータの質は 1.6 Å で Rmerge 3.7% と満足のものであった。c 軸の長さが 340 Å (表 4) のトロピノンレダクターゼ 2 (表 4) においては格子定数にもかかわらず回折点がよく分離されていた。さらに, 実験室系の対陰極 X 線発生装置では 2.5 Å までしか回折を示さなかったものが, 1.8 Å を越えて回折を示した (図 5)。分子置換法によって 1.9 Å 分解能で構造解析を行った結果得られた, 2Fo-Fc マップの 155 番目の残基であるチロシン付近の電子密度を図 6 に示す (Yamashita et al. in preparation)。

表 3, 4 に示した結晶学的データには部分反射のデータが含まれていないが, これは回転軸とシャッターの同期が思わしくなかったからである。現在では, その問題は解消している。

ワイセンベルグカメラの 8000 × 8000 ピクセルという有感面積は非常に格子定数の大きい超分子複合体や超高分解能が得られる結晶の回折強度収集を可能にする。たとえば, 波長 0.92 Å でカメラ長が 1000 mm の場合, 検出器の端では 2.4 Å までの回折が記録可能である。この条件では, 最大格子長 1592 Å のブルータンングウイルスでも回折点を 0.57 mm 間隔で分離することが可能である。モザイ

Table 2. Crystallographics projects carried out during the commissioning of EH3/ID14 between July and October 1997

Protein	Results	Detector	Names
Myrosinase	Difference map shows vitamin-C and a bound sugar	IP & CCD	W. Burmeister et al. (ESRF)
Tropinone reductase II	First structural result from ID14/EH3: ternary complex, 1.9 Å structure shows the substrate and NADP	IP	H. Kato, A. Yamashita (Kyoto), T. Tomizaki, S. Wakatsuki (ESRF)
Bovine heart mitochondria bc1 complex	P6 <sub>1</sub> , a=b=127 Å, c=720 Å, spots well separated, but weakly diffracting	IP	S. Iwata, K. Okada (Uppsala)
Mitochondria import stimulating factor	MSF-S crystals diffracted to 3.5 Å	IP	Y. Morimoto (Himeji), T. Tomizaki, S. Wakatsuki (ESRF)
Gambif 1 (NF-κB/Rel family)	Diffraction data to 3.3 Å shows good density, but didn't show one of the subunits clearly	MAR CCD	P. Cramer & C. Müller (EMBL)
Blue tongue virus core particle 1	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> , a=798 Å, b=825 Å, c=756 Å, diffraction to 3.8 Å	IP	D. Stuart et al. (Oxford)



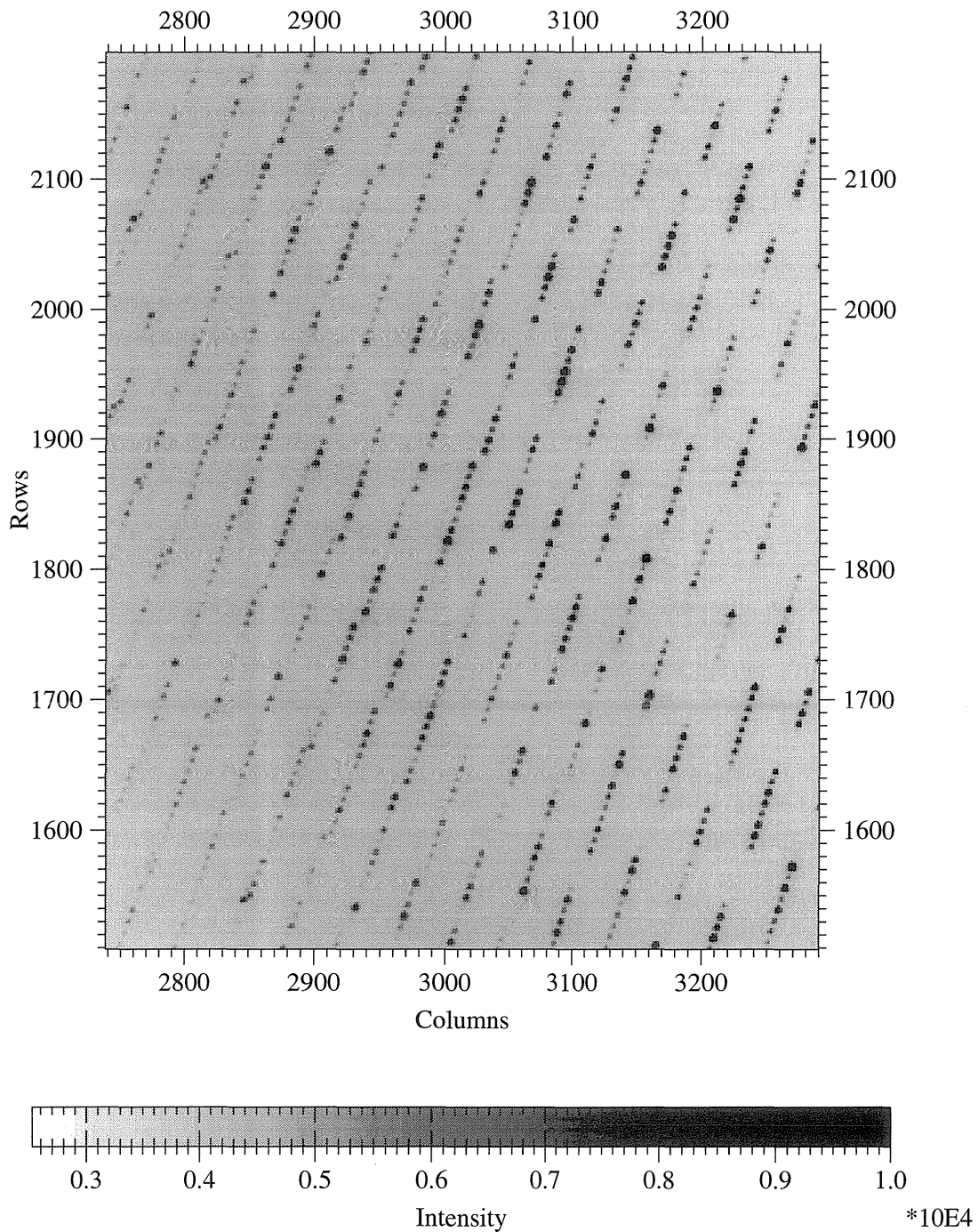


Figure 5. A diffraction image of a tropinone reductase II crystal (space group  $P6_122$ ,  $a=89.7 \text{ \AA}$ ,  $b=89.7 \text{ \AA}$ ,  $c=340.2 \text{ \AA}$ ) taken on ID14/EH3. Exposure time was 120 sec for a  $3^\circ$  oscillation. The image plate was scanned with  $100 \mu\text{m}$  raster which gives 4000 pixels by 8000 pixels (64 Mbytes). The crystal-to-detector distance was 360 mm and the wavelength  $0.918 \text{ \AA}$ .

シティが十分に小さければこれは実現可能な回折実験となる。また、カメラ長を360 mmに設定して同じく $0.92 \text{ \AA}$ の波長を使用すれば検出器の端では $1.1 \text{ \AA}$ まで回折像を記録することが可能になる。

大型イメージングプレート用スキャナが他の回折実験のための装置・ソフトウェアと同時に稼動するようになれば

超分子複合体の結晶学的データを収集するための最適な設備を提供することになる。CCDカメラを用いて迅速に質のよい結晶を検索し、最適化された条件で結晶が損傷を受ける前に迅速に完全なデータセットを収集することができる。これは、極低温で凍結することができないために結晶の損傷が重大な問題となるウイルス結晶に対して、特に有



Table 3. Scaling statistics of a partial data set of myrosinase (Burmeister et al., 1997)

Cell parameters:	137.73 Å, 140.53 Å, 82.76 Å, 90°, 90°, 90°
Space group:	C22 <sub>1</sub>
Crystal to camera distance:	360 mm
Wavelength:	0.918 Å
Oscillation angle:	2 degrees
Exposure time:	40 s of two 20 s passes
No. of images:	7

(partial reflections are not included)

## Statistics by resolution

Dmin (Å)	Rfac	Rcum	I/sigma	%poss	Multiplic
12.0					
5.87	.017	.017	44.7	26.6	1.3
3.86	.019	.018	34.3	33.0	1.2
3.08	.024	.020	29.6	35.1	1.3
2.64	.037	.023	20.1	33.4	1.3
2.48	.041	.025	18.0	32.0	1.3
2.14	.059	.029	13.0	29.0	1.3
1.97	.078	.032	9.6	25.3	1.3
1.90	.098	.033	7.6	19.4	1.2
1.73	.121	.035	6.4	11.1	1.2
1.64	.119	.035	6.1	6.1	1.1
1.60	.120	.035	6.6	3.6	1.1
Total		.035	19.8	21.9	1.3

## R-factor statistics by ranges

I <sub>max</sub>	Rfac	I/Sigma	N <sub>meas</sub>	N <sub>ref</sub>
1500.	.164	4.4	844.	397
3000.	.126	5.9	2984.	1359
4500.	.081	9.3	1573.	705
6000.	.061	12.6	997.	456
7500.	.051	15.3	823.	376
9000.	.044	18.2	546.	258
10500.	.041	19.4	452.	208
12000.	.038	21.3	357.	167
13500.	.031	25.9	314.	152
15000.	.030	25.7	247.	113
16500.	.024	32.4	262.	122
18000.	.027	29.0	191.	89
193127.	.019	38.9	1969.	950
Total	.035	19.8	11559.	5352

効であろう。

## 6. 結論と今後の展開

ビームラインの建設のコミッショニングは2年間にわたり有意義に進められた。現在では実験ステーションEH3, 4がまもなく利用可能な状態にある。ダイヤモンド光学系からの実験結果は大変勇気づけられるものであった。光学系は“TROIKA 構想”を最初に具現化したものであり、EH3での回折実験結果は超分子複合体の高分解

Table 4. Scaling statistics of tropinon reductase II data (Yamashita et al., in preparation)

Cell parameters:	89.69 Å, 89.69 Å, 334.77 Å, 90°, 90°, 120°
Space group:	P6 <sub>1</sub> 22
Crystal to camera distance:	360 mm
Wavelength:	0.918 Å
Oscillation angle:	3 degrees
Exposure time:	120 sec of two 60 sec passes
No. of images:	12

(partial reflections are not included)

## Statistics by resolution

Dmin (Å)	Rfac	Rcum	I/sigma	%poss	Multi.
12.00					
6.74	.049	.049	12.5	65.0	2.6
4.38	.049	.049	13.0	83.9	3.1
3.86	.050	.050	12.6	88.8	3.4
3.20	.054	.051	11.5	93.0	3.7
2.98	.061	.052	11.2	92.4	3.7
2.65	.073	.055	9.9	90.4	3.5
2.31	.087	.059	8.4	86.3	3.3
2.22	.096	.060	7.7	82.9	3.3
2.07	.111	.063	6.7	77.8	3.0
1.89	.144	.066	5.1	61.3	2.5
1.80	.154	.067	4.7	45.4	2.0
Total		.067	8.9	77.1	3.1

## R-factor statistics by intensity ranges

I <sub>max</sub>	Rfac	I/Sigma	N <sub>meas</sub>	N <sub>ref</sub>
2000.	.165	4.5	66445.	20136
4000.	.098	11.2	18703.	4789
8000.	.060	13.1	10734.	2741
10000.	.054	14.4	7445.	1903
12000.	.052	15.1	3900.	997
16000.	.049	16.1	3274.	820
18000.	.049	16.0	2351.	617
20000.	.045	17.2	1853.	496
22000.	.047	16.8	1838.	464
24000.	.046	17.0	1361.	364
118558.	.046	16.6	7052.	2070
Total	.067	8.9	168701.	46620

能回折像のデータ収集の新たな可能性を約束するものである。EH4はESRFにおいてアンジュレータ光による多重異常分散法に特化した実験ステーションとしては最初に供用が開始される予定である。建設計画が順調に進めば、ID14はESRFにおける蛋白質X線結晶構造解析ビームラインの60%を占めることになる。

我々は1997年春から欧州放射光施設の構造生物学の共通テーマとして、「真核生物細胞内の蛋白質輸送」を選び研究を開始した。その第1課題としてミトコンドリア内部の各部分への蛋白質輸送に関わる分子シャペロンと膜透過の受容体、第2課題として小胞体とゴルジ体間の蛋白質

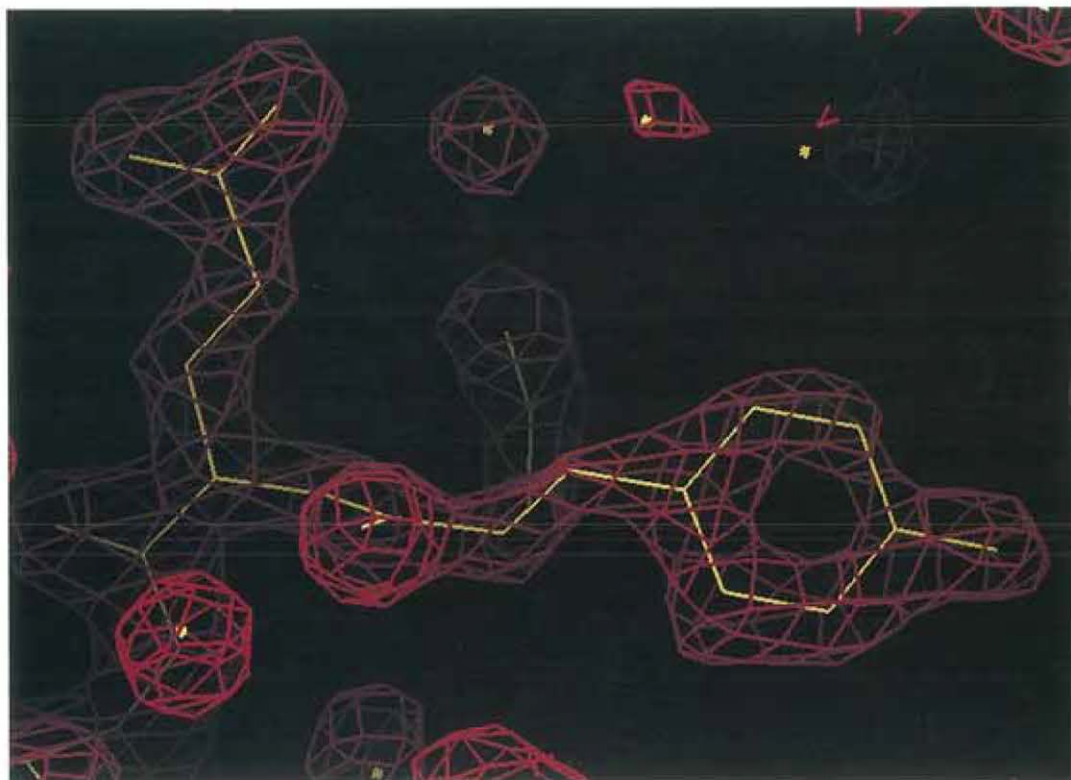


Figure 6. Part of the 2Fo-Fc electron density map of tropinone reductase II showing a tyrosine residue, Y155. The contours were drawn at  $2\sigma$  level from the map calculated using data between 10 and 1.9 Å.

輸送に関わる G 蛋白質とその GTP-GDP 交換因子を結晶学的に取り組むことにし、今後重点的に研究を進める予定である。

#### 謝辞

ESRF と EMBL グルノーブル分室の Joint Structural Biology Group のメンバーに協力と助言をいただいたことに感謝いたします。ビームラインのために大型イメージングプレート用のドラムスキャナを設計・作成した EMBL グルノーブル分室の F. Cipriani, J.-C. Castagna, トロピノンレダクターゼ 2 の結晶を提供していただいた、京都大学化学研究所の加藤章博、山下敦子両氏、回転軸とシャッターの同期のために協力してくれた R. Holaday にも感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) J. Als-Nielsen, A. K. Freund, G. Grubel, J. Linderholm, M. Nielsen, M. Sanchez del Rio and J. P. F. Sellschop: Nucl. Inst. & Methods, B94, 306-318 (1994).
- 2) W. P. Burmeister, S. Cottaz, H. Driguez, R. Iori, S. Palmieri and B. Henrissat: Structure 5, 663-675 (1997).
- 3) F. Cipriani, J.-C. Castagna, L. Claustre, H. Blampey, C. Wilkinson, T. Tomizaki, W. P. Burmeister and S. Wakatsuki: ESRF Newsletter, No 28, 30-32 (1997).
- 4) Collaborative Computational Project Number 4 (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography", Acta Cryst. D50, 760-763.
- 5) G. Grubel, J. Als-Nielsen and A. K. Freund: J. de Physique IV, vol 4, C9-27 (1994).
- 6) M. Mattenet, et al.: J. Synch. Rad. in this issue.
- 7) Z. Otwinowski: in Proceedings of the CCP4 Study Weekend, L. Sawyer, N. Isaacs, S. Bailey, eds., SERC Daresbury Laboratory, UK. 56-62 (1993).
- 8) M. Sanchez del Rio and R. J. Dejus: "XOP: A Multiplatform Graphical User Interface for Synchrotron Radiation Crystal and Optics Calculations", SPIE proceedings vol. 3 152, 1997, in press.