

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月22日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570124

研究課題名（和文） 超微小タンパク質結晶試料可視化技術の開発による全自動データ収集の実現

研究課題名（英文） Development of automated visualization system for very fine protein crystals

研究代表者

五十嵐 教之（IGARASHI NORIYUKI）

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：80300672

研究成果の概要（和文）：本研究では、可視光では認識困難な微小結晶試料を、エッジ強調により認識可能にする装置を開発し、自動認識アルゴリズムを開発することにより、微小結晶試料の全自動測定システムの開発に繋げることを目的とした。研究を進める上で、視界深度不足、微小領域照度不足などの問題が明らかになり、全自動測定システムに組み込むには至らなかったが、ハードソフト両面で要素技術開発はほぼ終了することができ、実用化への目途を立てることができた。

研究成果の概要（英文）：We pursued development of automated visualization system for very fine protein crystals using edge enhancement of very fine crystals by controlling light direction. We completed development of elemental technology of micron-size visualization system and will do further development in order to implement this system into fully-automated data collection system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析・可視化・測定の自動化技術

## 1. 研究開始当初の背景

高輝度放射光の高度化と汎用的な利用により、X線結晶構造解析を適用可能な結晶試料サイズがどんどん小さくなり、構造生物学研究の発展に大いに寄与していた。結晶試料サイズも数十ミクロン程度まではルーチンで解析可能になっていたが、さらなるサイズダウンが求められていた。特に、膜タンパク質や超分子複合体などの生物学的に重要な機

能を持つタンパク質に解析のターゲットが移りつつあったが、これらのタンパク質は複雑な分子構造を持つが故に、結晶成長が進まないだけでなく、結晶ができたとしても個々の品質（結晶性）が均一でない場合が多い。そのため、多くの結晶試料をスクリーニングする必要があり、自動化や高速化、高精度化による微小結晶試料のハイスループット測定の実現が求められていた。放射光ではマイ

クロビームビームラン及びその周辺技術について開発が開始され、その中でもカギを握るのがクライオルーブ内の微小結晶試料認識であり、近喫の開発課題であった。

## 2. 研究の目的

微小結晶試料の認識には、エッジ抽出やコントラスト法などの画像解析技術の適用や偏光を利用した複屈折特性、X線マイクロビームスキャンなど様々な方法が試されていたが、それぞれ微小結晶試料のコントラストの小ささや、X線照射によるダメージの問題などがあり、カッティングエッジとはなっていない。また、赤外線や紫外線の利用による結晶検知も試みられていたが、回折計の試料周辺に特別に装置が必要なこと、画像取得に用いられるカメラが赤外や紫外だけでなく可視光にも感度があることから明エリアではやはり画像のバックグラウンドが高くなることなどがあり、ルーチンには実用化できていなかった。

本研究では、光源の工夫及び画像抽出技術を組み合わせることにより、結晶試料に与えるダメージの少ない可視光を用いながらも、微小結晶試料（ミクロンサイズ）のようなコントラストがつかない試料でもエッジを際立たせ、容易に結晶試料認識できる手法の開発を目指した。また、クライオルーブ認識用のラージスケール観察系とミクロンサイズ結晶認識用観察系とを両立させ、制御ソフトに組み込むことにより、精度良く微小結晶試料の位置決めを自動で行うことができるシステムを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

最初に大面積かつ個別素子制御ができる高輝度LED発光装置を開発し、高感度デジタルカメラ及び既存のテレセントリック光学長焦点望遠鏡と組み合わせて、タンパク質結晶エッジ強調画像の取得テストを行い、条件検討を行なった。この評価結果を基に、発光装置や対物レンズ、装置セッティングなどの改良を実施し、微小結晶試料を認識可能な装置をくみ上げた。

取得された画像を利用し、複数のエッジ強調画像を合成することにより、微小結晶試料を認識できるアルゴリズムの構築を行なった。また、外部から照度コントロールが可能な制御装置を開発し、ビームライン制御ソフトのインターフェースクライアントを開発することで、全自動測定システムに組み込めるようにした。

最後に、ラージスケール観察系と組み合わせて全自動で微小結晶試料の位置合わせを高精度で実現するシステムを構築することを目指したが、後述するミクロンサイズ結晶認識用観察系で判明した問題解決を優先した

ことと、2011年春の大震災の復旧作業等のため開発を半年ほど中断せざるを得なかったため、ラージスケール観察系については構築するには至らなかった。

## 4. 研究成果

本研究での胆であるミクロンサイズ結晶認識用観察系の光源として、大面積かつ個別素子制御ができる高輝度LED72素子パターン制御発光装置を開発した（図1）。高感度デジタルカメラ及び既存のテレセントリック光学長焦点望遠鏡と組み合わせて、タンパク質結晶エッジ強調画像の取得を行った。その結果、通常サイズの結晶試料では効果的にコントラストを付けることが確認され、開発したエッジ抽出アルゴリズムソフトで効果的に認識できることが分かった。しかし、肝心の微小試料視認に必要な高倍率領域では視界深度不足の問題が非常に大きいことが分かった。そのため、放射光科学研究施設 BL-1A に導入したピエゾアクチュエータを利用した高速全焦点カメラシステム（フォトロン社製）との組み合わせを試すこととした。評価実験の結果、全焦点カメラシステムとの組み合わせで視界深度の問題はクリアできるが、画像が暗くなるため、より照度が必要であることが分かった。しかし、素子配置や単体照度向上、小型化による近接化など、微小領域照射のための工夫を進めたが、全体照度は向上できても微小領域の輝度を効果的に向上することは困難であり、集光光学系が必須であるとの結論に至った。そこで、新たにミラー集光型の発光素子を開発した（図2）。画像評価の結果、開発したミラー集光型であれば微小領域照度については十分であることが分かり、今後はミラー集光型をベースに開発を進めることとした。

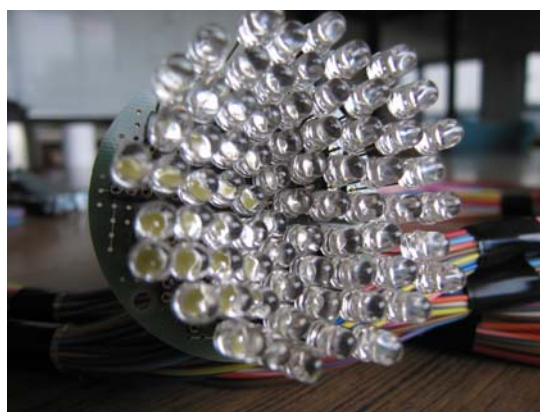


図1. 開発した高輝度LED72素子パターン制御発光装置



図 2. 次に開発したミラー集光型発光装置

これらのミラー集光型発光素子と全焦点カメラを回折計に組み込み、画像認識アルゴリズムやインターフェースの開発を行った(図3)。しかし、微少なコントラストを鮮明に判別するためには、微少な振動も許されず、カメラと発光装置をより堅牢に固定する必要であることがわかり、回折計への組み込み方や、免震、小型化などの検討を進めているところである。

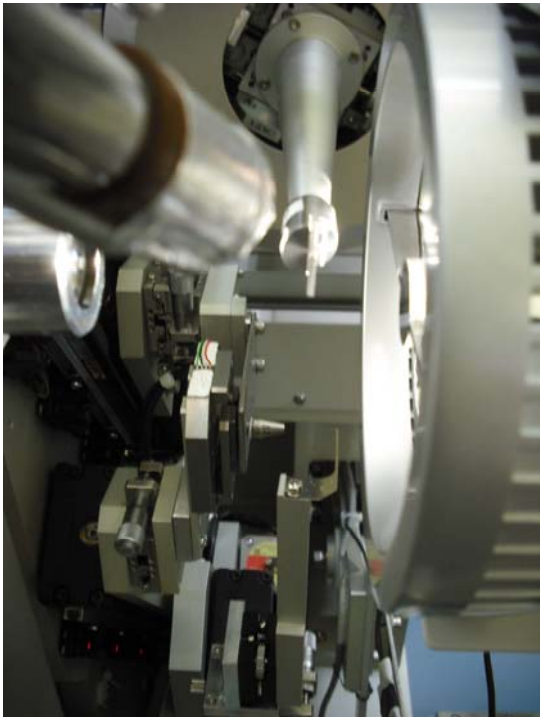


図 3. 回折計に組み込み画像評価をしている様子

また、これらの発光装置の外部制御ユニット及びビームライン制御クライアントを開発した(図4)。このユニットは、PC上の制御ソフトからUSBポート経由で照度を8bit(64諧調)でコントロールをできるようになっており、ビームライン制御クライアントを経由して、ユーザーインターフェースから利用できるようにしている。これにより、開発し

た装置を全自動システムに組み込み可能とすることができた。



図 4. 開発した発光装置外部制御ユニット

以上のように、大震災による約半年の中断の影響もあったが、ミクロナサイズ結晶認識用観察系についてハードソフト両面で要素技術開発についてはほぼ完了し、小型化・堅牢化の問題をクリアできればすぐに全自動システムに組み込むことができるところまで進めることができた。今後ラージスケール観察系も含めて早期の実用化に向けて開発を継続的に行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

- ① 山田悠介、松垣直宏、平木雅彦、Leonard M. G. Chavas、五十嵐教之、若槻壮市、PF 構造生物ビームラインにおける全自動回折実験システムの高度化と汎用化、第25回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム、鳥栖市、2012/1/8
- ② Yusuke Yamada、Masahiko Hiraki、Naohiro Matsugaki、Leonard M. G. Chavas、Noriyuki Igarashi and Soichi Wakatsuki、Automation of data collection and processing at the Photon Factory macromolecular crystallography beamlines、A Special Symposium Celebrating the 40th Anniversary of the Protein Data Bank (PDB40)、Cold Spring Harbor, NY (US)、2011/10/29

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

五十嵐 教之 (IGARASHI NORIYUKI)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授  
研究者番号：80300672

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

若槻 壮市 (WAKATSUKI SOICHI)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授

研究者番号：00332114

平木 雅彦 (HIRAKI MASAHIKO)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・研究機関講師

研究者番号：20282676

松垣 直宏 (MATSUGAKI NAOHIRO)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教

研究者番号：50342598

山田 悠介 (YAMADA YUSUKE)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教

研究者番号：20391708