

## 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：21604015

研究課題名（和文） X線 HARP 検出器を用いた微小結晶高速スクリーニング技術の開発

研究課題名（英文） high-speed evaluation of microcrystals using X-ray HARP detector

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：X線マイクロビームによりタンパク質結晶をスキャンし、回折イメージをリアルタイムで収集・評価するシステムの開発を行った。このシステムにより、大きさ数十ミクロン程度の微小結晶の高速位置決めが可能であることが示された。この技術はタンパク質結晶回折実験の自動化への応用が可能である。

研究成果の概要（英文）：A system was developed to scan protein microcrystals by X-ray beam and to evaluate the diffraction images simultaneously. The system allows rapidly identifying the position and shape of the crystals in tens of micrometers. Automated macromolecular diffraction experiments would be possible by applying this system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：放射光構造生物学

科研費の分科・細目：量子ビーム科学

キーワード：X線 HARP 検出器、タンパク質結晶、スクリーニング、マイクロビーム、自動化

## 1. 研究開始当初の背景

生命科学において原子レベルでの生体分子の立体構造情報は不可欠であり、その手段として放射光 X 線を用いた結晶構造解析は特に重要である。タンパク質結晶構造解析の技術はこの 10 年で長足の進歩をとげ、測定の主ターゲットが 10 ミクロン以下の微小結晶に移りつつある。これは疾病や障害の原因や重要な生命現象に関わるタンパク質、特に膜タンパク質やタンパク質複合体からは、10 ミクロン以下の解析困難な微小結晶しか得られない場合が多いことによる。

タンパク質結晶構造解析における回折実験はほとんどの場合振動写真法で行われ、その目的は結晶を様々な角度で振動させて得られる「回折データセット」を収集することにある。しかしながら選んだタンパク質結晶が必ずしも良質とは限らないため、回折データセットの収集を行う前にその結晶が良好な回折を与えるかどうかをチェックする必要がある。すなわち回折データセット収集の価値があるかどうかで結晶をスクリーニングするわけであるが、現在日本国内のみならず海外の放射光施設においても、このプロセ

スを効率的（あるいは自動的）に実行できるシステムは存在しない。タンパク質結晶のスクリーニングの現状は、具体的には

- (1) X線ビーム上への結晶の位置決め
- (2) 回折イメージの収集および評価

の二つの過程を段階的に実行することによって行われる。1)に関しては可視光と望遠鏡を用いた人間の視覚認識に依存しているため、特に微小結晶の場合、視認性の悪化および結晶を囲む母液による可視光の屈折効果の増大が深刻となり正確な位置決めを行うことが困難である。また、視覚によって位置決めした場所が必ずしも最良の回折イメージを与える場所ではないこともしばしばである。2)の回折イメージ収集で用いられる検出器は、回折データセット収集用の検出器（ほとんどがCCD検出器）で兼用されている。しかし、回折イメージの読み出しに一秒から数秒を要し露光も数秒程度必要となる。CCD検出器による回折イメージの収集および評価では、スクリーニングの効率が悪いだけでなく試料結晶への放射線ダメージの影響も無視できない。

## 2. 研究の目的

X線マイクロビームによりタンパク質結晶をスキャンし、高感度で高速な読み取り性能を持つX線HARP検出器によって回折イメージをリアルタイムで収集・評価するシステムを開発する。このシステムは回折実験における微小結晶のスクリーニングの精度と効率を劇的に向上させ、限られた放射光X線ビームの有効利用を促進する。また、現在光学顕微鏡下で人間が行っている微小結晶の位置決めを自動化するためにも必須の要素技術である。

## 3. 研究の方法

効率的なスクリーニングを行う最も重要なポイントは、高感度で高速読み出しのできる専用の検出器を用いて露光時間と読み出し時間を最小限に抑えることである。露光時間を短くすることは試料の放射線損傷を最小にするためにも非常に重要である。このような観点からX線検出器としてピクセルアレイ型検出器やX-ray HARP (High-gain Avalanche Rushing amorphous Photoconductor) 検出器を採用したスクリーニングシステムの開発を行う。HARP検出器はNHK技術研究所によって開発された可視光用超高感度カメラであり、アモルファスセレンのアバランシェ動作を利用した世界でも例のないユニークな撮像技術に裏付けられている。X線HARP検出器は開発途上であり、現段階では大面積化が困難であるため回折データセット収集用の検出器としては適さないが、感度は既存のCCD検出器を10倍から

100倍凌駕することが示されている。本研究の目的であるスクリーニングを用途とするのであれば大面積は必要なく、X線HARP検出器の高感特性と30Hzでの高速読み出しは大変魅力的な特性である。

## (1) ゴニオメータと検出器の同期技術の開発

X線ビームによる試料のスキャンはゴニオメータを高速高精度で駆動させることで実現する(図1)。収集したすべての回折イメージに対してゴニオメータの位置を対応づけるため、ゴニオメータコントローラの加速信号を、X線検出器のトリガ駆動機能とリンクさせる。例えば20ミクロンのスキャンステップおよび30Hzのフレームレートでデータを収集していく場合、ゴニオメータのスキャンスピードは $20\mu\text{m}/33\text{msec}$  ( $0.6\text{mm}/\text{sec}$ )となり、ゴニオメータの駆動と検出器のタイミングは少なくとも10ミリ秒程度以下で合わせる必要がある(スキャン結果の位置精度は10ミクロン程度となる)。X線ビームを用いた試験は放射光X線マイクロビームと高精度の回折計が必要であるため、高エネルギー加速器研究機構フotonファクトリーの微小タンパク質結晶構造解析用ビームラインを利用する。

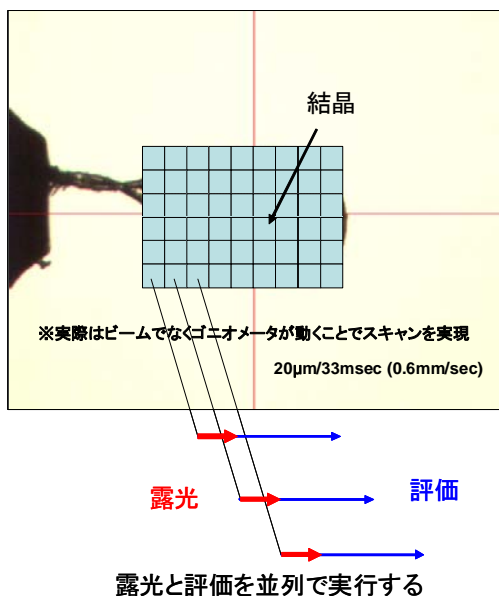


図1. X線ビームによる結晶スキャンの概要

## (2) 回折イメージ評価技術の開発

第一段階としては単純な回折ピークサーチによるプログラムを作成し、スキャンによって得られた回折イメージのスコアリングを可能にする。次の段階で、30Hzで収集される回折イメージ(VGAからハイビジョンサイ

ズ)を、逐次ではなく並列に独立して評価できるようにソフトウェアを開発する。目標はゴニオメータのスキャンが完了するのと同様にすべての回折イメージの評価も完了するようなシステムである。GPU(画像演算ユニット)を用いた方法がコスト面と性能面から最も有望な方法と考え開発を行う。

ここまでの評価方法は、試料結晶のセンターリングのための単純なピークサーチ(イメージ上の回折点の数を数える)であった。複数の回折イメージから最も良い回折が与えられているイメージ(=最も多数の回折点が記録されているイメージ)を選び出すことで試料結晶の位置を推定するというものである。そこで更に評価方法を発展させ、回折イメージの指数付け(結晶の方位や対称性の決定)やデータ収集条件(振動角、露光時間)の提示機能を実装する。これによってスクリーニング終了後直ちに(X線 CCD 検出器などで)回折データセットの収集を行うことが可能となり、回折実験の効率化は更に向上する。自動指数付けに関しては現在イメージングプレートや CCD 検出器用に開発されているソフトウェアを利用し、それらソフトウェアと柔軟に通信できるようなインターフェースの実装を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 回折イメージの高速評価ソフトウェア

X線 HARP 検出器から 30Hz のフレームレートで出力される回折イメージデータ(サイズ: VGA)をリアルタイムで評価するため、GPU を用いて処理を分散させ高速化するソフトウェアを開発した。具体的には、回折イメージを数十の小イメージに分割し、それぞれの小イメージの処理を各 GPU に割り振って並列計算させるソフトウェアを製作した。評価のアルゴリズムとして単純な回折ピークサーチのアルゴリズムを採用した。このような単純な処理であれば、GPU 処理が可能である。テストを行った結果、VGA サイズの回折イメージ一枚当たり約 15 ミリ秒で処理することが可能であることが示された(図 2)。

評価の第二段階(オプション)として、比較的サイズの大きな結晶上の良質部を探索することを目的とした機能を追加した。アルゴリズムとしては各回折点のプロファイル(スポットサイズ等)を評価する。リアルタイムでの評価は難しいが、マイクロビームを用いた応用の一つとして有用であると考えられる。

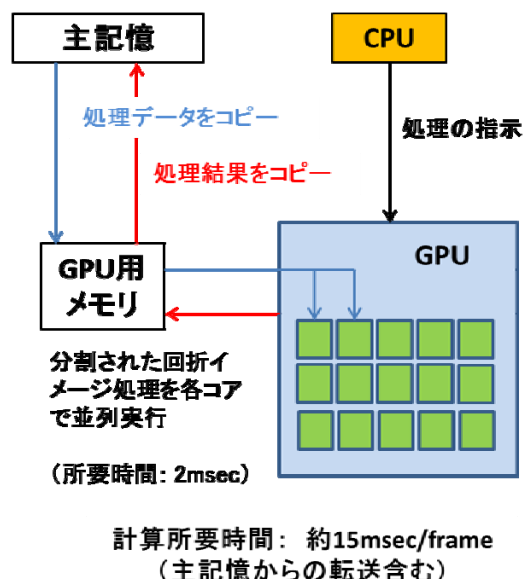


図 2. GPU による回折イメージの並列評価

##### (2) X線ビームによるスキャンシステムの構築

試料(タンパク質結晶)を X線ビームでスキャンするため、ビームラインの試料位置調整軸(ゴニオメータ)を利用したシステムとした。ゴニオメータを駆動させるステッピングモーターコントローラ(SC800CP、神津精機製)を制御するプログラムを開発した。動作としては、スキャン方向へ軸を加速させ数十ミリ秒後に駆動スピードが等速になったと同時にビームシャッターを開とし、同時にコントローラから出力されるトリガ信号(TTL)を利用して検出器のデータ収集を開始する。こうすることですべてのスキャンステップが等間隔となることが保証され回折イメージの評価が容易となる。またスキャンが開始された位置を特定でき、得られた回折イメージを試料位置に正確にマッピングすることが可能となる。30Hz のフレームレートでデータを収集していく場合、スキャンステップと同等の位置精度でマッピングを行うためにはゴニオメータの駆動と検出器のタイミングは 10 ミリ秒程度で合わせる必要がある。SC800CP において、シャッターや検出器へのトリガ信号の精度はミリ秒のオーダーであるので、この条件は十分にクリアされている。

##### (3) 超小型ビームストッパーの開発

回折イメージの評価の精度を上げるためには、検出器を試料に可能な限り近接させて大きな角度の回折点を取り込んだ回折イメージを取得することが有利である。検出器を近接させるためにはビームストッパーをできるだけ試料位置に近づける必要があるが、

同時に回折イメージ中に写りこむビームストッパーの影が大きくなってしまふ。この相反する要望を満たすため、超小型のビームストッパーを開発した(図3)。検出器を試料から10mmの距離まで近接させることができる一方、ビームストップ部の直径が200マイクロンに抑えられておりビームストッパーの影が小さくなるよう設計されている。

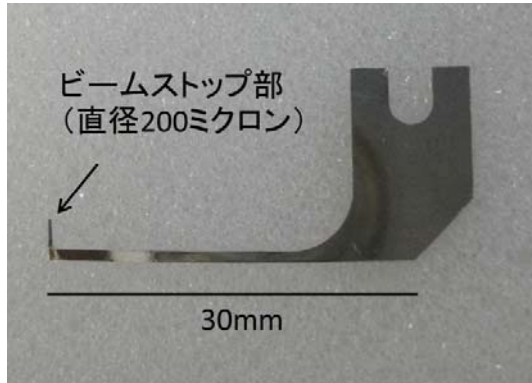


図3. 超小型ビームストッパー

#### (4) 放射光ビームラインでのタンパク質結晶のスクリーニング試験および評価

開発したスクリーニングシステムを放射光ビームライン(フォトンファクトリーBL-1A)に設置して評価試験を行った。

試験の第一段階として性能の良くわかっている商用のピクセルアレイ型検出器(Pilatus100K、Dectris社製)を用いた。受光面積84mm x 33mm、画素サイズ172マイクロン、最大300Hzのフレームレートが可能な検出器である。タンパク質結晶は大きさ100マイクロン程度のもの(タンパク質名:Nue2)とし、X線ビームサイズに合わせ、水平方向70マイクロン、垂直方向20マイクロンのステップで5 x 15 = 75点のスキャンを行った。各ステップでの露光時間は17ミリ秒でフレームレートは50Hzとした。図4に各ステップで得られた回折イメージの評価を結晶画像上にマッピングしたものを示す。評価スコア(ここでは強度5シグマ以上の回折ピーク数)で等高線を描くと、結晶の位置および形状の情報を取得できることが分かる。また、結晶に照射するX線量を(通常回折データ収集実験に比べ)かなり弱くしても、スキャンによる位置情報取得が可能であることも示された。

X線HARP検出器を用いてのスクリーニング試験は、東日本大震災後、放射光ビームタイムが確保できなかったため十分におこなうことができなかった。今後ビームタイムを取得し評価実験を行う予定である。

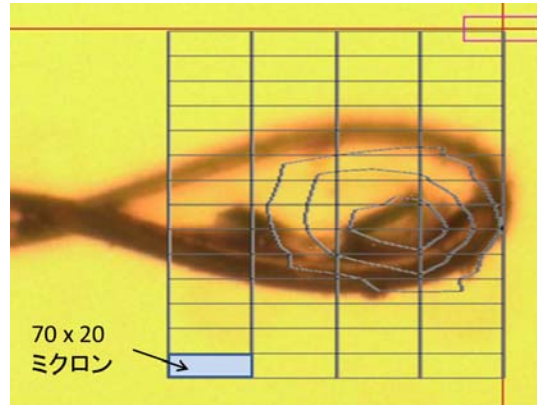


図4. 各回折イメージの評価スコア(5シグマ以上のピーク数)を結晶の画像上にマッピングし、等高線図と重ねて描画したもの。マス目は各回折イメージに対応する領域を示す。

#### 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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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: 5 0 3 4 2 5 9 8

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし