# 全自動測定ビームタイムを使ってみて

京都大学大学院理学研究科
藤橋雅宏

第3回 タンパク質結晶構造解析ビームライン中級者向け講習会
2018年10月27日（土）東京理科大学葛飾キャンパス

# 全自動測定でやりたかったこと

酵素と基質の複合体の結晶構造解析を行いたい

↓

基質非結合型: 完了済

この結晶でSoaking: うまくいかない
この条件で複合体の結晶化: うまくいかない

↓

新しい結晶化条件の探索と、それを基にした複合体作成

# 結晶化条件のスクリーニング

基質は市販品ではない (貴重)
脂溶性が高い

基質無しで再スクリーニング (300条件)

↓

8条件で結晶らしきものが得られる

↓

どの結晶が使えるか?

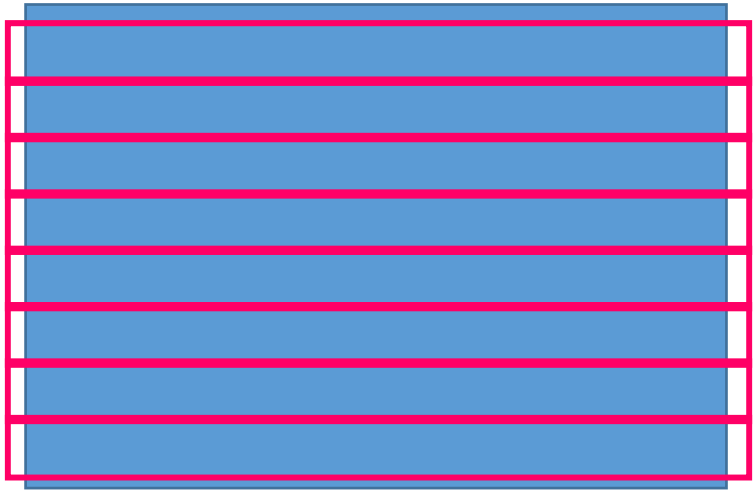
X線をあてて評価

# Plate Scanのための結晶化

スクリーニングで得た結晶のうち、回折能を持つものを調べる

PF 17AでPlate Scan可能な96穴プレートで、結晶を再現する

CrystalQuickX (Greiner)
in-Site 1 (mitogen)



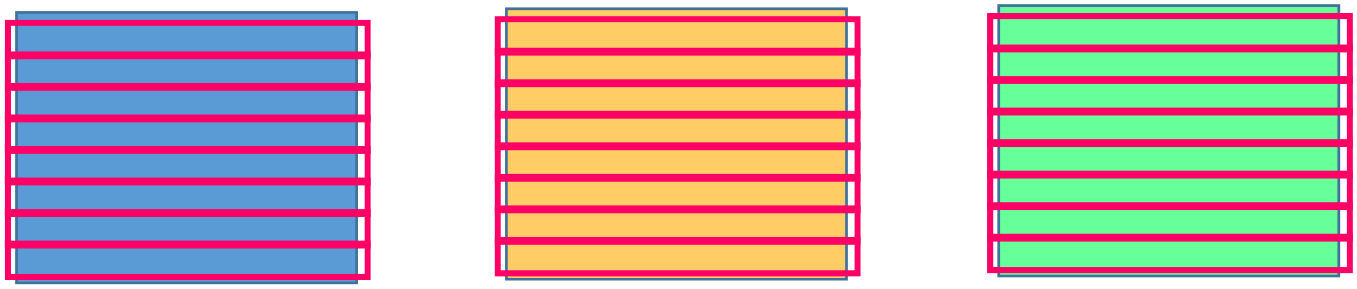
条件1
条件2
⋮
条件8

8つの結晶化条件
各12 dropで結晶化

# Plate Scanのための結晶化

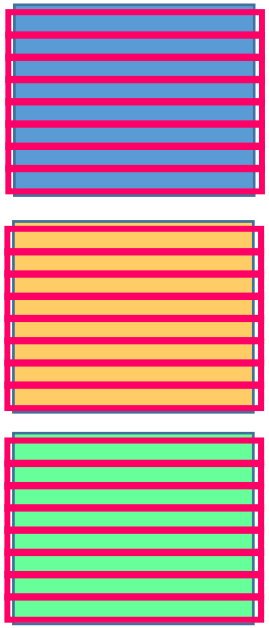
基質は脂溶性が高い

有機溶媒を含む結晶化も試しておく
(結晶化の沈殿剤は全て同じ)



有機溶媒なし　　含DMSO　　含MeOH

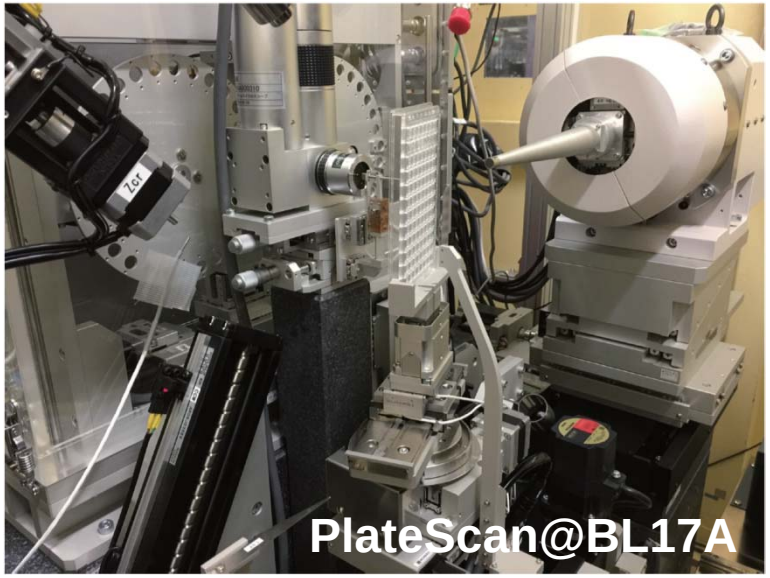
# Plate Scan @ BL17A



合計150個の結晶に対して
可視光での写真撮影とX線照射を行った。

所要時間: 計6時間 (2日に分けています)

➔ 結晶1個あたり2.5分 (しかも結晶をすくわなくても良い!)




ちなみに in Situ 1のPlateで、
2uL drop, 40uL reservoirだと、
宅配便で京都-PFを往復輸送しても
問題ありませんでした。

# Plate Scanの結果

| 結晶化条件 | 有機溶媒なし | 含DMSO | 含MeOH |
|---|---|---|---|
| A | 格子型1 | 格子型1 | 格子型1 |
| B | (反射弱い) | 格子型1 | (反射弱い) |
| C | (反射弱い) | (反射弱い) | 格子型2 |
| D | 格子不明 | 格子型1 | 格子型1 |
| E | (反射弱い) | 格子型1 | (反射弱い) |
| F | 格子型2 | 格子型2 | 格子型4 |
| G | 格子型3 | (反射弱い) | (反射弱い) |
| H | (反射弱い) | 格子型1 | (反射弱い) |

1結晶当たり1 frameの照射なので、
同じ格子型に分類したものも実際は異なる格子を持つ可能性もある

# 全自動測定@NE3A (最初の測定)

2018/5/18, 25

4つの含MeOH結晶化条件で調製した結晶を準備

(含DMSO条件はPlate Scan後の生化学実験の結果を基に排除)

| | 分解能 | 条件A | 条件C | 条件D | 条件F |
|---|---|---|---|---|---|
| Cryo Protectantが機能しているか? | < 2.0 Å | 1 | | | 2 |
| | 2.0 - 2.5 Å | 1 | 1 | | |
| | 2.5 – 3.0 Å | | 1 | | |
| 8結晶 | 3.0 – 4.0 Å | | | 1 | |
| | 4.0 – 5.0 Å | | | 1 | |

| | 分解能 | 条件A | 条件C | 条件D | 条件F |
|---|---|---|---|---|---|
| Soaking Mother Buffer で壊れないか? | < 2.0 Å | | 1 | | 2 |
| | 2.0 - 2.5 Å | 3 | 2 | | 1 |
| | 2.5 – 3.0 Å | 1 | | | |
| | 3.0 – 4.0 Å | | | 1 | |
| | 4.0 – 5.0 Å | | | | |
| 15結晶 | > 5.0 Å | | | 1 | 1 |
| | Dxscan failed | | | 1 | |

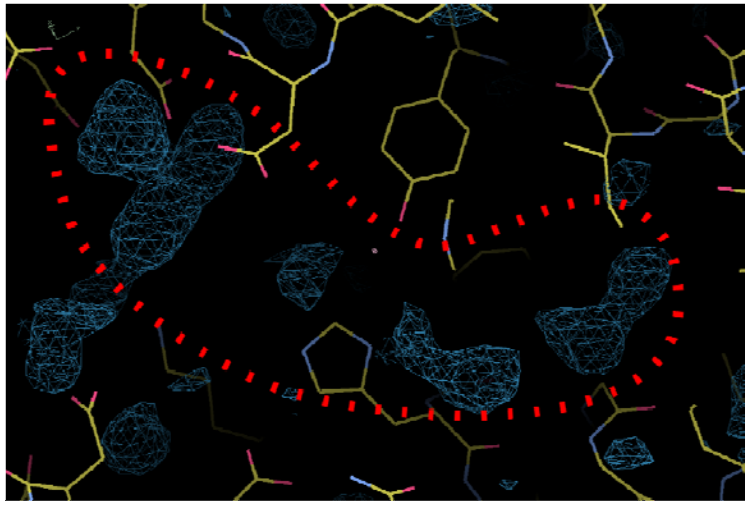
# 全自動測定@NE3A (最初の測定)

2018/5/18, 25

条件Dを除く結晶に、濃度・時間などを変えながら基質をsoaking

| 分解能 | 条件A | 条件C | 条件F |
|---|---|---|---|
| < 2.0 Å | | | 1 |
| 2.0 - 2.5 Å | | 1 | |
| 2.5 – 3.0 Å | | | |
| 3.0 – 4.0 Å | | 1 | 1 |
| 4.0 – 5.0 Å | | | 1 |
| > 5.0 Å | | 1 | 1 |
| Dxscan Failed | 10 | | |
| Index Failed | 4 | | |

条件Fで基質の可能性がある
電子密度が得られた



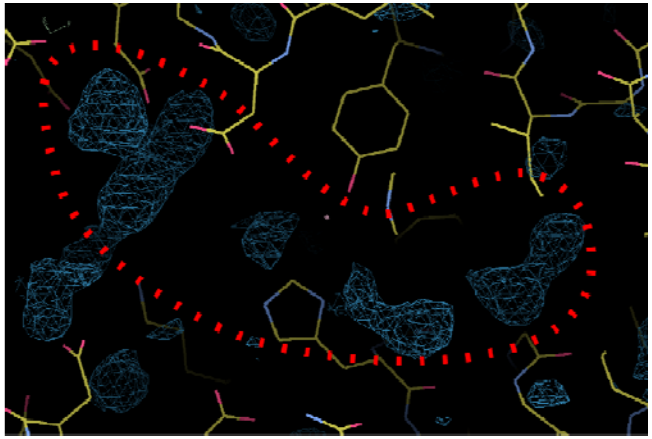
# 実験の経過@NE3A (2回目の測定)

2018/6/8 (3週間後)
Soaking 最適条件の検索

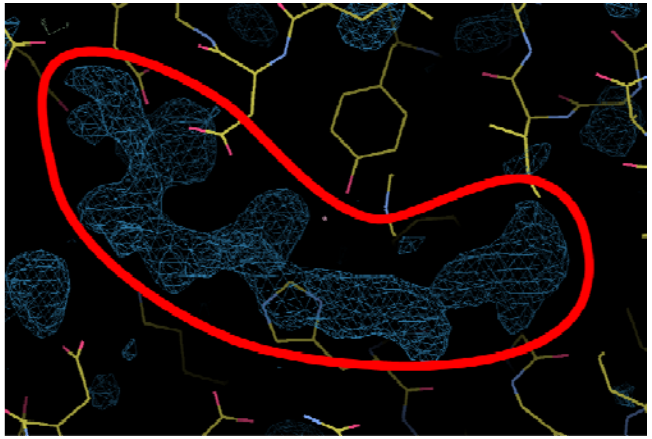
| 分解能 | 条件C | 条件F |
|---|---|---|
| < 2.0 Å | | 5 |
| 2.0 - 2.5 Å | | 7 |
| 2.5 – 3.0 Å | | 2 |
| 3.0 – 4.0 Å | 5 | 3 |
| 4.0 – 5.0 Å | | 2 |
| Dxscan Failed | 1 | 2 |
| Index Failed | 1 | 6 |
| Crystal cracked? | | 3 |

# 実験の経過@NE3A (2回目の測定)

2018/6/8 (3週間後)
Soaking 最適条件の検索



2018/5/18取得 (再掲)



2018/6/8取得

**条件F**

**Hit Rate**

**1/30**

# 実験の経過@NE3A (3回目の測定)

2018/6/22 (さらに2週間後)
基質電子密度の再現とSoaking 最適条件の検索続き

| 分解能 | 条件F |
|---|---|
| < 2.0 Å | 10 |
| 2.0 - 2.5 Å | 6 |
| 2.5 – 3.0 Å | 3 |
| 3.0 – 4.0 Å | 2 |
| 4.0 – 5.0 Å | 1 |
| Dxscan Failed | 8 |
| Index Failed | 2 |

**Hit Rate**

**1/30**

**4/32**

得られた電子密度は6/8と本質的に同じ

# 全自動データ収集のメリット

PFの全自動測定を使ってみて

・とにかく大量のデータ収集が行える

「放射光に供する結晶のスクリーニング」が不要になる

・夜のうちに、自動で回折データの収集と積分が完了している

あとは電子密度を描いて、確認するのみ

➔ 将来的には電子密度を描く作業も、自動化される見込み

・5週間で、学生1人が100個以上の結晶から
回折データを収集し、評価できた

結晶試料の作成と、電子密度描画・観察に集中できたため

# 全自動測定@PFの得手不得手

## できること

### UGUISに入力する「値」を事前に設定できることの全て

どのピンの結晶をマウントするか？

波長、カメラ距離、振動角、総振動角

露光時間、減衰率

### センタリング

ループセンタリングは「普通の」ループならほぼ成功している
失敗例を見ていると、極端に大きい(1mmクラス)ループ、極端に
歪んだループ、霜が付いている、などの悪条件が見受けられる

Diffraction Scanセンタリングの評価はできていません。
概ね上手くいっているように見えます。

# 全自動測定@PFの得手不得手

できないこと

ビームラインでの結晶の凍結はできない

クライオ気流の装置が研究室に無い場合、結晶を液体窒素に浸けて凍結させる必要がある

ヘリカルスキャンはできない

結晶内で、質の良い部分を探すことはできない

➔ NE3A, NW12A, 5Aでデータ収集するなら問題にならない

snap shotをAI処理して、
自動でdata collection 条件を考えてくれることはない

➔ AIによる条件設定はできませんが、下記の設定で上手くいくことが多い

| | |
|---|---|
| 一枚当たり振動角: | 0.2 º/frame |
| カメラ距離: | 個人的には心持ち近めにしています |
| 総露出時間: | NE3Aの場合180sec (1-5MGyを目安) |

# 全自動測定@PFの得手不得手

・X線をルーチン的に照射し、
データを集める実験に非常に向いています

**得意** v(^^)v

リガンド複合体を作成する
重原子同型置換体を作成する
クライオ条件を検討する
ビームタイム前に全結晶のsnap shotを撮る

・高度なセンタリングを要する実験には向いていません

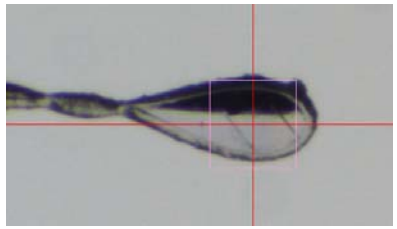
**苦手** (T_T);

ループ内に質の良い結晶と悪い結晶が混在する
ヘリカルスキャン

・ルーチンではない、
その場で「考えること」の必要な実験は、できません

**苦手** (T_T);

# 全自動測定@PFに必要な準備



結晶の準備
ループの真ん中を
目標にする

Uni-Puckに
結晶をつめる

Dry Shipperの
送付

CSVの
登録

・結晶の準備は、下記を参照
https://www2.kek.jp/imss/pfweis/manual/ja/index.html
・全自動実験の案内は、課題代表者宛に定期的に届きます

# 全自動測定@PF, csv fileの準備

1: カセットのID
2: カセット中のポート番号
3: 結晶のID
4: タンパク質の名前
5: データを保存するためのディレクトリ
6: コメント
7: 全自動で行う操作(snapshot/data collection)
8: Run番号
9: イメージファイル名の開始番号
10: 総フレーム数
11: 開始omega角
12: スナップショットOmega角
13: フレーム当たり振動角
14: フレーム当たり露光時間
15: 入射波長
16: 最大分解能設定 (カメラ距離)
17: カメラ鉛直方向offset
18: 水平方向ビームスリット幅
19: 鉛直方向ビームスリット幅
20: X線透過率
21: 検出器読み出しモード設定
22: ビームの発散

赤文字はPAM (結晶交換ロボット) 使用の際は必ず指定すべきパラメータ

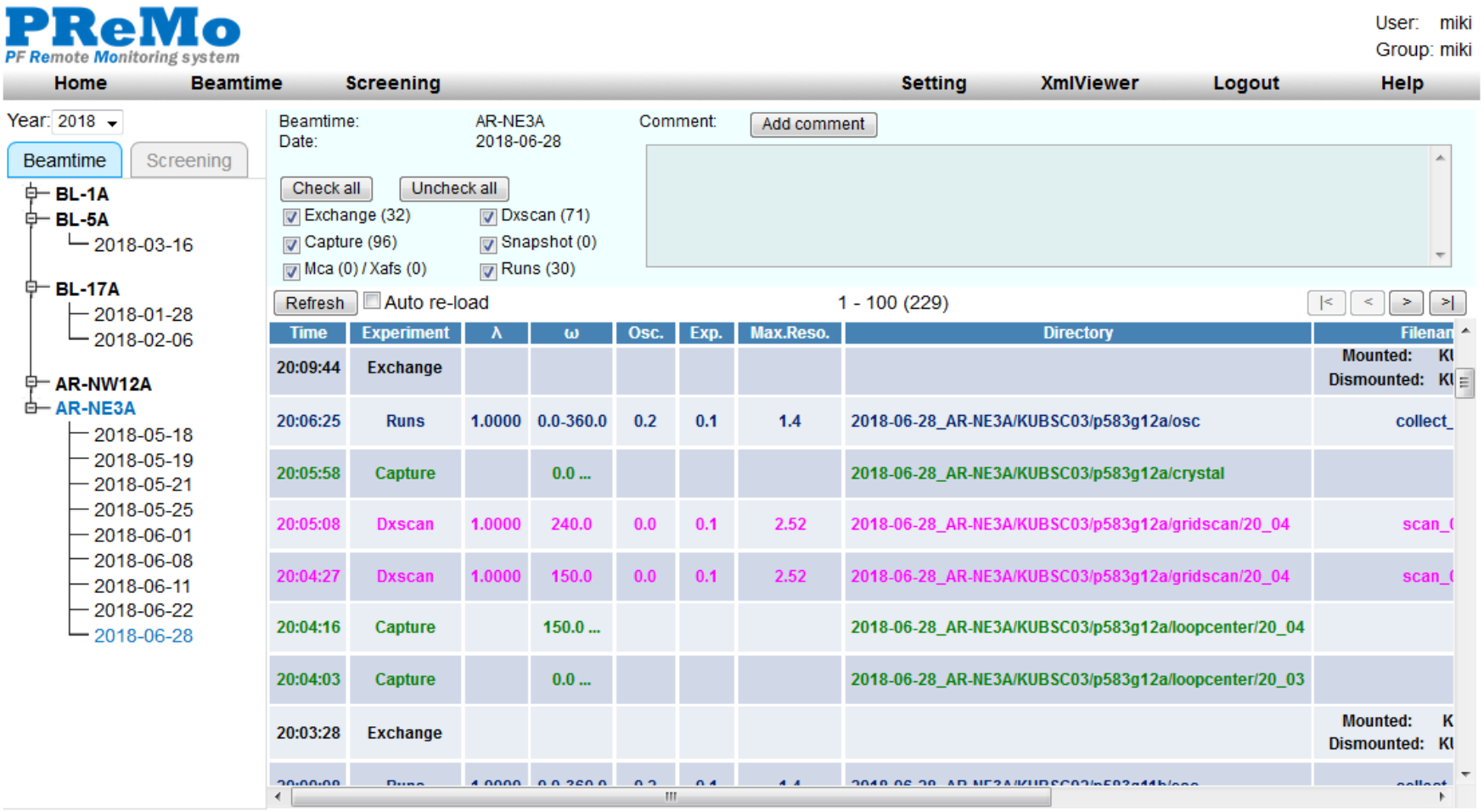
黒文字は全自動測定で指定可能のパラメータ (defaultでも良い)

https://www2.kek.jp/imss/pfweis/manual/ja/samplelist_prep.html

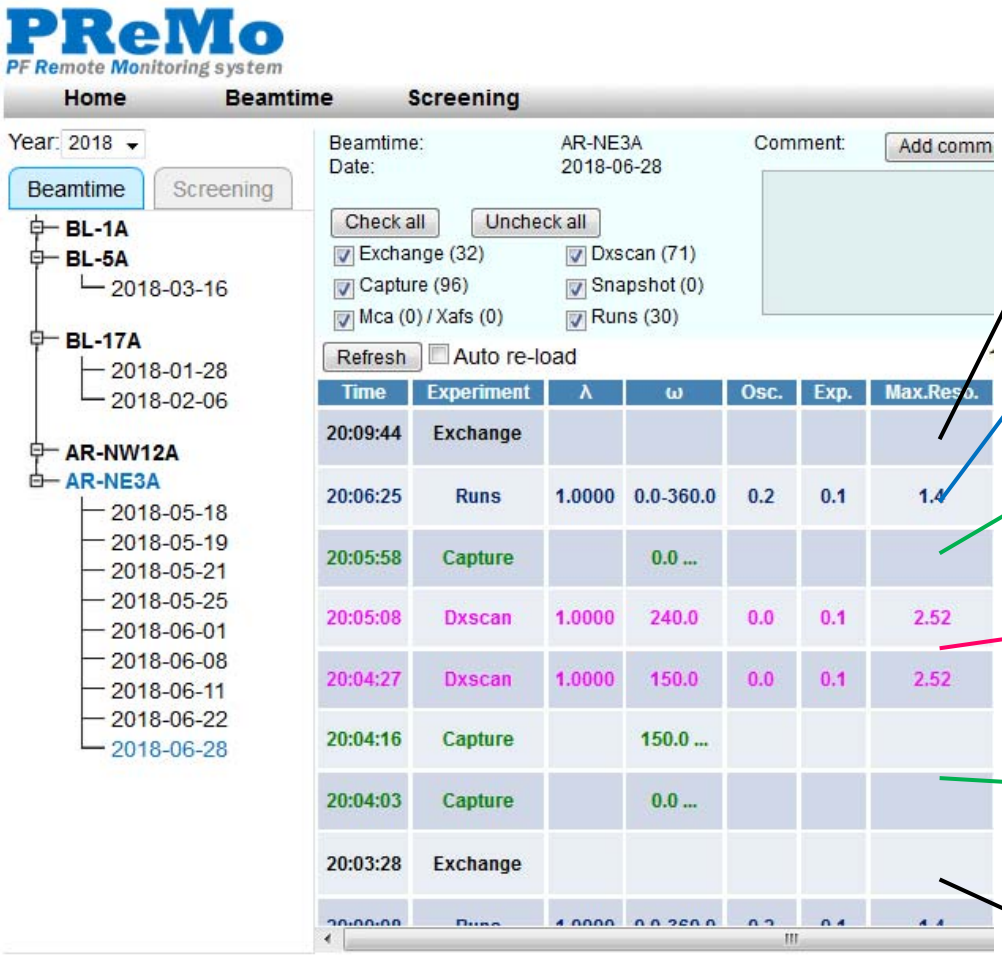
# 全自動測定@PF　結果のチェック

https://premo.kek.jp/RCM-Web/action/login.html

# 全自動測定@PF　結果のチェック



# 全自動測定@PF　結果のチェック




結晶交換

Data Collection
(3分19秒)

可視光写真 (27秒)

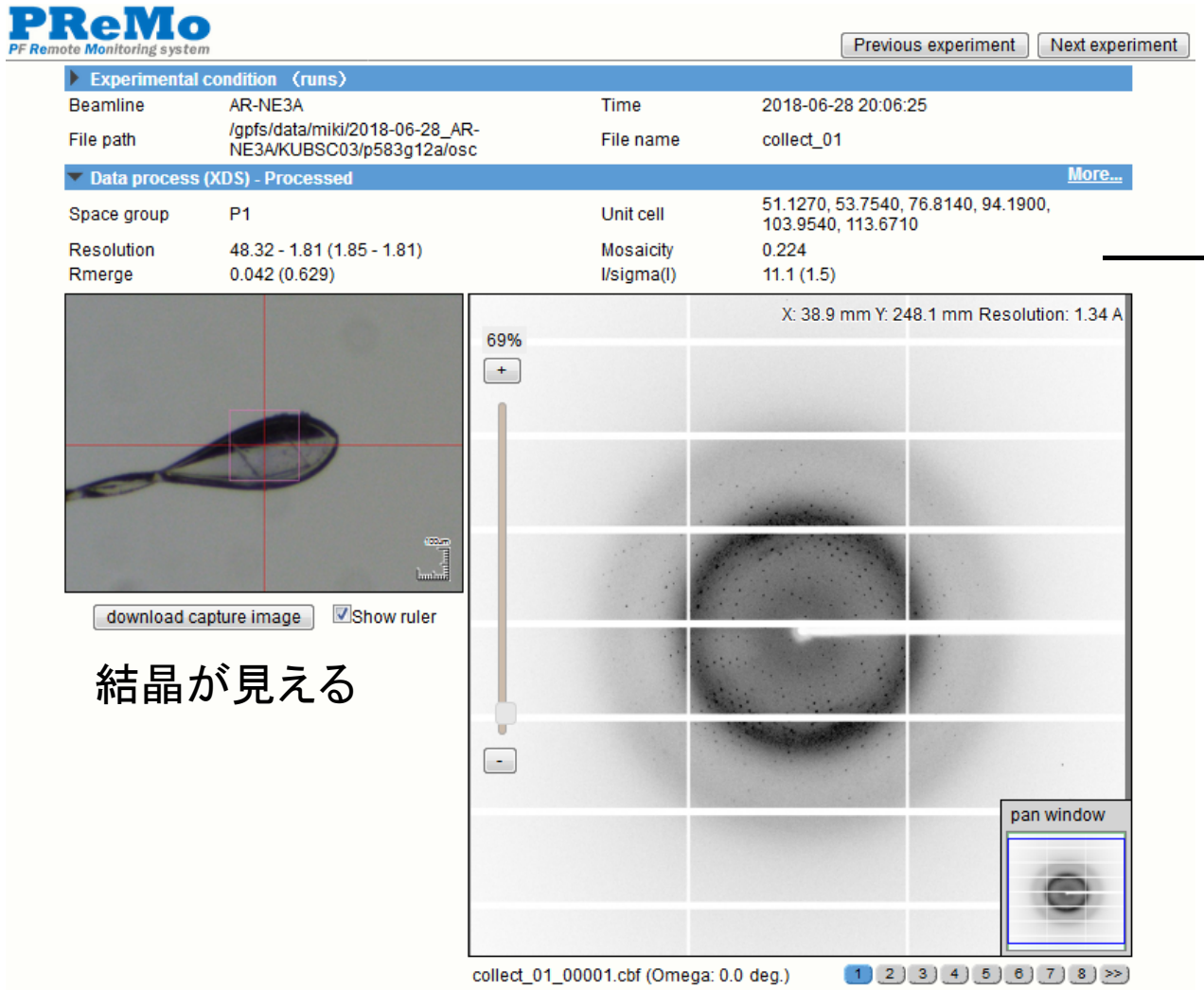
Diffraction Centering
(1分31秒)

可視光写真 (24秒)

結晶交換 (35秒)

6分16秒

# 全自動測定@PF　結果のチェック




結晶が見える

Space group
Unit Cell
Resolution
Mosaicity
$R_{merge}$
$I$/sigma($I$)

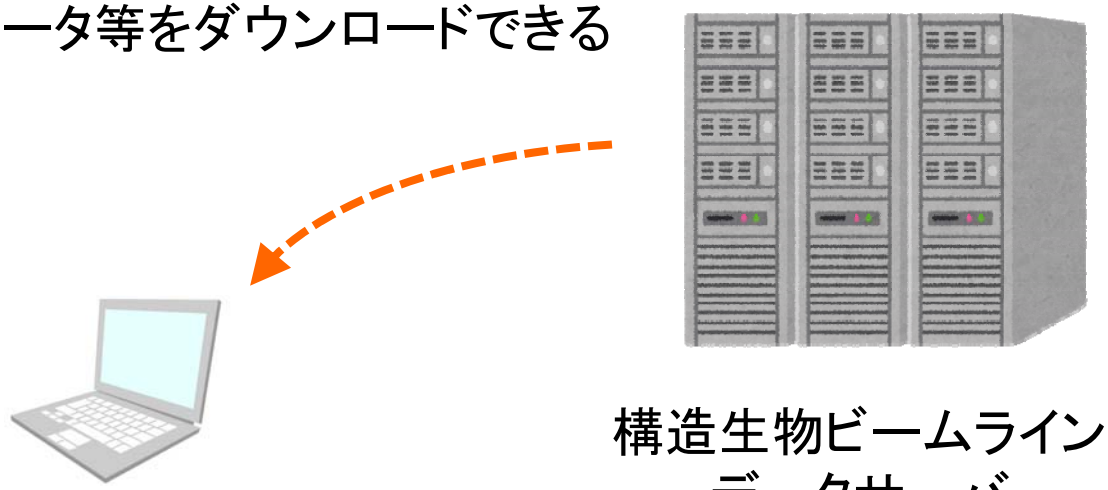
が、表示される

イメージが見える

# データのダウンロード from PF

・VPN接続された状態で
sbgfs.kek.jp (データ保存サーバ)にftpでログインする

撮影したイメージデータ等をダウンロードできる




・sshでビームラインの計算機にログインして、データ処理も
行えます

# ダウンロードの速度

・VPN接続された状態で
sbgfs.kek.jp (データ保存サーバ)にftpでログインする

京都大学からは概ね1MB/secでダウンロード出来ました。

自宅(京都郊外, フレッツ光)からは概ね2MB/secで
ダウンロード出来ました。

・例えばNE3A(1枚あたり3MB)で、900枚
のデータを撮ると1MB/secの回線では
1時間ぐらいでダウンロード出来ます

・xdsの自動処理で積分されたデータのダウンロードのみなら、
1-2時間以内で可能

・回折イメージについては、数十個の結晶を使って
データを撮った場合、HDDの郵送で取得するのが現実的

# まとめ

以下は個人の意見です

5A, NW12A, NE3Aで行う「snap shotによる結晶の評価」
「X線回折データ収集」のほとんどは、全自動で測定できる
と思います

センタリングは、X線をあてて行って下さっていますが
ユーザーとしても念のために
ループの真ん中に結晶を置いた方が良い気がします。

XDSによる自動積分は、default条件での計算で
積分可能な結晶であれば、信頼できる結果になります

# ユーザーとしての要望

数十から100個近くのデータをまとめるのは手がかかります
XDSの処理結果をまとめた表が自動作成されればと思います

XDSによる自動積分で、
パラメーターの一部を自分で指定できればありがたいです

積分のあと電子密度の計算もルーチンワークなので、
この部分のケアもあるとありがたいです

ユーザー皆さんが使うようになって、さらに高頻度で全自動
測定の枠が出来ると良いなと思います。

# Acknowledgements


- Photon Factory スタッフのみなさま
- 実験を頑張ってくれた学生さん
- 過去から現在にかけての研究室メンバーの皆様
- 様々な議論に応じて下さった共同研究者の先生方