

低温ヘリウムガス吹き付け型結晶冷却装置

中迫雅由^{1*}, 澤野成民², 河本正秀³

¹慶應義塾大学理工学部物理学科*/理化学研究所播磨研究所,
²理学電機株式会社システム設計部, ³財高輝度光科学研究センター利用促進部門Ⅱ

Development of an Open-Flow Cryostat Utilizing Helium Gas for Cryogenic X-ray Diffraction Experiments

Masayoshi NAKASAKO¹, Masahito SAWANO² and Masahide KAWAMOTO³

¹Department of Physics, Faculty of Science and Engineering, Keio University and RIKEN/Harima Institute,
²Rigaku-Denki Corp., ³JASRI/SPring-8

Abstract

An open-flow cryostat utilizing helium gas for cryogenic X-ray crystallography has been developed. The lowest temperature reached was 35 K within a temperature fluctuation of 0.5 K. This device enables easily the structural studies between 35 K and 90 K.

1. はじめに

低温 X 線回折実験は, Dewar によって構成される密閉型あるいは低温ガスを試料に吹き付ける開放型クライオスタットを用いて行われている。密閉型クライオスタットは微細な温度調節を可能とする大きな熱的容積を有するが, 試料の迅速な交換には不向きである。開放型クライオスタットでは温度精度が密閉型に劣るものの, 試料の交換が容易であり, 試料周り空間を広く取ることができるので, 可視紫外分光装置などを用いた同時測定を簡便に行うことができる。密閉型クライオスタットが液体ヘリウム温度近傍の極低温に到達できるのに対して, 開放型では使用する冷媒ガスによって到達温度が規定されている。

我々が携わっている生体高分子の結晶構造解析では, 結晶の非破壊急速凍結のために低温窒素ガス吹き付け型試料冷却装置が主に使用されている。生体高分子結晶の低温 X 線回折実験¹⁾は1995年頃から世界的に普及し始めたが, その主たる目的は X 線照射に伴う結晶の放射線損傷低減である。生体高分子結晶の放射線損傷は, 結晶による X 線光量子の吸収によって生じる電子やラジカルが, 生体高分子の立体構造や結晶内分子間相互作用を破壊することにより生じると考えられている。低温実験では, 水をガラス状氷に凍結することによってラジカルの拡散を抑制し, 放射線損傷を副次的に低減している。国内では1995年以来, 第三世代大型放射光施設 SPring-8 での放射線損傷低減²⁾, 蛋白質の水和構造³⁾および物性研究⁴⁾に向けた低温実験手法の研究開発が筆者らによって進められてきた。液

体窒素中での結晶保存技術の確立により, 整理された手順で効率的な低温実験が可能となっており, 低温 X 線回折実験技術は, X 線検出器, 放射光 X 線やデータ処理解析ソフトウェア等と並ぶ生体高分子構造解析の重要な要素技術として位置付けられている。

生体高分子結晶の X 線回折強度測定は, 100 K 前後で行われてきた。低温窒素ガス吹き付け装置の使用可能な温度範囲で結晶の急速凍結が可能であること, 実験室 X 線源や高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory に代表される第二世代放射光施設の X 線を用いた場合に100 K 程度の低温で顕著な放射線損傷は観測されない⁵⁾ことなどがその要因である。しかし, 最近, 高輝度高強度 X 線が供給される SPring-8 の BL41XU⁶⁾や BL45PX⁷⁾では, 100 K に冷却した蛋白質結晶の放射線損傷が報告され始めた。大強度 X 線によってガラス状に凍結された水が局所的に溶解し, 発生したラジカルが拡散しているのであろうか。低温電子顕微鏡による生体高分子の観察においては, より低い温度での実験が放射線損傷の低減に有効であることが明らかにされているが⁸⁾, X 線回折実験においても同様のことが期待できるのであろうか。低温下で観測され始めた放射線損傷への対処を検討するには, 現状の低温窒素ガス吹き付け型冷却装置に変わって, より低温への到達が可能でヘリウムガスを冷却媒体とする装置の開発が不可欠となってきた。

100 K 以下の温度を実現するために液体ヘリウムを用いる装置は幾つか開発されてきたが⁹⁾, 操作が複雑であり,

* 慶應義塾大学理工学部物理学科 〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1
TEL: 045-566-1679 E-mail: nakasako@phys.keio.ac.jp

多数のユーザーが簡単に操作できるものではない。我々は、SPring-8で観測された低温下での放射線損傷に関わる諸問題の検討、より低い温度での簡便な低温構造解析、100 K以下での蛋白質や有機化合物の光反応初期中間状態の構造解析を視野に入れて、操作性に優れた開放型試料冷却装置の開発を行った¹⁰⁾。本稿では、35 K以上の低温 X線回折実験や X線吸収端測定に利用できる低温ヘリウムガス吹き付け型試料冷却装置の概要について記述する。

2. 構成と性能

2.1 コールドヘッドと熱交換ユニット

今回開発した低温ヘリウムガス吹き付け型試料冷却装置では、コールドヘッドに密着させた熱交換ユニットにヘリウムガス (Fig. 1k) を通過させることで冷却を行い、得

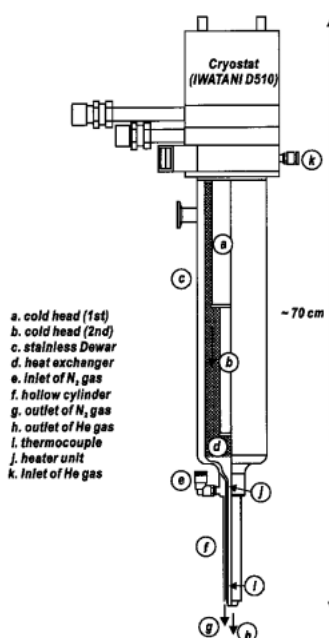


Figure 1. A schematic illustration of the open-flow type He-cooling device.

られた低温ガスを直接試料に吹き付ける方式を採用している (Fig. 1)。コールドヘッドには、改良型ソルベサイクルで動作し、2段冷凍機能を有した岩谷瓦斯 D510を採用した。同コールドヘッドはヘリウムガスコンプレッサー岩谷瓦斯 CW303 (Fig. 2) によって作動し、第一段目で 9 W (最低到達温度 38 K, Fig. 1a)、第二段目で 5 W (最低到達温度 10 K, Fig. 1b) の冷凍能力を有する。重量は 6.3 kg であり、設置には大掛かりな支持台が不要であるという利点もある。熱交換ユニットには、リガク低温窒素ガス吹き付け型試料冷却装置に使用されている銅メッシュ製の熱交換ユニットを改良して使用した (Fig. 1d)。銅メッシュのもつ大きな表面積は、効率的な熱交換の実現に有効であった。コールドヘッドと熱交換ユニットは特製の Dewar (Fig. 1c) に密閉され、外部と熱的に遮断される。また、Dewar は真空ポンプに接続され (Fig. 2)、常時 10^{-2} Pa 程度に保たれる (Fig. 2)。冷却ガス (Fig. 1h) の温度は、ノズル吐出口付近に設置した熱電対 (Fig. 1i) とノズル内部のセラミックヒーター束 (Fig. 1j) によって PID 制御される (Fig. 2)。熱電対には、配線の容易さや強度を考慮して銅コンスタンタンを用いている。

2.2 シースガス

吐出低温ヘリウムガスは窒素ガスのカーテン (Fig. 1g) によって周囲から隔離される。窒素ガスは、その密度や粘性に由来して安定流束を形成し、吐出低温ヘリウムガス流束 (Fig. 1h) の安定化に寄与している。乾燥窒素ガスの供給 (Fig. 1e) には、岩谷瓦斯窒素ガス製造装置 (M2NT-12S) を用いている (Fig. 2)。

2.3 設置条件

本装置は、ヘリウムガスの密度や流体力学的性質に起因して、ほぼ鉛直方向 (角度幅 ± 15 程度) に設置しなければならない (Fig. 2)。大きく傾けたり、水平に設置した場合には最低到達温度は 50 K 程度となり、温度揺らぎの幅も大きくなった。設置の際には、環状の保持具 (Fig. 2a) を取りつけた装置本体を、ゴニオメータ架台 (あるいは近傍に設置した専用架台) に取りつけたマウント具

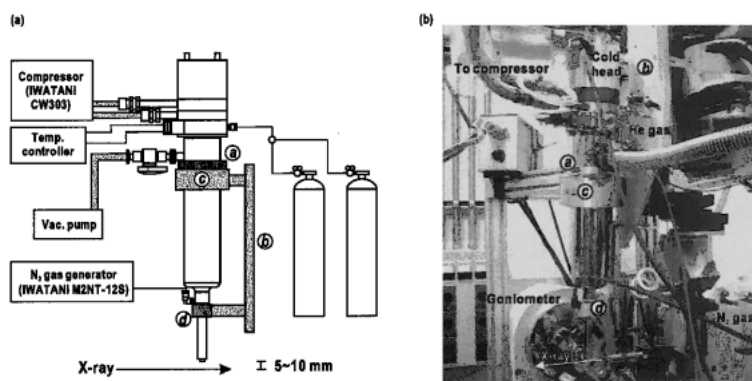


Figure 2. (a) A schematic diagram of the experimental setup of the cooling device. (b) A photograph of the device set on the goniometer carriage of BL41XU at SPring-8.

(Fig. 2b) のアーム部分 (Fig. 2c, d) に装填する。この際、コールドヘッドのソルベサイクルで生じる振動がマウント台に伝播しないよう、様々な緩衝素材を検討した。現在では、保持具とアーム間に 2 cm 角のシリコンゴムを 3 点支持で挿入することにより、測定に支障のない程度に振動伝達を除去している。

2.4 ヘリウムガス消費量

本装置が 40 K に至るまでに消費するヘリウムガス量は液体ヘリウム換算で 0.4 Litter/hour 程度であり、液体ヘリウムを使用したクライオスタット (40 K 以下達成するのに 1.8 Litter/hour) に比べて経済的である。また、装置の 1 日あたりのヘリウムガス消費量はおよそ 7000 Litter のヘリウムガスボンベ 1 本である。

2.5 性能

ヘリウムガス流量 5~5.5 Litter 毎分の場合、動作開始後 1 時間程度で 35 K (± 05 K) に到達することができる。その際、吹き付け管内部の温度は 24 K であり、吐出口周辺での Dewar (Fig. 1c) 部分との熱的接触で 10 K 程度の温度上昇が生じている。Fig. 3 には、熱電対を用いて測定されたヘリウムガス流束内での温度分布を示してある。流束方向では 6 mm 以上にわたって (Fig. 3(a)), また、動径方向では、流束中心付近に約 1 mm ϕ の温度安定領域 (Fig. 3(b)) が形成される。低温回折実験に供される蛋白質結晶のサイズは 0.5 mm³ 以下であるため、温度安定領域は結晶の温度を保持するには十分である。しかし、最低温度領域に試料を確実に設置するためには、実験に先駆けて、試料位置に設置した熱電対温度を指標とした吐出口の位置設定を厳密に行っておく必要がある。

3. 実験上の留意点

本装置で達成される温度は、シースガスに用いている窒素の凝固点よりも低いので、試料表面への固体窒素の付着に留意点せねばならない。

生体高分子結晶の低温 X 線回折実験では、一旦急速冷却した試料を液体窒素中で保存し、それを再度回折装置にマウントして低温実験を行う。液体窒素から取り出した凍結試料を 35 K の低温ヘリウムガス中に直接設置すると、試料に付着している液体窒素が瞬時に固体窒素薄膜に転化し、固体窒素の Debye-Scherrer リングが蛋白質結晶の回折パターンに重なってしまう。これを避けるため、あらかじめ装置を 80 K 程度で運転しておき、試料マウント後に 35 K に温度設定を行う。

多くの放射光ビームラインでは、X 線の偏光面に応じて水平型ゴニオメーターが設置されている。水平型ゴニオメーターにおける試料設置では、結晶マウント具の試料支持ピンが直接シースガスを遮り、ピンのシースガスに対する角度によっては、シースガスがピン表面を伝いながら試料位置まで拡散することがある (Fig. 4(a))。測定中の試料表面への固体窒素付着防止には、ピンと結晶マウント用

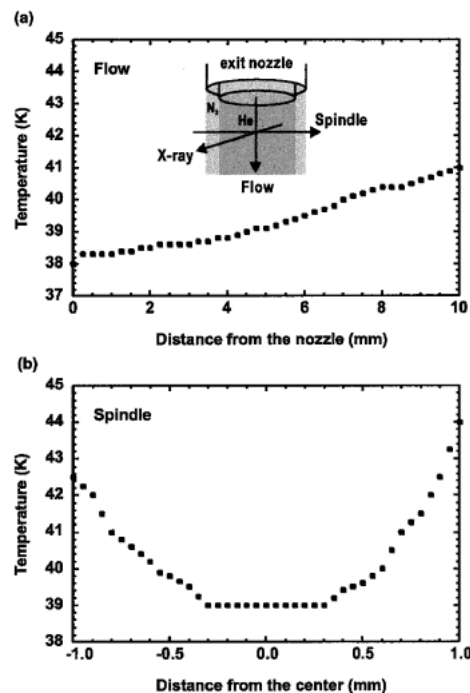


Figure 3. Temperature variation around the exit nozzle of the cooling device measured with a thermocouple under the He-gas flow rate of 5.0 Litter/min. (a) Variation along the center axis of the gas flow. (b) Variation in the horizontal plane 5 mm distant from the nozzle.

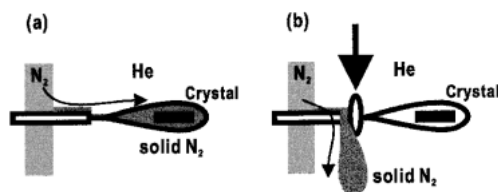


Figure 4. A schematic illustration of the solid-nitrogen formation around the sample with (a) and without (b) the 'deflector', indicated by an arrow, at the tip of the crystal mounting device.

ループの接続部にリング状に接着剤を塗布し、表面を拡散する窒素ガスを、ちょうど「ねずみ返し」のように拡散する窒素ガスを逃がす細工が必要となる¹⁴⁾ (Fig. 4(b))。

4. 実験例

本装置を用いた回折実験は、SPring-8のBL41XU⁶⁾において二度¹¹⁾、BL40B2¹²⁾において一度¹³⁾実施された。いずれの実験でも冷却装置は 2 または 4 日の間トラブル無く動作し、標準試料に加えて幾つかの蛋白質や超分子複合体結晶の回折強度データが収集された。一例として、シタロン脱水酵素変異体¹⁴⁾の回折パターンを Fig. 5 に示す。分解能 1.45 Å まで収集した回折強度データを用いて良好な電子密度を得ることができている。連続露光による 37 K と 100 K での放射線損傷の程度を比較する実験や光応答性蛋白質の光刺激直後の構造解析なども継続して行っている。

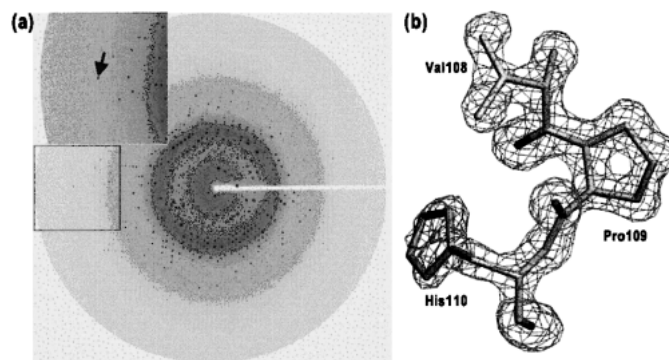


Figure 5. (a) An X-ray diffraction pattern of scytalone dehydratase F162A mutant crystal taken at 37 K. The arrow in the magnified view at the upper-left indicates a diffraction spot laying at the Bragg spacing of 1.5 Å. The pattern was taken at BL41XU of SPring-8 with MarCCD165 detector. The X-ray wavelength was 0.710 Å, and the crystal-to-detector distance was 130 mm. (b) An omit-annealed F_o-F_c difference Fourier electron density map around the active site (His110) of the scytalone dehydratase mutant. The map is calculated with the reflections between the Bragg spacings of 8.00 and 1.45 Å, and is contoured at 4.0 standard deviation level.

5. おわりに

蛋白質結晶の低温回折実験は、整理された手順でなされるようになり、本稿のような技術開発によって、その適用範囲の拡大もなされ始めている。一方で、残された課題も多い。高輝度放射光 X 線を用いたサブゼロ温度領域での簡便な低温実験技術の開発、中性子低温結晶構造解析に向けたミリメートルサイズ結晶の簡便な冷却方法等である。特に前者は蛋白質の機能発現と振動ダイナミクスの相関を研究する上で非常に重要である。我々は、今後、これらの課題の解決に向けた実験技術の開発を予定である。なお、本稿で紹介した冷却装置は昨年より市販されており、SPring-8 の BL40B2 で利用可能である。

謝辞

本装置の製作において、岩谷瓦斯株式会社の研谷昌一郎氏、理学電機株式会社横沢裕氏、ユニオン工学山田佳人氏にご助言、御助力いただきましたことを深く感謝申し上げます。また、製作全般において理学電機株式会社、リガク東京・大阪支店の方々に御助力いただきました。X 線回折実験を行うにあたっては、理化学研究所・播磨研究所の神谷信夫博士に御助力いただくとともに、多数の研究者の方々に低温実験に参加していただきました。お礼申し上げます。本装置開発は、科学研究費補助金によって援助を受けました。また、SPring-8 での実験は、共同利用実験課題（課題番号 2000B0097-NL-np, 2001A0349-NL-np, 2001B0049-CL-np）として実施されました。

参考文献

- 1) E. F. Garman and T. S. Schneider: *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 211 (1997).
- 2) 中迫雅由: 本結晶学会誌 **37**, 266 (1995); M. Nakasako, T. Ueki and Y. Umeda: *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 856 (1995); 中迫雅由: 生物物理 **36**, 110 (1996); 中迫雅由: 日本結晶学会誌 **41**, 47 (1999).
- 3) 中迫雅由: 日本結晶学会誌 **40**, 107 (1998); M. Nakasako: *Bioscience and Industry* **56**, 23 (1998); M. Nakasako: *J. Mol. Biol.* **289**, 547 (1999); M. Nakasako, H. Takahashi, N. Shimba, I. Shimada and Y. Arata: *J. Mol. Biol.* **291**, 117 (1999); M. Nakasako, T. Fujisawa, S. Adachi, T. Kudo and S. Higuchi: *Biochemistry* **40**, 3069 (2001); M. Nakasako: *Cell. Mol. Biol.* **47**, 767 (2001); M. Nakasako: *J. Biol. Phys.*, in press (2002); M. Nakasako, F. Tsuchiya and Y. Arata: *Biophys. Chem.*, in press (2002); J. Higo and M. Nakasako: *J. Comp. Chem.* in press (2002).
- 4) C. Nagata, M. Moriyama, N. Tanaka, M. Nakasako, M. Yamamoto, T. Ueki and T. Oshima: *Acta Crystallogr. Sect. D*, **52**, 632 (1996); Y. Joti, M. Nakasako, A. Kidera and N. Go: submitted to *Acta Crystallogr. Sect. D*.
- 5) S. Nagashima, M. Nakasako, M. Odaka, M. Yohda, N. Kamiya and I. Endo: *Photon Factory activity report* **13**, 329 (1996).
- 6) M. Kawamoto, Y. Kawano and N. Kamiya: *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A* **467-468**, 1375 (2001).
- 7) M. Yamamoto, T. Kumasaka, T. Fujisawa and T. Ueki: *J. Synchr. Rad.* **5**, 222 (1998).
- 8) Y. Fujiyoshi: *Adv. Biophys.* **35**, 25 (1998).
- 9) M. J. Hardie, K. Kirschbaum, A. Martin and A. A. Pinkerton: *J. Appl. Crystallogr.* **31**, 815 (1998); B. L. Hanson, A. Martin, J. M. Harp, D. A. Parrish, C. G. Bunick, K. Kirschbaum, A. A. Pinkerton and G. J. Bunick: *J. Appl. Crystallogr.* **32**, 814 (1999).
- 10) M. Nakasako, M. Sawano and M. Kawamoto: *Rigaku J.* **18**, 47 (2001); 中迫雅由, 澤野成民, 河本正秀: 理学電機ジャーナル **32**, 8 (2001); M. Nakasako, M. Sawano and M. Kawamoto: *Rev. Sci. Instrum.* **73**, 1318 (2002).
- 11) M. Nakasako, M. Kawamoto, J.-R. Shen, N. Kamiya, Y. Shirakihara, K. Imada, F. Samaty and S. Nagashima: *SPring-8 User's report 2000B*; Nakasako and M. Kawamoto, *SPring-8 User's report 2001B*.
- 12) 三浦圭子, 井上勝晶, 河本正秀: *SPring-8 利用者情報* **5**, 336 (2000).
- 13) M. Nakasako: *SPring-8 User's report 2001A*; M. Nakasako, K. Miura and M. Yoshimura: *SPring-8 User's report 2001A*.
- 14) T. Motoyama, M. Nakasako and I. Yamaguchi: *Acta Crystallogr. Sect. D*, in press (2002); M. Nakasako, T. Motoyama and I. Yamaguchi: submitted.