中性子科学への招待 (3)

中性子単結晶構造解析, 生物回折計

日本原子力研究所 栗原和男

茨城大学 田中伊知朗, 新村信雄

Kazuo KURIHARA, Ichiro TANAKA and Nobuo NIIMURA:
Neutron Diffractometer for Biological Macromolecule Crystallography

Neutron diffraction provides an experimental method of directly locating hydrogen atoms in proteins and nucleic acids, and the development of the neutron imaging plate (NIP) became a breakthrough event in neutron protein crystallography. A high resolution neutron diffractometers dedicated to biological macromolecules (BIX-3, BIX-4) with the NIP have been constructed at Japan Atomic Energy Research Institute. The detailed structure of the diffractometer and the systematic procedure of the neutron diffraction experiment from the crystallization of a large single crystal to the data collection and the data processing, and the future prospect of the neutron diffractometry in proteins will be presented.

1. 序

21世紀に入りヒトゲノムの解読が完了し、人間は自らの生命の設計図を手にしてこれをもとに本格的な生命現象を理解する時代、ポストゲノム時代に入った。タンパク質やDNAは立体構造を形成して初めて機能を発揮する。立体構造解析の主流は放射光X線やNMRである。しかし、生理機能に直接関与する水素原子や完全な水和構造はX線やNMRでは決定困難である。生命現象のなかで水素原子の果たす役割や生体物質と水とのかかわりは大変重要である。しかし、それらを原子レベルで観察した例は少なく、生命現象のなかで水素原子の果たす役割や生体物質と水とのかかわりの多くは類推で議論されることが多かった。これを可能にする最も有効な実験手法の1つが中性子回折法である。

中性子回折法によるタンパク質の結晶構造解析は決して新しいものではなく、すでにB. Schoenbornらによって1969年にミオグロビンの構造解析が報告されている。¹⁾その後いくつかの基本的なタンパク質の中性子回折実験が行われたが、1980年以降実験がなされなくなってしまった。データ収集に1年以上の時間がかかるのが1番の原因であった。

この難題を解決したのが中性子イメージングプレート(NIP)の開発と実用化である。²⁾加えて高性能中性子モノクロメータを開発実用化し、これらを装備した世界最高性能の生体物質中性子回折計(BIX-2, BIX-3, BIX-4)を原

研JRR-3に設置した。³⁾これにより、約1 mm角のタンパク質単結晶を用いて平均的には25日位で2 Å以下の高分解能データ収集が可能となり、リゾチーム、ミオグロビン、ルブレドキシン、インスリンなど基本的なタンパク質やオリゴマーDNAなどの水素・水和構造決定を完了し、中性子構造生物学という分野を確立することに成功した。⁴⁾中性子構造生物学はタンパク質や核酸などの水素や水和構造を見たい研究者なら誰もがができる実験手法になった。

この入門講座はX線タンパク質結晶構造解析経験者のための中性子構造生物学実験用回折装置の解説である。そうでない場合でも最低回折結晶法による構造解析の知識を有している読者を対象に書いている。

生体物質中性子回折計の実験入門講座であることなので、装置の詳細、それを用いてデータを取得すること、生データから構造因子の大きさを求めることまでを述べたが、

- (1) いわゆる構造解析を行うこと、水素原子、水和構造の位置決定とそれらの精密化
- (2) 中性子回折実験で得られた水素原子、水和構造の実例については割愛した。(1)については個々のわれわれの論文に書かれてあり、また(2)については総合報告を参照して欲しい。⁴⁾

2. 生物用中性子回折装置の備えるべき要素

2.1 X線回折装置との違い

中性子回折法とX線回折法の原理的な違いはすでに多く書かれてある⁵⁾のでここでは詳細は述べないが、中性子

回折装置建設および実験計画を立てるうえで知っていてほしい重要な違いに限って述べる。

中性子強度はX線に比べて10桁近く弱い。この違いは決定的であり、中性子回折装置建設は中性子強度との戦

図1 中性子回折装置の写真。(Photography of a BIX-type neutron diffractometer.)

図2 中性子回折装置の概念図。(Schematic view of a BIX-type neutron diffractometer.)

図3 回折パターンの一例 (ミオグロビン)。(An example of diffraction pattern from myoglobin.)

いであり、種々の工夫を凝らし装置建設を行い、それにより中性子構造解析手法の原理は確立した。弱い中性子強度をカバーするためにとった中性子回折装置の工夫と特長を以下に示す。また、具体的な工夫などは次節以降に順次説明する。

- (1) 入射中性子ビームの平行度を可能な限り落とし、結晶にあたる中性子強度を増加させた。その結果、回折斑点は広がり測定可能な格子定数に制限がつく。
- (2) 中性子散乱長 (X線の原子構造因子に相当) が散乱角によらないので原理的に高分解能データ収集に適している。また、長波長中性子の反射率は大きいのでそれをうい背面反射を十分とれるようにする。
- (3) 大型結晶 (約1 mm 角) を用いる必要がある。試料は石英ガラスキャピラリーに封入する。石英ガラスは中性子にとり透明であるので、肉厚のキャピラリーが使い封入は比較的容易である。
- (4) 使用する中性子のエネルギーは meV 領域 (X線は 10 keV 領域) なので、中性子照射で結晶損傷はなく、常温測定が可能で、1 個の結晶で全反射の測定が完了する。
- (5) データ収集に時間がかかるので中性子回折実験はハイスループット構造解析には不向きである。

種々の工夫を凝らして建設した中性子回折装置の写真 (図1) と概念図 (図2) を示す。図3にこの装置で取得した回折パターンの一例を示す。

2.2 モノクロメータ

原子炉における中性子実験装置で最も基本的なコンポーネントの1つがモノクロメータである。従来型の高配向性熱分解黒鉛 (HOPG) では、結晶面のモザイク性が大きいため、小さな生体高分子試料結晶に達するまでに角度分散が生じ、試料位置での中性子強度確保に問題があった。そこでわれわれは、弾性的に湾曲させると中性子の反射率が增大かつ集光する原理を利用した弾性湾曲完全結晶シリコン (EBP-Si) に注目し、ピアノ線を利用して結晶湾曲器を小型化・単純化した (図4)。その結果、生体遮蔽体内の狭い場所に設置することが可能となり、生体高分子用中

図4 弾性湾曲完全結晶シリコンモノクロメータ。(An elastically bent perfect silicon monochromator.)

表1 従来のPSDとNIPの性能比較. (Comparison of the performance of convetional PSD and NIP.)

	中性子イメージングプレート (NIP)	二次元位置敏感比例計数管 (PSD)
データ取り込み方式	積分	微分
中性子検出器効率 (波長 1 Å)	~80%	~80%
位置分解能	0.2 mm以下	約2 mm (最良で)
直線性	0.1%以下 (全領域)	~1% (中心部) ~5% (端部)
一様性	0.1%以下 (全領域)	場所依存性大 (経年変化大)
有感面積	原理的に制限なし	数10 cm×数10 cm
計数率	10 ¹⁰ cps以上/cm ²	10 ⁴ ~10 ⁵ cps/全有感面積
ダイナミックレンジ	5桁	制限なし
γ線感受率	1/20 $E_\gamma > 300$ keV 1/2 $E_\gamma < 300$ keV (Pb 1 mm厚で1/10に減少)	波高弁別により分離可
構造	可塑性	剛体

性子回折計モノクロメータとして世界で初めて実用化に至った。⁶⁾

従来型 HOPG モノクロメータと比べた主な特長は,

- (1) (hkl) 反射面選択による広い領域の波長選択と高調波除去が可能である.
- (2) 価格が1/10程度と安価である.
- (3) 大面積化が容易である.
- (4) 複数枚のシリコン板の重ね合せで反射強度が増大する.
- (5) 複数のEBP-Siモノクロメータを1ビームラインに設置し同一断面のビームを共有できる. これは, シリコン単結晶の中性子透過率が大きいので, 実際, BIX-3, BIX-4はもう1台の回折装置 (HRPD) とともに, それぞれEBP-Siモノクロメータを用い1本のビームラインをこのように共有している.

現在, 原研研究炉 (JRR-3) の中性子散乱装置 (BIX-2, BIX-3, BIX-4, HRPD, FONDER, RESA) でこのEBP-Siモノクロメータが使用されている.

2.3 中性子イメージングプレート (NIP)

NIPは開発当時にX線結晶構造解析で広く使用されていたIPに中性子検出のためガドリニウムを添加したものである. この開発に成功したところ, NIPについてはいくつかの雑誌で紹介したので構造, 原理その他応用などに興味ある読者は原論文⁷⁾およびそれら解説記事⁸⁾を読んでいただきたい. NIPはそれまで使用されていた位置敏感型中性子検出器 (PSD) の種々の性能を大幅に凌駕するものであった. 表1に従来のPSDとNIPの性能比較を示す. NIPが生体物質用中性子回折装置に应用されるに際して重要だった因子は,

- (1) 位置分解能が格段に良くなったため, カメラ半径を小さくでき, 装置がコンパクトになった.
- (2) 位置直線性が良くなり, Bragg 反射の指数づけが正確になった.
- (3) 大型面積検出器を容易に実現できるようになった.

図5 NIPのγ線感受率. (γ-ray energy dependence of NIP.)

- (4) 可塑性に富むので試料を見込んで円筒状に取り巻く構造がとれた.

であった. これらのお陰で25年前に廃れてしまった中性子回折法による構造生物が装いに新たに復活したのである.

一方, NIPにも大きな欠点があった. NIPは従来のX線用IPが原型であるので, バックグラウンドとなるγ線に有感であることであった. 従来の中性子検出器では, 中性子とγ線それぞれを検出したときの出力信号にかなりの差があるので, それらを検出ごとに波高分析器を用いてある程度分離できていた. 一方, NIPは入射放射線の種類を問わず検出してしまう. NIPのγ線感受率を測定した結果, 図5に示すようにエネルギーに強く依存することが判明した. つまり, 300 keV以下のγ線の感受率は高いがそれ以上の高エネルギーγ線の感受率は中性子の1/20である. しかも, 300 keV以下のγ線は1 mm厚の鉛でほとんど吸収されてしまうが, 中性子はそれではまったく吸収されない. NIPをこのようにして使用することで炉室内のγ線環境下でも使用可能になった.⁸⁾

2.4 バックグラウンド遮蔽, 中性子光学系

炉室内での放射線 (隣接回折計からの漏洩放射線など) によるバックグラウンドを検出器から遮蔽するために, 回

折計本体は円筒状の遮蔽ケースによって覆われている。NIPはX線や γ 線にも有感であるため、中性子のみならずX線特に γ 線の遮蔽も考慮しなくてはならない。そこで、設置位置での遮蔽予備実験の結果に基づき、遮蔽ケースは外側に5 cm厚の炭化ホウ素 (B_4C) 粉末と接着剤の混合物 (ホウ素は熱中性子に対して高い遮蔽能をもつが、中性子の吸収で二次 γ 線を放出するので)、内側に5 cm厚鉛の2層構造とした (図2)。これにより、周囲からのバックグラウンドは中性子: 0.1 %以下, γ 線: 10 %以下に減少する。

一方、入射中性子とともにビーム上流から試料に入射する γ 線もバックグラウンドとなるが前節で述べたようにNIP直前に1 mm厚鉛板を設置した。これにより回折斑点のS/N比が1.2 ~ 1.6倍に改善される。⁸⁾

さらに、フライトチューブと試料位置の間には、入射中性子の空気散乱を遮蔽するため、 B_4C (5 mm厚) が内壁に張られた円筒管がその内部をダイレクトビームが通過するように設置されている。試料直前には、入射ビームの最終成型用に2段のスリットが設置されている。二次 γ 線の小さいスリット材としてフッ化リチウム焼結体を使用している。

2.5 データ読み取り

NIPの読み取り原理は基本的にX線IPと同様である (図2)。中性子露出終了後、円筒型NIPは下方に移動する。それと同時に、励起レーザー照射とNIPからの輝尽性発光を受光する読み取りロッドが回転しながらNIP上を走査する。走査終了後、NIPの移動は上方に転じ、読み取りきれなかったNIP上の回折強度パターンがハロゲンランプにより消去され、次の露出サイクルに移る。この一連の読取サイクルには、BIX-3の場合約5分、BIX-4の場合、読取モード (後述) によって約5分または8分かかる。さらに、この読取系 (光学系、信号回路、走査動作および強度データ出力) には以下のような工夫がなされている。

励起光の強度を上げるため、励起レーザーに反射集光系を付加した (図6)。一般に、励起光源が大強度であるほど輝尽性発光も高強度となって画像読取のS/N比が良くなる。したがって、励起レーザーは大強度のものが望ましいが、大強度のレーザー光源は非常に高価で、かつその駆動や冷却も大掛りとなりやすく、応用範囲の広いコンパクトな読取器を製作するのが困難であった。そこで、BIX-3およびBIX-4では、励起レーザー部に複数のレーザーを使用しかつ反射集光系を組み合わせたものを装備した。具体的には、4台の半導体レーザーを使用し、各光源がそれぞれに発する励起光ビームを凸面鏡で同一方向へ反射して集光させている。

また、読取装置のダイナミックレンジを広げるため、読み取られた輝尽性発光信号を増幅する光電子増倍管を高感度・低感度用の2段とした。ある画素の強度情報に着目した場合、読み取られた輝尽発光はまず半透過鏡により

図6 NIP読取用レーザー反射集光原理図。(The principle of a laser focusing system for reading NIP.)

10 : 1に分割された後、高感度・低感度それぞれの増倍管に導かれる。増幅された信号は、通常は高感度側の強度が記録されるが、強度が高感度側の最大許容入射量に近いしきい値以上であるときは、低感度側の信号に切り替わり、その値に補正係数をかけて記録される。これによって、読取装置は10⁶のダイナミックレンジをもつ。

さらに、読取走査およびデータ出力にもいくつかのモードを選択可能となっている。まず読取走査について、その走査間隔はBIX-3では円筒型NIPの円周方向、円筒軸方向ともに0.2 mmであるが、BIX-4では円周方向は0.1 mm固定、円筒軸方向は0.1/0.2 mm切替可能となっている。一方で、強度データの出力間隔 (出力画素サイズ) は、円周軸×円筒軸 = 0.2 × 0.2 mm/0.4 mm × 0.4 mmの2モードとなっている。ただし、BIX-4ではそれぞれにおいて、読取走査間隔を変更可能である (つまり、読取走査間隔とデータ出力間隔の組み合わせは、BIX-3では2モード、BIX-4では4モード)。これによって、測定条件に応じて出力分解能とデータ統計精度の組み合わせを選択可能にしている。ただし、BIX-4における円筒軸方向0.1 mm間隔走査の場合は、読取動作サイクル時間が0.2 mm間隔に比べて約5分から約8分に増加する。

2.6 その他補助装置

結晶アライメント装置 (図7) : 中性子回折装置BIX-3、BIX-4の試料位置周辺はコンパクトで大量の遮蔽ケースに覆われているので、試料へのアクセスがほとんど不可能である。そこで、結晶のセンタリングにはゴニオメータを回折計本体より外してこの結晶アライメント装置に移動し、入射中性子ビームラインと同位置関係にセットしたCCDカメラを用いて行う。その後、試料がセットされたゴニオメータを回折計に戻して測定を開始する。

2軸測定用アングル (図8) : BIX-3、BIX-4ともNIPが円筒状であるため、円周方向赤道線上のd-mimは1.2 Å

および1.4 Åである一方, 円筒軸方向は約3 Å程度と低い。そのため, 回転軸を2軸以上とって測定を行う場合が多い。結晶外形から結晶軸が推測できる場合に, 最初の封入段階でキャピラリーに対し, ある結晶軸を本治具で45度傾けてマウントし, さらに結晶軸が回転軸に一致するようにキャピラリーを傾けて(結晶軸の傾きと反対方向に45度)

図7 結晶アライメント装置。(A crystal alignment tool.)

図8 2軸測定用アングル。(A tool for crystal alignment of different 2 axes.)

セットし, 1軸目を測定する。キャピラリーを180度回転させれば, 結晶軸も回転軸に対し90度傾く。これで2軸目を測定できる。ただし, この方法ではキャピラリー自身や本治具の影がNIP上に現れるので注意する必要がある。

3. データ収集

3.1 Step scanとその意義

BIX-3およびBIX-4ではステップスキャン法で測定を行っている。振動写真法では検出器上であるブラッグ反射が出るべき場所に注目した場合, その反射が出ていない試料角度条件のときにも入射ビームは試料に当たり続けバックグラウンドが検出器上のその場所に加算される。これに対してステップスキャン法は反射が起きていない条件でのバックグラウンドが含まれないのでバックグラウンドを極小化でき, その結果シグナル/バックグラウンド比を極大にできる。特に中性子回折では非干渉性散乱からのバックグラウンドが強いので, ステップスキャン法が有効である。通常, BIX-3やBIX-4のステップ幅は0.3度で行っている。ただし, その際, すべての反射はパーシャルになる。

3.2 ラウエ法との比較

世界の原子炉を用いた生体物質中性子回折実験はBIX-3, BIX-4以外ではフランスのラウエ・ランジュバン研究所のラウエカメラ型中性子回折装置LADIでしか行われていない。ここでLADIによる実験についてコメントする。

LADIでは通常, バックグラウンド低減と反射スポット分離のために1 Å程度の限られた波長幅を使用して試料からのブラッグ反射を収集する。これを準ラウエ法と呼んでいる。準ラウエ法は, モノクロメータ法に比べて, 少数の結晶角度における測定で1データセット収集できるので測定時間が比較的短時間で済むが, 高次反射の重なりが生じたり, 中性子非干渉性散乱による高いバックグラウンドのため高角の反射が見えにくくなったりする問題点がある。

表2 中性子回折装置BIX-3(モノクロメータ法)とLADI(準ラウエ法)の仕様比較。(Comparison of the neutron diffractometer BIX-3 (monochromator type) and LADI (quasi-Laue type).)

	BIX-3(原研)	LADI(ILL)
回折の原理	モノクロメータ法	準ラウエ法
入射中性子	弾性湾曲シリコン Si(111/311) (2.35/1.23 Å)	多層膜(Ti and Ni) (3~4 Å)
強度 [n/sec/cm ²]	3×10 ⁶ (Δλ/λ=0.015)	3×10 ⁷ (Δλ/λ=0.28 at 3.5 Å)
カメラ半径 (試料-検出器間距離)	200 mm	159 mm
検出器 周長, 高さ	neutron imaging plate 500 mm×450 mm (2 plates)	neutron imaging plate 200 mm×400 mm (4 plates)
最大反射角度	143°	144°
分解能	1.2 Å/0.6 Å	1.4 Å
検出器読み取り方向	入射: 前方 読み取り: 前方	入射: 後方 読み取り: 前方
シグナル/ノイズ比	10	1(単位)
データ収集期間	22 days, d _{min} =1.5 Å (myoglobinの場合)	10 days, d _{min} =2.0 Å (hew-lysozymeの場合)

ある。一方、モノクロメータ法とステップスキャン法を併用すると、不必要なバックグラウンドを最小限にできるので、シグナル/バックグラウンド比が向上する。ちなみに $\Delta\lambda$ の幅を考えると、BIX-3はLADIの1/10なので、シグナル/バックグラウンド比も10倍になるので(表2)、高角の弱い反射が見えやすくなりその測定精度も向上することが期待される。BIX-3、BIX-4では、測定時間が長くなるが高角データはより精度良く収集でき、その結果、水素原子の位置情報を正確に得ることができると考えられるので優れている。

4. 中性子回折実験の流れ

4.1 試料調整, 結晶育成

中性子で水素原子が見えるのは水素原子と中性子の相互作用が強いからである。しかし、中性子回折実験で水素原子には大変不都合な面がある。水素原子核は核スピンを有しそれが不規則に並ぶことに起因して、中性子は水素原子で大変強い非干渉性散乱(等方散乱)を起こしバックグラウンドになる。一方、重水素では核スピが消しこのようなことが生じない。そこで、水素原子を重水素に置換できるなら中性子回折データの質は1桁以上向上できる。そのために重水中で結晶育成を行う。それが困難な場合はいったん通常の方法で育成した結晶を重水中に1~3カ月ほど浸しておく(重水中には結晶が溶解しないようにあらかじめ結晶化剤などを調整しておくことが必要である。)と結晶中の水が重水に置き換わる。また、これにより酸素や窒素原子に結合しているほとんどの水素原子は重水素に置き換わる。ただし、炭素原子に共有結合している水素原子は置換しない。データの質をさらに向上させるにはこの水素原子も重水素に置換するとよいが、これはタンパク質大量発現の段階から、例えば大腸菌の飼育を重水中で行うなどの措置が必要で、時間と経費がかかる。この詳細はここでは割愛する。

中性子回折実験で重要なのは大型単結晶育成である。これの原理的なことは最近雑誌⁹⁾にまとめたのでそれを読んでいただくとしてここに概要を記す。大型結晶育成の基本は溶解度曲線の近傍にある準安定領域(核形成はしないが、種結晶があれば結晶成長する領域)で結晶成長させることである。そのためには、簡便でよいから相図を決定し、それをもとに結晶育成することである。われわれはそのため大型結晶育成装置を製作し、現在その使用方法を確立中である。それに準じた簡便な方法として、インスリンの大型結晶育成の例を図9に紹介する。透析法により準安定状態よりわずかに過飽和状態で結晶化を行う。そこに核形成した結晶は成長することで溶液中のタンパク質濃度は低下し溶液全体が準安定状態に入る。そこでは核形成が生じないので、タンパク質は現有の結晶に集中して取り込まれ大型結晶が得られた。このようにして得られた結晶

図9 インスリンの大型結晶育成の例。(Crystallization process of a large single crystal of insulin.)

図10 インスリンの巨大結晶。(A large single crystal of insulin.)

を図10に示してある。

4.2 試料封入およびアライメント

キャピラリーへの封入の際にX線回折実験と大きく異なる点は、使用する結晶が通常1 mm角と大きいため、スポイト類などを使用して結晶に直接接せず母液からの引き上げ、移動、キャピラリーへのマウントなど行えない場合が多いことである。そこで、結晶に直接接触して操作する市販品(Micro Tools (Hampton Research Corp.)など)や自作の結晶取り扱い治具が必要となる。また、キャピラリーも、特に大きな結晶の場合、通常のX線用キャピラリーでは内径が小さすぎてマウントできない場合があるので、その他のガラス管を使用することとなる。そこで問題となるのは、ガラス中に含まれる不純物で、熱中性子を吸収するホウ素やリチウムなども含まれている場合がある。当グループでは不純物含有量がきわめて少ないNMR用の溶融石英ガラス管(内径4 mm)を使用している。

試料のアライメントは、回折実験前に既述の結晶アライメント装置で行って置く。

4.3 データ収集

回折実験は完浴で行われる。測定はステップスキャン法で行う。ローレンツ因子にもよるが、1つの反射が4~5点でロッキングカーブを描ける程度にステップ幅を調整

した結果, BIX-3 および BIX-4 では 0.3 度となっている。ただし, 試料が有機分子など, 回折強度が大きく露出時間が短時間で十分なため NIP 読取時間の割合が全測定時間に対し相対的に大きくなる場合には, 測定効率を上げるために振動測定を行う場合が多い。

露出時間は長いのが望ましいが, 現実問題としてマシンタイムは有限である。したがって通常次の手順で露出時間などを決定する。

- (1) 用意された複数の結晶で最も高角のデータが取れるものを選ぶ。
- (2) 選んだ 1 つの結晶に対して高角度に観測される反射数の露光時間依存性を調べ, その反射数が飽和する時間を求める。
- (3) 空間群, 結晶方位を決定する。
- (4) 結晶の特性などを総合的に考慮して, 最も効率の良いスキャン範囲を定め, ステップ数および 1 フレーム当たりの照射時間が決定される。

実際の測定時間は, 例えば以下ようになる。回転角: 90 度, ステップ: 0.3 度 (300 フレーム), 読取時間: 5 分 (BIX-3, BIX-4: 円筒軸方向 0.2 mm モード) なら, 露出時間/測定時間 = 1 時間/325 時間 (13.5 日), 2 時間/625 時間 (26 日), 3 時間/925 時間 (38.5 日) となる。ちなみに, JRR-3 のマシンタイムは 7 サイクル/年であり, 1 サイクルは 25 日間, サイクル間は最短 10 日間である。

吸収補正: DENZO の未補正の x file を, 形状または等価反射から吸収補正して新たな x file を作成するマック・サイエンス社 (当時) 製ソフトウェア。この補正された x file から SCALEPACK によって最終的に補正された積分強度 $I(hkl)$ が算出される。形状データを作成する手順を以下に述べる。

- (1) 測定の前後は問わないが, 各結晶方位に対して前述の結晶アライメント装置上で 30 度ごとに 0 ~ 180 度まで 7 枚写真を撮る。
- (2) 各写真の結晶外形を CRT 上でなぞり, 各形状データを保存する。

4.4 データ処理

データ処理には, DENZO と SCALEPACK を使用している。処理方法は X 線と基本的に同じである。ただし, X 線の場合と異なり, 回折斑点が広がっているため, DENZO での予測スポット位置精密化の結果の 1 つである, positional error が非常に大きな値になるなど, 通常の X 線回折実験では出くわさない点も見受けられる。一方で, 中性子の場合, 放射線損傷は皆無であるためパラメータ精密化にそのような考慮は必要なく, また, 結晶はビームに対し完浴で測定し結晶による吸収も少ないため, 多くの場合, 結晶形状による吸収補正も必要がないという点もある。

もう 1 点 X 線の場合と大きく異なっているのは, 前述のようにここで使用している中性子の場合ビームの波長・日本結晶学会誌 第 46 巻 第 3 号 (2004)

図 11 円周線上に伸びた回折斑点の一例 (インスリン).
(An example of diffraction spots elongated along circumference (insulin).)

角度分散が大きいため, 通常, NIP 上での回折斑点は円周線上に伸びた形をしていることがある (図 11)。結晶が比較的小さくその形状の異方性が強調される場合や, 格子定数が大きく回折斑点が密な場合において, DENZO による回折強度計算段階でパラメータの 1 つである spot の形状に対して円を用いると, 実際の回折斑点形より非常に大きな直径の spot を使用することとなる。その場合, 強度データの精度が悪くなったり, 隣接 spot が重なり合ってしまう強度データが取得できないということが生じる。そのようなことを避けるには, spot に楕円を用い実際の回折斑点形状に近づける必要がある。しかし, DENZO の通常の使用方法では, 1 フレームに対して 1 つの形状の spot しか指定できないので, フレーム全体の回折斑点に対して適切な spot を適用できない。そこで, この場合, DENZO の使用法に工夫が必要となる。その 1 つの解決策として以下のような方法が挙げられる。フレーム内をいくつかの領域に分割し, それぞれの領域内での回折斑点形状に適切な spot を指定する。次にそれぞれの spot で回折強度の取得を繰り返し行う。最後に各回折強度データセット (x file) から対応する spot が適応される領域の回折強度データだけをそれぞれ抽出し, それらをフレームごとに組み合わせ最終的な回折強度データセットを得る。現在は, 以上のような方法を, 一部プログラム作成して行っている。

5. 飛行時間法回折装置 (BIX-P1) 建設に向けての Design Philosophy

ここで将来の方向を述べる。すでに述べたが, 生体物質の中性子単結晶構造解析は中性子強度との戦いである。ここまで述べてきた手順でデータは収集可能であるが, データ収集に最低 1 カ月にかかる。また, 1 mm 角の単結晶を育成するのも容易ではない。なんといっても中性子強度の向上が必要である。幸い, 現在建設中の J-PARC における

図12 生体関連物質結晶構造解析用パルス中性子回折計 (BIX-P1) の模式図。(Schematic view of a single crystal pulsed neutron diffractometer for biologically important materials no.1 (BIX-P1).)

1 MW 出力のパルス中性子を用いた単結晶回折装置は、原研 JRR-3 に設置されている生物用回折計と比較して 50 倍以上の測定効率を期待できる。現在、単位格子長が 135 Å 程度までの結晶に対応した生体関連物質結晶構造解析用パルス中性子回折計 (BIX-P1) の提案がされており、その詳細な仕様の検討が進められている (図 12)。¹¹⁾

生体高分子の中性子回折実験を考えるうえで最重要課題は中性子強度である。米国での同様の次世代中性子源 SNS 計画のパルス周期 60 Hz と大きく異なる J-PARC の 25 Hz を活かした性能を引き出し、大強度中性子の発生が可能な結合型減速材に取り付けることで生体高分子単結晶試料からの弱いシグナルを拾えるようなデザインにしている。

また、標準となる結晶が 0.5 mm 角と小さいことから、検出器の位置分解能を 1 mm 以下としながら、かつ広い立体角を最少の隙間で覆うことのできる数マイクロ秒の時間分解能をもつ二次元検出器が必要である。積分型の中性子イメージングプレート (NIP) は J-PARC には不適である。試料-検出器間距離を短めにしているのは、費用を抑え、かつなるべく少量の部品で安定した運転を実現するためである。

その他、結合型減速材に由来する裾の重なった反射スポットを分離するデータ処理ソフトウェア、そして中性子源から 40 m 試料位置までのガイド管的確なデザインが BIX-P1 のフルスペック実現には必要である。

6. 終わりに；中性子回折実験を行う手続き

この入門講座をお読みいただければ、タンパク質結晶の中性子回折実験を行うための技術的問題はご理解いただけたと思う。最後に、BIX-3 や BIX-4 を用いてのタンパク質などの中性子回折実験を行う手続きについて述べる。

BIX-3、BIX-4 は現在日本原子力研究所中性子利用研究センター中性子構造生物学研究グループ (グループリーダー：黒木良太氏) が維持管理している。これを利用するには原研と、大学関係であれば協力研究、民間企業などであれば共同研究を実施するという形態をとる必要が

ある。このための手続きの詳細は原研ホームページ (<http://www.jaeri.go.jp>) の「お知らせ／研究課題公募」または「活動について／研究協力と技術移転」のなかの「研究協力／募集型の共同・協力研究／募集中の研究課題案内」に記されている。ただ、どちらの場合も事前に技術的な問題を経験者 (例えばこの入門講座の著者ら) と十分詰めてから協力研究、共同研究の手続きを開始されることが実験成功の早道であろう。なお、例年だと 10 月末に次年度の協力、共同研究公募が締め切られる。

本原稿をまとめるにあたりさまざまな視点からの情報提供をいただいた日本原子力研究所中性子構造生物グループの皆さんに感謝します。

文 献

- 1) B. Schoenborn: *Nature* **224**, 143 (1969).
- 2) N. Niimura *et al.*: *Nucl. Instr. Methods A* **349**, 521 (1994).
- 3) I. Tanaka *et al.*: *J. Appl. Cryst.* **35**, 34 (2002).
- 4) N. Niimura *et al.*: *Z. Kristallogr.* **218**, 96 (2003). (タンパク質の中性子回折実験解析結果の実例が報告されている。)
- 5) 新村信雄, 茶竹俊行: 日本中性子科学会誌「波紋」**13**, 47 (2003).
- 6) I. Tanaka *et al.*: *J. Appl. Cryst.* **32**, 525 (1999).
- 7) 新村信雄: *RADIOISOTOPES* **44**, 449 (1995).
- 8) Y. K. Haga *et al.*: *J. Appl. Cryst.* **32**, 878 (1999).
- 9) 新村信雄: 現代化学 **396**, 26 (2004).
- 10) M. Maeda *et al.*: *J. Synchro. Rad.* **1**, 12 (2004).
- 11) I. Tanaka *et al.*: ESS 03-136-M1, 321 (2003).

プロフィール

栗原和男 Kazuo KURIHARA
日本原子力研究所中性子利用研究センター
Neutron Science Research Center, Japan Atomic Energy Research Institute
〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2-4
2-4 Shirakata-Shirane, Tokai, Ibaraki 319-1195, Japan
e-mail: kurihara@kotai3.tokai.jaeri.go.jp
専門分野：中性子構造生物学、タンパク質結晶成長

田中伊知朗 Ichiro TANAKA
茨城大学工学部物質工学科
Faculty of Engineering, Ibaraki University
〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1
4-12-1 Naka-narusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan
e-mail: i.tanaka@mx.ibaraki.ac.jp
専門分野：中性子構造生物学、中性子装置開発

新村信雄 Nobuo NIIMURA
茨城大学大学院理工学研究科応用粒子線科学専攻
Institute of Applied Beam Science, Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University
〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1
4-12-1 Naka-narusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan
e-mail: niimura@mx.ibaraki.ac.jp
専門分野：中性子構造生物学、タンパク質結晶成長学