

# ■ 生体物質中性子回折計と 中性子イメージングプレート

生体物質中性子回折研究グループ ■ 新 村 信 雄 ■

## Neutron Diffractometer for Crystallography in Biology and Imaging Plate Neutron Detector

Nobuo NIIMURA

Research Group For Neutron Crystallography in Biology

The structure–function relationship of bio–macromolecules is dominated by the behavior of hydrogen atoms, and neutron diffraction provides an only experimental method of directly locating hydrogen atoms.

We have constructed a diffractometer dedicated for the neutron crystallography in biology (BIX), where a large area detector system is indispensable. For this purpose, an imaging plate neutron detector was developed and promising results were successfully obtained.

### 1. 生体物質中性子回折計

タンパク質の機能は、3次元構造を形成して発現される。そのため、タンパク質の立体構造の原子レベルでの決定は、その生理機能の理解に必須である。これは、X線結晶構造解析で実現され、ワトソン・クリックらのDNA二重らせん構造決定を含め、5件ものノーベル賞が授与されていることから判るように、生命科学にとり重要な分野である。

X線結晶構造解析という、確固たる評価を得た分野があるにもかかわらず、なぜ中性子回折法なのであろうか。生体物質は構成元素の約半分が水素原子であり、生命現象の中で水素原子の果たす役割や生体物質と水との関わりは、大変重要なものである。しかし、X線回折法では、すべての元素の中で水素原子からの寄与は最も小さいため、その位置決定は困難で、決定された骨格から水素位置や水分子の位置を類推し、その振舞を議論せざるを得ないのが現状である。一方、

中性子回折法では、水素原子の中性子散乱能が炭素原子や酸素原子などと同程度であるため、水素原子の位置情報が得やすい。また、HとDでは、中性子散乱能が大きく異なるため、H/D置換により水素原子の位置決定の精度をさらに高めることもできる。また中性子回折法で用いる中性子のエネルギーは数10 meVであるため、中性子照射でタンパク質結晶が放射線損傷を受けることはない。それに対し、回折に用いるX線のエネルギーは約数10 keVと高いため、5～10個の単結晶を用意しなければならないのと対照的である。中性子回折法ではひとつの単結晶に必要な回折線を収集でき、結晶構造の温度変化から、タンパク質分子の熱振動の振舞を調べるのに大変有利である。

このような有用な手法は、大いに利用されるべきであるが、実際にはそれほど簡単な実験ではない。

観測されるBragg反射数を含んだ中性子回折強度式は次のようになる。

$$I \propto I_0 \cdot V_C \cdot A \cdot F(hkl)^2 / (v_0)^2 \quad (1)$$

ここで  $I_0$  は試料に入射する中性子束,  $V_c$  は単結晶の体積,  $A$  は試料を見込む検出器の立体角,  $F(hkl)$  は結晶構造因子, そして  $v_0$  は単位格子の体積である。

タンパク質結晶の単位格子の体積は数万  $\text{\AA}^3$  程度で, 通常は無機物質の結晶と比較すると, この項で4~5桁の反射強度減となる。これをカバーするためには, 試料に入射する中性子強度を増し, 大きな単結晶を用い, 試料を見込む立体角の大きな中性子検出器を準備することである。

我々は, 以上の条件を次のように考慮して, 生体高分子結晶構造解析用中性子回折計 (BIX) を設計し, 建設した。

中性子回折計で使用される中性子は, 原子炉から出る中性子をモノクロメーターで単色にして用いられる。そこで, 試料に入射する中性子強度を増す有効な方法は, BIX に最適なモノクロメーターを選定することである。得られるタンパク質単結晶の一辺の大きさは高々1~3 mm であり, またその格子定数は100  $\text{\AA}$  前後であるから, 角度分散が小さく輝度の高い中性子を与えるモノクロメーターが必須で, 多くの予備実験を行った結果, BIX に供せられる原子炉からのビームサイズ (4 cm 幅×4 cm 高) を有効に使用するため, 250 mm 長×29 mm 高×5 mm 厚のシリコン完全結晶を弾性的に曲げて用いる方法を採用した。その結果, 現在, 試料位置で, 大きさ5 mm $\phi$ , 中性子束  $3 \times 10^6 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$ , 角度拡がり半値幅  $0.3^\circ$  の中性子ビームが得られた。この方式の原理は, すでに発表されていた<sup>1)</sup>が, このように大きな系で実用化したのは我々が初めてである<sup>2)</sup>。なお, 更に改良を加え, 最終的に  $2 \times 10^7 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$  の中性子束が得られることを目標にしている。

入射中性子強度の増強と同等に重要なのが, 大面積中性子検出器の設置である。中性子イメージングプレートの実用化 (次節参照) まで, BIX は二次元位置敏感比例計数器 (PSD) (25 cm×25 cm, 位置分解能2.0 mm, 検出効率70% [ $\lambda=1.8 \text{\AA}$ ]) 2台を用いることにした。

上述以外にも種々のパーツに工夫を凝らした BIX (図1) を据付け調整し, 1994年7月24日午後9時, リゾチーム単結晶による中性子回折斑点の記録に成功した<sup>3)</sup>。

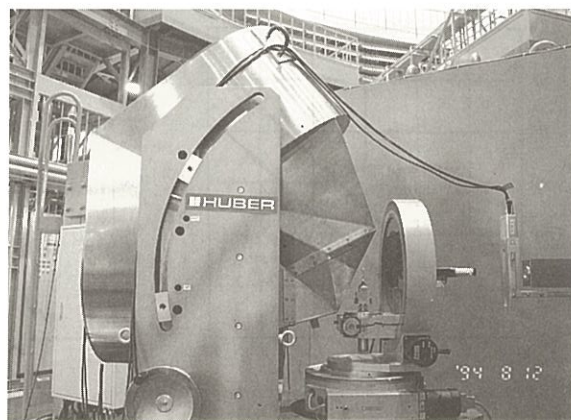


図1 完成した BIX

## 2. 中性子イメージングプレート (Imaging Plate Neutron Detector: IP-ND)

イメージングプレート (IP) は, 輝尽性蛍光体を用いた積分型二次元放射線検出器である。IP は, 以前から医療診断分野で使用されてきたが, 特にタンパク質等の生体高分子単結晶 X 線構造解析用二次元検出器として, その有用性が実証され, この分野の目覚ましい進歩に寄与したことで一躍注目を集めた。これは, 検出効率が約100%, 位置分解能が0.2 mm 以下, ダイナミックレンジが5桁, 面積が数100mm×数100mm という素晴らしい特長が多いに寄与したためである。

中性子イメージングプレート (IP-ND) の開発は, それに較べ相当の遅れをとっており, Gd 箔を X 線用 IP に密着させたり, Gd 化合物を X 線用 IP 蛍光体中に混ぜ込むなどの試みは行われていたが, 十分な成果は得られていなかった。

我々は, 富士写真フイルム(株)と共同で, IP-ND の開発を試み, X 線に匹敵する性能を有する IP を製作することができた。

IP に用いられる輝尽性蛍光体は次の様にして起る。使用されている蛍光体は  $\text{BaF}(\text{Br, I}): \text{Eu}^{2+}$  で, 放射線による一次励起で, 伝導バンドに生じた電子は  $\text{F}^+$  中心に, 価電子バンドに生じた正孔は  $\text{Eu}^{2+}$  に捕らえられ, それぞれ F 中心,  $\text{Eu}^{3+}$  になる。赤色光の照射で F 中心の電子は伝導バンドに解放され,  $\text{Eu}^{3+}$  に戻り, その励起状態に捕らえられ,  $\text{Eu}^{2+}$  による 390 nm (3.2 eV) の紫色発光を示す。

中性子は電荷を有しない粒子であるから, 蛍光体を一次励起させることのできる電離性放射線に中性子を変換するコンバーターが必要である。コンバーターとして  $^{10}\text{B}$ ,  $^6\text{Li}$ , Gd を第1候補にあげ, 中性子捕獲により生じるそれぞれからの二次粒子の輝尽性蛍光体中で

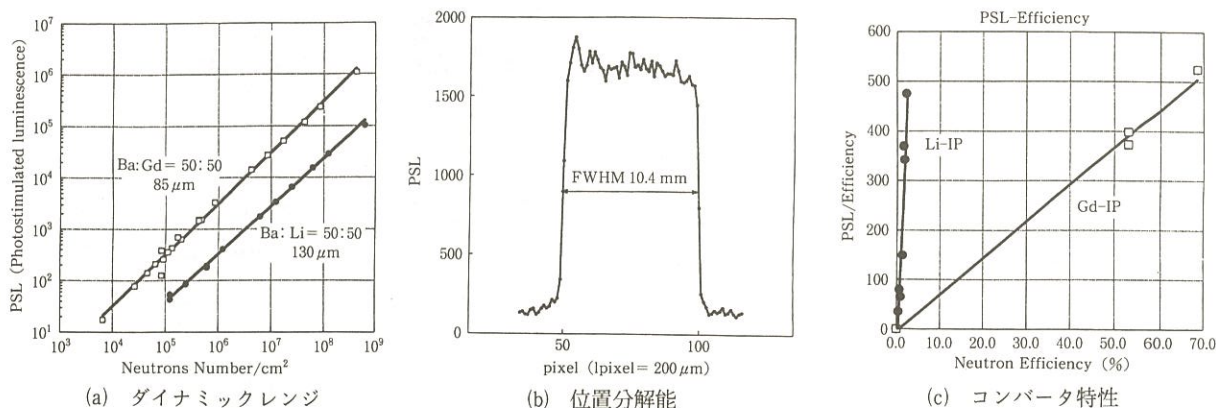


図2 中性子イメージングプレート特性図

の飛程、位置分解能、中性子検出効率を計算し、コンバーターの組成比、IPの厚みをパラメータにして数種類のIP-NDを設計製作した。なお、 $^{10}\text{B}$ については、それを含むいくつかの化合物について製作を試みたが、現時点では成功していない。これらのIP-NDについて、それぞれの特性を中性子を用いて測定した。

図2(a)に入射中性子数と輝尽性蛍光の強度(PSL)の関係を示すが、ダイナミックレンジは4~5桁あることが実証された。図2(b)は、10.0 mm幅のスリットをIP-NDに密着させた結果で、半値幅が10.4 mmと得られた。読取器の分解能を0.2 mmにして読んだので、位置分解能は0.2 mm以下であると言える。図2(c)は、横軸に中性子検出効率、縦軸にPSLをとったものである。グラフの勾配は、捕獲中性子1ヶに対するPSLを示す。 $^6\text{Li}$ 系がGd系に較べて勾配が約30倍となっているが、この値はそれぞれの元素からPSLに寄与した二次粒子のエネルギーの比に対応している。

中性子検出効率、ダイナミックレンジ、位置分解能を総合的に評価すると、このような優れた特性を有する中性子検出器は、未だ得られなかったもので、中性子計測分野に大きな効果を与えることとなる。

我々は、生体物質中性子回折計にIP-NDをセットし、リゾチームタンパク質単結晶(空間群 $P4_32_12$ , 格子定数 $a=b=79.1 \text{ \AA}$ ,  $c=37.9 \text{ \AA}$ , 結晶サイズ $2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm}$ )からの中性子回折斑点の記録を行った。実験条件は、中性子波長 $1.73 \text{ \AA}$ , 試料位置での中性子強度 $3 \times 10^6 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$ , 照射時間1時間, 試料とIP-ND間距離50 cmである。表紙写真はその結果を示すものである。これはタンパク質単結晶からの中性子回折斑点を単色中性子を用いて撮影した世界で初めての結果である。

しかし、現時点で、IP-NDをそのまま実用するには、中性子以外にX線、 $\gamma$ 線にも強く感じてしまうと

いう問題点がある。これを解決する方法として、(1)X線、 $\gamma$ 線に不感な輝尽性蛍光体を探す。(2)X線、 $\gamma$ 線を遮蔽する。(3)X線、 $\gamma$ 線を見積って補正する等が考えられ、現在、検討中である。

### 3. まとめ

1で述べたように、生体物質中性子回折実験は、中性子強度との関係で非常に難しい実験で、これまでILL(フランス)及びBNL(米国)の高束中性子炉でしか行われてこなかった。それぞれの原子炉に較べ、 $1/5$ ,  $1/2$ の強度のJRR-3Mに、生体物質中性子回折計を設置し、タンパク質結晶からの回折斑点の観測に成功できたことは特筆すべきことである。今後、PSDに替えて中性子イメージングプレートが使用可能となれば、生体物質中性子回折計の性能は一段と向上し、この分野の大きな発展に寄与するものと期待される。

### 参考文献

- 1) Mikula, P., Wagner, V., Lukas, P. and Scherm, R., Physica B **180&181**, 981 (1992).
- 2) Tanaka, I., Niimura, N., Karasawa, Y. and Minakawa, N., Physica B (in press).
- 3) Niimura, N., Tanaka, I., Minezaki, Y., Karasawa, Y., Tanaka, I., Miki, K., Sato, M., Hidaka, M., Minakawa, N. and Morii, Y., Physica B (in press).
- 4) Niimura, N., Karasawa, Y., Tanaka, I., Miyahara, J., Takahashi, K., Saito, H., Koizumi, S. and Hidaka, M., Nucl. Instr. Methods **A349**, 521 (1994).