

# ■ 高性能中性子回折計 (BIX-3) と生体高分子結晶構造解析

中性子構造生物学研究グループ ■ 田中伊知朗, 新村 信雄 ■

## High Performance Neutron Diffractometer for Biological Macromolecule Crystallography (BIX-3)

Ichiro TANAKA and Nobuo NIIMURA

Research Group for Neutron Structural Biology

A high performance neutron diffractometer for biological macromolecule crystallography (BIX-3) has been constructed at JRR-3M in JAERI, Japan, which is equipped with an elastically bent Si (EBP-Si) monochromator and a neutron imaging plate (NIP). It took 10 days to collect 1.6Å resolution data of rubredoxin by the use of BIX-3, and about 420 hydrogen atoms in rubredoxin have been identified at the early stage of data analysis. It was found that the data quality was better than that of a Laue diffractometer LADI at ILL in France and the BIX-3 was proved to be one of the highest performance diffractometers in the world.

### 1. はじめに

タンパク質の3次元立体構造は主にX線結晶解析法により決定され、生命科学に大きく貢献してきたが、水素原子の位置を十分に決定できないという原理的な課題を有している。一方、近年、タンパク質中及び周辺の水素・水和構造が立体構造の維持や反応性に大きく関与していることが明らかとなり、構造生物学の面から、水素原子の位置情報に対する需要が急速に増大しつつある。これを可能にする唯一の実験手法が中性子回折実験であるが、この度、世界一の性能を誇る中性子回折装置を完成させた。

これは、これまでに先端基礎研究センターが開発した中性子イメージングプレート (NIP) の技術と弾性湾曲シリコンモノクロメータの技術を組み合わせ、従来のこの種の装置には全く存在しない縦型装置にすることでコンパクト化を実現したものである。この装置により、タンパク質ルブレドキシンの水素原子位置決

定実験を試みたが、予定通り、約10日の実験で分解能 1.6Å の精度で分子構造を決定できる精度の高いデータが取得でき、この装置が設計通りの性能を有することが確認できた。今後は、DNAの水素原子及び水和構造を決定する実験を行うことを計画している。これにより、タンパク質がDNA遺伝情報を解読する機構解明が期待できる。

尚、この装置は生体物質の構造決定だけでなく、1mm角の極微量粉末試料からの中性子回折実験にも使えることが今回実証され、今後のユニークな粉末用中性子回折装置建設への参考になる装置である。

### 2. 単色中性子回折法とラウエ法

今回のBIX-3は単色中性子回折法を採用したが、最初に我々がニワトリ卵白リゾチームの中性子回折実験を行った<sup>1)</sup>ラウエランジュバン研究所 (ILL) の回折装置 (LADI) はラウエ法を採用した。生体物質中

中性子回折装置を設計するのに、単色中性子回折法とラウエ法のどちらを採用すべきか、比較を行って見る<sup>2)</sup>。

ラウエ法は白色中性子を用いる。(但し、ILLのLADIは後で述べるバックグラウンドを軽減するために約3から4Åの狭い波長範囲の中中性子を使っている。)そのため、試料位置での中性子強度も強く、ブラグの反射条件を満たす反射も多いので、一度に多くの反射を収集出来る優れた特徴がある。しかし、これは、隣り合う反射間の重なりも生じやすく、積分強度計算に誤差が入りやすくなる欠点を持つ。また、ブラグ反射条件を満たした波長の中中性子は有効な信号としてNIP上に記録されるが、それ以外の波長の中中性子も常時試料にあたっているため、それによるバックグラウンドが信号の上に被さってきて、S/N比が悪くなる。

一方、BIX-3では単色中性子を用い、且つ測定はステップスキャン法(結晶を固定して測定をし、データを読み取り後結晶を一定微小角回転する。)を採用しているため、ブラグ反射に不必要なバックグラウンドが乗ることはない。(但し通常のバックグラウンドはある。)LADIの場合、ブラグ反射に寄与する波長幅は入射波長幅の1割位であるので、単純な計算でBIX-3のS/NはLADIの約10倍良い。しかし、各測定毎にデータをメモリに格納するので、膨大なメモリー容量が必要である。

比較を非常に単純化して言うと、ラウエ法はデータの収集精度は落ちるがデータ収集速度は速いのに対し、単色中性子法は逆にデータの収集速度は遅いがデータ収集精度は高いとまとめられる。

中性子単結晶解析法はX線が出された構造に水素原子や水和水を付加することで、精度高いデータがあれば必ず解ける問題である。そこで、データ収集に若干時間が余計かかっても精度高いデータが得られる方が得策と考え、我々は単色中性子法を採用した。

### 3. 高性能中性子回折計 (BIX-3) を可能にした技術開発

中性子結晶構造解析の中でタンパク質の結晶構造解析は、回折強度が弱くて最も難しい実験の一つであるが、我々はこの困難を克服するために、次の3項目の開発を行った<sup>3)</sup>。

- (1) 数mm角のタンパク質単結晶試料位置での中性子束を大きくするためのモノクロメータ
- (2) 数mm角のタンパク質試料単結晶育成技術
- (3) 可能な限り多くの回折斑点を同時に検出できる大面積検出器

このうち(2)は回折装置技術とは直接関係ないのでここでの説明は省略する。

(1)は完全結晶シリコンをピアノ線で湾曲させる方式(EBP-Si)を開発し、試料位置に中性子を集光させることに成功した<sup>4)</sup>。現在、この方式のモノクロメータはすでに他の中性子回折装置でも使われるようになっている。BIX-3では更に2枚のシリコン板を重ねて湾曲させる方式を開発し1枚に比べ試料位置での強度を1.6倍にすることに成功した<sup>5)</sup>。

(3)はNIPを開発実用化したことで解決した<sup>6)</sup>。但し、NIPはガンマ線に有感であり、特にNIPを炉室内で使用するには、ガンマ線遮蔽が必要で装置が大型化する恐れがある。最少の鉛厚で十分なガンマ線の遮蔽を施し<sup>7)</sup>、回折装置に必要な部品を工夫して配置し、縦型にすることでコンパクトな装置に組み上げることに成功した。

設置場所は原研JRR-3M炉室1GAポートで、基本的な設計仕様は、単位格子90Å程度の単結晶から反射される最近接反射を検出器上で分離することである。図1にBIX-3の模式図を示す。現在、実験可能な試料環境は常温常圧である。

## 4. 成果

### 4.1 ルブレドキシシ (Rd) タンパク質の測定と結晶構造解析

Rdは鉄-硫黄タンパク質の一種で、アミノ酸53個(分子量~6000)からなる。生体内で酸化還元反応の活性中心となる可能性が示唆されているが、その機能ははっきりしてはいない。PDB (Protein Data Bank)には載っていないが、X線で決められた水素原子の数は分子中にあるべき水素の約半分といわれ、X線で水素原子位置を決めたチャンピオンデータのひとつであり、中性子の結果と比較することは興味深い。

BIX-3において収集したデータの一部を示す(図2)。このデータは露出60分で得られており、最広角反射で1.5Åまでが見えている。10日間スキャンで合

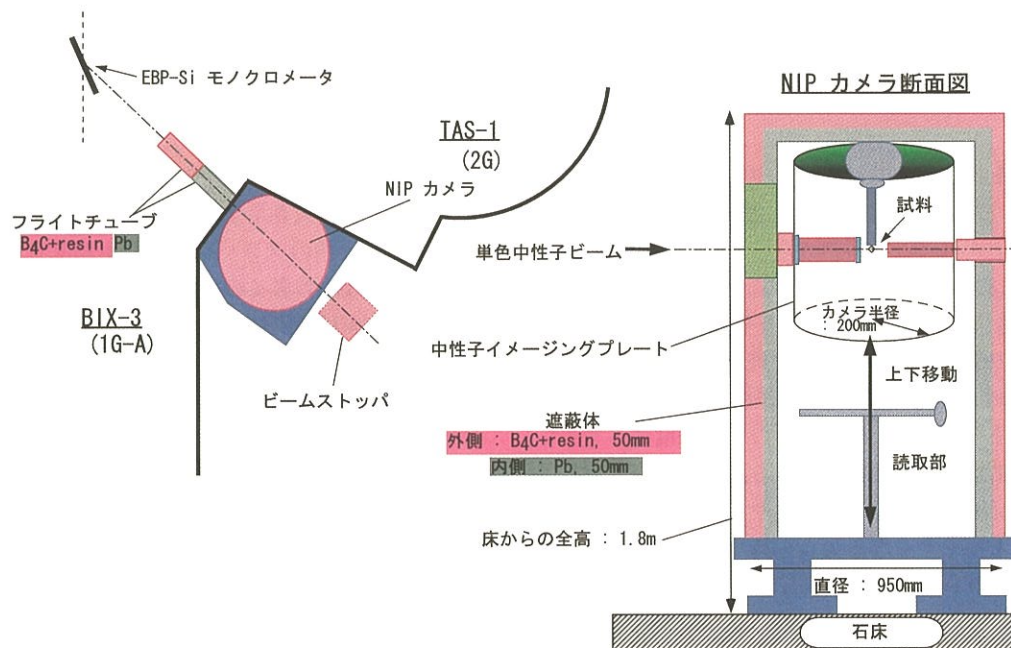


図1 BIX-3の配置図(左)および模式図(右)。

計で226枚、約4700個の独立反射を集めることができた。我々がラウエ法で撮ったリゾチームとは試料が異なるので単純な比較はできないが、データの質を分解能やS/N比から判断すると、生体物質用回折計として世界一の性能と思われるILLの装置と同程度かやや良質のデータを集められることが確認できた。日本の原子炉JRR-3Mでも1マシンタイム(約1ヶ月)でタンパク質のデータ収集が十分可能になったことを示

す重要な実験となった。

図3は、現時点でのデータから決定された水素位置(約400個)を含むRdの立体構造である。この解析時点での測定データと計算値との一致度(R値)は24%であり、BIX-3により十分解析可能なデータ収集ができたことを示す。更に詳細な構造解析を進め水和水の位置を同定する予定である。

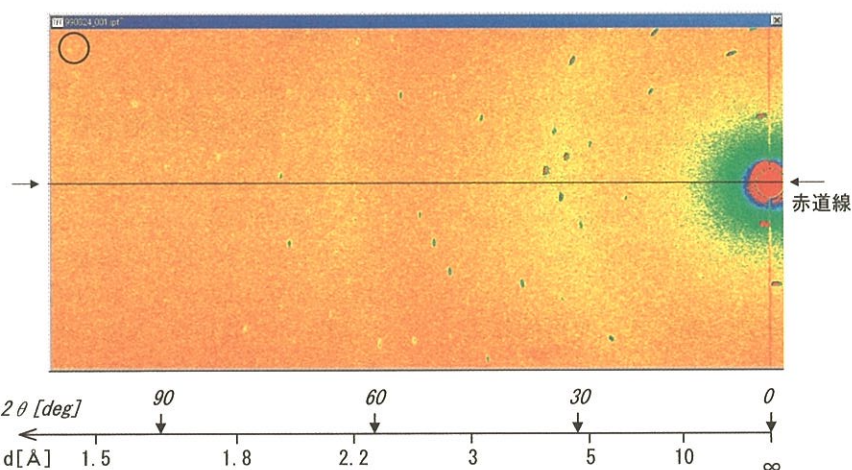


図2 ルブレドキシタンパク質の中性子回折斑点生データ。丸印が最広角反射( $d \sim 1.5\text{\AA}$ )。スケールは赤道線上(水平方向)の値。試料体積約 $5\text{ mm}^3$ 、入射中性子波長 $2.35\text{\AA}$ 、露出時間60分。



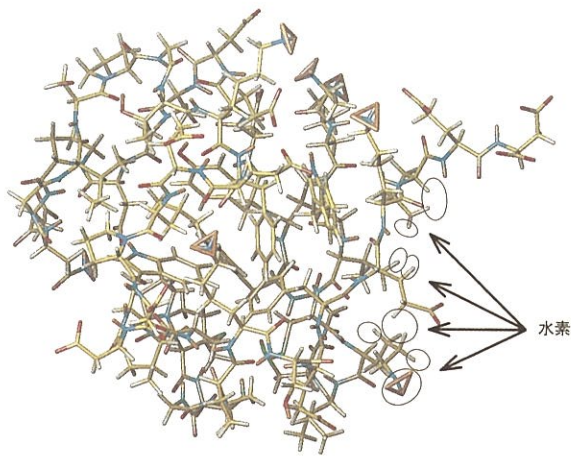


図3 今回の実験で決定された水素を400個余り含むルブレドキシンの立体構造。現在詳細構造解析進行中。

#### 4. 2 微小粉末中性子回折装置

本来 BIX-3 は粉末回折計として設計されたものではないが、NIP の微小粉末中性子回折装置への応用として格好の実例が BIX-3 で証明された。NIP が高分解能位置敏感検出器である特徴を活かし、試料を小さくすることでスリットレスの微小粉末中性子回折装置が考えられる。今回の BIX-3 はまさにこれに相当するもので、その高性能を証明する例として平成10年度の黎明研究で行った研究を紹介する。この試料は高温高压下で人工的に合成された含水鉱物で、多結晶の体積として  $1 \text{ mm}^3$  以上にはならない。この粉末試料に対して、約11時間の測定データの解析から、目的であった水の位置を決定できた。地球科学の分野において、こういう試料から水の位置が決定されたことは非常に大きなインパクトを持つ。

#### 5. まとめと展望

グループ発足以来中性子の基礎的な研究開発・技術革新を行ってきたものが BIX-3 として結実し、いよいよ日本でも世界最高レベルの生体高分子結晶構造解析ができる時がきた。これで、世界で中性子構造生物学研究ができる装置が LADI と BIX-3 の2台になり、BIX-3 の成果に注目が集まっている。西暦2000年2月にベルリンで中性子構造生物学のワークショップが開催されるが、そこでの主題は LADI と BIX-3 の成果報告である。

平成11年10月から約5カ年計画で『開放的融合研究』が当グループにおいてスタートした。そのテーマ

である『水素・水和構造を含めた新しい構造生物学の開拓』を実現するため、ヒトリゾチーム変異体や DNA 等の生体高分子結晶の中性子実験を計画している。ここでの、BIX-3 の活躍が期待される。

この分野に残された重要な課題はサイズが  $1 \text{ mm}^3$  程度の単結晶育成である。開放的融合研究の大きな戦術として我々は生体物質単結晶育成工場ともいえるべき実験室を作り、ひたすら大きな単結晶育成に専念することにした。しかし、これだけで中性子構造生物学実験の難題が解決するとは考えていない。最後の期待は中性子強度増である。中性子強度が100倍あがれば結晶の大きさは  $1/100$  でよいので、実験の対象になりえる生体物質の種類は格段に増え、生命科学の全く新しい世界が開かれる。生命科学はきたるべき21世紀の科学といわれ、中性子構造生物学への期待も大きい。次世代中性子の実現が待たれる。

#### 謝 辞

BIX-3 の建設は中性子構造生物学研究グループ一丸となって行ったものである。グループ員全員でこの成功を喜びたい。ルブレドキシソ試料提供では南カリフォルニア大・Bau 教授、鉱物試料提供および解析では東北大・大谷教授、鈴木助手に感謝したい。

#### 参考文献

- 1) N. Niimura, Y. Minezaki et al., *Nature Struct. Biol.* 4 (1997) 909.
- 2) N. Niimura, *Curr. Opin. Struct. Bio.* 9 (1999) 602.
- 3) 新村信雄, 基礎科学ノート2 (1995) 2.
- 4) N. Niimura, I. Tanaka et al., *Physica B* 213 & 214 (1995) 929.
- 5) I. Tanaka, N. Niimura and P. Mikula, *J. Appl. Cryst.* 32 (1999) 525.
- 6) N. Niimura, Y. Karasawa, K. Takahashi et al., *Nucl. Instr. Meth. A* 349 (1994) 521.
- 7) Y. Haga, S. Kumazawa, N. Niimura, *J. Appl. Cryst.* 32 (1999) 878.