

## 第 169 委員会・量子ビーム融合化研究専門小委員会報告

第 169 委員会委員長 坂部知平

### I. 第 169 委員会設立の趣旨と量子ビーム融合化研究専門小委員会

#### 1. 回折構造生物・第 169 委員会設立の趣旨

蛋白質など生体高分子のもつ機能を理解するため、これらが機能している状態における立体構造や物性を研究し、それを出発点として優れた医薬品、農薬、食品などの開発を促進することは社会的に急務をようする課題である。そこでこの課題を達成するため、X線、中性子、電子線の回折を相補的に利用し産学官の協力により構造生物を探索することを目的として本会は 2000 年 1 月 1 日に設立された。つまり、本目的の達成のために量子ビーム融合化研究を積極的に取り入れることは、目的達成を一層加速すると考える。本委員会は上記の目的を達するため、特に重点的に進める必要のある課題については小委員会を結成し、独自の活動を行っている。

#### 2. 量子ビーム融合小委員会

第 169 委員会は設立の趣旨で述べたように、X線、中性子、電子線などの量子ビームを相補的に利用して、まず出発点となる機能発現を起こしている生体高分子の構造を得ることを目的とする。蛋白質の機能発現には水素やプロトンは重要であるが、これまで構造解析の殆どが X 線を主体にしていたため、水素やプロトンが機能発現に際してどのように振る舞っているのか計測することは大変難しく、特にプロトンは全く計測できなかった。これらの情報に関する正確な構造情報は X 線回折と中性子回折の同時計測によるのが望ましい。そこで、理想的な計測条件を満足できる X 線と中性子回折装置の同時計測が可能な装置を開発し、新分野を開拓する。その理想を実現するため、坂部知平を小委員長として平成 20 年に量子ビーム融合小委員会が設立され、第一回研究会が 7 月 4 日に開催された。そして今回石山新太郎氏の御奮闘により、全国的なレベルの量子ビーム融合化研究領域専門委員会が設立され、第一回幹事会が平成 20 年 9 月 9 日に東工大原子炉工学研究所で開催され、その大枠とスケジュールが決まり、本日、第 1 回専門委員会が開催される運びとなった。石山新太郎氏の力量に敬服すると共に心から感謝している。

本小委員会には現在図 1 に示すように 3 つの研究チーム①単結晶時分割計測技術・科学研究チーム、②界面反射率計測技術・科学研究チーム、③トポグラフ計測技術・科学研究チームがあり、更に 2 つの研究チーム④ラジオグラフ計測技術・科学研究チーム及び⑤残留応力計測技術・科学チームが予定されている。本チームはそれぞれ独自の中性子ビームラインを利用した測定器系を立案している。

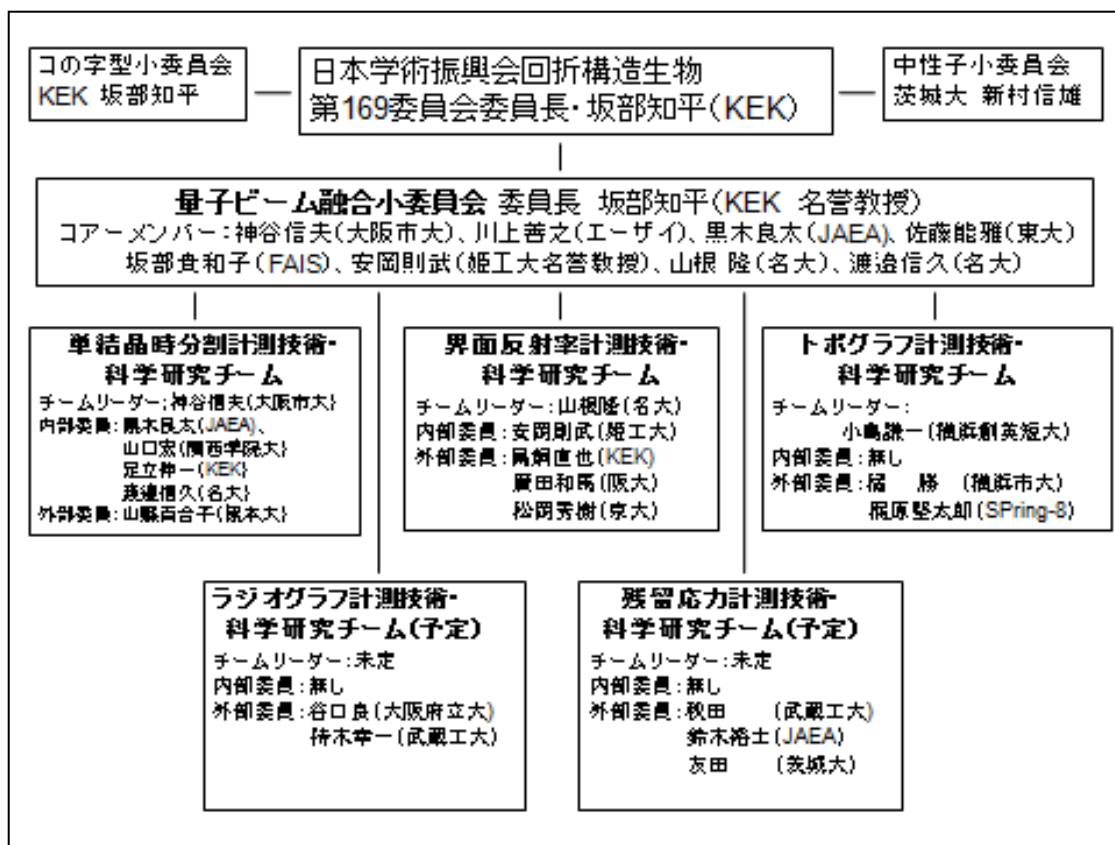


図1. 第16委員会における「量子ビーム融合小委員会」の位置付けと構成

## II. 研究報告

### 1. X線源の開発

量子ビーム融合化研究領域専門委員会の何れのチームも中性子とX線の相補的利用を目指している。J-PARCに大型放射光を建設し、同時計測を行うことは難しい。そこで中性子ビームラインに密着して設置できる小型で且つ強力なX線源を開発する必要がある。この線源の第一候補は我々が開発を進めているコの字型回転対陰極X線発生装置である。

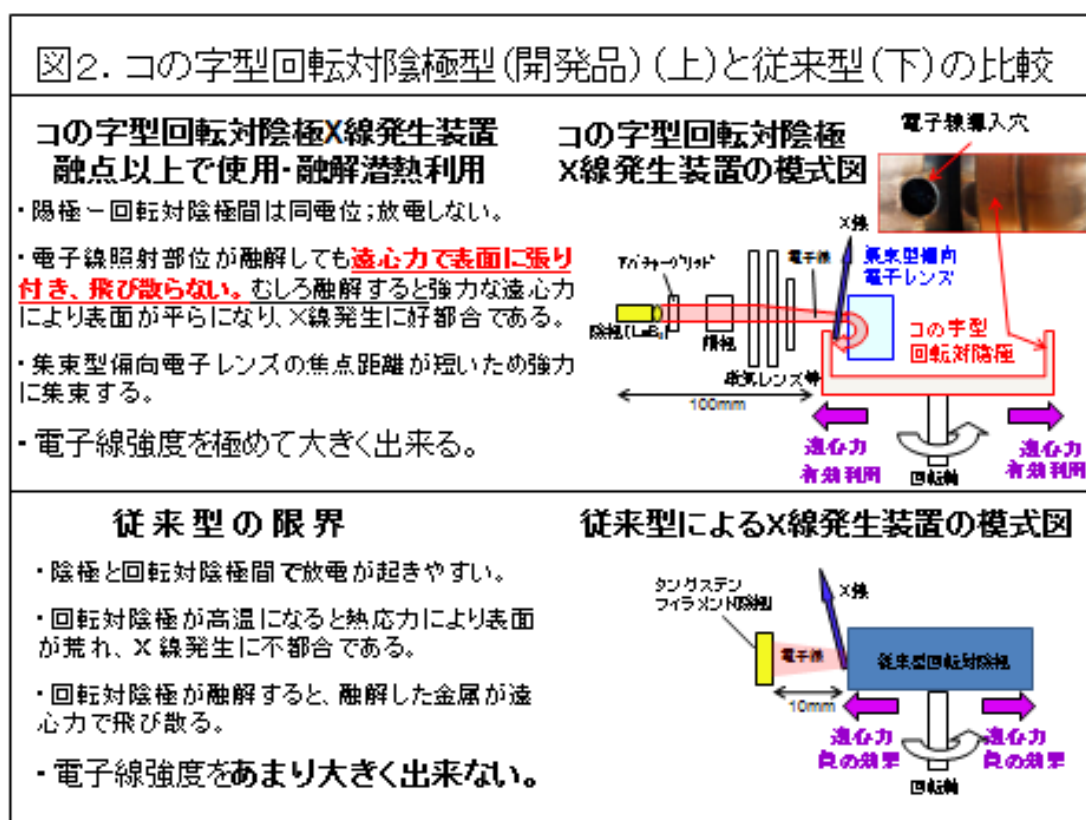
#### 1) コの字型回転対陰極と従来型の回転対陰極との構造的比較

従来の回転対陰極は図2の下段右に画かれた模式図のように円筒形の回転対陰極の側面に電子線が照射される。回転対陰極は回転軸内に設けられた水路に従い冷却水が循環して回転対陰極を冷却するがそれでも、電子線のパワーがますと照射部位は高温になる。その結果、同図の左に書いたように；

- ①陰極と回転対陰極間で放電しやすい。
- ②電子線照射部位は高温になり、回転して電子線から外れると温度が急にさがる。その繰り返しが激しいため、熱応力も大きく表面が荒れ、出射X線の一部が吸収される。
- ③電子線の強度を上げ、回転対陰極が部分的に軟化したり、更に進んで融解すると強力な遠心力により、回転対陰極が部分的に変形を生じバランスを崩し、或いは金属が飛び

散り破壊の原因になる。これらの要因の結果、従来X線結晶解析に利用されている回転対陰極の直径が 10cm の簡易型回転対陰極X線発生装置では電子線焦点サイズ 0.1mm<sup>2</sup> の場合、最大負荷は 1.2kW、輝度に換算すると 1.2kW/0.1mm<sup>2</sup>=12kW/mm<sup>2</sup> である。高輝度用として開発された、回転対陰極の直径が 25cm、電子線実効焦点サイズが φ0.7mm の場合最大負荷は 2kW で輝度は 45kW/mm<sup>2</sup> である。簡易型と高輝度型で表現形式が不統一であるのは、カタログの違いに依るため、お許し願いたい。

それに対し坂部知平が発案したコの字型回転対陰極と大澤哲 KEK 教授が発案した集束型偏向電子レンズ（磁石）を組み合わせたコの字型回転対陰極X線発生装置は図2の



上段右の模式図の様に、回転対陰極がカタカナのコの字型をしており、その内側表面に電子線を照射するものである。このジオメトリーをとる事により従来型の限界をブレイクスルーする事が出来る。即ち、

①電子銃には上段の図のように、陰極と中心に穴の開いたアパチャーグリッドと陽極があり、電子はアパチャーグリッド (+3 kV) で陰極 (LaB<sub>6</sub>) から効率よく引き出され陽極で加速されるが、殆ど吸収されることはなく、中心に空けられた穴を通過するように設計されている。従って、グリッドや陽極が高温になることは無い。陽極とコの字型回転対陰極は共にアースされており、同電位である。その結果コの字型対陰極が電子線照射により高温になっても、陽極とコの字型回転対陰極間で放電することは無い。

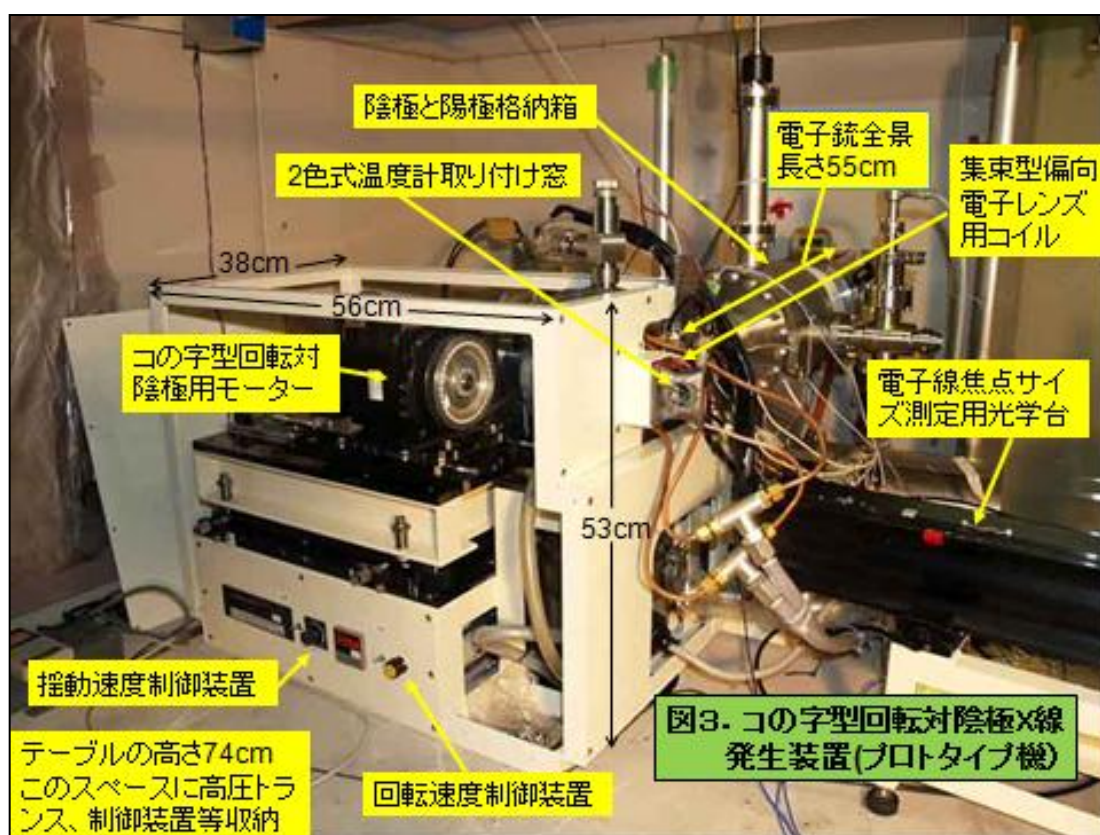
②電子線の強度を増し、電子線照射部位が融解しても、融解した金属は遠心力で表面に

張り付き飛び散ることはない。融解すると強力な遠心力で表面は平坦になる。即ち、従来品で問題になった熱応力による表面の荒れはコの字型回転対陰極では融解の度にリセットされる。逆に言うと、コの字型回転対陰極では電子線照射部位が融解するに足る強力な電子線を照射する必要がある。

③集光型偏向電子レンズの焦点距離を短く設計出来るため、電子線照射面積を小さくでき、輝度を上げることが出来る。

## 2) プロトタイプ機の大きさ

コの字型回転対陰極等格納容器の大きさは図3に示した様に、高さ 55cm、横 56cm、奥行 38cm である。奥行き方向に 55cm の電子銃が取り付けられているので、最低必要床面



積は  $0.56\text{m} \times 0.93\text{m} = 0.52\text{m}^2$  である。J-PARC のビームラインに取り付ける際には防 X 線カバーなどが付き、少し大きくなるが、中性子ビームラインに取り付け得る十分小型なサイズである。図3に書いてあるように本体は高さ 74cm のテーブルに乗っている。このテーブルの下のスペースに高圧電源や制御装置及び真空排気に大切なターボモレキュラーポンプなどが納められている。プロトタイプ機の電子銃制御はマニュアルモードのみであり、実験し易いように電子銃の制御系は全て操作卓の側に設置されている。尚、ビームラインに取り付ける場合は必要に応じ、図3の本体部分をゴニオメータ上に載せ得るよう設計する。

### 3) プロトタイプ機とその性能

#### ①プロトタイプ機の試作：

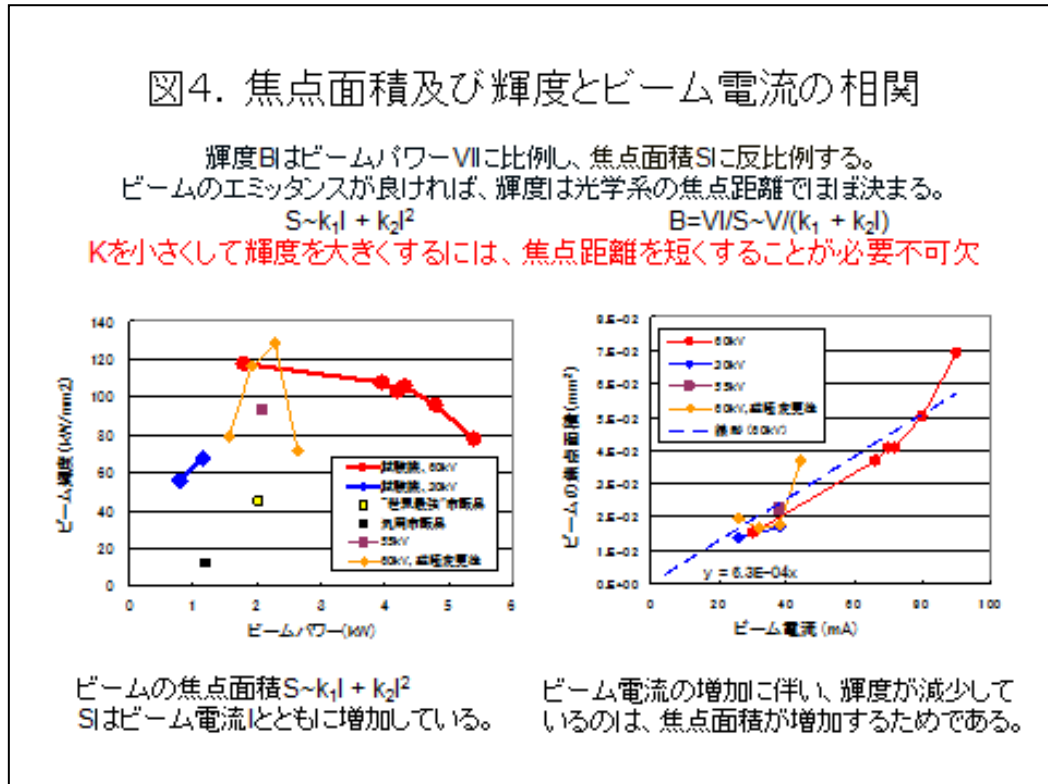
市販の簡易型で、最高負荷 6kW (60kV×100mA)、直径 10cm の回転対陰極X線発生装置の回転対陰極を内径 10cm のコの字型回転対陰極に取り替え、電子銃を取り付けるなどの改造を施して、プロトタイプ機を開発した。

#### ②達成した最高負荷とその輝度：

改作に際し、高圧電源安定化のため 10mA バイパスした。その結果、プロトタイプ機電源の最高パワーは 5.4kW である。平成 20 年 7 月に負荷 5.4kW (60kV,90mA) を達成したが、焦点サイズは回転軸方向が 0.92mm、回転方向が 0.096mm までしか縮まらなかった。取り出し角度は 6 度であるから、試料位置から見たX線光源点サイズ(実効焦点サイズ)は 0.096mm×0.096mm であった。陰極には 2mm φ の LaB<sub>6</sub>を使用しているため焦点は矩形ではなく楕円になり、その面積は 0.0693mm<sup>2</sup> であった。従ってこの時の輝度は 5.4/0.0693=77.8kW/mm<sup>2</sup> である。改造前の普及型の最高輝度は 12kW/mm<sup>2</sup> であるから、改造により輝度は 77.8/12=6.48 倍に相当する。

#### ③達成した最高輝度とその負荷：

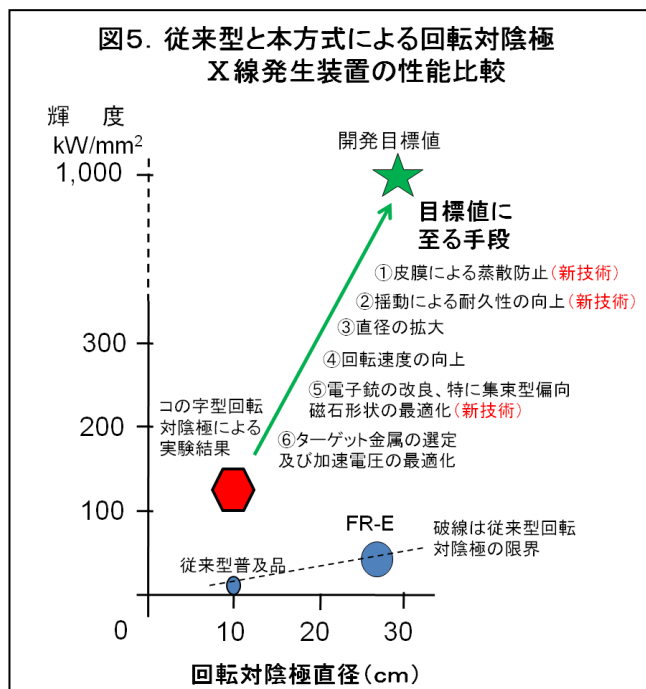
最高輝度は負荷 2.3kW (60kV,38mA) の時で、電子ビームの焦点面積は 0.0177mm<sup>2</sup> であった。これは実効焦点サイズサイズが約 0.042mm (42 μ m) に相当する。この時の輝度は 130kW/mm<sup>2</sup> (2.3/0.0177) であった。この輝度は改造前の約 11 倍に相当する。電子線パワーと輝度及び電子線電流と電子線の焦点面積の実測値を図 4 に示した。図 4 の右のグラフのように電流と電子ビームの焦点面積は概して比例している。完全に比例



しておれば、輝度は変化しないが、70mA 付近から直線より上昇カーブを描いている。そのため輝度が下がるのである。電流を一定のまま、即ち電子線焦点面積を一定のまま、加速電圧を上げれば輝度は電圧に比例する。これにより、取り出される X 線の総量は増すが、あまり高電圧にすると輝線の強度増加より高エネルギー側の白色 X 線の強度増加の割合が大きくなる。輝線のエネルギーの 6～7 倍が理想的であろう。例えば Cu の  $K\alpha$  線のエネルギーは 8KeV であるから、負荷電圧は 48～56 kV であり、Mo $K\alpha$  は 17.4KeV で有るから、104～122 kV である。根本的な改良でプロトタイプ機の輝度を上げるためには、集光型偏向電子レンズの焦点を短くする事及び収差の少ないレンズを製作する必要がある。最初の試みとして、現在は平行な磁極間距離を持ち、磁極間に入射する電子線の角度のみをパラメータとする最も単純な系を用いているが、形状も平面のみでなく多くの変化をシミュレーションで求めることにより、更に焦点サイズの小さな、即ち高輝度の X 線発生装置を作成できる可能性は大きい。

④ 従来品と本開発品の性能比較及び量子ビーム融合化のための開発目標：

許容最大負荷は他のパラメータを固定した場合、回転対陰極の直径と回転速度との積の平方根に比例する。図 5 は横軸に回転対陰極の直径、縦軸に輝度を取って、従来型の普及品と、高輝度且つ高出力製品として有名な FR-E を青まるで示した。又従来の方法で達成可能と思われる限界を点線で示した。赤色 6 角形は今回のプロトタイプ機で達成した 130kW/mm<sup>2</sup> を示している。緑色の星印は量子ビーム融合化研究の X 線源の開発目標



値で、輝度 1MW/mm<sup>2</sup> を目指している。それに至る手段が緑色の矢印の右に書いてある。例えば現在のプロトタイプ機は回転対陰極直径が 10 cm であるがこれを 28cm (図 5 の手段③) にする、また回転数は毎秒 100 回転であるが、これを 150 回転 (手段④) にすると増加の割合の積は 4.2 であるからその平方根は 2.05 になる。回転対陰極の負荷は無理なく 2 倍に出来る。モリブデンターゲット (Mo $K\alpha$  は 17keV) の場合 (手段⑥) 加速電圧は 120kV (Mo $K\alpha$  ; 17.4keV  $\times$  7 = 122kV) まで上げれば、電

流は上げないでも 2 倍の輝度、260kW/mm<sup>2</sup> が達成できる。目標値まであと 4 倍である。これを達成するためには図 5 の手段⑤電子銃の改良、特に収束型偏向磁石の形状の最適化が必須である。

## 中性子-X線複合界面反射率計測システム開発に向けて

研究チームリーダーの山根隆氏に報告して頂く予定であったが、12月25日は名大で本務があり、出席不可能になったので、スライドファイルを頂き坂部が報告する。

### 1) 中性子・X線同時計測による界面構造解析の目的

#### ①界面反射率計測とは：

これは物質の厚さ方向の界面構造変化（時間分割）を調べる手段である。

#### ②同時計測が必要な理由：

界面が液体の場合蒸発などにより表面が変化し易い、この他不可逆課程の追跡など、X線-中性子同時計測或いは交互に計測する場合には短時間で測定を終了する必要がある。従って別の装置、または別の施設で測定する場合は、表面状態を同じように保つことが必要であり、これを実行することは多くの試料では極めて難しい。

#### ③原子種の同定：

X線の原子散乱因子は原子番号に比例する。X線だけで原子種を決めることは電子の存在確率や存在状態（温度因子など）の変化に比べ、原子散乱因子の差が少ないため、殆ど不可能である。中性子の散乱能（散乱断面積）は原子番号に比例しない。従って両者を用いれば原子種を単独の場合より遙かに良い精度で決定できる。

#### ④その他の相補性：

界面は表面だけを意味するのではなく、液体或いは固体内に幾層にも界面が存在する場合がある。X線は光学系を組みやすく、強度、平行性も出し易いので分解能を上げることは容易であるが、吸収が大きいため、深部は観察し難い。また、水素の情報を得ることは極めて困難である。それに対し、中性子は吸収が少ないため、深部の観察が出来、しかも水素原子核の散乱断面積が大きいため容易に水素を含めた構造解析が出来る。X線による解析との差をとる事により、水素の挙動をより正確に把握できる。この様な相補性を生かした精密解析には試料によっては同一資料を同一方向から測定することが重要である。又、時分割実験の場合は、理想的には同時計測が良い。上記の仕様を満足する装置を開発する必要がある。

### 2) 中性子界面反射率計の稼働状況

①フランスの原子炉ラウエ・ランジュバン研究所（ILL）では3台稼働している。

②ドイツ・ミュンヘン工科大学の原子炉（FRM-II）でも3台稼働している。

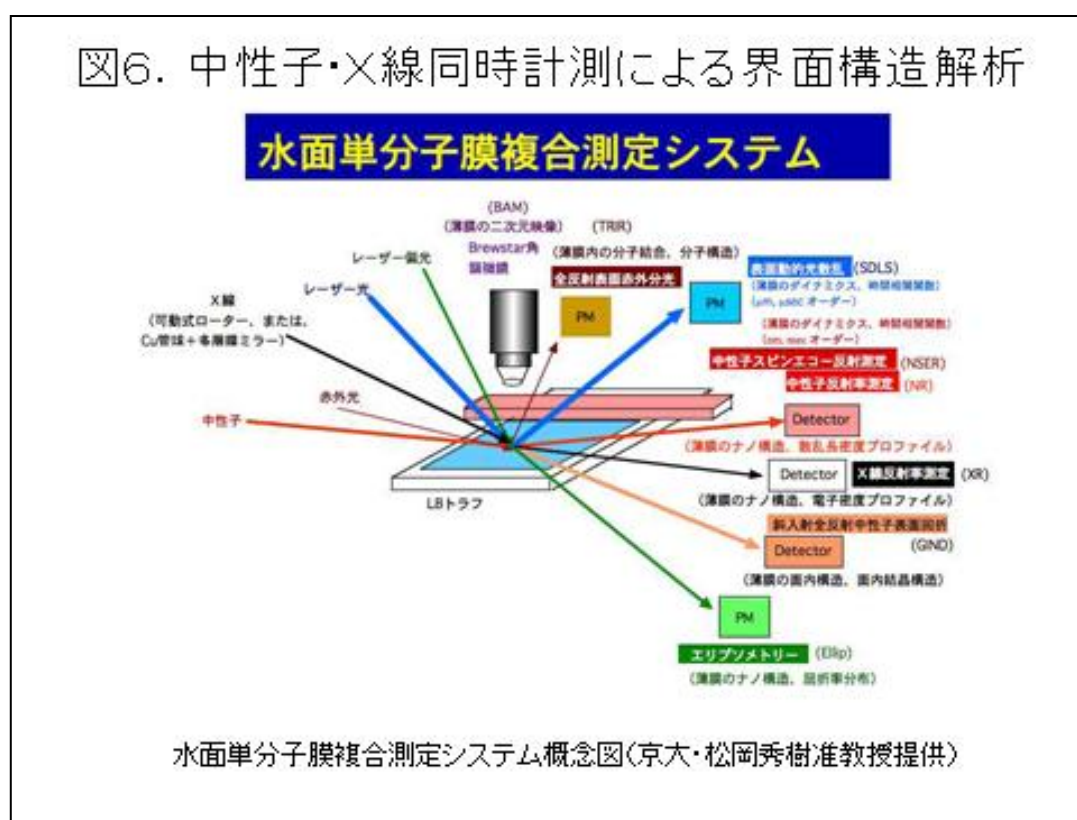
③英国のパルス中性子施設であるラザフォード・アップルトン研究所（ISIS）に2台が稼働しており、その他建設中のものが3台ある。米国では7台が稼働し、オーストラリアでも1台が稼働している。

④我が国、日本では、KEK に 2 台あったが、現在は運転を停止している。今年度中に J-PARC の中性子反射率計が立ち上がる予定である。その他 JAEA の原子炉には JAEA が建設した JRR-3 及び京大原子炉のグループが建設した反射率計の 2 台が稼働している。

### 3) 量子ビーム融合化による界面解析システム

#### ①多種量子ビームの融合化：

中性子-X線融合化研究のみでなく、量子ビームには赤外線、レーザー光、レーザー偏光、など色々ある。これらのあらゆる組み合わせが計測できるよう考え、また量子ビームは観測に用いるのみでなく、励起にも役立つ。又 Brewster 角顕微鏡で測定位置の試料の厚さなどの情報を捉える。これらを考慮した「水面単分子膜複合測定システムを図 6 に示した。



#### ② X線と中性子の測定方法の違い：

X線による構造解析には単色X線が主として用いられる。これは白色X線を用いると回折線に倍音が含まれ、エネルギー分解能を持つ検出器或いはモノクロメータを通さない限り倍音を分解できないためである。それに対し、中性子は波長により速度が異なり、特に J-PARC 中性子はパルス中性子であるから、波長により試料に到達する時間差を利用して倍音を分ける事が出来る。

#### ③溶液表面測定方法の具体例：

X線、パルス中性子、原子炉中性子、それぞれに対する溶液表面測定方法を図 7 に示した。上段はX線、下段右はパルス中性子、下段左は原子炉、を用いた場合で、何れの

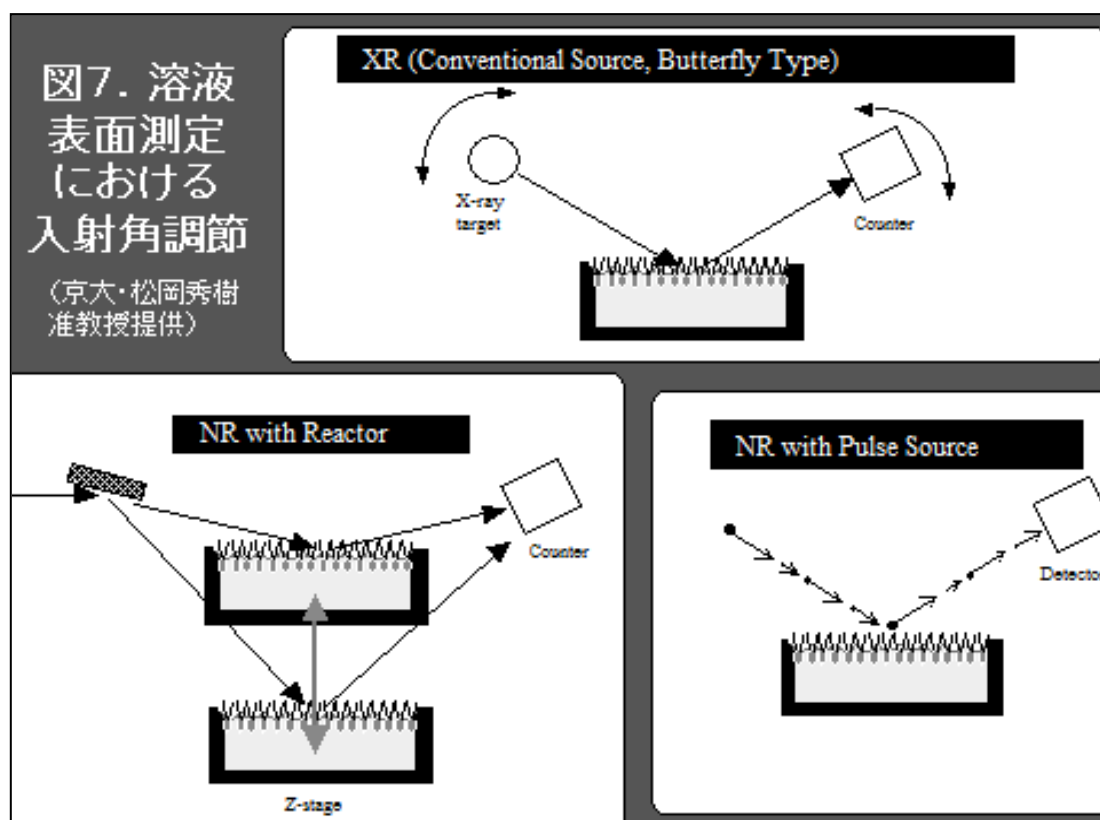


場合も試料は溶液で各図の中央に描かれており、左上から量子ビームが入射し、液体表面で回折し右上の検出器により回折強度が測定される。液体試料の表面を測定する場合は入射角や反射角は光源と検出器を図7のように配置する必要がある。検出器は赤道線のみを測定する場合はシングルカウンターでも良いが、2次元検出を用いれば、赤道線以外の情報も得られる。

ターゲットを持つX線発生装置では  $K\alpha$  線（輝線）を利用できるので、 $K\beta$  線を弱めるためのフィルターを通す、或いは多層膜コリメータを用いて容易に単色X線を得る事が出来る。そこで、光源と検出器が図7の上段に示した動き、即ち試料に対し入射角と反射角が等しくなる動きを持たせた所謂 **Butterfly Type** が基本形である。

**J-PARC** 中性子のようにパルス中性子の場合は先に述べた様にラウエ法が用いられるので、白色のまま試料に照射し、高速 2 次元検出器で測定し、時間差で倍音を分解する方式が用いられる。図2下段右にこの場合のジオメトリーが示されている。ラウエ法は測定に必要な全波長領域を照射し、有効利用するため、白色中性子を分光するのに比べて桁違いに測定効率が良い。従って、**J-PARC** 中性子に期待するところは極めて大きい。

図7は一般的観点から描かれたもので、上記の他原子炉からの中性子を用いる場合も



描かれている。原子炉から出てくる中性子には輝線はない、また、X線発生装置のように原子炉を自由に持ち上げることは不可能である。そこで図7下段左のジオメトリーが基本形になる。即ち、原子炉からの入射ビームはモノクロメータで波長を撰ぶ、波長により入射中性子に対し  $2\theta$  下向きに出射する。試料を **Z-stage** に乗せて単色化された中性

子が同一場所を照射する様に制御する。このジオメトリーはX線源が放射光の場合にも用いられる。

#### 4) 中性子・X線同時計測で解決すべき点

##### ① X線測定機器と中性子測定機器配置：

中性子測定器はカメラ長を大きく取り、X線測定器が中性子入射ビームの水平面への投影位置を原点とし、そこから90度回転可能にする。即ち、中性子とX線の入射方向は0~90度の任意の角度が取れる様にする。

液体試料の場合、特に表面測定では試料槽の中央部分には殆ど異方性は無いと思われるので、X線用装置と中性子用装置を互いに邪魔にならない位置に設定し使用すれば同時計測が可能になる。

2次元検出器のサイズには限度があるのでカメラ長（試料から検出器までの距離）はマニュアルで可変とする。中性子測定装置の可変部分はカメラ長のみである。即ちゴニオメータとしては0サークルでよい。それに対しX線用ゴニオメータは、先に述べた中性子との相対的位置を決める0-90度回転軸、これにより異方性が有りX線と中性子を同一な方向から測定する必要がある場合にはX線用装置を動かしてX線と中性子を交互に計測する事が可能になる。その他、図7の上段に示した **Butterfly Type** の2回転軸、計3サークル回折計の構成になる。試料の位置決めは基本的には **Z-stage** で良い。

固体試料の場合は試料を任意の方向に回転させるため3サークルゴニオメータを用いる。以上の軸を合計すると6軸回折計になる。

##### ② 試料への照射面積：

同じ輝度のビームの場合、照射面積を大きくすれば、回折強度も、大きくなるが空間的分解能が下がる。縦長にするか横長にするかも目的に応じ、撰ぶ必要が有る。従って照射面積及び形状はX線と中性子で独立に調整可能とする。

##### ③ 試料温度；

目的に合わせて設定できること。但し、X線による損傷を考慮すると、可能な限り低い温度が好ましい。

##### ④ 検出器等の検討：

中性子とX線では検出器の種類が異なる。今後最良の条件を探る。又、レーザーによる測定も可能なように別の軸組を設けるか或いはX線軸と取変え可能にするか等今後検討を行う。

#### 5) 中性子-X線同時計測について

中性子はラウエ法、X線は単色で **Butterfly Type** でデータ収集を行う。蛋白質結晶解析の場合、ラウエ法と単色法の測定時間はラウエ法の方が3桁以上速い。界面反射率計測の場合はこれほどの差は無いと思われるが、中性子ラウエ法で計測している間に、X線単色法で計測を終了するためには高強度高輝度のX線源が必要になるとと思われる。

## 中性子・X線の融合による水と水素の4次元構造解析

大阪市立大学・大学院理学研究科 神谷信夫

ポストゲノム時代の構造生物学は、研究対象をますます拡大して、最近では、複数の構成要素からなる複合体をまるごと結晶化したり、離合集散系のようにそのままでは結晶化が困難な場合には、相互作用するドメインを構成要素から切り出して、調製した部分的複合体から構造情報を引き出すことも行われている。目的とするタンパク質・酵素の結晶化に成功すれば、阻害剤により反応を止めたり、活性発現に関与するアミノ酸残基の部位特異的変異体を利用して機能に関わる情報が集められる。現在の構造生物学で多用される常套手段であるが、ここで我々には、阻害剤を結合した構造や部位特異的変異体の構造が、生命現象の中で実際に進行している化学反応を正しく反映しているのかという疑問が浮かぶ。構造生物学により提案された多数の反応機構モデルはそれぞれ実証されるべき段階にあり、我々はその方策のひとつとして、従来の結晶構造解析に時間軸を加えた4次元構造解析により、酵素反応をその場観察する研究を進めている。以下には、広い範囲の酵素反応について、水と水素の反応過程をその場観察することを主要な目的として、「コの字」型X線発生装置を併設したJ-PARC時間分割構造解析用ビームラインの建設を提案したい。

今回の提案は、ADPリボースピロリン酸分解酵素 (ADPRase) をはじめとする複数の酵素について、実験室系X線回折装置と放射光を利用して行われた4次元構造解析を基礎にしている。ADPRaseはNudixファミリーに属し、2価金属イオンの存在下、ADPリボース (ADPR) をAMPとリン酸化リボース (R5' P) に加水分解する。ADPRaseの結晶構造は既に複数報告されていたが、その反応機構については、2価金属イオンと阻害剤・生成物、酵素からなる3元複合体の結晶構造に基づくもの、あるいは部位特異的変異体の反応速度論的解析に基づくものの異なる2つのモデルが提案されて、なお確定していなかった。我々は、酵素の結晶にADPRをソーキングした後、Znイオンをソーキングして反応を開始させ、反応時間の異なる結晶をクライオトラップして、まず実験室系X線回折装置により一連の反応経路を追跡した。その後、SPRING-8の極めて高い分解能でその場観察された反応経路は、これまでに阻害剤や部位特異的変異体を利用して提唱されてきた2つの反応機構モデルのいずれとも異なるものであった。

ADPRaseでは、確かにX線回折実験から反応過程をその場観察することができた。しかしながら、それでもなお、その反応経過のすべてが明らかにされた訳ではない。ピロリン酸の加水分解では、 $\alpha$ リン原子を攻撃する水酸化物イオンは、水から水素イオンが引き抜かれたものである。反応の進行とともに、この水素イオンは速やかに反応中心から取り除かれる。またピロリン酸の加水分解によって生成したR5' Pには2個の負電荷が残る。これには新たな水素イオンが取り込まれて過剰の負電荷が中和される。水素イオンの除去と取り込みは個別の反応であり、反応過程の全体を眺めれば、酵素の分子中で水素イオンが一方向に流れるよう

に見える。このような水素イオンの流れは、ADPRaseを含め全ての加水分解反応の根幹をなしていると思われるが、これまでのところ、X線結晶解析では本質的に水素イオンの同定は困難であるため、この問題に正面から向き合った例は極めて少ない。それを得意とする中性子回折が必要とされるゆえんである。

従来、中性子回折による構造生物学の研究では、1mmキュービックを越える大型結晶が必要とされてきた。放射光利用とクライオ技術の発展により、0.001mmキュービック程度の結晶でX線構造解析が行われている現状では、この3桁の違いは決定的であり、これまで多くの研究者が、中性子回折実験の必要性を認識しつつもこの足を踏んで来た理由である。一方、J-PARCでは、光源強度の増大とパルス特性、それに対応したTOF型検出器の利用により、結晶の大きさは0.1mmキュービック以上で良いとされている。多くのタンパク質・酵素では、この大きさでもなお、結晶を準備するために多くの困難を伴うであろうが、中性子回折実験の重要性から考えて、今後は、結晶の大型化を試みる研究者が増加すると予想される。

さて、何らかのトリガーを利用して反応を開始させる4次元構造解析では、結晶の大きさの問題はさらに深刻である。ADPRaseについてこれまで用いてきた結晶は0.01mmキュービック程度であり、金属イオンのソーキングで反応を開始させることができたのは、この小さなサイズによるところが大きい。J-PARCが稼働し、0.1mmキュービックの結晶サイズで回折強度測定が可能となっても、4次元構造解析を考える限り、最適な反応条件を設定するための予備実験に多くの結晶が必要となるという事情は変わらない。問題は、少数しか準備できない虎の子の大型結晶で、いかにして目的とする反応中間状態を実現し中性子回折実験に持ち込むことができるかという点にある。

ADPRaseの例から考えて、一般の酵素群を対象にしても、実験室系回折装置やSPring-8により、0.01mmキュービック以下の多数の小型結晶で反応条件を探索することは可能であろう。ここで、J-PARCのビームラインに「コの字」型X線発生装置が併設されていれば、研究者はあらかじめ決定した反応条件をもとに、現場で虎の子の大型結晶に反応を開始させ、「コの字」型回折装置により短時間の内に反応の進行を確認して目的とする反応中間状態を見だし、その状態をクライオトラップして中性子回折実験を行うことができる。このようなビームラインが利用可能となれば、これまで主流であった創薬 (Structure- Based Drug Discovery: SBDD) の手法にも大きな変革をもたらされるものと予想される。生体中で重要な機能を担い、その反応に水と水素が関与する酵素は膨大な数にのぼる。これまでの創薬では、それぞれの創薬ターゲットの基質認識特性に着目して新しい薬剤が開発されてきたが、多くの場合に、副作用の克服が新薬開発のボトルネックとなってきた。今回提案するビームラインは、酵素の基質認識機構とともにその反応機構を考慮に入れたSBDDを可能とするものであり、副作用の発生率を押さえることで今後の創薬産業に大きく貢献するものと期待される。

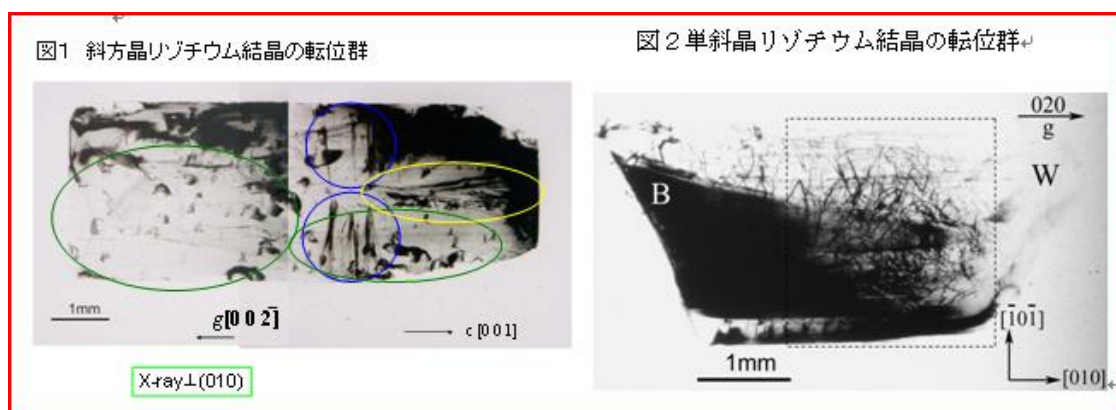
## X線および中性子トポグラフによるタンパク質結晶の完全性の評価

横浜市立大学名誉教授・横浜創英短大教授 小島 謙一

タンパク質結晶の結晶成長の研究は、世界中で1980年代から精力的に行われ、その成長機構は無機結晶や低分子結晶と同じように、2次元核成長機構とスパイラル成長機構の2種類があることがわかった。しかしながら、成長機構がわかっていても必ずしもすべての結晶の完全性が高いとは限らず、十萬種ともいわれるタンパク質の中で、数十%しか結晶解析が行われていないといわれている。これは、現在、タンパク質結晶の結晶解析の分野で残っている大きな問題で、タンパク質の単結晶を育成しても十分な回折データが取れないため、高い精度で結晶解析が出来ないことを意味している。さらに、中性子線回折により、同様な実験を行う場合にも、完全性の高い1mmサイズの大きな結晶が必要になる。このように、大きくて、完全性の高いタンパク質結晶を育成するためには、不完全性の原因となっているモザイク構造の解明が必要である。しかしながら、その不完全性の評価はいろいろな方法で行われているが、評価法はまだ確立されていない。それは、この不完全性ないしはモザイク構造が何に起因するかが明らかでないからである。われわれはタンパク質結晶中の不完全性の原因の一つと考えられている、格子欠陥の中で、主に転位について放射光X線トポグラフィーによって研究してきた。その結果、転位像を得るための最適な条件を見つけ、明瞭な転位像を得ることに成功した。[1,2]

以下にその結果を簡単に示す。放射光トポグラフの実験は主にリゾチウム結晶によって行われた。リゾチウム結晶は多形を持つので斜方晶系、単斜晶系の二種類の結晶を二液界面法によって育成した。詳しい結晶成長に関するデータは文献[1,2]を参照されたい。

図1と図2は斜方晶、単斜晶リゾチウム結晶の単色放射光トポグラフによる転位像である。両結晶ともに多数の転位が導入されている。転位像の消滅則から転位のバーガース



ベクトルを決定することができる。転位線の特徴は直線状の転位や曲線状やループ状の転位も観察される。一部の直線状の転位はセクターバンダリーから発生していることがわか

る。しかしながら、それ以外の直線状の転位やループないしは曲線状の転位の発生の機構は不明である。さらに単斜晶は特有な結晶成長のメカニズムとともに転位の生成の機構も不明な点が多い。このようにX線トポグラフィーでは転位の分布や密度は観測できるが発生の機構はまだ不明点が多い。タンパク質結晶の転位の生成機構は無機結晶とことなり結晶水に大きく影響していることが予想される。転位の発生源として結晶水のクラスターや転位以外の格子欠陥のボイドや点欠陥集合体が考えられる。それらは内部に空洞を有し、結晶水を取り込むことが予想されるからである。そのため、これらの集合体自身の観察にはX線トポグラフではなく中性子トポグラフが適している。またこれらの欠陥集合体がつぶれて転位ループや曲線状の転位が生成されることが予想される。それゆえこれらの転位源の特定には中性子トポグラフの観察が必要である。

このように、結晶の品質を劣化させる転位の生成をはじめ、点欠陥集合体、ボイド、不純物集合体の形成には必ず結晶水が関与しているものと考えられる。また、結晶水自身がクラスター化し、欠陥として働く場合もあろう。そこで、タンパク質結晶中の欠陥の挙動を解明するためには、X線トポグラフィーだけでは不十分であり、中性子トポグラフにより欠陥像を結晶水をとおして観察する必要がある。

さらに、最近、われわれのグループでトポグラフ像と共にX線CCDシステムにより数 $\mu\text{m}$ のオーダーの領域のロックンクカーブの半値幅、強度、ピーク位置を測定できるシステムの構築に成功し、転位像とロックンクカーブの関係は分かるようになった。しかしながら、このシステムでは結晶水を含む欠陥や転位の周りの水に関する観察には適していない。そこで、中性子線ロックンクカーブについても同様なCCDシステムを立ち上げ中性子トポグラフ像とロックンクカーブの解析とを同時に観察する必要がある。さらに、結晶水を含む欠陥の生成過程は時間的に変化する可能性がある時間分割をしてその生成の機構を知ることも重要である。最も大切なことは、このCCDカメラを含むX線トポグラフのシステムと中性子トポグラフの両システムによって同一の欠陥像を同じ反射面を使い同時に測定することである。それによつてはじめてトポグラフ像と回折曲線の差を観察できる。

このようにタンパク質結晶のモザイシティを理解するためには、その原因となる欠陥の性質をひとつひとつ解明する必要がある。先に述べたようにタンパク質結晶ではX線のトポグラフィーとロックンクカーブだけでは観察に限界がある。それはタンパク質結晶の転位やボイド、不純物集合体、点欠陥集合体、クラスターなどすべてタンパク質結晶特有な結晶水と関係していることが予想されるからである。その理由はこれらの欠陥が持つ歪場と結晶水は弾性的相互作用によつて引き合うからである。その典型的なケースは転位と結晶水との相互作用である。それゆえに、タンパク質結晶の欠陥を観察するためには中性子トポグラフの実験は無機結晶に比べるときわめて重要になる。

さいごに、原研の黒木良太研究室と予備的な中性子トポグラフィーの実験を行った結果を図3に示す。

図は斜方晶リゾチウム結晶の中性子トポグラフのデジタル像とフィルム像である。まだ、予備的な段階であるのとマシンタイムの関係なので十分な結果は得られていないが、Gd箔とフィルムの密着性、CCDの分解能などX線トポグラフでも問題となっているような同じような問題があることがわかった。

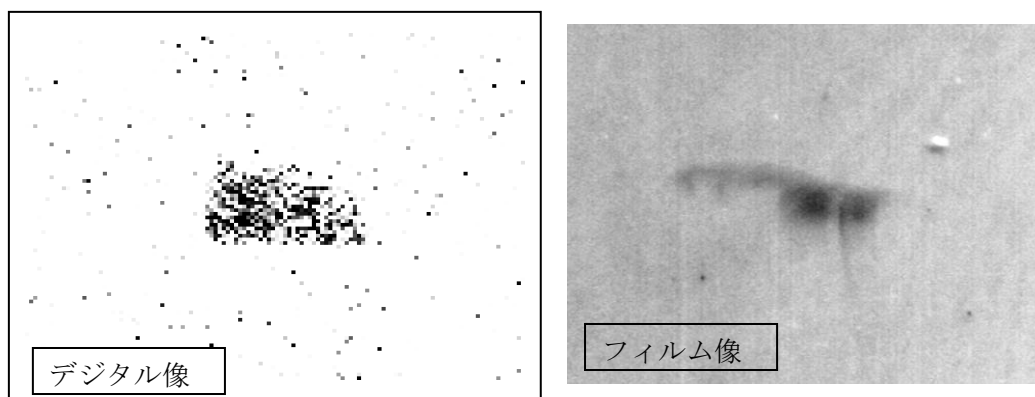


図3 斜方晶リゾチウム結晶の中性子トポグラフ像

最終的にはX線と中性子のロックンクカーブから得られる情報とトポグラフ像から得られる情報を総合して、モザイシティの構造を解明し、タンパク質結晶の完全性を制御し、すべてのタンパク質結晶の高品質化を目指す。

#### 参考文献

- [1] M. Koishi, K. Kojima, M.Tachibana et al, J. Cryst Growth and Design: **7**, 2182-2186 (2007)
- [2] H.Koizumi, M.Tachibana, K.Kojima et al, Phys. Stat. Solid.: **(a) 204**, 2688-2693 (2007)