

JAERI-Conf
2001-004



JP0150347



第 182 回基礎科学セミナー
中性子構造生物学ワークショップ
「溶液散乱によって開かれる蛋白質
構造研究の新しい地平」 報文集

2000 年 2 月 9 日～ 10 日、東海村

2001 年 3 月

(編) 藤原 悟

日本原子力研究所
Japan Atomic Energy Research Institute

本レポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。

入手の問合わせは、日本原子力研究所研究情報部研究情報課（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村）あて、お申し越し下さい。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村日本原子力研究所内）で複写による実費頒布を行っております。

This report is issued irregularly.

Inquiries about availability of the reports should be addressed to Research Information Division, Department of Intellectual Resources, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 〒319-1195, Japan.

© Japan Atomic Energy Research Institute, 2001

編集兼発行 日本原子力研究所

第 182 回基礎科学セミナー
中性子構造生物学ワークショップ
「溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究の新しい地平」報文集
2000 年 2 月 9 日～10 日、東海村

日本原子力研究所先端基礎研究センター
藤原 悟

(2001 年 1 月 31 日受理)

平成 12 年 2 月 9 日～10 日に、東海研究所で「溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究の新しい地平」と題された中性子構造生物学ワークショップが開催された。大学、研究所及び民間企業から約 36 名の出席があり、24 の講演がなされた。この報文集は、講演の要旨ならびに講演者が講演に用いた図表等の関連資料をまとめたものである。

Proceedings of the 182nd Basic Science Seminar
(The workshop on Neutron Structural Biology)
“New Frontiers of Structural Biology Advanced by Solution Scattering”
February 9-10, 2000, Tokai, Japan

(Ed.) Satoru FUJIWARA

Advanced Science Research Center
(Tokai Site)
Japan Atomic Energy Research Institute
Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken

(Received January 31, 2001)

182nd advanced science seminar (the workshop on neutron structural biology) was held in February 9-10, 2000 at Tokai. Thirty six participants from universities, research institutes, and private companies took part in the workshop, and total of 24 lectures were given. This proceedings collects abstracts and the figures and tables which the speakers used in their lectures.

Keywords: Solution Scattering, X-ray, Neutron, Crystallography, Neutron Inelastic Scattering, Detectors, Synchrotron Radiation, Neutron Source, Hydration, Proteins,

目 次

まえがき	1
1. イントロダクション	
1.1 X線の立場から	2
木原裕(関西医科大学)	
1.2 中性子の立場から	5
新村信雄(日本原子力研究所)	
2. 構造ゲノム科学の時代における溶液散乱、中性子散乱	
2.1 低分解能構造情報で何ができるか、何が期待されるか	9
木寺詔紀(京都大学大学院)	
2.2 構造予測と溶液散乱	18
佐藤衛(横浜市立大学)	
2.3 結晶構造に基づく溶液構造と溶液散乱実験	28
A.A. Timchenko (Inst. Protein Res., RAS, Russia)	
3. 溶液散乱で捉える構造変化	
3.1 Non-native 構造	33
片岡幹雄(奈良先端科学技術大学院大学)	
3.2 GroEL, GroES 及びその複合体の溶液構造	46
A.A. Timchenko (Inst. Protein Res., RAS, Russia)	
3.3 タンパク質のフォールディング中間体の構造	51
新井宗仁(東京大学大学院)	
3.4 溶液散乱法で得られる構造階層性、水和、表面チャージ	64
平井光博(群馬大学)	
4. 中性子結晶構造解析、中性子散乱は構造生物学に新しい道をつけることができるか	
4.1 中性子溶液散乱と水和その他	70
藤原悟(日本原子力研究所)	
4.2 ガラス転移	79
片岡幹雄(奈良先端科学技術大学院大学)	
4.3 次期大強度パルス中性子源における装置開発への期待	94
平井光博(群馬大学)	
4.4 中性子構造解析によるニワトリ卵白リゾチームの水素結合	104
峯崎善章、新村信雄(日本原子力研究所)	

4.5 低温X線蛋白質結晶解析	116
中迫雅由(東京大学分子細胞生物学研究所)	
5. 新しい実験のために その1 X線	117
5.1 放射光光源	117
八木直人(SPring-8/JASRI)	
5.2 X線検出器とX線溶液散乱	123
雨宮慶幸(東京大学大学院)	
5.3 CCD型X線検出器のX線溶液散乱実験への応用	138
伊藤和輝(筑波大学)	
5.4 放射線損傷	150
木原裕(関西医科大学)	
6. シミュレーションと溶液散乱	153
6.1 MDを基にして得られる構造情報	153
肥後順一(生物分子工学研究所)	
6.2 NMRにより決定される溶液構造の特徴と性質	171
MDを基にして得られる構造情報—NMRとの比較—	
小島正樹(東京薬科大学)	
6.3 溶液散乱測定を用いた構造予測法の紹介	183
上久保裕生(高エネルギー加速器研究機構)	
7. 新しい実験のために その2 中性子	189
7.1 統合計画中性子源と新しい中性子分光器の可能性について	189
古坂道弘(高エネルギー加速器研究機構)	
7.2 中性子検出器の現状	211
—中性子イメージングプレート応用例から—	
新村信雄、田中伊知朗(日本原子力研究所)	
付録	223
1. ワークショッププログラム	
2. 出席者名簿	

Contents

Preface	1
1. Introduction	
1.1 From the Point of View of X-ray Scattering	2
Hiroshi Kihara (Kansai Medical Univ.)	
1.2 From the Point of View of Neutron Scattering	5
Nobuo Niimura (JAERI)	
2. Neutron and X-ray Scattering in the Era of Structural Genomics	
2.1 What Can be Done with Low Resolution Structural Information	9
Akinori Kidera (Kyoto University)	
2.2 Structure Prediction and Solution Scattering	18
Mamoru Sato (Yokohama City Univ.)	
2.3 Solution Structure Based on Crystal Structure and	28
Solution Scattering Measurements	
A.A. Timchenko (Inst. Protein Res., RAS, Russia)	
3. Structural Changes Detected with Solution Scattering	
3.1 Non-native Structures	33
Mikio Kataoka (NAIST)	
3.2 Solution Structure of GroEL, GroES and Their Complexes	46
A.A. Timchenko (Inst. Protein Res., RAS, Russia)	
3.3 Structures of Protein Folding Intermediates	51
Munehito Arai (Univ. Tokyo)	
3.4 Structural Hierarchy, Hydration, and Surface Charges	64
Detected with Solution Scattering	
Mitsuhiro Hirai (Gunma Univ.)	
4. Do Neutron Crystallography and Neutron Scattering Open a New Way in Structural Biology?	
4.1 Hydration and Neutron Solution Scattering and Other Topics	70
Satoru Fujiwara (JAERI)	
4.2 Glass Transition	79
Mikio Kataoka (NAIST)	
4.3 Expectation to the Development of the Instruments for	94
the Next-generation Pulsed-neutron Source	
Mitsuhiro Hirai (Gunma Univ.)	

4.4 Hydrogen Bonds of Hen Egg-white Lysozyme Observed with Neutron Crystallography Yoshiaki Minezaki and Nobuo Niimura (JAERI)	104
4.5 X-ray Cryo-crystallography of Proteins Masayoshi Nakasako (Univ. Tokyo)	116
5. Sources and Detectors, Part 1. X-ray	
5.1 Synchrotron Radiation Naoto Yagi (SPring-8/JASRI)	117
5.2 X-ray Detectors and X-ray Solution Scattering Yoshiyuki Amemiya (Univ. Tokyo)	123
5.3 Application of CCD Type X-ray Detectors to X-ray Solution Scattering Experiments Kazuki Ito (Univ. Tsukuba)	138
5.4 Radiation Damage Hiroshi Kihara (Kansai Medical Univ.)	150
6. Simulation and Solution Scattering	
6.1 Structural Information Based on MD Junichi Higo (BERI)	153
6.2 Characteristics of Solution Structures Determined by NMR Structural Information Based on MD —Comparison with NMR Structure— Masaki Kojima (Tokyo Univ. Pharm. Life Science)	171
6.3 Introduction of Structure Prediction Methods using Solution Scattering Measurements Hironari Kamikubo (KEK)	183
7. Sources and Detectors, Part 2. Neutrons	
7.1 The Joint Project of the High-intensity Pulsed-neutron Facility and Possibilities of New Neutron Spectrometers Michihiro Furusaka (KEK)	189
7.2 Current Status of Neutron Detectors —Applications of Neutron Imaging Plates— Nobuo Niimura, Ichiro Tanaka (JAERI)	211
Appendix	223
1. Program of the Workshop	
2. List of Participants	

まえがき

平成12年2月9日—10日に、日本原子力研究所東海研究所において第182回基礎科学セミナーとして中性子構造生物学ワークショップが開催された。このワークショップは関西医大・木原裕教授、原研・新村信雄グループリーダーそして藤原悟により企画・主催されたもので、「溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究の新しい地平」と題して、中性子ならびにX線溶液散乱法を中心に、これらの手法が蛋白質構造研究にどのようなインパクトをもたらすかを議論した。溶液散乱法は、高分解能の原子モデルの作成が可能な結晶構造解析と較べると、低分解能ではあるが、溶液中の構造情報を直接抽出できるという利点がある。蛋白質はその機能発現を水分子に取り巻かれた”溶液中”で行っている。したがって溶液中の構造を直接調べることでこれらの方法は非常に重要な方法である。このような結晶構造解析とは異なった切り口を持った様々な手法を駆使して構造生物学研究を繰り広げ、結晶構造解析と比較検討することによって、構造生物学研究の新たな道が開けてくることが期待される。このワークショップでは、その様々な可能性が活発に議論された。

日本原子力研究所先端基礎研究センターの中性子構造生物学研究グループでは、中性子結晶構造解析を主な手法として蛋白質分子の水素原子の位置決定ならびに蛋白質を取り巻く水分子の構造—水和構造—を明らかにすることを目的とした研究を行っている。我々は、結晶構造解析により水分子位置を直接決定することにより水和構造を調べているが、溶液散乱法により溶液中での”平均”水和構造を調べることも可能である。水和構造の解明には、こうした様々な方法による実験結果、さらには計算機によるシミュレーションとの比較検討を行うことが非常に重要であろう。このワークショップでは、このような水和構造に関する溶液散乱法や計算機シミュレーションの話題も含めて、様々な可能性が論じられている。その意味で、このワークショップの発表はきわめて重要な内容を持っており、今後の中性子構造生物学研究の発展に資するところが非常に大きい。そこで編者は発表者及び実行委員の協力を得て、発表資料をJAERI-confレポートとしてここにまとめた。

このワークショップの開催に当り、先端基礎研究センター長、次長、基礎研究推進室、中性子構造生物学研究グループの皆様にお世話になった。主催者を代表して、ここに感謝する次第である。

藤原 悟

(原研・先端基礎研究センター)

平成13年1月

溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究の新しい地平

Session 1. イントロダクション - 1.1 X線の立場から

関西医科大学物理学教室 木原 裕

ポストゲノム時代に入って構造生物学はますます重要になってきている。中でもX線、中性子線による結晶解析がその主流であることは言うまでもない。しかし、それは生物学研究のゴールではなくスタートである。生物機能の理解にとっては、結晶構造の理解だけでは不十分であることも広く認識されている。その意味でポスト結晶解析の構造生物学が何をすべきか - これが本シンポジウムの本当の主題である。

本シンポジウムでは、特に溶液散乱法を主軸としてこのようなテーマに迫っていきたいと考える。溶液散乱法は以下のような特徴と問題点を持っている。

- 1) 溶液中の構造をそのまま追うことができる。これは特に反応中に構造変化を起こす場合、そもそも結晶にならない（例えば変性した状態）場合などに威力を発揮する。
- 2) 低分解能である。実際溶液散乱パターンにはせいぜい十数個の独立パラメータしか含まれない。したがって原理的に原子分解能を持つ構造を決めることはできない。適用に際しては、蛋白質分子の持つ大きな構造ユニット（全体の形、サブユニットの配位など）が意味がある場合に限るなどの限界がある。
- 3) 位相情報が失われており、構造をユニークに決めることはできない。可能なのは基本的にモデル解析である。
- 4) 考慮すべき課題がまだ多く残されている。水和、構造変化、構造揺動、電子密度の不均一性などの効果がいずれも散乱強度に寄与してくる。これらを如何に分離していくかが今後の課題である。

近年、X線溶液散乱法は多くの発展を遂げてきた。いくつかを列挙すれば

- 1) 結晶解析、NMR等で得られた構造情報を基にして溶液構造を最適化する方法の精密化が進んできた。それによって上に掲げた種々の因子が議論できる水準に到達した。
- 2) 実験データのS/Nが飛躍的に向上した。特に高い強度のX線源が使用可能になり、理論と合わせることで質の高いデータが供給されるようになった。ただし、X線強度の増大に伴って、放射線損傷の問題も重要な課題となりつつある。
- 3) 構造変化、中間体の構造、non-native構造の研究の意義が高まり、多くの研究成果が集積されてきた。
- 4) 特に水和の問題は、理論、実験の両面から飛躍的進歩を遂げてきた。
- 5) molecular dynamicsの採用により、従来とは異なる「モデル計算」が可能になりつつある。
- 6) この他に溶液散乱の結果だけから、構造を推定する試みも始まっている。

今回のシンポジウムは以上のような背景と問題意識を基に企画された。全体の流れの中でこれらの問題に少しでもアプローチできれば幸いである。

溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究の新しい地平

(2000.2/9, 10)

溶液散乱法の特徴

- 1) 溶液中の構造
- 2) 低分解能
- 3) 位相情報が失われており、基本的にはモデル解析である。
- 4) 考慮すべき課題: 水和, 構造変化, fluctuation, 電子密度の不均一性

最近の発展

- 1) 結晶解析, NMR 等で得られた構造を基にした溶液構造の精密化
- 2) 実験データの質の向上 (S/N 比=強度, 角度分解能)
X 線源, 検出器 $\langle = \rangle$ 放射線損傷
- 3) 構造変化, 中間体の構造, non-native 構造
- 4) 水和
- 5) molecular dynamics を基にした構造変化へのアプローチ
- 6) ab initio model calculation

Reconstruction from SAXS data of low resolution of switch

activating protein (SAP1) from yeast

Dirk Walther, Michael Bada, Ian Millett, Marc Delarue, and Sebastian Doniach (1998 SSRL activity report, 7:175-176)

Reconstruction of low density map of biomolecules from directly from SAXS data

- 1) D.I. Svergun et al. (1997) Shape determination from solution scattering of biopolymers, *J. Appl. Cryst.*, 30, 798-802.
- 2) P. Chacon, F. Moran, J.F. Diaz, E. Pantos and J.M. Andreu (1998) Low resolution structures of proteins in solution retrieved from x-ray scattering with a genetic algorithm, *Biophys. J.*, 74, 2760-2775.

Svergun: Based on an expansion of the surface of the molecule by spherical harmonics

Not applicable to a class of proteins presenting a hole in the middle.

Chacon: assembly to build a model from an assembly of point scatterers by a generic algorithm

Walther: based on a new set of Monte-Carlo moves following a "give'n take" principle in the process of adding and removing beads.

- Minimization of a combination of an R-factor and of a correlation coefficient between experimental $I_{exp}(s)$ and calculated $I_{calc}(s)$ data
- Beads are added on a face centered cubic lattice. Only nearest neighbors of existing beads are considered for bead addition. A move is accepted if it decreases the energy (i.e. increases the fit). = This basically amounts to a Monte Carlo algorithm at zero temperature.
- The algorithm stops when the fit does not improve any more after trying all allowed Monte Carlo steps.
- Then another run is initiated, and the results are superposed using the principal axes of the different models, so that the final model is eventually a mean of several trials (typically 10-20 independent runs).
- This method is much more rapid than the Chacon algorithm.
- Resolution is c.a. 16 Å.

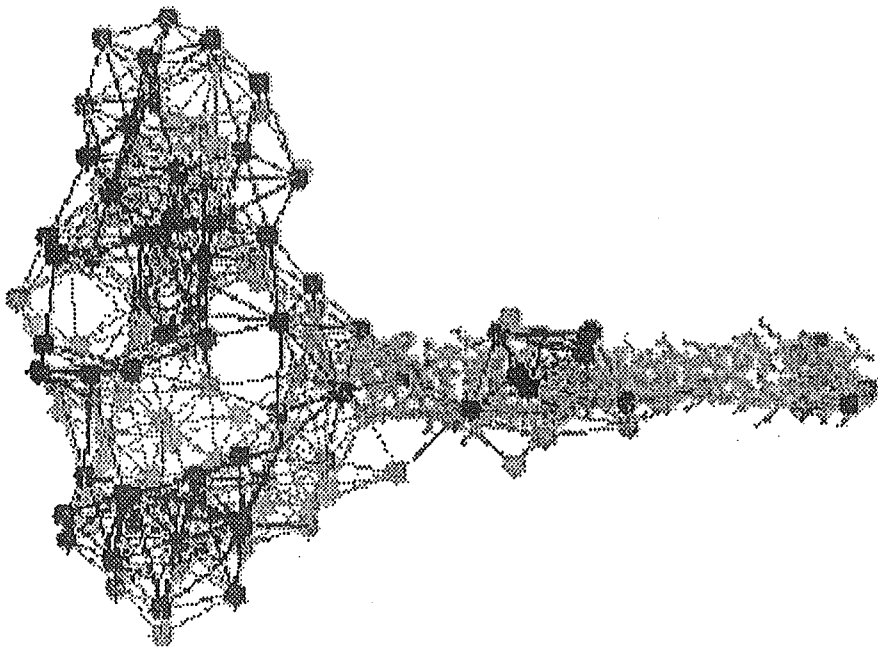


Figure 1: low resolution reconstruction of SAPI superposed on coiled-coil model for the "broom handle" portion of the DNA binding protein.

1.2 イントロダクション「中性子の立場から」

日本原子力研究所
先端基礎研究センター
新村信雄

中性子小角散乱は決して新しい実験手法ではないし、競合・相補関係にある分野（X線小角散乱、X線・中性子結晶構造解析）は明確であるので、その中の何が競合し、何が相補であるかを明らかにしたテーマを中性子小角散乱に選ぶ必要がある。

小角散乱で見える分解能は約 1nm である。それに対して結晶構造解析で見える分解能は 0.1nm である。結晶化可能な試料を用いての小角散乱実験はもし構造決定を目的にするなら無意味に等しい。コントラスト変調法が中性子小角散乱の特徴であるからという理由で複合体の構造決定を行っても、その後結晶構造解析がされれば先のデータは顧みられなくなることを肝に命ずるべきである。ここからの結論は原理的に結晶化しない系を扱うということになるだろう。

X線小角散乱で用いる試料の量は中性子に比べて 1/10 以下である。X線小角散乱で可能な実験はそちらに任せるべきである。コントラスト変調法を上手に利用出来る系、中性子では放射線損傷は無いことを利用出来る系（長時間測定が必要な系）等が候補である。

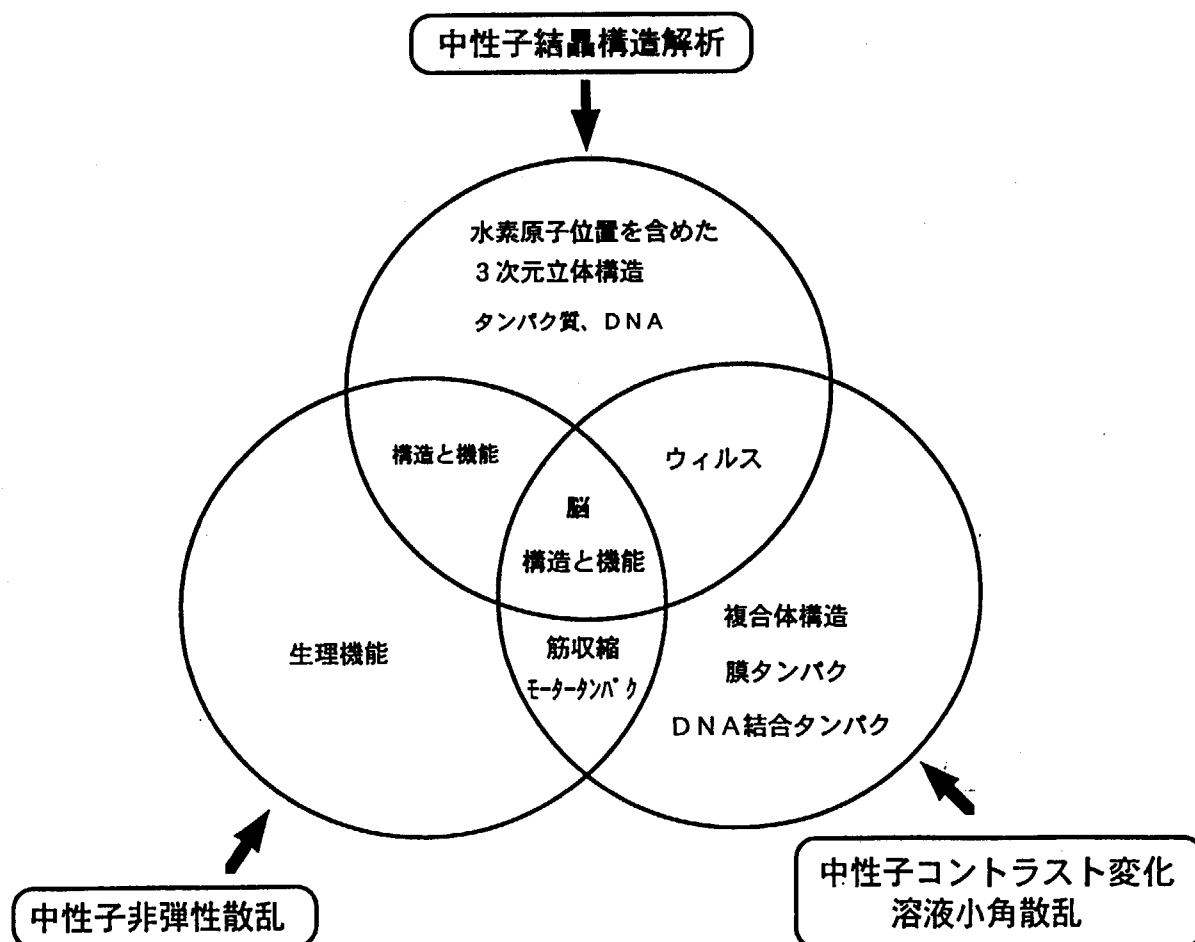
今回のテーマ、水和構造が（X線小角散乱を含めても）中性子小角散乱で見えるのか、いくつか過去に報告例はあるが、正しく見ているのかは今後の課題であり、チャレンジなテーマである。活発な議論を期待したい。

中性子の立場から

平成 12 年 2 月 9 日

原研・先端基礎研究センター
中性子構造生物学研究グループ

新 村 信 雄



中性子小角散乱の特徴

- 1) 物質内部 (c.f.電顕)
- 2) 水素、重水素効果 (c.f.X線)
- 3) ダイナミックス

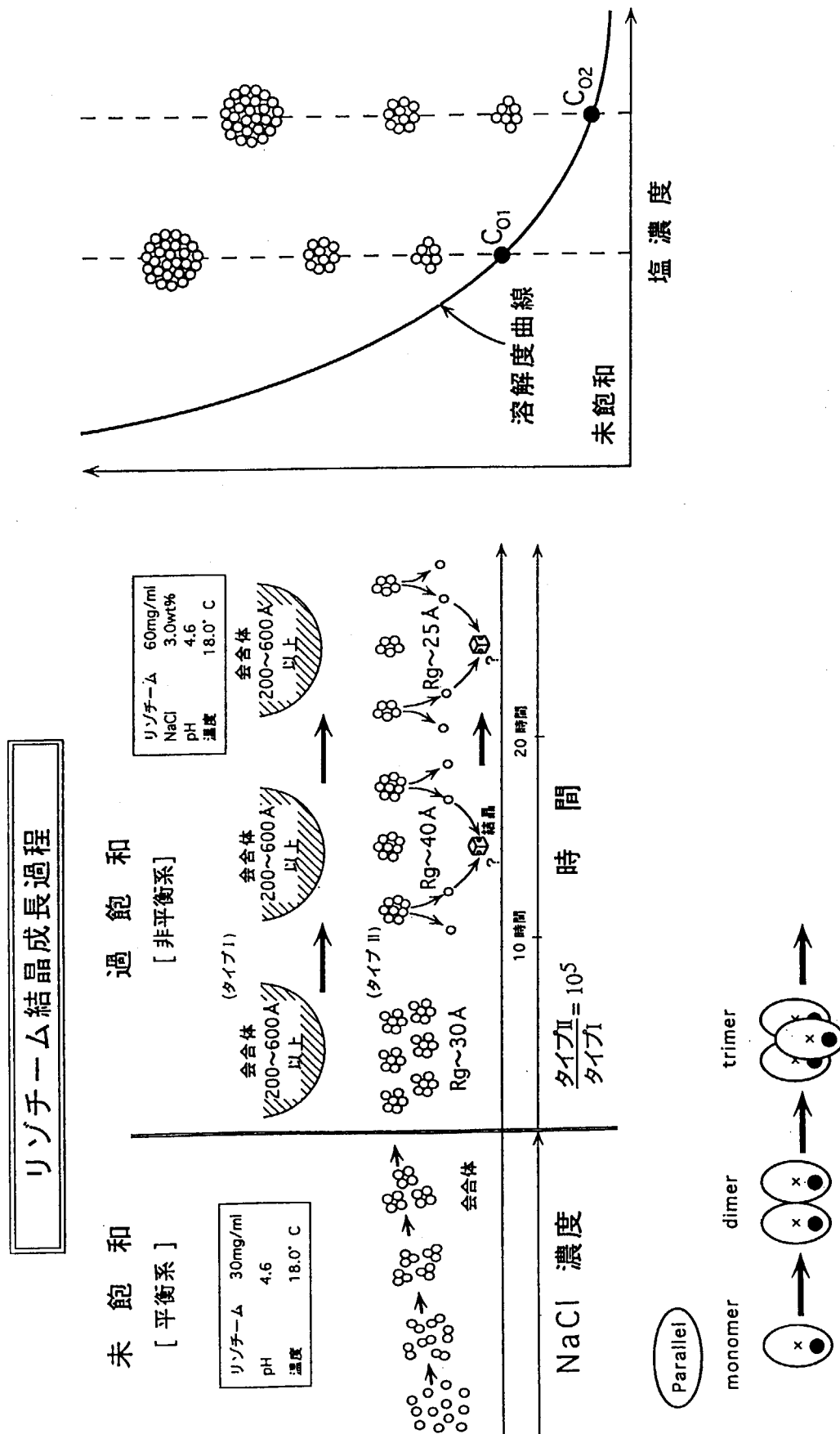
構造生物：溶液中での構造が見える。

注) 小角散乱の利点であり欠点でもある。
これと、上の1)、2) そして3) を組み合わせる。

中性子溶液散乱が得意とするテーマ
(タンパク質結晶学との相補性)

○ 競合関係にある分野から見ても

- 1) X線タンパク質結晶学
結晶化しない系、結晶化しにくい系
(Unfolding, 膜タンパク質、等)
結晶構造と溶液構造との違いを見る
(シヤペロニン、等)
- 2) X線溶液散乱
コントラスト変化法が有利に使える系
(複合体、等)
X線による損傷を免れない系
(結晶成長直接観察、等)



X線・中性子小角散乱実験から得られたモデル(全体像)

2. 構造ゲノム科学の時代における溶液散乱、中性子散乱

2.1 低分解能構造情報で何ができるか、何が期待されるか

京都大学大学院理学研究科 木寺詔紀

溶液散乱についての私見を述べる。

溶液散乱の基本は、系が溶液中にあることにより溶質分子の運動に制約がないことにあると考える。即ち、溶液散乱には、結晶構造からの、平均構造のずればかりでなく、運動性の違いが観測されることが期待される。結晶場による制約は特に、マルチドメインタンパク質のドメイン間運動に大きく現れると予想されるので、溶液散乱の対象としては、マルチドメインタンパク質が最も重要な対象となると期待される。全体構造を低分解能で与える溶液散乱の特徴は、その意味でドメイン間運動の検出に適しており、同じ溶液状態を扱う NMR が、主に近距離の相互作用情報を用いるために、そのような長距離情報の検出が困難であることと対照的である。この場合、低分解能であることの限界は、それぞれのドメインの原子レベルの平均構造を結晶構造、NMR 構造に依拠することによって、多くの場合回避できるだろう。むしろ、そのような積極的な役割分担こそが重要であると考ええる。

ここで、運動を強調することは、タンパク質の機能における運動の重要性を意識していることであるが、それ以上に、中性子線による非干渉性散乱の大きな可能性を強調したいためでもある。タンパク質の機能に関わる運動は、多く非線形で拡散的なものであると考えられているが、そのような情報をもたらすものは、中性子の低エネルギー側の非弾性散乱、また準弾性散乱である。そのような運動の情報をもたらす他の分光学的方法 (Raman 散乱、過渡的ホールバーニング等) と異なり、中性子散乱はほとんど古典的な運動の描象のみで理解し得るところが重要である。静的なものと同時に動的な散乱データを与えるところに、中性子散乱の大きな可能性があると思われる。

このような運動性を含むような情報を正しく取り出すためには、多くの技術的な革新が必要とされるだろう。運動性、溶媒和状態等を正しく取り入れたより詳細なモデルに基づく解析、より高い空間、エネルギー分解能の実験。それに加えて、NMR では極めて当たり前になっているラベリングを取り入れて、全体構造だけでなく、部位特異的な情報を取り出す試みを期待したい。そこでのモデルの構築には理論・計算を行っている我々が寄与できる部分であるかもしれない。

構造ゲノム科学の時代における溶液散乱・中性子散乱

低分解能構造情報で何が出来るか
何が期待されるか

低分解能構造情報

で何が出来るか・何が期待されるか

一次元情報

主体的：ない

低分解能構造はそのままでは
構造インフォマティクスの情報たり得ない
構造決定は大量情報処理のprotocolとして
成熟していない

P.Chacón, *et al. Biophys.J.* 74, 2760 (1998)

D.I.Svergun, *Biophys.J.* 76, 2879 (1999)

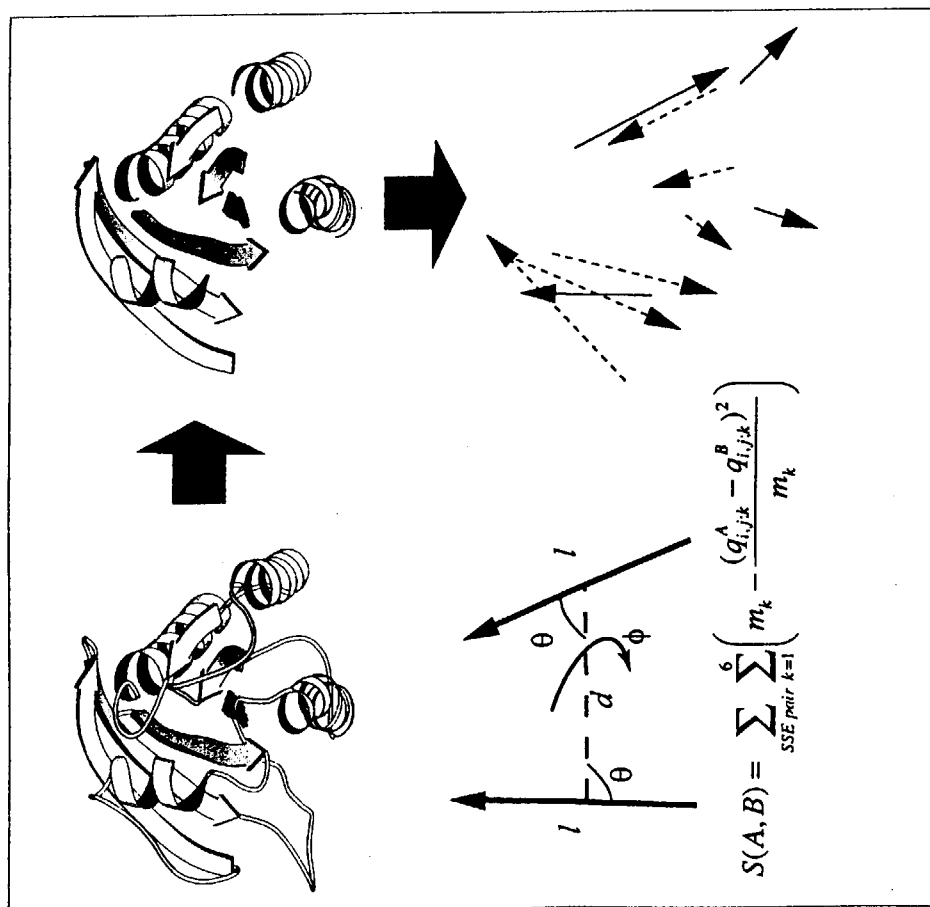
京都大学大学院理学研究科
木寺詔紀

補助的：あり得る

Modular Proteinの立体構造構築の補助など

個別論としてのより深い理解
正しい物理学の基盤に基づいた生物学の構築

Structural Classification



溶液散乱 (static) に何を望むか？

Dynamics Ensemble

溶液構造
NMR

結晶構造
(結晶)構造生物学

生状態の立体構造

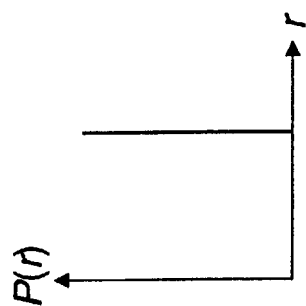
Inter-modular Motion

Multi-domain protein
Multi-chain protein
複合体

フォールディング
変性状態
中間状態

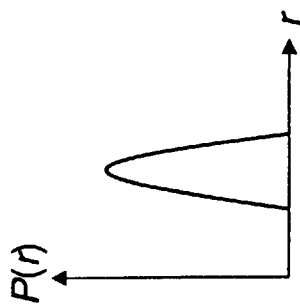
Model of Ensemble

Gauss chain model
(J.J.Portman et al. Phys.Rev. 81, 5237)



$$H(\lambda) = H_{\text{chain}} + \lambda H_{\text{int}}$$

$$\beta H_{\text{chain}} = \frac{1}{2} \sum_{i,j} \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{\Gamma}_{ij} \cdot \mathbf{r}_j$$



$$\beta H_{\text{int}} = \sum_{ij} \varepsilon(r_{ij})$$

$$e^{-\beta F(\mathbf{B})} = \text{Tr} \left[\prod_i \delta(B_i - \Delta r_i^2) e^{-\beta H} \right]$$

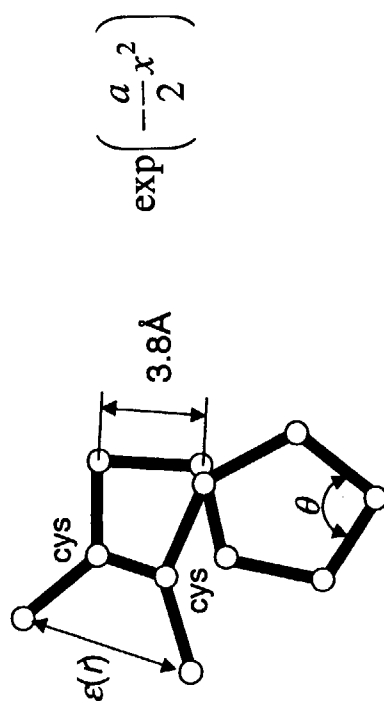
高分解能
特定部位からの散乱

分配関数 *analytical*(ε) $\longleftrightarrow$ 散乱関数(ε)



散乱関数 *experimental*

実験データから構造情報をどれだけ取り出し得るか？



解析

bare proteinの情報

溶媒効果

D.I.Svergun *et al.*
PNAS **95**, 2267 (1998)

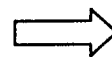
Guiner領域

A_2 (希薄領域?)

低角-広角領域

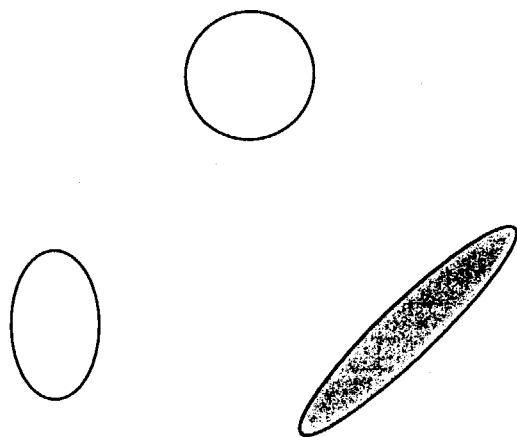
Model of Ensemble

Modelの情報量 ≫ 実験の情報量

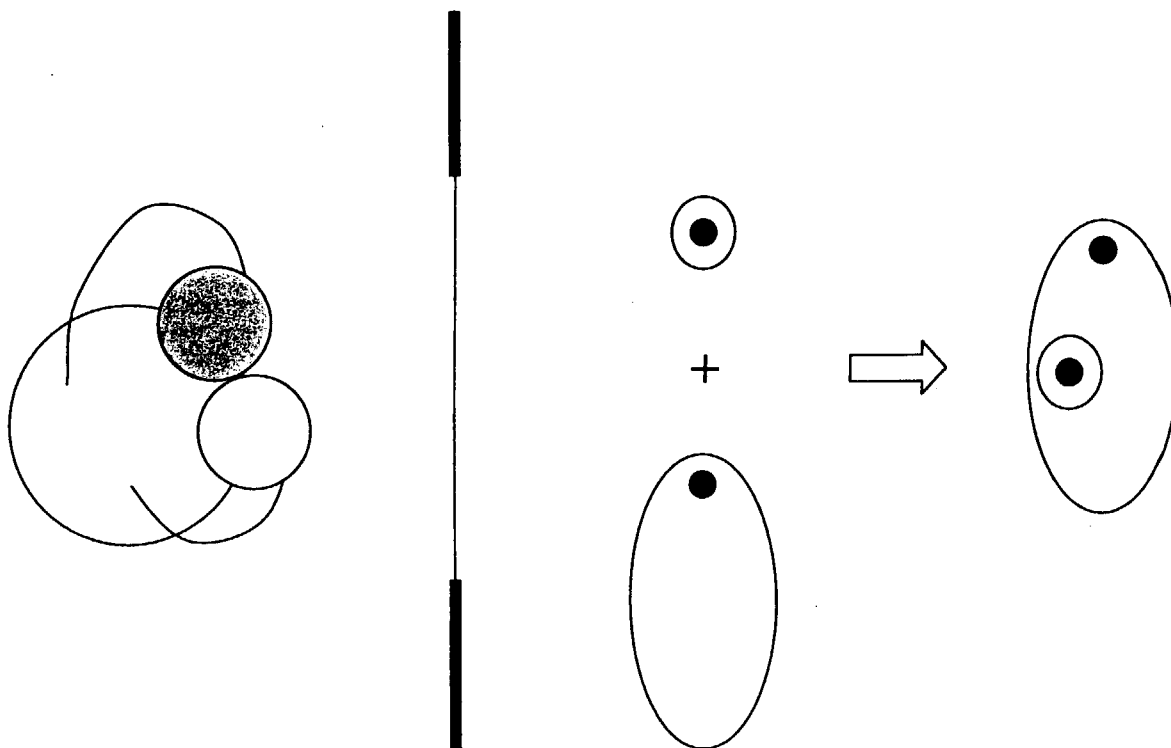
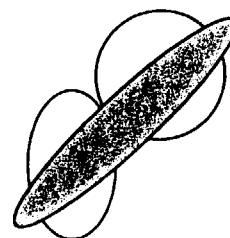


Modelの情報量 ~ 実験の情報量

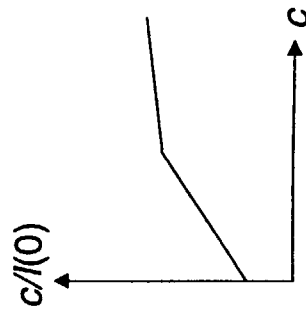
NMR Crystallography



Solution Scattering



実験の情報量をどのように増やすことができるか？



$$\frac{c}{I} \propto \frac{1}{M} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots$$

混合溶媒系の散乱 A_2^1, A_2^2

Contrast Variation Method

Labeling 特定部位の $P(r)$ を求める
相互作用部位の決定

配向 非希薄領域
polymer embedding — — 軸延伸
形の異方性

Modular Protein vs. AFM、電子(光学)顕微鏡
NMR
Crystallography
標準的な protocol

Aggregation (Amyloid)

P.Aymard, et al. *Int. J. Polym. Anal. Char.*
2, 115 (1996)

溶液散乱 (dynamic) に何を望むか？

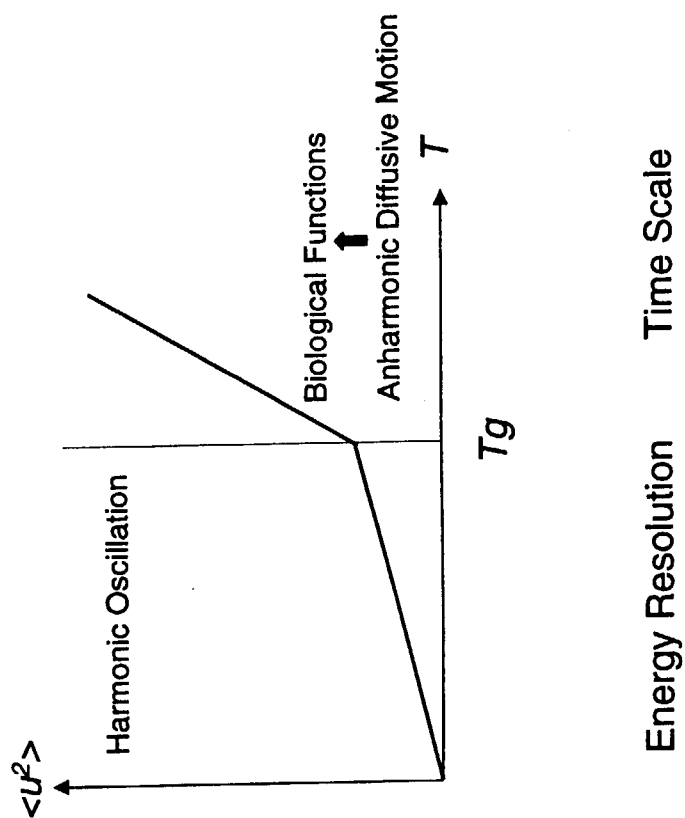
$S(\mathbf{q}, \omega)$

最も直接的なdynamics測定手段

非弾性散乱 (低エネルギー領域)
準弾性散乱

anharmonic diffusive motions

Specificity **→** Labeling



Energy Resolution Time Scale

Acknowledgements

片岡 幹雄 (NAIST)

中迫 雅由 (東京大学)

柴山 充弘 (京都工芸繊維大学)

2.2 構造予測と溶液散乱

横浜市立大学大学院総合理学研究科

佐藤 衛

ゲノム科学が20世紀を締め括り、新たにポストゲノム科学として再スタートする。20世紀後半が、DNAの塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列をベースにした一次元のサイエンスの時代とすれば、21世紀の始まりはタンパク質の立体構造をベースにした三次元のサイエンスの時代と言える。アミノ酸配列がタンパク質の立体構造を規定し、その立体構造がタンパク質の機能を規定するという世紀を挟んだ構図の主役は、タンパク質の立体構造である。タンパク質の立体構造が数多く決定されると、アミノ酸配列の類似性が低くてもその立体構造が類似しているケースが数多く認められ、そこから現有するタンパク質の基本構造が試算された。3D-1D法は、このような状況下で生まれた新しい構造予測法で、その開発には、これまでに蓄積されたアミノ酸の配列情報や立体構造情報、その他各種データベースの整備が大きく貢献している。

3D-1D法は、ホモロジー検索の一種の発展形で、立体構造未知のアミノ酸配列と構造既知のタンパク質間のホモロジーを調べるとき、スレッディング (threading) という概念で立体構造 (3D) とアミノ酸配列 (1D) を比較するのが特徴である。この方法では、構造未知のアミノ酸配列が与えられたとき、その配列に対する立体構造既知のタンパク質に対する適合度を調べ、データベースの中で最もよい適合性を示す立体構造が構造未知のタンパク質の立体構造であると予測する。3D-1D法の利点は、立体構造とアミノ酸配列を直接比較するので、構造未知のアミノ酸配列と構造既知の配列を比較するいわゆる比較解析法よりも、微弱なアミノ酸配列のホモロジーでも立体構造が予測できる点にある。

しかしながら、実際に3D-1D法で構造未知のアミノ酸配列を与え、その配列に対する立体構造既知のタンパク質に対する適合性を調べてみると、適合性の度合を表す数値 (スコア) に有意な変化が認められない場合が少なくない。データベースの中から適合性が極端により立体構造を見つけ出すことができないと、タンパク質の立体構造を予測することができないので、予測的中率はあまり高くない。この問題を解決するために、方法論やアルゴリズムの改良を含め多くの試みがなされているが、本ワークショップでは、3D-1D法という理論的な取扱いに対し、溶液散乱という実験を加味し、立体構造予測的中率が向上できないかどうかについて言及する。

中性子構造生物学ワークショップ

(平成12年2月9日～2月10日)

溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究

の新しい地平

「構造予測と溶液散乱」

横浜市立大学大学院

総合理学研究科

佐藤 衛

[構図]

3D-1D 法によるタンパク質の構造予測

予測的中率を向上させる

↓

3D-1D 法で得られた複数の解 (立体構造)

を SAXS 法で検証する。

↓

3D-1D 法と SAXS 法の併用

↓

3D-1D-SAXS 法

「結晶構造解析研究者からの
溶液散乱への期待」

3D-1D 法によるタンパク質の立体構造予測

タンパク質の立体構造予測

- ・ ab initio 法 (非経験的手法)
フォールディング機構の解明に重要
立体構造予測が困難
- ・ 3D-1D 法 (経験的手法)

3D-1D 法による立体構造の予測

- ・ 1990年代の新しい構造予測法
背景: 天然のタンパク質の基本構造は有限 (C.Chotia)
PDBの増大、SCOP データベース
- ・ スレディングという概念
立体構造を起点としたデータベースに基づく立体構造予測
- ・ ホモロジー検索の一種の発展形で、15~25%のホモロジーが
立体構造の予測の対象

3D-1D 法の方法論

- ・ 立体構造 (3D) とアミノ酸配列 (1D) の直接比較
適合性の評価, 3Dプロファイル, アライメント

3D-1D 法の利点と限界

- ・ 利点: 配列比較よりもホモロジーが低くても予測可能で実用的
- ・ 限界: データベースの中に類似構造がなければ予測できない
フォールディング機構の解明に結びつかない

3D-1D 法の有効性

- ・ スコア<-3が予測の目安
- ・ 機能に着目

3D-1D 法の予測的中率の向上

- ・ リスクの少ない実測 (実験) データを組み合わせる
↓

X線溶液散乱法? (3D-1D-SAXS 法)

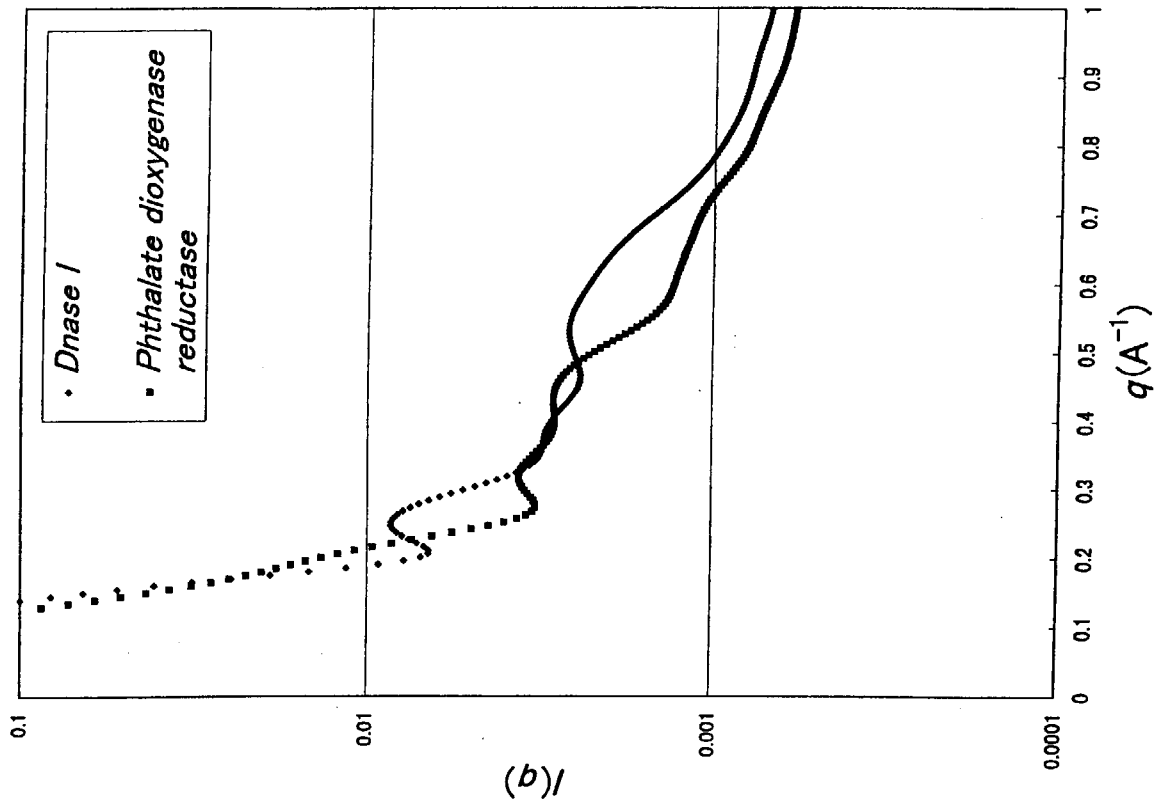
溶液散乱法の利点と欠点

利点

- ・ データ収集および解析が簡単
- ・ 立体構造の予測とは、未知のタンパク質の
主鎖のフォールディングを予測
↓
未知のタンパク質とモデルタンパク質の
原子位置はかなり異なっている
↓
低分解能で立体構造を比較する必要あり
↓
溶液散乱法

欠点

- ・ 溶液散乱: 1次元データ, 構造: 3次元データ
↓
異なる構造でも類似の溶液散乱を
与える可能性あり
↓
3D-1D法との併用

Comparison of $I(q)$ calc

3D-1D 法による SMase (sphingomyelinase) の立体構造予測

SMase : リン脂質(sphingomyelin)を分解する酵素

アミノ酸配列は決定済
立体構造は未決定

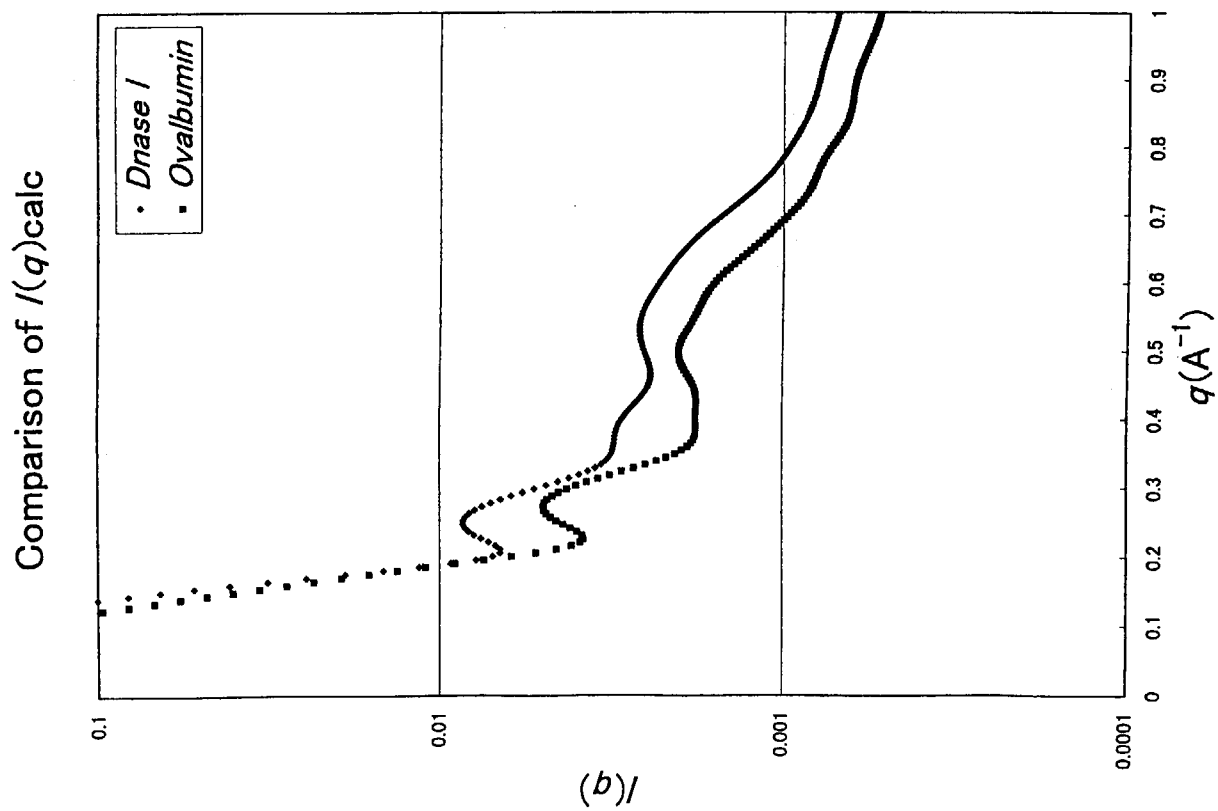
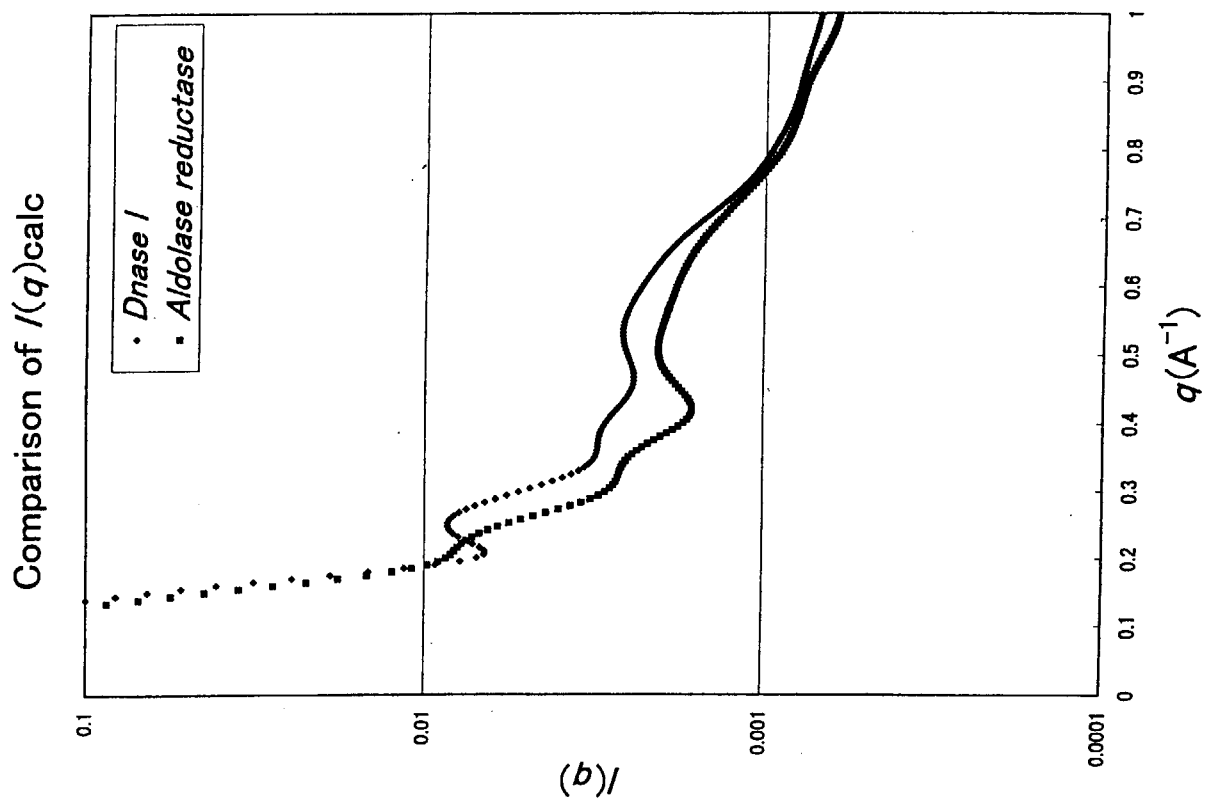
SMase のアミノ酸配列を COMPASS に入力して、
構造ライブラリーを検索

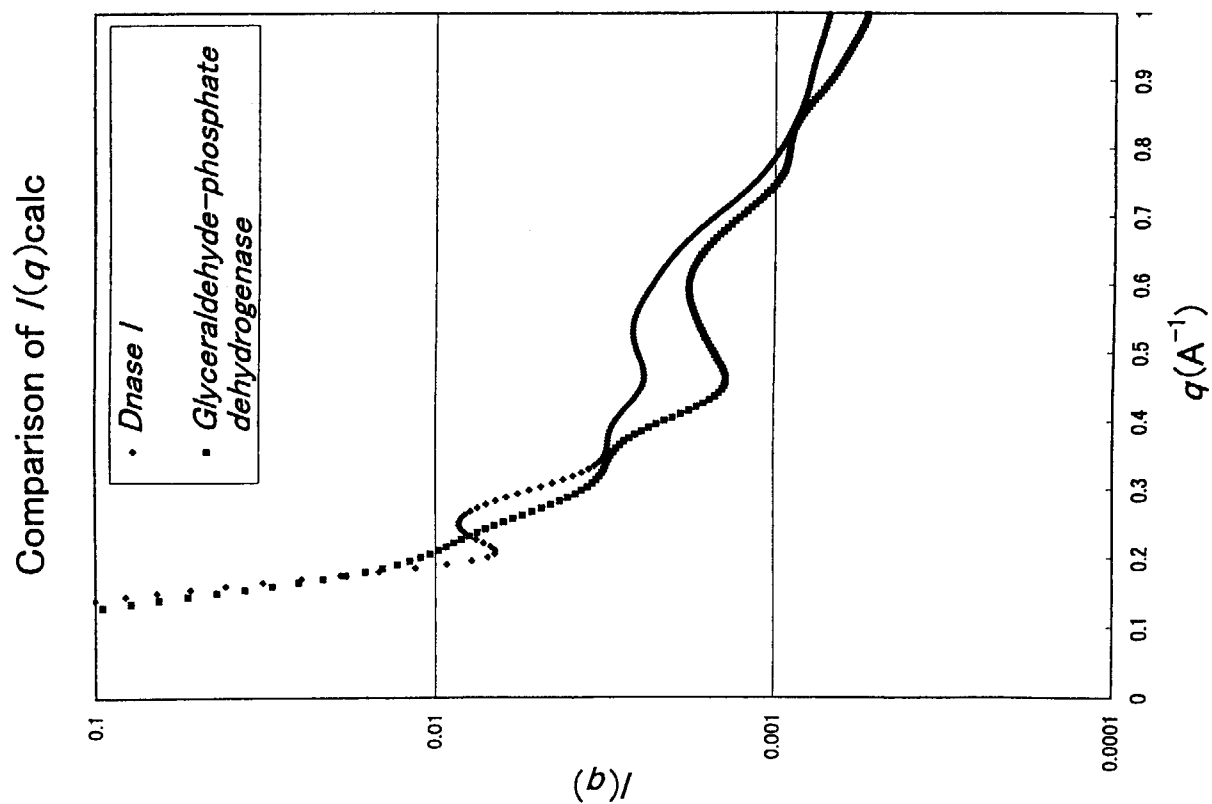
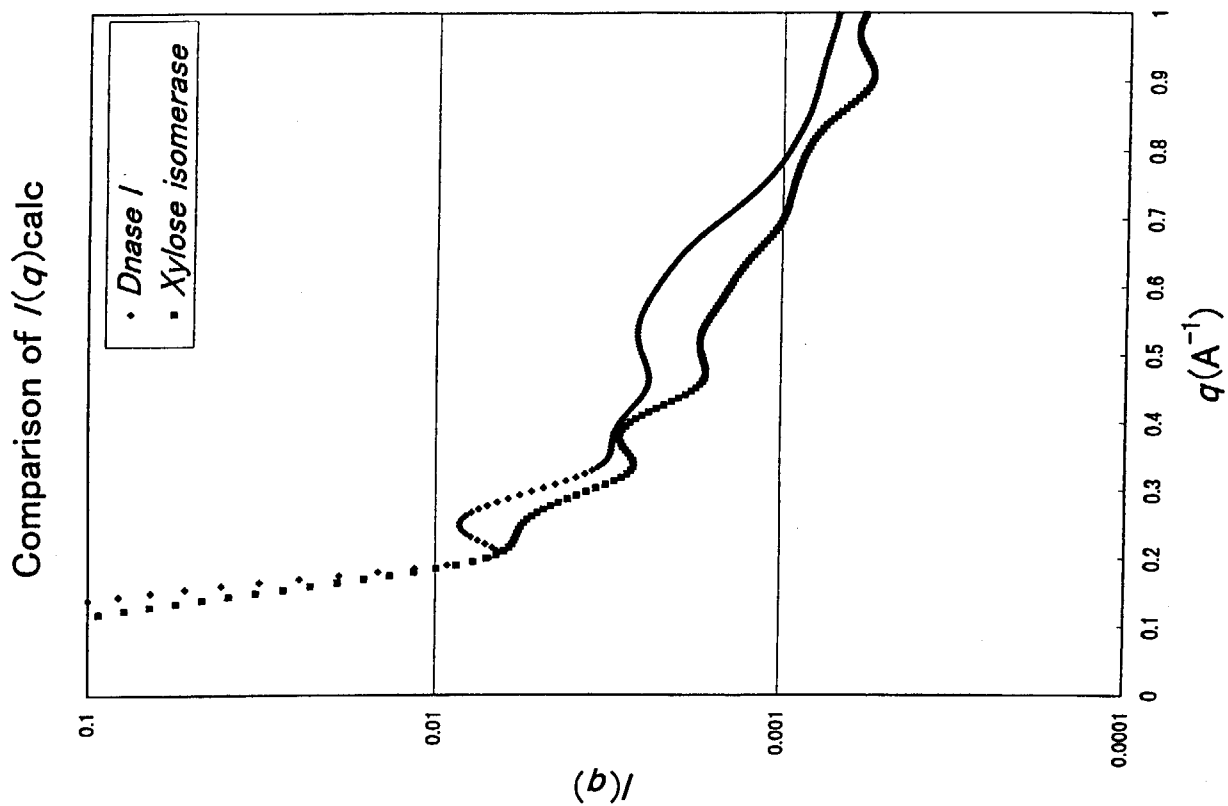
表 2 バクテリア SMase のアミノ酸配列を入力として構造ライブラリーをサーチした出力結果*

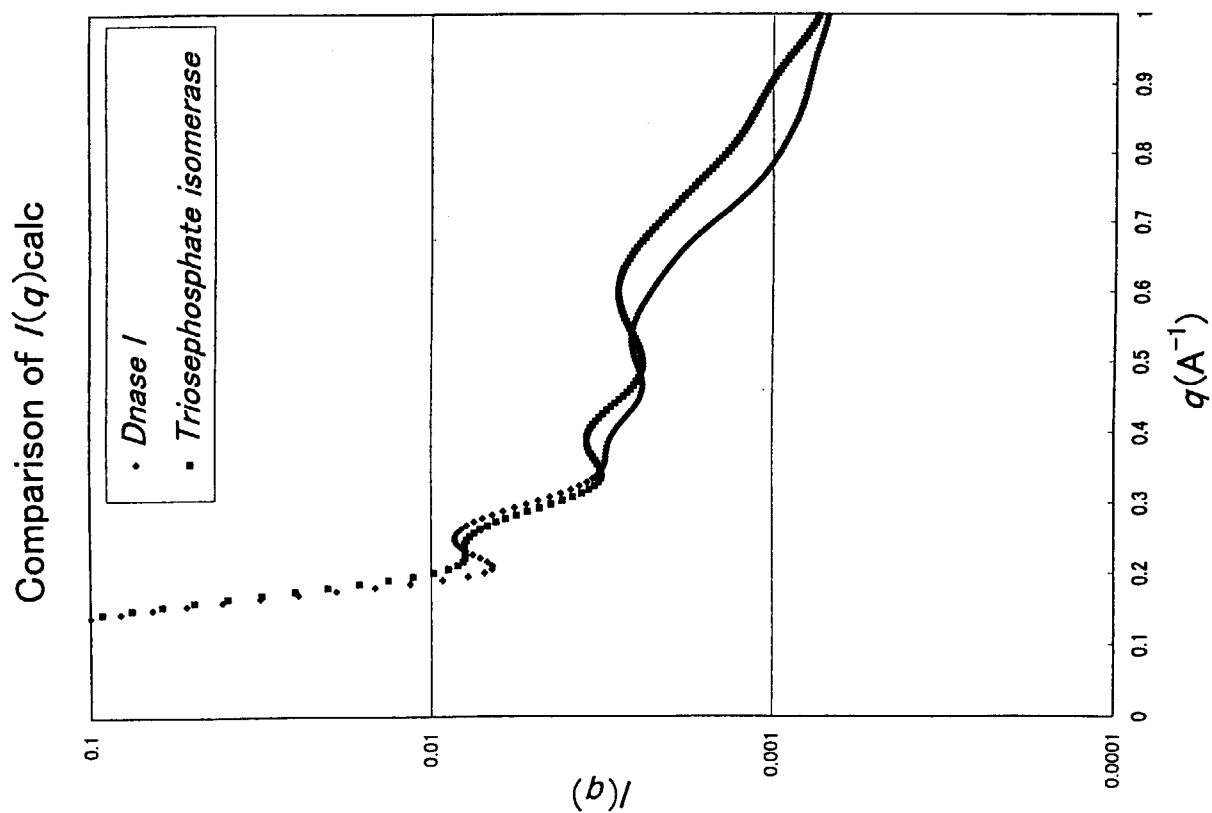
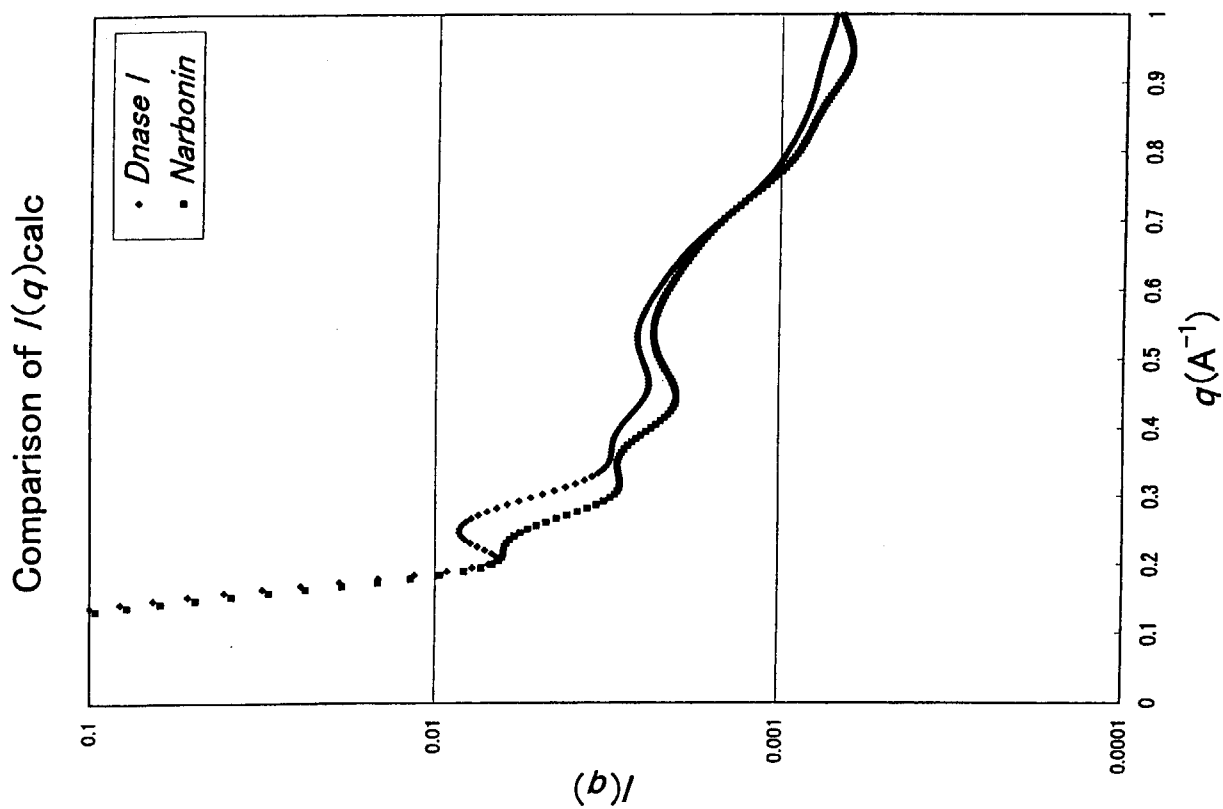
順位	モデル構造	PDB コード	NR	同一残基率 (%)	S_{sim}	S_{sim}
1	Dnase I	3DNI	250	9.7	-2.82	-2.70
2	bean pod mottle virus	1BMV2	300	8.8	-2.32	-1.08
3	phthalate dioxygenase reductase	2PIA	294	7.8	-2.23	-1.08
4	ovalbumin	1OVA	303	9.6	-2.04	-0.73
5	Rubisco	SRUBA	298	9.1	-2.04	-0.80
6	aldose reductase	1ADS	285	7.2	-2.01	-0.97
7	xylose isomerase	4XIS	298	6.9	-2.00	-0.76
8	D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1GDI0	280	10.7	-1.98	-1.02
9	triosephosphate isomerase	5TIMA	245	11.7	-1.92	-1.62
10	narbonin	1NAR	275	10.1	-1.91	-1.02

* スコア (S_{sim}) の値の低い順にモデル構造を並べてベスト 10 を表示した。 S_{sim} は残基当たりのスコア (合計スコアを NR で割り、あらためて偏差値に換算)。 PDB は Protein Data Bank (立体構造データベース) の略。 NR は配列・構造間でアラインされた残基数。

西川 建: 医療情報学, 17(3), 1997: 421-432 より







理論溶液散乱強度

静止した1分子の散乱強度

$$I_m(\vec{q}) = \sum_i \sum_j f_i \cdot f_j \cdot \exp[i(\vec{q} \cdot \vec{r}_{ij})]$$

溶液中の1分子の散乱強度

$$I_m(q) = \langle I_m(\vec{q}) \rangle = \sum_i f_i^2 + \sum_i \sum_j f_i \cdot f_j \frac{\sin(q \cdot r_{ij})}{q \cdot r_{ij}}$$

$\vec{q}$: 散乱ベクトル, $q = |\vec{q}| = 4\pi \sin \theta / \lambda$, 2θ : 散乱角

$\langle \rangle$: 空間平均

f_i, f_j : iおよびj番目の原子の原子散乱因子

溶媒効果を加味した原子散乱因子

(Fraser *et al.* (1978) *J. Appl. Cryst.*, 11, 693-694)

$\vec{r}_{ij}, r_{ij}$: iとj番目の原子間ベクトルおよび原子間距離

PDB データから計算

3D-1D-SAXS 法の手順

立体構造を予測したいタンパク質(アミノ酸配列既知)のX線溶液散乱を測定する。 $q = 0.2 - 0.6 \text{ \AA}^{-1}$

↓

立体構造を予測したいタンパク質のアミノ酸配列を入力データとして、3D-1D法でデータベース中の構造既知のタンパク質との適合性を調べる。

このとき、ただ1つだけ他の多くの立体構造よりも適合性が極端に優れた(スコアが小さい)構造が得られた場合は、その立体構造が構造未知の立体構造と予測される可能性が大。

↓

3D-1D法で適合性を評価して、データベース中で適合性が高いと判断される上位10位程度までのタンパク質それぞれについて、理論散乱強度を計算する。

↓

3D-1D-SAXS 法の問題点

適用できるタンパク質の分子量に限界がある

実際のタンパク質はアミノ酸残基の数が増えていくとドメイン構造を形成して三次構造を安定化させている。3D-1D法も同様な制約があるが、3D-1D法と併用するX線溶液散乱法もこのようなドメイン構造をもつと予想されるタンパク質には適用できない。ドメイン間の相互干渉によるX線散乱の極大ピークが $q = 0.2 \sim 0.6 \text{ \AA}^{-1}$ の領域に現れる可能性があるからである。したがって、3D-1D-SAXS法は、タンパク質の基本構造を予測するという点に目的に限定して適用する必要がある。

タンパク質の分子表面に存在するループ領域

構造未知のタンパク質の基本構造を予測するとき、そのタンパク質の分子表面に存在するループ領域の大小およびその数がX線溶液散乱に及ぼす影響が挙げられる。ループ領域の大小およびその数はタンパク質の基本構造にはまったく関係していないので、その領域がどの程度基本構造のみからのX線散乱に影響を与えるのか、個々のケースで異なる。

実験的に求められた構造未知のタンパク質のX線溶液散乱強度と理論散乱強度を比較し、もっともよく一致した理論散乱強度分布を与えるタンパク質の立体構造を構造未知のタンパク質の立体構造と予測する。

理論散乱関数の問題

構造既知のタンパク質の理論散乱関数を計算するときにも問題があって、その取扱いたいへんむずかしい。タンパク質のように溶媒中に存在して溶媒分子（水）と水和して存在しているケースに適用するには、真空中とは異なる溶媒効果を考慮しなければならぬ。このような溶媒効果には背景効果と溶媒和効果があり、背景効果についてはそれを考慮した理論的な取扱いが可能であるが、溶媒和効果については、それぞれのタンパク質によって溶媒和効果が異なったり、分子表面に固定されている水分子に関する構造情報が乏しいこともあって、適切な取扱いができないのが現状である。

タンパク質分子表面に固定されている水分子に関する構造情報

↓

中性子結晶解析や超高分解能のX線結晶解析

2.3 Solution structure based on crystal structure and solution scattering measurements A.A.Timchenko, Institute of Protein Research RAS, Russia

X-ray analysis gives much structural information about the object under study. This information concerns the structure of macromolecules in crystal. The question arises about the correspondence of solution and crystal structures. The procedure for the calculation of solution structure of particle on the basis of its known atomic coordinates has been developed. It is based on the detailed description of particle molecular surface by small cubes (0.3Å in size) with the subsequent calculation of solution scattering pattern averaged over all particle orientations. This approach has been applied for a set of enzymes such as ribonuclease A, alcohol dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and some others. It has been found that for ribonuclease A and alcohol dehydrogenase the crystal and solution structures are close each other. At the same time for phosphoglycerate kinase and some other proteins there was a discrepancy between a solution and crystal structures. Changing the position of blocks (domains, subunits) the most plausible solution structure has been found which scattering pattern is close to the experimental one. The resolution power of such approach has been evaluated.

The procedure for the calculation of solution structure of particle on the basis of its known atomic coordinates has been developed. It is based on the detailed description of particle molecular surface by small cubes (0.3Å in size) with the subsequent calculation of solution scattering pattern averaged over all particle orientations. This approach has been applied for a set of enzymes such as ribonuclease A, alcohol dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and some others. In Fig.1 the calculated scattering patterns for ribonuclease A and its complex with 2'-CMP are presented. One can see noticeable difference in the scattering curves. Fig.2 and Fig.3 demonstrate the good coincidence of the calculated scattering patterns with experimental ones both for free ribonuclease A and its complex with inhibitor. In other words, the solution structure of ribonuclease A is close to that in crystal.

The analogous behavior is for horse alcohol dehydrogenase as one can seen from Fig.4. Model calculations show that domains/subunits closing- unclosing can be excluded whereas the sliding motion of blocks can not be excluded. Moreover, upon the formation of NADH-DMSO LADH complex the sliding rotation of domains occurs in crystal but the diffuse scattering curve is not sensitive to such type of motions.

Another example is the phosphoglycerate kinase (PGK). There is noticeable

difference in the calculated and experimental scattering patterns as one can see from Fig. 5. In contrast to ribonuclease A, PGK represents the two well-distinct domains (see Fig. 6) which can easily move each to other. Such modifications of PGK structure have been done and the scattering pattern from the modified structure is presented in Fig. 5. One can see good coincidence of the calculated and experimental scattering curves. The made structural changes are shown in Fig. 6. The value of rotation angle for sliding motion (the axis 1 in Fig.6) was about 20° and that for locking (the axis 2 in Fig.6) was about 25° .

The above examples demonstrate the possibility of the developed procedure to obtain more detailed information about structural rearrangements in proteins occurring upon crystal- solution transition and upon ligand binding. At the same time the made calculations show the limits of resolution of diffuse X-ray scattering method indicating high sensitivity to locking motions and low one to sliding movements.

Legends to Figures.

Fig.1 Comparison of the theoretical scattering curves for ribonuclease S (----) and its complex with 2'-CMP (- - -).

Fig.2 Comparison of the theoretical scattering curve (----) with the experimental one for ribonuclease (. . .). ΔI is a scattering intensity extrapolated to zero concentration (impulses per second) calculated per macromolecule.

Fig.3 Comparison of the theoretical scattering curve (----) with the experimental one for ribonuclease- 2'-CMP complex (. . .).

Fig.4 Comparison of the experimental curve (o o o) of apo-LADH ($c=14.9$ mg/ml) with the scattering curves calculated for crystal structure of apo-LADH (----) and for structures different from the crystal one by the rotation of the catalytic domain (in both subunits) by 6° (- - -) and by 15° (-.-.-) around the axis passing through $C\alpha$ atoms of residues 323 and 340 (unlocking). The calculated curves are smeared in accordance with the collimation system used.

Fig.5 Comparison of experimental scattering curves (o o o) for "free" yeast PGK (a) and PGK in the presence of PGA-ATP (b) with the curves calculated for the crystal structure (- - -) and for the structure differing from the crystal one (---) by the "sliding" (a) and the "locking" (b) of domains (see text). The calculated curves are "smoothed" according to the real geometry of our experimental equipment.

Fig.6 Schematic drawing of the crystal structure of yeast PGK (Watson et al., 1982). Letters and figures enumerate β -strands and α -helices, correspondingly. The "hinge

point” and the axes 1 and 2 rotation about which leads to a good coincidence between the calculated and experimental scattering curves for the “free” PGK (1) and for the ternary complex (2) are shown. The directions of rotation are indicated by round arrows.

April 1978

FEBS LETTERS

Volume 88, number 1

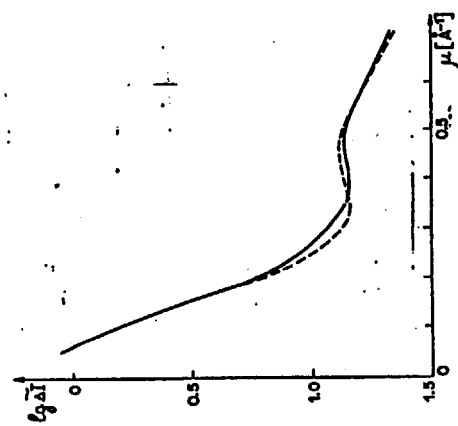


Fig. 1. Comparison of the theoretical scattering curves for ribonuclease S (—) and its complex with 2'-CMP (---).

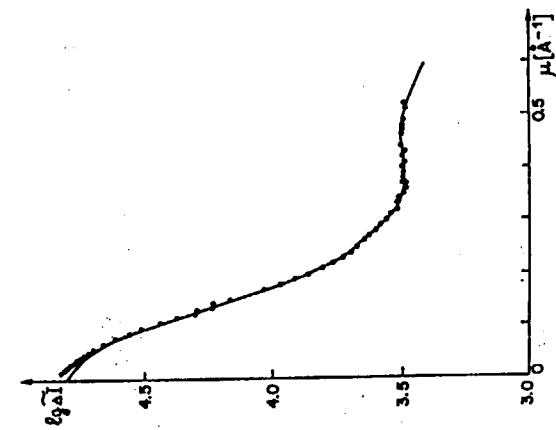


Fig. 2. Comparison of the theoretical scattering curves (—) with the experimental one for ribonuclease (···). ΔI is a scattering intensity extrapolated to zero concentration (impulses per second) calculated per macromolecule.

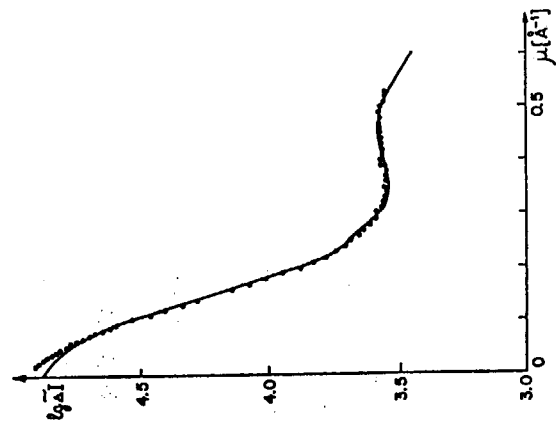


Fig. 3. Comparison of the theoretical scattering curve (—) with the experimental one for ribonuclease-2'-CMP complex (···).

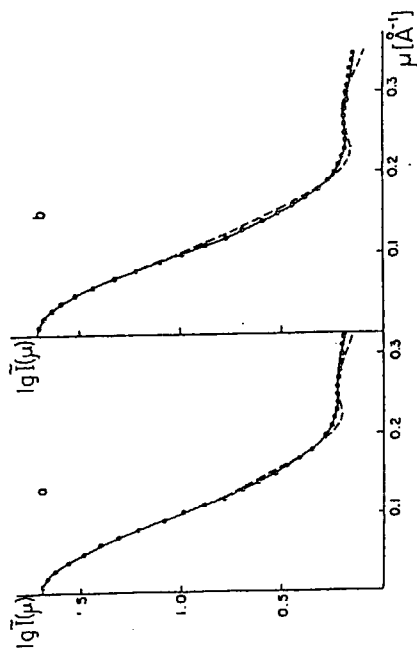


Fig.5 1. Comparison of experimental scattering curves (o o o) for "free" yeast PKG (a) and PKG in the presence of PGA+ATP (b) with the curves calculated for the crystal structure (—) and for the structure differing from the crystal one (---) by the "sliding" (a) and the "locking" (b) of domains (see text). The calculated curves are "smoothed" according to the real geometry of our experimental equipment.

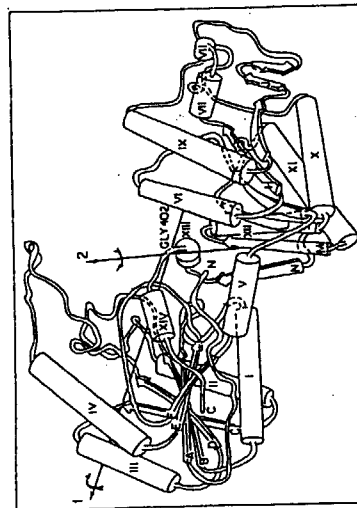


Fig.6 . Schematic drawing of the crystal structure of yeast PKG (Watson *et al.*, 1982). Letters and figures enumerate β -strands and α -helices, correspondingly. The "hinge point" and the axes 1 and 2 rotation about which leads to a good coincidence between the calculated and experimental scattering curves for the "free" PKG (1) and for the ternary complex (2) are shown. The directions of rotation are indicated by round arrows.

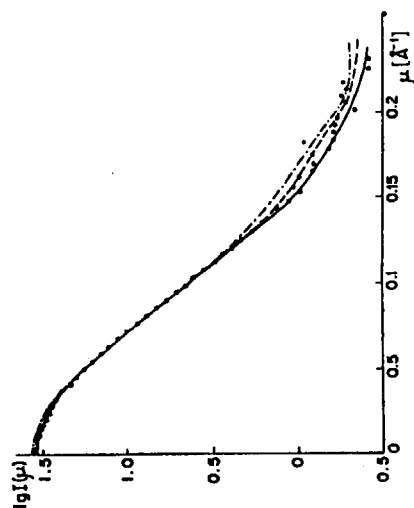


Fig.4. Comparison of the experimental curve (—) of apo-LADH ($c = 14.9 \text{ mg/mL}$) with the scattering curves calculated for crystal structure of apo-LADH (---) and for structures differing from the crystal one by the rotation of the catalytic domain (in both subunits) by 6° (.....) and by 15° (-.-.-). The calculated curves are measured in accordance with the collimation system used.

3. 溶液散乱で捉える構造変化 3.1 -non-native 構造

奈良先端科学技術大学院大学 片岡幹雄

蛋白質は、20種類のアミノ酸が重合してできた高分子であり、アミノ酸配列順序は遺伝情報に規定されている。100個のアミノ酸からなるポリペプチドを考えよう。異なる配列の可能性は、 $20^{100} \approx 10^{130}$ 個もある。今、全地球に存在する生物種は 10^8 とも 10^{10} ともいわれている。一種類の生物がその一生に精算する蛋白質の種類は、大腸菌などの下等生物で 10^3 、ヒトでは 10^5 といわれている。これらの数の最大値をとっても、全地球に存在している蛋白質の種類は 10^{15} 程度であることになる。したがって、生命の誕生時に、原始地球に存在していたアミノ酸がランダムに重合してポリペプチドができとしても、それが蛋白質となる確率はほとんど0なのである。すなわち、まず考えるべき問題は、どの配列が蛋白質になるのかということである。これは、人工蛋白質の設計にあたっては避けて通ることのできない問題である。

次に、100個のアミノ酸から、蛋白質になるポリペプチドができたとしよう。一つのアミノ酸あたりとりうる配置が3個あるとする。実際には、ある領域の配座をとりうるため、3個という仮定は少ない極限である。こうすると、とりうる構造の数は $3^{100} \approx 10^{45}$ にもなる。正しい構造は一つである。正しい構造にたどり着くまでに、全ての構造を調べるとして、構造間の転移時間を 10^{-12} 秒とする。実際には、こんなに早く構造転移は起きない。この状態では、任意の構造から出発して正しい構造にたどり着く時間は、 $10^{45} \times 10^{-12} = 10^{33}$ 秒である。これは、生命が誕生してから現在までの時間、40億年(10^{10} 秒)をはるかに越える。すなわち、構造をランダムにサーチしては正しい構造に折りたたまれる確率はほとんどないことを意味する。しかし、生体内で生合成されたポリペプチドは数ミリ秒から秒のオーダーで正しい構造に折りたたまれる。

これをLevinthalのパラドックスという。蛋白質が正しい構造に折りたたまれるために必要な情報は、アミノ酸配列(と溶媒との相互作用)だけである。したがって、蛋白質折り畳みは興味深い物理の問題である。さらに、ゲノムプロジェクトの進展により機能、構造とも未知の蛋白質の一次構造が続々と明らかにされている。これらの機能や構造を確実に予測するためには、アミノ酸配列がどのように立体構造を規定するのかを理解しなければならない。

これらの問題を理解するためには、現存の蛋白質の折りたたまれた状態の構造を明らかにするだけでは不十分である。蛋白質折り畳みにおいて、折り畳み

中間体の構造を調べる必要がある。また、遺伝子操作技術を用いて、アミノ酸配列に摂動を加えることも容易に行えるようになってきた。人工的に作ったポリペプチドの構造情報を得ることで、どの配列が蛋白質になるかという問題についてもアプローチが可能になってきたのである。折り畳み中間体や折り畳みの始状態（非天然状態）は、正しく折りたたまれた状態（天然状態）とは異なり、多数の構造のアンサンブルであり、結晶化が望めない。そのため、詳細な構造情報を得ることが困難であった。非天然状態の構造情報を得るために、シンクロトロン放射光を用いた X 線溶液散乱が非常に有効であることを、筆者らは始めて示した。その後、非天然状態は、折り畳みなどの蛋白質物理化学にとってのみならず、病理にも関係しており、生理的に重要な意味を持っていることがわかってきた。X 線溶液散乱は、サイズ、形状など他の手段では得難い構造情報を与えるのみならず、二次構造のパッキングの様相なども与えることができる。

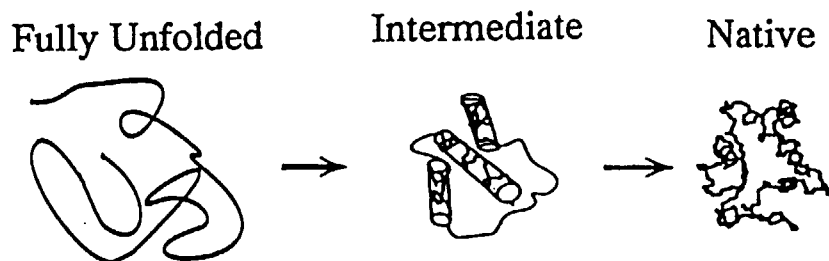
非天然状態は、モルテングロビュールに代表されるコンパクトな折り畳み中間体と高度に変性したいわば折り畳みの始状態に分類することができる。X 線溶液散乱はそれぞれの状態の構造的特徴を半定量的に記述することが可能である。講演では我々の明らかにした折り畳み中間体の構造の多様性や、フランスのグループによる高度に変性した状態の中性子溶液散乱による分子モデル構築について紹介し、低分解能構造解析手段である溶液散乱の有効性を示す。

蛋白質の non-native 構造

片岡幹雄

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

Protein Folding



Paper Folding (Origami)

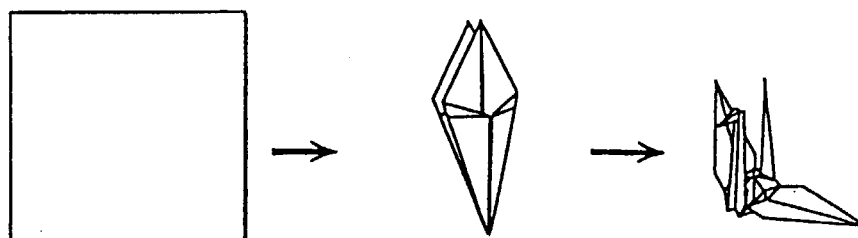
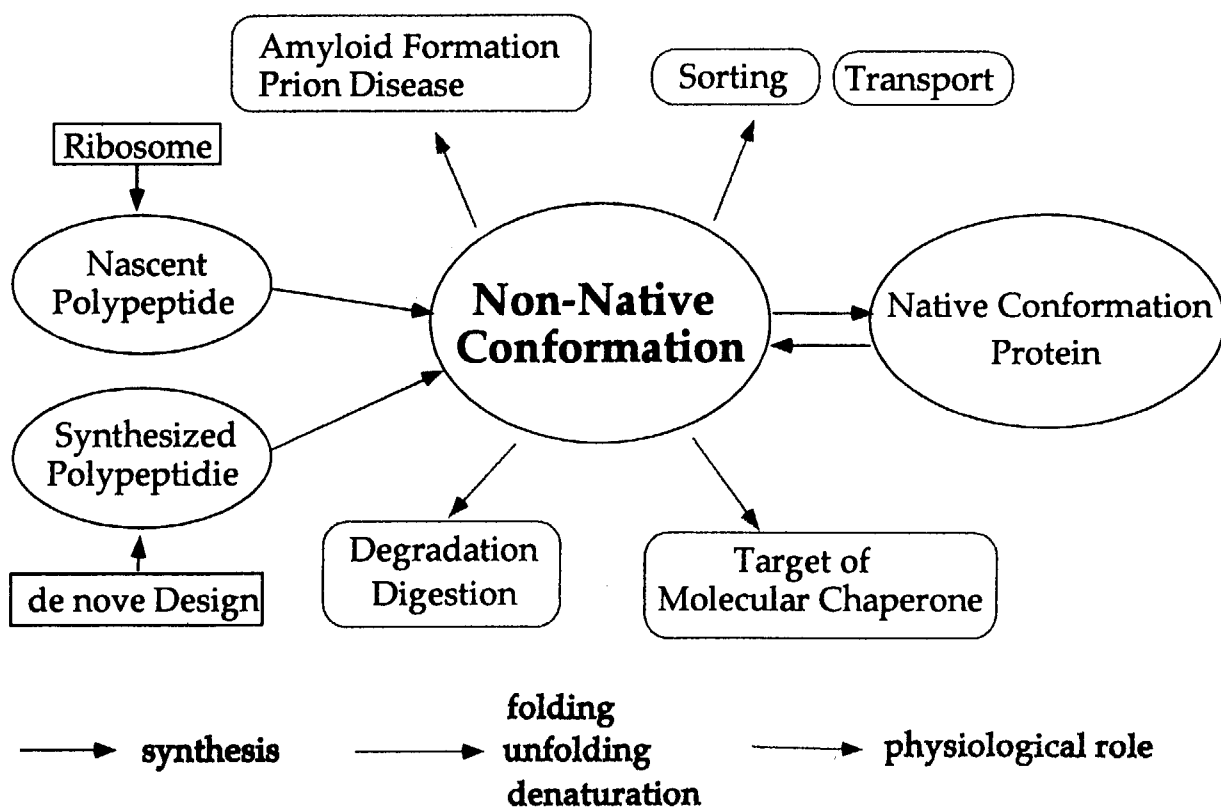


図 2. 蛋白質の折れたたみ反応と折り紙



タンパク質の折れ量みの程度を表現する性質

	N 状態	M G 状態	U 状態	測定方法
二次構造	+	+	-	C D
三次構造	+	-	-	N M R、C D X 線散乱
局所構造	+	+ / -	-	N M R、蛍光
分子サイズ	コンパクト	コンパクト	膨潤	ゲル濾過、粘度、動的散乱 X 線散乱
形状	球状	球状	鎖状	X 線散乱

NON-NATIVE CONFORMATION OF PROTEINS

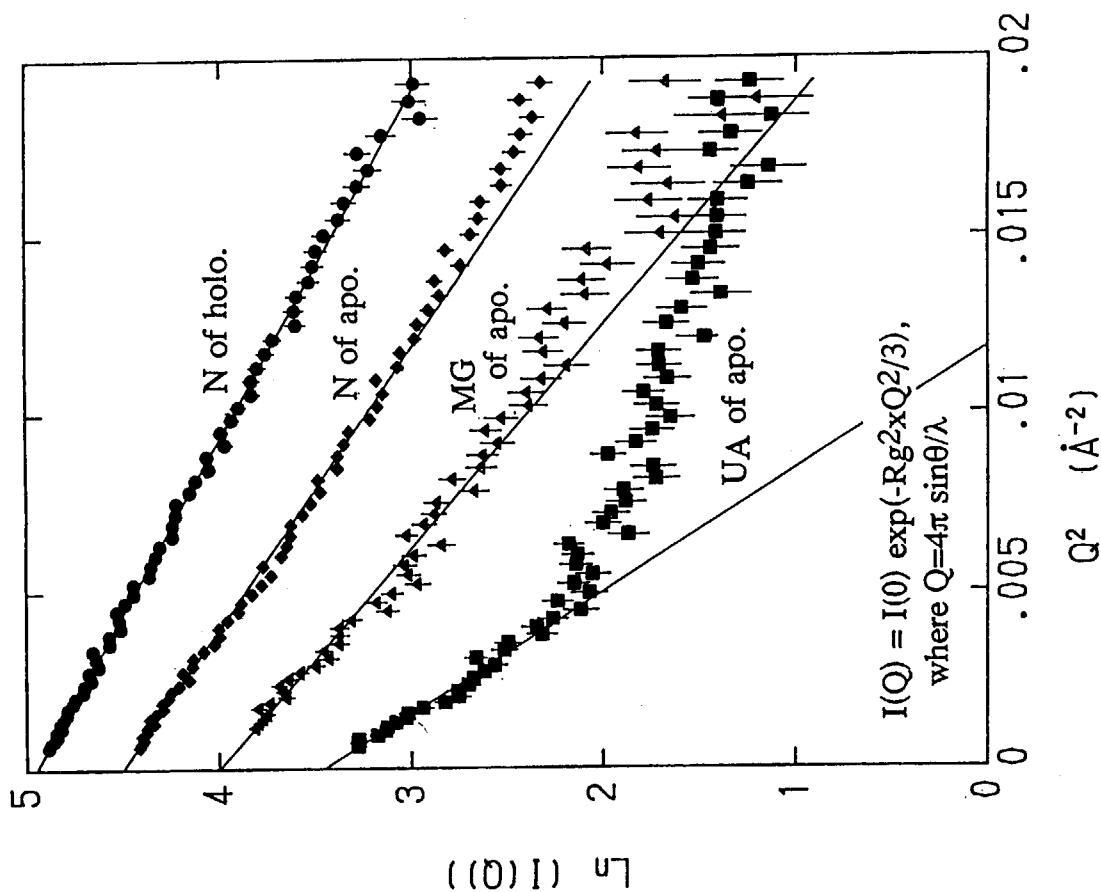
I. Molten Globule State (or Compact Denatured State)

1. Cytochrome c
pH 2, 0.5M NaCl
pH 2, Acetylation
2. Apomyoglobin
pH 2, 20mM NaTCA
3. Staphylococcal Nuclease
fragment (Δ 137-149) (pH 7)
4. α -Lactalbumin
Apo-protein (pH 8, 20°C)
Acid-MG (pH 2)

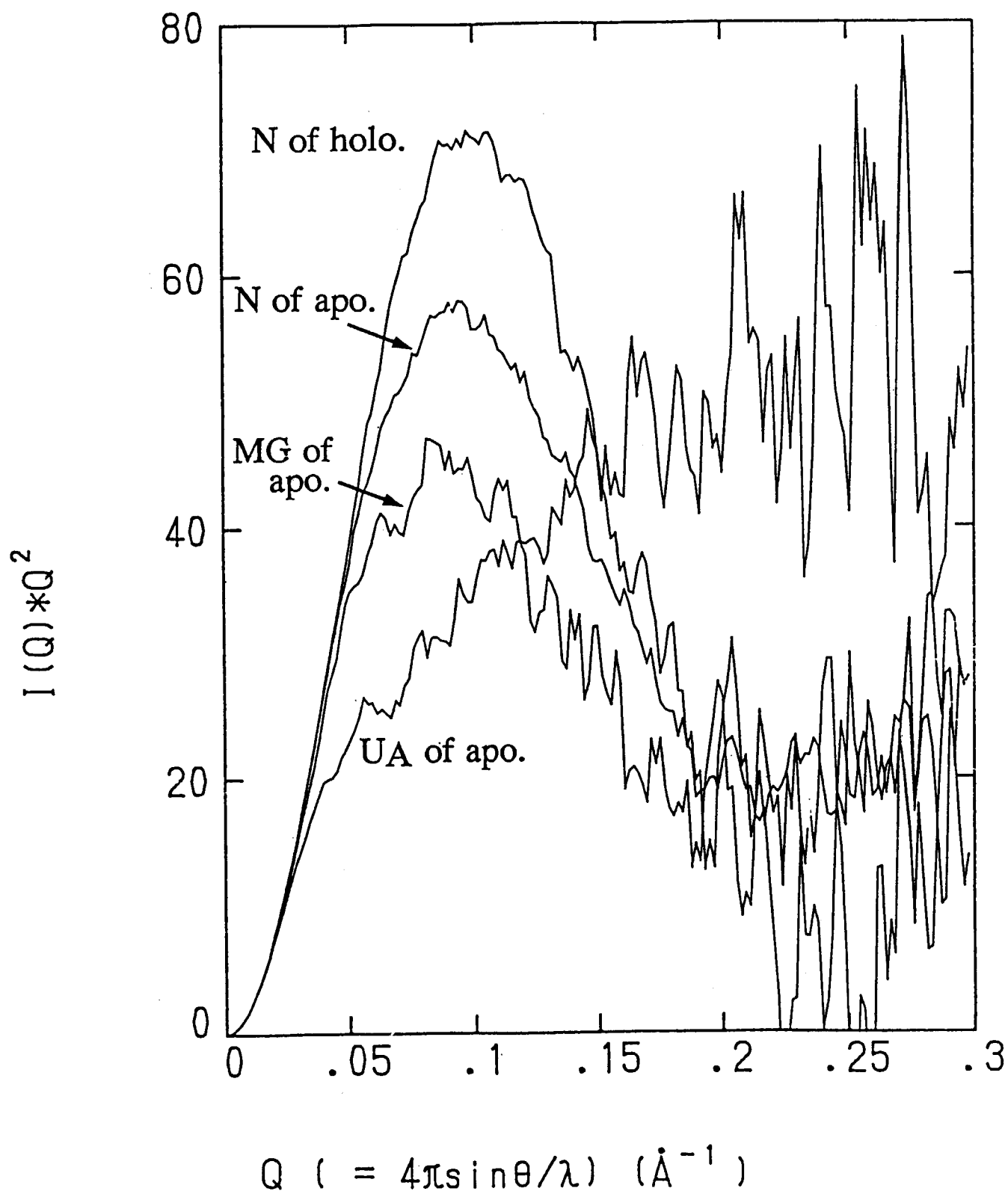
II. Unfolded State (or Highly Denatured State)

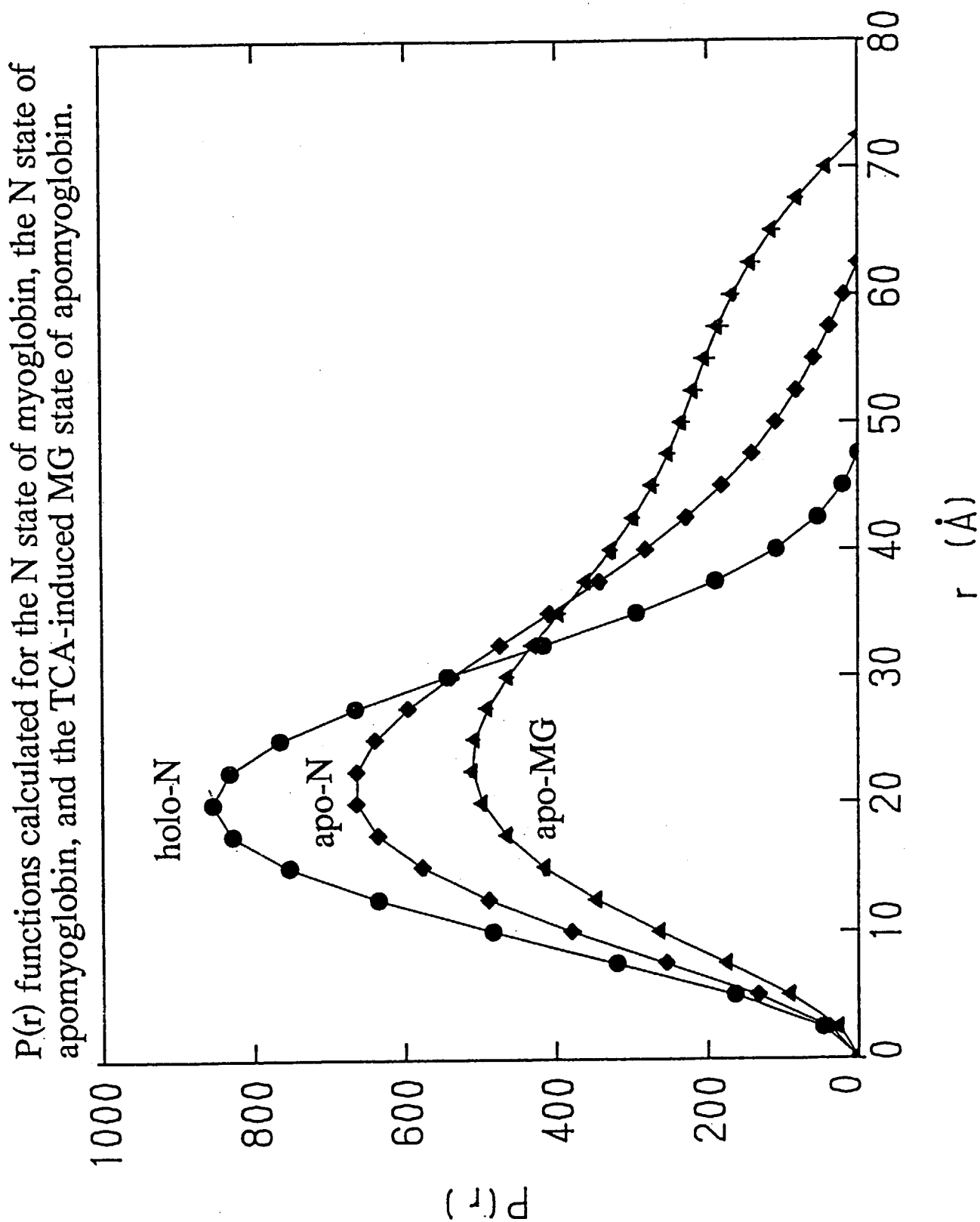
Acid-denatured State
Denaturant-denatured State

Guinier plots of the various conformational states of horse myoglobin and apomyoglobin at 20°C.
 holo-N (pH 7), $R_g = 17.5\text{\AA}$; apo-N (pH 7), $R_g = 20.1\text{\AA}$;
 apo-MG (pH 2, 20 mM NaTCA), $R_g = 22.2\text{\AA}$;
 apo-UA (pH 2, no salt), $R_g = 29.7\text{\AA}$.

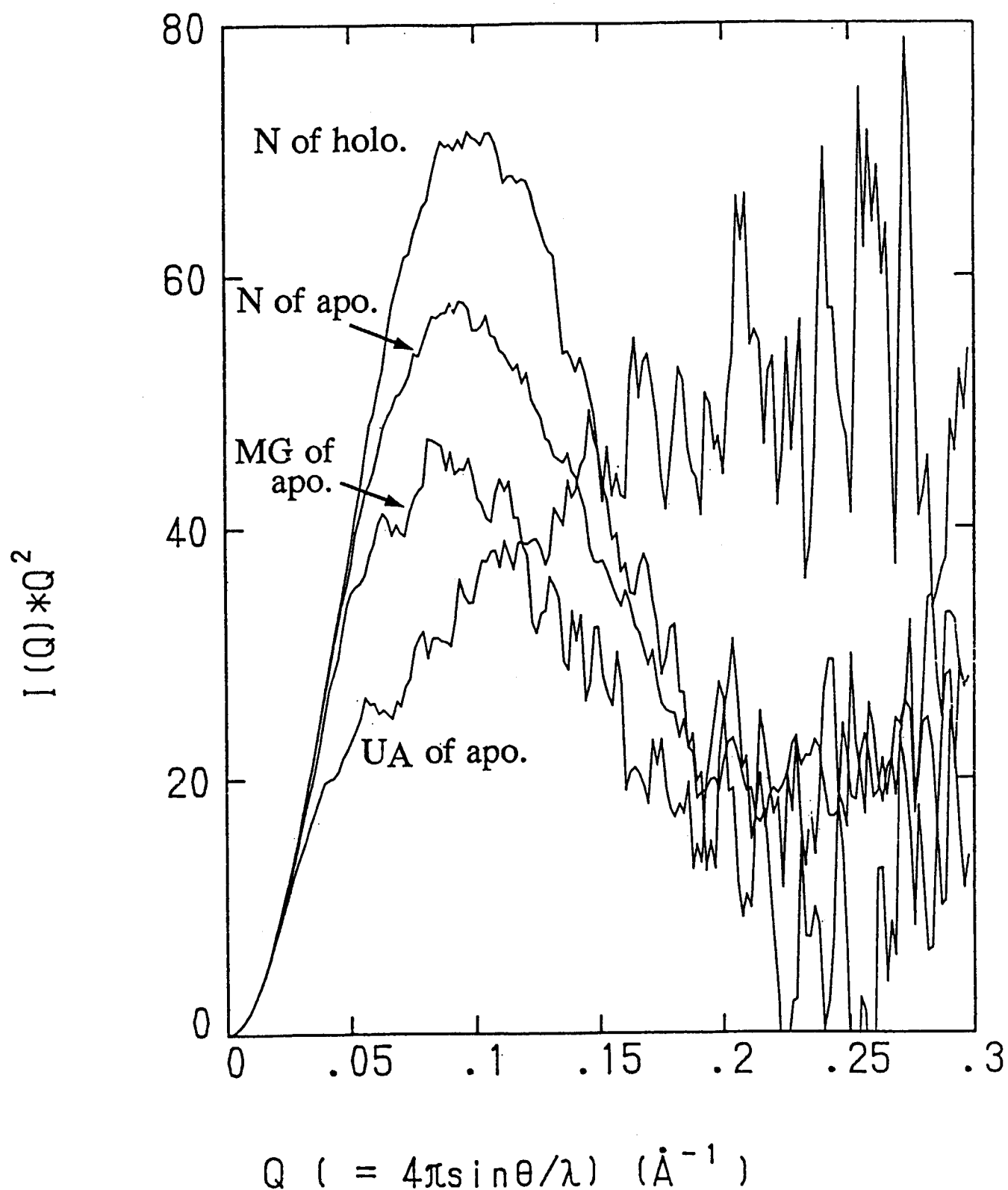


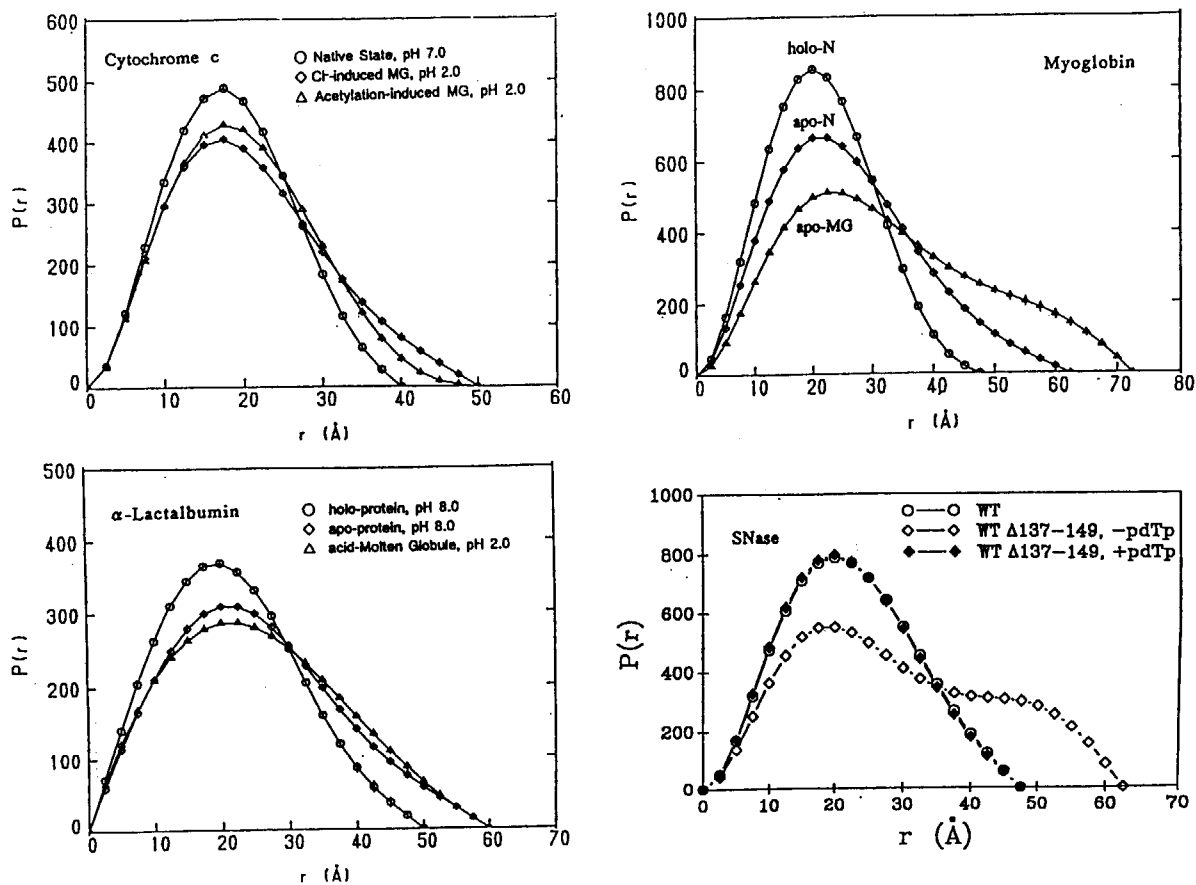
Kratky plots of the various conformational states of horse myoglobin and apomyoglobin at 20°C.



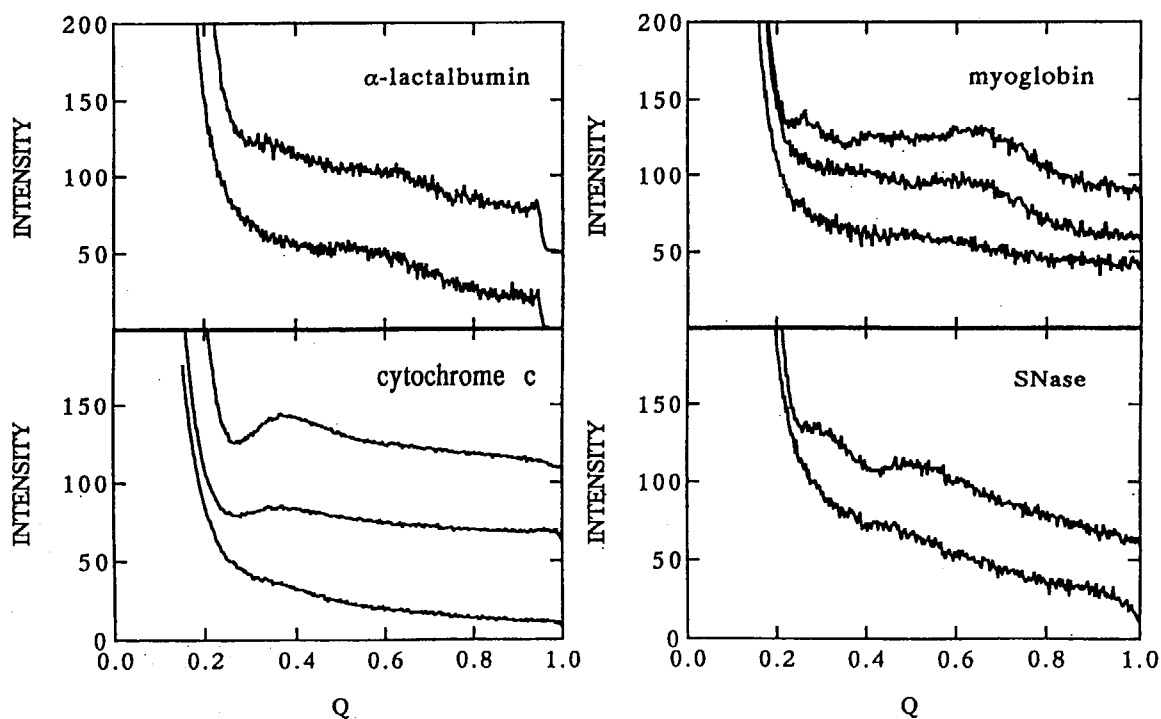


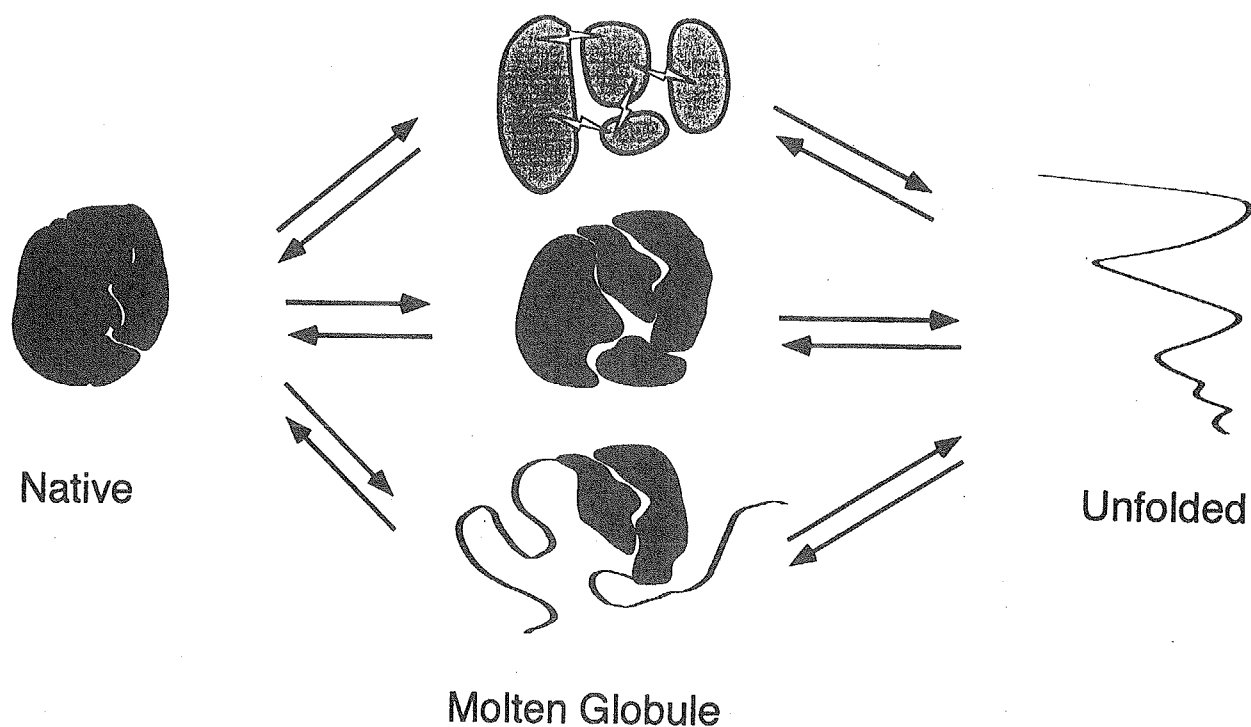
Kratky plots of the various conformational states of horse myoglobin and apomyoglobin at 20°C.



Comparison of $P(r)$ 

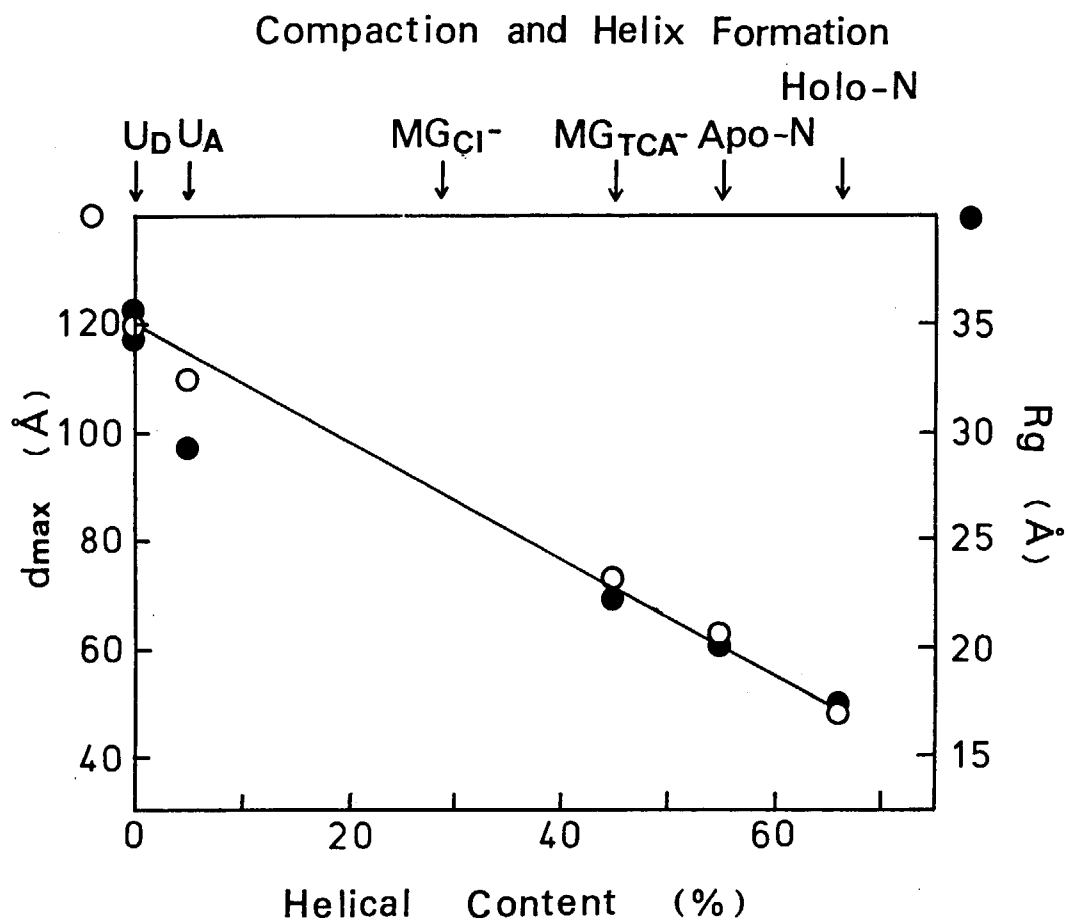
COMPARISON OF HIGH-ANGLE SCATTERING



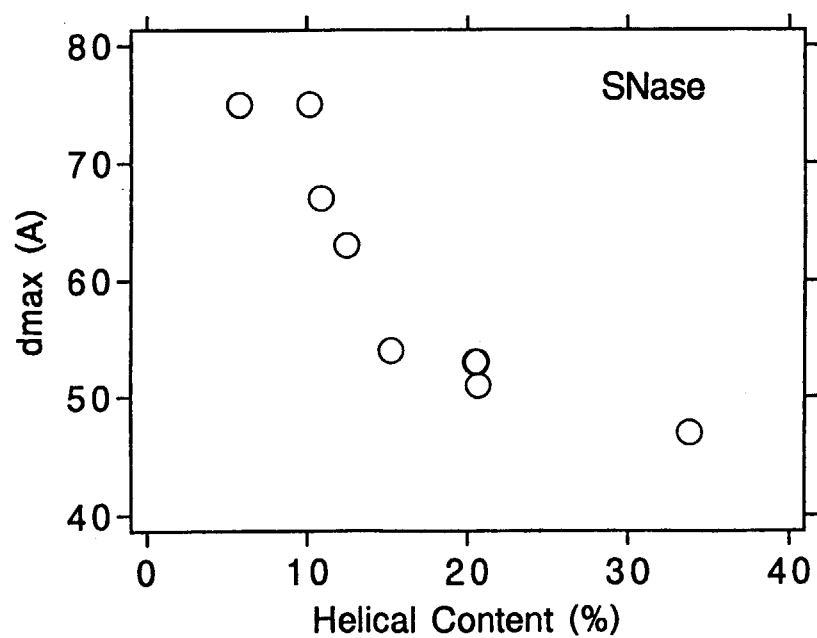


Comparison of R_g among the native, molten globule and unfolded states

Proteins	R_g (Å)			$\frac{\Delta R_g(MG-N)}{R_g(N)}$ (%)
	N	MG	U	
Cytochrome c	13.5	17.4 (NaCl) 17.0 (Acet.)	24.2 (Acid) 32.4 (Den.)	25.9-28.8
Holomyoglobin	17.5			14.9 (Holo-Apo)
Apomyoglobin	20.1	22.2	30.2 (Acid) 34.2-35.8 (Den.)	10.4 26.9 (Holo-MG)
α -lactalbumin	15.7	17.5 (Apo) 17.9 (Acid)		11.5-14.0
SNase	16.2	21.2 (Δ 137-149)	$\sim$ 33 (Den.)	30.8



Relationship between Compaction and Helix Formation



蛋白質の非天然構造をめぐる諸問題

I. MG状態 或いは コンパクトな変性状態

1. サイズ

Ptitsin の主張 Native $\approx$ MG (Rgの増加は10%以下)

我々の結果 Native < MG (Rg $\approx$ 25~30% 増加)

	Native		MG
SNase	16.2	17.6	21.2 ~30%
Myoglobin	17.5	20.1	22.2 ~27%
Cytochrome c	13.5		17.0 17.4 25% 29%

2. 形状

bilobic to Per)

SNase, Myoglobin
RNase A (Sosnik & Trewhella)

3. 三次構造 (熱変性の協同性と関係?)

高角領域の微細構造

++ SNase (m⁺), Cytochrome C (NaCl)
+ Myoglobin, Cytochrome C (7E7u)
— SNase

II. Unfold 状態 或いは 高度な変性状態

ランダムコイルと一括できない。

mutation の影響を受ける。

多様性のある 球状構造。

詳細な構造の記述は可能か?

3.2 Solution structure of GroEL, GroES and their complexes

A.A.Timchenko, Institute of Protein Research RAS, Russia

The scattering patterns for chaperonin GroEL, co-chaperonin GroES and complexes of GroEL with ADP, ATP and ADP+GroES have been measured in the range of scattering vector values 0.01-0.15 Å⁻¹. It has been found the essential difference between experimental scattering curves and the calculated ones on the basis of the known atomic coordinates of GroEL and GroES by cube method. It was shown that the GroES structure in solution differs from that in crystal by the ring orifice increase and the tilting of subunits. For GroEL structural changes are more dramatic and complicated including both subunit movements and domain rotations. The binding of ADP does not change the GroEL structure whereas ATP makes noticeable structural changes. The binding of GroES to GroEL essentially changes the structure of GroEL.

The developed cube method for the calculation of solution scattering pattern of macromolecule from its atomic coordinates has been applied for chaperonin proteins. It was shown the essential difference in the calculated and experimental scattering patterns as one can see in Fig. 1 and Fig. 5. To elucidate the structural changes in chaperonins upon crystal- solution transition the possible rotations of large blocks have been made. The possible changes are shown in Fig.2 both for GroEL and GroES. As a result the good coincidence of scattering patterns have been obtained (see Fig.1 and Fig.5). The structures having good coinciding scattering patterns with the experimental ones are shown in Fig.3 for GroES and in Fig.4 for GroEL. The solution structure of GroEL-GroES complex is under study. In all cases one can see that the dramatic large-scale structural changes occur supporting the thought about potential flexibility of chaperonins.

Legends to Figures

Fig.1 The SAXS patterns of the GroES oligomeric particle. Open circles are for crystal structure. Others are for modified structures.

Fig2. Schematic representation of the GroEL and GroES crystal structure modifications.

Fig.3 The GroES original crystal structure and the GroES crystal structure modified by the moving all protein subunits out of the ring center to achieve the experimental R_g value and 15° X-turn, 25° Z-turn of each subunit

Fig.4 The GroEL original crystal structure (A,B) and the GroEL crystal structure with main modifications: turning of subunits and domains (C,D).

Fig.5 The SAXS patterns of the GroEL oligomeric particle. Open circles are for crystal structure. Others are for modified structures.

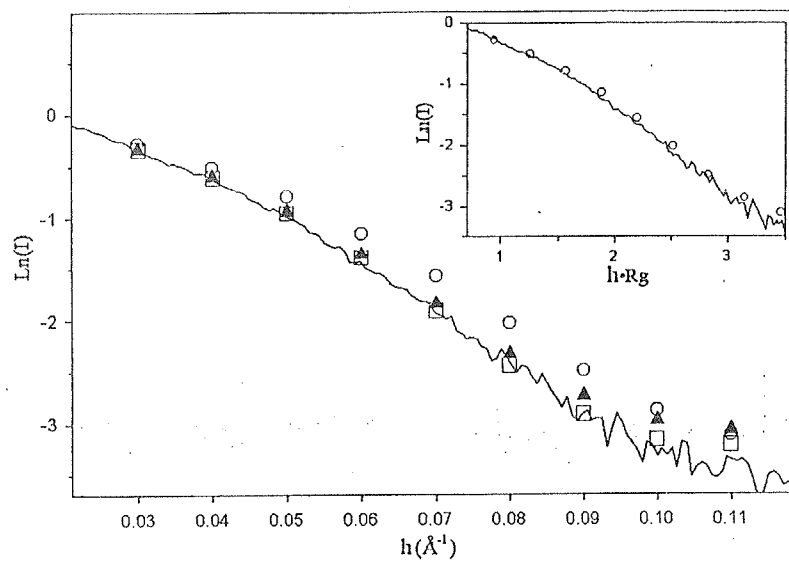


Figure1

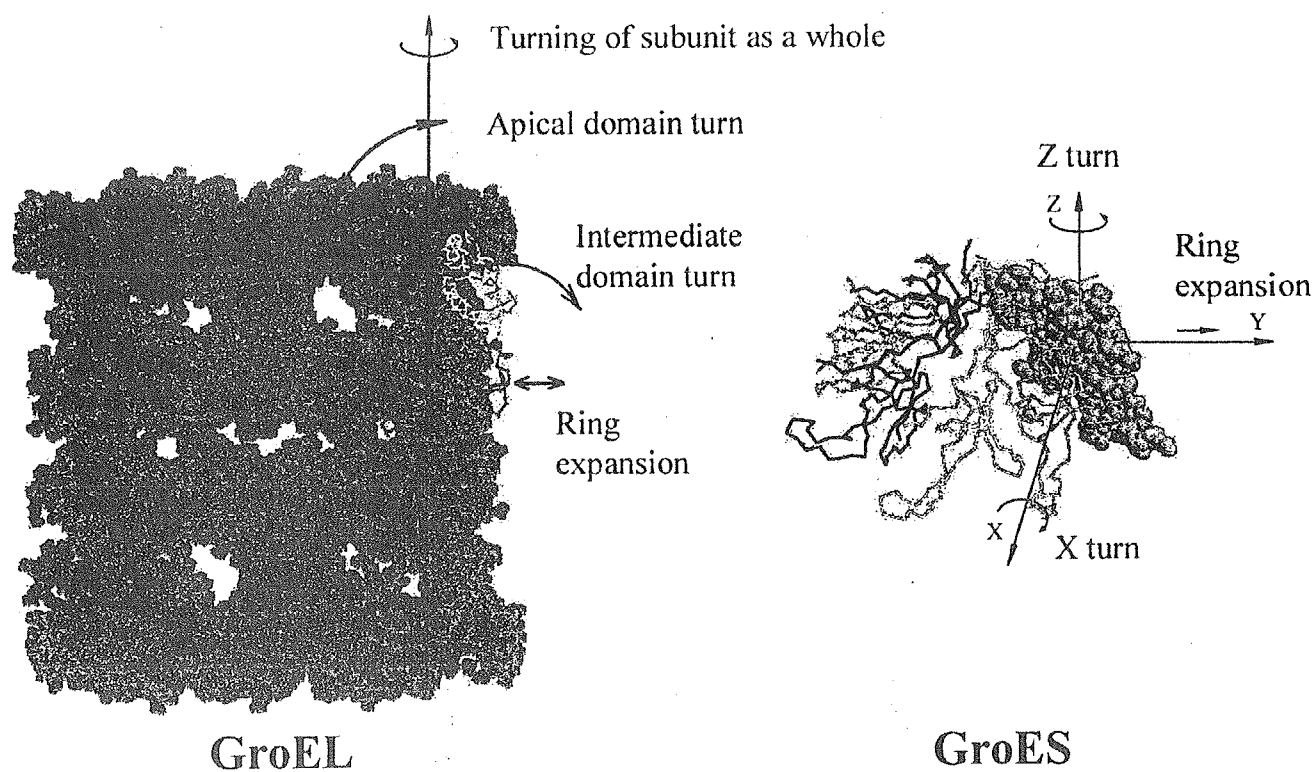


Figure 2. Schematic representation of the GroEL and GroES crystal structure modifications.

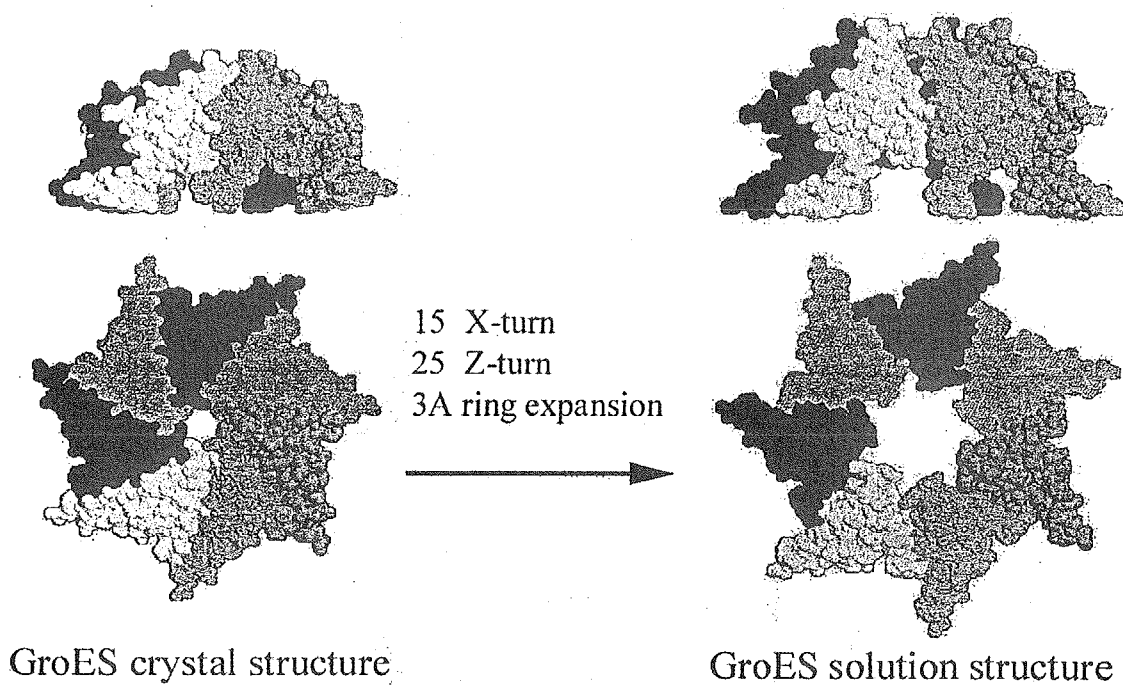


Figure 3. The GroES original crystal structure and the GroES crystal structure modified by the moving all protein subunits out of the ring center to achieve the experimental Rg value and 15° X-turn, 25° Z-turn of each subunit.

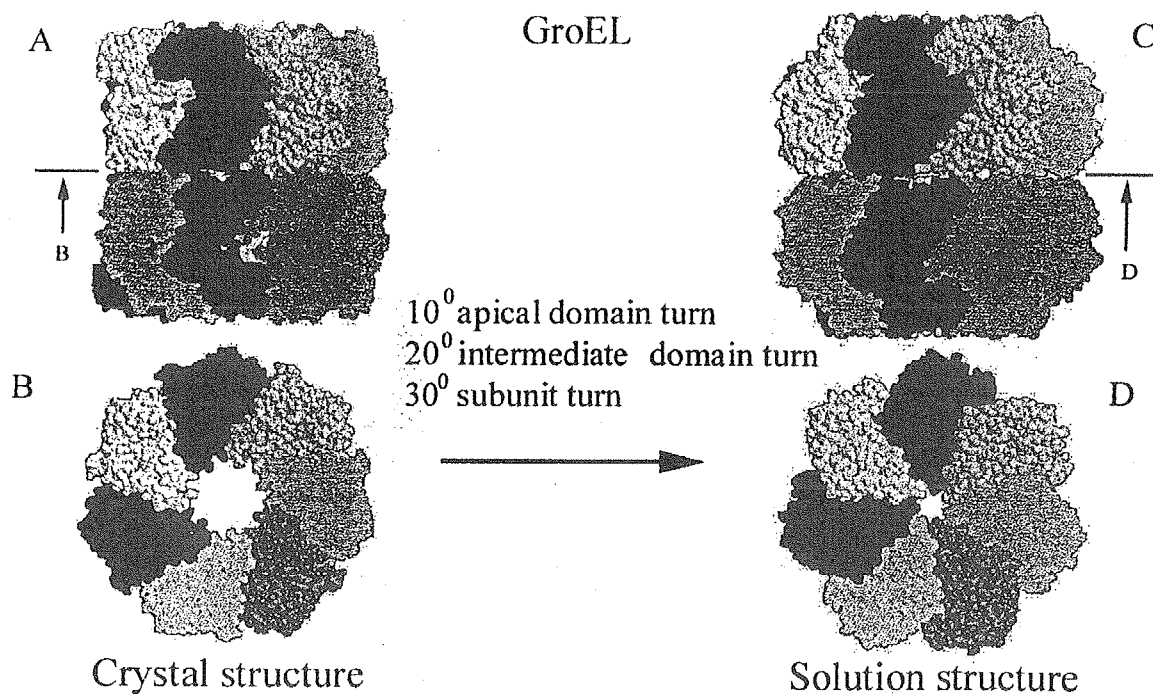


Figure 4. The GroEL original crystal structure (A, B) and the GroEL crystal structure with main modifications: turning of subunits and domains (C, D).

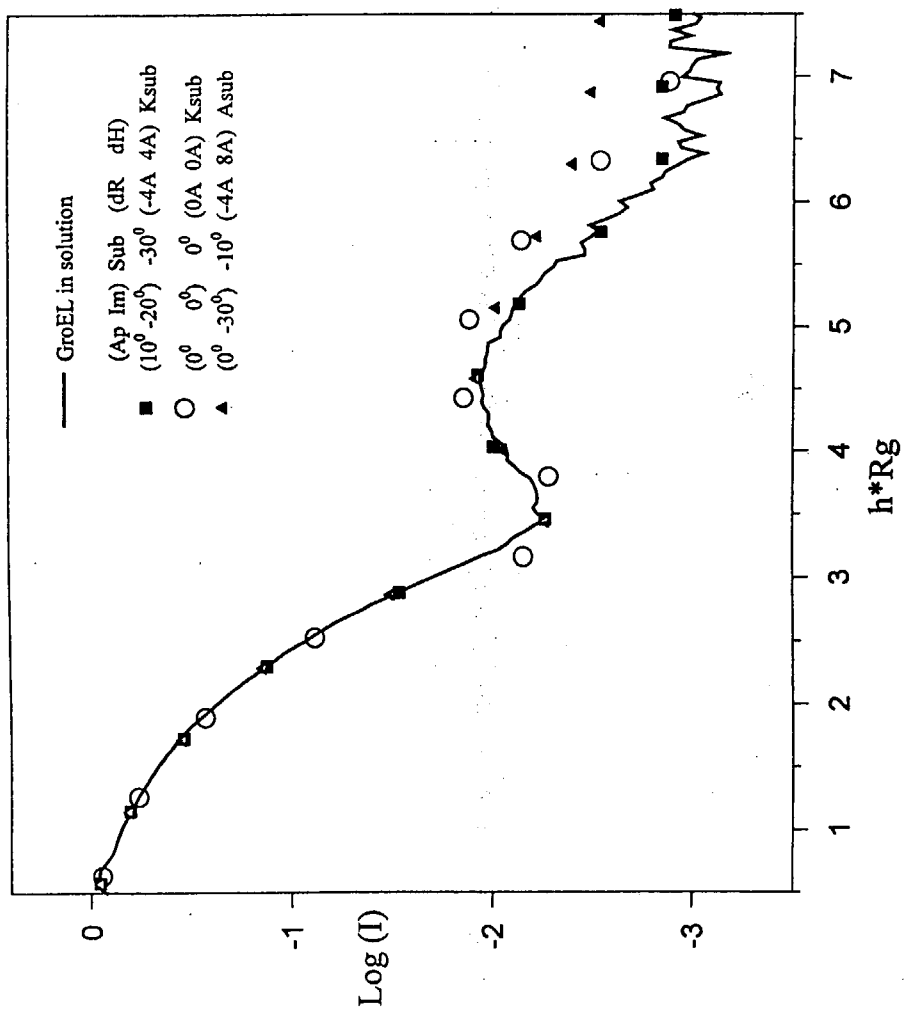


Fig. 5

3.3 タンパク質のフォールディング中間体の構造

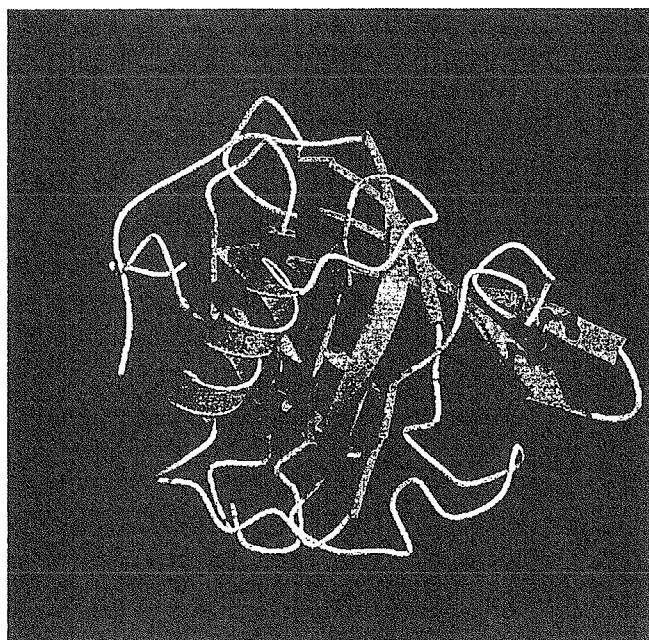
東京大学・大学院理学系研究科・物理学専攻 新井宗仁

タンパク質の構造形成機構の解明は、現代の生物物理学における最重要課題の一つである。一般に、タンパク質は巻き戻り反応の初期に巻き戻り中間体を形成することが知られており、この中間体を検出し特徴づけることによってタンパク質の構造形成機構が明らかになると期待されている。現在までに、この中間体は二次構造を持つが三次構造は壊れたモルデン・グロビュール (MG) 様の状態であることがわかっているが、中間体の分子サイズや形状がどのようなものか明らかでなかった。一方、MG 状態はコンパクトな状態であると特徴づけられており、タンパク質フォールディングの普遍的な中間体であると考えられている。したがって、巻き戻り中間体が MG 状態であるかどうかを明らかとするためには、中間体の分子サイズと形状を特徴づけることが必要である。そこで我々は、巻き戻り初期に形成される中間体のグローバルな構造を明らかにすることを目的として、シンクロトロン放射光を用いたストップフロー X 線散乱法により、タンパク質の巻き戻り反応の測定を行ってきた。X 線溶液散乱法は、原理的にはすべてのタンパク質に適用でき、溶液中での動的な形状変化を直接的に観測できるという点で非常に優れた測定法である。しかし、1 次元 PSPC を用いた X 線溶液散乱の時分割測定では S/N 比が悪いため、シンクロトロン放射光を用いてもミリ秒のタイムスケールで慣性半径の時間変化を求めることは困難であった。そこで我々は、コンパクトさを表す経験的なパラメータとして、(ある限られた領域の) 積分散乱強度を用いることにより、タンパク質の巻き戻り反応の測定を行った。その結果、 β -ラクトグロブリン (β LG) の巻き戻り反応開始後 30 ms 以内に、積分散乱強度にして 70% の変化が起きており、 β LG は巻き戻り初期にコンパクトな中間体を形成することが明らかになった [1]。さらに、100 ms 以内の散乱曲線を平均した散乱曲線の Guinier plot と Kratky plot から、 β LG は巻き戻り反応開始後 100 ms 以内に、天然状態の 1.1 倍程度の慣性半径しか持たない、コンパクトで球状な構造を形成していることが明らかになった。しかし、この測定法では数グラムのタンパク質が必要であり、様々なタンパク質の巻き戻り中間体の構造を調べることは困難であった。

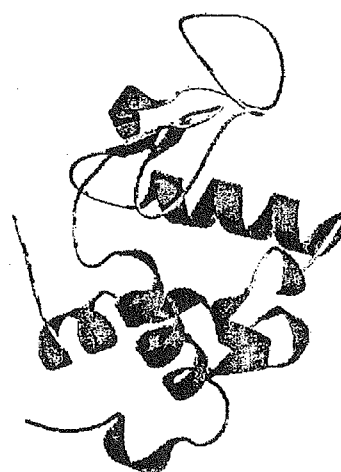
そこで我々は 2 次元 CCD 型 X 線検出器 [2] を用いた実験を開始し、データの S/N 比を向上させることを試みた。その結果、S/N 比を 100 倍以上も向上させることに成功した。また、検出器の画像歪みと感度不均一性に対する補正、及び X 線イメージインテンシファイヤーのコントラスト低下に対する補正を行ったのちに、この検出器で得られた散乱曲線を PSPC によるデータと比較したところ、小角から広角までの全領域にわたって良い一致が見られた。したがってこの方法により、タンパク質の分子サイズと形状を正確に求められることがわかった。そこで我々は、CCD 型 X 線検出器を利用して、 α -ラクトアルブミン (α -LA) の巻き戻り反応の測定を行った。 α -LA は平衡条件下で MG 状態を形成することが知られており、また、巻き戻り反応の初期に二次構造を持つが三次構造は壊れた MG 状態様の中間体を形成することがわかっている。しかし、この巻き戻り中間体の分子サイズと形状については、まだ明らかではなかった。実験においては、まず、コンパクトさを示す経験的なパラメータである積分散乱強度で反応過程を追跡し、この反応の速度定数が、以前にストップフロー円二色性スペクトル法で求めた速度定数と一致していることを示した。これにより、 α -LA の巻き戻りに伴うコンパクト化の過程を正しく測定していることが確かめられた。次に、巻き戻りに伴う慣性半径の時間変化を解析することにより、巻き戻り初期に形成される中間体の慣性半径は $17.4 \pm 0.3 \text{ \AA}$ であると見積もられた。この値は、平衡条件下で既に測定されている MG 状態の慣性半径 ($17.2 \pm 0.2 \text{ \AA}$) [3] と一致していた。さらに、巻き戻り中間体の Kratky plot は、MG 状態のものと同一であった。したがって、 α -LA の巻き戻り中間体の分子サイズと形状は MG 状態と同じであることがわかった。こうして、 α -LA はフォールディング反応の初期に MG 状態を形成することが裏付けられた。

1. Arai et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 275: 149-162.
2. Amemiya et al. (1995) *Rev. Sci. Instrum.* 66: 2290-2294.
3. Kataoka et al. (1997) *Protein Sci.* 6: 422-430.

タンパク質フォールディング 中間体の構造



β ラクトグロブリン



α ラクトアルブミン

東京大学 大学院理学系研究科
物理学専攻

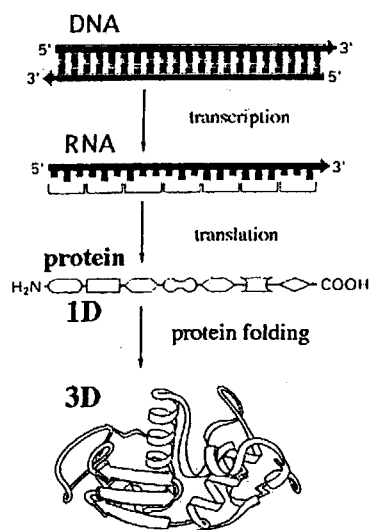
新井 宗仁

タンパク質のフォールディング機構

◎unfoldしたポリペプチド鎖が、
どのようなメカニズムで
天然構造を形成するのか？

◎遺伝情報発現の最終段階

ポストゲノム時代において重要



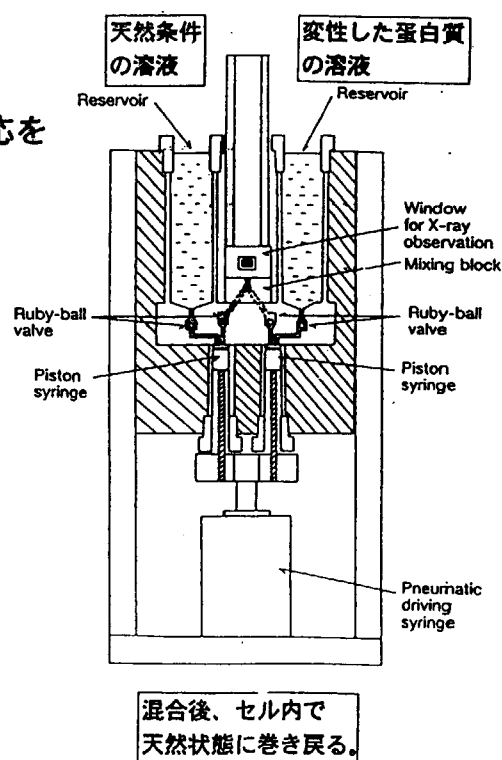
折りたたみ過程の追跡

◎ ストップフロー法を用いて、巻き戻り反応を
開始させ、反応の速度過程を測定する。

不感時間 (dead time) : 1 ~ 30 ms

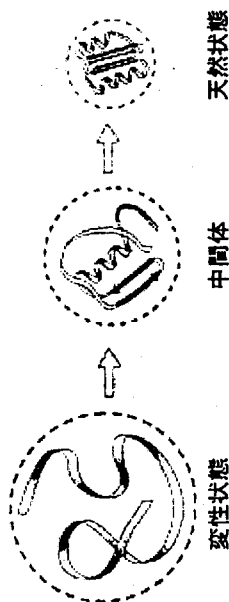
◎ 天然状態に特異的な性質をプローブ
として、折りたたみをモニターする。

- ・ 二次構造……遠紫外CD
- ・ 三次構造……近紫外CD、蛍光、吸収
- ・ 分子サイズ・形状……X線溶液散乱



Introduction

タンパク質のフォールディング反応



フォールディング中間体
(反応途中に過渡的に観測される)

- ・二次構造を持つが
- ・三次構造を持たない。
- ・分子サイズは？

モルテン・グロビュール状態
(平衡条件下で観測される)

- ・二次構造を持つが
- ・三次構造を持たない。
- ・分子サイズがコンパクトである。

フォールディング中間体がモルテン・グロビュールであるかどうかを明らかにするには、フォールディング中間体の分子サイズを測定することが必要。

シンクロトロン放射光を用いた
ストリプトフローX線溶液散乱法により、
これを明らかにすることが可能。

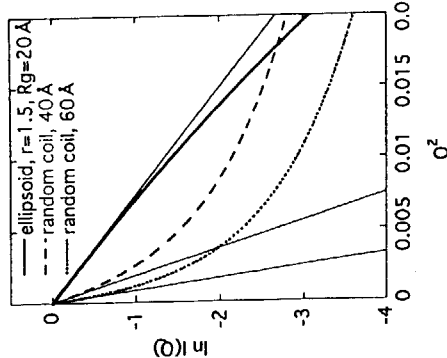
問題点：1 次元PSPC型検出器を使った時分割測定ではS/N比が低く、コンパクト化の過程の追跡は困難であった。

改善策：2 次元CCD型X線検出器を用いることにより、S/N比を飛躍的に向上させることができる。

X線溶液散乱

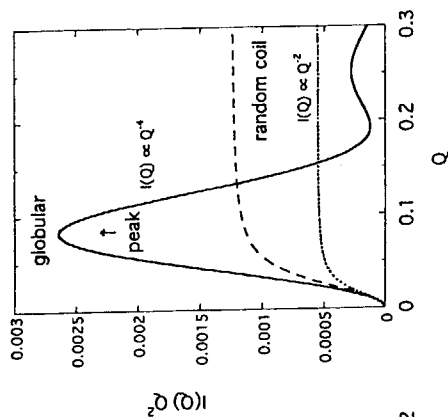
(1) 分子の大きさ (R_g)

Guinier plot



(2) 形 (球状、コイル状)

Kratky plot



長所：

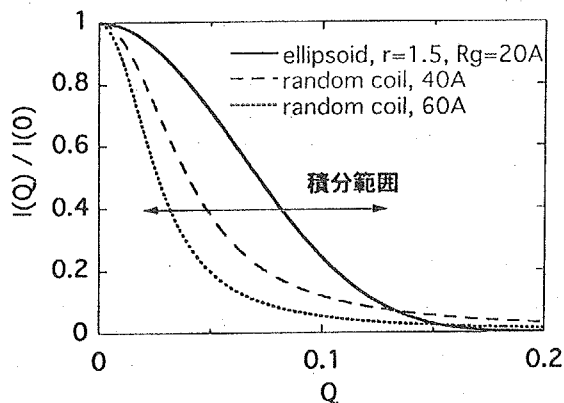
原理的にすべてのタンパク質に適用できる。
溶液中の分子の動的变化を直接的に観測できる。

短所：

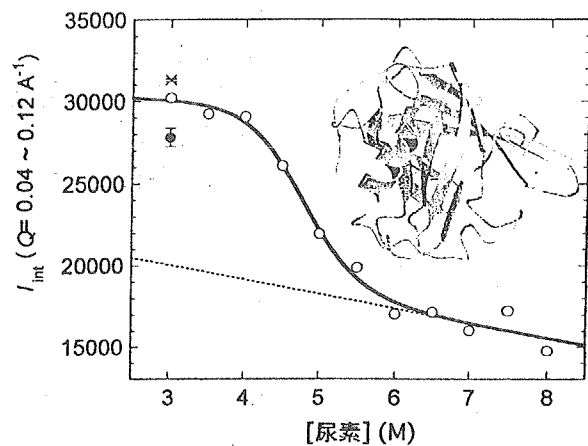
時分割実験ではS/N比が悪く、大量のサンプルと
長時間のマシニングが必要になる。

積分散乱強度 ($I_{\text{int}}, K_{\text{int}}$)

散乱曲線またはKratky plotにおいて、積分範囲を適切にとって求めた散乱強度の積分値。時分割実験でのS/N比を向上させるために用いる経験的パラメタ。



β ラクトグロブリンの尿素変性転移



積分散乱強度は、タンパク質のグローバルな構造変化を反映している。

Compaction of β -LG

β -Lactoglobulin

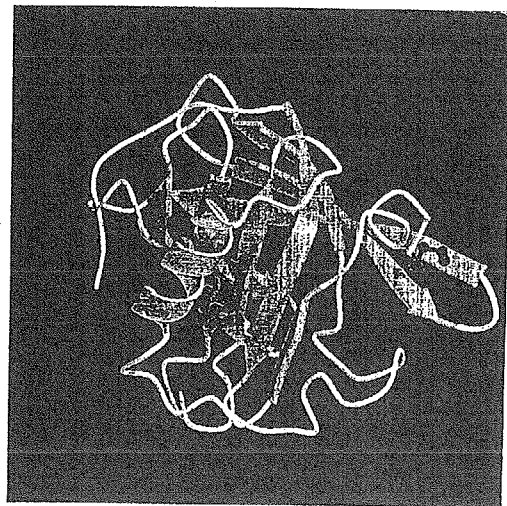
* Structure

Nine β -strands, one α -helix

* Non-native α -helices are formed in the burst-phase intermediate.

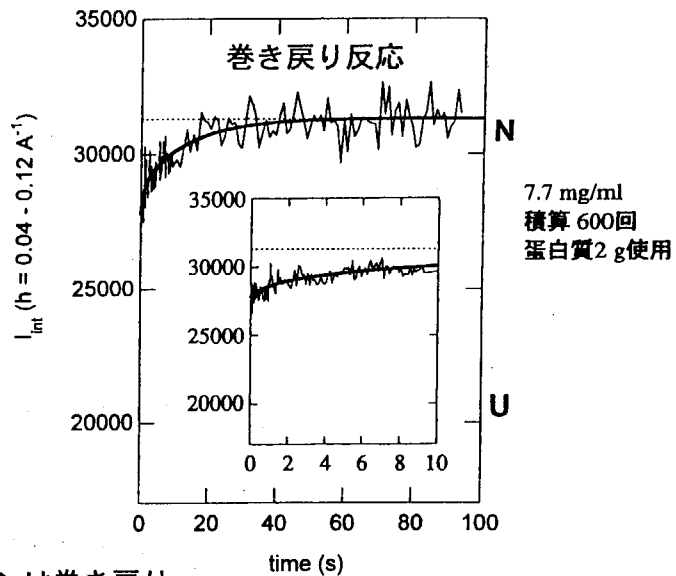
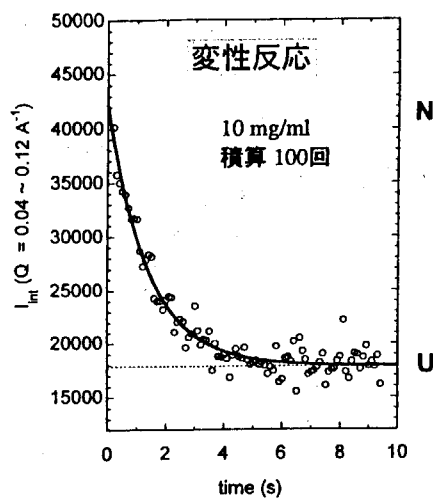
* Framework model?

The *native-like* secondary structure is formed before the tertiary structure is locked in place.



時分割X線溶液散乱法による β ラクトアルブミンの変性反応と巻き戻り反応

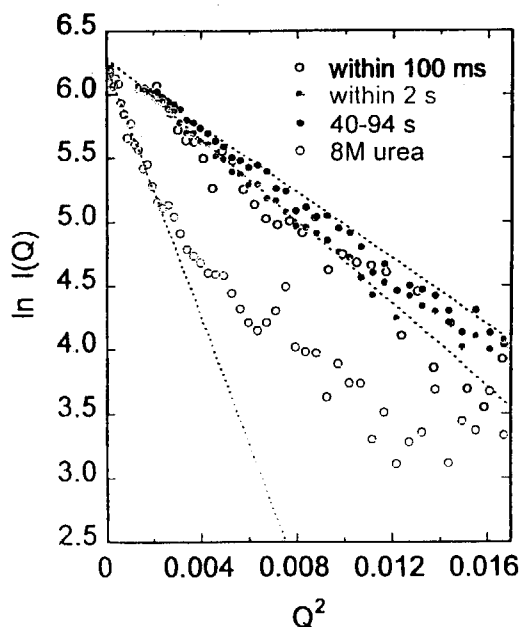
PT. BLISA



β ラクトグロブリンは巻き戻り
反応初期にコンパクトになる。

Compaction of β -LG

Guinier plots early and late in folding



(1) $I(0)$ values(y-intercept) are the same

$\Rightarrow$ no aggregation

(2) R_g (slope)

within 100 ms: $22.3 \pm 1.9 \text{ \AA}$

within 2 s: $22.0 \pm 1.0 \text{ \AA}$

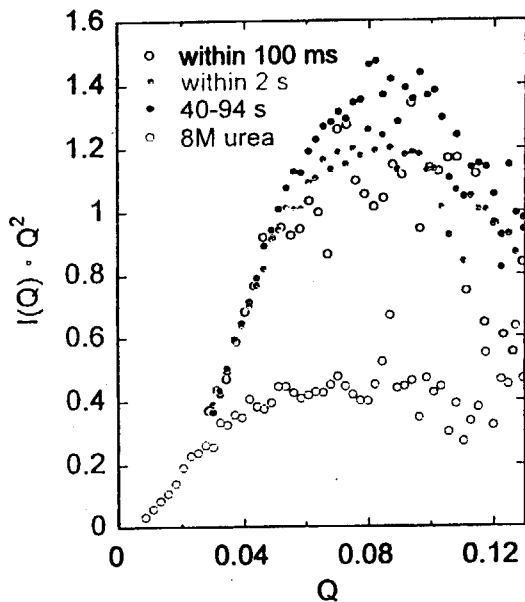
40-94 s: $19.7 \pm 0.6 \text{ \AA}$

8 M urea: $\sim 40 \text{ \AA}$

$\Rightarrow \beta$ -LG becomes compact with
the R_g of 1.1-times larger than
that of the native state within
100 ms.

Compaction of β -LG

Kratky plots early and late in folding



$\Rightarrow$ β -LG becomes globular within 100 ms of refolding.

Adapted from Arai *et al.* (1998)
J. Mol. Biol. 275: 149-262.

CCD型X線検出器

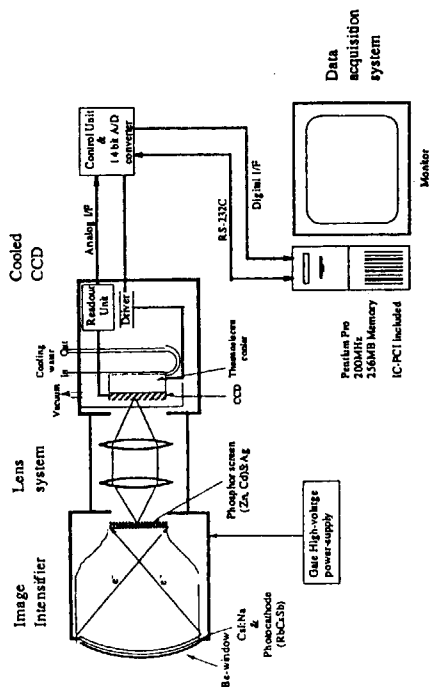


図1: CCD型X線検出器

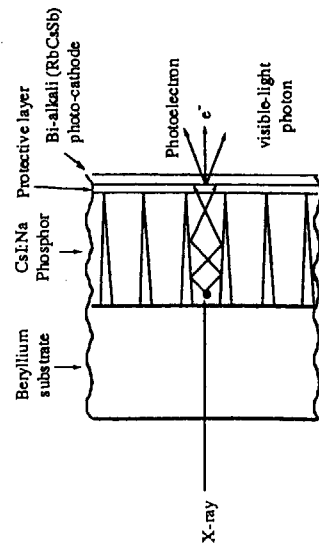
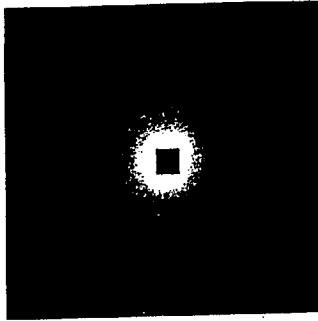


図2: ベリリウム窓X線イメージンシファイヤーの入射部の構造

解析方法

CCD型X線検出器によって
得られた2次元の散乱データ



2次元

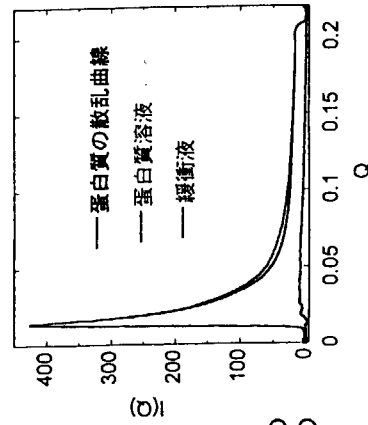
画像歪みの補正

円周平均

X線イメージンシファイヤーの
コントラスト低下に対する補正 (扇形マスク)

感度不均一性の補正

1次元の散乱曲線



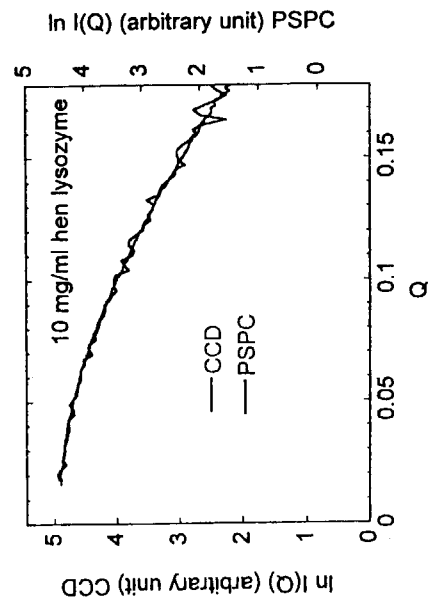
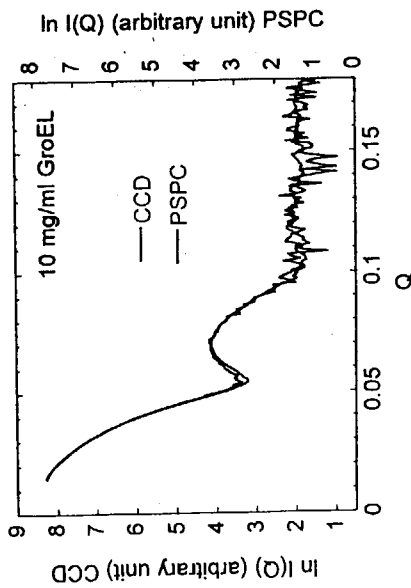
1次元

タンパク質溶液の
散乱から、溶媒の
散乱を引く

タンパク質の散乱曲線

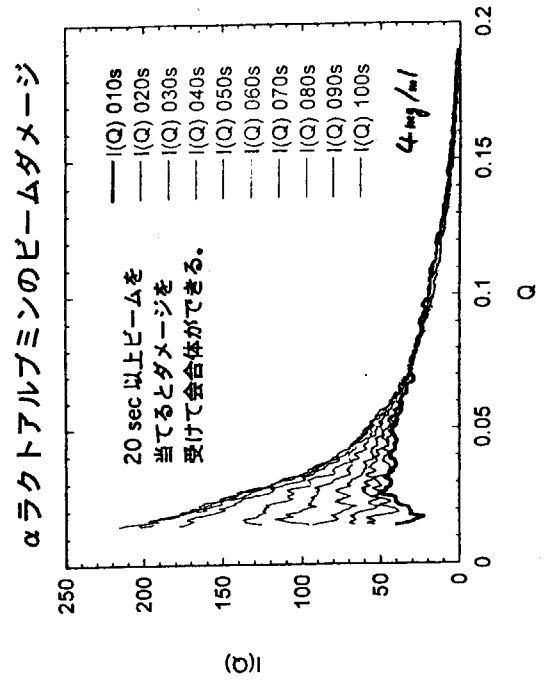
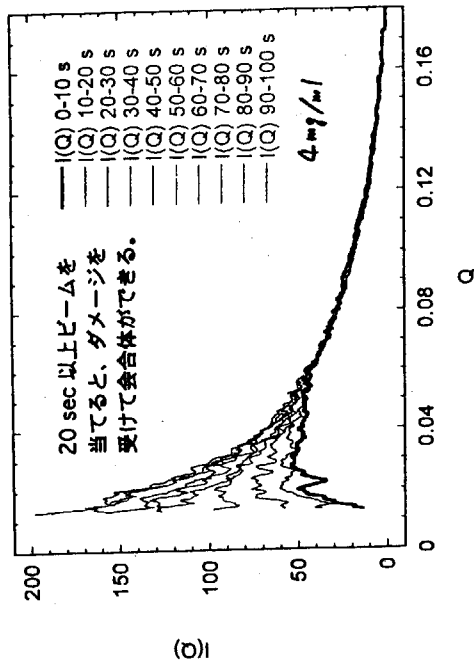
pixel size:
 { PSPC 0.368 mm
 { CCD 0.1535 mm

PSPCとCCDの比較



補正をすることにより、CCDのデータは、
 PSPCのデータとよく一致する。

PF-BLISA
 $\sim 10^{10}$ photons/s
 ニワトリ・リゾチームのビームダメージ

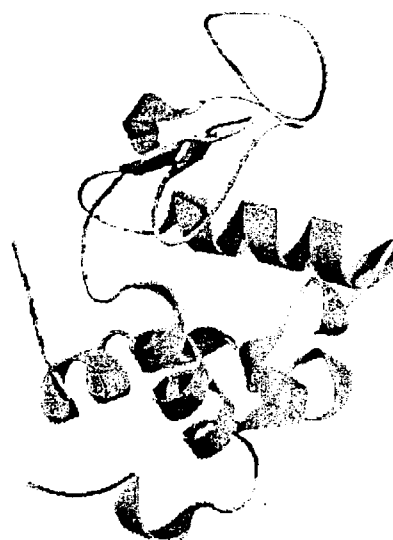
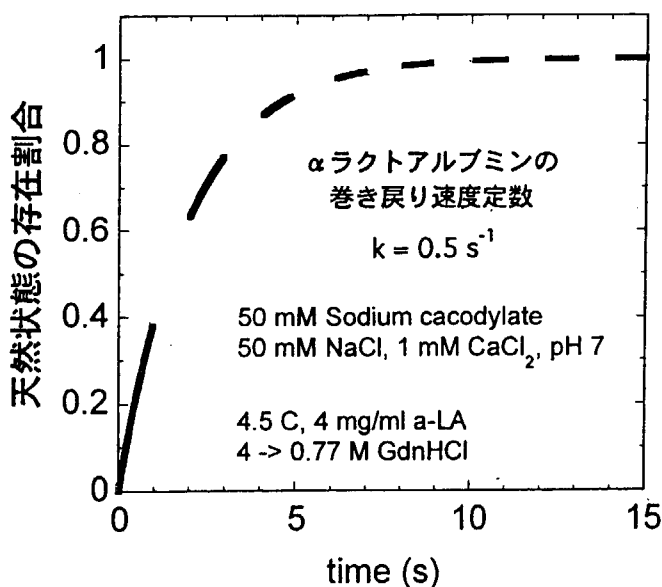


αラクトアルブミンの 巻き戻り反応

α-LA のフォールディング反応についてわかっていること：

変性状態 $\xrightleftharpoons{\text{fast}}$ 中間体 $\xrightarrow{\text{slow}}$ 天然状態

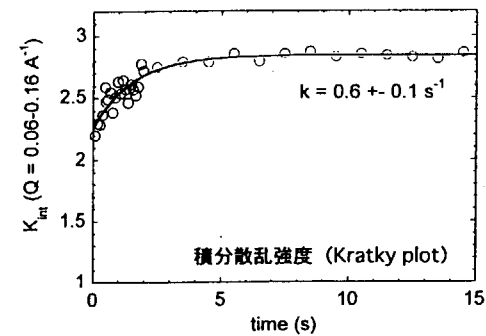
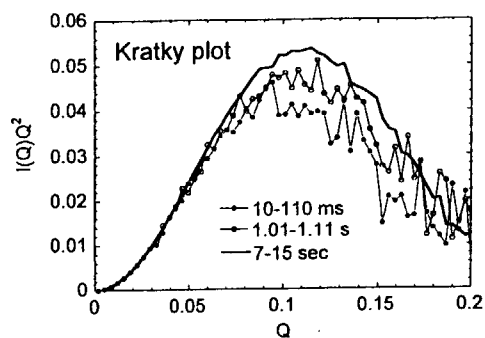
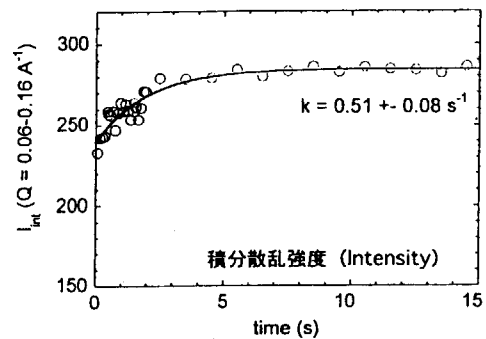
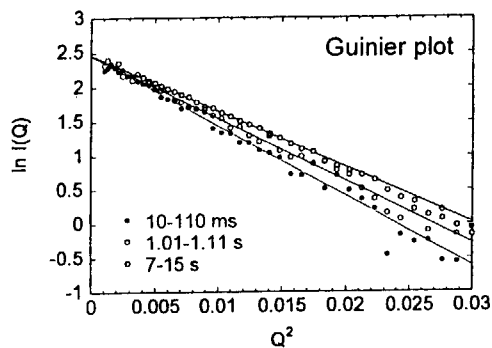
中間体は、二次構造を持つが三次構造を持たず、
モルテン・グロビュール状態に類似している。
しかし、中間体の分子サイズは不明。



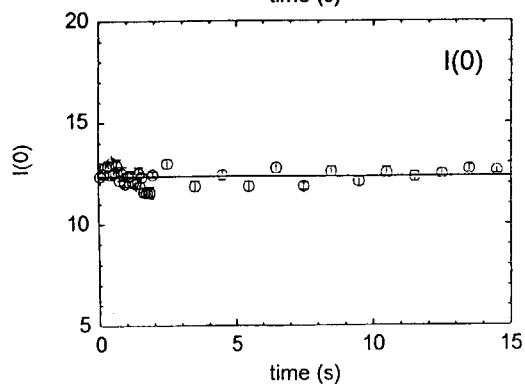
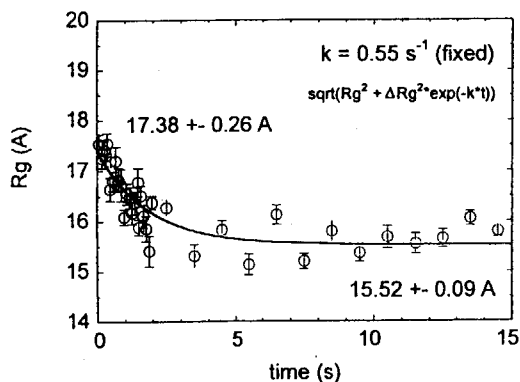
αラクトアルブミンの
結晶構造

- ① 1 秒ごとにデータを取り込み、
各データの散乱曲線を解析した。
(積算回数 10回)
- ② 100ms 間隔
積算 40回
インテリゲンチカムの CCD を使用
ストップフローの遅延時間 ~ 7ms

α ラクトアルブミンの巻き戻りに伴う散乱曲線の変化



α ラクトアルブミンの巻き戻りに伴う慣性半径の時間変化



巻き戻り反応：

中間体の $R_g = 17.4 \pm 0.3 \text{ \AA}$
天然状態の $R_g = 15.52 \pm 0.09 \text{ \AA}$

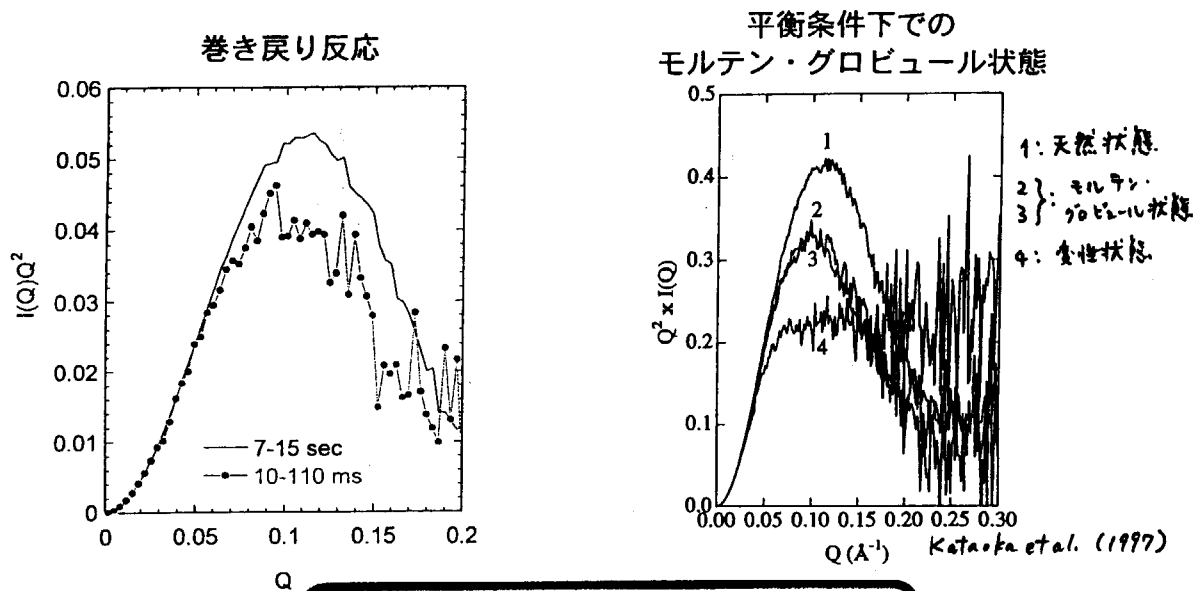
平衡条件下での測定：

MG状態の $R_g = 17.2 \pm 0.2 \text{ \AA}$
天然状態の $R_g = 15.7 \pm 0.2 \text{ \AA}$
(Kataoka et al., 1997)



α ラクトアルブミンの巻き戻り中間体の分子サイズは、モルテン・グロビュール状態と同じである。

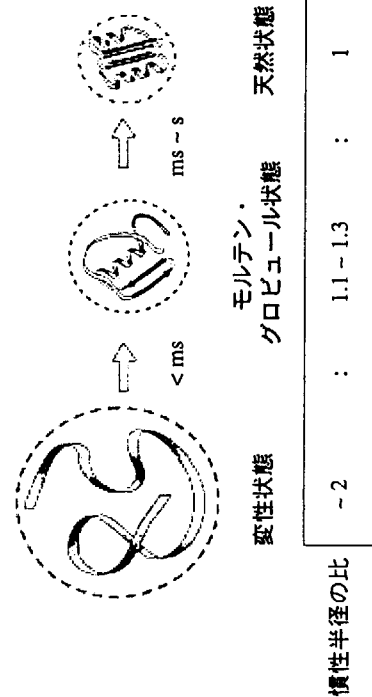
α ラクトアルブミンの巻き戻り初期中間体の形状



α ラクトアルブミンの巻き戻り中間体の形状は、モルテン・グロビュール状態の形状と同じである。

Conclusions

- ・β-ラクトグロブリンの巻き戻り中間体は、コンパクトで球状であり、その慣性半径は天然状態の1.1倍程度である。
- ・2次元CCD型X線検出器を用いることにより、S/N比を飛躍的に向上させることができた。
- ・α-ラクトアルブミンは、巻き戻り反応初期に、天然状態の1.3倍の慣性半径を持った中間体を形成する。この中間体の分子サイズと形状は、平衡条件下で観測されるモルデン・グロビュール状態と同じである。
- ・球状タンパク質のフォールディング反応では、一般に、反応初期にコンパクトで球状の構造が形成されることが示唆される。



Acknowledgment

東大院理

筑波大応生

桑島邦博

伊藤和輝

伊野部智由

槇 互介

中尾正治

関西医大

東大院新領域

木原 裕

雨宮慶幸

3.4 溶液散乱法で得られる構造階層性、水和、表面チャージ

平井光博 (群馬大学大学院工学研究科)

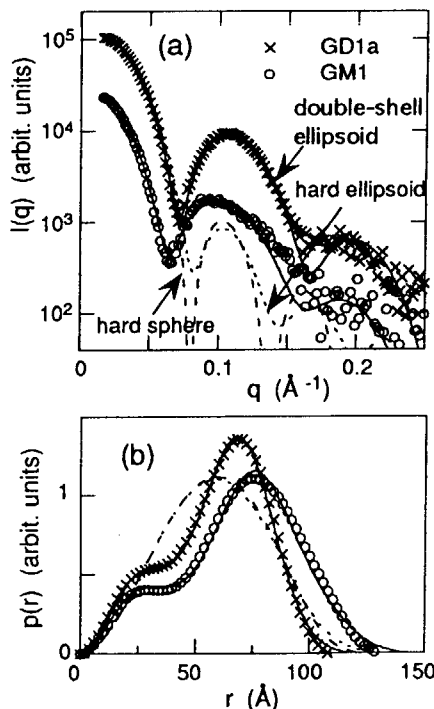
mhirai@fs.aramaki.gunma-u.ac.jp

1. 序

放射光X線・中性子溶液散乱法(小角散乱法を含む)は長距離秩序物質、非晶質物質、分散・凝集状態の物質を対象とした構造解析手法であり、結晶構造解析と光散乱の中間レベルの構造(およそ $1 \sim 10^2$ nm, 極小角散乱では $10^2 \sim 10^4$ nm)や同程度の構造揺らぎを観測するのに適している。溶液散乱では原子レベルでの構造情報は得がたいものの、各種の条件下(溶媒、温度、圧力、電磁場等)における溶液中で生起する様々な生体高分子系の反応が研究対象になり得る。特に、放射光X線や中性子の利用が一般的になった現在、両者の相補的な構造情報の使い分けや散乱データ解析の工夫から、分散粒子の内部構造や有効表面電荷、水和、排除体積、構造階層性などをある程度定量的に評価することが可能である。ここでは比較的容易に応用できる分散系の散乱解析法の幾つかを紹介する。

2. 分散粒子の内部構造と水和状態の解析

研究対象について少し説明する。対象としたガングリオシドは親水性頭部にシアル酸残基の結合した糖鎖有するスフィンゴ糖脂質で主に細胞膜外表面に偏在し、糖鎖の多様性を通じて細胞膜情報伝達調節機能、細胞間認識、細胞/基質間接着の調節機能等に関与していること知ら



[図1] ミセルの内部構造の解析。

ガングリオシドミセルの散乱関数(a)と距離分布関数(b)。マークは実験データ。破線、点線、実線は剛体球、剛体回転楕円体、2重殻回転楕円体モデルでそれぞれ最適化したもの。

れており、最近では、様々なリガンドとの結合能力がスフィンゴ糖脂質の「ラフト」と称されるマイクロドメインを介して行われ、そのラフトの性質によりリガンドとの反応性が大きく変化すると考えられている^{1),2),3)}。先ず最初に、巨大な親水性糖鎖頭部の存在によりガングリオシドが形成する単分散性ミセルの構造とその安定性の検討を行った。図1に2種類のガングリオシドミセル(GD1a, GM1)の散乱関数 $I(q)$ (q は散乱ベクトルの大きさ、 $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, 散乱角 θ , 入射波長 λ)と散乱関数のフーリエ変換によって求まる距離分布関数 $p(r)$ を示す。距離分布関数は散乱体粒子の形状と内部散乱密度分布(X線の場合は電子密度分布)の様子を把握する際に小角散乱では広く用いられる。図1(b)で特長的な短距離側に肩をもち長距離側にピークをもつ距離分布関数の形は、粒子内部の散乱密度分布に大きな揺らぎが存在することを示しており、ミセルを構成するガングリオシド分子の糖鎖頭部と脂肪酸尾部で散乱密度が大きく異なることに起因する。散乱関数小角領域のギニエ解析から得られる回転半径で散乱体粒子の構造変化を議論することが多いが、粒子内部の散乱密度

分布の揺らぎが大きく、粒子の形状の変化と内部散乱密度分布の変化の両方が同時に起きる予測される場合には、両者が相乗的或は相殺的に回転半径の変化に寄与するために回転半径のみによる議論は適さない。広角域の散乱関数を測定してモデル解析により構造パラメータを求めることが重要である。特に、ミセルのように中心対象性の高い単純な構造が考えられる場合には、多重殻回転楕円体の散乱関数 $I_s(q)$ (式1) を用いたモデル解析が有効である。図1に剛体球、剛体回転楕円体、2重殻回転楕円体モデルで実験データを合わせた結果を示す。

$$I_s(q) = \int_0^1 \left\{ 3 \left[\bar{\rho}_1 V_1 j_1(qR_1)/(qR_1) + \sum_{i=2}^n (\bar{\rho}_i - \bar{\rho}_{i-1}) V_i j_i(qR_i)/(qR_i) \right] \right\}^2 dx \quad (1)$$

：ここで $R_i = r_i(1+x^2(v_i^2-1))^{1/2}$ ； i 番目の殻のコントラスト $\bar{\rho}_i$ ，半径 r_i ，軸比 v_i ，体積 V_i ；一次の球ベッセル関数 j_1 。

内部散乱密度分布を考慮した2重殻回転楕円体でなければ実験結果を説明できないことは図1から明らかである。このモデルの場合、内核（脂肪酸尾部）及び外殻（親水性頭部）のそれぞれの半径，軸比，コントラスト（内核或は外殻領域の平均散乱密度と溶媒の平均散乱密度との差）を変数として用い、初期値としては分子構造から予測される炭化水素鎖や糖鎖頭部の長さ，コントラストを与えて各変数の最適化を行なう。得られたモデルの妥当性は、実験から得られた距離分布関数，回転半径，全散乱強度との比較やミセルの幾何学的充填条件⁴から検討する。このような解析から、昇温に伴うミセル親水性領域の収縮，熱履歴，親水性部分と疎水性部分の散乱密度の変化等が明らかになった⁵。さらに、モデル解析で得られた構造パラメータと（式2）を用いて熱構造転移に伴うミセル親水性領域の含水量を定量すると、

$$n_w = \left[\left\{ \frac{\Delta_{shell}}{\Delta_{core}} \left(\frac{\sum b_{cer}}{V_{cer}} - \alpha \right) + \alpha \right\} V_{shell} - n_a \sum b_{head} \right] / \sum b_{water} \quad (2)$$

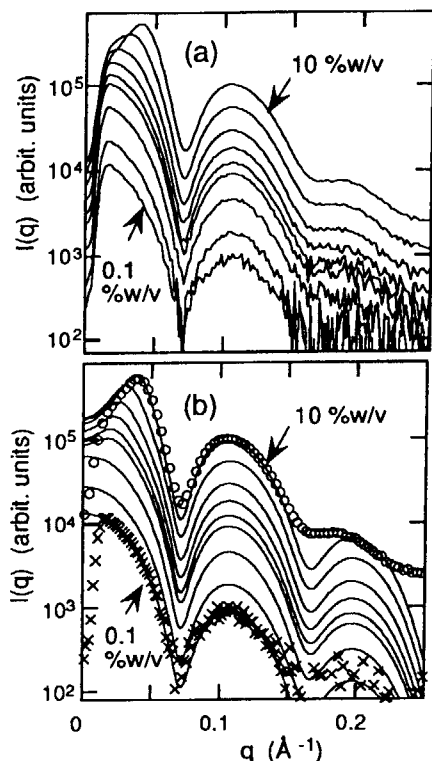
：ここで、モデル計算から求まる親水性外殻および疎水性内核のコントラスト比 $\Delta_{shell}/\Delta_{core} = \bar{\rho}_{shell}/\bar{\rho}_{core}$ ，親水性外殻の体積 V_{shell} ，ミセル会合数 n_a ；化学組成及び分子排除体積から計算できるガングリオシド分子の疎水性尾部，親水性頭部及び水分子の全散乱振幅 $\sum b_{cer}$ ， $\sum b_{head}$ ， $\sum b_{water}$ ，疎水性尾部の体積 V_{cer} ，水の平均散乱密度 $\alpha = 9.4 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ 。

糖鎖頭部領域は極めて親水的な環境にあり、それが熱可逆的な多量の水の吐出・吸蔵を伴いながら変化すること、即ち、糖鎖頭部の構造と水和状態が生理的温度領域（20-40℃）で大きく変化することが明かになった⁶。

3. 粒子間斥力相互作用ポテンシャルと有効電荷の解析

通常、形や大きさの異なる粒子が存在する多分散系では、散乱実験からおよその粒子径分布解析できても粒子個々の構造を決めることは困難である。また、一種類の粒子からなる分散系においても粒子間相互作用の存在は回転半径の評価の困難さなどを生じるために、塩濃度を上げた希薄溶液での測定や濃度依存性を測定して低濃度への外挿を行なうことがある。散乱強度は分子量と重量濃度の積に比例するので、放射光X線を用いてさえ低濃度試料では露出時間を大幅に増加せざるを得なくなり、試料の放射線損傷の増加や時分割散乱実験の困難さなど別の問題が生ずる。例えばニエ領域の散乱関数の濃度依存性から回転半径を評価しても、内部散乱密度が不均一な粒子の回転半径の評価には前述のような本質的な問題点があり、さらに、散乱実験で得られる回転半径はすべての分散粒子の値の z -平均となるので少量の凝集体の存在に極めて敏感であり、微妙な変化構造を論じるには限界がある。例えば、球形粒子の一部が二量体

を形成して5%混在するだけで回転半径の値は13%増加する。また、単分散系であっても極端に異方的な粒子形により濃度液晶相転移を示すような場合には、粒子の空間配列の規則性と配列構造の乱れなどにより散乱関数が様々に影響されるために別の解析が必要となる⁷⁾。しかし、



【図2】内部構造と粒子間斥力相互作用の同時解析。

gangliosideミセルの散乱関数の濃度変化。

(a), 実験データ ($q < 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ の急激な落ち込みはビームストッパーによる)。 (b), 2重殻回転楕円体モデルと粒子間斥力相互作用で最適化したもの (マークは実験データ)。

マクロイオン (ミセル) の有効電荷, 即ちgangliosideモノマーのシアル酸残基の解離度を求めることができる。ここで用いた平均球面場近似により得られた粒子間相互作用の解析から, マクロイオン (ミセル) の有効電荷, 即ちgangliosideモノマーのシアル酸残基の解離度を求めることができる。ここで用いた平均球面場近似により得られた粒子間相互作用構造因子 $S(q)$ (式4) には, ミセル会合数, ミセル有効半径, モノマーの濃度, モノマーの解離度, イオン強度, 臨界ミセル濃度がパラメータとして考慮されている^{8), 9)}。

$$S(q) = 1 / \{1 - 24\eta a(q\sigma)\} \quad (4)$$

ここで, ミセルの体積分率 $\eta = \pi N \sigma^3 / 6$, ミセル有効直径 σ , $a(q\sigma)$ の関数形は文献参照¹⁰⁾。

モノマー濃度, イオン強度, 臨界ミセル濃度は既知であり, ミセル会合数とミセル有効直径は2重殻回転楕円体モデル解析から得られることから最終的にモノマーの解離度を変数として実験散乱関数に合うよう最適化することができる。ミセル数及びモノマーの解離度を变化させた場合の粒子間相互作用構造因子 $S(q)$ を図3に示す。このように実験で得られた散乱関数からミセルの内部構造と有効電荷を同時に直接評価できるため, 温度変化に伴うgangliosideミセルの内部構造と有効電荷の変化を同時に明かにすることが出来た¹⁰⁾。上記 (2), (3) の結

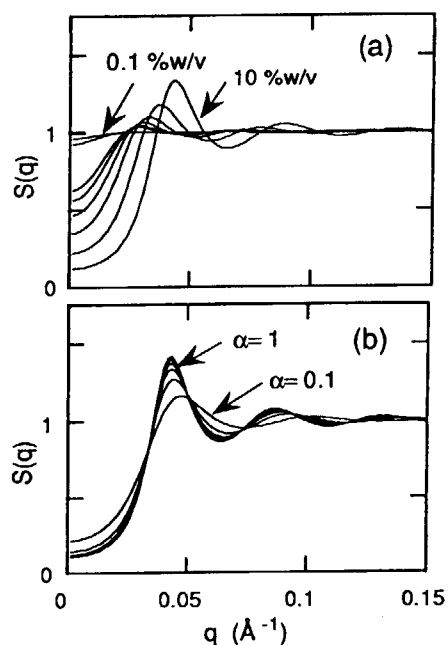
一般的に, 粒子構造異方性が小さく粒子間斥力が支配的な単分散系の場合には, 粒子間相互作用によるピークを含む広角域の散乱関数を積極的に利用すると, 粒子の内部構造変化とそれに伴う粒子間相互作用ポテンシャル (有効電荷など) の変化を散乱関数から同時に評価することが可能である。

例えば, gangliosideミセルでは, シアル酸残基の解離によるクーロン斥力相互作用の影響が散乱関数小角側にブロードなピークとして現れ, 脂質濃度 (ミセル数即ち体積分率) に依存してピーク位置が移動する (図2(a))。一般に, 粒子間相互作用存在下の散乱関数は粒子の散乱関数 $I_s(q)$ (例えば式1) と粒子間相互作用の構造因子 $S(q)$ の積として (式3) で与えられる。

$$I(q) \propto N I_s(q) S(q) \quad : N \text{ は粒子数} \quad (3)$$

ミセルをマクロイオンと見なし, マクロイオン間の斥力クーロンポテンシャルの粒子間相互作用構造因子を利用することで, (式3) を用いて図2(a)の実験散乱関数の濃度依存性を図2(b)の様に再現できる。小角側のピークを避けて2重殻回転楕円体モデルで各濃度におけるミセル粒子の内部構造パラメータを求めるとよい一致を示すことから, 測定した濃度範囲においてミセル構造が安定に保たれていることが分かる。また, 小角側の粒子間相互作用に関わるピークの解析から,

果は、外部環境変化にたいして、ガングリオシドミクロドメインが細胞膜の界面構造や水和状態、表面電荷分布に局所的な変動や揺らぎを生じさせることを意味し、そのような応答を通じて蛋白質や高分子の膜界面への吸着・結合・間入や膜間相互作用などに関与している可能性を示唆している。



〔図3〕平均場近似による粒子間斥力相互作用の構造因子。

(a), 粒子電荷（ガングリオシドモノマーの解離度）一定における粒子濃度（体積分率）依存性。(b) 粒子濃度一定における粒子電荷（ガングリオシドモノマーの解離度 α ）依存性。

4. 蛋白質の広角散乱と構造階層性・転移の多状態性の評価

溶液散乱法で得られる情報は、回転半径に代表される低分解能の情報のみならず、広角散乱関数には小・中・高角領域に蛋白質の構造階層性が順次反映されるため、蛋白質の構造転移をより詳細に議論することが可能である¹¹⁾。PDBデータから各種蛋白質の溶液散乱関数を計算すると各領域に構造階層性とその特長が現われ、およそ、 $0.2 > q \text{ Å}^{-1}$ 領域には四次・三次構造、 $0.3 < q < 0.6 \text{ Å}^{-1}$ 領域には分子内の構造ドメイン間や二次構造間の相関が反映されていることが分かる。一般に、分散粒子の散乱関数 $I(q)$ は粒子外形の散乱関数 $I_v(q)$ と粒子内の散乱密度揺らぎの散乱関数 $I_f(q)$ 、両者の積の散乱関数 $I_w(q)$ 、及びコントラスト $\bar{\rho}$ を用いて $I(q) = \bar{\rho}^2 I_v(q) + \bar{\rho} I_w(q) + I_f(q)$ と与えられ（ $I_v(q)$ 、 $I_f(q)$ 、 $I_w(q)$ は基本散乱関数）、中性子溶液散乱パターンコントラスト変化計算から基本散乱関数分離を行うと、このことを理解できる（図4）。中性子溶媒コントラスト変化法を用いて基本散乱関数を実験的に分離した例もある¹²⁾。そこで、リゾチームの熱構造転移に関して（式5）を用いて領域別に構造転移多状態解析（

（TMA解析：Transition Multiplicity Analysis）を行って熱容量曲線（DSC）との比較すると、三次構造の転移温度や未変成（N）状態／変成（U）状態の割合はDSCで得られるものと良く一致し（図5）、pHの低下にともなう二状態的な構造転移からのずれの様子が観測できる（図6）。

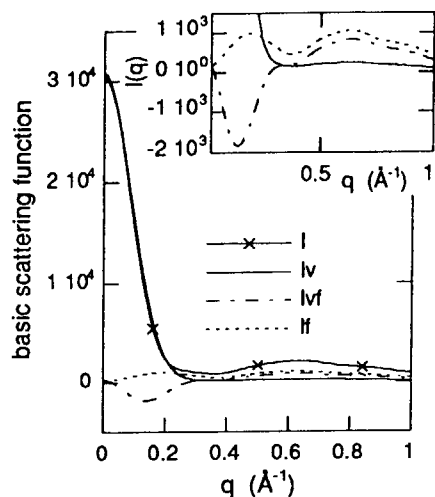
$$\Delta = \sum_{q=q_1}^{q_2} \left| I(q, T) / \sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T) - \left\{ \alpha I(q, T_N) / \sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T_N) + (1-\alpha) I(q, T_U) / \sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T_U) \right\} \right| \quad (5)$$

：ここで、 $I(q, T_N)$ 、 $I(q, T_U)$ 、 $I(q, T)$ は温度 T_N （N状態）、温度 T_U （U状態）、及び中間温度 T の散乱関数、N状態のモル分率 α 、二状態転移からのずれ Δ 。

また、DSCで観測されるエンタルピー変化を伴う三次構造の主転移温度よりはるかに低い温度領域から分子内構造の揺らぎ（崩壊）が連続的に生じることなどがわかり¹³⁾、立体構造形成の三次元格子モデルで指摘された二つの特性温度の存在¹⁴⁾などと合わせて議論できる。TMA解析は、基本的には構造転移過程の散乱関数を始状態と終状態の散乱関数でフィットする（二状態構造転移の仮定）単純な方法であるが、領域別に解析することで情報量が増えるために、散乱体の構造転移の多状態性と構造階層性を直接関連づけて議論できる点で有効であり、特に、蛋白質立体構造形成経路の普遍性を考える上で有用な知見を与えられ考える。

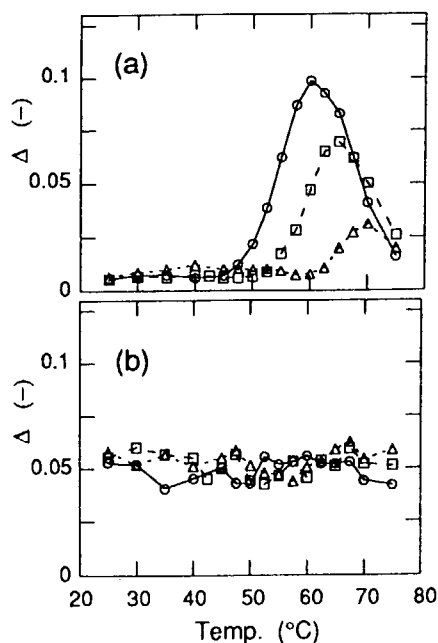
5. おわりに

一般的な分散系の研究に応用可能な放射光X線・中性子溶液散乱構造解析の例を紹介した。隔靴搔痒の観の否めない「一筆書き」の溶液散乱パターンからもある程度定量的な構造情報が得られること、溶液散乱法は次期計画においても重要な手法の一つであることに変わりない。



〔図4〕 広角散乱関数と分子内構造。

蛋白質（リゾチーム）の中性子溶液散乱関数 $I(q)$ と基本散乱関数（分子外形の散乱関数 $I_v(q)$ ，分子内散乱密度揺らぎの散乱関数 $I_f(q)$ ，両者の積の散乱関数 $I_{vf}(q)$ ）の分離。



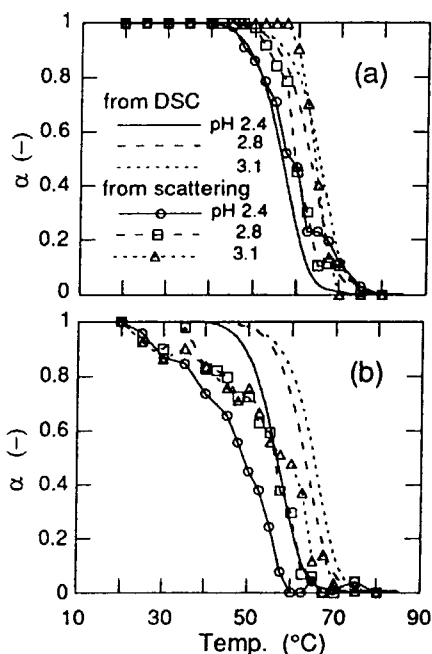
〔図6〕 二状態構造転移からのずれの評価。

pHの低下にともなう二状態構造転移からのずれ因子 Δ 。

(a), $0.1 < q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ 領域（三次構造）。(b), $0.3 < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ 領域（分子内構造）。

〔図5〕 構造階層性と領域別構造転移多状態解析。

リゾチームの熱構造転移過程の散乱関数変化から得られる未変成／変成状態の割合 α と DSC で得られる割合との比較と pH 依存性。(a), $0.1 < q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ 領域（三次構造）。(b), $0.3 < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ 領域（分子内構造，主にドメイン間相関）。



文 献

- 1) Simons, K.; Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569-572.
- 2) Hakomori, S., Yamamura, S., Handa, K. (1998) In *Sphingolipids as signaling modulators in the nervous system*; Ledeen, R.W., Hakomori, S., Yates, A., Scheider, J.S., and Yu, R.K., Eds.; The New York Academy of Sciences, New York., 1-10.
- 3) Jacobson, K. and Dietrich, C. (1999) *trends in Cell Biology* **9**, 87-91.
- 4) Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. and B. W. Ninham, B.W. (1976) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.* **72**, 1525-1568.
- 5) Hirai, M. et al. (1996) *Biophys. J.* **70**, 1761-1768; (1996) *J. Phys. Chem.* **100**, 11675-11680.
- 6) Hirai, M. and Takizawa, T. (1998) *Biophys. J.* **74**, 3010-3014.
- 7) Hirai, M. et al. (1995) *Physical Review E* **51**, 1263-1267; (1997) *Physical Review B* **55**, 3490-3496.
- 8) Hayter, J. B. and Penfold, J. (1981) *Mol. Phys.* **42**, 109-118.
- 9) Hansen, J. P. and Hayter, J. B. (1982) *Mol. Phys.* **46**, 651-656.
- 10) Hirai, M. et al. (1996) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **92**, 4533-4540; (1999) *J. Phys. Chem. B* **103**, 10136-10142.
- 11) Hirai, M. et al. (1998) *J. Phys. Chem. B* **102**, 1308-1313; (1999) *Biophys. J.* **76**, 2192-2197.
- 12) Stuhmann, H. B. and Fuess H. (1976) *Acta Cryst.* **A32**, 67-74.
- 13) Hirai, M., Arai, S., and Iwase, H. (1999) *J. Phys. Chem. B* **103**, 549-556; (2000) *Thermochim. Acta*, **344**, 95-102.
- 14) Klimov, D. K., and Thirumalai, D. (1996) *Phys. Rev. Lett.* **76**, 4070-4073; (1996) *Proteins.* **26**, 411-441.

4. 中性子結晶構造解析、中性子散乱は構造生物学に新しい道をつけることができるか？

4.1 中性子溶液散乱と水和その他

日本原子力研究所
先端基礎研究センター
藤原 悟

中性子は物質の構造研究のプロブとしてX線とは異なった特徴を持つ。その特徴を利用して生体物質の構造研究においても様々な研究が行われてきた。中性子は原子核と相互作用するので、原子の散乱長は個々の原子種により異なっており、水素と炭素、酸素、窒素等の生体物質を構成する主要な原子の散乱長は同程度の値をもつ。したがって、例えば高分解能中性子結晶構造解析により蛋白質中の水素原子や水和水の位置決定が可能ということになる。また、中性子溶液散乱法においては、溶媒中の重水濃度を変化させることによりコントラストを大きく変化させることが容易に可能なので、このいわゆる“コントラスト変調法”が、粒子の内部構造を調べるために広く利用されてきた。しかし、この手法は溶液散乱にのみ限定されるものではなく、例えば低分解能中性子結晶構造解析においてこの手法を用いることにより膜蛋白質-界面活性剤複合体単結晶中の界面活性剤領域の構造情報を得るといった成果が上げられている。さらに、近年、数オングストローム程度の分解能で測定した中性子結晶構造解析のデータから蛋白質の周りの水和構造を導出しようという試みや、重水中および軽水中の蛋白質溶液の中性子およびX線溶液散乱のデータから、やはり蛋白質の周りの水和を検出しようとする試みが行われている。また、少し方向性の異なった手法として、種々の蛋白質からなる巨大分子複合体中でのこの分子の構造情報を得るために目的の分子を重水素化し、それを重水素化していない他の分子とともに複合体に再構成することにより、複合体中の目的の分子の構造を得るという手法がある。こうした手法も中性子散乱/回折でのみ可能な方法で、構造情報抽出のための方法論がいくつか提出されている。

本講演では、以上のべた中性子散乱/回折の方法論について紹介し、その可能性について議論する。

X線と中性子

X線： 電子と相互作用

→ 原子散乱因子は原子番号に比例

中性子： 原子核と相互作用

→ 原子の散乱長は原子ごとに異なる

Scattering length b of some atoms in units of 10^{-12} cm

	中性子	X線
H	-0.374	0.282
D	+0.667	0.282
C	0.665	1.69
N	0.94	1.97
O	0.580	2.25
S	0.28	4.5
Ca	0.47	5.6
Fe	0.95	7.3

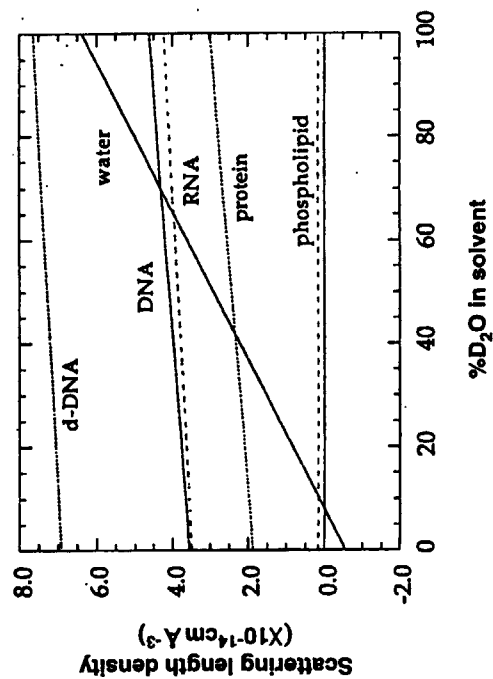
Scattering length density of H_2O : -0.00562 ($10^{-12} \text{cm} \text{Å}^{-3}$)
 Scattering length density of D_2O : $+0.06404$ ($10^{-12} \text{cm} \text{Å}^{-3}$)



The average scattering length density of water

$$b = -0.00562 + 0.0697X$$

X: the percentage of D_2O in water



Contrast: $\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho_{sol}$

$\rho(r)$: scattering length density of protein

ρ_{sol} : scattering length density of solvent

Scattering and Contrast

Contrast of a particle in solvent of D₂O fraction, x :

$$\Delta\rho_x(r) = (\rho_{\text{prot}}(r) - \rho_{\text{sol}})_{\text{H}_2\text{O}} + x(\rho_{\text{prot}}(r) - \rho_{\text{sol}})_{\text{HD}}$$

where H₂O refers to the structure in H₂O,

and HD to the scattering density increments from H₂O to D₂O

Structure factor of the particle :

$$F_x(q) = F_{\text{H}_2\text{O}}(q) + xF_{\text{HD}}(q)$$

where $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ (2θ ; scattering angle, λ ; wavelength)

Intensity :

$$I_x(q) = |F_{\text{H}_2\text{O}}(q)|^2 + 2x\cos\Phi|F_{\text{H}_2\text{O}}(q)||F_{\text{HD}}(q)| + x^2|F_{\text{HD}}(q)|^2$$

where Φ is the phase difference between F_{HD} and $F_{\text{H}_2\text{O}}$

Crystallography

$$I_x(hkl) = |F_{\text{H}_2\text{O}}(hkl)|^2 + 2x\cos\Phi|F_{\text{H}_2\text{O}}(hkl)||F_{\text{HD}}(hkl)| + x^2|F_{\text{HD}}(hkl)|^2$$

Fiber Diffraction

$$I_x(R,Z) = \langle |F_{\text{H}_2\text{O}}(q)|^2 + 2x\cos\Phi|F_{\text{H}_2\text{O}}(q)||F_{\text{HD}}(q)| + x^2|F_{\text{HD}}(q)|^2 \rangle_\psi$$

Solution Scattering

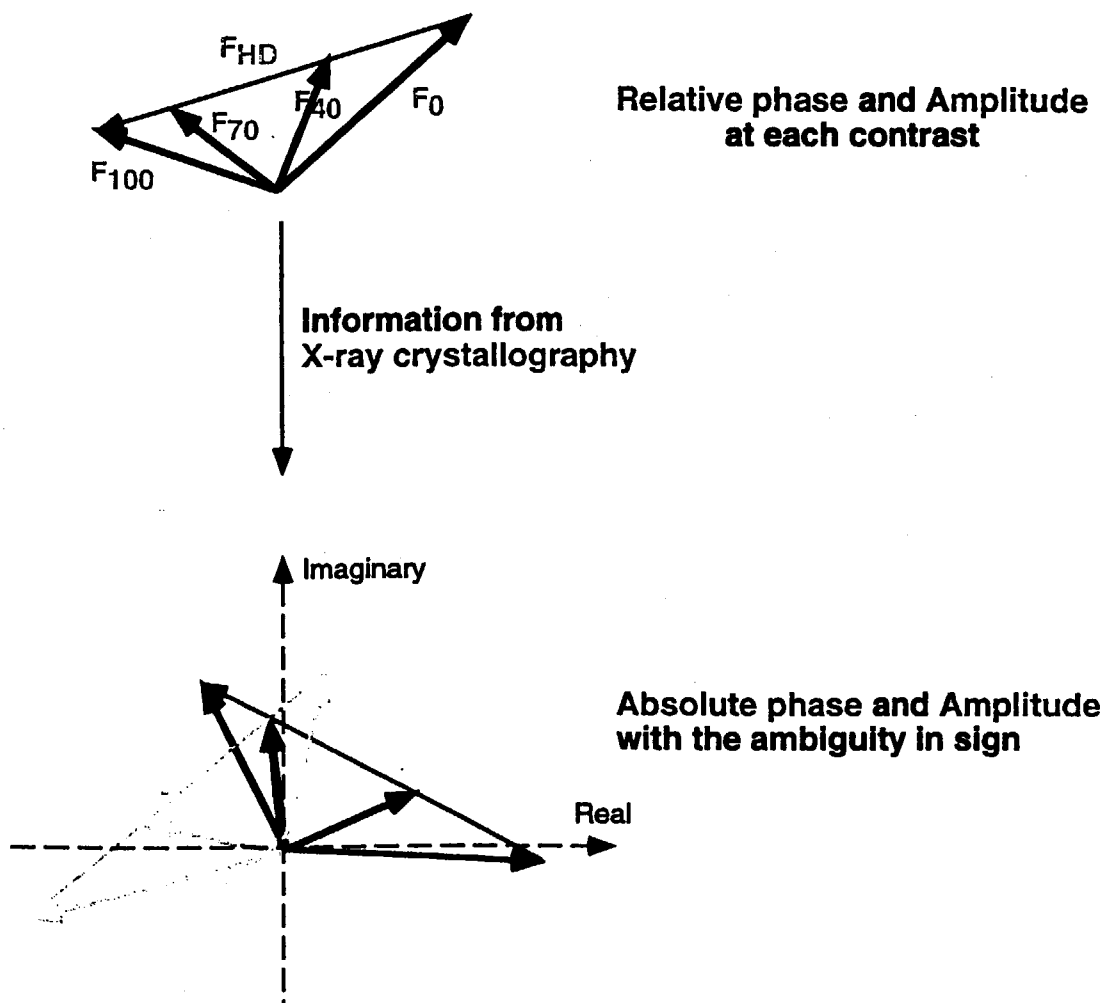
$$I_x(q) = \langle |F_{\text{H}_2\text{O}}(q)|^2 + 2x\cos\Phi|F_{\text{H}_2\text{O}}(q)||F_{\text{HD}}(q)| + x^2|F_{\text{HD}}(q)|^2 \rangle_{\theta,\varphi}$$

With the contrast variation measurements, the factors for a quadratic function of x can be determined.

i.e.,

The amplitude and the relative phase of the structure factor at any contrast can be obtained.

Low Resolution Crystallography



Examples

(1) Tomato Bushy Stunt Virus

"The Three-dimensional distribution of RNA and protein in the interior of tomato bushy stunt virus: a neutron low-resolution single-crystal diffraction study"
Peter A Timmins, David Wild, and Jean Witz, *Structure* (1994) 2, 1191-1201

(2) OmpF Porin

"Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin"
E Pebay-Peyroula, RM Garavito, JP Rosenbusch, M Zualuf, and PA Timmins
Structure (1995) 3, 1051-1059

Solvent Structure Analysis with Neutron Crystallography

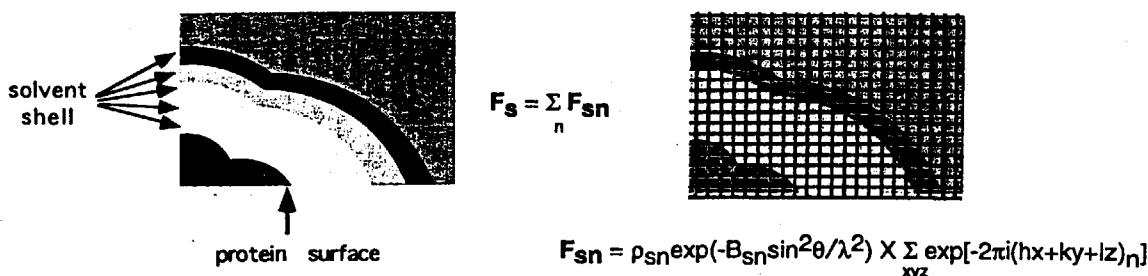
Schoenborn, J. Mol. Biol. (1988) 201, 741-749

Cheng & Schoenborn, Acta Cryst. (1990) B46, 195-208

Daniels, Schoenborn, & Korszun, Acta Cryst. (1997) D53, 544-550

The observed structure factor: $F_O = |F_S + F_P|$
 where F_S : the structure factor of the solvent
 F_P : the structure factor of the protein

The solvent shell model



The scattering density and/or B -factor of each shell can be estimated.

Protein hydration in solution: Experimental observation by x-ray and neutron scattering

D. I. SVERGUN*†‡, S. RICHARD§, M. H. J. KOCH*, Z. SAYERS*, S. KUPRIN¶, AND G. ZACCAI§¶

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 Vol. 95, pp. 2267-2272, March 1998
 Biophysics

The scattering intensity from the molecule surrounded by a hydration layer with a scattering density ρ_b :

$$I(q) = \langle |A_s(q) - \rho_s A_s(q) + \delta \rho_b A_b(q)|^2 \rangle_Q$$

where $A_s(q)$: the scattering amplitude from the particle *in vacuo*

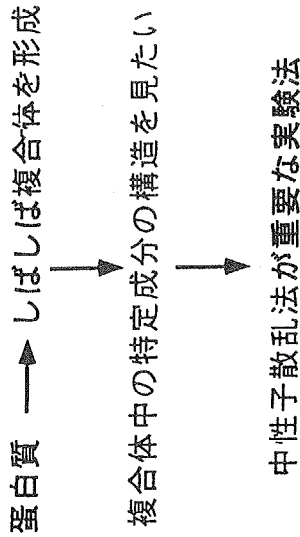
$A_s(q)$: the scattering amplitude from the excluded volume

$A_b(q)$: the scattering amplitude from the hydration layer

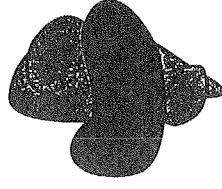
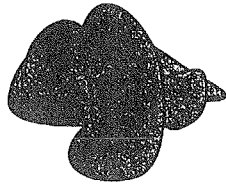
$$\delta \rho_b = \rho_s - \rho_b$$

The effects of $\delta \rho_b$ are different in X-ray scattering, in neutron scattering in H_2O , and in neutron scattering in D_2O . The density of the hydration layer can be estimated from these effects.

蛋白質複合体の中性子溶液散乱

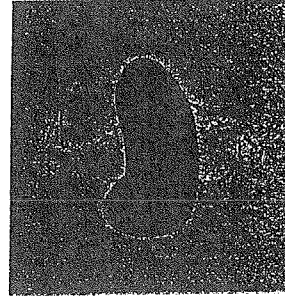


- ・選択的重水素化
- 目的の蛋白質のみを重水素化する



・コントラストマッチング

溶液中の $H_2O : D_2O$ 比を変えることで
溶媒の散乱長密度を重水素化されていない
領域の平均散乱長密度と一致させる



問題点

- ・マッチング領域の散乱長密度のゆらぎ
 - ・複合体間の干渉効果
- ↑ 散乱曲線が歪む

Contrast Variation Method

Scattering length density of a particle:

$$\rho(r) = \rho_p \rho_F(r) + \rho_s(r)$$

where $\rho_p = \langle \rho(r) \rangle$

$$\rho_F(r) = 1 \text{ (inside the particle)}$$

$$0 \text{ (outside)}$$

$\rho_s(r)$: density fluctuations

Contrast:

$$\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho_{sol}$$

$$= \rho_F(r) + \rho_s(r) \text{ where } \rho = \rho_p - \rho_{sol}$$

Intensity:

$$I(S) = \rho^2 I_c(S) + \rho I_{cs}(S) + I_s(S)$$

Radius of gyration:

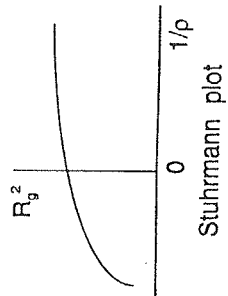
$$R_g^2 = R_c^2 + \alpha/\rho - \beta/\rho^2$$

R_c : the radius of gyration
at infinite contrast

$$\alpha = (1/V_c) \int \rho_s(r) r^2 dr$$

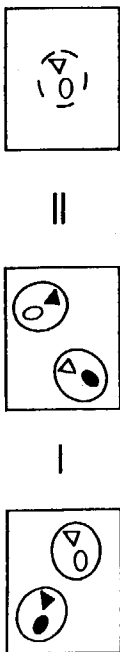
$$\beta = [(1/V_c) \int \rho_s(r) r dr]^2$$

From the plot of R_g vs $1/\rho$ (Stuhrmann plot), R_c , α , and β can be estimated.



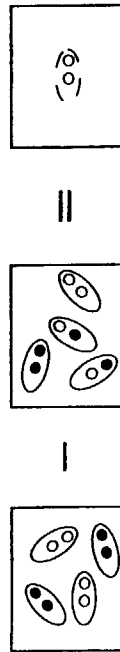
余計な干渉効果を除去し、目的の粒子のみからの散乱を抽出する特別な方法

(1) Hoppe's Method (1973)



複合体中の2つの異なる粒子間の干渉関数を抽出

(2) The Statistical Labeling Method (by Kneale, Baldwin & Bradbury, 1977)

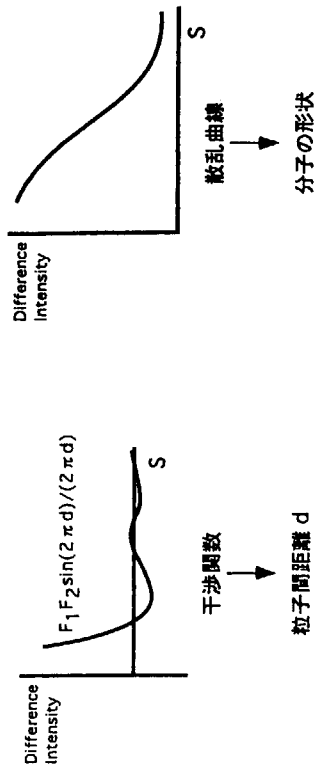


複合体中の2つの同一粒子間の干渉関数を抽出

(3) The Triple Isotopic Substitution Method (by Pavlov & Serdyuk, 1987)



複合体中の1個の粒子からの散乱曲線を抽出



高次の規則構造を形成しない球状蛋白質複合体の系のみに対して提案

規則構造をもった系には適用できないのか？
2個の粒子の干渉関数しか得られないのか？（一般化できないのか？）

Hoppe's method, SLM, TISM の理論的解析を行った

1個の large Particle からの散乱振幅

$$F_{\text{LP}}(s) = F_{\text{LP}}(S) + \sum_{j=1}^N F_{\text{SP}}(S) \exp(2\pi S r_{j1})$$

N_T 個の large particle からなる系の散乱強度 (基本式)

$$I(S) = N_T \{ \langle |F_{\text{LP}}(S)|^2 \rangle_{\text{labeling}} + \langle (1/N) \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle F_{\text{LP}}(B_i^{-1}S) \rangle_{\text{labeling}} \langle F_{\text{LP}}(B_j^{-1}S) \rangle_{\text{labeling}} \exp(2\pi S r_{ij}) \rangle_{\text{orientation}} \}$$

SLMの導出

Mixture Sample からの散乱強度

$$I_{\text{ML}}(S) = N_T \{ \langle |F_{\text{LP}}(S)|^2 \rangle + (1-\delta) |F_{\text{LP}}(S)|^2_{\text{orientation}} + \langle (1/N) \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle F_{\text{LP}}(B_i^{-1}S) \rangle + (1-\delta) F_{\text{LP}}(B_i^{-1}S) \rangle \times \{ \delta F_{\text{LP}}(B_m^{-1}S) + (1-\delta) F_{\text{LP}}(B_m^{-1}S) \} \exp(2\pi S r_{im}) \rangle_{\text{orientation}} \}$$

Randomly Labeled Sample からの散乱強度

$$I_{\text{RL}}(S) = N_T \{ \langle |F_{\text{LP}}(S)|^2 \rangle + (1-\delta) |F_{\text{LP}}(S)|^2_{\text{orientation}} - \delta \langle (1-\delta) \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \langle \Delta F_{\text{SP}}(S) \rangle_{\text{orientation}} \Delta F_{\text{SP}}(S) \exp(2\pi S r_{jk}) \rangle_{\text{orientation}} + \langle (1/N) \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle \delta F_{\text{LP}}(B_i^{-1}S) \rangle + (1-\delta) F_{\text{LP}}(B_i^{-1}S) \rangle \times \{ \delta F_{\text{LP}}(B_m^{-1}S) + (1-\delta) F_{\text{LP}}(B_m^{-1}S) \} \exp(2\pi S r_{im}) \rangle_{\text{orientation}} \}$$

Difference Intensity

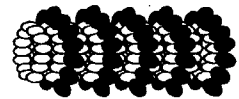
$$\Delta I(S) = I_{\text{ML}}(S) - I_{\text{RL}}(S) = N_T \delta \langle (1-\delta) \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \langle \Delta F_{\text{SP}}(S) \rangle_{\text{orientation}} \Delta F_{\text{SP}}(S) \exp(2\pi S r_{jk}) \rangle_{\text{orientation}} \}$$

Hoppe's Method における Difference Intensity

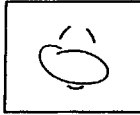
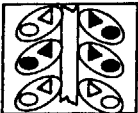
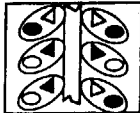
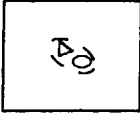
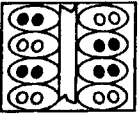
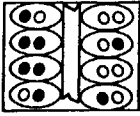
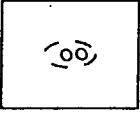
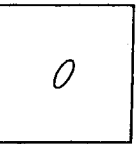
$$\Delta I(S) = N_T \langle \text{Re}[\Delta F_{\text{SP}}(S) \Delta F_{\text{SP}}^*(S) \exp(2\pi S r_{12})] \rangle_{\text{orientation}}$$

TISM における Difference Intensity

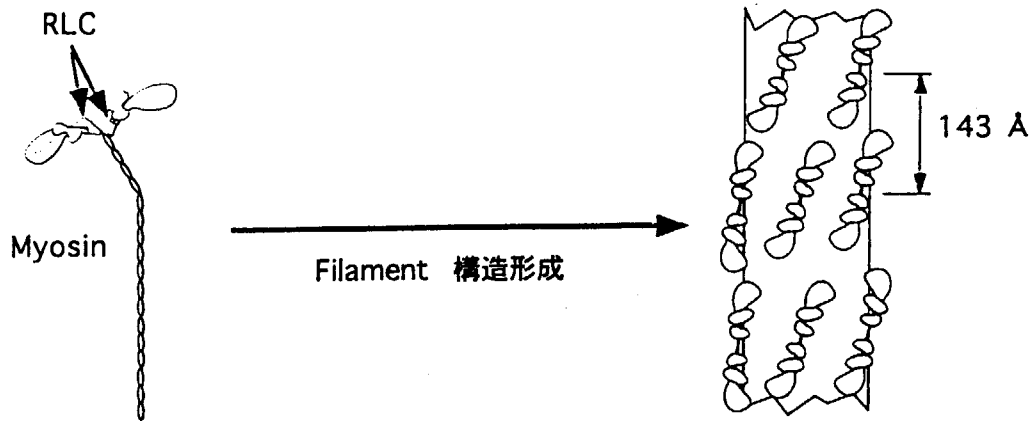
$$\Delta I(S) = N_T \delta \langle (1-\delta) \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \langle \Delta F_{\text{SP}}(S) \rangle_{\text{orientation}} \Delta F_{\text{SP}}(S) \exp(2\pi S r_{jk}) \rangle_{\text{orientation}} \}$$



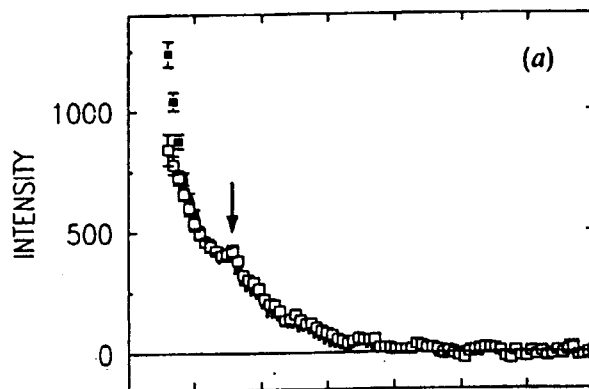
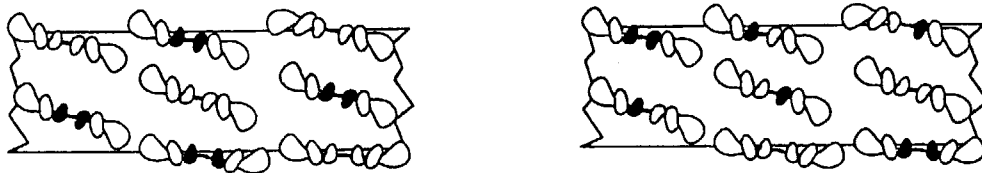
Hoppe's method, SLM, TISMの応用可能性

目的とする 粒子の数	目的とする 粒子の種類	方法	実験法			得られる 構造情報		
1	—	TISM		—		=		形状
2	異なる	Hoppe's method		—		=		距離
	同一	SLM		—		=		
> 2	同一	SLM		—		=		粒子の 配列
		TISM		—		=		粒子1個 の形状

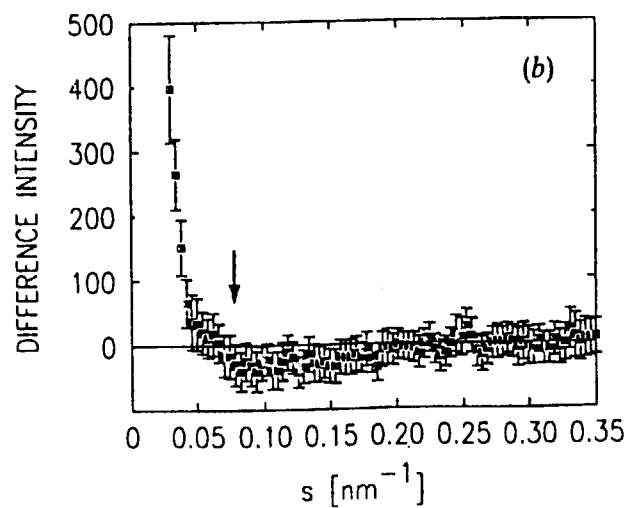
Myosin Filament



SLM の myosin filament への適用



Myosin 分子間干渉による
ピークが観測される



ピークが消え、
 $\sin X/X$ 型の干渉関数となる

4.2 ガラス転移

奈良先端科学技術大学院大学 片岡幹雄

一般に、蛋白質は外界からの刺激に応答して構造を変えることができる。構造を変えることで、機能を発揮するといつてよい。立体構造が変わるということとは、タンパク質の中の原子の位置が動くということである。我々の身の回りでは、物がひとりで動くことはありえない。物を動かすためには、力を加える必要がある。この力学の原理は、タンパク質についても成り立っている。タンパク質が構造を変えるために必要な力はどこからくるのであろうか。基質の結合や光の受容などの外界の刺激を受けることは、タンパク質に外から力を及ぼすことを意味する。どのような力が働いてどのように原子が動くのか、つまりタンパク質はどのように構造を変えるのか理解することが、タンパク質の動力学を理解するということである。

非干渉性中性子非弾性散乱は、蛋白質の動力学を理解するために、優れた研究手段である。高エネルギー領域では、いわゆる振動スペクトルを観測することができる。

ピークのアサインのためには、エネルギー分解能の高い赤外吸収やラマン散乱を利用の方が効率的である。しかし、理論計算と実験結果を対比させるためには、基準振動解析の結果から直ちに散乱強度を計算できる中性子非弾性散乱がはるかに優れている。光学的測定法では選択側があり、基準振動の全てが観測にかかるわけではない。

さらに、強度計算のためには、遷移双極子モーメントや分極率の変化についての情報が必要となるが、これらを蛋白質のような複雑な系のしかもある基準振動について計算することは現状では不可能である。我々が、ラザフォードアップルトン研究所の TFXA 分光器を用いて測定した非弾性散乱スペクトルは、現在のところ世界最高精度を誇っており、その結果は基準振動解析により定性的に説明できた。しかし、定量的一致度は低く、理論計算におけるポテンシャル関数の改善などが必要であることが示された。

中性子非弾性散乱が、光学的測定に比べて有利なもう一つの点は、 Q 依存性を見ることができる点である。弾性散乱強度の Q 依存性を調べると、平均自乗変位を得ることができる。蛋白質や高分子などについて、様々な温度で平均自乗変位を求めると、ある温度以上で急激に増加する現象が見られる。これをガ

ラス転移と読んでいる。ガラス転移点以上の温度では、あるポテンシャル極小値から別の極小値に遷移するような構造変化に対応する非調和的な運動が活性化されるのである。また、この非調和運動は、水和することにより始めて獲得される。折畳まれた状態と折畳まれていない状態では、非弾性散乱に現れる調和的な振動モードについては大きな変化は観測されないが、ガラス転移点以上での非調和運動に違いが見られてくる。さらに、Q依存性のガウスの振る舞いからのずれを定量的に評価することで、動力学の不均一性が評価できることが示されてきた。

講演においては、我々の研究成果を中心に、中性子非弾性・準弾性散乱による蛋白質動力学の研究の現状を報告する。構造生物学における中性子の利用では、結晶構造解析が着目されているが、蛋白質物理学、構造生物学の今後の進展においては、非干渉性中性子非弾性散乱の重要性がますます高まることと期待している。

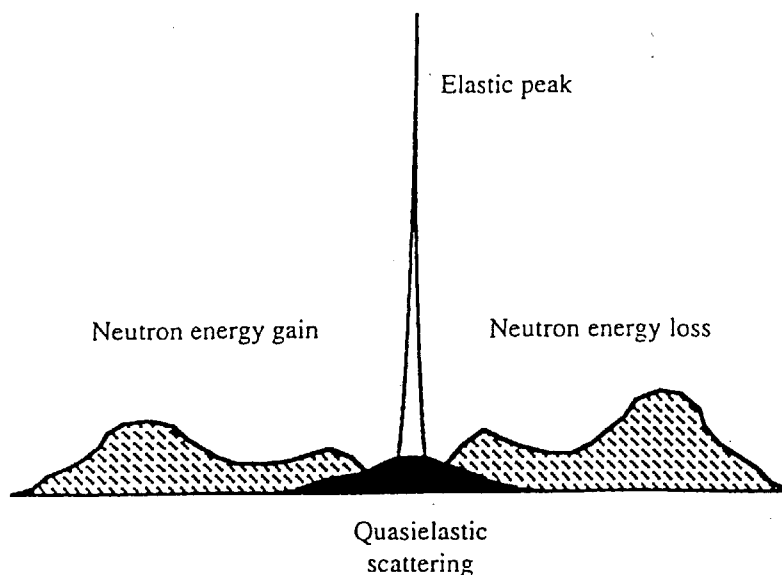
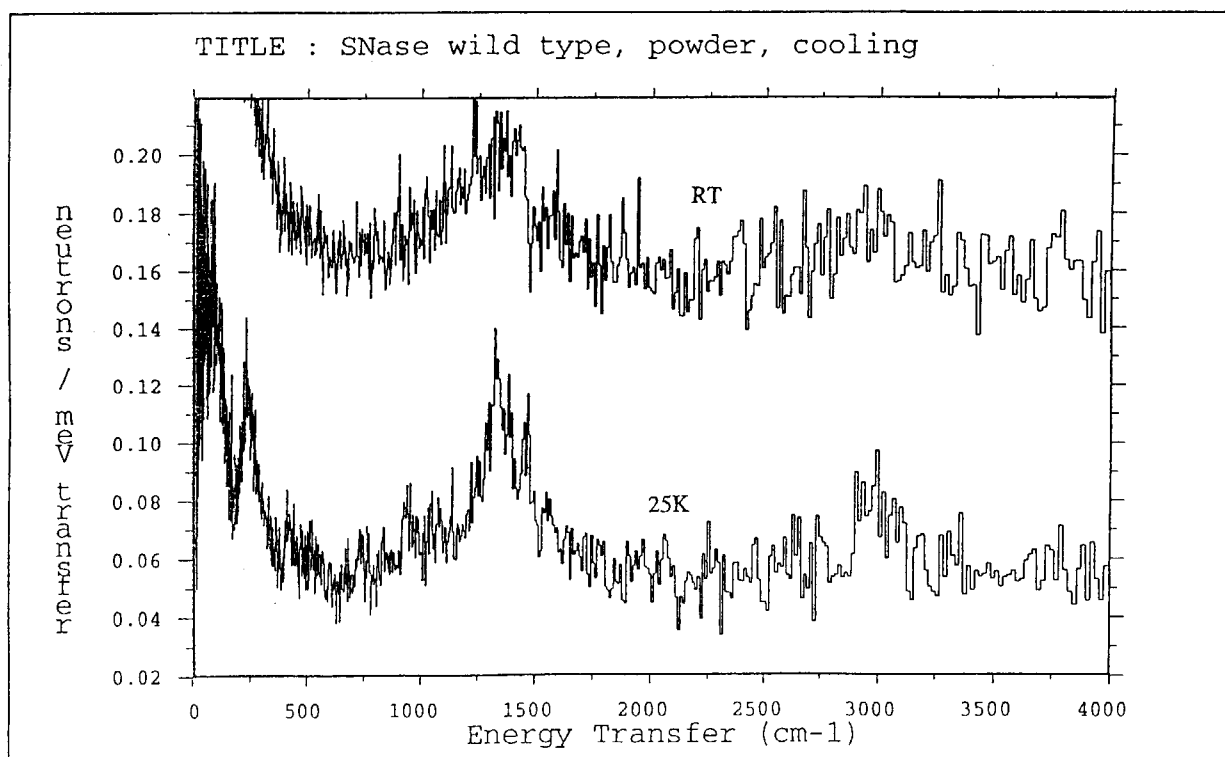


Fig. 2. Schematic diagram indicating the three observed types of incoherent neutron scattering: elastic, quasielastic and inelastic. Reproduced from Cusack (1989).

INSTRUMENT: TFXA
 RUN NUMBER: 3507
 SPECTRUM : 1

USER: MK/JCS
 RUN START TIME: 28-JUN-1996 11:40:
 PLOT DATE: Tue 2-JUL-1996 10:10:
 NO GROUPING OF BINS

LOCATION: TFXA\$DISK0:[TFXMGR.DATA]TFX03507.RAW



中性子非弾性散乱 スペクトルの計算

$$S(\vec{Q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt \exp(-i\omega t) F(\vec{Q}, t)$$

$S(\vec{Q}, \omega)$: 動的散乱因子

$$F(\vec{Q}, t) = \sum_{\alpha} b_{\alpha}^2 \langle \exp(-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_{\alpha}(0)) \cdot \exp(i\vec{Q} \cdot \vec{R}_{\alpha}(t)) \rangle$$

$F(\vec{Q}, t)$: 中間散乱関数

α : 個々の原子を表す.

$\vec{R}_{\alpha}(t)$: 原子 α の(時間依存する)位置

基準振動解析の結果を用いて

$$S(\vec{Q}, \omega) = \sum_{\alpha=1}^N \sum_{\lambda=1}^{3N-6} b_{\alpha}^2 \exp\left(\frac{\hbar\omega_{\lambda}}{2kT}\right)$$

$$\times \frac{\exp(-2W_{\alpha}(\vec{Q})) \cdot \hbar |\vec{Q} \cdot \vec{e}_{\lambda\alpha}|}{4m_{\alpha}\omega \sinh\left(\frac{\hbar\omega_{\lambda}}{2kT}\right)} \delta(\omega - \omega_{\lambda})$$

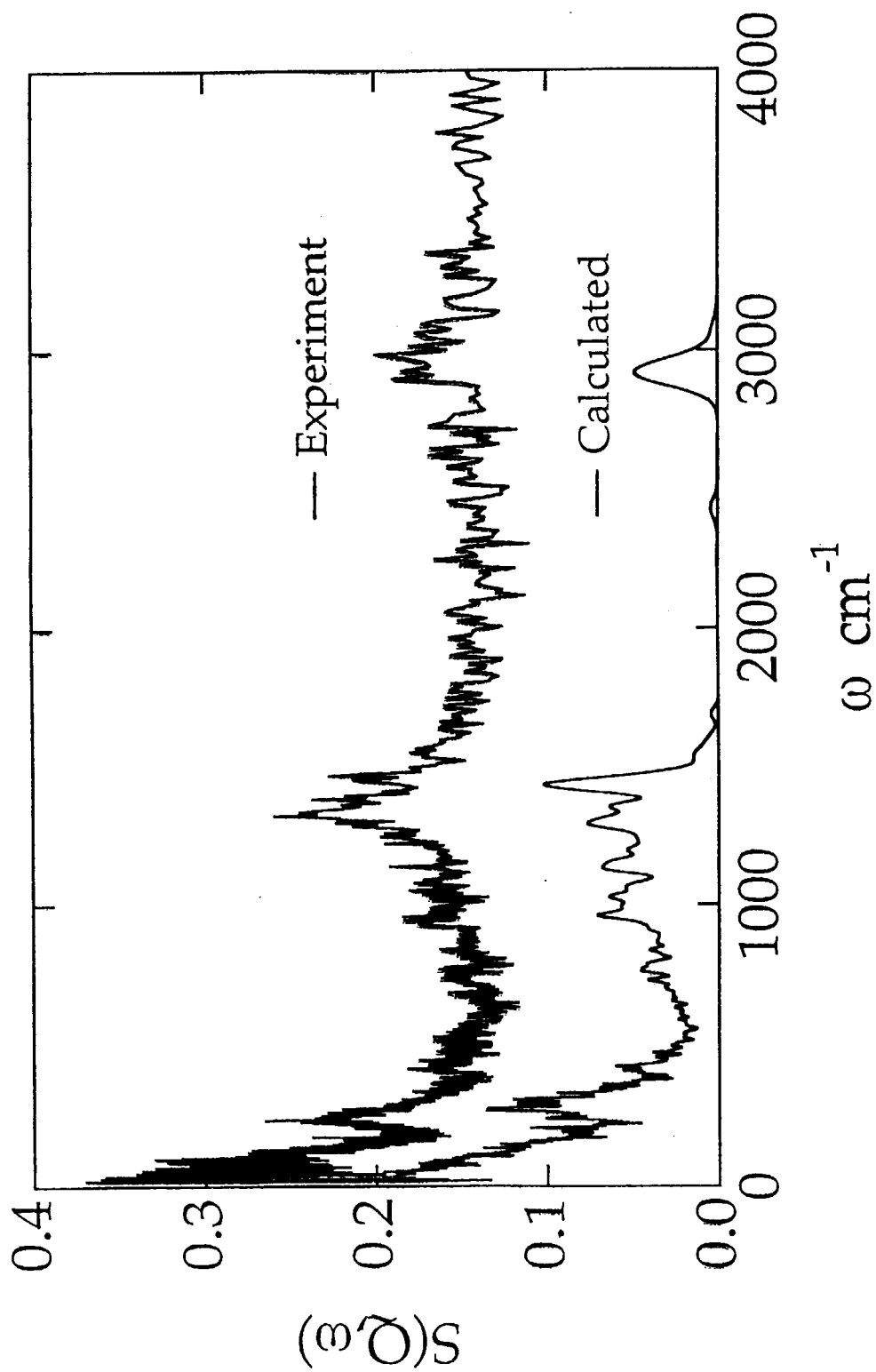
λ : 基準振動モード

$\vec{e}_{\lambda\alpha}$: 原子 α の基準振動モード λ の原子固有ベクトル (位置)

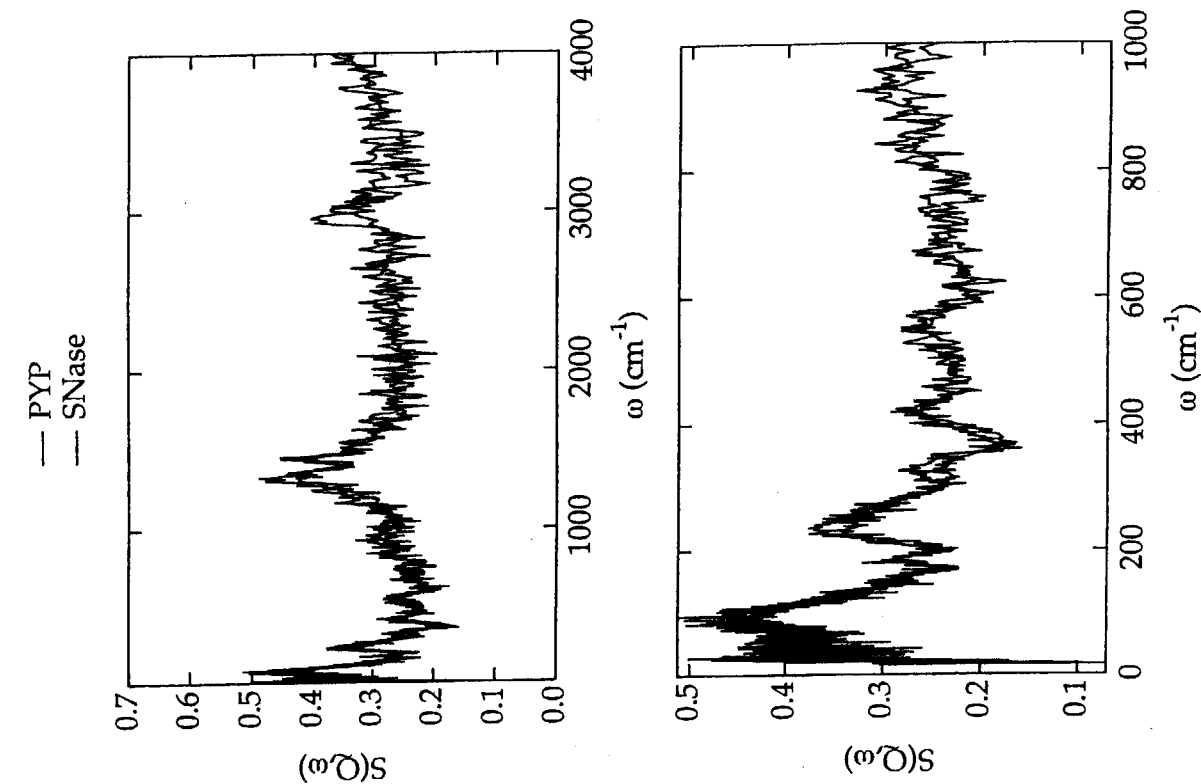
と計算される.

Comparison of Inelastic Neutron Spectrum

25K, powder



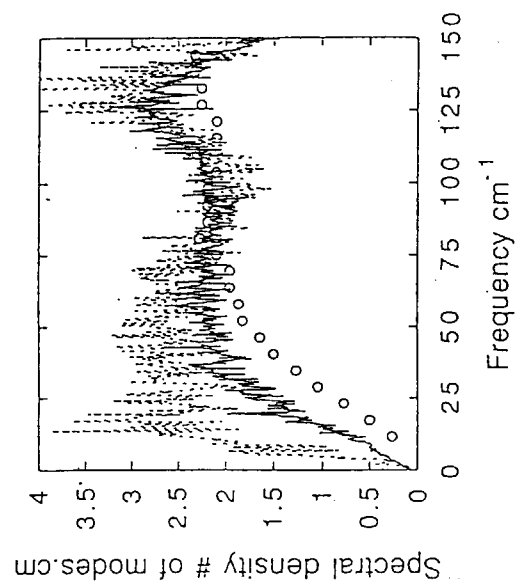
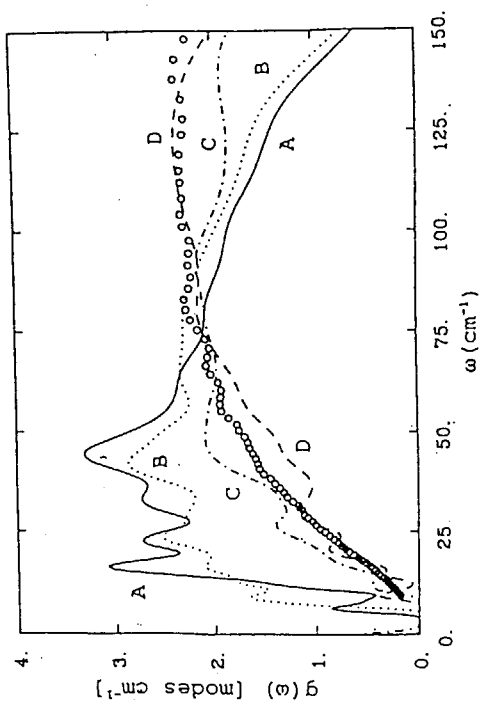
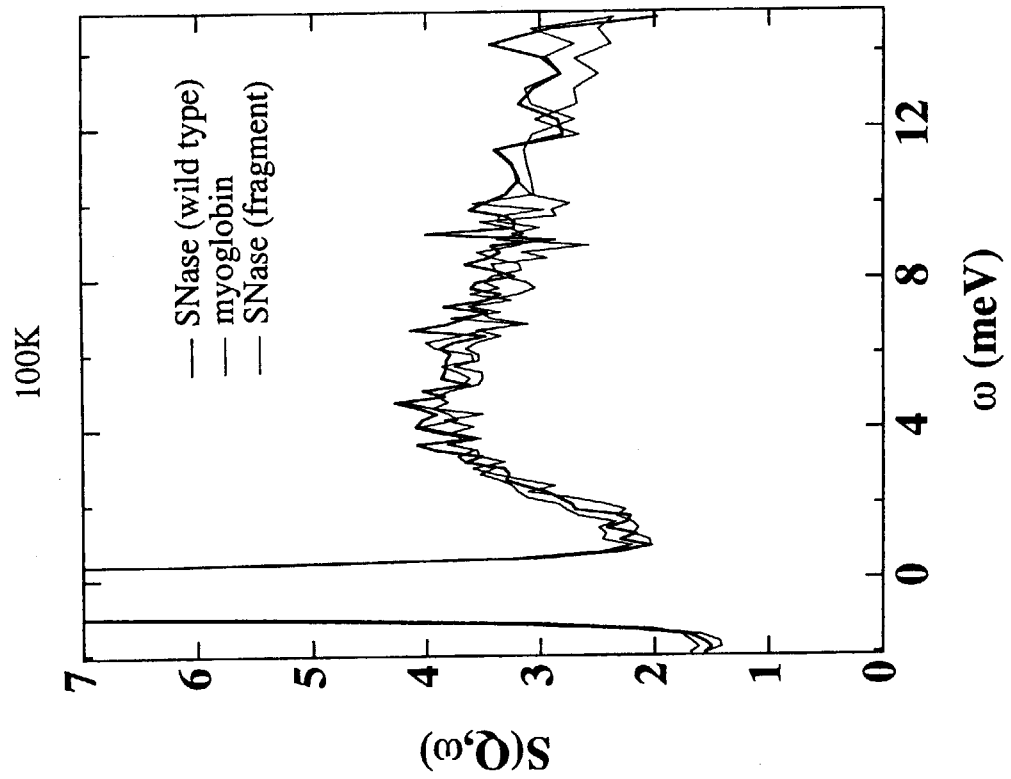
Comparison of INS spectra



expt.	theory	assignment
235	269	CH ₃ -t
400-450	395-435	CCC-def, CCN-def, skeletal
477	471	CCC-def, CCN-d.f, skeletal
470-590		water O-H..O-b
720-775	720-795	CH ₂ -r, CH-b
837	835	CH ₂ -r
936	958	CH ₂ -r, CH ₃ -r
1136	1136	CH-b, CH ₂ -tw, CH ₃ -r
1284	1291	CH ₂ -tw, CH ₂ -w, CH-b, CH ₃ -sb
1326		
	1352	CH ₂ -w, CH ₂ -tw, CH-b, CH ₃ -sb
1386		
1455	1431	CH ₂ -b, CH ₃ -ab, CH-ip
1555	1530	C-Ns
	1686	C-Ns
	2430	N-Ds
2952	2920	N-Hs

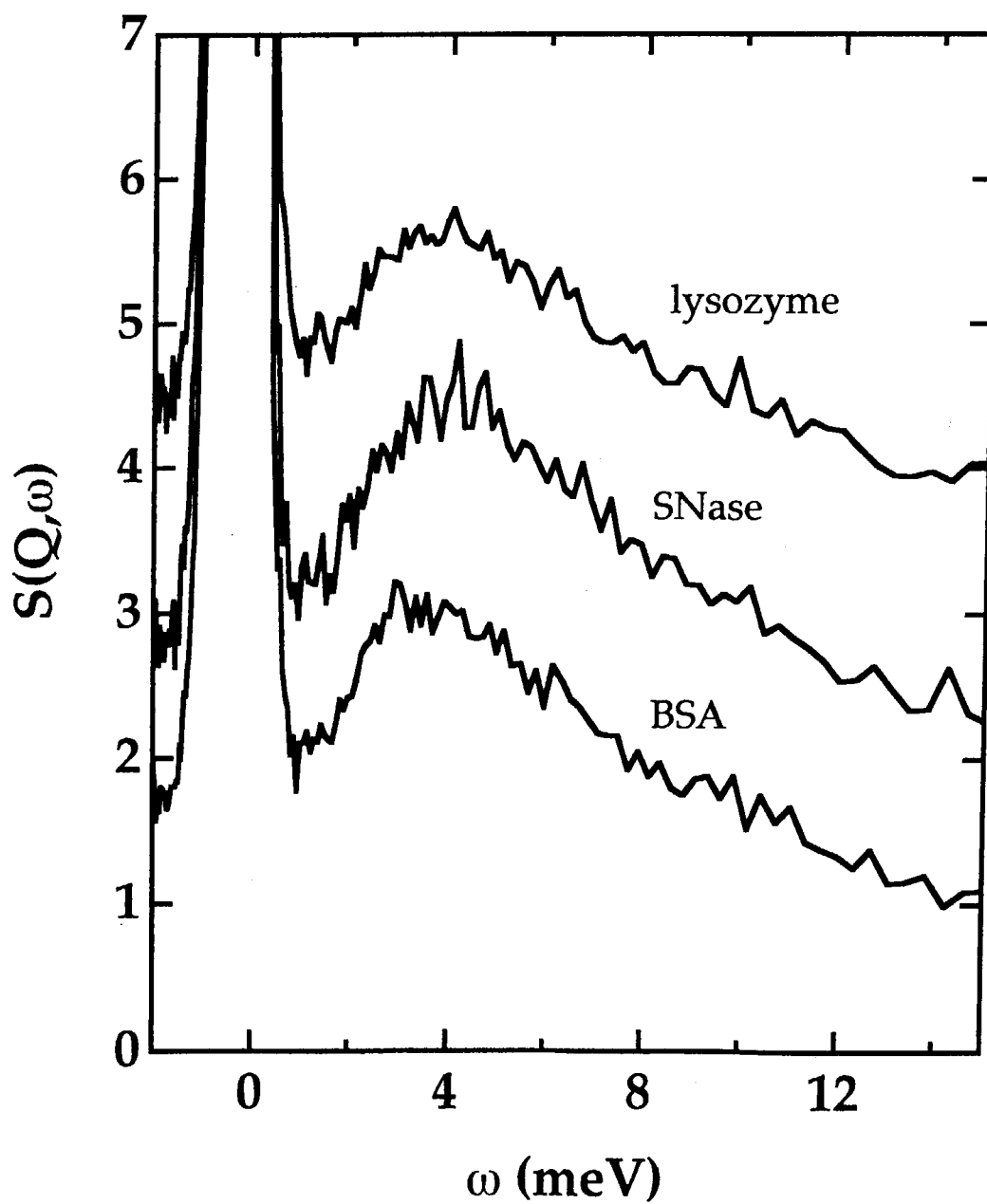
Table 1: Frequencies (in cm⁻¹) of vibrational peaks in 25K INS spectrum from the TFXA experiment and the theoretical normal mode analysis. Assignments of the theoretical modes are also given. For modes of frequency < 1500 cm⁻¹ qualitative assignments were made by graphical inspection of dynamical trajectories. For each peak the order, from left to right, is in decreasing strength of the contribution. The abbreviations used are as follows: t=torsion; def=deformation; b=bend; r=rock; tw=twist; w=wag; sb=symmetric bend; ab=antisymmetric bend; ip=in-plane bend; s=stretch.

Comparison of quasielastic scattering spectrum



Comparision of quasielastic scattering spectrum

100K



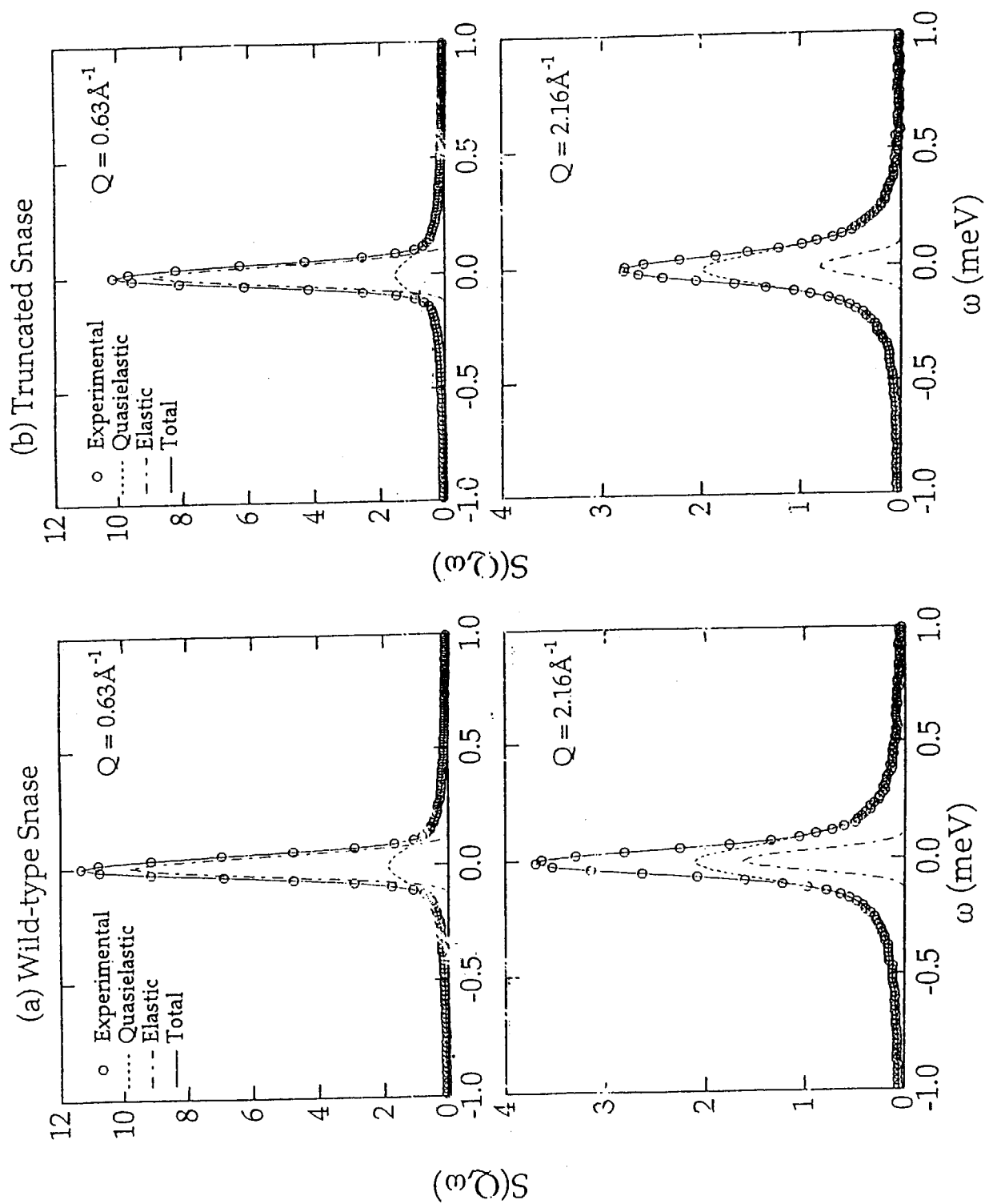
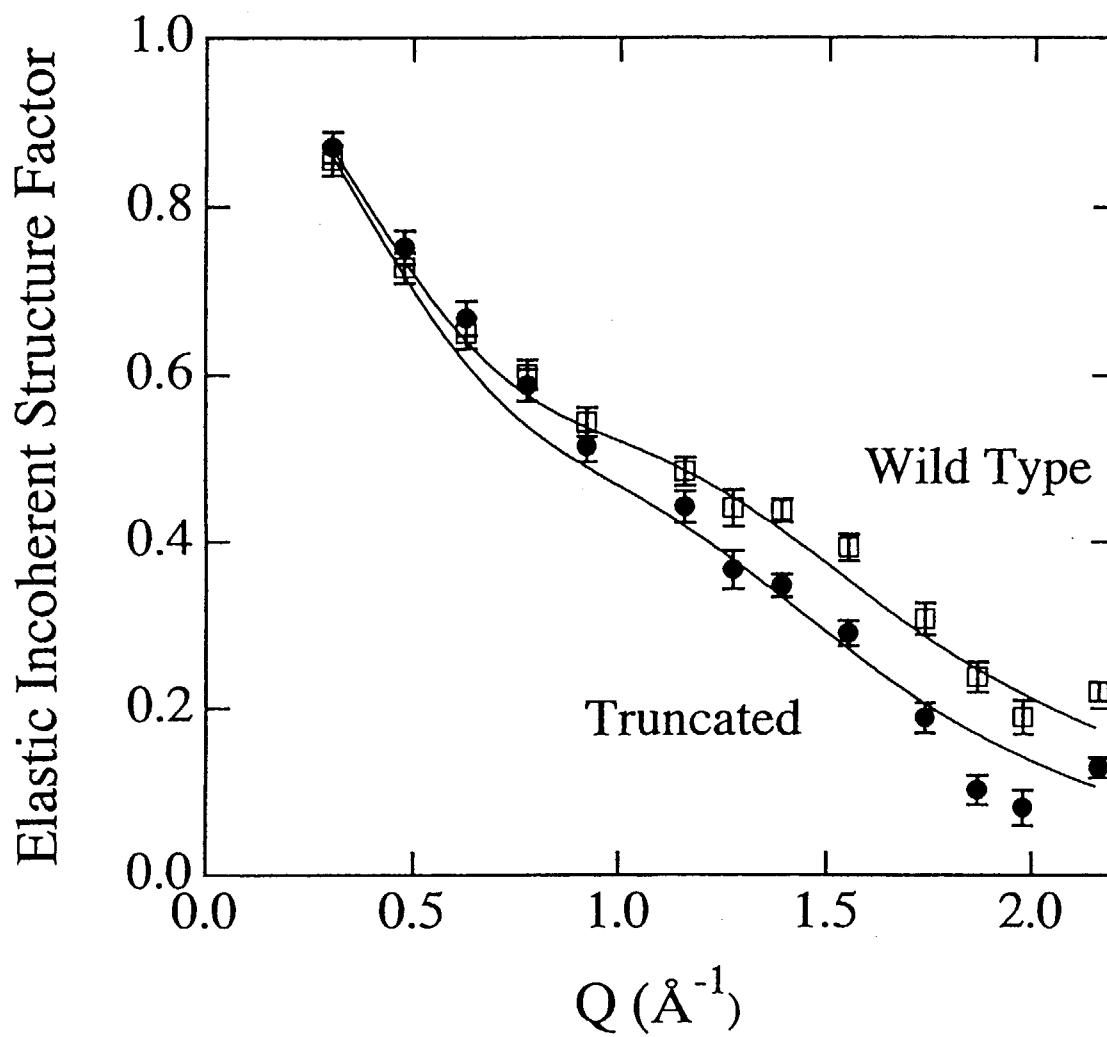
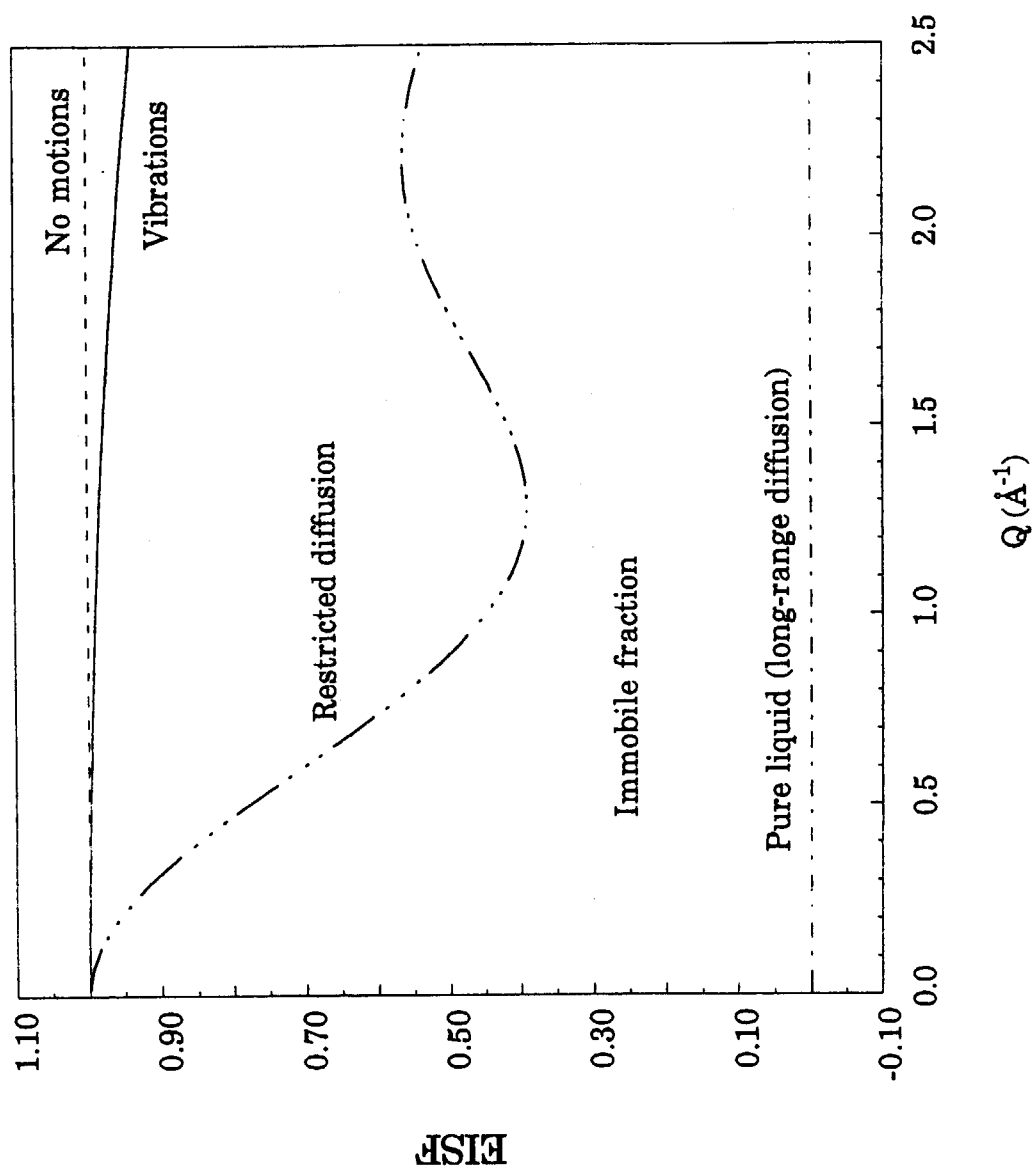


Fig. 2 Kataoka, Lamy-Goupil, Kamakubo, Ferrand, Yunoki, Oka & Smith





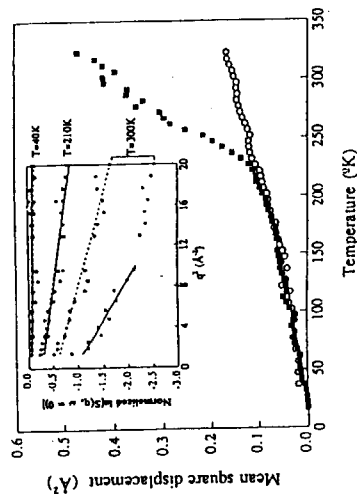
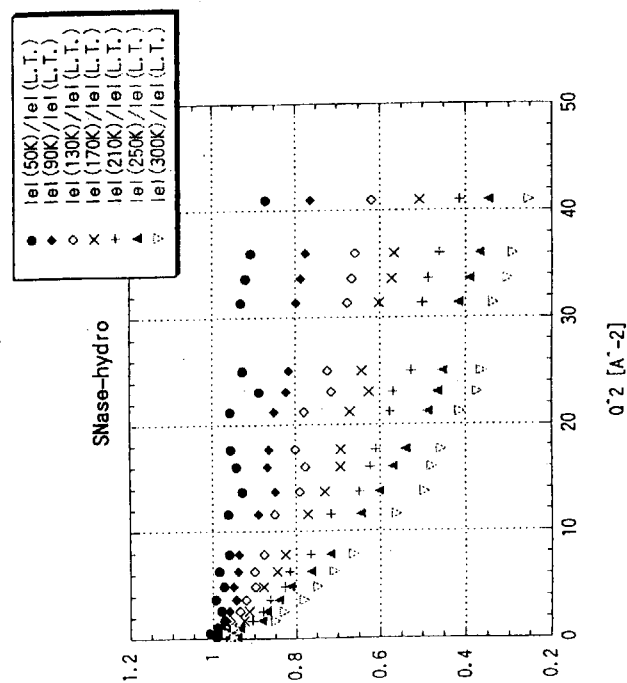
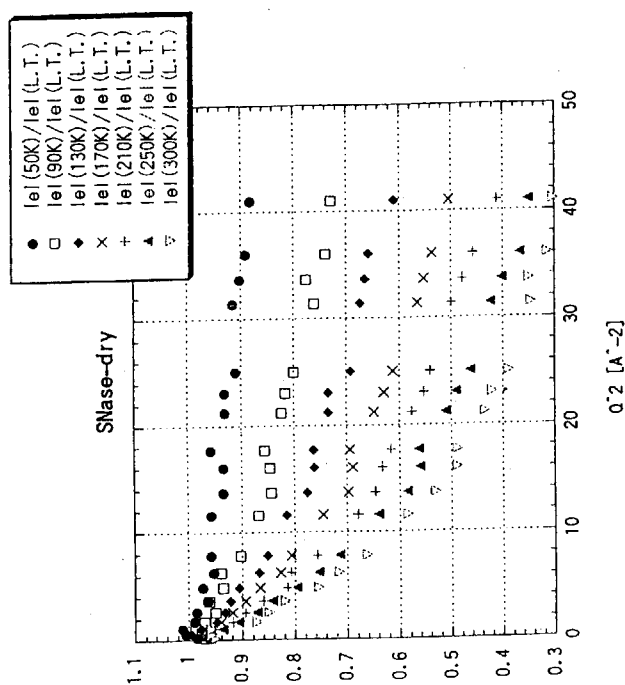
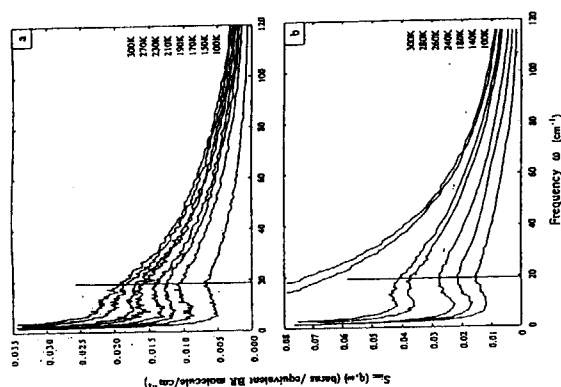
[illegible]

Fig. 2. Temperature dependence of the IINS observed on the IN6 time-of-flight spectrometer (energy resolution ≈ 100 μ eV). Data shown are for q (elastic) = 1.76 $\text{\AA}^{-1}$. Data were normalized by the scattering of a standard vanadium sample and by the mass of BR in each sample. "Dry" (a) and "wet" (b) samples are represented (see caption of Fig. 1).

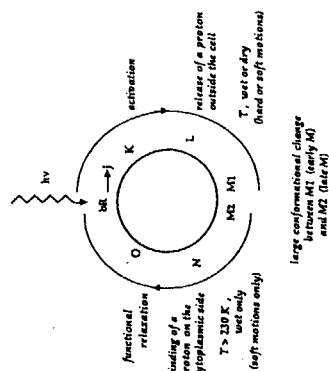
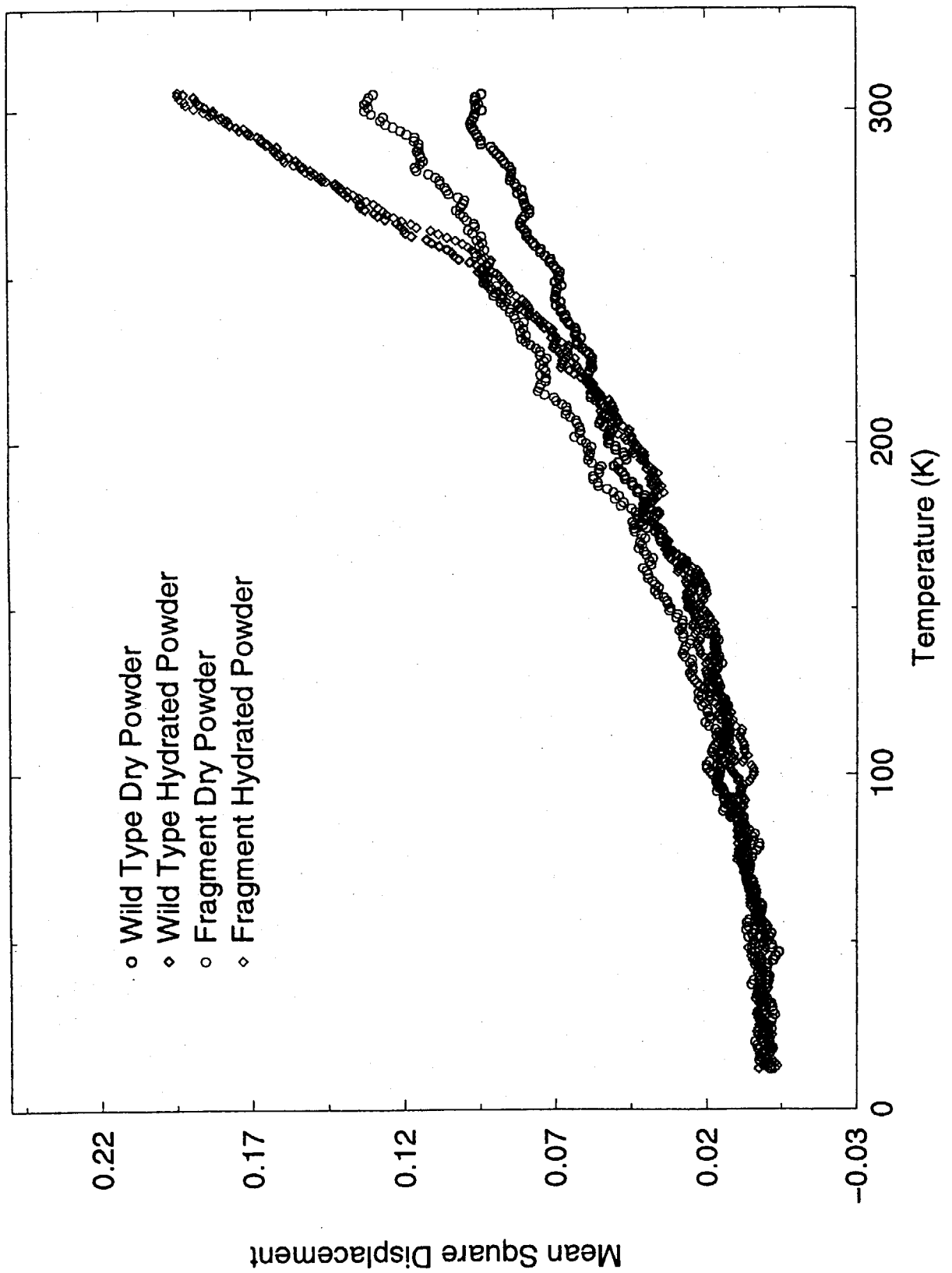
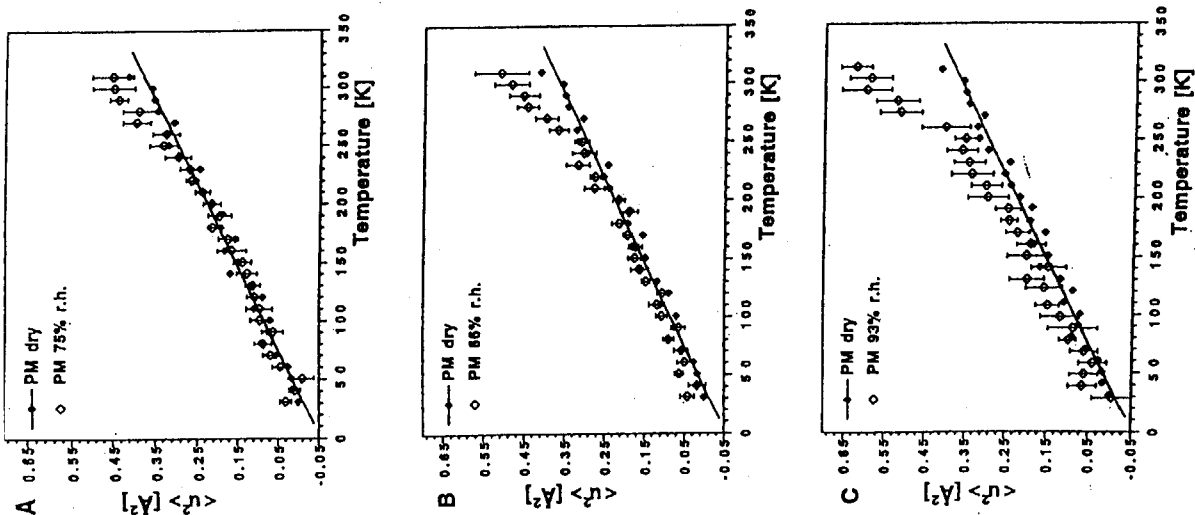


Fig. 3. Photocycle of BR shown schematically with the conclusions of the present study. bR, ground state of BR.





Distribution of Mean Square Displacement

It is assumed that the molecular motion in individual environment can be described within the Gaussian approximation. Then, the incoherent elastic scattering intensity $I_d(Q)$ is given by

$$I_d(Q) = \exp(-\alpha Q^2) \quad (1)$$

where α is defined as $\frac{1}{6} \frac{\langle u^2 \rangle}{\langle u^2 \rangle}$. Due to the heterogeneity of local environment, using a distribution $g(\alpha)$, $I_d(Q)$ is given by

$$I_d(Q) = \int_0^\infty g(\alpha) \exp(-\alpha Q^2) d\alpha \quad (2)$$

• Gaussian distribution

$$g_G(\alpha) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_G} \exp\left(-\frac{(\alpha - \bar{\alpha})^2}{2\sigma_G^2}\right) \quad (3)$$

where σ_G and $\bar{\alpha}$ are the standard deviation and average value of α , respectively.

$$I_d(Q) = \exp(-\bar{\alpha} Q^2 + \frac{A_0 \bar{\alpha}^2}{2} Q^4) \quad (4)$$

where A_0 is a non-Gaussian parameter defined as

$$A_0 = \frac{\bar{\alpha}^2 - \bar{\alpha}^2}{\bar{\alpha}^2} \quad (5)$$

A_0 is a dimensionless normalized standard deviation of the distribution of the mean square displacement.

• Bimodal distribution

$$g_B(\alpha) = p_1 \delta(\alpha - \alpha_1) + p_2 \delta(\alpha - \alpha_2) \quad (6)$$

where δ is a δ -function.

$$I_d(Q) = p_1 \exp(-\alpha_1 Q^2) + p_2 \exp(-\alpha_2 Q^2) \quad (7)$$

4.3 次期大強度パルス中性子源における装置開発への期待

群馬大学大学院工学研究科 平井光博
e-mail: hirai@sun.aramaki.gunma-u.ac.jp

プローブ走査型顕微鏡法や一分子実時間イメージング法などの進展により、個々の生体高分子の分子機械としての理解が一段と深化し、また、数十マイクロオーダーの結晶を用いた放射光X線結晶構造解析や溶液中での構造解析が可能なNMRなどの強力な手法も一般化している。このような状況にあって、次期大強度パルス中性子源の建設計画において、中性子散乱法のソフトマターの研究における有用性と他の手法との相補性を明確にするためには、上記の手法では測定が困難な生体高分子凝集系・分散系の集団挙動・機能を対象とした研究のさらなる展開が必要であり、従来から良く知られている特長（広いエネルギー・波長、高透過率、水素・重水素置換）のみならず中性子核スピンを有効に利用する散乱装置の開発と建設が欠かせない。中でも、建設が期待される装置としては、

1) 熱・冷パルス中性子超広角散乱装置

TOF法と広範囲の波長の中性子を利用する熱・冷パルス中性子散乱では、一度の測定で広角領域散乱データが測定可能 ($0.005 < q < 10$ ($1/\text{\AA}$)) であり、中性子溶媒コントラスト変化法などを利用して分子外形の散乱関数と分子内構造の散乱関数を分離し、非結晶状態（溶液中）での蛋白質分子内部の構造ドメイン間相関・配列や二次構造の外部環境変化（温度・圧力・溶媒条件等）に対する応答を解析する。

2) パルス中性子スピンエコー装置（偏極中性子）

生体高分子の機能発現状態と密接に結び付いた中・長距離の構造揺らぎ（1～100nm領域）とダイナミックス（低エネルギー励起、 $\sim$ neV領域）の空間的・時間的広がり（階層性）が測定可能な準弾性散乱装置（パルス中性子スピンエコー装置）の建設。

3) 動的核スピン偏極偏極冷中性子散乱装置（偏極中性子）

生体系に多く存在する超分子集合体の機能部位の構造解析や情報伝達系に見られる各種蛋白質の反応連鎖（相互作用と構造変化）の測定が可能な動的核スピン偏極（DNP）による偏極冷中性子散乱装置の建設。

や、生体膜間・膜面内の構造解析が可能な中性子反射率計の建設などが上げられる。3) 番目の装置は、もともと存在する分子内或は分子種（蛋白質、核酸、糖、脂質）ごとの水素原子の密度の差（揺らぎ）を核スピン偏極率を変えることで同一試料でコントラストを自在に変化させて（核スピンコントラスト法）、分子内構造や超分子複合体の特定部位（分子）の構造を *in situ* で選択的に測定できる他、溶液中で複数の蛋白質が関与する反応系において特定の蛋白質の構造を分離して測定できる、放射光X線では及ばない謂わば究極的な溶液散乱法であり、散乱強度も従来の中性子溶媒コントラスト変化法に比べて ~ 10 倍に増強可能である。次期大強度パルス中性子源の完成に至ってもなお十分とは言い難い中性子線強度を最大限有効に利用可能である。現実には ~ 10 倍の強度増加を達成するためには、水素原子の核スピンの高い偏極率（90%以上）が必要となる。直接、水素原子核スピンを偏極することは困難であるため

（0.05K, 2.5teslaでプロトン核スピン偏極率は5.1%）、常磁性電子の高い偏極率を核スピン・電子スピン間の双極子・双極子相互作用と磁気共鳴により核スピン系に移行させるために、従来では希釈冷凍機と常伝導電磁石が用いられてきた。最近開発されたヘリウムフリーの超伝導磁石（10tesla）を用いれば、装置や取り扱いが簡単な4.2Kにおいても $\sim 90\%$ 以上の核スピン偏極率が得られる上に、軽水素原子核と重水素原子核の核スピンの選択的脱偏極が極めて容易になる。このことは、例えば、一つの蛋白質内の特定の重水素化アミノ酸残基の位置情報を増強させて抽出可能になることを意味する。蛋白質低温結晶構造解析が隆盛の現在、ネイティブな構造状態を保持して4.2Kまでクエンチすることの技術的・生物学的な問題点は解決しているように思われる。分子系、超分子系、蛋白質複合反応系の静的構造のみならず、急速凍結による中間状態の解明にも展開が可能であろう。

いち楽観主義者？の

次期パルス中性子源への期待

群馬大学大学院工学研究科 平井光博
e-mail: hirai@sun.aramaki.gunma-u.ac.jp

従来から良く知られている特長（広いエネルギー・波長、高透過率、水素・重水素置換）のみならず中性子核スピンを有効に利用する散乱装置の開発と建設が欠かせない。
建設が期待される装置としては、

1) 熱・冷パルス中性子超広角散乱装置

TOF法と広範囲の波長の中性子を利用する熱・冷パルス中性子散乱では、一度の測定で広角領域散乱データが測定可能($0.005 < q < 10 (1/\text{\AA})$)であり、中性子溶媒コントラスト変化法などを利用して分子外形の散乱関数と分子内構造の散乱関数を分離し、非結晶状態（溶液中）での蛋白質分子内部の構造ドメイン間相関・配列や二次構造の外部環境変化（温度・圧力・溶媒条件等）に対する応答を解析する。

2) パルス中性子スピンエコー装置（偏極中性子）

生体高分子の機能発現状態と密度に結び付いた中・長距離の構造揺らぎ（1～100nm領域）とダイナミックス（低エネルギー励起、～neV領域）の空間的・時間的広がり（階層性）が測定可能な弾性散乱装置（パルス中性子スピンエコー装置）の建設。

3) 動的核スピン偏極偏極冷中性子散乱装置（偏極中性子）

生体系に多く存在する超分子集合体の機能部位の構造解析や情報伝達系に見られる各種蛋白質の反応連鎖（相互作用と構造変化）の測定が可能な動的核スピン偏極（DNP）による偏極冷中性子散乱装置の建設。

その他に、生体膜間・膜面内の構造解析が可能な中性子反射率計の建設などが上げられる。

放射光X線・中性子散乱法の相補性
(生体・高分子系への応用)

[放射光X線散乱・回折の特長]

短時間分割測定
微量試料、微結晶の構造解析
長波長X線領域の異常分散効果の利用 (MAD法)

[中性子散乱・回折の特長]

水素原子の「位置と動き」（静的・動的構造）の測定
各種コントラスト変化法の利用
低エネルギー励起の測定（数十meVからneV領域）

(放射光X線)

波の種類 : 電磁波
核スピン : 無し
エネルギー : 高い (12.4~2.1 keV)
波長 : 1.6 Å (1st)
速度 : 光速
散乱能 : 核外電子数に比例
H (0.28×10^{-12} cm)
D (0.28)
C (1.69)
N (1.97)
O (2.25)
P (4.23)
S (4.5)

実験法 : 重原子置換
異常分散 (MAD法)
弾性散乱

発生装置 : シンクロトロン
実験装置 : 小型化可能
入射線強度 : 大強度 (10^{14})

試料透過率 : 低い
試料損傷 : 大きい
試料必要量 : 少量
測定時間 : 短時間
例えば分子量1万の溶液試料
1wt%/0.05mL/5min. at PF
試料周囲 : 比較的狭い

特長 : 炭素の位置 (静的構造)

(中性子線)

波の種類 : 粒子波
核スピン : 有り
エネルギー : 低い (82~0.36 meV)
波長 : 1.15 Å (1st)
速度 : 396km/s 264 m/s (1A)
散乱能 : 核種に依存、核外電子数に無関係
H (-0.37×10^{-12} cm)
D (0.67)
C (0.67)
N (0.94)
O (0.58)
P (0.52)
S (0.28)

実験法 : 重水置換
各種コントラスト変化法
弾性・準弾性・非弾性散乱

発生装置 : 原子炉、加速器
実験装置 : 大型
入射線強度 : 弱い (10^{14})

試料透過率 : 高い
試料損傷 : 小さい
試料必要量 : 多量
測定時間 : 長時間
例えば分子量1万の溶液試料
1wt%/1mL/15hr. at JRR-3M
試料周囲 : 比較的広い

特長 : 水素の位置 (静的構造)
分子の低エネルギー励起 (動的構造)

熱・冷パルス中性子超広角散乱装置

が万能アイテム！！

溶液散乱法で得られる知見は、空間平均された等方的な構造情報に限られると思われがちであるが、広角領域散乱で得られたデータを領域別に解析することにより、回転半径に代表される分子外形の広がりやの情報が得られ、分子内部の構造ドメイン間相関・配列、二次構造に至る蛋白質構造の階層性を反映した広い実空間の構造情報を引き出すことが可能である。

即ち、分子量2万程度の蛋白質の場合、散乱領域別に

- 1) $2 > q > 1$ ($1/\text{\AA}$)領域には α ヘリックスや β シートの含量
- 2) $1 > q > 0.5$ ($1/\text{\AA}$)領域には構造ドメイン内のヘリックスやシート配列
- 3) $0.5 > q > 0.2$ ($1/\text{\AA}$)領域には構造ドメイン間相関
- 4) $0.2 > q$ ($1/\text{\AA}$)領域には分子外形の広がり

に関する構造情報がそれぞれ反映される。特に2~3Åの局所構造からドメイン間の構造領域の情報は、蛋白質の折り畳み機構の解明にとって重要である。

特に、TOF法と広範囲の波長の中性子を利用する熱・冷パルス中性子散乱では、一度の測定で上記の広角領域散乱データが測定可能($0.005 < q < 10$ ($1/\text{\AA}$))であり、加えて、中性子溶媒コントラスト変化法を利用して分子外形の散乱関数と分子内構造の散乱関数を分離できるため、非結晶状態(溶液中)での蛋白質分子内部の構造ドメイン間相関・配列や二次構造の外部環境変化(温度・圧力・溶媒条件等)に対する応答を解析できる。

装置の汎用性が高く、強者、大食漢。
放射光との相補性、競合熾烈。
開発的な要素が少なく、即、実現可能。

パルス中性子スピネコー装置 (偏極中性子)

が注目アイテム！！

生体高分子の機能発現状態と密度に結び付いた中・長距離の構造揺らぎ(1~100nm領域)とダイナミクス(エネルギー領域10neV~30ueV:時間領域 10^{-7} ~ 10^{-10} sec)の空間的・時間的広がり(階層性)が測定可能。

対象としては、生体膜の波状運動と細胞間相互作用、蛋白質のガラス転移・折り畳みなどが考えられる。

NSEは、マイクロエマルジョン系の変形拡散運動、高分子の蛇行運動、高分子ミセルの呼吸モード、過冷却液体のガラス転移などに関連して、大変重要な情報を与えることが既に示されており、生体高分子凝集系の集団挙動の物理的理解にも重要な情報を与えると期待されるが、応用例は少なく、その研究の展開には多くの経験と理論家を含めた協力が必要である。

疎遠気味の生物と物理の掛け橋。
装置の汎用性は低い、極めて繊細華麗。
パルスNESに関しては開発的な要素が多いが、実現可能。

動的核スピンの偏極偏極冷中性子散乱装置 (偏極中性子)

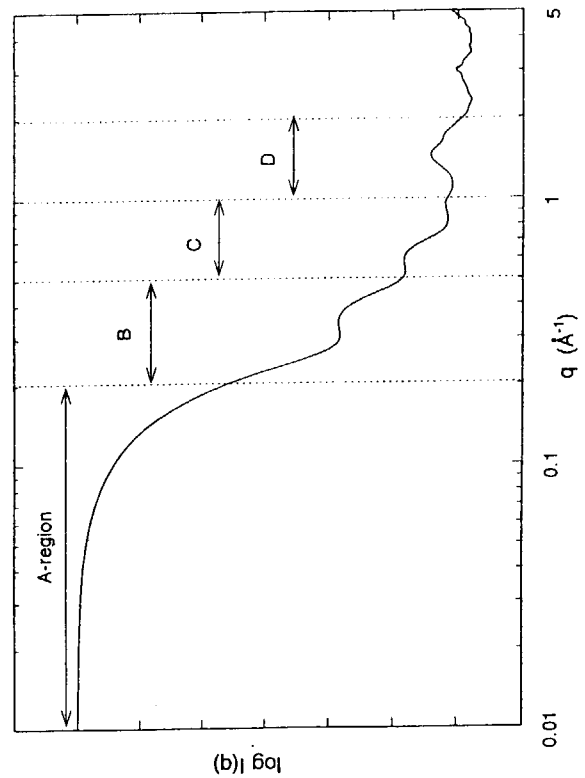
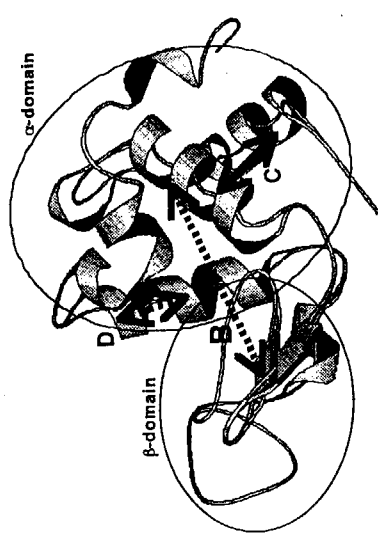
が究極アイテム！！

生体系に多く存在する超分子集合体の機能部位の構造解析や情報伝達系に見られる各種蛋白質の反応連鎖（相互作用と構造変化）の測定が可能。

- 1) 分子内或は分子種（蛋白質、核酸、糖、脂質）ごとの水素原子の密度の差（揺らぎ）を核スピン偏極率を変えることで同一試料でコントラストを自在に変化させて（核スピンコントラスト法）、分子内構造や超分子複合体の特定部位（分子）の構造を *in situ* で選択的に測定できる。
- 2) 溶液中で複数の蛋白質が関与する反応系において特定の蛋白質の構造を分離して測定できる、放射光 X 線では及ばない謂わば究極的な溶液散乱法。
- 3) 散乱強度を従来の中性子溶媒コントラスト変化法に比べて～10 倍に増強可能（90%以上の偏極率で）、中性子線強度を最大限有効に利用可能。
- 4) 軽水素原子核と重水素原子核の核スピンの選択的脱偏極により、一つの蛋白質内の特定の重水素化アミノ酸残基の位置情報を増強させて抽出可能。
- 5) 蛋白質低温結晶構造解析が隆盛の現在、ネイティブな構造状態を保持して 4.2K までクエンチすることの技術的・生物学的な問題は解決しているように思われる。分子系、超分子系、蛋白質複合反応系の静的構造のみならず、急速凍結による中間状態の解明にも展開が可能であろう。

打倒！放射光の切り札。
装置の汎用性は低い、極めて個性的。
開発的な要素は比較的少なく、実現可能。

Theoretical scattering profiles of lysozyme
by using Debye Equation



[Concept of Solvent Contrast Variation]

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_{\text{solute}}(\mathbf{r}) - \rho_{\text{solvent}}(\mathbf{r}) \quad \dots(1)$$

$$\rho_{\text{solute}}(\mathbf{r}) = \bar{\rho}_{\text{solute}} \rho_v(\mathbf{r}) + \rho_t(\mathbf{r})$$

$$\rho_{\text{solvent}}(\mathbf{r}) = \bar{\rho}_{\text{solvent}} \rho_v(\mathbf{r})$$

$$\rho_v(\mathbf{r}) = \begin{cases} 1 & \text{(for intramolecule)} \\ 0 & \text{(for extramolecule)} \end{cases}$$

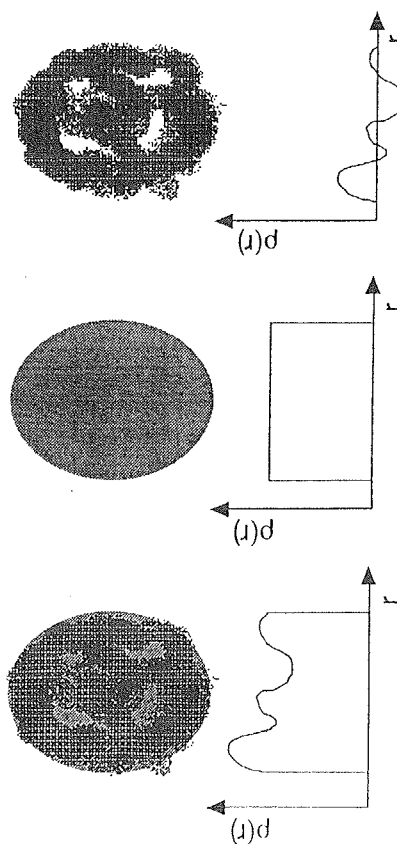
$$\int_V \rho_t(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = 0$$

$$\rho(\mathbf{r}) = (\Delta\rho)\rho_v(\mathbf{r}) + \rho_t(\mathbf{r}) : \Delta\rho = \bar{\rho}_{\text{solute}} - \bar{\rho}_{\text{solvent}}$$

.....(2)

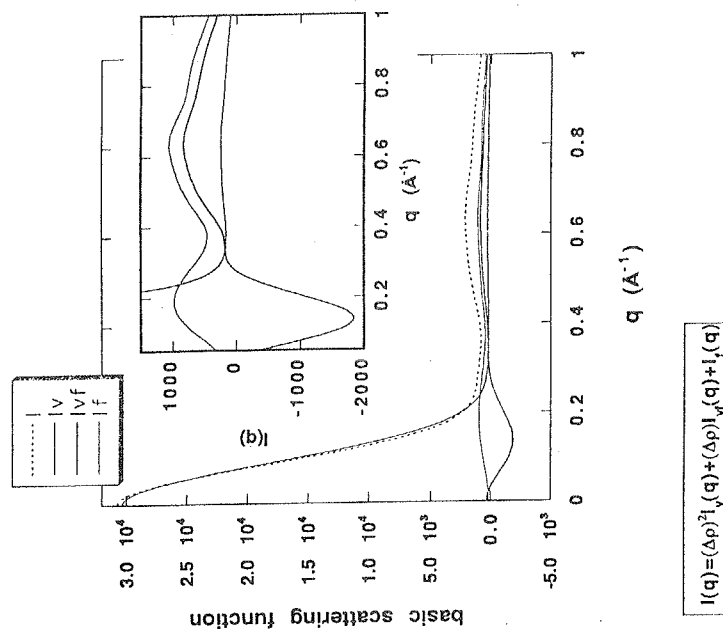
$$\rho(\mathbf{r}) = (\Delta\rho)\rho_v(\mathbf{r}) + \rho_t(\mathbf{r})$$

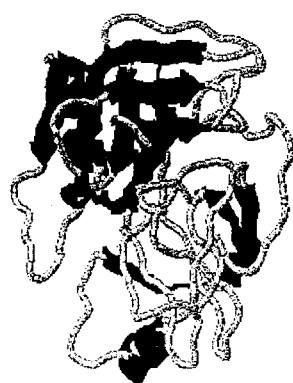
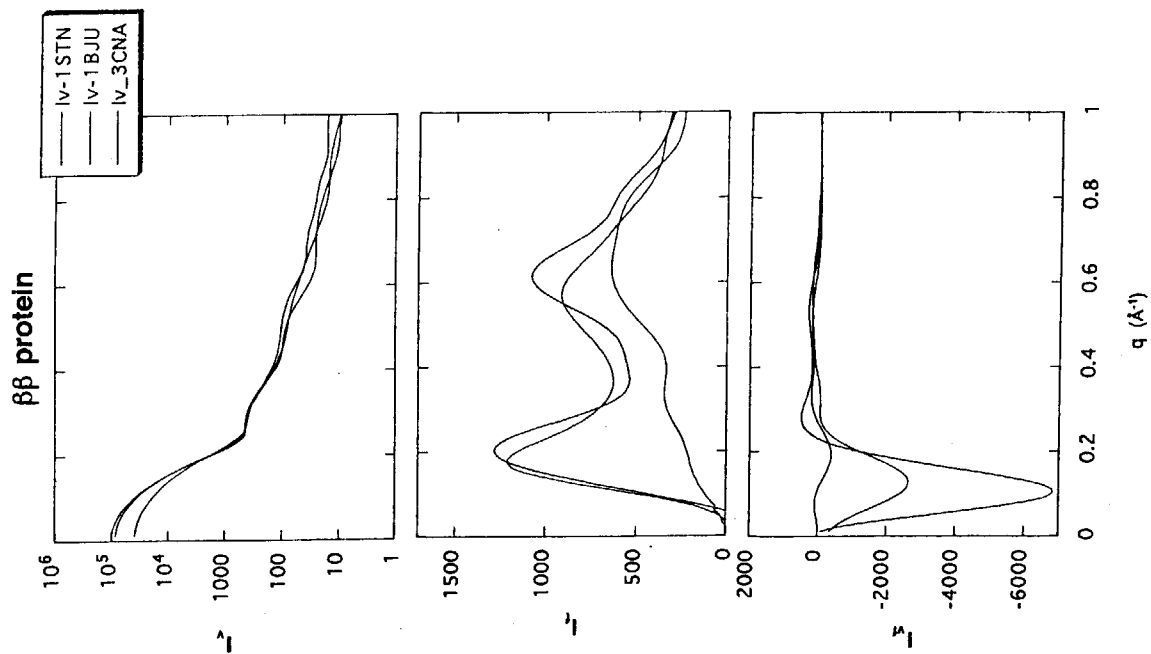
.....(3)



$$I(q) = \langle I(q) \rangle = \left\langle \left| \sum_i \rho(\mathbf{r}_i) \right|^2 \right\rangle = (\Delta\rho)^2 I_v(q) + (\Delta\rho) I_t(q) + I_t(q) \quad \dots(3)$$

Separated basic scattering functions by using theoretical scattering curves of lysozyme (6LYZ) at $D_2O=100, 80, 60\%$.





vi) Concept of spin contrast variation

Fermi scattering amplitude operator for a free nucleus:

$$a = b + 2B \cdot s \quad (1)$$

where s and I are the spin operators of the neutron and the nucleus.

For proton

$$b = [(I+1)b_{(+)} + Ib_{(-)}] / (2I+1) = -0.375 \cdot 10^{-12} \text{ cm}$$

$$B = (b_{(+)} - Ib_{(-)}) / (2I+1) = 2.91 \cdot 10^{-12} \text{ cm}$$

where the two eigenvalues b_{+} and b_{-} for the two different coupling channels $I+1/2$ and $I-1/2$.

Neutron differential cross section of a cluster:

A cluster with scattering centers at position r_i , nuclear spin polarization P , neutron polarization

$$\begin{aligned} P_{n_i} \frac{d\sigma}{d\Omega} &= \sum_i \left(|a_i|^2 \right) + \sum_{i \neq j} \langle a_i a_j^* \rangle \exp[-iq \cdot (r_i - r_j)] \\ &= \sum_i \left[\langle |a_i|^2 \rangle - \langle a_i a_j \rangle_{i \neq j} \right] + \langle a_i a_j^* \rangle_{i \neq j} \sum_{ij} \exp[-iq \cdot (r_i - r_j)] \\ &\equiv \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{inc} + \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{coh} \end{aligned}$$

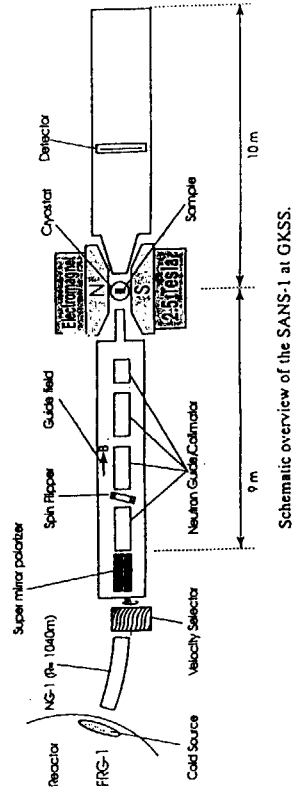
whence

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{inc} = \sum_i B_i^2 [I_i(I_i+1) - P_n P_{i,i} - P_i^2 I_i^2]$$

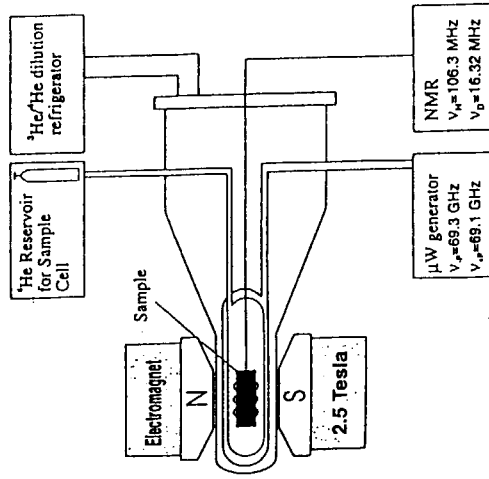
$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{coh} = |U(q)|^2 + 2P_n \Re[U(q)V(q)] + |V(q)|^2$$

$U(q)$ and $V(q)$ are the coherent scattering amplitudes obtained by the Fourier transforms of the invariant part $U(r)$ and the polarization-dependent part $V(r)$.

偏極中性子散乱装置と核スピン偏極ターゲット

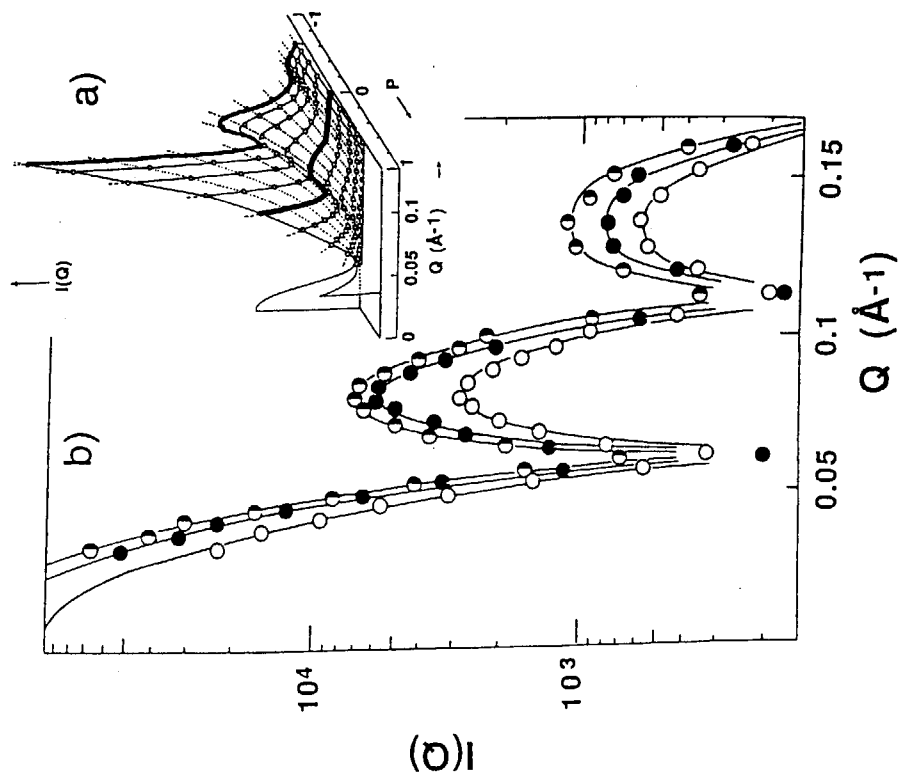


Schematic overview of the SANS-1 at GKSS.

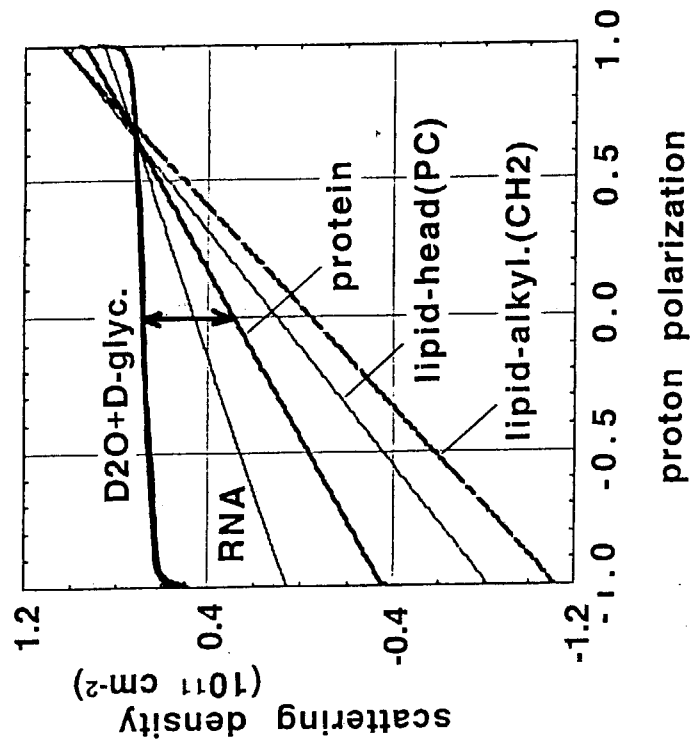


Schematic overview of the polarized target station

apoferritinの散乱長数の陽子偏極率依存性



平均散乱密度の陽子偏極率依存性 ($P_a=1$)

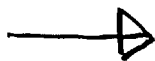


中性子スピリエコーの原理

$$G(r, t) \xleftrightarrow{f_r} I(q, t) \xleftrightarrow{f_t} S(q, \omega)$$

$$I(q, t) = \frac{1}{N} \sum_{ij} \langle \exp(iq \cdot r_i(t)) \exp(-iq \cdot r_j(0)) \rangle$$

$$= \frac{1}{N} \sum_{ij} \exp\left[-\frac{q^2}{6} \langle \{r_i(t) - r_j(0)\}^2 \rangle\right]$$



$$= I(q, 0) \exp(-\Gamma(q)t)$$

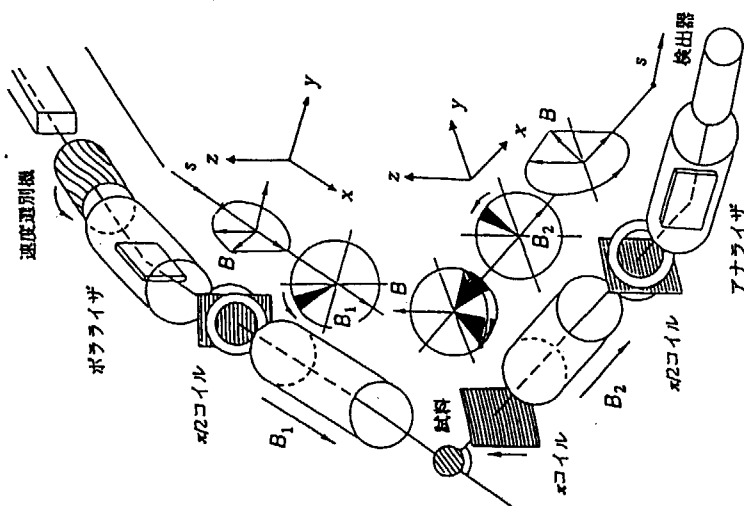
$$\Gamma(q) = D_{\text{eff}} q^2$$

for simple Brownian motion

$$D_{\text{eff}} = D$$

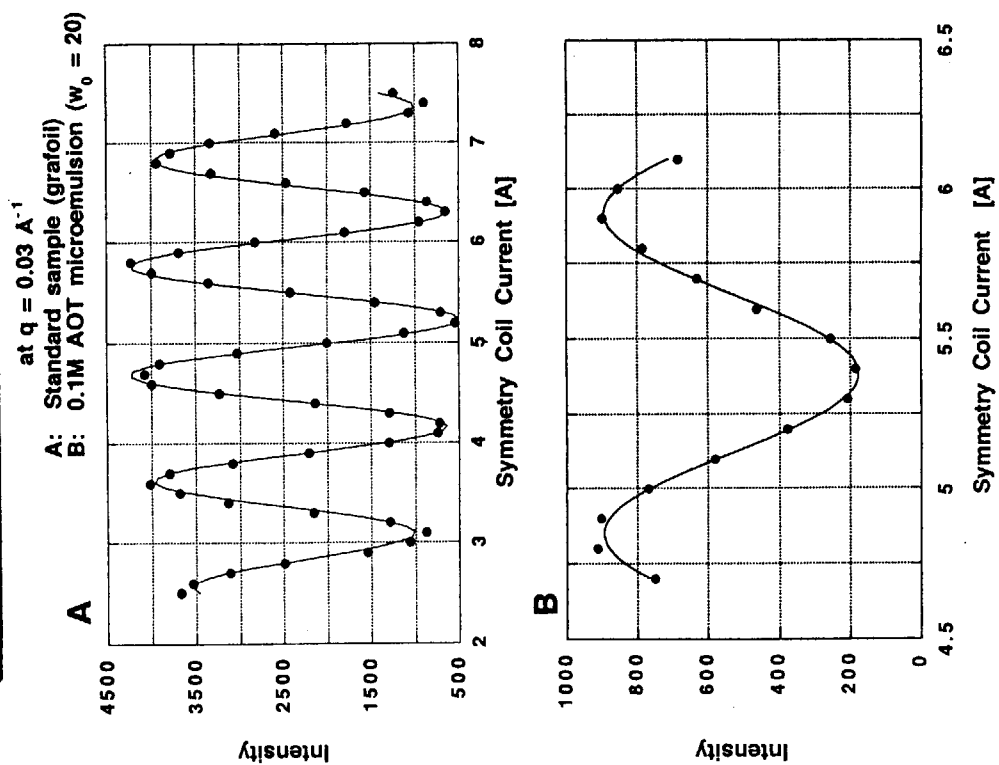
for microemulsion with bending motion

$$D_{\text{eff}} = \frac{\Gamma(q)}{q^2} = D + \frac{\Gamma_{\text{bend}}(q)}{q^2}$$



NSE 装置 (ILL-IN11) の概念図

Observed NSE signal intensity
as a function of the symmetry-coil current



$$P_{NSE} = I_A/B_I$$

$$I = A \exp[-a(i-i_0)^2 \cos[b(i-i_0)]] + B$$

4.4 中性子構造解析によるニワトリ卵白リゾチームの水素結合 峯崎 善章, 新村 信雄 (原研先端 基礎研究センター)

我々は中性子ラウエ回折計 (LADI) で収集したニワトリ卵白リゾチームの構造解析を行い、水素原子 960 個、水和水 157 個を決定した¹⁾。その後解析が進み、現在水和水 248 個を同定することが出来た²⁾。今回はこれらの結果を元にタンパク質内の水素原子を含めた水素結合の解析を報告する³⁾。

中性子解析によって決定された水素原子の位置と幾何学的に理想的な計算による水素原子の位置を比較したところ、水素結合に寄与しない水素原子位置の差に比べ、水素結合に関与している水素原子位置の差は一桁以上大きいことがわかった。

タンパク質の二次構造の形成・安定に重要な、N-D...O 型 (重水結晶を解析したため軽水から重水に置換している) の主鎖間の水素結合について水素結合距離、水素結合角の解析を行ったところ、水素供与体と水素受容体の距離は約 3Å と平均的な結合距離を示したが、水素原子-水素受容体間の距離は約 2.2Å と平均距離 2Å よりも長い傾向を示した。結合角を調べたところ 145 度付近にピークを持つ比較的ブロードな分布を示し直線型の 180 度のものはほとんどなかった。基本的な二次構造の枠組みである α ヘリックス中においても同様の傾向を示し、教科書にあるように直線的ではなくある程度の角度を持っていることがわかった。

次に通常水素結合として議論される一重水素結合 (X-H...Y) 以外の水素結合の解析を行った。二股及び三股水素結合の解析を行った結果、すでに報告されている低分子結晶内の二股及び三股水素結合の確率よりもタンパク質内でのそれは高いことがわかった。これは球状型タンパク質内では多くの水素結合アクセプターやドナーが密接して存在するので、二股及び三股水素結合を形成する可能性が低分子結晶より高いためと考えられる。 α ヘリックスや β シート内でもかなりの数の二股及び三股水素結合が見い出された。

次に主鎖の N-D...C=O 間の水素結合を解析したところ、圧倒的に n 番目の C=O と $n+3$ 番目と $n+4$ 番目の残基と水素結合を形成していることがわかった。これを ($n - n+3$) 型、($n - n+4$) 型水素結合と呼び、($n - n+4$) 型は典型的な N-D...O 型水素結合の値を示したが、($n - n+3$) 型は水素結合距離、結合角共に大きい傾向を示した。

今までのことを総合して考えると以下の結論が得られた。 α ヘリックスはエネルギー的にもっとも安定な直線 ($n - n+4$) 型の単純水素結合によって形成されているのではなく、実際にはほとんどの結合がある結合角を持ち、($n - n+3$) 型、($n - n+4$) 型の二股水素結合をとっていることがわかった。また二股結合をとってはいるがやはり ($n - n+4$) 型が主であり、($n - n+4$) 型がずれることにより ($n - n+3$) 型の水素結合を形成し二股水素結合を形成していることがわかった。

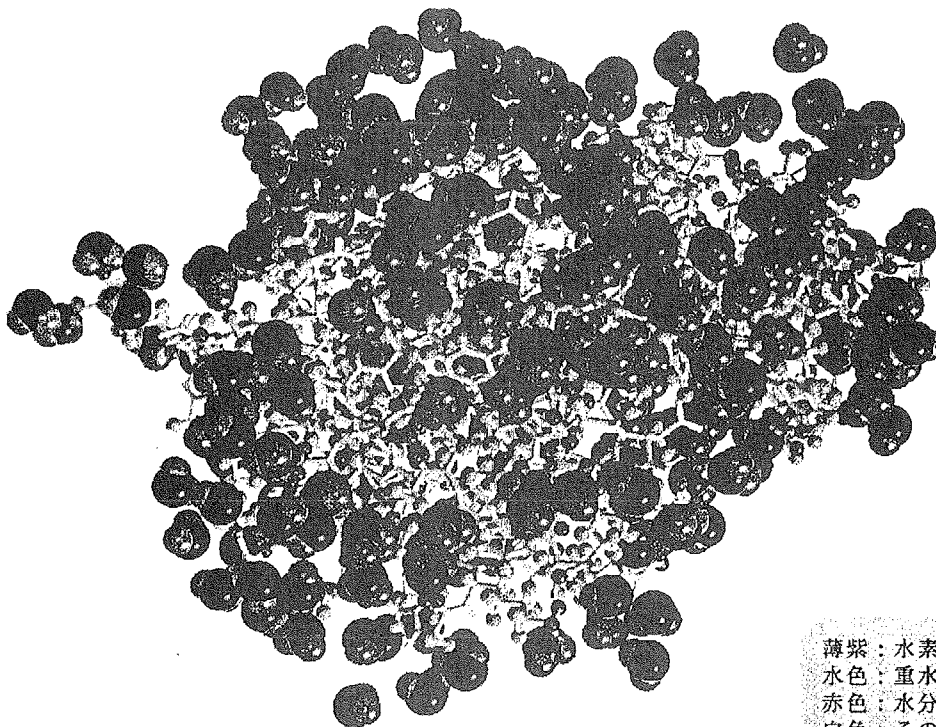
1) N.Niimura, Y.Minezaki, T.Nonaka, J.-C. Castagna, F.Cipriani, P.Høghøj, M.S. Lehmann & C. Wilkinson, Nature Struct. Biol. 4 (1997) 909-914

2) Y.Minezaki, T. Nonaka, N.Niimura, J. Phys. & Chem. Solids (1999) 1387-1391

3) Y.Minezaki, N.Niimura, in preparation

中性子結晶構造解析で見た水和構造

日本原子力研究所
中性子構造生物学研究グループ
峯崎善章



薄紫：水素
水色：重水素
赤色：水分子の酸素
白色：その他の原子

初期モデル

X線で我々が独自に決めた
NiCl₂単結晶の座標を用いた

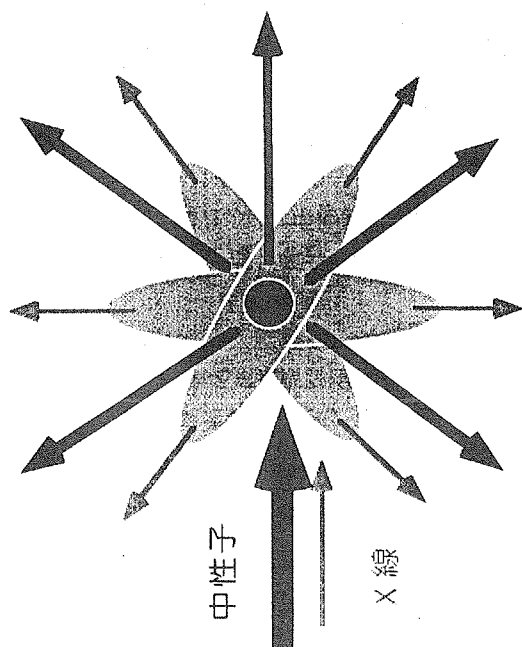
タンパク質中の C,O,N,S : 1012
(水分子の O : 142)

最新モデル

248個の水分子を付加
R-factor = 20.7%

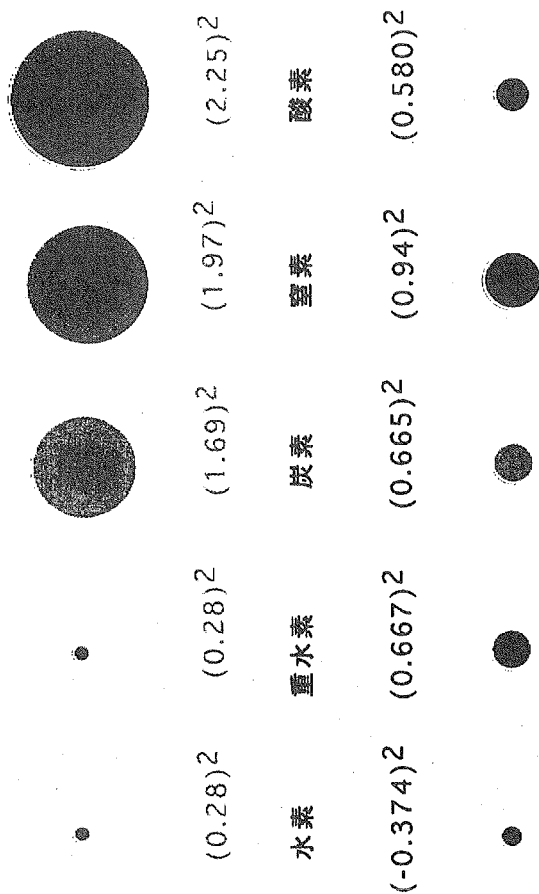
タンパク質中の C,O,N,S : 1012
タンパク質中の H,D : 960
水分子 (D₂O) 248×3 : 744

X線と中性子の散乱の違い



X線は電子と相互作用し、
中性子は原子核と相互作用
して散乱する

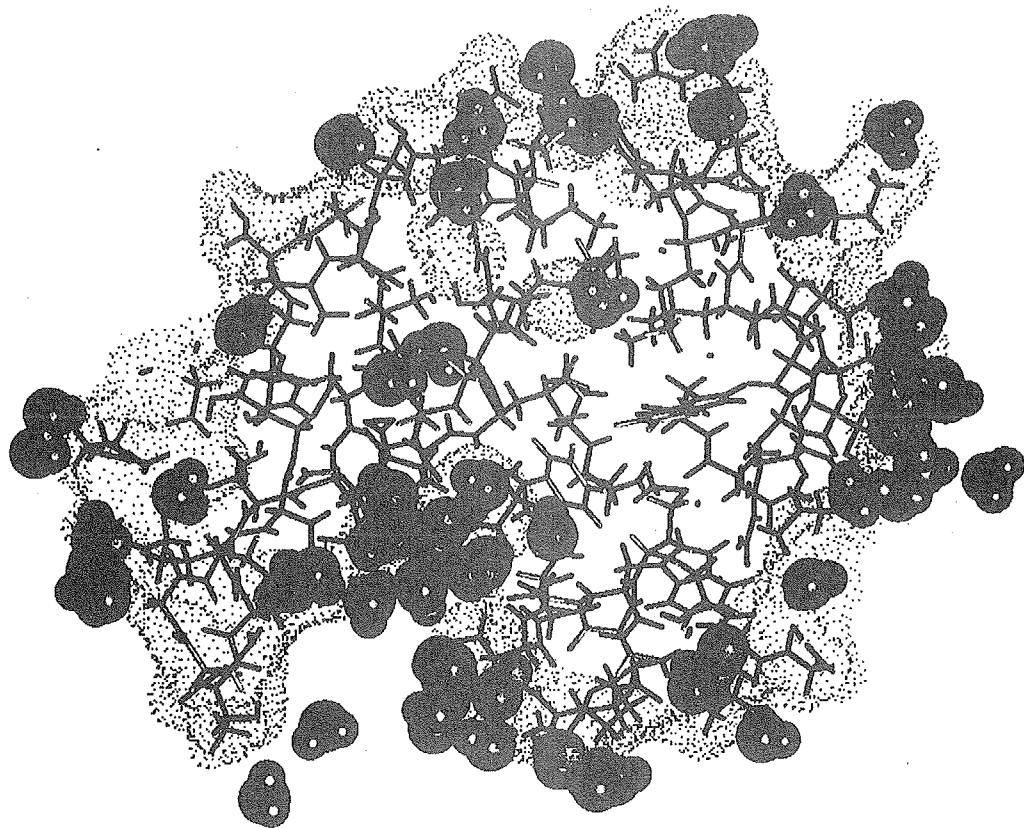
X線



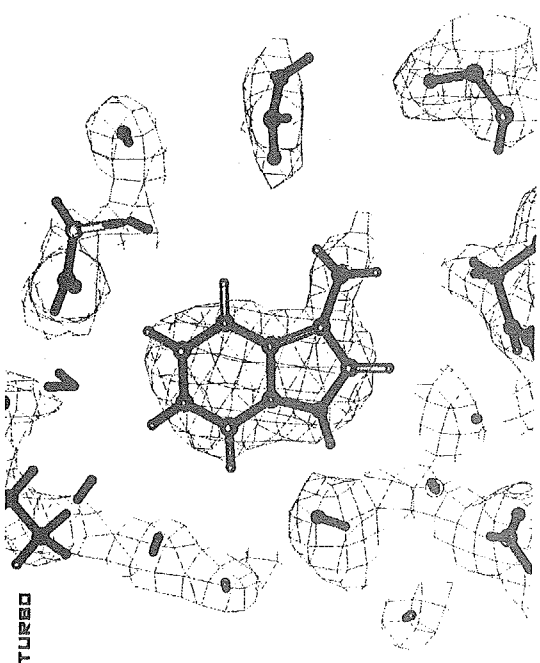
単位: 10^{-12} cm

円の大きさは各原子からのX線及び
中性子の散乱の強さを示す

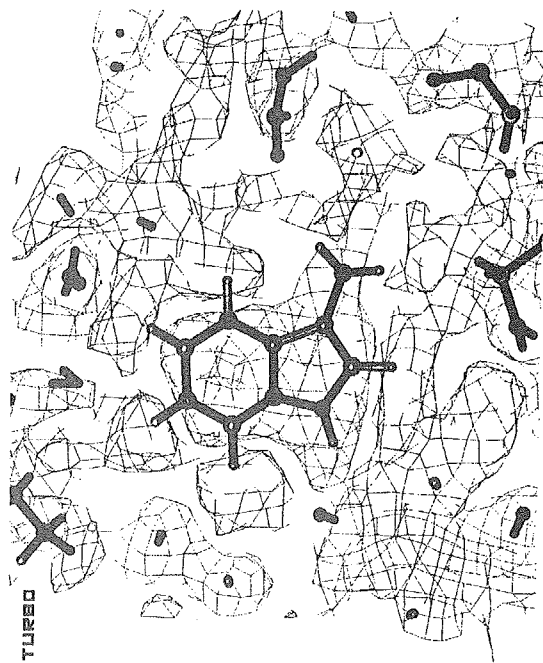
中性子



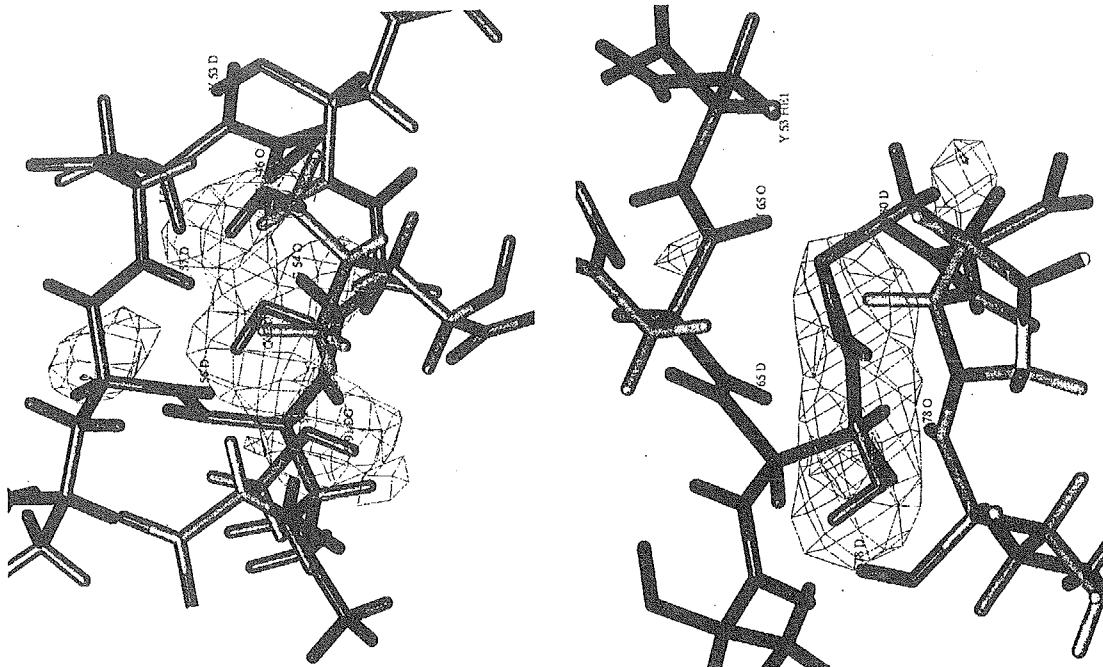
X線による Fo-map (Trp111, green:1 σ)



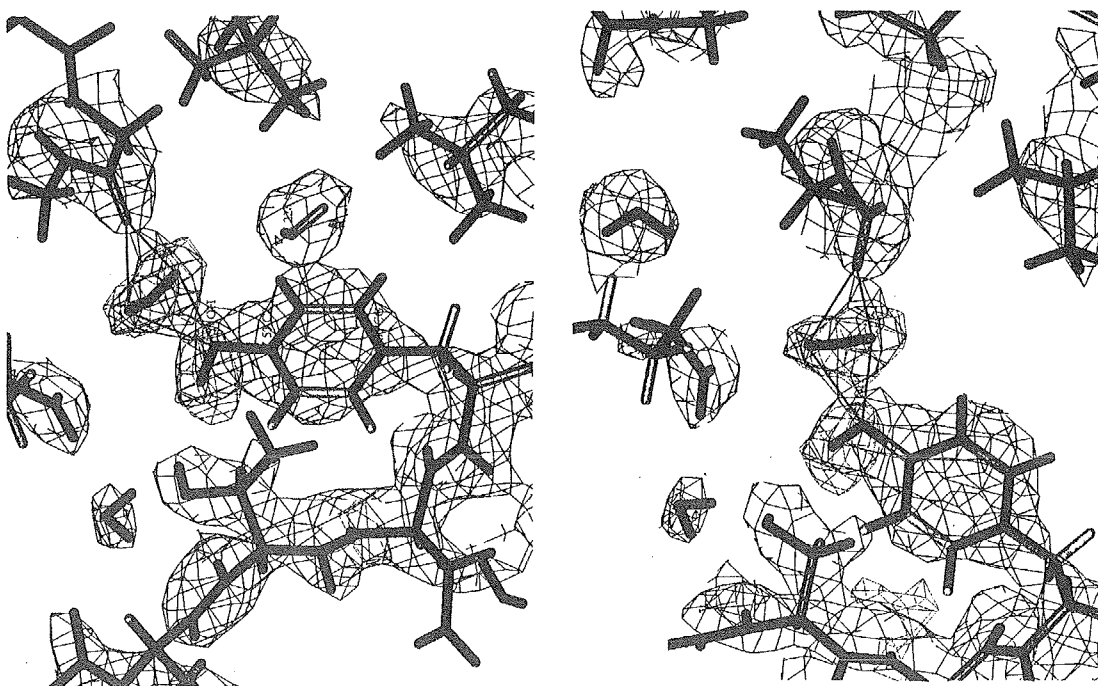
中性子によるFo-map (Trp111, blue:1 σ , red:1 σ)



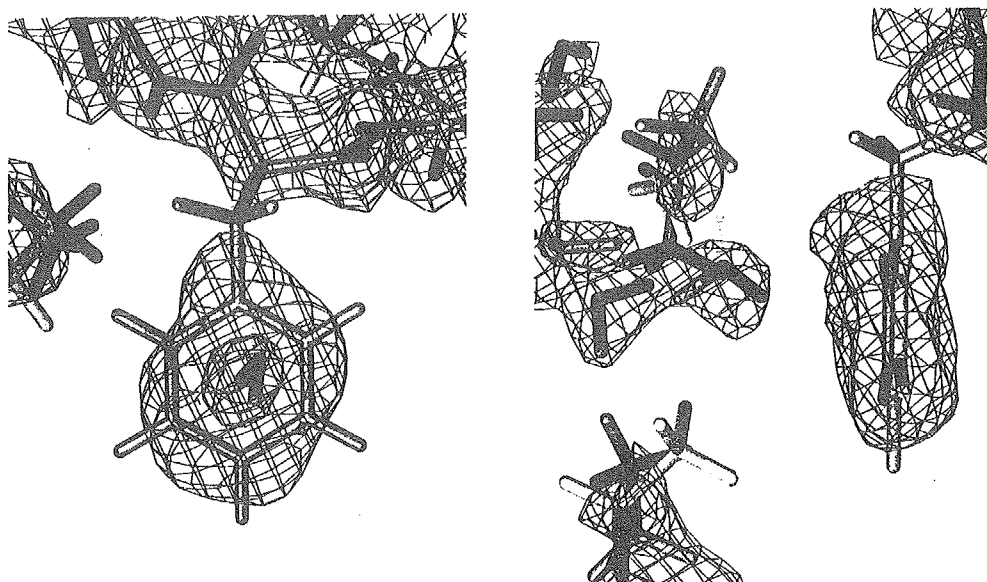
DOD 221&336, 372&373 周辺の omit map



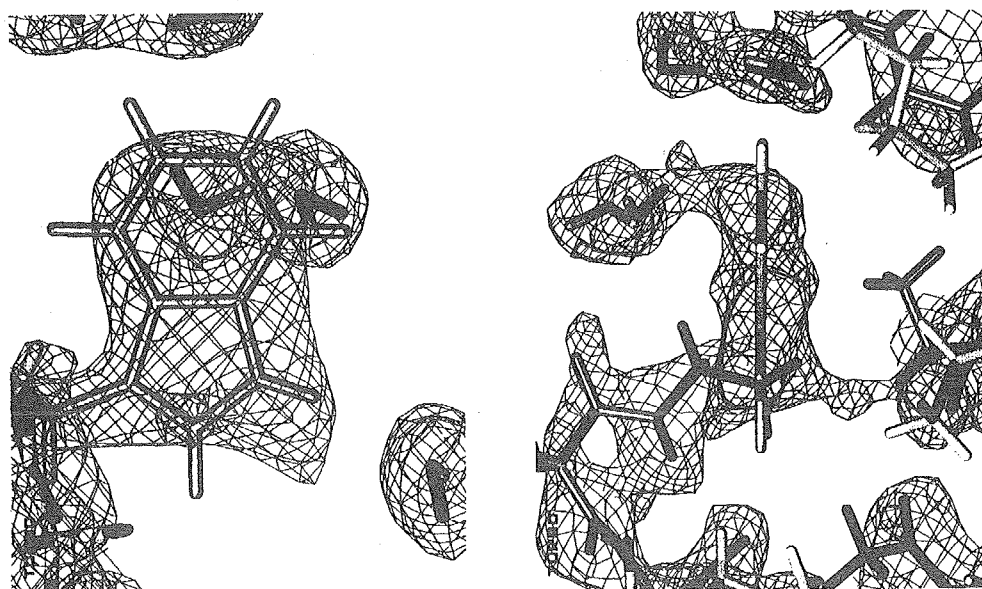
Tyr 53 周辺の Fo-map, omit map



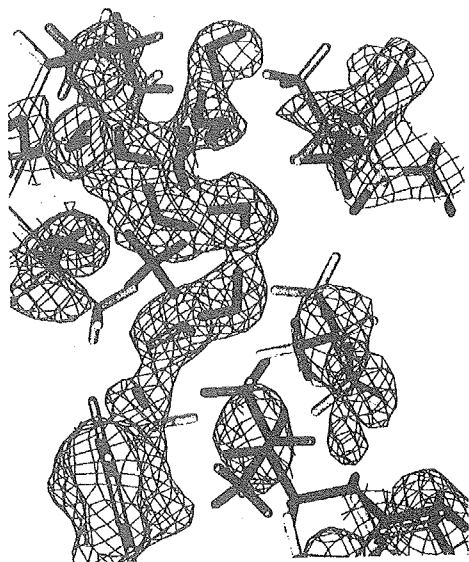
Water molecule on PHE 003



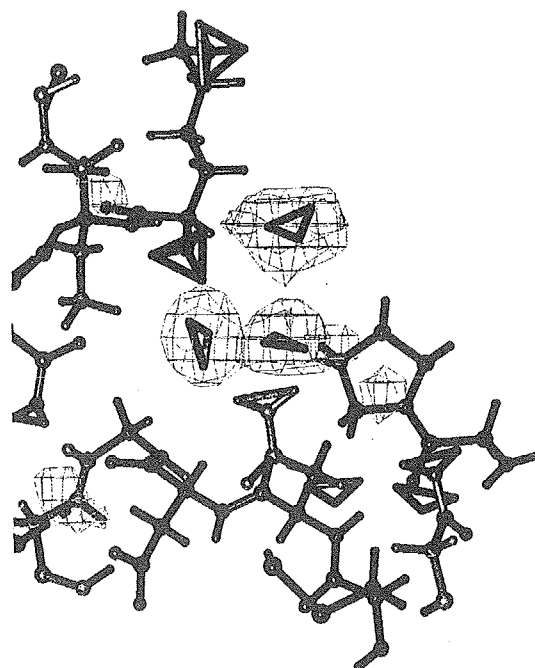
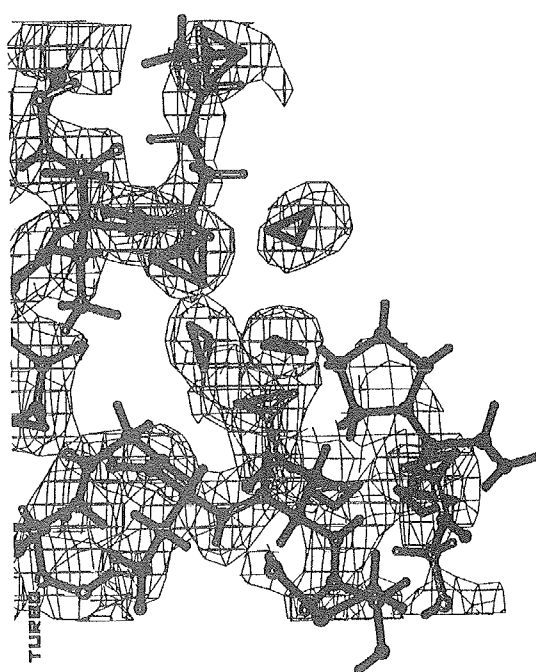
Water on TRP123



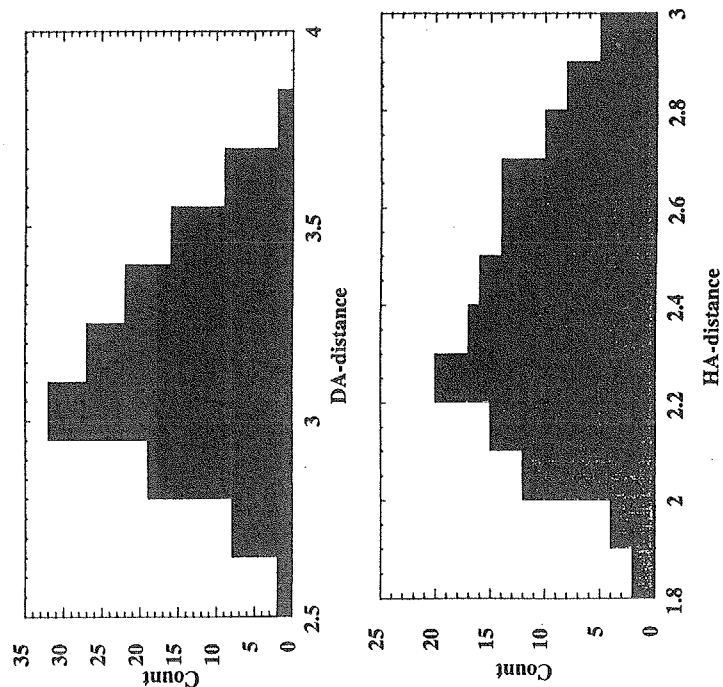
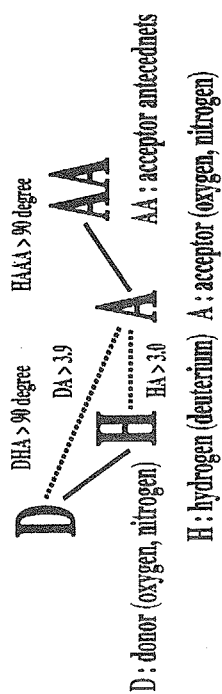
Water structure around hydrophobic residue



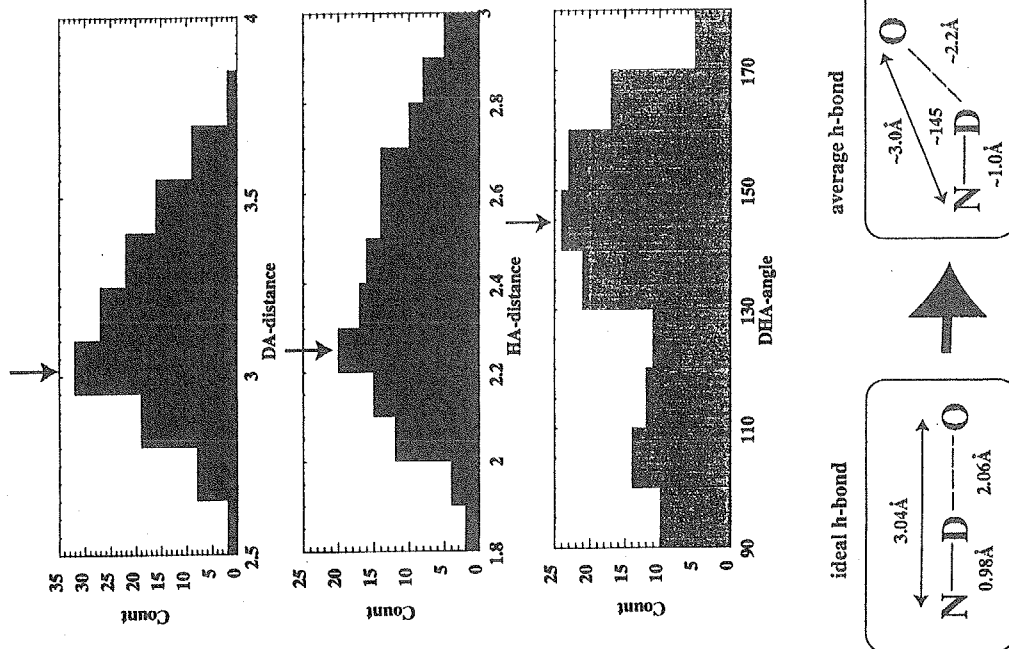
DOD 200, 201, 204 1Åの Fo-map, omit map



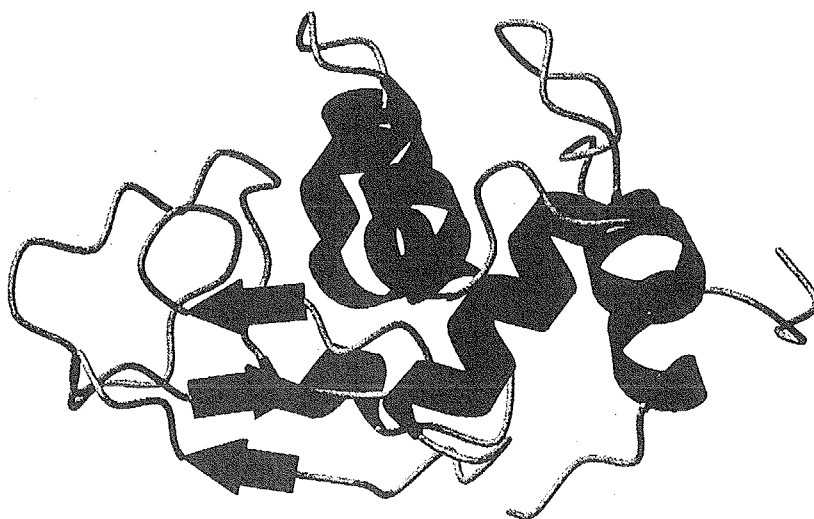
The definition of hydrogen bond



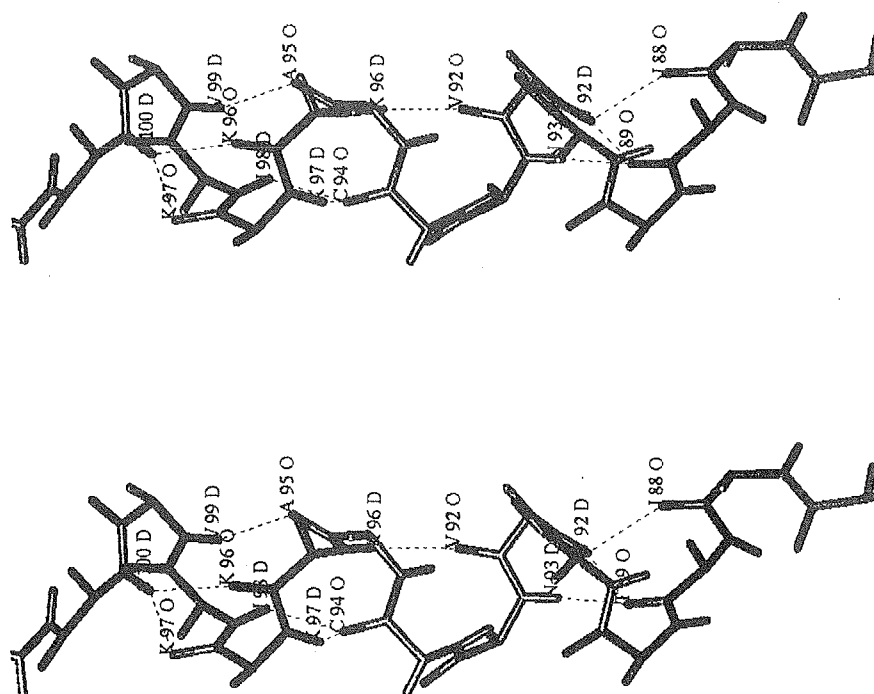
all N-D...O type hydrogen parameters



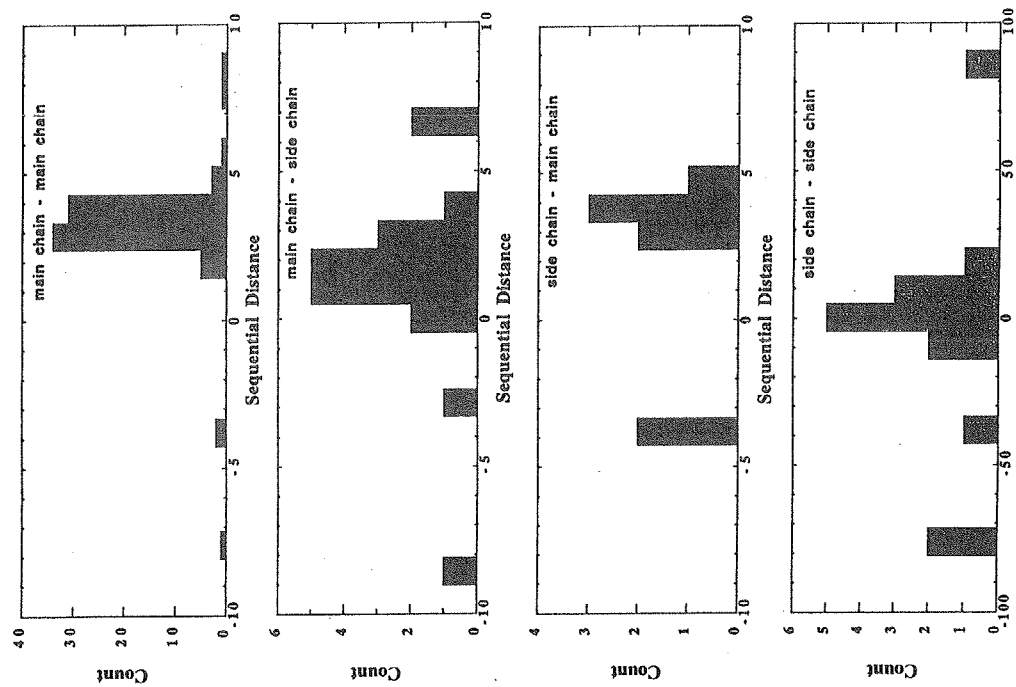
2ndary structure of HEW-lysozyme



2ndary structure	Residue-Number
Alpha-helix	5-14, 25-36, 80-84, 89-99, 104-114, 120-123
Beta-strand	43-45, 51-53, 58-60
loop-region	16-24, 65-73, 74-79, 85-87, 102-108, 116-119, 125-129



Sequential Distance of hydrogen bonds of MS, MS, SM, SM, SS



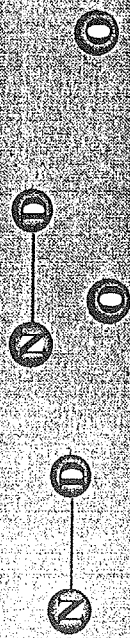
A summary of intramolecular hydrogen bonds by the number of hydrogen bond

category	N-D...O	O-D...O	O-D...N	others
single	71	40	1	3
bifurcated	50	18	0	0
trifurcated	5	7	0	0

single hydrogen bond



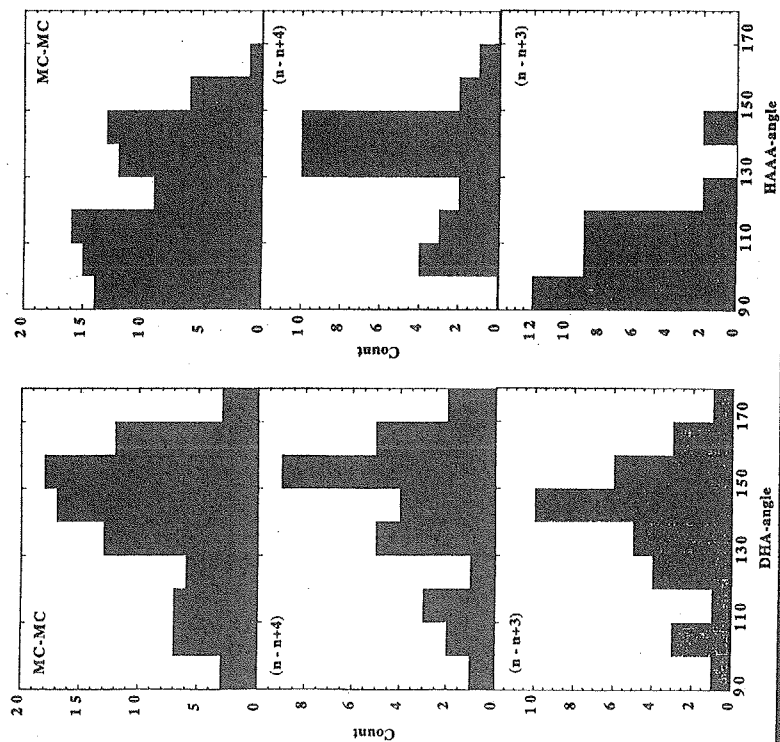
bifurcated hydrogen bond



trifurcated hydrogen bond

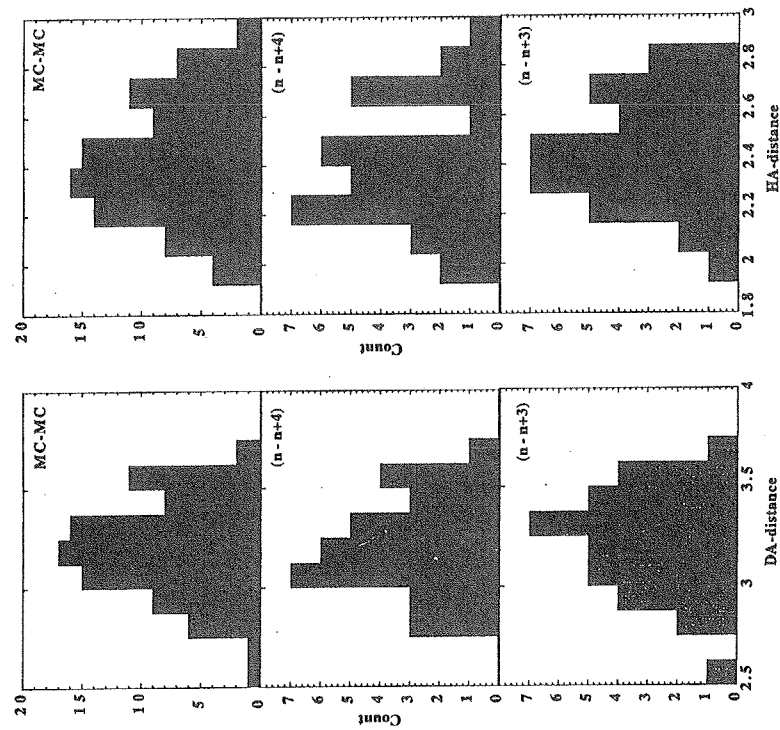


The Hydrogen Bond Parameters
(MC-MC) vs ($n - n+4$) vs ($n - n+3$)



DHA-angleについて ($n-n+4$) が150度付近にピークをもつものに対し、($n-n+3$) は140度付近にピークを持つ。HAAA-angleについてはまったく違う分布をとり、($n-n+4$) が140度付近にピークをもつものに対し、($n-n+3$) は90度付近にピークを持つ。

The Hydrogen Bond Parameters
(MC-MC) vs ($n - n+4$) vs ($n - n+3$)



DA-distance、HA-distanceともに ($n - n+4$) は ($n - n+3$) よりも0.1Å程度長い傾向がある。

中性子で何がわかったか

水素 9 6 0 原子を決定

- 1) タンパク質の半分は水素原子
⇒ 水素原子を含めた全構造の決定
- 2) 水素原子位置を決定
⇒ 水素結合様式の詳細な研究

水和水 2 4 8 分子を決定

- 1) 中性子では水分子の散乱が大きい
⇒ 様々な水和水が見つかった
⇒ 疎水基周辺の水和構造
- 2) 方位を含めた詳細な水和構造の決定
⇒ 親水基周辺と疎水基周辺の水和構造の違い

4.5 低温X線蛋白質結晶解析

科学技術振興事業団さきがけ
東京大学分子細胞生物学研究所
中迫雅由

低温X線蛋白質結晶解析は、X線露光時の蛋白質結晶の放射線損傷を著しく低減できるという技術的な側面と、蛋白質の周囲に存在する水和水の検出を十分可能にすると言う基礎化学的な側面を有する。ここでは、この技術のあらましを述べると共に、最近行った筋小胞体カルシウムポンプの結晶構造解析での同技術の適用を示す。

また、水和構造研究の例として様々な水溶性蛋白質への適用例と、それから得られた蛋白質水和構造の新たな描像について解説する。

参考文献

- (1) 中迫雅由 (1999) 低温蛋白質結晶構造解析 日本結晶学会誌 **41**, 57-65.
- (2) Nakasako, M. (1999) Large-scale Networks of Hydration Water Molecules Around Bovine β -Trypsin Revealed by Cryogenic X-ray Crystal Structure Analysis. *J. Mol. Biol.*, **289**, 547-564.
- (3) Nakasako, M., Takahashi, H., Shimba, N., Shimada, I., and Arata, Y. (1999) The pH-dependent Structural Variation of Complementary-determining Region H3 in the Crystal Structures of the Fv Fragment from an Anti-dansyl Monoclonal Antibody. *J. Mol. Biol.*, **291**, 117-134.
- (4) Nakasako, M., Odaka, M., Yohda, M., Dohmae, N., Takio, K., Kamiya, N., and Endo, I. (1999) Tertiary and Quaternary Structures of Photoreactive Fe-Type Nitrile Hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771: Roles of Hydration Water Molecules in Stabilizing the Structures and the Structural Origin of the Substrate Specificity of the Enzyme. *Biochemistry*, **38**, 9887-9898.
- (5) Nagashima, S., Nakasako, M., Dohmae, N., Tsujimura, M., Takio, K., Odaka, M., Yohda, M., Kamiya, N., and Endo, I. (1998) Novel Non-heme Iron Center of Nitrile Hydratase with a Claw Setting of Oxygen Atoms. *Nature Structural Biology* **5**, 347-351.

5. 新しい実験のために その1 X線

5.1 放射光光源

SPring-8/JASRI 八木直人

シンクロトロン放射光がX線小角散乱実験に使われるようになってから20年以上が経過した。当時は第二世代放射光源という偏向電磁石からの放射光を利用する放射光リングが一般的だった。このようは放射光施設では、偏向電磁石からの放射光を水平方向になるべく多く集めることが小角散乱ビームラインの設計では最良と考えられた。これには湾曲したモノクロメータを利用するのが一番であり、上下方向の収束はミラーで行う設計が一般的である。このような設計のビームラインはPFのBL15Aを始めとして世界にいくつもあつた。高いフラックスを得るにはなるべく光源近くにモノクロメータを置いて横方向に広く放射光を集めることが効率的であり、この設計の最終モデルといえるのが英国SRSのビームライン16.1である。

第二世代放射光も偏向電磁石だけを利用する時代は終わって、今では挿入光源を利用するのが一般的となっている。PFのBL16Aは小角散乱用ではないが、その一例である。しかし第二世代放射光リングは一般にあまり長い直線部を持っていないため、短めのウィグラーを波長シフターとして使っているSRSの16.1のようなビームラインもある。

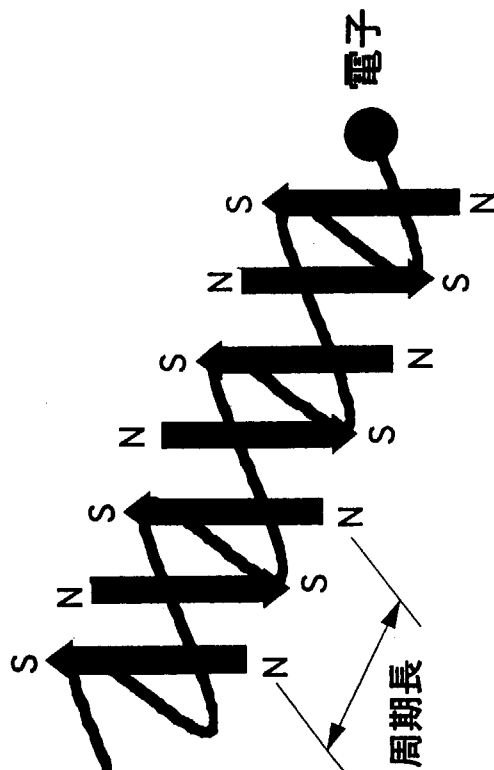
第三世代放射光リングは、挿入光源の利用を最初から考えた低エミッタンスリングである。一般に第三世代リングは周長が大きいので、最初の光学素子が光源から遠くなるので偏向電磁石を利用する場合でも第二世代リングのように水平方向のフラックスを横振りのモノクロメータで集めると効率が悪くなる。したがってダブルモノクロメータで単色化して、KBミラーまたはトロイダルミラーで集光するか、モノクロメータの第二結晶で水平方向をサジタル集光することが多い。挿入光源としては、ESRFのような比較的低エネルギーのリングではウィグラーも使われるが、SPring-8のような高エネルギーリングでは熱負荷の問題からアンジュレータがほとんどである。第三世代放射光のアンジュレータビームラインは光源が小さいことからビームの収束が非常に良い。さらに最近ミラーの質が向上したためミラーを非対称に置いて縮小光学系を実現することが容易になっており、垂直方向の焦点サイズは数10ミクロンが実現されている。これは小さなサンプルを用いた時分割実験に適しているが、試料の放射線損傷や検出器の整備などまだ検討すべき課題も残っている。

4. アンジュレータ

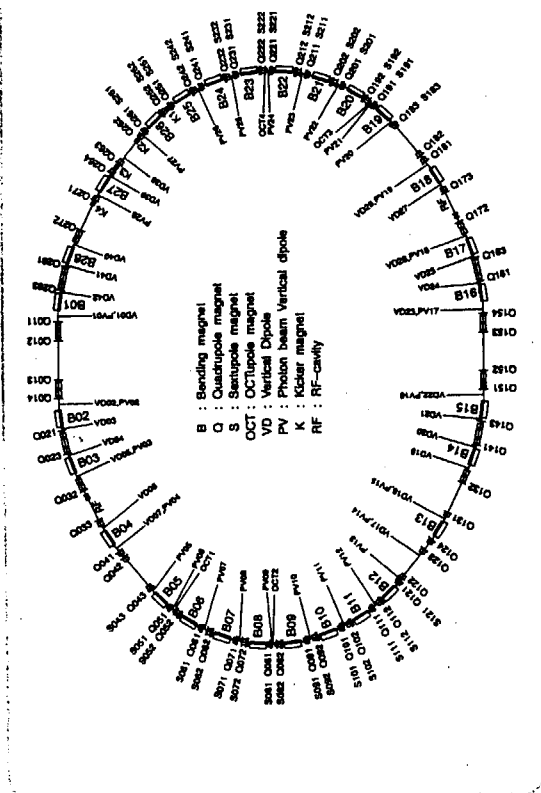
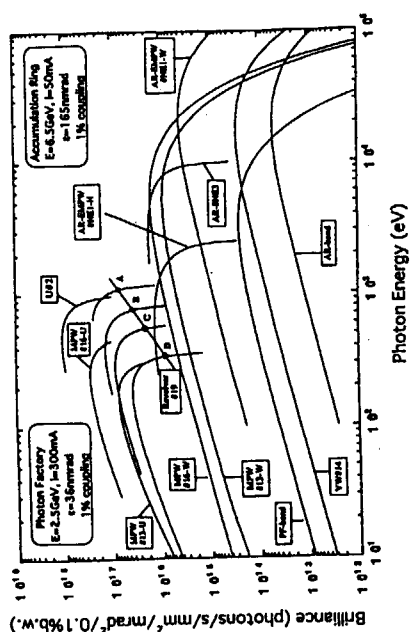
4.1 アンジュレータとは

アンジュレータ磁場における電子の蛇行運動

磁場が高いと蛇行の角度大 (比例)
 周期長が長いと蛇行の角度大 (比例)
 エネルギーが高いと蛇行角度小 (反比例)



SPRING-8のアンジュレータでは
 蛇行角度は0.00001radianから0.0002radian程度
 振幅 (サイン波の高さ) は1ミクロン程度



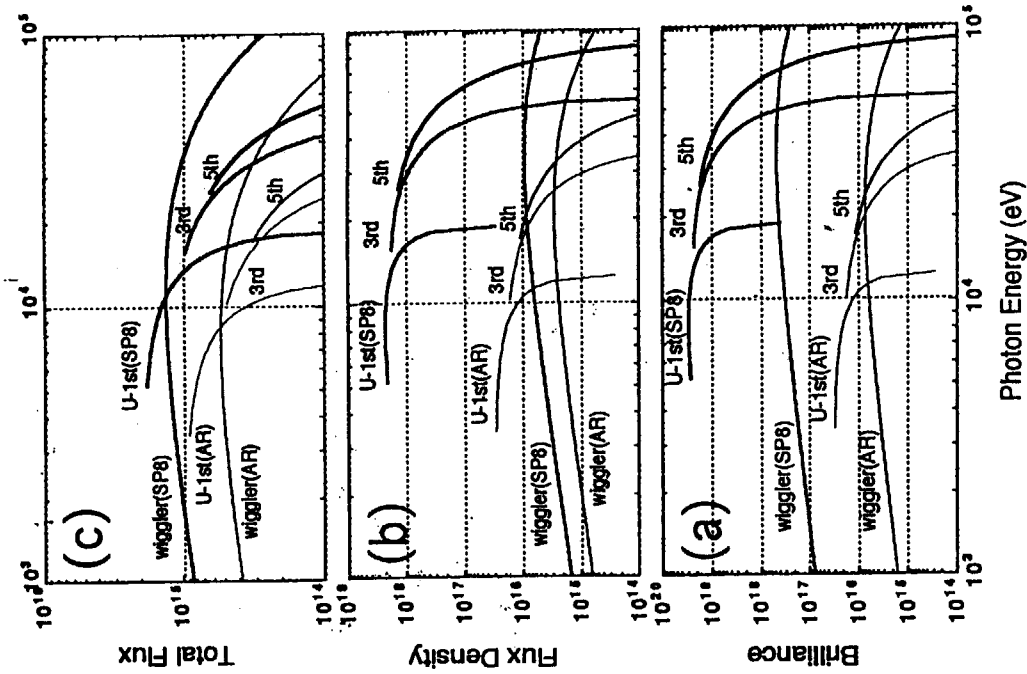


図1 第3世代リング (SPRING-8) と典型的な第2世代リング (トリスタンAR) に同一仕様のアンジュレータ (周期長3.2cm, 周期数140, 偏向定数1) やウィグラー (周期長12cm, 周期数37, 磁場1.0T) を想定した場合のスペクトル比較。(a), (b), (c) はそれぞれ輝度, 光束密度, 全光束である。なお, SPRING-8/ARのエミッタンス, カップリング, 電流は $6 \times 10^{-9}/1.7 \times 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{rad}$, 2/1%, 100/50mAとした。

$$\lambda_c = \frac{2\pi c}{\omega_c} = \frac{4\pi R}{3\gamma^3}$$

$$\lambda_c [\text{nm}] = \frac{0.558 R [\text{m}]}{E^3 [\text{GeV}]} = \frac{1.86}{B [\text{tesla}] E^3 [\text{GeV}]}$$

$$\epsilon_c = \frac{\hbar c}{\lambda_c}$$

$$\epsilon_c [\text{keV}] = \frac{1.24}{\lambda_c [\text{nm}]} = \frac{2.22 E^3 [\text{GeV}]}{R [\text{m}]}$$

$$\gamma = \frac{E}{mc^2} = \frac{1}{\sqrt{1-\beta^2}}$$

$$\langle \theta^2 \rangle^{\frac{1}{2}} \approx \frac{1}{\gamma}$$

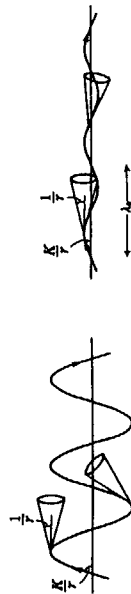


図5.31 入力光線からの放射光
(a) マルチポール・ウィグラー (b) アンジュレータ

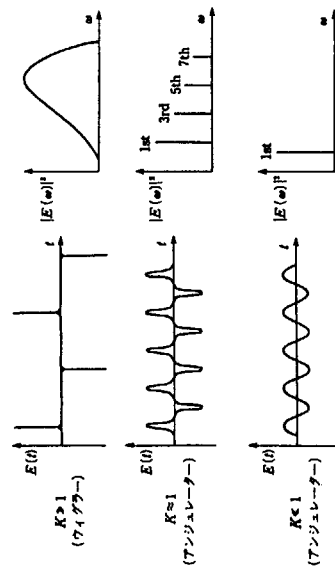
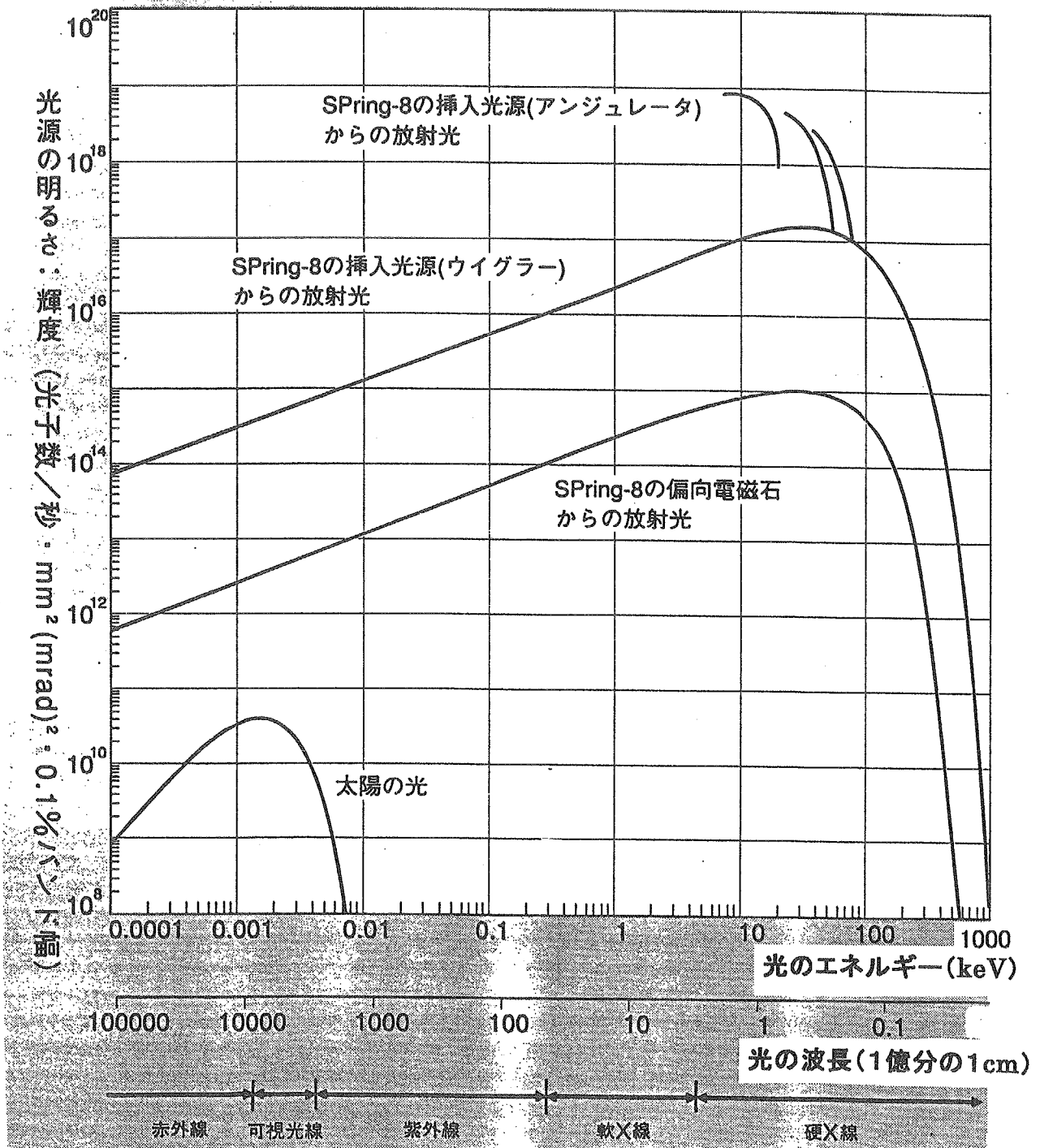
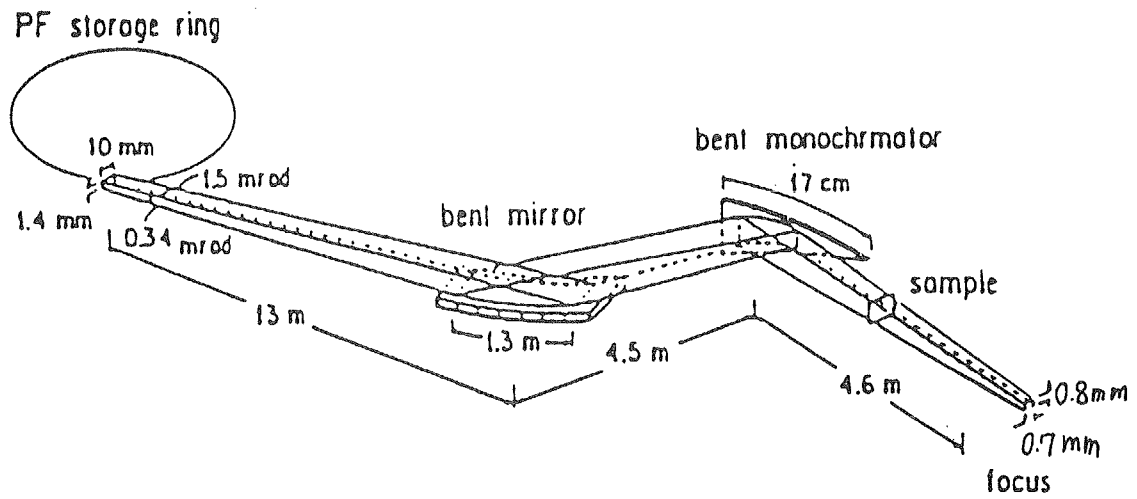


図5.32 入力光線からの放射光の電場の時間変化 $E(t)$ とスペクトル $|E(\omega)|^2$

$$K = \frac{eB_0 \lambda_0}{2\pi mc} = 0.934 B_0 [\text{tesla}] \lambda_0 [\text{cm}]$$

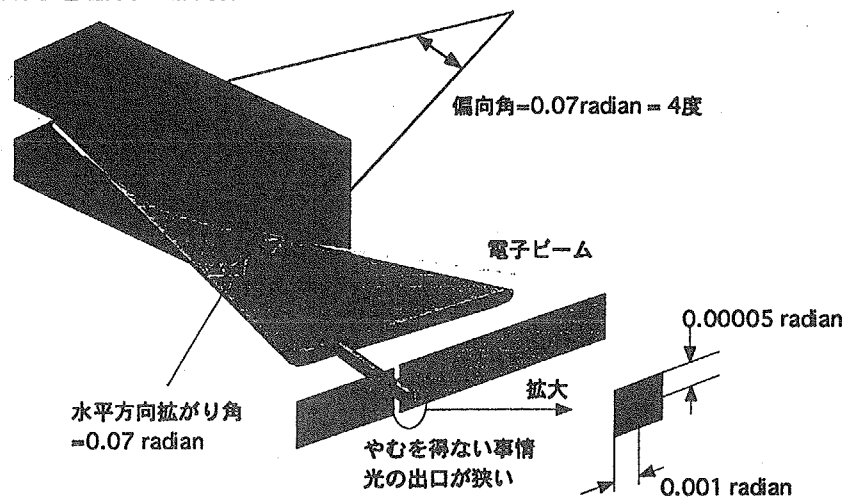
■ SPring-8 の放射光の性質





4.2. 普通の放射光（偏向電磁石）との比較（その1：空間的性質）

偏向電磁石の放射光



	Source		Flux	Focus size (mm)		Current	Energy	Flux density	Optics
			(cps)	horizontal	vertical	(mA)	(keV)	(cps/mm ²)	
Photon Factory	BL15A	BM	1.00E+11	0.80	0.60	400	8	2.08E+11	bMi+bMo
Photon Factory	BL10C	BM	5.00E+10	2.00	1.00	400	6 to 12	2.50E+10	bMo+tMi
Photon Factory	BL16A	MPW	3.00E+11	3.00	0.30	400	8	3.33E+11	dsMo+bMi
Daresbury SRS	2.1	BM	2.00E+11	5.00	0.75	200	8	5.33E+10	bMo+bMi
Daresbury SRS	16.1	W	6.00E+11	3.00	0.30	200	9	6.67E+11	bMo+bMi
ESRF	ID2	U	7.00E+12	0.70	0.35	200	8 to 16	2.86E+13	dMo+tMi
SPring-8	BL45XU(SX)	U	6.00E+11	0.40	0.20	100	12	7.50E+12	dMo+dbMi
SPring-8	BL47XU	U	2.00E+12	2.50	0.60	100	18	1.33E+12	dMo
APS	BioCAT	U	2.00E+13	0.20	0.03	100	6 to 12	3.33E+15	dsMo+bMi
SPring-8	BL40B2	BM	6.00E+10	0.15	0.10	100	6 to 17	4.00E+12	dMo+tMi
SPring-8	BL40XU	U	1.00E+15	0.25	0.04	100	12.4	1.00E+17	dbMi
ELETTRA	SAXS	MPW	2.00E+12	1.50	0.60	250	8	2.22E+12	dMo+tMi
DO NOT BELIEVE THESE VALUES !!									

5.2 X線検出器とX線溶液散乱

雨宮慶幸

(東大院・新領域・物質系)

強度の強い放射光を有効に利用してX線溶液散乱実験を行うためには、感度が高く、また、数え落としのない高速なX線検出器が必要である。位置敏感型ガス検出器等のパルス型検出器は、感度は高いが、数え落としの問題がある。一方、また、イメージングプレート、CCD型X線検出器等の積分型検出器は、数え落としがなく、かつ高感度であるが、高い実験精度を必要とする実験では、取り扱いに注意を要する。

本講演では、X線溶液散乱実験に用いられている位置敏感型ガス検出器、イメージングプレート、CCD型X線検出器の性能を比較しながら、その長所、短所を整理して、実験目的に適したX線検出器の選択に必要な情報を提供する。

また、我々が開発したイメージインテシファイヤーと冷却CCDを組み合わせた高感度CCD型X線検出器の原理と性能を紹介し、これを用いて行う時間分割X線溶液散乱実験の可能性について議論を行う。また、最近PFに導入された高速1次元ガス型X線検出器(OD3)の原理と性能を紹介する。

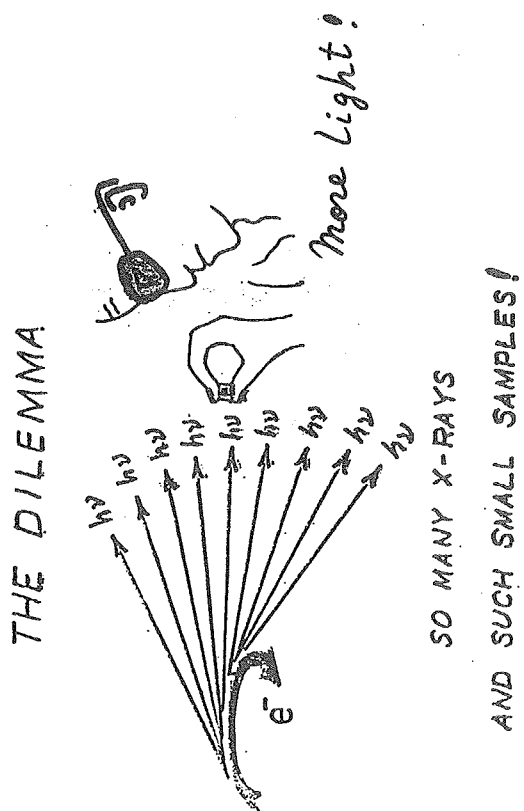
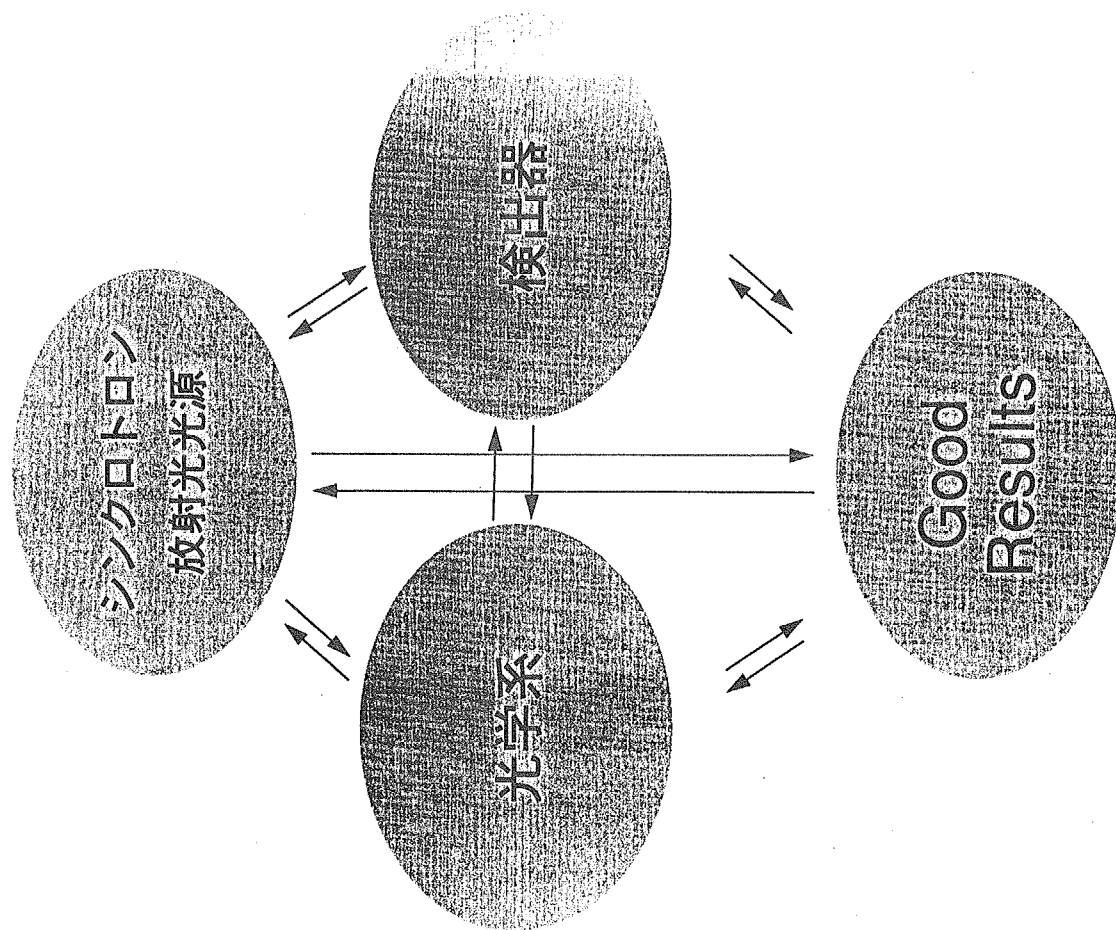
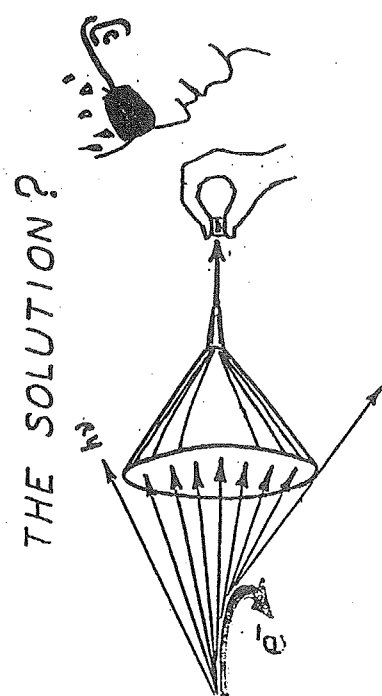


Figure 1



Integrating Type ----- Noise limited $\Rightarrow$ Low Efficiency

X-ray Area Detector

- Imaging Plate
- CCD-based detector
- X-ray Film

Pulse-counting Type ----- Count rate limited

- MWPC (Multi-wire Proportional detector)
- MSGC (MicroStrip Gas Chamber) $\sim 10^7$ Hz/mm²

放射光X線回折実験用検出器に対する要求

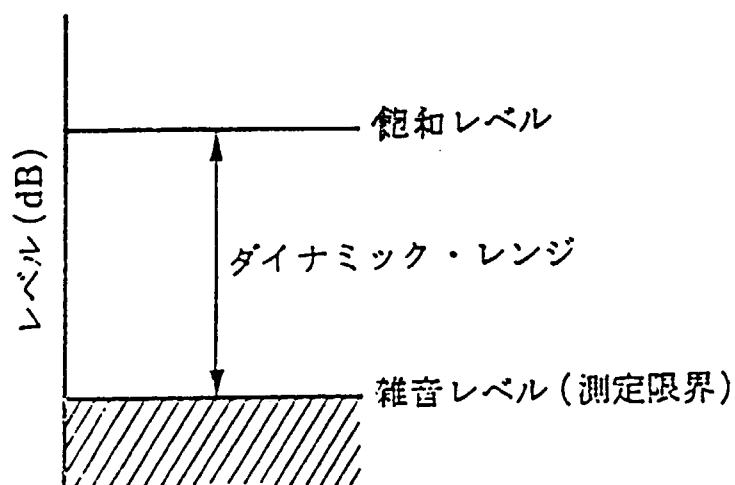
高い計数効率 (不感時間がない)
高い感度 (高い検出量子効率)
広いダイナミックレンジ
X線強度の定量性
X線位置の定量性 (少ない画像歪み)
大面積

取り扱いの容易さ
適正なイニシャルコスト、ランニングコスト

実時間測定能力
時間分割測定能力

$$[\text{ダイナミックレンジ}] = 20 \log \frac{[\text{飽和レベル}]}{[\text{雑音レベル}]} [\text{db}] \quad (5)$$

$$= 10 \log \frac{[\text{飽和レベル}]^2}{[\text{雑音レベル}]^2} [\text{db}] \quad (5')$$



$$\text{maximum relative uncertainty} = \frac{\text{雑音レベル}}{\text{飽和レベル}}$$

X線検出器の種類

	0次元 I	1次元 I(x)	2次元 I(x, y)	ΔE I(E)	
パルス型	シンチレーション カウンタ- (SC) アバランシェ型 フォトダイオード	1次元 ガス型検出器 1次元SSD	<i>MSGC</i> (Micro-strip gas chamber) 2次元 ガス型検出器 (MWPC)	SSD { Si(Li) Ge Hgl ₂ , CdTe Bolometer	感度が高い 直線性が良い 適正露光域が 広い
積分型	電離箱 TLD	フォトダイオード アレイ 1次元電離箱 ドラム型IP	PAD (Pixel array detector) X線フィルム イメージングプレート テレビ型X線検出器		不感時間なし
		位置分解能 ($\Delta x, \Delta y$) 感度の一様性 $\Delta I(x, y)$ real time 可?			

イメージング・プレート

感度が高い

広いダイナミックレンジ 5桁

強度の直線性 4桁

大面積 $400 \times 200 \text{ mm}^2$

不感時間がない（高い計数率）

位置分解能 半値幅 $150 \mu\text{m}$

感度の不均一性 約 $1 \sim 2\%$

画像ひずみ 約 1%

取り扱い容易，曲げ可能

画像歪み、減衰、ばね、IPの交換の容易さなど

問題点

・ 時間分割測定が困難である。

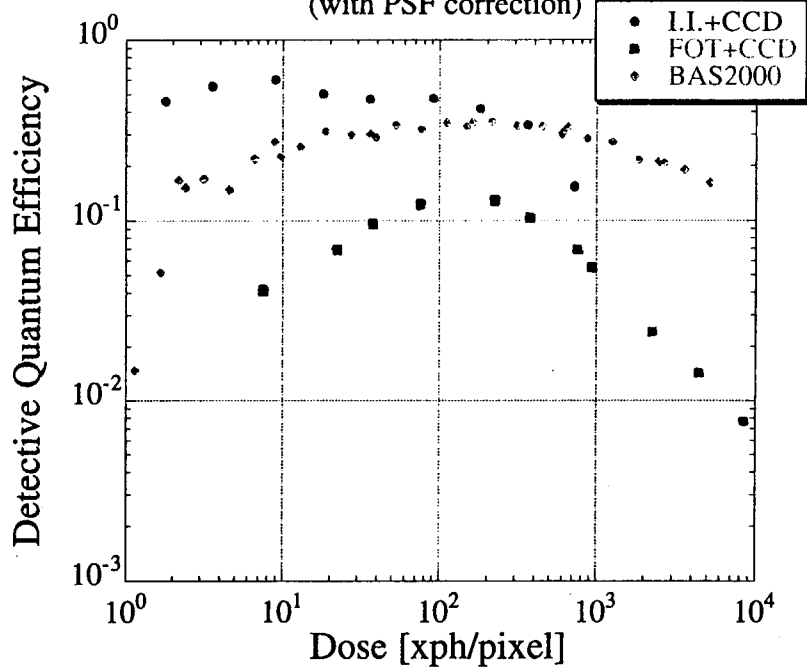
・ 実時間測定が困難である。

・ 画像間の演算が難しい。 fading
IP間のバラツキ

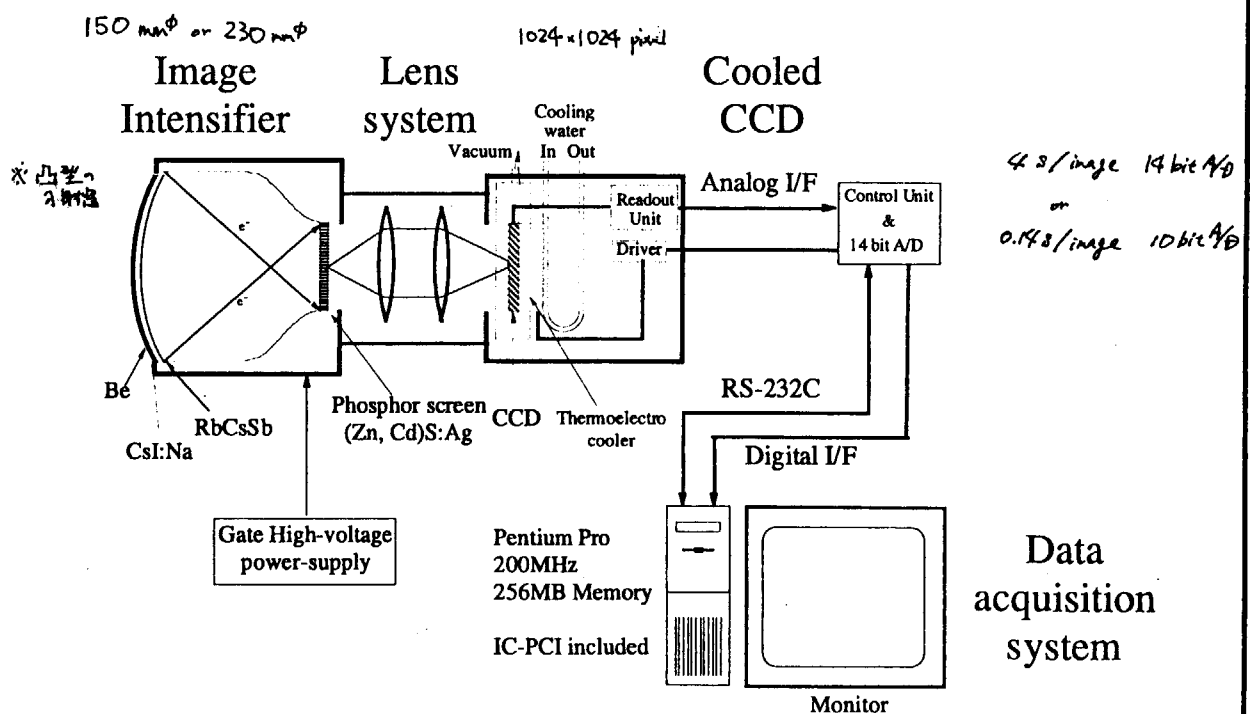
原理的にはデジタルなので可能であるが、
画像の重ね合わせを精度よく行うことが困難。

IPの交換の容易さなど、IPの交換の容易さなど

Detective Quantum Efficiency (DQE) of different detectors, I.I.+CCD, FOT+CCD and BAS2000.
(with PSF correction)



2: CCD 型 X 線検出器



イメージングプレート の性能

特に優れた特性

高い感度	80 % for 10-20 keV
広いダイナミックレンジ	5桁
強度の直線性	3.5桁
大面積	400 x 200 mm ²
不感時間がない (高計数率)	
取り扱い安さ (露光枚数が少ないとき)	

良好な特性

位置分解能	半値幅 150 μ m
感度の一様性	不均一性 1 ~ 2 %
画像歪み	1 ~ 2 %

問題点

実時間測定ができない

- ・測定中のデータのモニター不可能
- ・duty比が低い (露光時間 5秒 vs 読取時間 5分)
- ・オンライン処理・自動計測化ができない

蛋白質結晶構造解析を行うユーザー数が増加すればするほど、この問題点が大きな支障になってくる。

CCD型X線検出器の開発の必要性

$$\frac{\text{Signal}/\text{xph}}{\text{r.m.s. noise}}$$

IP

1 ~ 3

XII ⊕ CCD

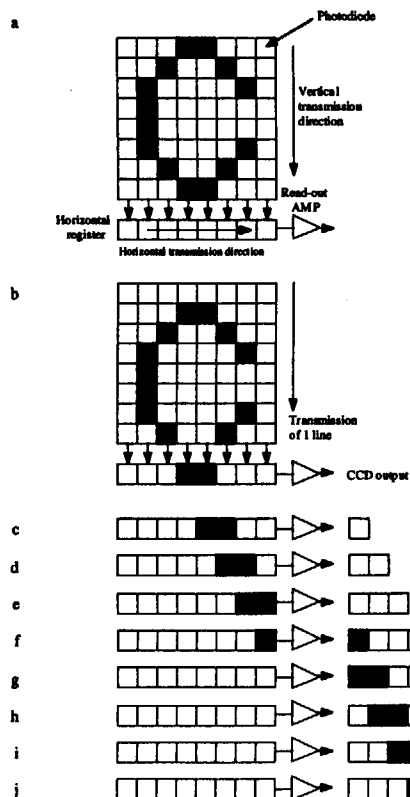
5 ~ 10

FOT ⊕ CCD

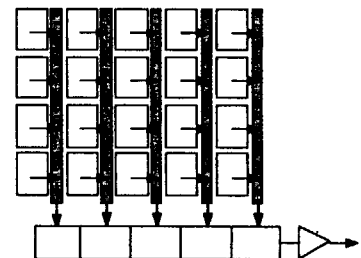
0.3 ~ 1

CCD 読み出し方式

フルフレームトランスファー方式



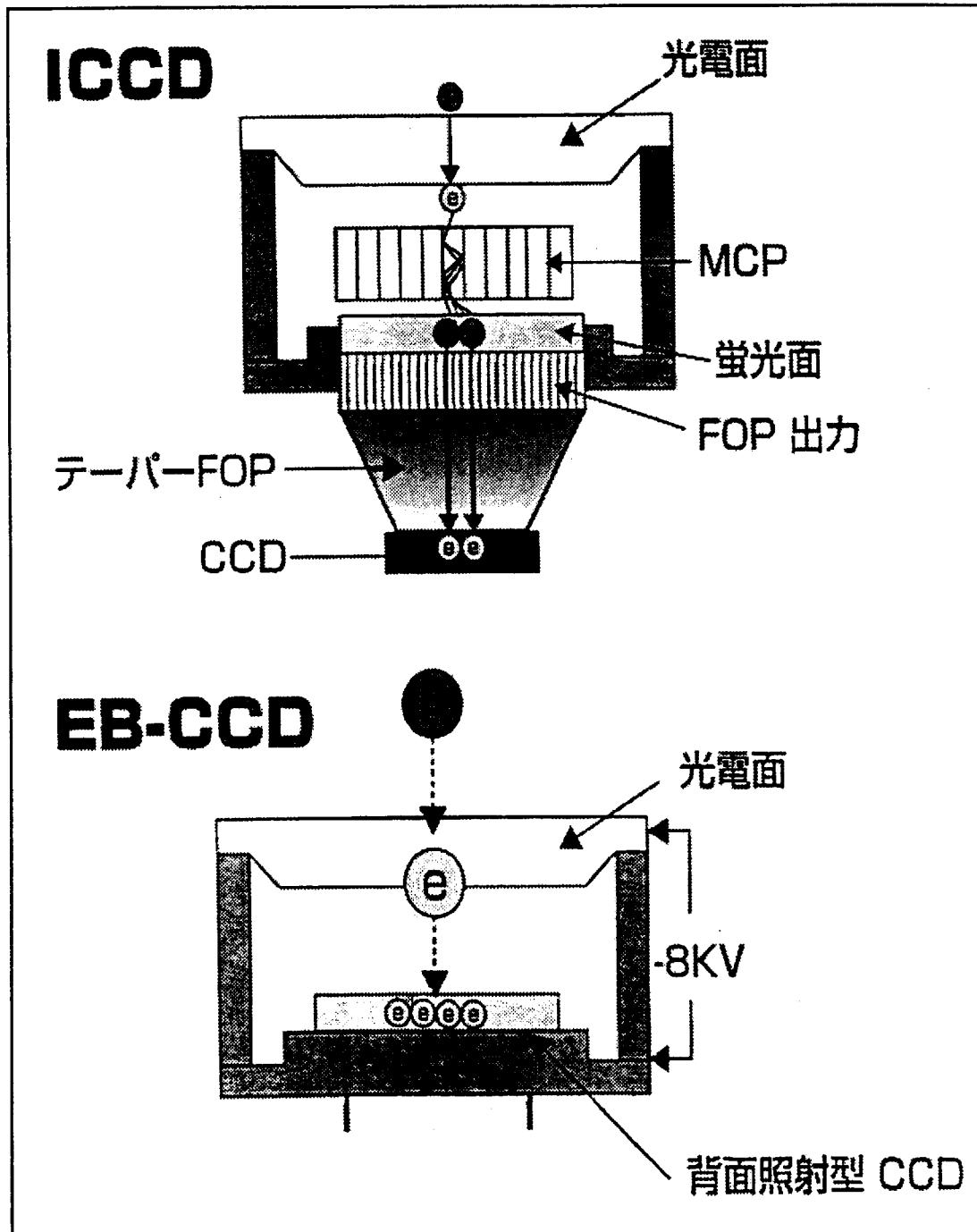
インターライン方式



- ・露光と読み出しを同時に行うことができる。
- ・開口率が100%ではない。

- ・開口率が100%である。
- ・読み出しと露光が同時に行えない。(読み出し時には遮光する必要がある)

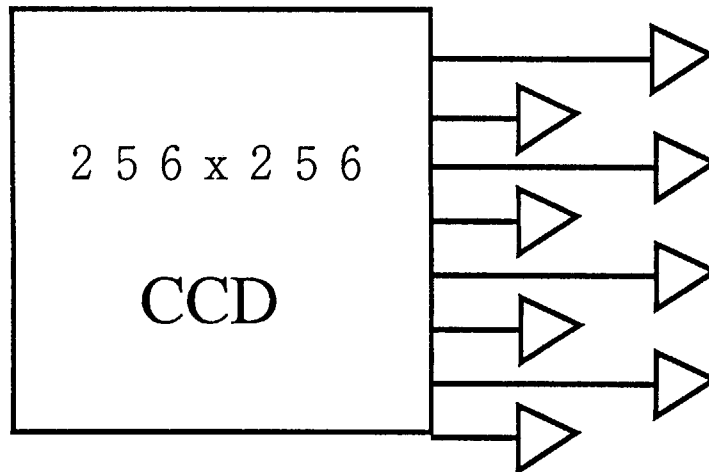
EB-CCDの原理



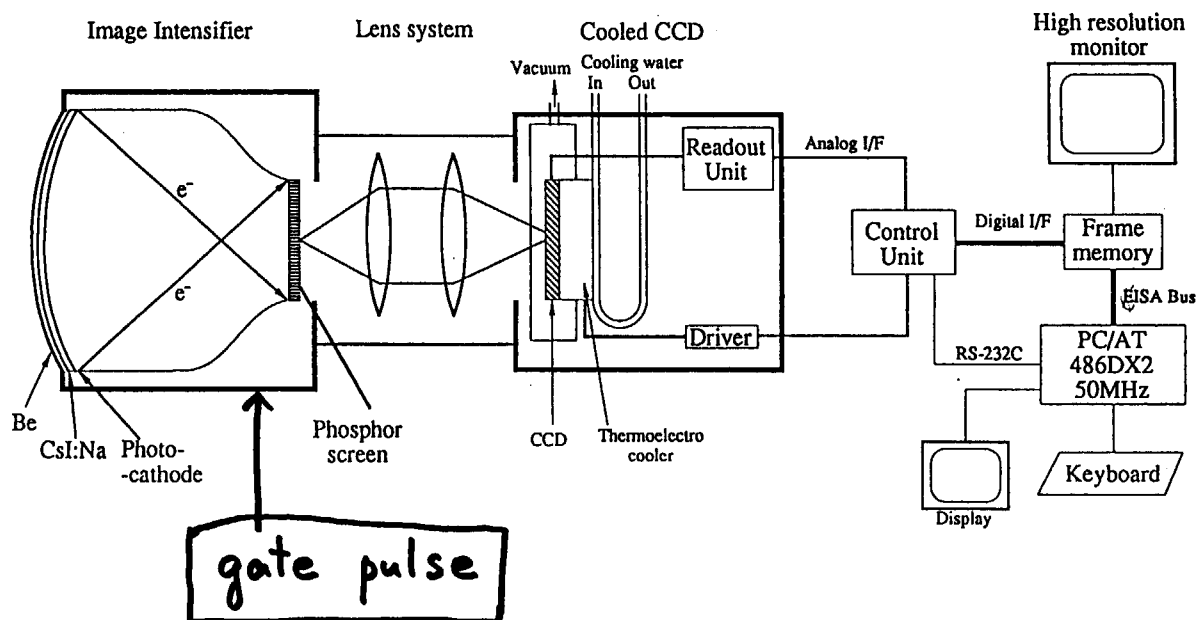
CCD with multi-channel readout

CCDの多チャンネル読み出し

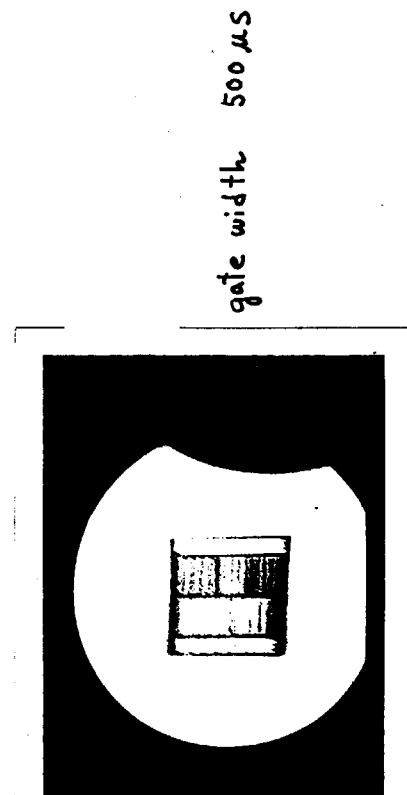
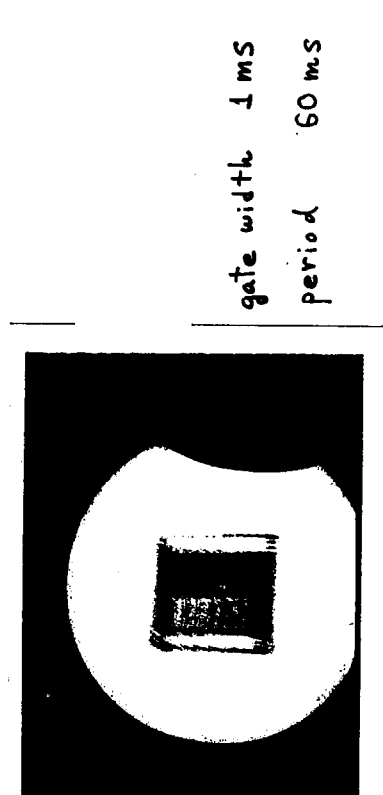
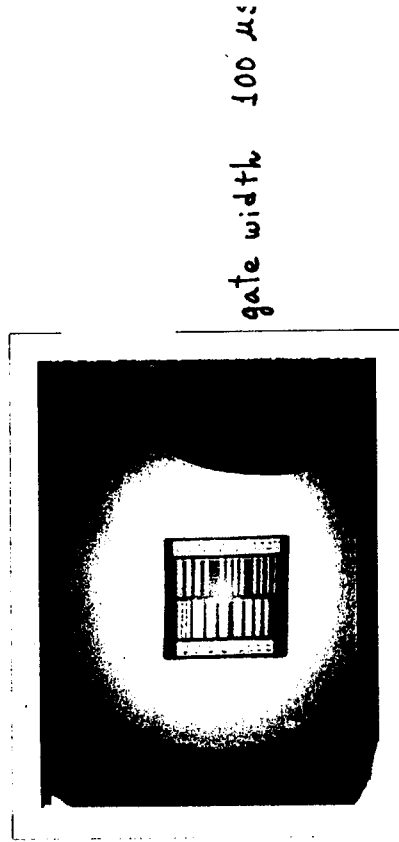
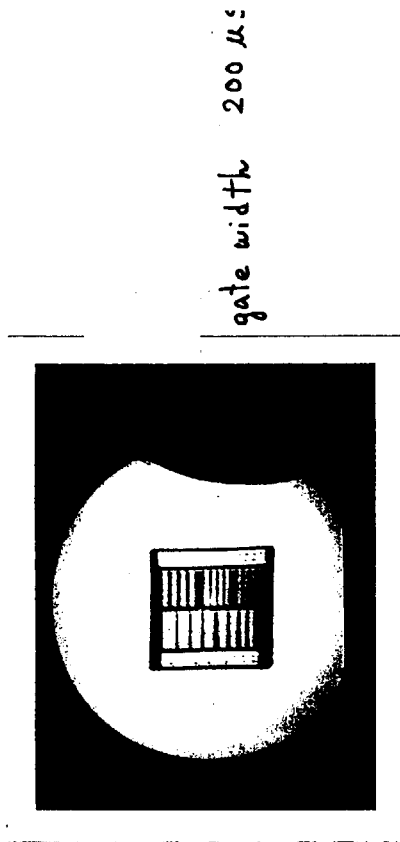
8チャンネル → 1000 frame/s (1ms)



4x4 スーパーピクセル読み出し → 8000 frames/s (125 μs)
super-pixel readout

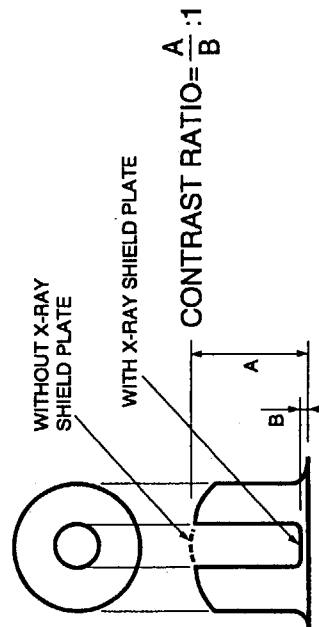
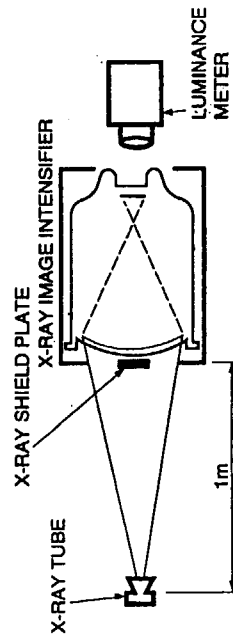


Schematics of the X-ray TV detector which utilizes the Be-window Xray image intensifier together with a cooled or a TV-rate CCD.



● Contrast Ratio

A circular X-ray shield plate with a diameter equal to 10% of the effective input area is placed in intimate contact with the image intensifier input surface at the center. The contrast is expressed as the ratio of the output luminance with an X-ray shield in place to the luminance at the same point with the shield removed. For this measurement, the X-ray tube voltage is set to 50 kVp and the input surface is kept at 1 m from the X-ray tube focal point.



< CONTRAST RATIO >

TII C0013AE

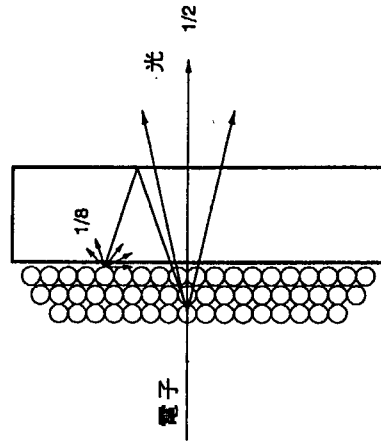
出力蛍光面

電子 → 光

- 変換係数
- 解像度
- コントラスト

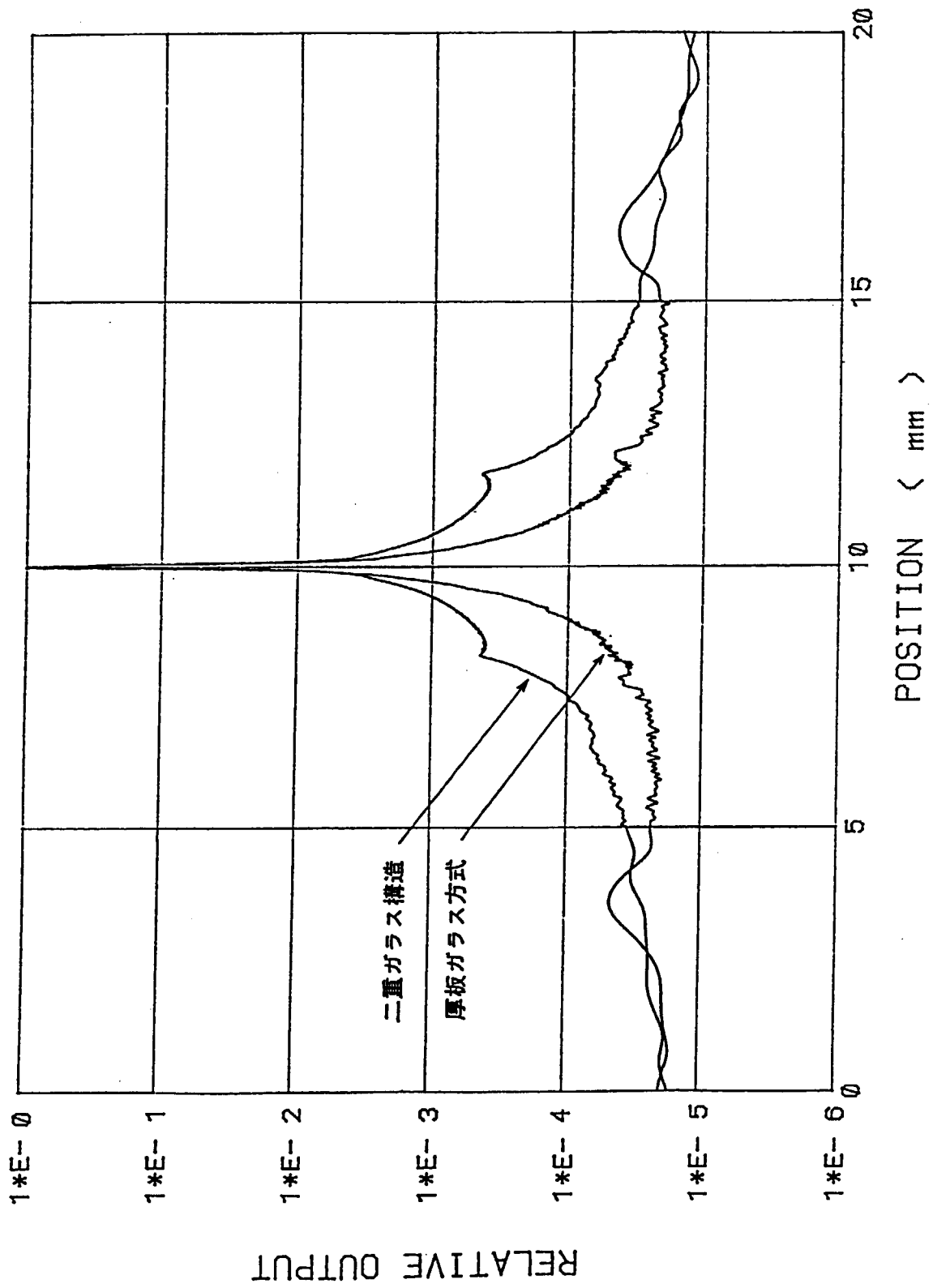
フィルターガラス方式

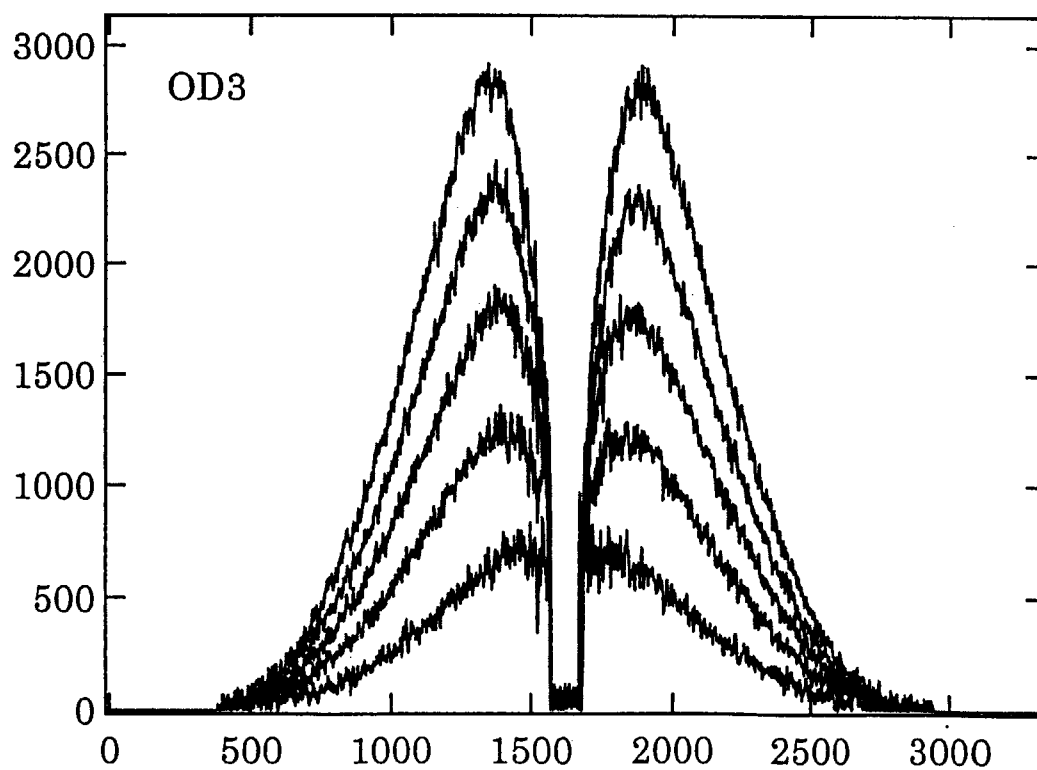
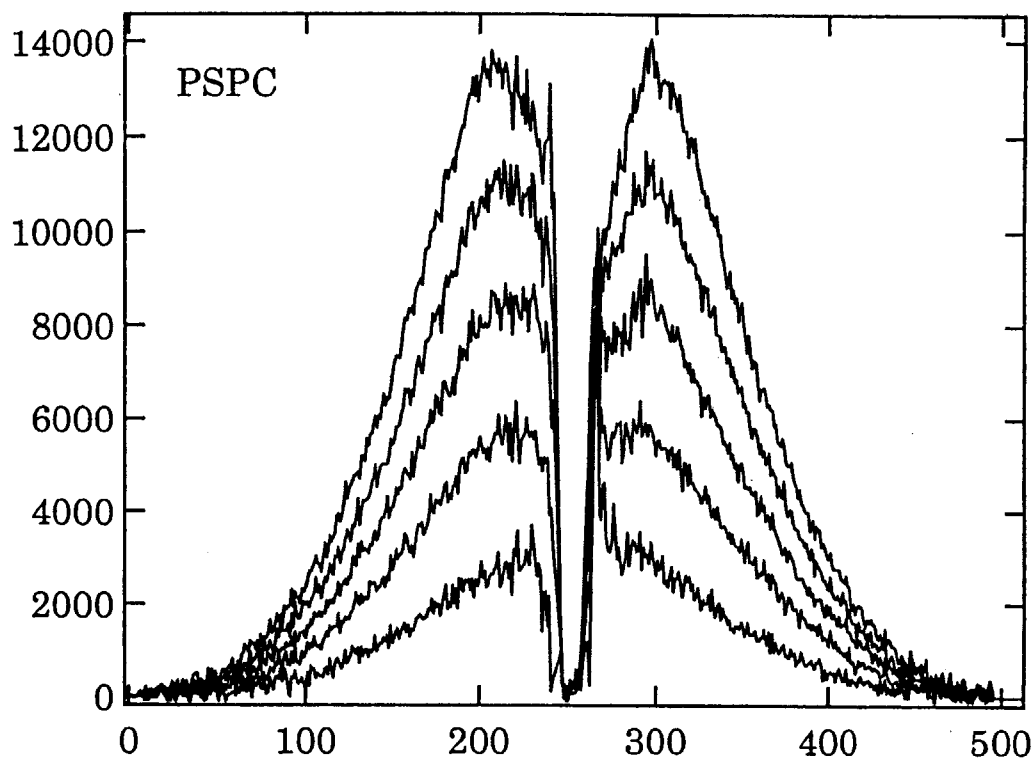
透過率 : 50 %



蛍光体 出力面基板
P-20 ガラス

図-3 発光分布





5.3 CCD 型 X 線検出器の X 線溶液散乱実験への応用

伊藤 和輝 (筑波大学 応用生物化学系)

CCD 型 X 線検出器⁽¹⁾は、ベリリウム窓を有する X 線イメージンテンシファイヤーと撮像素子として CCD を用いた二次元 X 線検出器である。特徴としては 1) 高感度、2) 時分割実験が可能、3) 画像間の演算が容易、という点が挙げられる。しかし、欠点として、X 線イメージンテンシファイヤーの入射窓の凸型形状に起因する画像歪みやそれに伴い、実効的な画素サイズが変化することによる感度ムラが存在する⁽²⁾。これらはソフトウェアによって補正することが可能である。

一方、X 線溶液散乱法は、分子形状の変化などに敏感でありタンパク質の機能と構造の関係の研究などに用いられている。この実験を行うためには、1) 高感度、2) 位置の定量性、3) 強度の直線性、4) 感度の一様性、5) 時間分解能、などの性能を有する X 線検出器が必要である。

本講演では、CCD 型 X 線検出器の画像歪み及び感度ムラの補正法について説明し、コントラスト低下の問題とその補正法について提案する。後半では適切な補正を適用することで X 線溶液散乱実験への応用が可能になることを示し、タンパク質溶液やポリスチレン・ラテックスを用いて他の検出器との比較を行った結果を示す。また、ロシア製の高速ガス一次元比例計数管である OD-3 (PF BL-15A にインストール) の紹介をする。

2000年2月9日、10日

中性子構造生物学ワークショップ@東海原研
「溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究の新しい地平」

CCD型X線検出器のX線溶液散乱実験への応用

伊藤 和輝
(筑波大・応生)

1: CCD型X線検出器の長所・短所

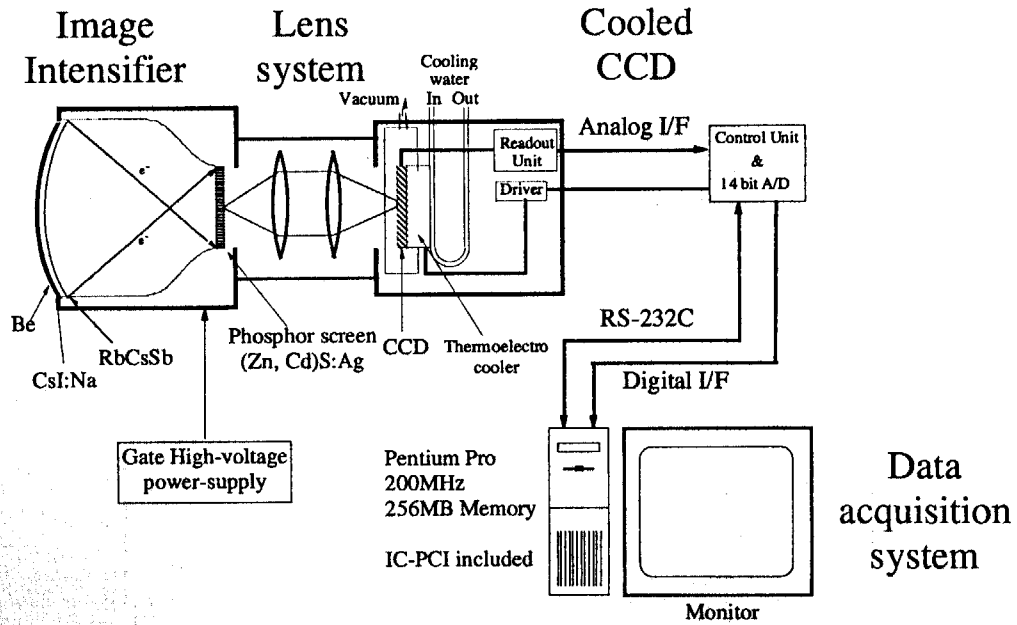
(長所)

	(IPとの比較)
高い検出量子効率	($>$ IP)
広いダイナミックレンジ	($\sim$ IP)
高計数率能	($\sim$ IP)
時分割測定が可能	($>$ IP)
画像間の演算が容易	($>$ IP)
二次元X線検出器	

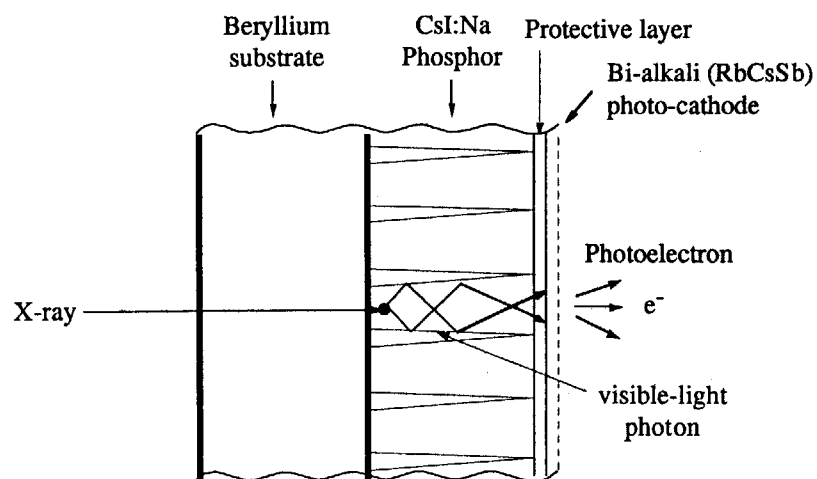
(短所)

画像歪み	($<$ IP)
感度不均一性	($<$ IP)
外部磁場による影響	($<$ IP)

2: CCD 型 X 線検出器(1)

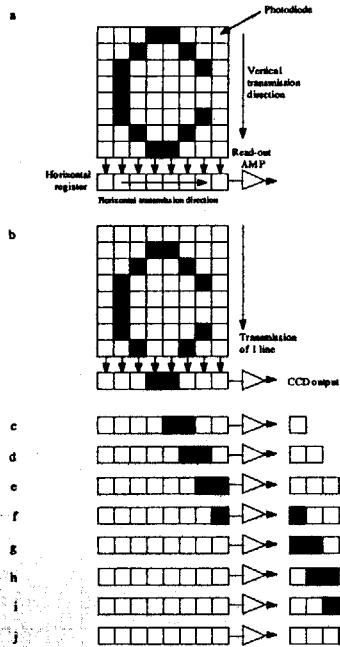


3: CCD 型 X 線検出器(2):入力蛍光面の構造

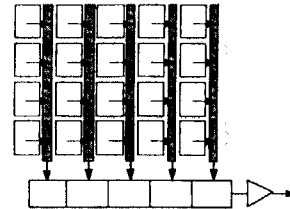


4: CCD 型 X 線検出器(3): CCD の読み出し方式

フルフレームトランスファー方式



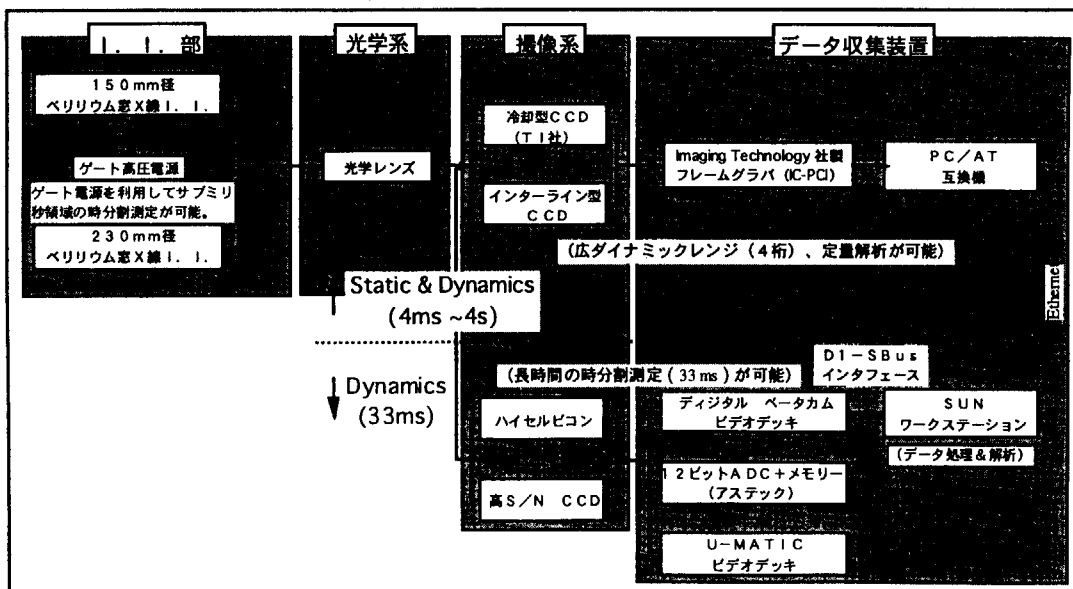
インターライン方式



- ・露光と読み出しを同時に行うことができる。
- ・開口率が100%ではない。

- ・開口率が100%である。
- ・読み出しと露光が同時に行えない。(読み出し時には遮光する必要がある)

5: CCD 型 X 線検出器(4): 検出器一覧



組み合わせにより、空間分解能、時間分解能を変えることができる。換装はワンタッチでできる(フィリップス・マウントの使用)。

6 : 画像歪みおよび感度不均一性の原因

(画像歪み)

- ・イメージンテンシファイヤーの入射窓の凸型形状
- ・外部磁場による影響
- ・静電レンズの収差

(感度不均一性)

- ・画像歪みに伴う実効的な画素サイズの不均一性
- ・蛍光体の塗リムラ
- ・蛍光体への斜め入射
- ・コントラストの低下

7 : X 線溶液散乱実験に必要な検出器の性能

- ・広いダイナミックレンジ、線形性
- ・感度の均一性
- ・高い空間分解能
- ・高い時間分解能
- ・高い検出量子効率
- ・安定性
- ・データ間の演算が可能であること

8: CCD 型 X 線検出器の溶液散乱実験への応用

CCD 型 X 線検出器は、

- ・高感度(円周積分による S N 比の向上)
- ・数え落としが無い
- ・時分割測定が可能
- ・画像間演算が容易

という長所を有する。

しかし・・・

- ・画像歪み
- ・感度の不均一性

が存在し、そのままでは散乱 X 線の強度及び散乱角の定量測定が必要な X 線溶液散乱実験に利用できない。



画像歪み及び感度の不均一性を補正すれば良い

9: 画像歪み & 感度不均一性の補正

画像歪み補正

グリッド・マスクの測定

↓
各ピーク位置での歪み量の計算

↓
歪み量の補間(2次元)

感度不均一性補正

露光面全体を照射

↓
IP によるリファレンスの測定

↓
画素値の再分配
(Rebinning)

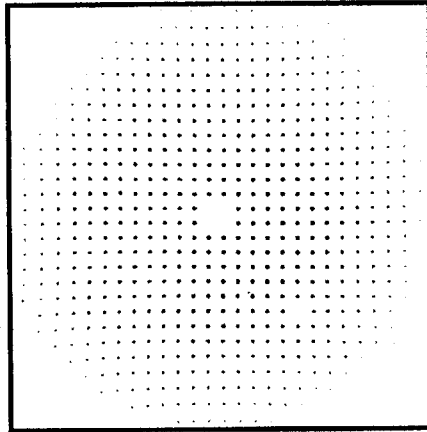
↓
CCD と IP の位置の合わせ込み

コントラスト補正

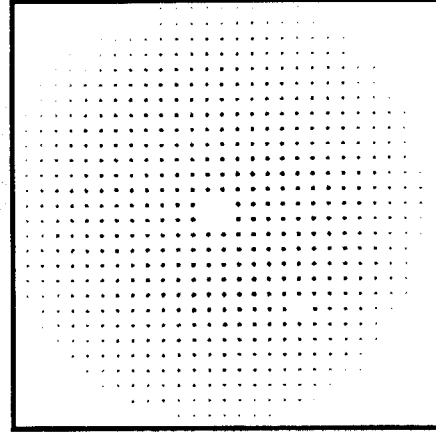
↓
CCD とリファレンスとの比較

↓
感度補正係数のテーブルの作成

10: 画像歪み補正(1)



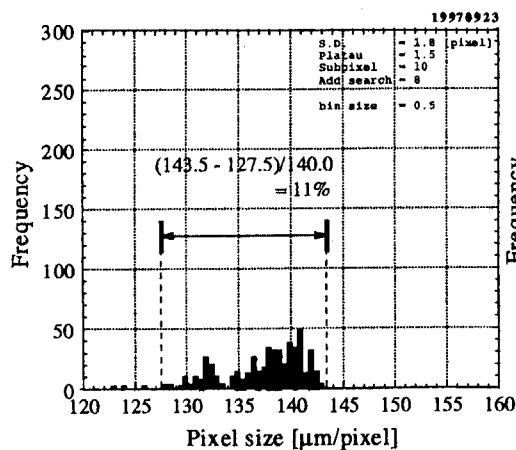
(原画像)



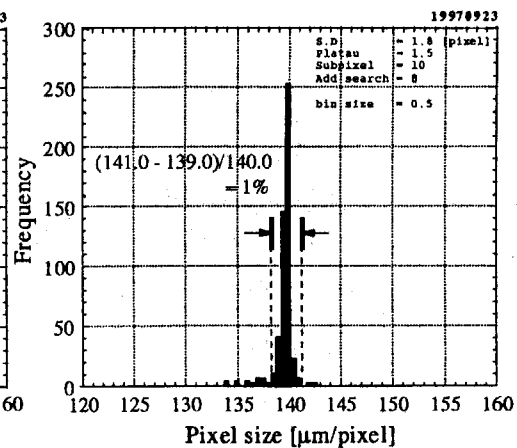
(補正された画像)

ガラス状カーボンからの散乱を用いて真鍮製のグリッド・マスクを露光した画像と、それを位置の補正のみ行った画像。原画像に見られるピン・クッション型の画像歪みがきちんと補正されていることがわかる。

11: 画像歪み補正(2)



(原画像)

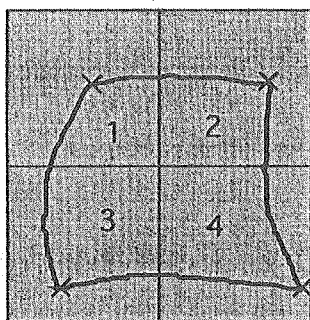


(補正された画像)

画像歪みを画素サイズの分布として表したものの。ヒストグラムは0.5[μm/画素]の分解能で作成した。

1 2 : 感度不均一性補正(1): 画素値の再分配 (Rebinning)

Ideal pixel



Distorted pixel

理想的な検出器(画像歪みのない)の画素とひずんだ画素の重なった部分に1、2、3、4と番号を付ける。また、重なった面積を a_1 a_2 a_3 a_4 とする。ひずんだ画素の画素値は次の式に従って再分配しなければならない。

$$P_i = \frac{a_i}{\sum_j a_j} \cdot P_d$$

ここで、 P_d はひずんだ画素の画素値であり、 P_i は重なり合う部分の歪みのない画素上にそれぞれ分配される画素値である。

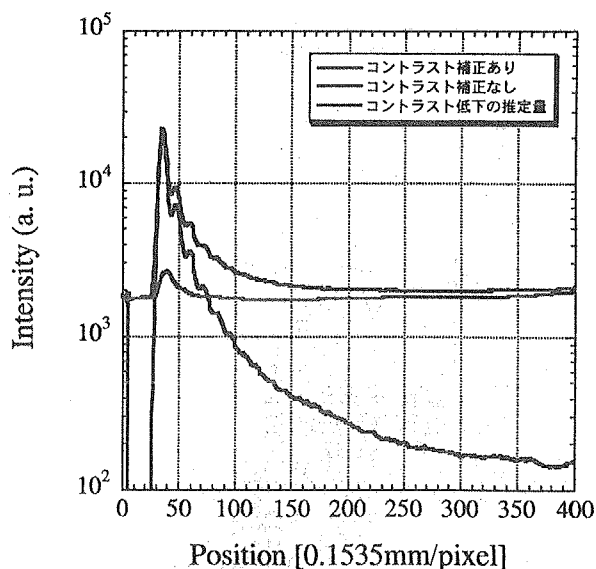
ひずんだ画素の4辺は曲線であるため、重なり合う部分の面積を厳密に計算するのは難しい。ここでは重なり合う面積を求める単純な近似として、画素を分割したものを利用する。

1 3 : 感度不均一性補正(2): コントラスト補正(1)

右図は CCD 型 X 線検出器で得られた散乱を円周積分し、コントラスト補正を施したものである。

コントラスト補正前には実効的なダイナミックレンジが2桁弱になっている。

しかし、コントラスト補正後には実効的なダイナミックレンジは約3桁に回復している。

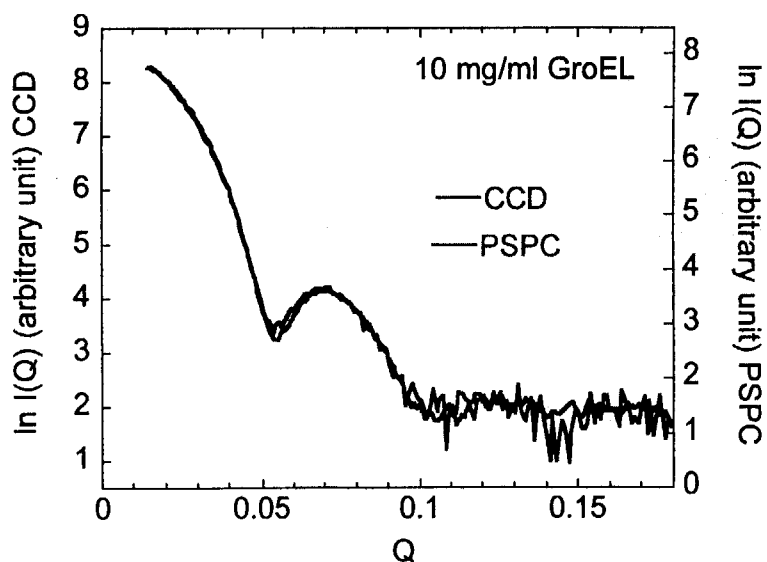


CCD 型 X 線検出器で得られた P S
L a t e x (0.12 μ m) の散乱曲線

15: CCD 型 X 線検出器の補正方法(溶液散乱実験)

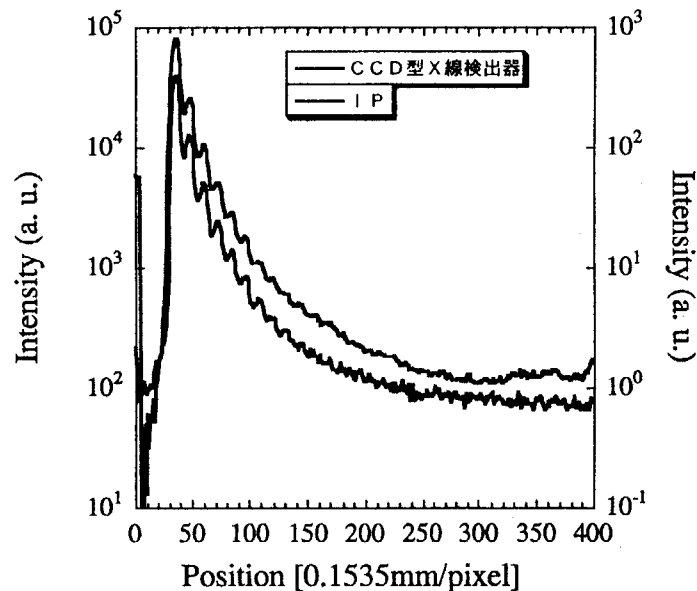
- (1) 画像歪み補正テーブルの作成
- (2) 円周平均による一次元化
- (3) 感度不均一性補正用テーブルの作成 ・コントラスト低下
・扇形マスクを用いて一様露光し、コントラスト低下の補正を行う。
- (4) 実験
- (5) 画像歪み補正 ・宇宙線等(スパイクノイズ)の除去
- (6) 円周平均による一次元化
- (7) コントラスト補正
- (8) サンプルからバッファを引き算
- (9) 感度補正 補正完了

16: 確認実験(1): タンパク質溶液(GroEL)



PSPC の露光時間は800秒、CCD 型 X 線検出器の露光時間は約170秒である。広角領域での S / N の改善が見られる。これは円周積分の効果であると考えられる。

17: 確認実験(2): P S L a t e x



ポリスチレン ラテックス(粒径 $0.12 \mu\text{m}$)の散乱曲線。IP、CCD 型 X 線検出器とも露光時間は10秒である。カメラ長は約1500 mm、波長1.5 Åである。

18: まとめ

我々が開発してきた CCD 型 X 線検出器の X 線溶液散乱実験への応用について、問題点とその解決法としてのコントラスト補正について述べた。

また、2種類の試料を用いた実験(GroEL、PS ラテックス)では、補正後のデータは P S P C、IP に良く一致し、P S P C に比べて広角側での S N 比の改善がより短い露光時間で得られることを示した。この特徴を生かして時分割 X 線溶液散乱実験への応用が現在行われている。

このような補正はすでにルーチン化されており、ユーザーは補正の内容を特に意識せずとも P S P C に比べて短時間にデータを収集することができるようになっている。しかし、積分型の検出器であるので、実効的なダイナミックレンジが限られてしまう。4桁を越えるようなダイナミックレンジが必要な場合にはパルス型の検出器である P S P C や O D - 3 などの検出器を用いる必要があるだろう。

OD-3とPSPCの比較

	OD-3	PSPC
有効長	260 mm	170 mm
時間分解能	1 μ s	10 ms
計数限界	10^7 cps (Total)	10^5 cps
空間分解能	0.15 μ m	0.3 mm
検出効率	~60% (Ar 75% + CH ₄ 25%, 2気圧)	17% (Ar 75% + CH ₄ 25%, 2気圧)
感度不均一性	1%	3%
位置検出方式	オリジナル	遅延線

OD-3の構造

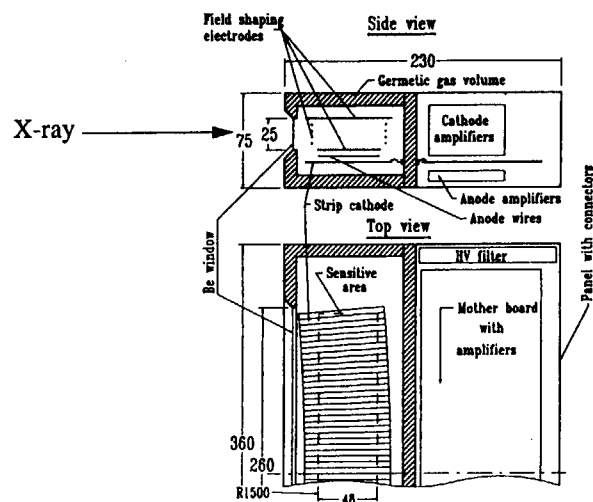


Fig. 1. Schematic view of the OD3.2 proportional chamber and front-end electronics.

PF にインストールされた OD-3 は、有効長 260 mm、空間分解能 150 μ m、時間分解能 1 μ s、量子効率 60%、焦点距離 1500 mm である。

OD - 3

BINP(ノボシビルスク、ロシア)で開発された高速の1次元ガス比例計数管である。

(特長)

- ・高感度(検出効率60%@8 keV)
- ・高計数率能(10^7 cps)
- ・高時間分解能($1 \mu s$)
- ・Parallax-free(焦点距離1.5 m 固定)



これまでのPSPCでは実現できなかった時分割測定(マイクロ秒領域)の可能性

共同研究者

東大・新領域・物質系
雨宮 慶幸

JASRI
八木 直人

東大・理・物理
桑島 邦博
新井 宗仁
伊野部 智由
中尾 正治
物構研・放射光
上久保 裕生

東京薬大・生命科学
小島 正樹

関西医科大・物理
木原 裕

阪大・基礎工・生物工
若林 克三
杉本 泰伸
武澤 康範
浜松ホトニクス(株)
遠藤 哲朗

5.4 放射線損傷

関西医大・木原 裕

1. はじめに

強力なX線源が利用可能になるにつれて、蛋白質がX線によって損傷を受け、その影響が無視できなくなってきた。これはそもそも自己矛盾的な主題であり、X線が物質に照射される限り、既に物質はそのX線と相互作用を起こし、化学結合などは影響を受ける。したがって放射線損傷をゼロにすることは、X線を照射しないということに等しい。ここではそのような意味ではなく、実質的に得られる構造情報に有意な影響を与えないで測定するにはどうすれば良いか、という問題として捉える。

放射線損傷を軽減する方法には次のようないくつかが考えられる。

- 1) 損傷を起こさない程度の弱いX線で測定する。

この方法は実用的には採用できないであろう。

- 2) radical scavenger を入れたり、低温で測定するなど放射線損傷を減らす工夫をする。

これは大いに工夫に値する。実際例えばエチレングリコールなどを入れることにより、放射線損傷の影響を著しく軽減できる。が、条件によっては許されない場合も多い。

- 3) 放射線損傷を起こす前に測定を終える。

実際にはこれが最も実用的な方法ではないかと考えられる。以下にこのために我々が行っている試みを紹介する。

2. Static flow cell

我々は後に示すような static flow cell を試作した。試料はシリンジ中に入れられる。標準的には 0.5 ml だが、変えることができる。シリンジに入れられた試料は stepping motor で押され、観測セルに挿入される。シリンジは決められた速さでゆっくり押される。我々は 1mm/s を標準として測定をおこなっている。装置の仕様は別の表に示す。

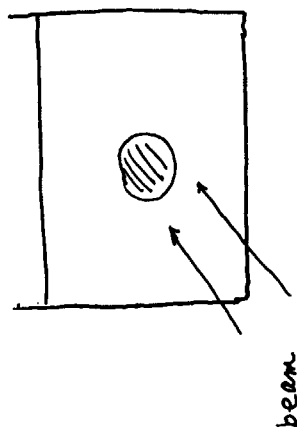
このような cell を用いることにより、次のような系に適用が可能になった。

- 1) 従来のセルにロードする場合に比べて、少なくとも 100 倍以上のX線照射が可能になった。
- 2) 非常に低濃度で測定しなければならない試料、長時間測定を続けたい試料などに有利である。

実際の測定は高エネルギー研放射光研究施設の BL-15A で行われ、30分間近くまでは測定が可能であった。

S. Radiation Damage

- Radiation damage must exist from the instant of exposure. pulsed X-ray measurement.
- To detect scattering, not different significantly from its (expected) 'native' scattering pattern.



- expose X-ray as ~~much~~ ^{long} as no apparent change
- use least volume

<Methods>

- 1) Change samples as long as required.
- 2) flow, continuously
- 3) stopped-flow
- 4) frozen / subzero measurement.

A Static Flow Cell for the Measurement of Solution X-ray Scattering

Hiroshi Kihara¹⁾ and Toshihiko Nagamura²⁾

1) Physics Laboratory, Kansai Medical University, Hirakata 573-1136

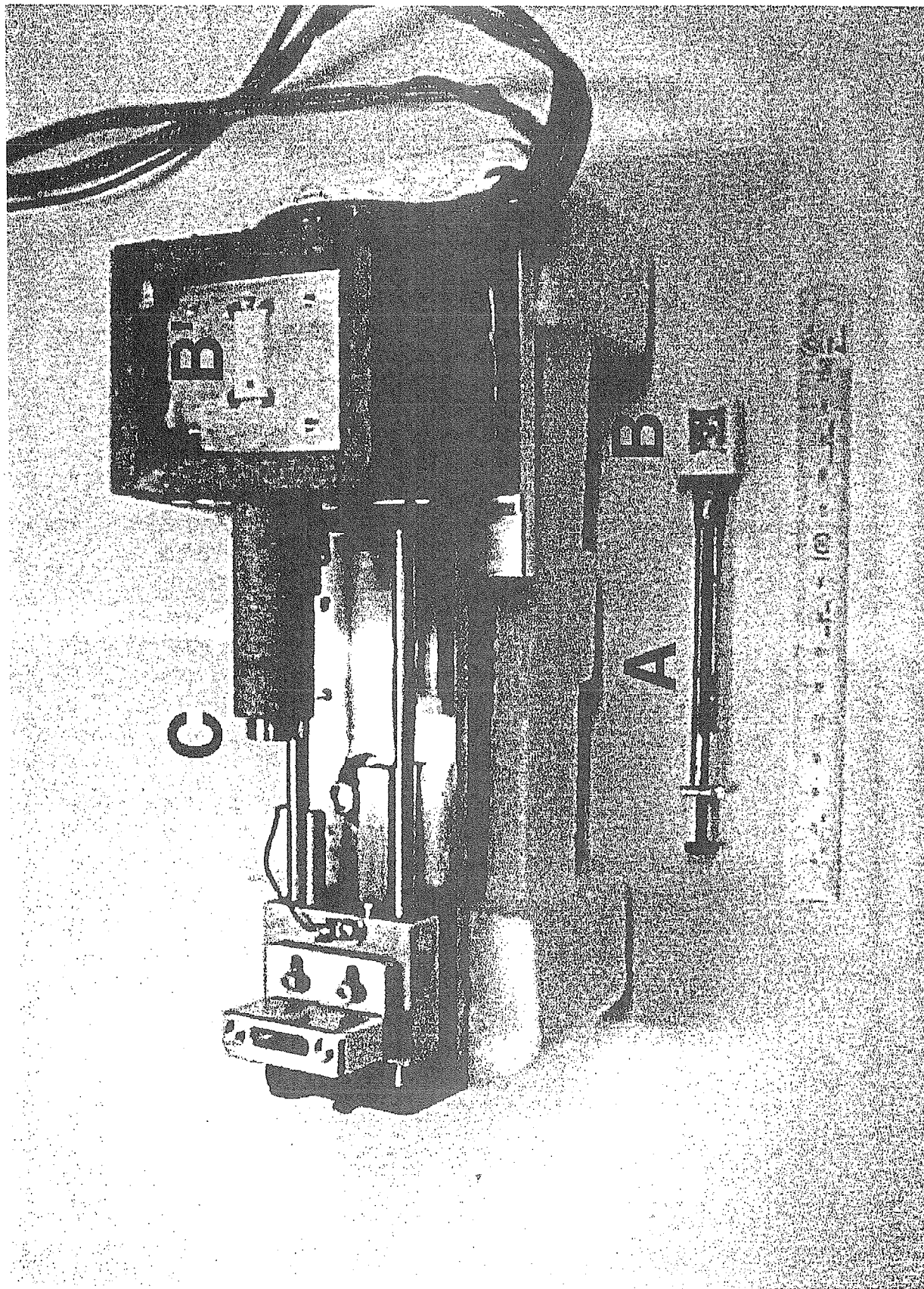
2) Unisoku Inc., Hirakata 573-0131

Its characteristics

- (1) It enables sample solution flow with the variable flow rate of 0.3 mm/s to 1 mm/s.
- (2) Total sample volume is less than 0.5 ml.
- (3) Temperature is controlled by a Peltier device, keeping the temperature between -30 °C and 50 °C with accuracy of $\pm 0.1^\circ\text{C}$.
- (4) Cell volume is 7 μl insides.
- (5) Cell window is mica of 25 μm in thickness.
- (6) Gap between the cell window and the window of the out-block is filled with He gas in order to decrease the attenuation by air and to prevent frost.

Advantages and application of the flow cell

- (1) With the same amount of radiation, the specimen can be irradiated 100 times longer than the conventional cell. If specimens are circulating, the specimens can be irradiated much longer time. Or the specimen can be measured with 100 times more intense X-rays.
- (2) Capability of measuring protein solution at very low concentration. As the ideal measurements should be at extreme dilute solution, the long time measurement is always desirable with very low concentration. Particularly, if the solution is apt to form associates, the more dilute, the better.



6. シミュレーションと溶液散乱

6.1 MD を基にして得られる構造情報

蛋白工学研究所

肥後順一

最近、計算化学の手法としての分子動力学 (MD) は広く用いられるようになった。本研究会では、いくつかの系での MD の結果を紹介し、溶液散乱や結晶解析の実験結果との関わりを議論した。

(1) ミオシンの分子動力学と X-線溶液散乱への利用

ミオシンは、計算機シミュレーションをする上ではまだ大きな分子である。そこで、ある単純化されたモデルを持ち込むことで分子の複雑さを減らし、MD シミュレーションを行った。その結果、分子の C 端側 (レバーアームと呼ばれる尻尾のような部分) が、2つのモードで運動していることが分かった。

ミオシンの加水分解前後で大きな構造変化が起きることが、X-線溶液散乱から分かっている。そこで、この構造変化を MD から得られた運動モードに関連させて調べてみた。結果、前述した二つのモードのうちの一つが構造変化に主に寄与していることが分かった。

(2) MD から得られる結晶水と水のダイポール場

DNA 結合蛋白質 (CRO 434) とリゾチームの、水中での分子動力学計算の結果を紹介した。二つの蛋白質とも、MD から得られた強い水和のサイト (high solvent-density sites) は、X-線結晶解析から得られた結晶水の位置と良く合うことが分かった。これは、計算と実験の両方の質の高さを検証したことになる。

また、蛋白質の周囲の水のダイポールが、蛋白質の影響で配向場を作っていることも紹介した。この配向場が蛋白質の機能とどう関係しているのかが、興味深い。

(1) myosin head, S1 conf. fluctuations & conf. change by the ATP hydrolysis

J. Higo, Y. Sugimoto, H. Nakamura, &
K. Wakabayashi.

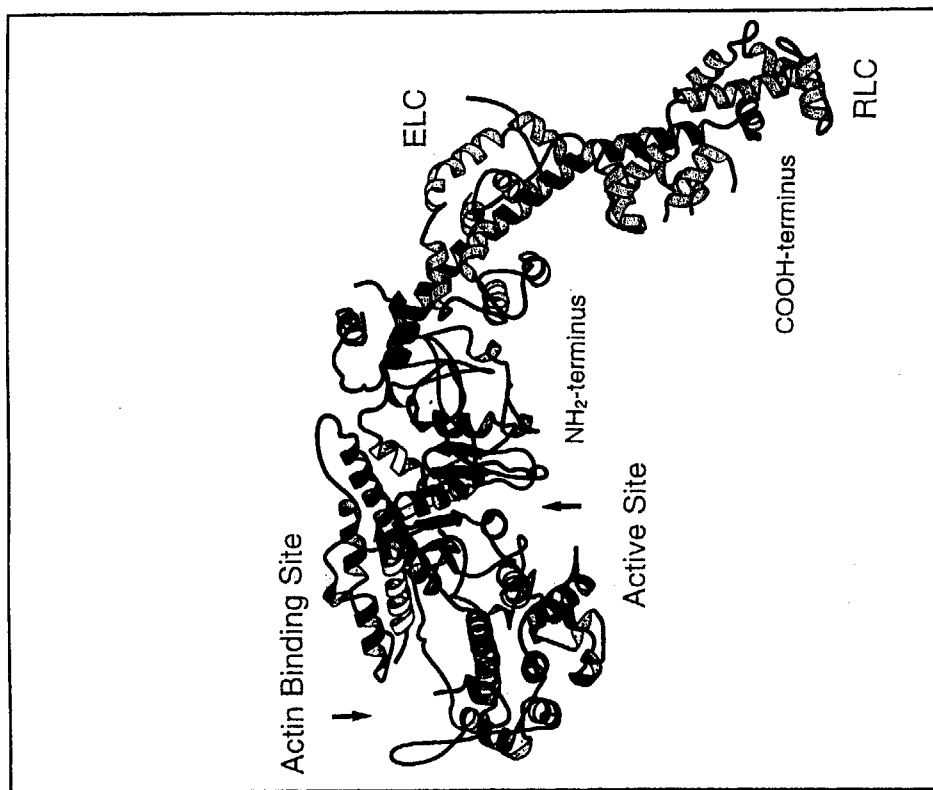
(2) protein hydration

CRO 434

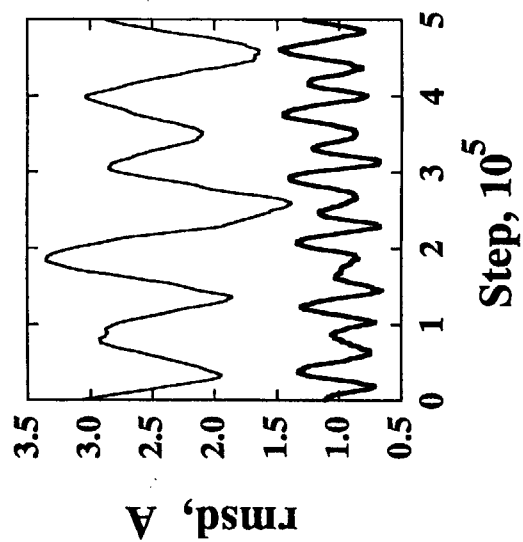
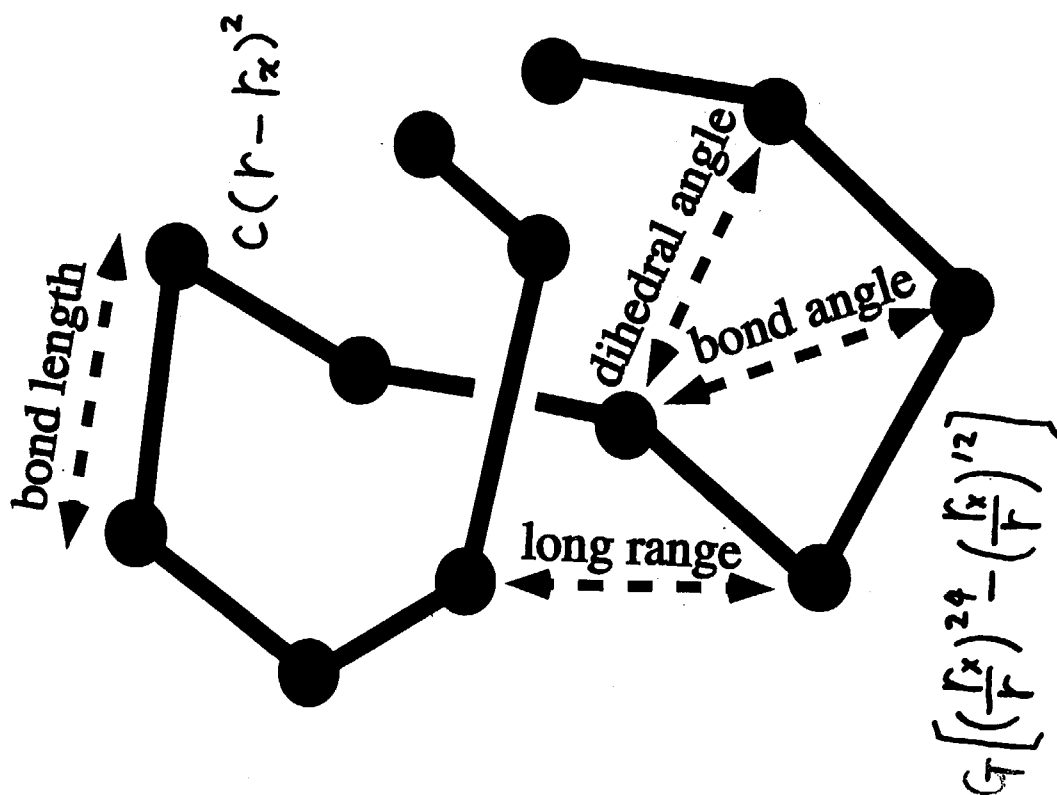
J. Higo, H. Kono, H. Nakamura, &
A. Sarai

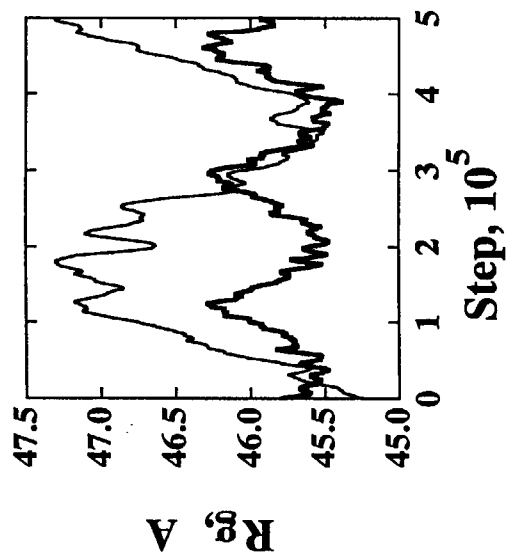
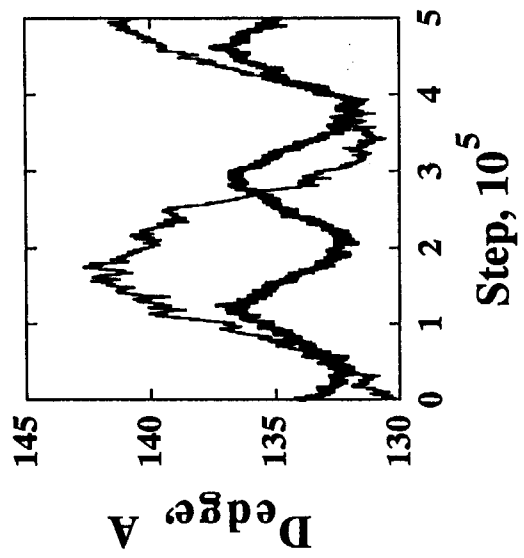
lysozyme

J. Higo & M. Nakasako



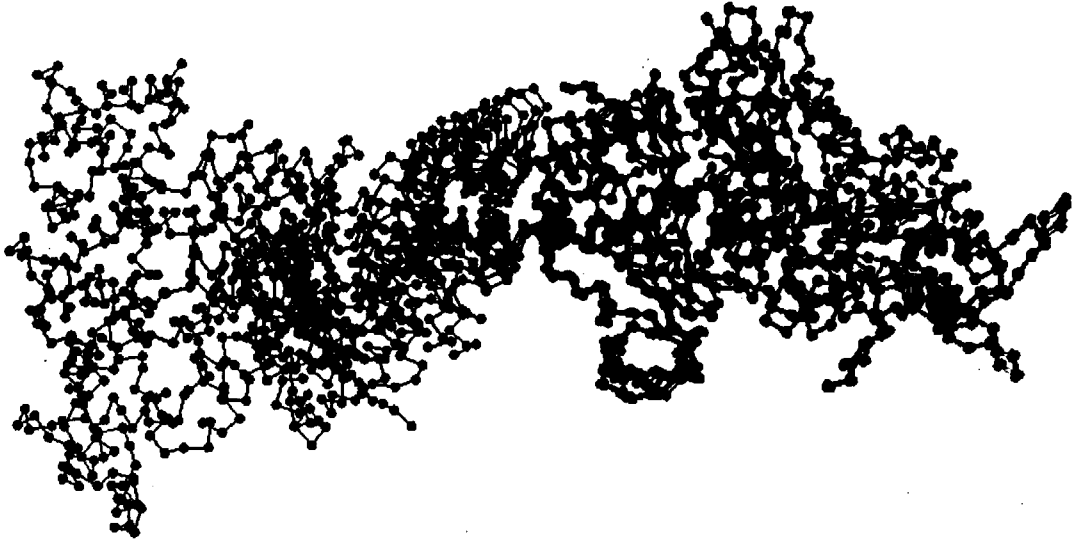
Backbone model

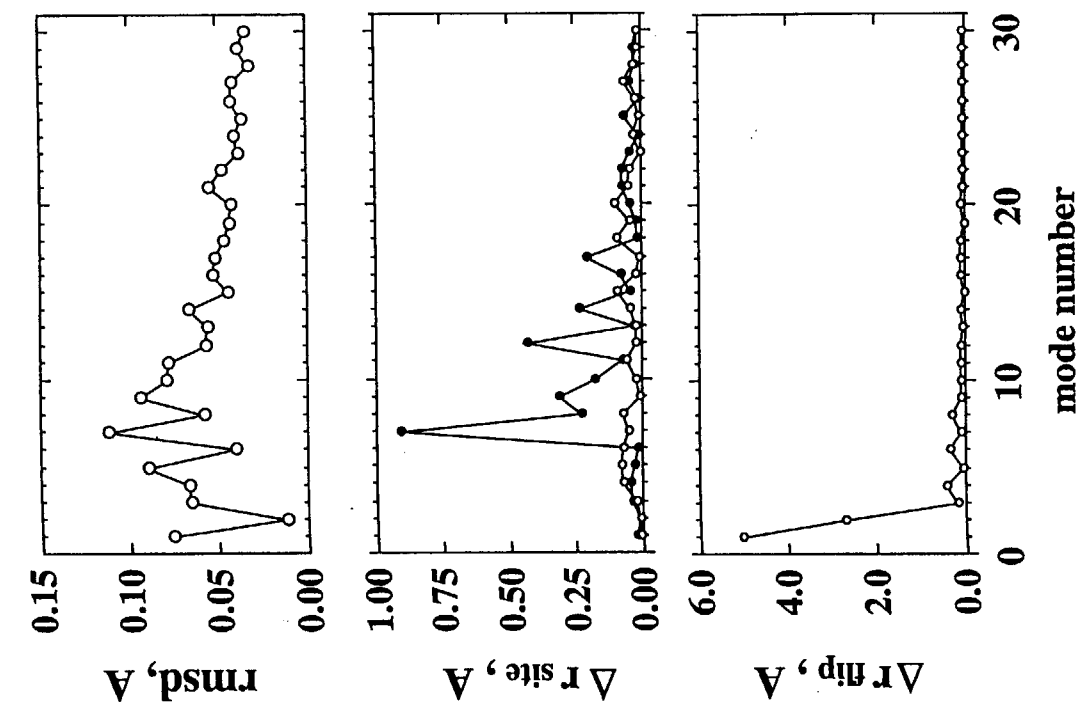


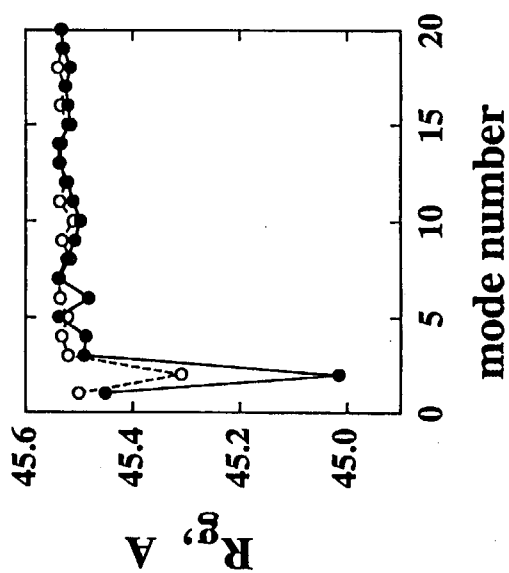
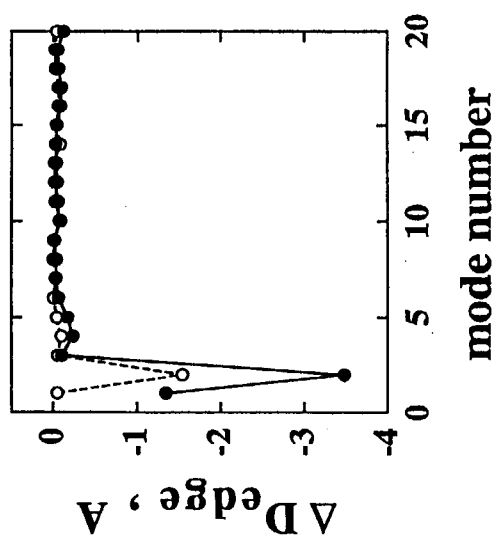
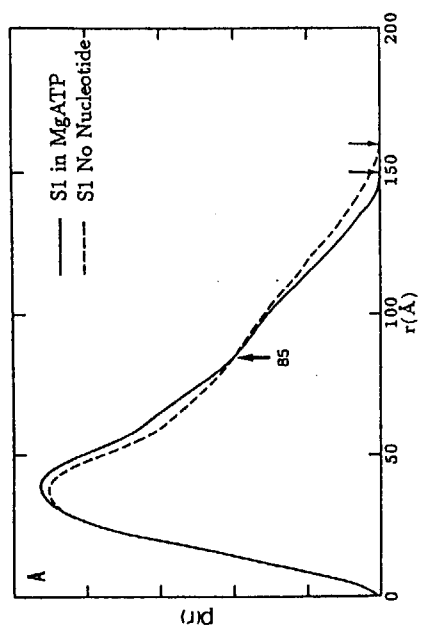


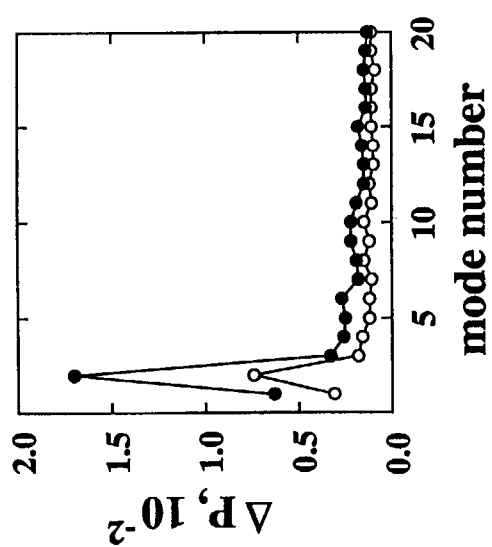
conf. fluctuations
= mode 1 + mode 2
+ mode 3 + ...

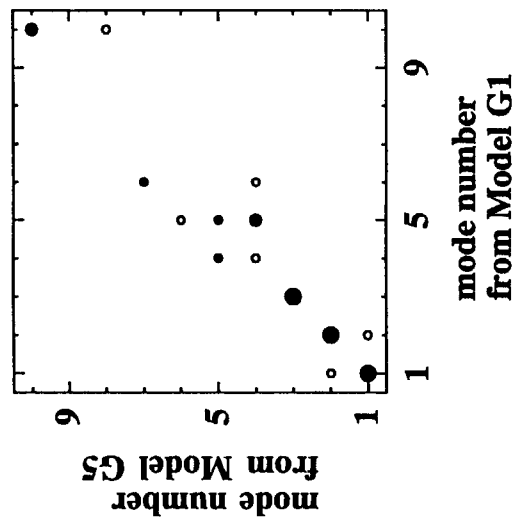
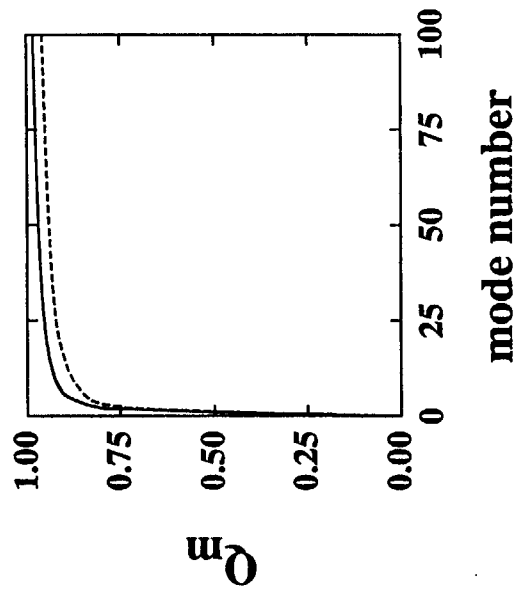
amount of fluctuation:
mode 1 > mode 2 > mode 3 > ...

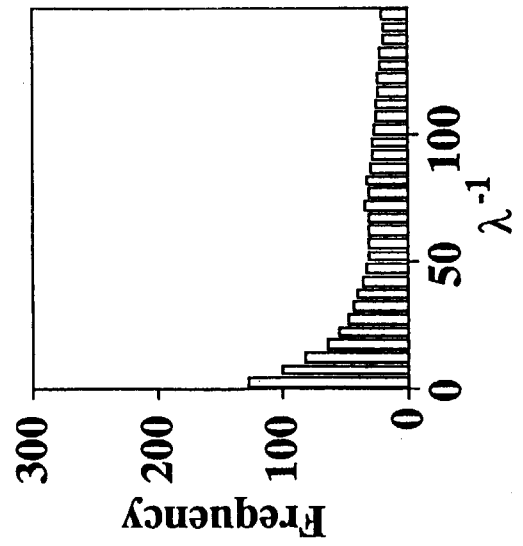
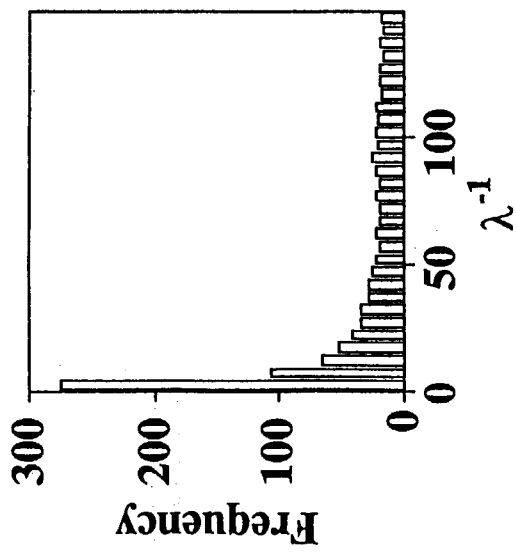
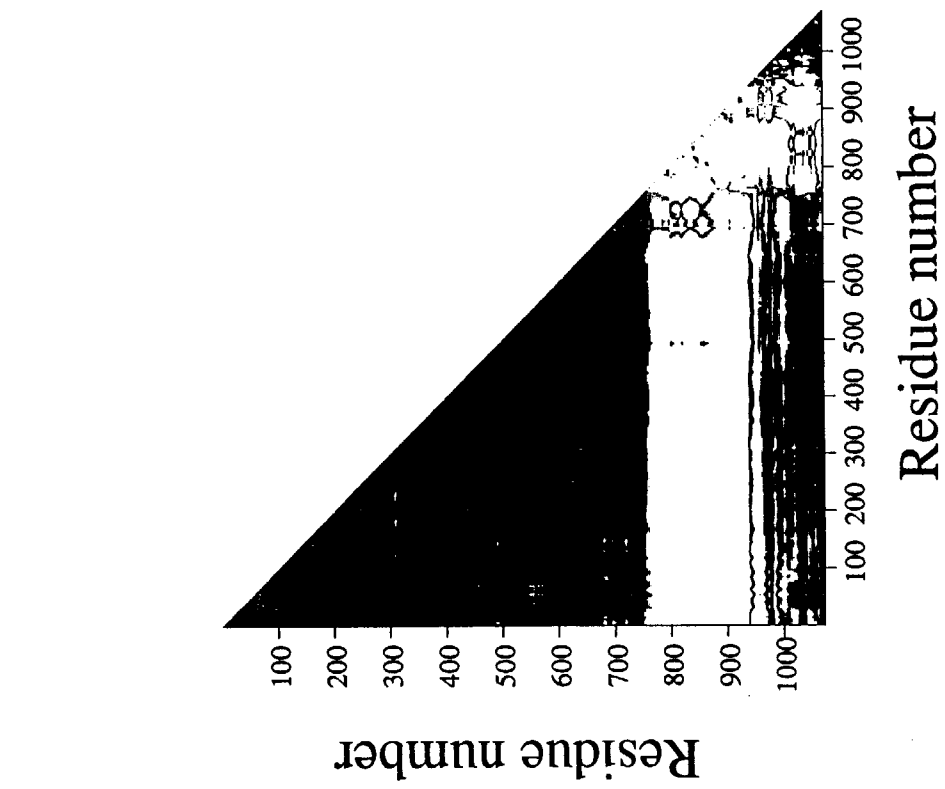






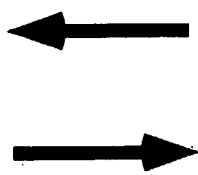






**solvent density
around the protein**

CRO 434



charged & neutral stets

crystal water

**solvent-dipole ordering
around the protein**

lysozyme

no ion, 0.2 M, & 0.4 M



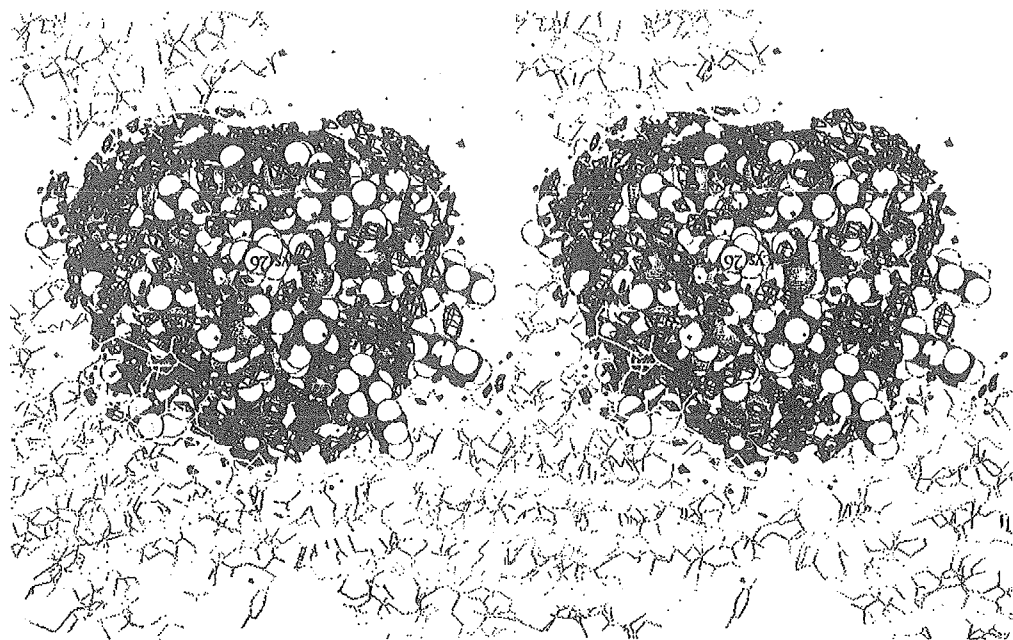
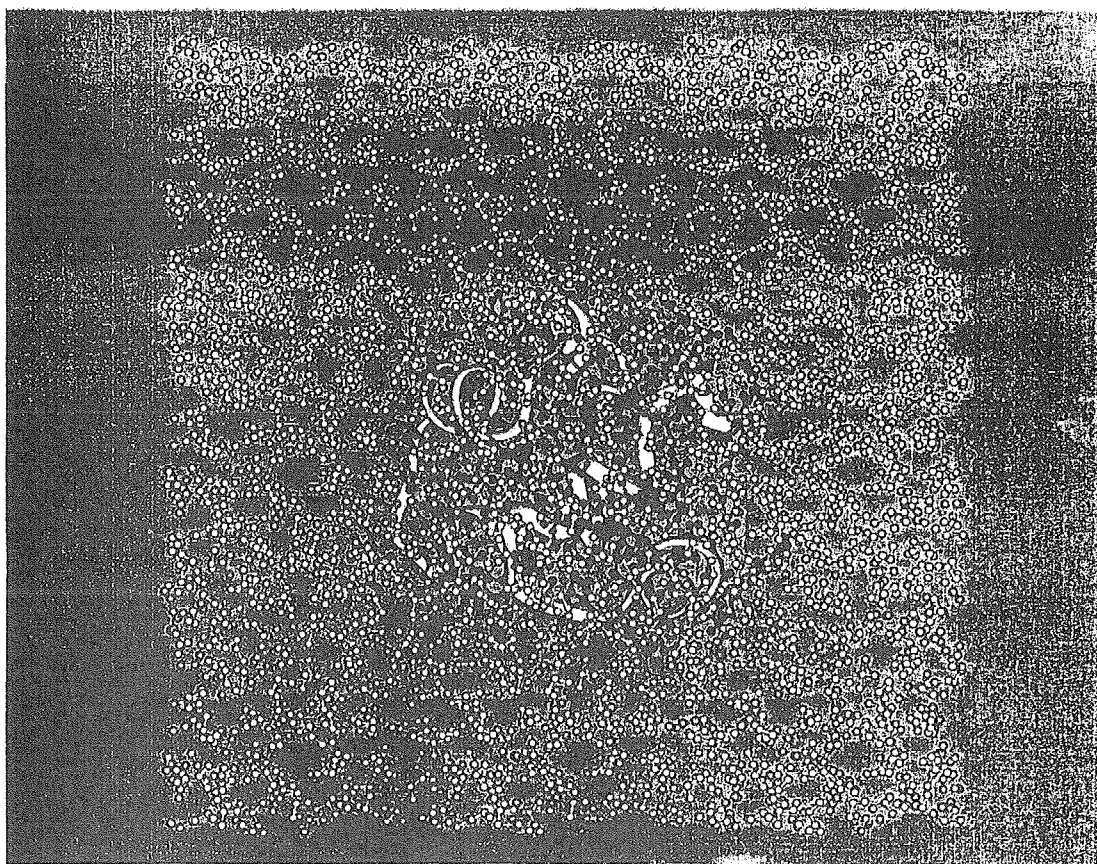
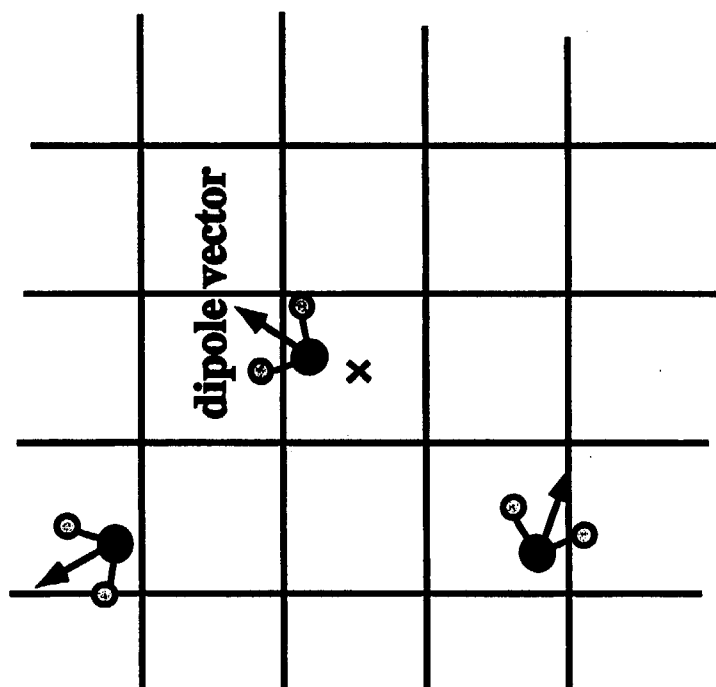
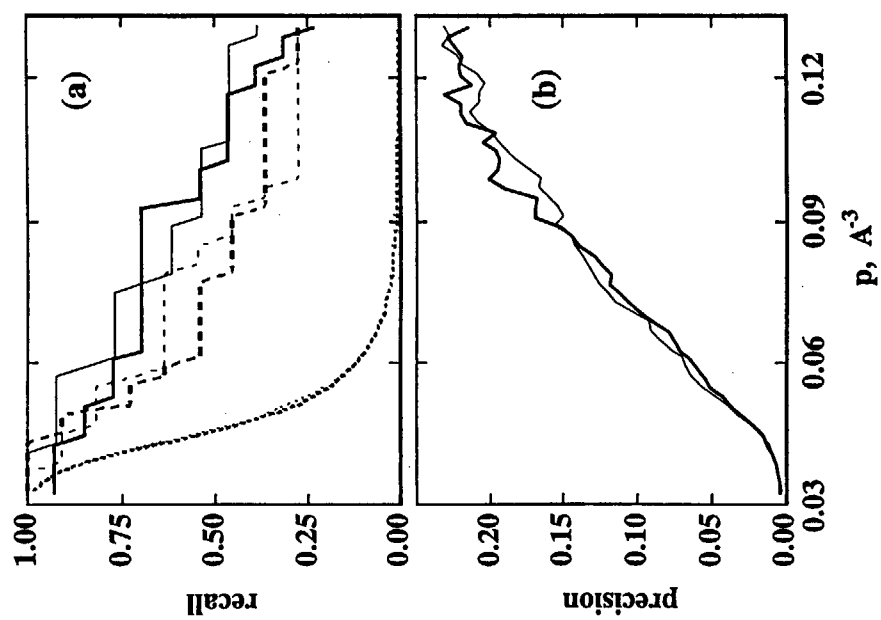


Fig. 4



system S4



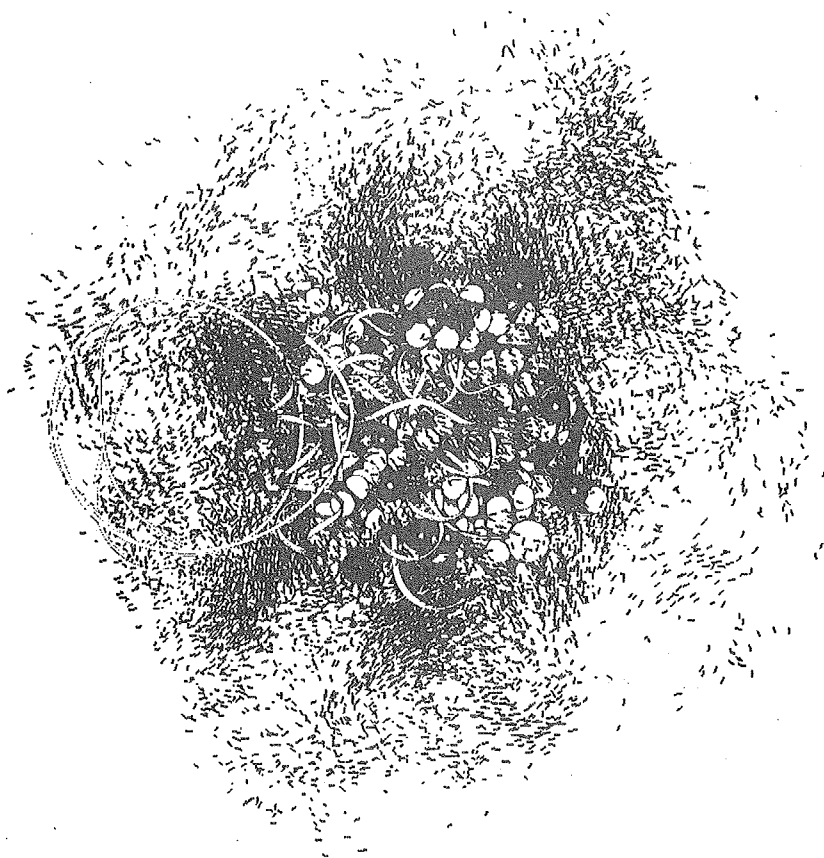


Fig. 7b

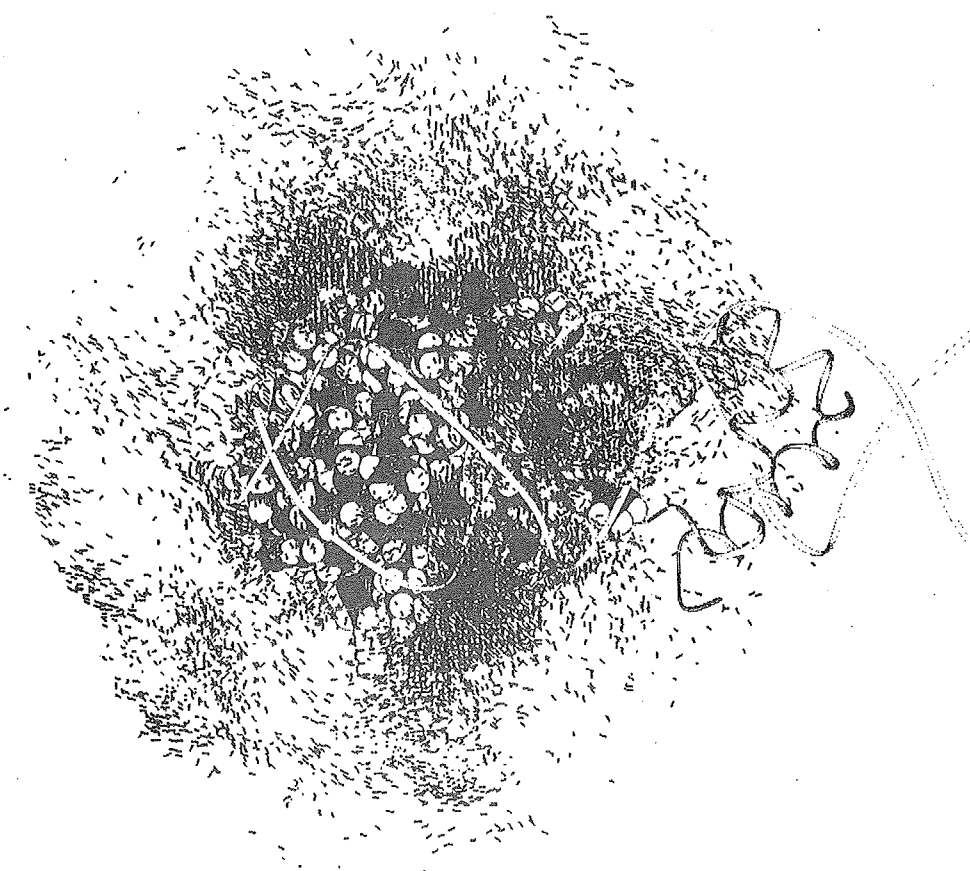


Fig. 7a

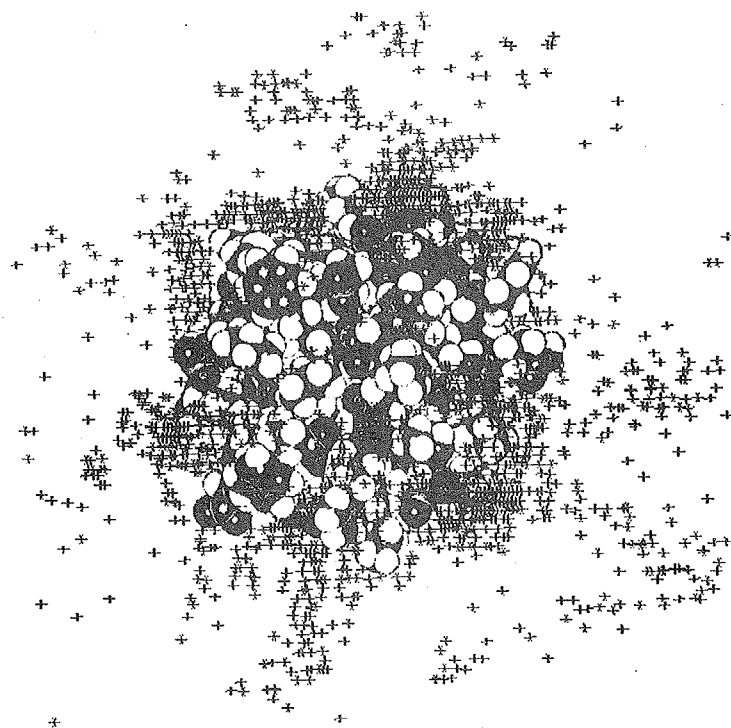


Fig. 9b

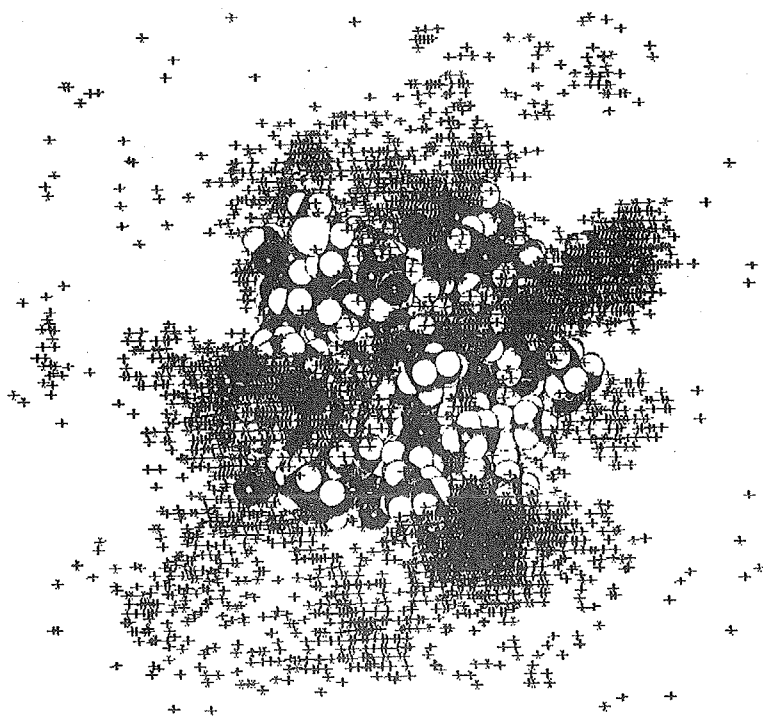


Fig. 9a

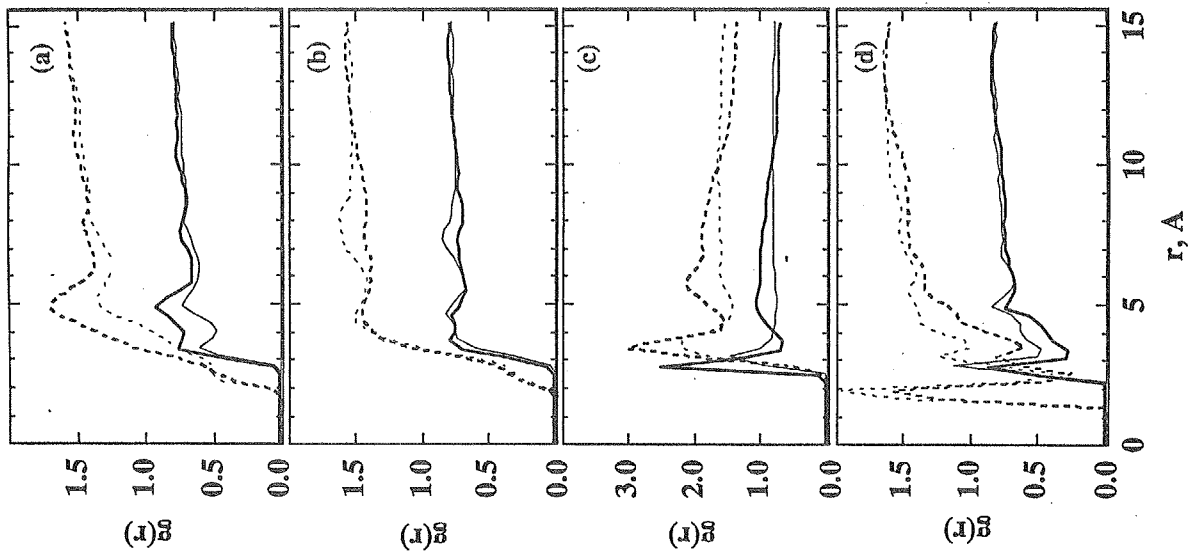


Fig. 11

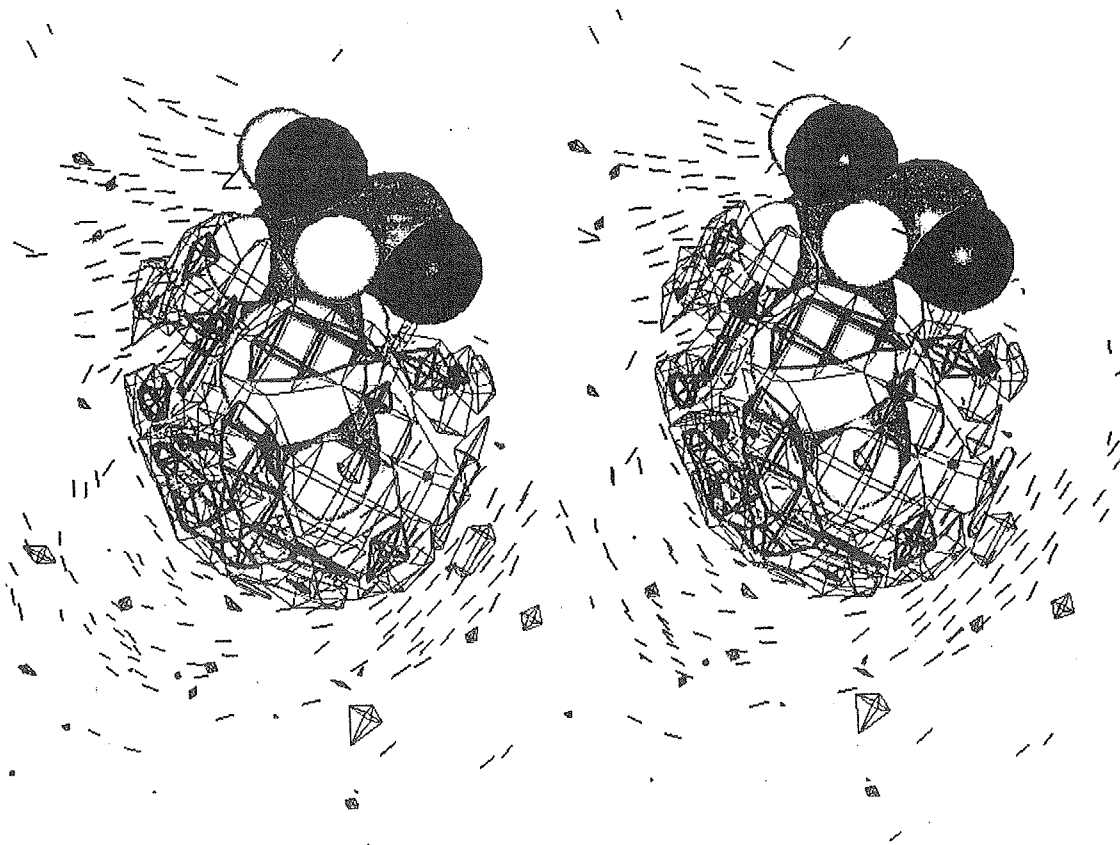


Fig. 10

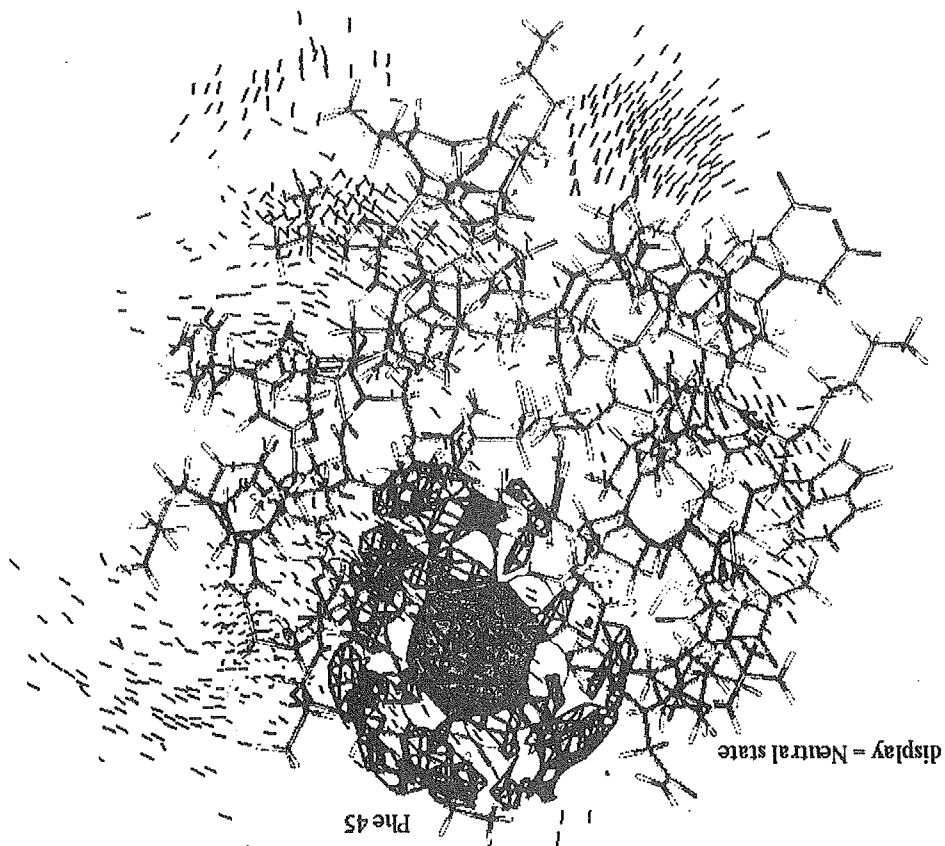


Fig. 13

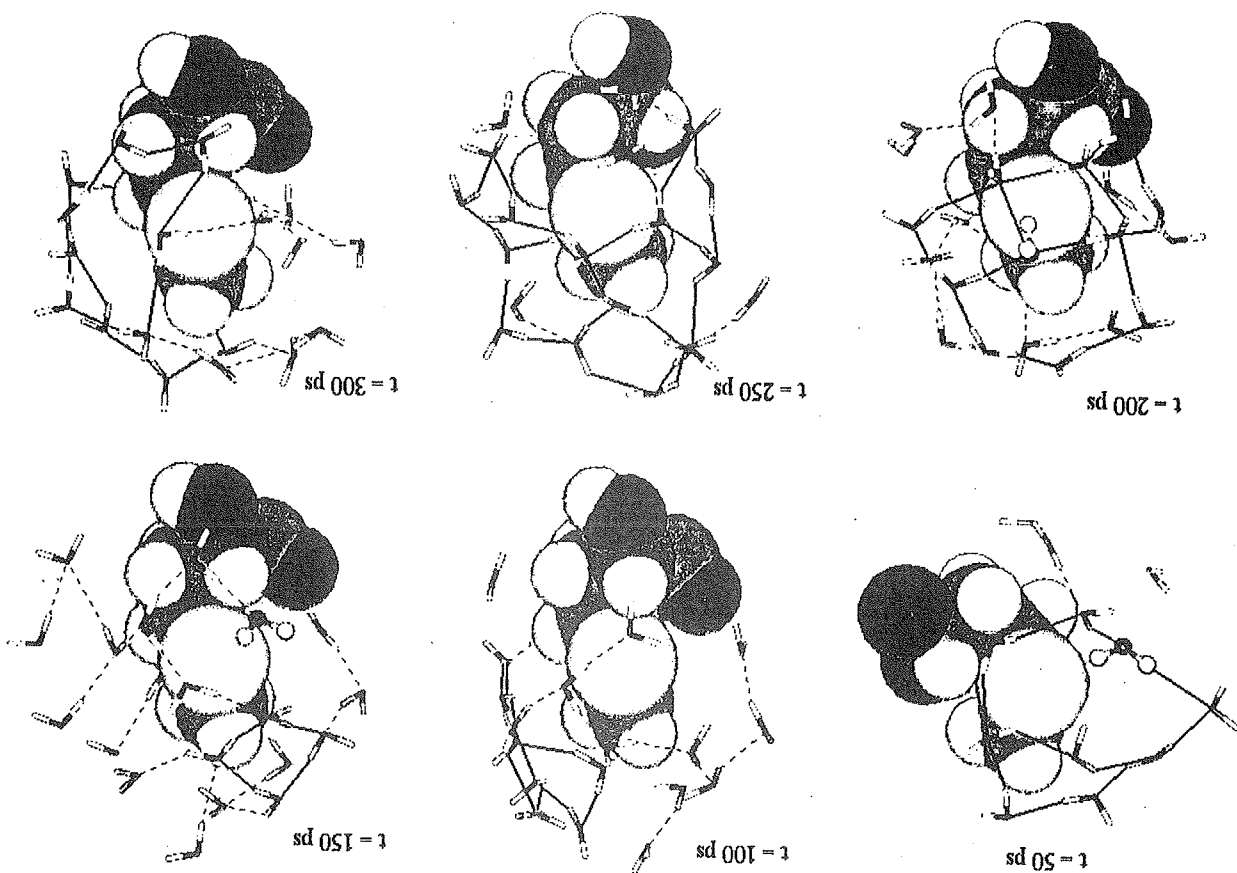


Fig. 12

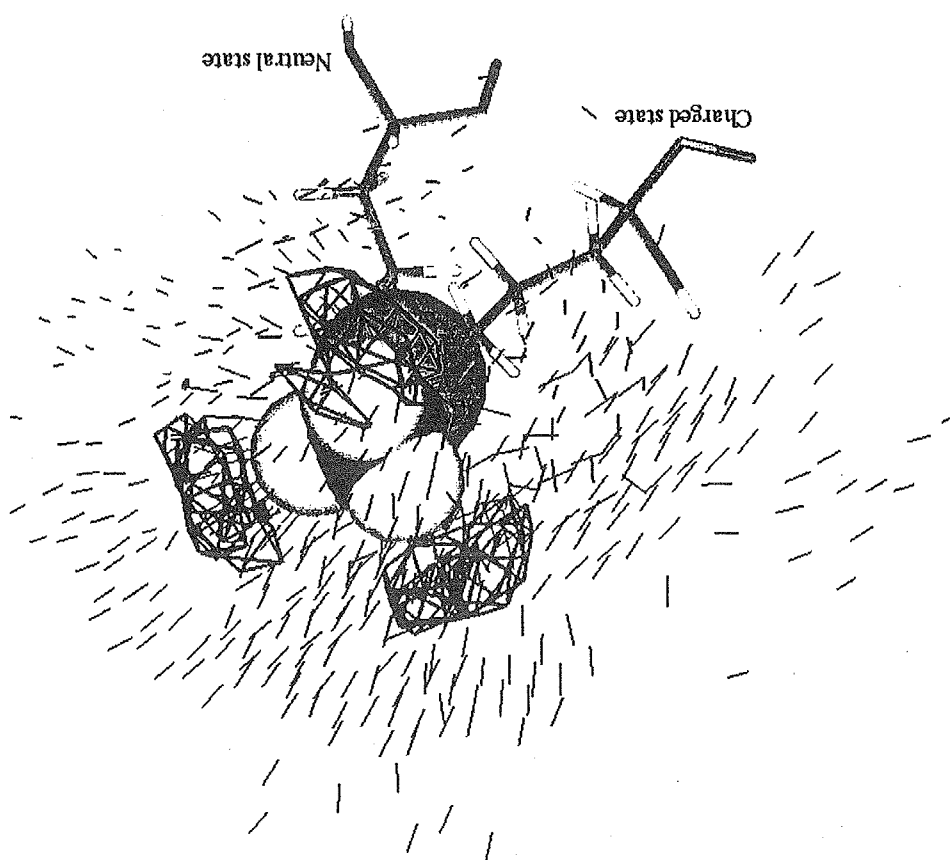


Fig. 14

6.2 NMR により決定される溶液構造の特徴と性質

MD を基にして得られる構造情報 — NMR との比較—

東京薬科大学・小島正樹

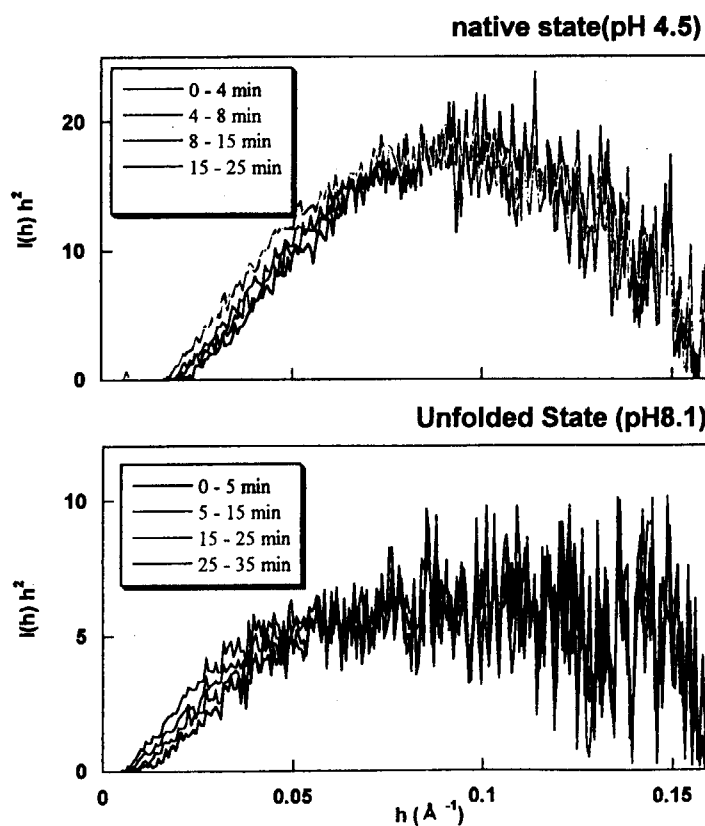
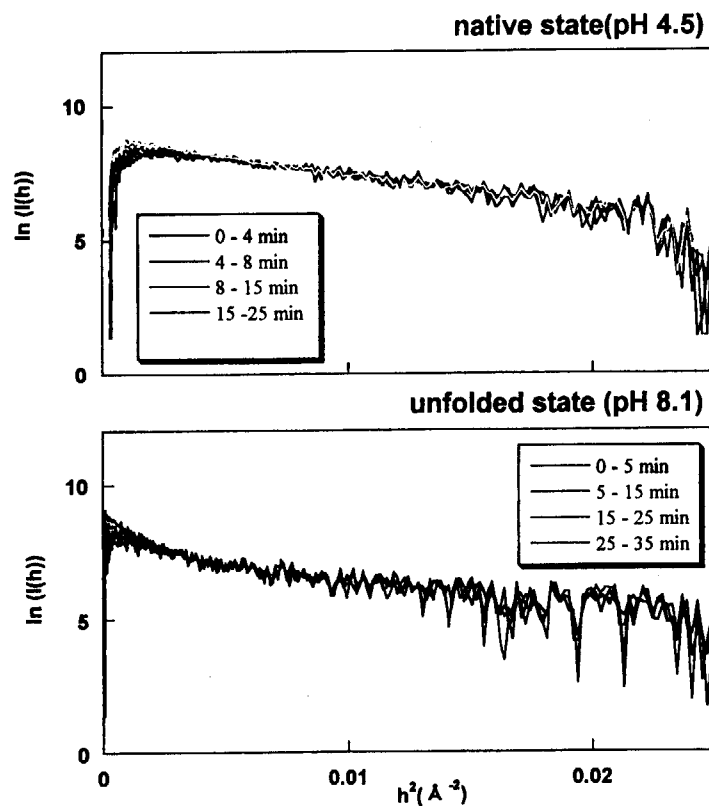
NMR による構造解析から明らかにされているように、蛋白質分子において溶液中と結晶中とではその立体構造は、細部を除いて一般には大差ないと考えられている。本発表では、X線溶液散乱と NMR とで、得られる溶液構造の差異についてとりあげる。

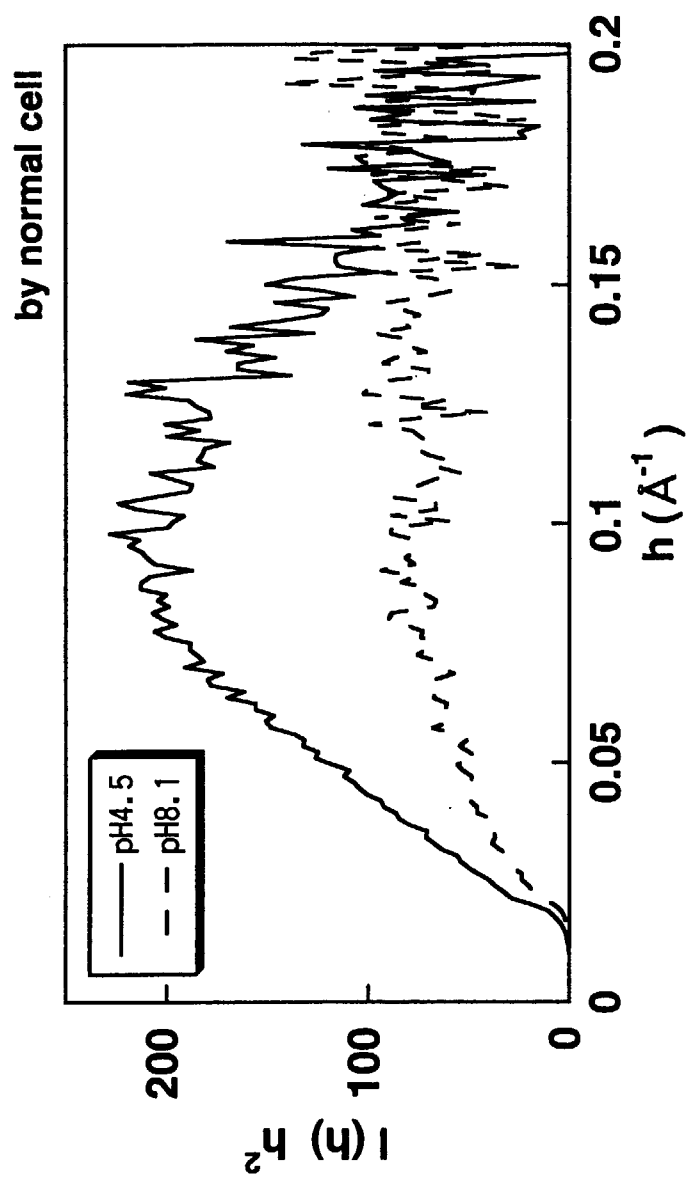
まず、NMR においては、NOE 強度を原子間距離の上限に、カップリング定数を二面角の範囲に換算し、得られた距離制限および所与の化学構造を満足する原子配置を、ディスタンスジオメトリ法あるいは拘束条件付き MD 法により決定する。このように比較的近距离の local な情報から構造を構築するため、分子全体の大きさや方向性等、global な性質には、結晶構造解析と比して誤差を生じ易い。また、スペクトル上には、各原子の運動性や多形性等、溶液特有の情報が反映しているはずであるが、これらの情報の抽出は、構造決定とは独立な方法でなされる（例えば前者に関しては、緩和時間の測定から Model-free analysis によって、後者では、交換速度の測定や Time-averaged MD 計算と組合わせて）。このため、NMR 解析内部で行われる方法間、および得られるパラメータ間の整合性に関しては、十分な吟味が必要であると考えられる（発表では例として化学シフトの計算を取り上げる¹⁾）。

一方、X線溶液散乱は、結晶構造解析と方法論を同にするため、散乱データから分子構造を決定することは無理であるが、分子構造が与えられたとき、それがどのような散乱パターンを与えるかは、かなりの精度で決定できるようになっており、近年では、このように計算した結晶構造の散乱パターンと実測散乱パターンのずれを、構造内部の二次構造セグメントの相対配置の違いや、水和層からの寄与として説明されている。

リボヌクレアーゼ T₁ を例として、結晶構造および NMR により決定された構造を基に、散乱パターンの計算を行い、両者とも実測散乱パターンと異なっていた。このためモデル構造（結晶構造あるいは NMR により決定された構造）から計算された散乱パターンと、実測散乱パターンとの残差二乗和を束縛項として拘束条件付き MD を行い、束縛項が最小になる（実測散乱パターンに合う）構造を探索することを試みた。具体的には、二面角空間におけるダイナミクスを行う NMR 用構造決定プログラム DYANA に、Dr. Timchenko より供与を受けている散乱パターン計算プログラムを組み合わせて、上記計算を行う予定である。

¹⁾ Hatano, Kojima, Tanokura, and Takahashi (*in preparation*)





Concentration dependence of Pepsin solution at pH 5.3.

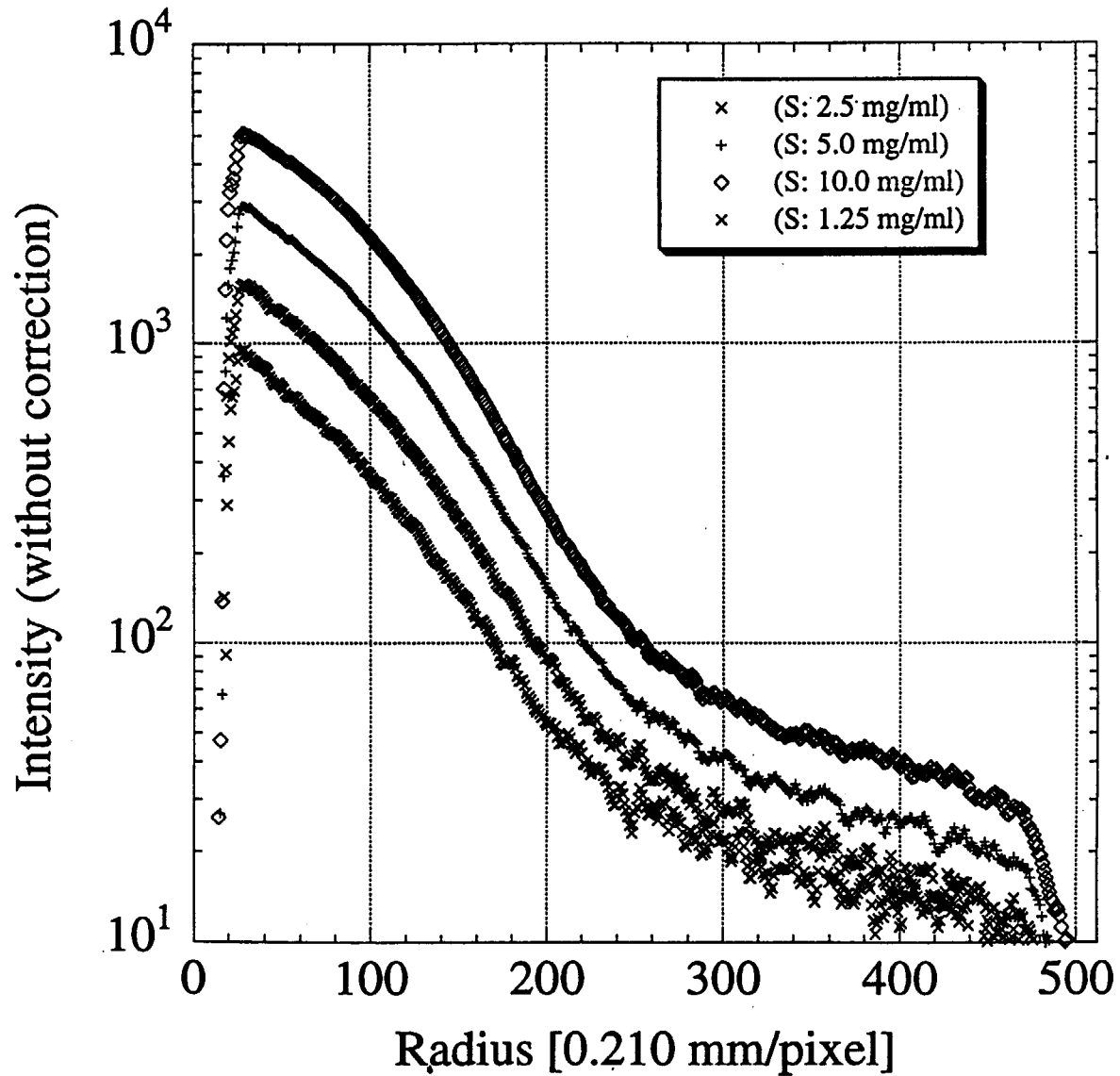


図6. フローセルおよび CCD 検出器使用時のペプシンの濃度依存性.
測定は, pH5.5, 37℃で行った.

NMR and X-Ray Solution Scattering

Masaki Kojima (Tokyo University of Pharmacy and Life Science)

Collaborators;

Kenji Takahashi (Tokyo University of Pharmacy and Life Science)

Masaru Tanokura (Tokyo University)

Yoshiyuki Amemiya (Tokyo University)

Kazuki Ito (Tsukuba University)

Hiroshi Kihara (Kansai Medical University)

Alexander Timchenko (Protein Research Institute, Russia)

Distance Restraints obtained from NMR spectra

1. NOE (Nuclear Overhauser Effect)

$$(NOE)_{ij} \propto \frac{f(r_{ij})}{r_{ij}^6}$$

r_{ij} : distance between protons i and j
 τ_c : rotational correlation time

Due to $f(r)$ factor, this determines the upper limit of distance
 (lower distance $\leftarrow$ sum of Van der Waals radius of two atoms)

$$\rightarrow L_{ij} \leq r_{ij} \leq U_{ij}$$

2. Spin-coupling Constant (J value)

$$^3J_{HH} = 6.4 \cos^2\theta - 1.4 \cos\theta + 1.9$$

$$\theta = |\phi - 60^\circ|$$

$$\phi: \text{torsion angle}$$

$$\rightarrow \begin{cases} ^3J_{HH} < 5.5 \text{ Hz} \Rightarrow -90^\circ \leq \phi \leq -45^\circ \\ \text{" } > 8.0 \text{ Hz} \Rightarrow -145^\circ \leq \phi \leq -80^\circ \\ \text{" } > 16.6 \text{ Hz} \Rightarrow -145^\circ \leq \phi \leq -100^\circ \end{cases}$$

Determination of Molecular Structure by NMR

1. Distance Geometry

1-1. Using Metric Matrix (Embedding) $\rightarrow$ Havr¹, Crippen, and Kuntz, *Biochemistry* 18, 73 (1979)1-2. Using Variable Target Function $\rightarrow$ Braun & Gr², *J. Mol. Biol.* 186, 611 (1985)

2. Restrained Molecular Dynamics

 $\rightarrow$ Brünger, Clore, Gronenborn, and Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 593 (1990)
 Nilges, Clore, and Gronenborn, *FEBS Lett.* 229, 317 (1988) (1991)

Information about dynamics of molecule from NMR

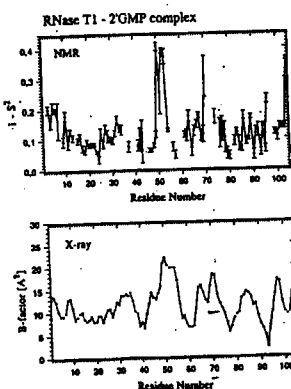
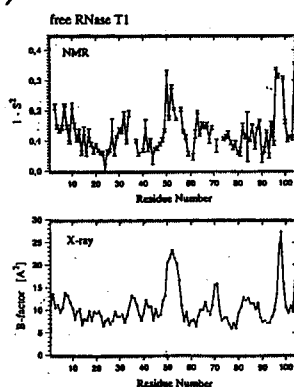
Model-Free Analysis ← independent of specific model

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2 \tau_c}{1 + (\tau_c \omega)^2} + \frac{(1-S^2)\tau_c}{1 + \tau_c^2 \omega^2} \right)$$

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_e}$$

 $J(\omega)$: spectral density S : (generalized) order parameter (measure of the degree of spatial restriction of motion) τ_c : effective correlation time (measure of the rate of motion)Lipari & Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4541 (1982)

Example (RNase T1)

Fushman, Watanabe, Tjering,
and Kisterjanz,
J. Biomol. NMR **4**, 61 (1994)

Distance Restraints from NMR data

semi-quantitative

consistency between informations obtained from NMR

Features of NMR structure

local → exact

global → somewhat different from crystal structure

Makai, Kubota, and Nakamura
J. Biomol. NMR **3**, 19 (1993)

X-Ray Crystallography; Data $\Leftrightarrow$ Molecular Structure

X-Ray Solution Scattering; Data $\leftarrow$ Molecular Structure

Pavlov & Fedorov Biopolymers 22,

NMR; Data (Spectrum) ? Molecular Structure

Calculation of NOE and chemical shift from molecular structure

{ NOE $\leftarrow$ solved by Relaxation Matrix Method (Kempers & James J. Magn. Reson. 22, 464 (1989))

{ chemical shift ?

Structural Difference between Solution and Crystal

1. Difference in local structure $\rightarrow$ *Timchenko, Pitsyn, Troitsky, and Denesyuk FEBS Lett. 22, 101 (1978)*
2. Solvation effect $\rightarrow$ *Svergun, Barbarat, Koch, Feller, and Vachette Proteins 27, 114 (1997)*
3. Multiple conformation

Theoretical Calculation of Chemical Shifts from Molecular Structure

Structural Shift (Conformation-Dependent Shift)

$\sigma_{\text{struc.}} \equiv \sigma_{\text{obs.}} - \sigma_{\text{random coil}}$ *random coil chemical shift (obtained by experiment)*
Bandi & Wüthrich Biopolymers 22, 285 (1999)

1. Ring current shift of aromatic residues

$$\sigma_{\text{ring}} = -i B G(r), \quad G(r) = \sum_{i,j} S_{ij} \left(\frac{1}{r_i^2} + \frac{1}{r_j^2} \right)$$

i, B; constants

r_i; distance from ring atoms i to the proton

G(r); geometric factor

S_{ij}; area of triangle formed by atoms i, j and the proton projected onto the ring plane

2. Magnetic anisotropy effect from carbonyl and/or C-N bonds of amide groups

$$\sigma_{\text{ani}} = \sum_{i,j} \frac{1}{r_{ij}^3} \{ \Delta\chi_1 (1 - 3 \cos^2 \theta) + \Delta\chi_2 (1 - 3 \cos^2 \phi) \}$$

r_i; distance from the proton to center of anisotropy

$\Delta\chi$; constant

3. Electrostatic field effect polarizing C-H bonds

$$\sigma_E = \sum_i \frac{Q_i}{r_i^2} \cos \theta_i$$

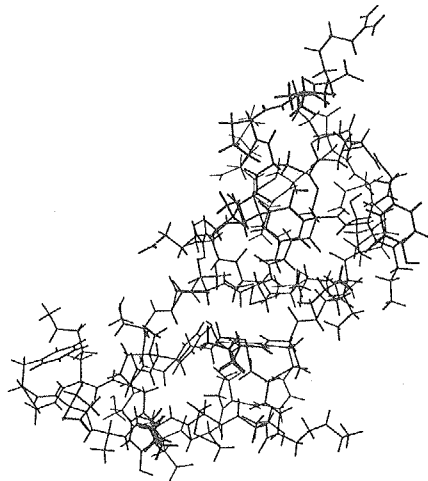
$$\Rightarrow \sigma_{\text{struc.}} = \sigma_{\text{ring}} + \sigma_{\text{ani}} + \sigma_E$$

(i.e. $\sigma_{\text{calc.}} = \sigma_{\text{r.c.}} + (\sigma_{\text{ring}} + \sigma_{\text{ani}} + \sigma_E)$)

Model 0: 1bi6.pdb

Bromelain inhibitor VI (BI6)

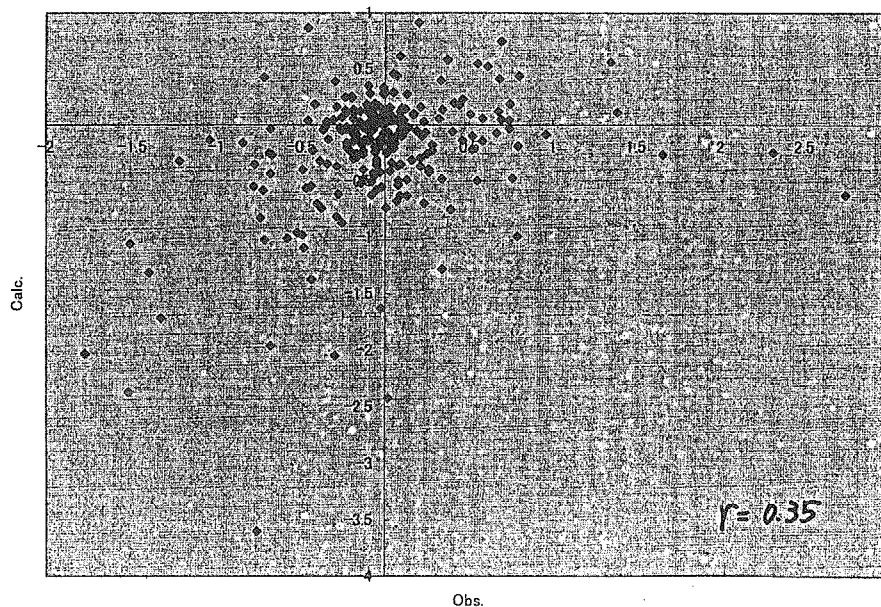
*Hafano, Kajima, Tanekawa, and Takahashi:
Biochemistry 35, 5577 (1996)*



UCSF MidasPlus

相関 グラフ 1

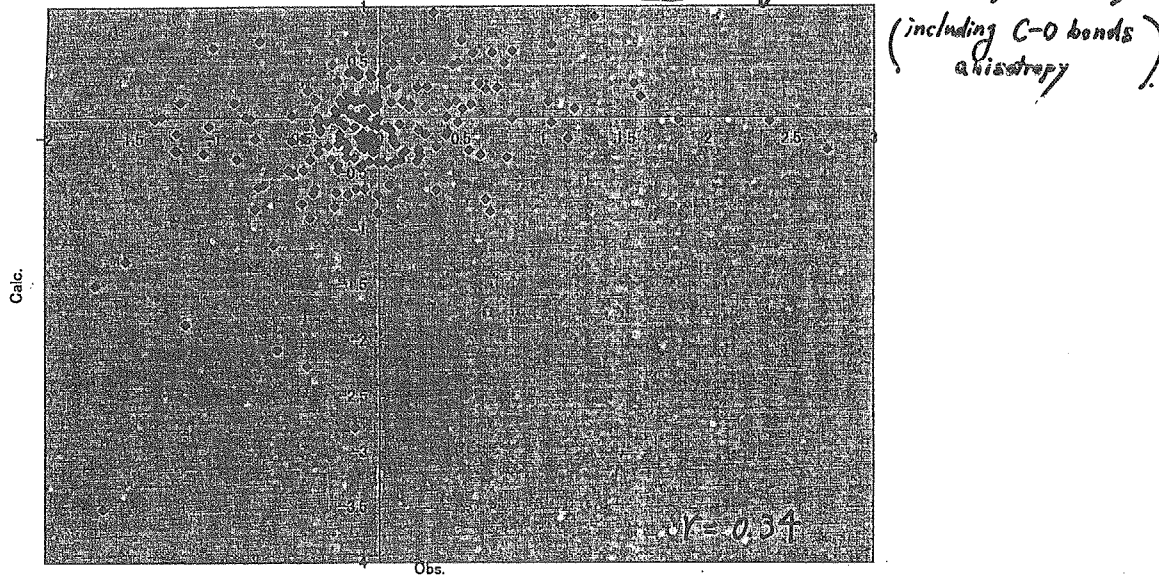
*Correlation between observed and calculated structural shifts for protons of BI6
(method of Oesapay & Case) J. Am. Chem. Soc. 113, 9436 (1991)*



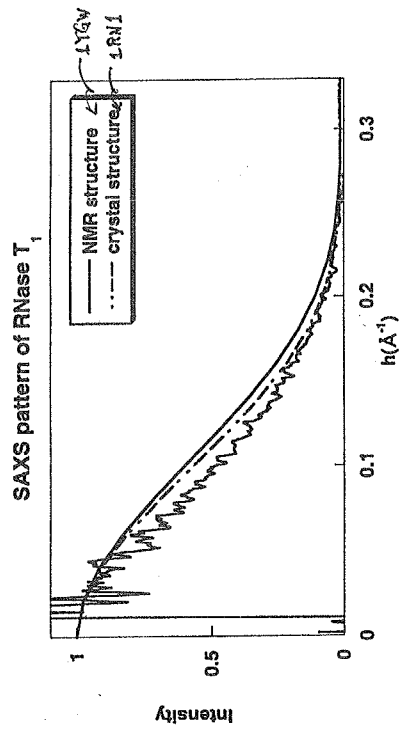
*implemented in the SAND
module of AMBER*

相関 グラフ 2

Correlation between observed and calculated structural shifts for protons of B16
(method of Williamson & Asakura) J. Magn. Reson. Ser. B, 101, 63 (1993)



Other Ref.
Kuszevski, Grossmann, and Cleve.
J. Magn. Reson. Ser. B 107, 293 (1995)
(→ implemented in XPLOR 3.8)



$$A(h) = F(h) - A_0(h)$$

$$F(h) = \sum_j f_j(h) e^{i h \cdot r_j}$$

$$A_0(h) = \sum_j A_{0j}(h) e^{i h \cdot r_j} (= \rho_0 \int dV e^{i h \cdot r})$$

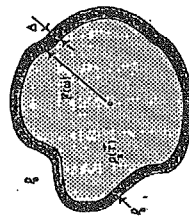
$$A_{0j}(h) = 8 \rho_0 \frac{\sin(ch_0 a)}{h_0} \frac{\sin(ch_0 a)}{h_0} \frac{\sin(ch_0 a)}{h_0}$$

j -th parallel piped

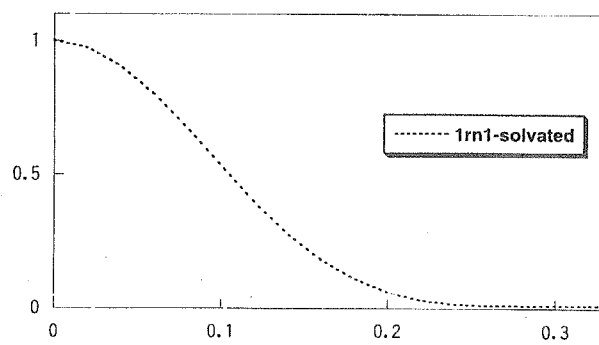
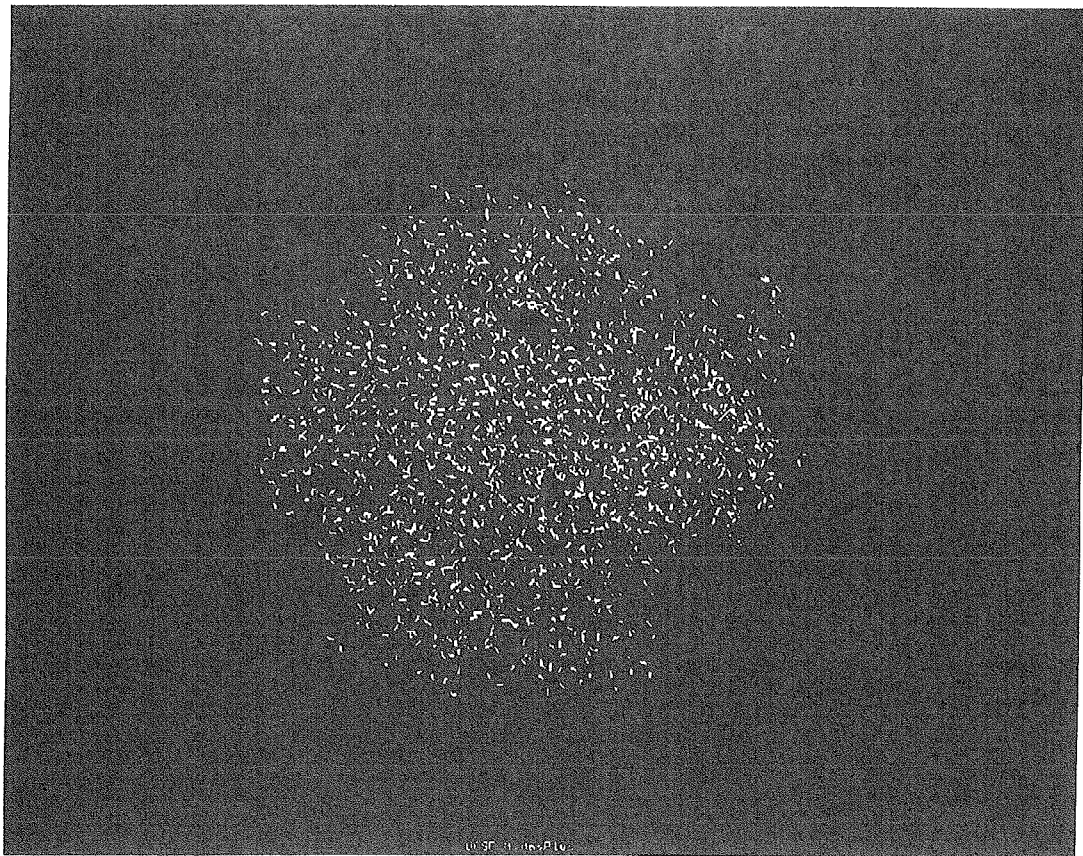
$$I(h) = A \cdot A^* = |F(h) - A_0(h)|^2$$

$$I(h) = \langle I(h) \rangle_\omega$$

Tachikawa, P. H. J. and V. M. S. J. Appl. Cryst. 27, 1001 (1994)



Sveinsson, B. and Kock J. Appl. Cryst. 28, 788 (1995)



Calculation is performed for SAXS data using

$$E = \sum_i \{I_{obs}(k_i) - I_{calc}(k_i)\}^2$$

instead of E_{pot} for NMR data

Assuming harmonic approximation for the dependence of E on the atomic coordinates

ref. crystallography

$$E = \sum_{i,j} \{ \frac{1}{2} k_{ij} (x_i - x_j)^2 \}$$

Dräger, Kasper, and Kasper
J. Phys. Chem. 1980, 84, 1000
J. Phys. Chem. 1980, 84, 1000
J. Phys. Chem. 1980, 84, 1000

Calculation in torsion angle space

Target Function

$$T = \sum_i \frac{(U_{ij}^2 - r_{ij}^2)^2}{L_{ij}^2} + \sum_i (L_{ij}^2 - r_{ij}^2)^2 + \sum_i (S_i - S_j)^2 - r_{ij}^2$$

r_{ij} : distance between atoms i and j in model structure
 U_{ij} : upper distance limit between atoms i and j
 L_{ij} : lower " " " "
 S_i : vdW radius of atom i
 w : weighting factor (constant)

Minimizing T value with molecular structure as variables

$$\frac{\partial T}{\partial \phi} = 0$$

In dynamics calculation, T has the role of potential energy.

$$E_{pot} = w \cdot T$$

w : constant

Solving Lagrange equation

$$\frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{q}_i} \right) - \frac{\partial L}{\partial q_i} = 0 \quad (i=1, \dots, n)$$

$$L = E_{kin} - E_{pot} : \text{Lagrangian}$$

E_{kin} : kinetic energy

Güsterl, Hünenberger, and Wüthrich
J. Mol. Biol. 223, 203 (1998)
(implemented in STRAIN)

(Analytical formula of first derivative of each term is required for both calculations)

6.3 “溶液散乱測定を用いた構造予測法の紹介”

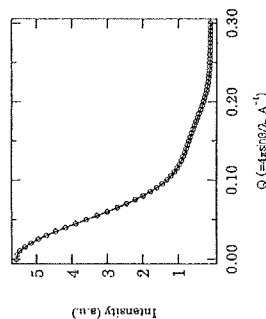
高エネルギー加速器研究機構
物質構造科学研究所
上久保 裕生

蛋白質から得られる溶液散乱曲線には 10~15 個程度の独立なパラメータしか含まれていない。従って、溶液散乱曲線から直接蛋白質の形状を求めるためには、形状をあらわすパラメータ数を何らかの近似を用いて減らす必要がある。Svergun や Stuhrmann らは蛋白質の形状 (Surface Envelope) を低次数の球面調和関数の重ね合わせで近似することによって、独立なパラメータを減らし溶液散乱曲線を用いたりボソーム等の構造解析を行ってきた。[1・2・3] この手法では、散乱曲線に含まれる独立なパラメータ数とほぼ同数のパラメータで蛋白質の形状を決定しており極めて合理的なものである。しかしながら、一方で、ミオシンやカルモジュリンのような異方性の大きな形状は、原理的に低次数の球面調和関数では近似することができず、この手法を適応するのが困難であった。この問題を解決する方法として、適当な大きさの Dummy Atom を測定結果の散乱曲線にあうように組み合わせて形状を再構成する方法がある。しかし、この方法では少なくとも 100 個程度の Dummy Atom の位置を決める必要があり、適当な束縛条件を設け収束性のいい最適化アルゴリズムを用いなくては解が収束しない。そのため、従来は実験者が Trail and Error で Dummy Atom を再構成していくのが主流であった。最近になって、Chacon らのグループと Svergun が別々に、解の導出に用いる最適化アルゴリズムに工夫を凝らし、直接散乱曲線から蛋白質の形状を導き出すプログラムを開発した。[4・5] ここでは、特にこれら 2つのプログラムを取り上げ、それぞれで用いられている束縛条件、最適化アルゴリズムについて紹介し、実際に与えられる結果を示す。

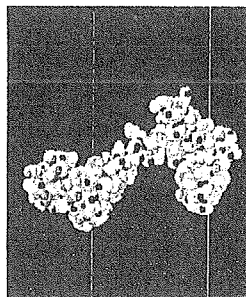
ここで紹介したプログラムは全て Web 上で公開されており誰でも入手することができる(OHP 参照)。(Chacon らが開発したプログラムに関しては、現在ヴァージョンアップを行っている最中で、それが終了し次第配布するとのことである。) これらのプログラムは適応方法さえ注意すれば、散乱曲線から直感的な実空間の情報を得ることができ、有力な解析手法となることが期待される。

- [1] Stuhrmann, H. B. (1970) Acta. Crystallogr. A. 26, 297-306.
- [2] Svergun, D. I. and Stuhrmann, H. B. (1991) Acta. Crystallogr. A. 47, 736-744.
- [3] Svergun et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 11826-11830.
- [4] Chacon, F. et al. (1998) Biophys. J. 74, 2760-2775.
- [5] Svergun, D. I. (1999) Biophys. J. 76, 2879-2886.

Inverse Scattering Problem



?



Shannon rule

$$Ns = D_{\max} (Q_{\max} - Q_{\min}) / \pi$$

(Q=4πsinθ/λ)

→ 10 ~ 15 (独立なパラメータ)

1. 適当な収束条件
境界条件等
2. 収束性のいいアルゴリズムの使用
Genetic Algorithm, Simulated Annealing
3. 計算時間の短縮
球面調和関数での展開
DALAIアルゴリズム

入手可能なプログラムパッケージ

EMBL-Hamburg, DORIS strage ring, DESY Home Page
URL: <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfoResearch/Sax/index.html>

SASHA

H.B. Stuhmann *Acta Cryst.* (1970) A26, 287-
D.I. Svergun *et al. Acta Cryst.* (1991) A47, 736-744.
D.I. Svergun *et al. Acta Cryst.* (1996) A52, 419-426.

DAMMIN

D.I. Svergun *Biophys. J.* (1999) 76, 2879-2886.

DALAI_GA

P. Chacon *et al. Biophys. J.* (1998) 74, 2760-2775.

Pablo Chacon Montes Home Page
URL: <http://aktoria.cb.csic.es/~pablo/>

モンテカルロシミュレーションを使ったSAXSデータからの構造予測
D. Walther, M. Bada, I. Millett, M. Delarue and S. Doniach (1998)
Reconstruction from SAXS Data of low resolution structure of Switch
Activating Protein (SAP1) from yeast, SSRL activity report, 7/175-176.

DALAI_GA

Biophysical Journal 1998, 74, 2760-2775

"Low-Resolution Structures of Proteins in Solution
Retrieved from X-ray Sacattering with a Genetic Algorithm."
P. Chacon, F. moran, J. F. Diaz, E. Pantos, and J. M. Andreu.

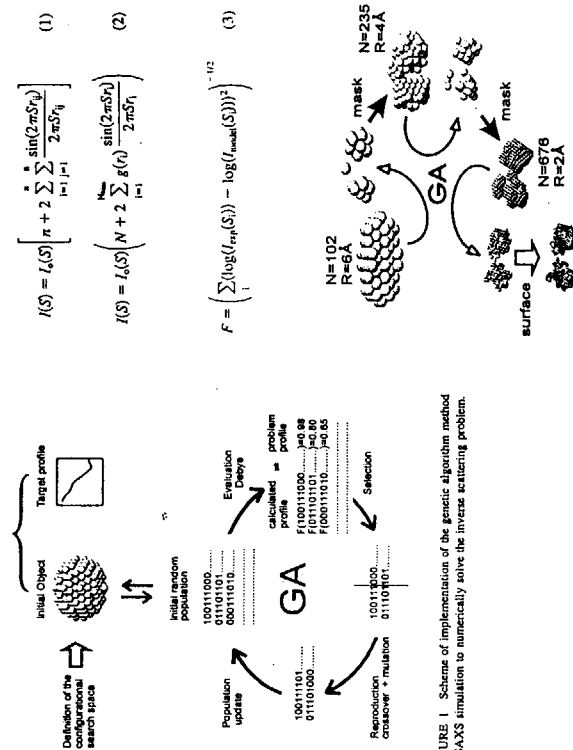
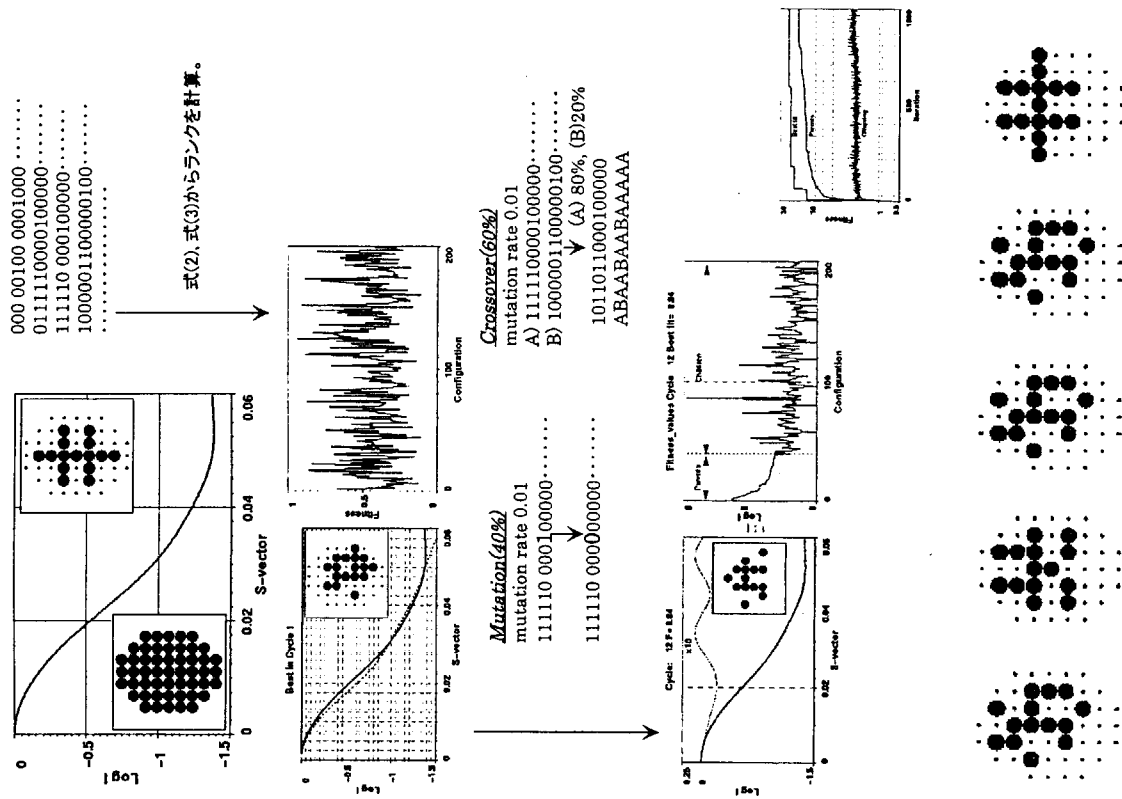


FIGURE 1 Scheme of implementation of the genetic algorithm method of SAXS simulation to numerically solve the inverse scattering problem.

構造予測のスキーム

1. ターゲットの蛋白質を内包できる空間を定義し、ダミーアトムで埋める。
(ダミーアトムの半径(R) < $\pi/Q \sim 6\text{\AA}$)
2. 乱数によってSequenceの集合を発生。(約400個の配列を含む)
3. それぞれのSequenceに対しDALAIアルゴリズムを使い $I_{\text{model}}(S)$ を計算し、 F (上式) によって各配列のランクを計算する。
4. ランクの高い上位50%のSequenceを残し、下位のSequenceを捨てる。
5. 上位のSequenceに対し、mutationもしくはcrossoverの演算子をかけ、新たなSequenceを生成する。
6. ダミーアトムの半径を小さくし、Refinement。

DALAI_GA



DALAI_GA

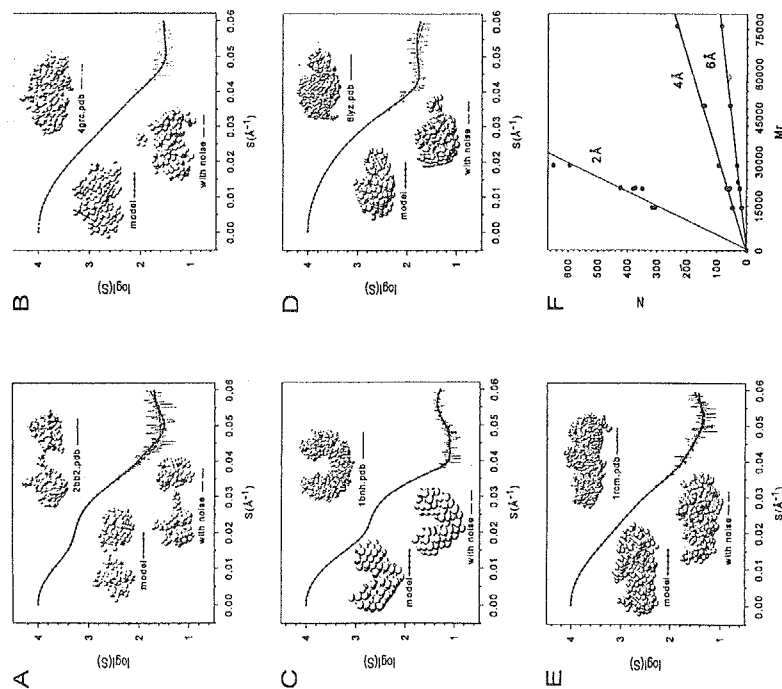


FIGURE 3 Calculated and fitted scattering profiles for the known protein structures of (A) β 2-crystallin (2B2.pdb), (B) γ -crystallin (4gc.pdb), (C) ribonuclease inhibitor (1bth.pdb), (D) lysozyme (1tmh.pdb), (E) two molecules of lysozyme (1tmh.pdb), (F) γ -crystallin (8y.pdb), (G) calculated profiles for each pdb file with the program DALAI (P. Svergun et al., 1998). Lysozyme atoms and water molecules have not been taken into account. Points (circles), DALAI_GA simulated profiles. Dashed lines, calculated profiles with white noise. Dotted lines, corresponding simulated profiles. A CTRK view of the problem structure is shown in the upper right part of each panel, and the best fitted bead models are shown below it. (P) The numbers of beads N in models with different bead radii are plotted versus the abscissa. The corresponding linear regression parameters ($N = a + bS$) are $a = 0.497$, $b = 1.13 \times 10^{-3}$, $r = 0.998$, $a = 1.151$, $b = 3.0 \times 10^{-3}$, $r = 0.998$, $a = 8.70$, $b = 20.68 \times 10^{-3}$, $r = 0.974$ for bead radii of 6, 4, and 2 Å, respectively. Data include those from the models derived from scattering profiles with and without noise (A-F) and similar experiments with lactoferrin (1lfd.pdb, M_r 76,000).

DAMMIN

Biophysical Journal 1999, 76, 2879-2886
 "Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing."
 D. I. Svergun.

$$f(\mathbf{r}) = 2\pi^2 \sum_{j=0}^{\infty} \sum_{k=0}^{\infty} \left[\sum_{l=0}^{\infty} [\Delta\rho A_{lm}^{(j)}(\mathbf{r})]^2 + 2 \sum_{l=0}^{\infty} \Delta\rho A_{lm}^{(j)}(\mathbf{r}) \Delta\rho A_{lm}^{(k)}(\mathbf{r}) \right] \exp(-i\mathbf{r} \cdot \mathbf{l})$$

$$A_{lm}^{(j)}(\mathbf{r}) = i \sqrt{2\pi} f(\mathbf{r}) \sum_{j=1}^{N_j} j(j+1) Y_{lm}^{(j)}(\mathbf{r})$$

N_j : 蛋白質内に電子密度が異なる領域が K-phaseある時の、散乱強度の球面調和関数展開表示

収束条件

$$f(X) = \chi^2 + \alpha P(X)$$

$P(X)$: 同様のDummyAtomができるだけ近接するようにするための収束条件。

$$P(X) = 1 - \langle C(Ne) \rangle$$

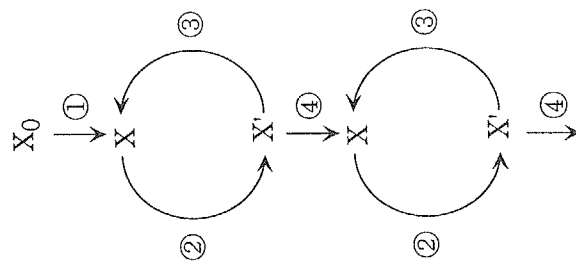
$$C(Ne) = 1 - [\exp(-0.5Ne) - \exp(-0.5Nc)]$$

Nc : 近接Atom HexagonalPackの時12

Ne : 近接する同種(Phase同じ)Atomの数
 $P(Ne=12)=0$ $P(Ne=8)=0.057$ $P(Ne=0)=0.998$

$$\chi^2 = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N [(f_{ij}^0(\mathbf{r}) - f_{ij}^l(\mathbf{r})) / \sigma(\mathbf{r}_j)]^2$$

構造予測のスキーム



- ① シミュレーション温度T0で初期構造X0を決める。
- ② 1つのDummyAtomを選び、ランダムにPhaseをかえ、新しい構造(X')を決める。
- ③ $\Delta = f(X') - f(X)$ を計算し、 $\Delta < 0$ ならばX'に置換する。 $\Delta > 0$ ならば、 $\exp(-\Delta/T)$ の確立でX'に置換する。
- ②~③のプロセスをTー一定のまゝ、100N回繰り返す後、X→X'の置換を10N回繰り返した後、
- ④ 系の温度をT→0.9xTに下げる。

DAMMIN

DAMMIN

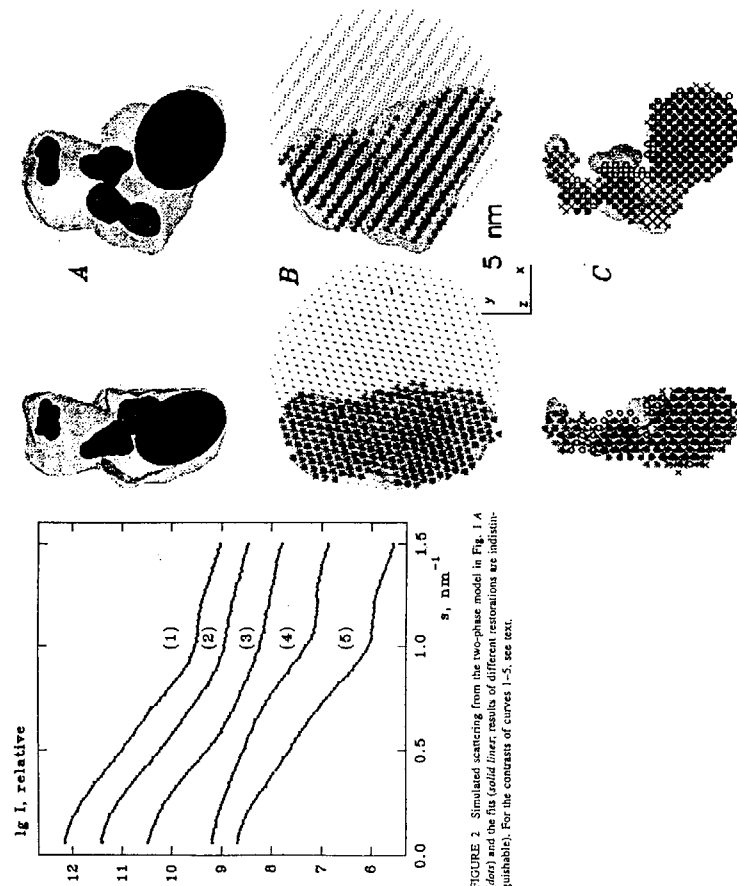
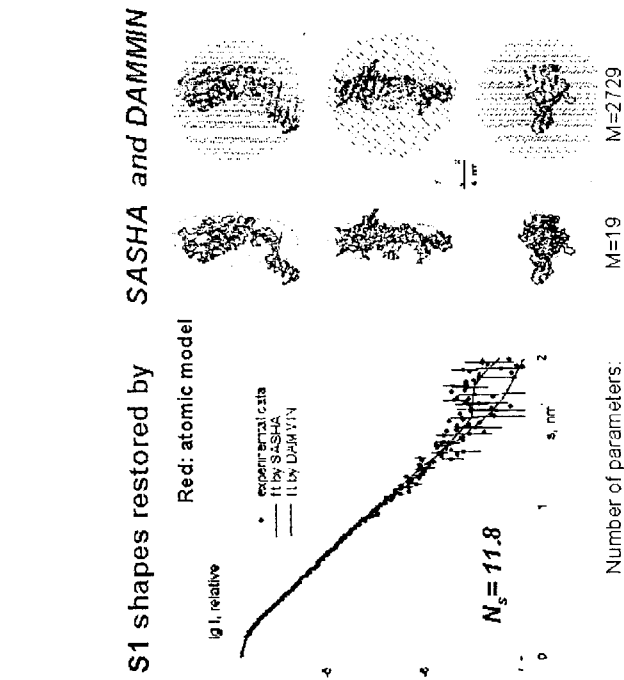
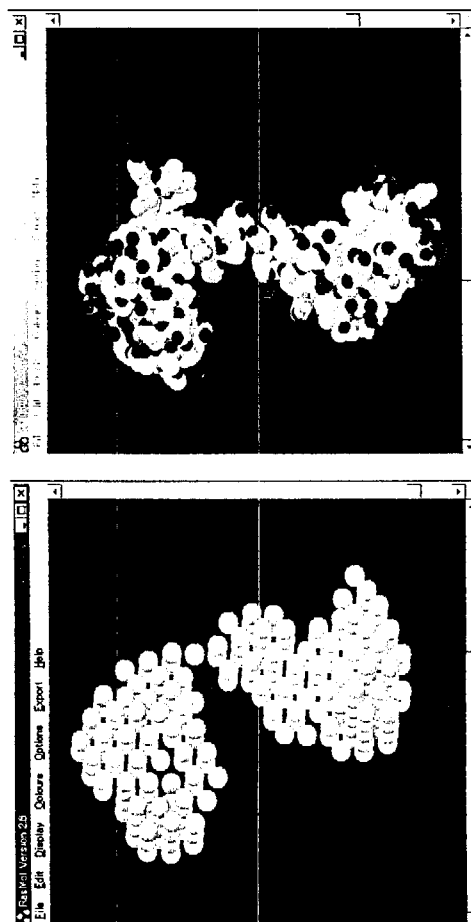
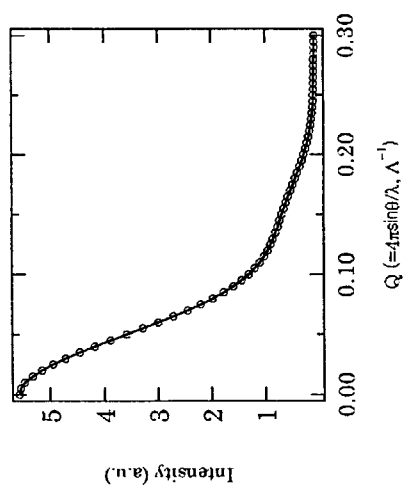


FIGURE 2. Simulated scattering from the two-phase model in Fig. 1 A (left) and the fit (solid lines); results of different restorations are indistinguishable. For the contrasts of curves 1–5, see text.

DAMMIN



7. 新しい実験のために その2 中性子

7.1 統合計画中性子源と新しい中性子分光器の可能性について

高エネルギー加速器研究機構

中性子科学研究施設

古坂道弘

1998 年秋頃に急に気運が高まり、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) が推進してきた大型ハドロン計画 (JHF) と日本原子力研究所 (原研) の中性子科学計画が統合され、協力して大強度陽子加速器科学計画を推進していくことになった。これに伴い、双方の計画の要であった中性子施設も協力して推進していくことになった。当面の推進チームが作られ、双方の計画のすりあわせ作業が行われ、統合計画として一本化された計画としてまとめられた。また、概算要求案も完成しつつあり、平成 13 年度 (2001 年度) からの予算獲得に向け様々な努力が行われている。完成予定は 2005 年度の末である。1999 年の末からは文部省、科技厅主催で、この計画に関する第三者評価委員会が何度か開かれ、2000 年の 5 月には報告書が出される予定である。最近、一年の時限付ではあるが、さらに一歩きちんとした枠組みの組織が作られ、計画の実現に向けて作業が続けられている。

中性子グループは統合推進チームの下の一つのグループとして活発な活動を続けてきた。また、中性子グループの下に中性子統括班が置かれ、中性子関係の執行部的役割を負うことになった。その下に中性子源グループ、分光器検討グループ、デバイス企画グループ、サイエンスグループが立ち上がりつつあり、さらに、中性子ビームライングループが立ち上がる予定である。

中性子は構造生物学の研究のためには強力な手段となり得る大きな潜在能力を持っているが、現在の中性子源では中性子強度があまりにも低すぎる。このような状況をうち破り、中性子が有効な道具となるためには、現在に比べ 2 桁以上、出来れば 3 桁明るい中性子線源、それを有効に利用するための光学デバイス、新しい概念の中性子分光器が必要不可欠である。そのような意味合いから現在全く新しい概念の光学素子の開発が行われつつある。一つは磁場による中性子の制御であり、磁気レンズ、磁気プリズムが日本で発案、開発され、基本的性能が確かめられ、さらに実用に向けた開発が進んでいる。その他にも高性能ミラーによる収束デバイス、高位置分解能、高計数率の二次元シンチレーション検出器等の開発が進められている。

構造生物の次世代の分光器ともいうべき Low-Q、low-energy 非弾性散乱測定装置に関しても、集光デバイス、磁気プリズムを利用することにより非常によい性能のものが出来る可能性があることが分かってきている。

統合計画中性子源における 新しい中性子分光器の 可能性について

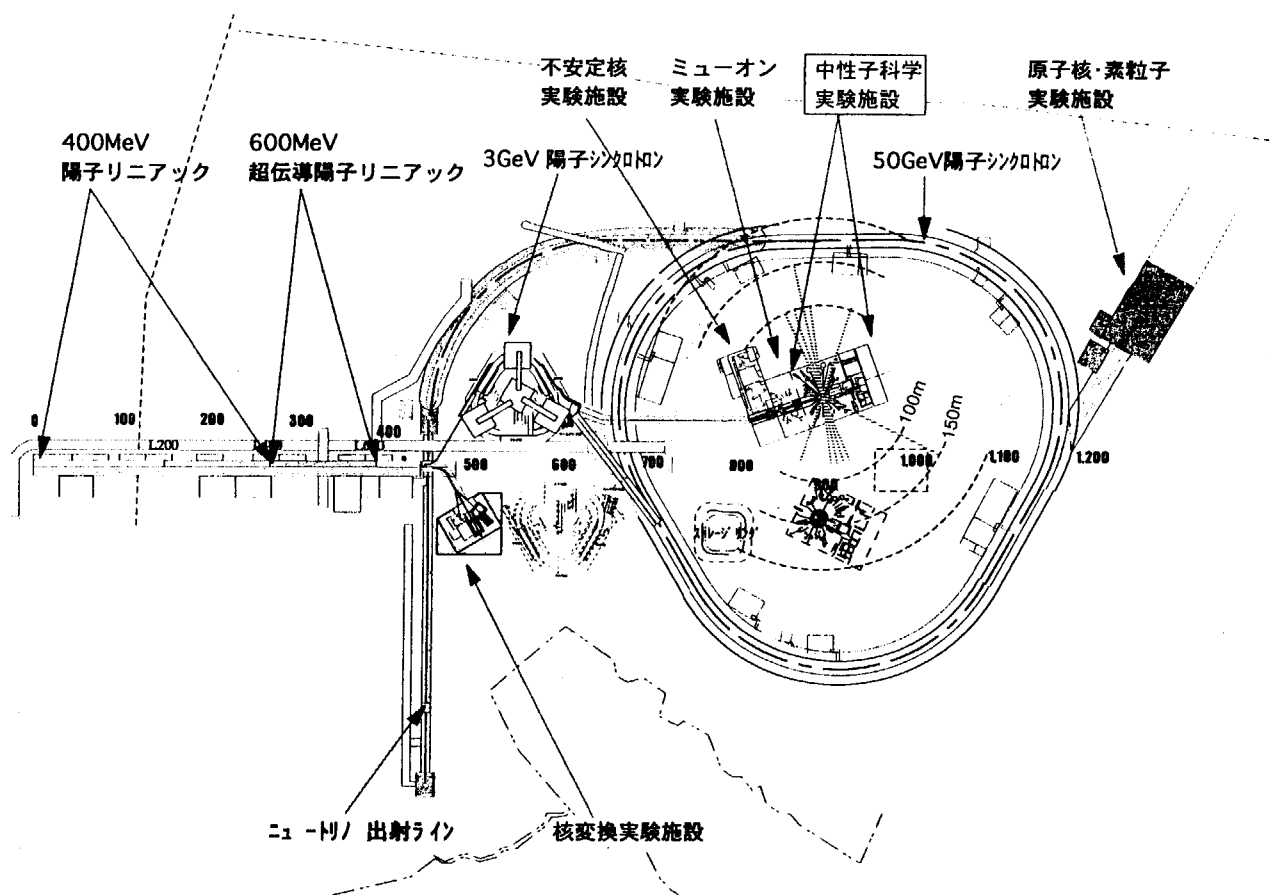
KEK 古坂道弘

Contents

- ◆ 統合計画の概要
 - ◇ 施設
 - ◇ 推進体制
- ◆ 中性子散乱装置
 - ◇ 中性子散乱装置
 - ◇ 中性子光学素子開発

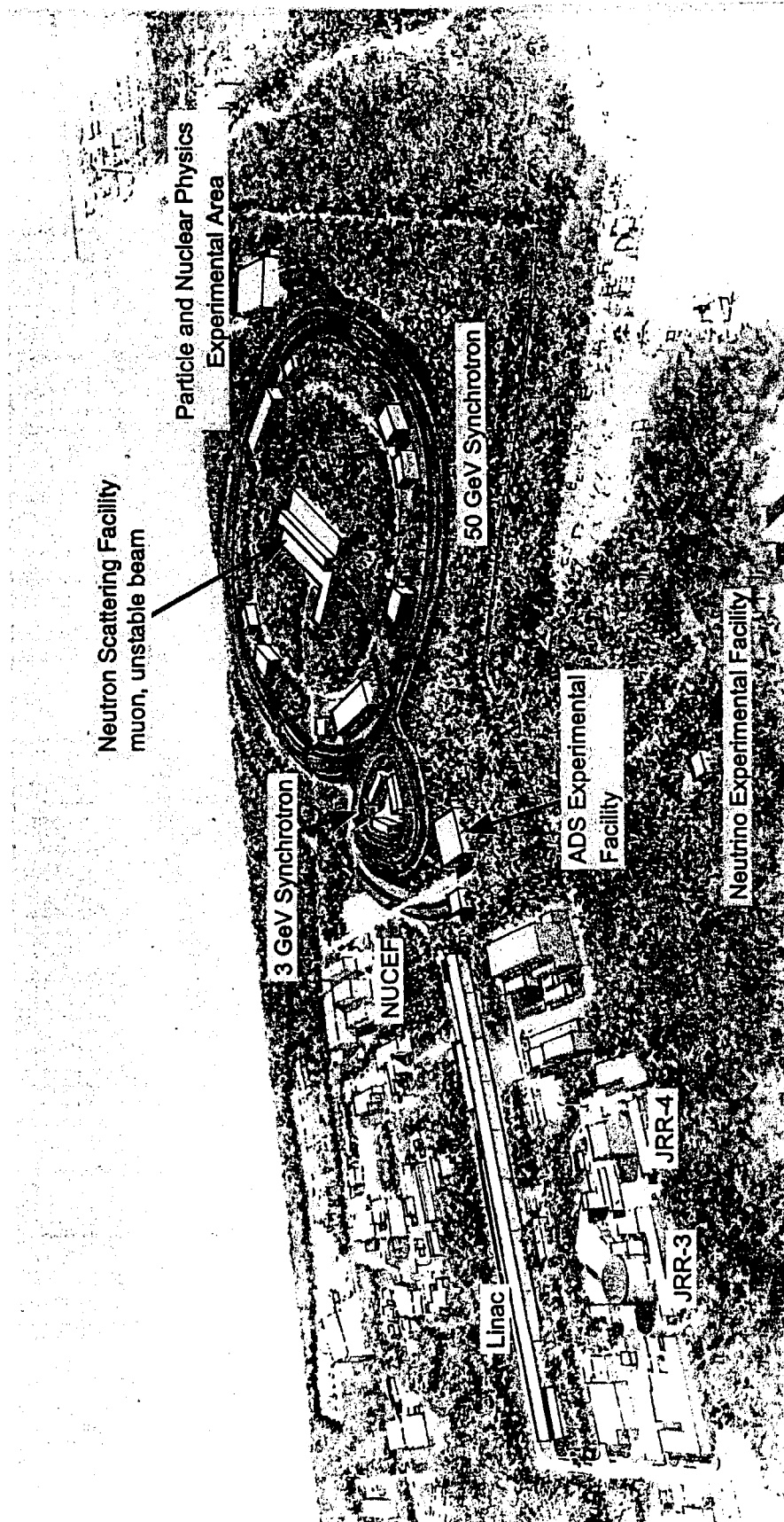


00.2.5



Proposed Schedule

	FY2000	FY2001	FY2002	FY2003	FY2004	FY2005	FY2006	FY2007	FY2008
Japanese Government Reorganization	◆								
Overall project	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
Building Construction	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
Linac	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
3-GeV Synchrotron	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
50 GeV Synchrotron	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
Neutron Facility	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
Neutron Spectrometers		=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
Muon Facility			=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
Unstable Beam Facility			=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
Nuclear/Particle Physics Facility			=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
Transmutation Facility			=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
	R&D	Construction budget				1MW Beam	5MW Beam		
		Phase 1					Phase 2		



JAERI-KEK Joint Project

評価部会の進め方について

「第三者評価」

- 11月19日 原子力委員会で評価部会の設置を決定
11月22日 学術審議会加速器科学部会で評価部会の設置を決定

- 12月16日 評価部会(第1回)
・部会の進め方
・計画概要のヒアリング
・評価の観点について

- 1月中旬 評価部会(第2回)
・国際レビュー等のフォローについて
・技術的、学術的評価について

- 2月中旬 評価部会(第3回)
・経済的、社会的波及効果等についての評価
(コスト／ベネフィット等の観点から)
・運営体制等について

- 3月中旬 評価部会(第4回)
・評価報告書の素案作成・検討

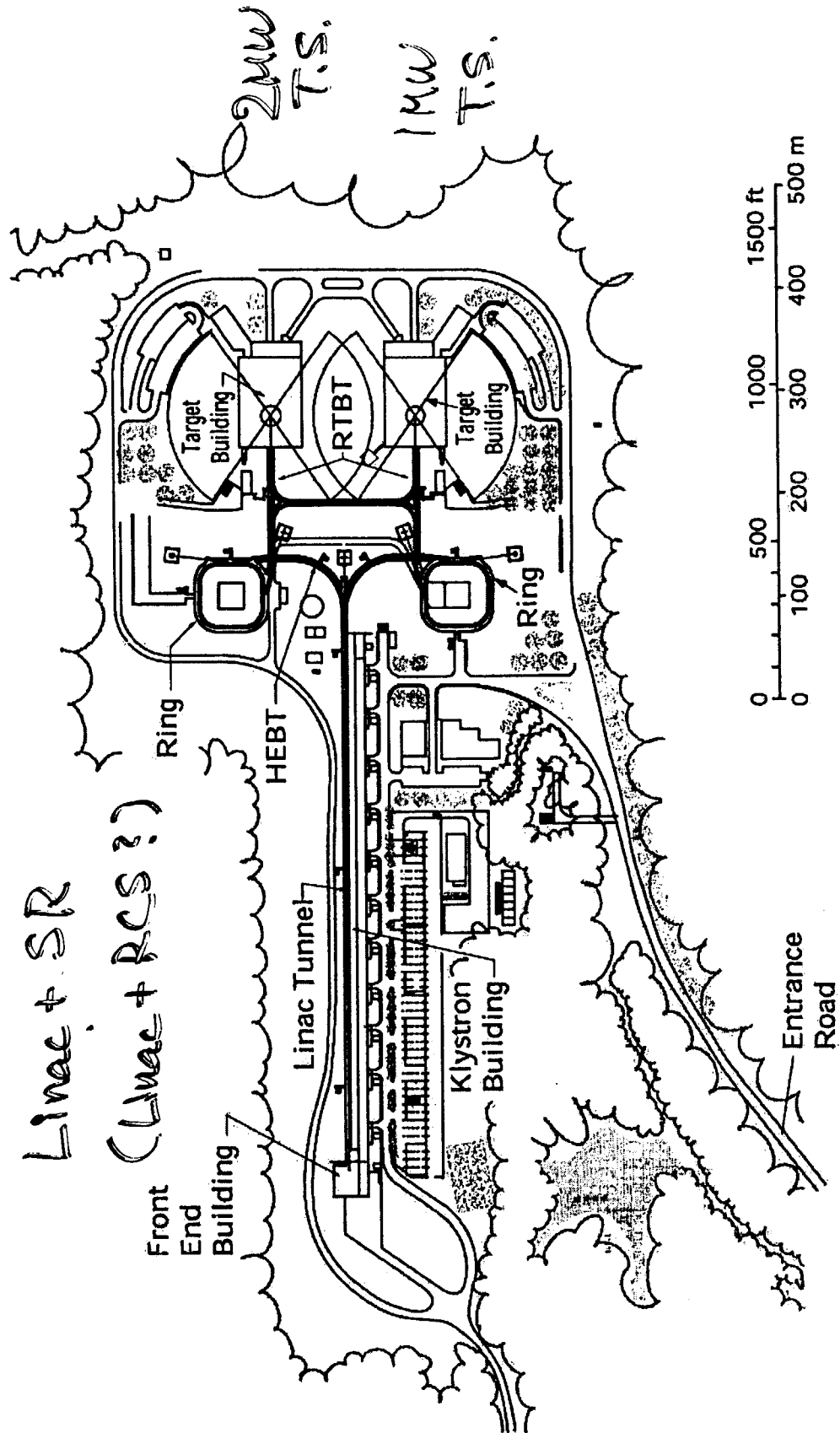
- 4月上旬 評価部会(第5回)
・評価報告書のとりまとめ

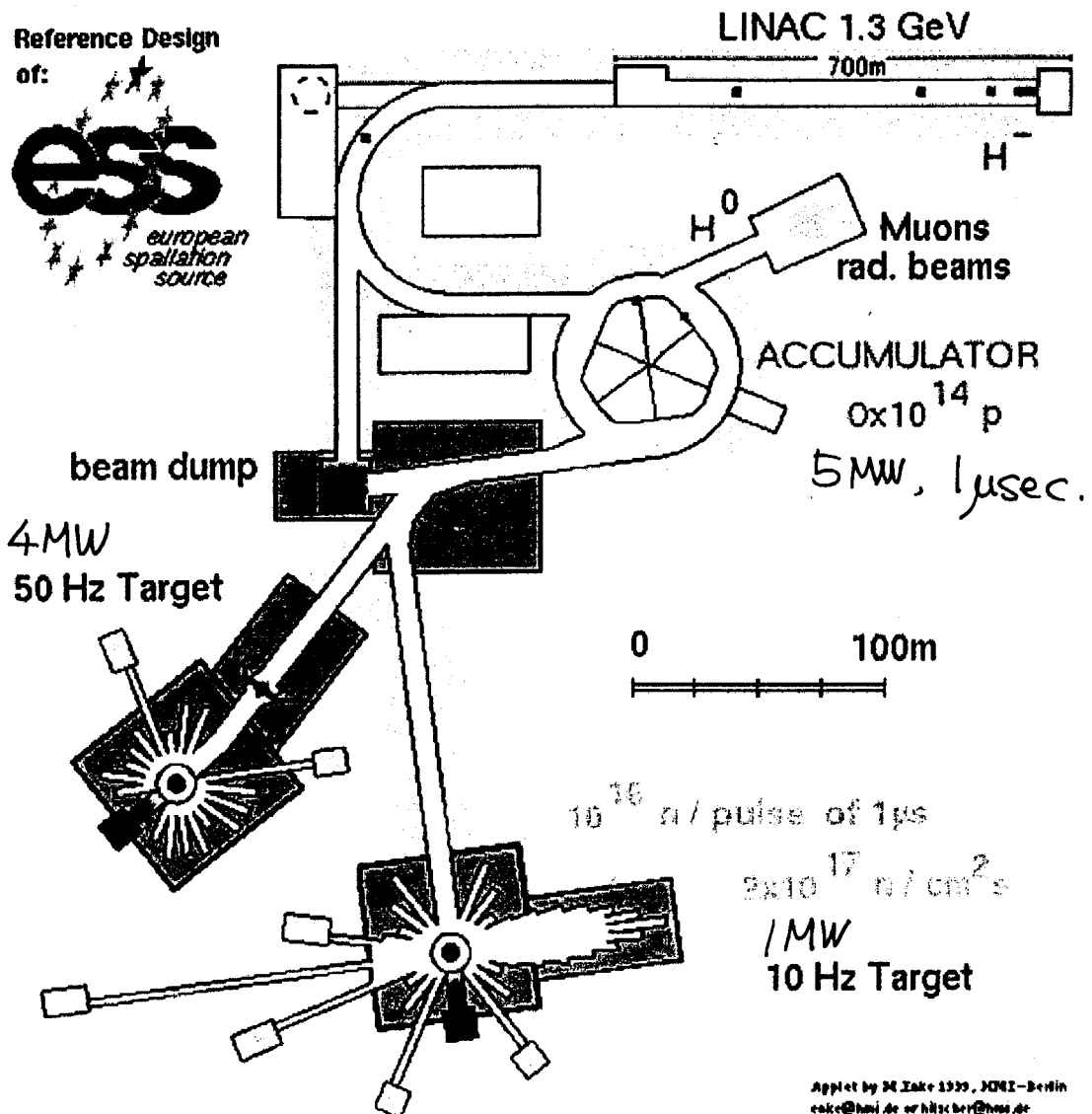
(この後、パブリックコメントの受け付け:2週間程度)

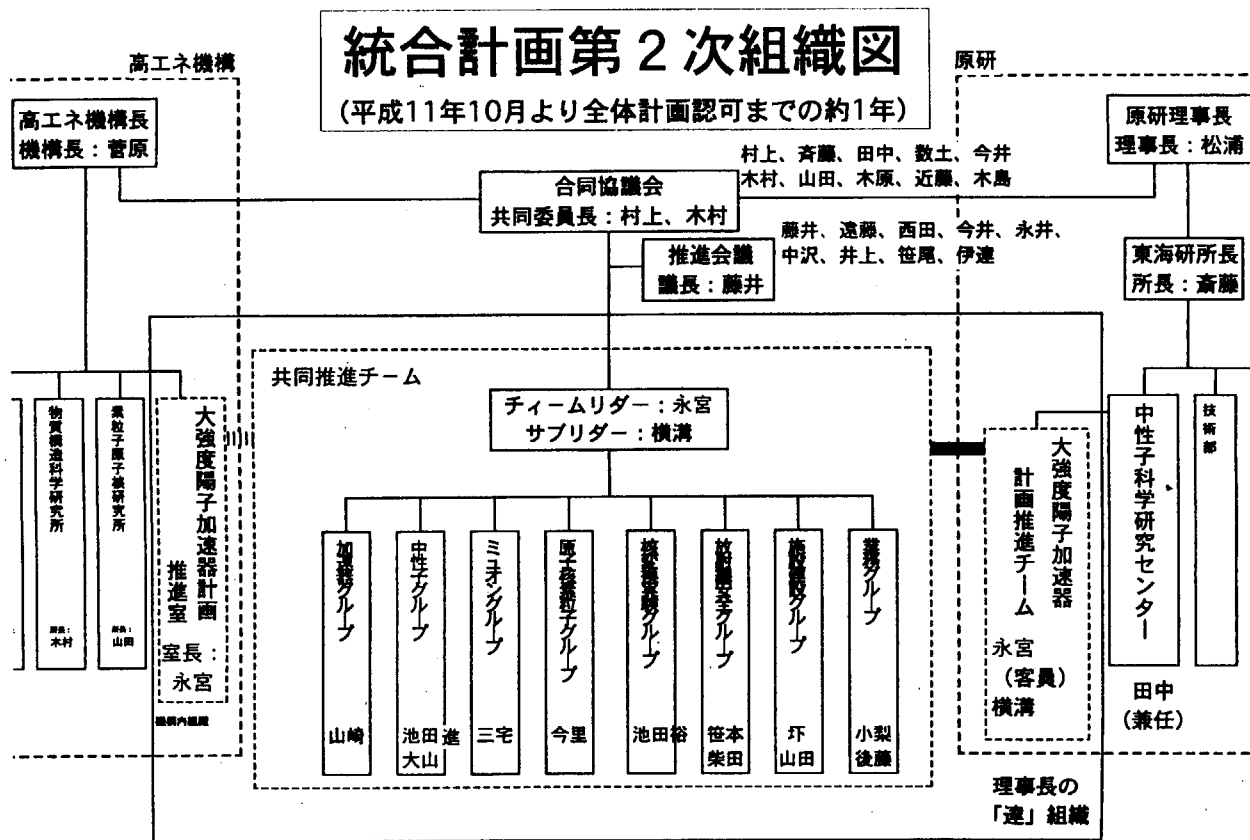
- 5月中旬 評価部会(第6回)
・評価報告書のとりまとめ

その後、原子力委員会、学術審議会に報告、了承

SNS Layout







中性子

◆中性子統括会議

- 大山*、日野、池田裕、新村、森井、渡辺(顧問)
- 池田達*、古坂、新井、川合、鬼柳(顧問)

◆中性子源グループ(日野)

- 加速器班、エンジニアリング班、ニュートロニクス班、材料班

◆中性子分光器検討グループ(新井)

- 新村、森井、鈴木、曾山、相沢、松林
- 新井、古坂、伊藤、大友、池田達

◆陽子ビームライン&実験室(池田裕)

- 中性子・中間子・短寿命核合同チーム

◆特殊装置(古坂)

- コア：曾山、大友、鬼柳、清水、川端

◆サイエンス班(新村)

- △大強度核破砕中性子源における科学

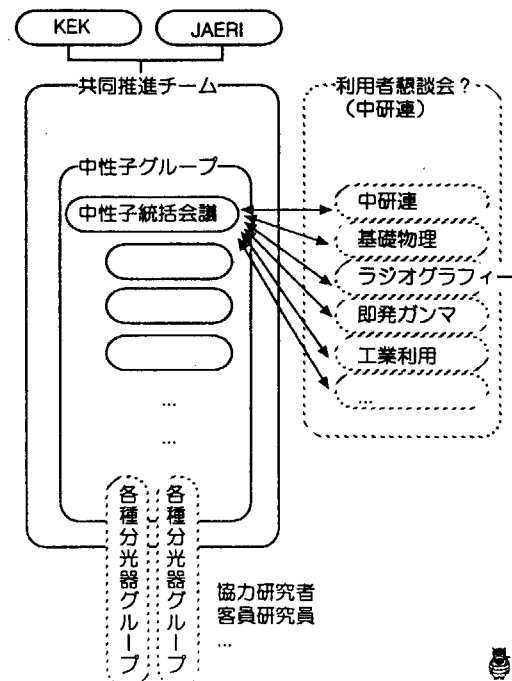
○中性子ビームライン(川合)

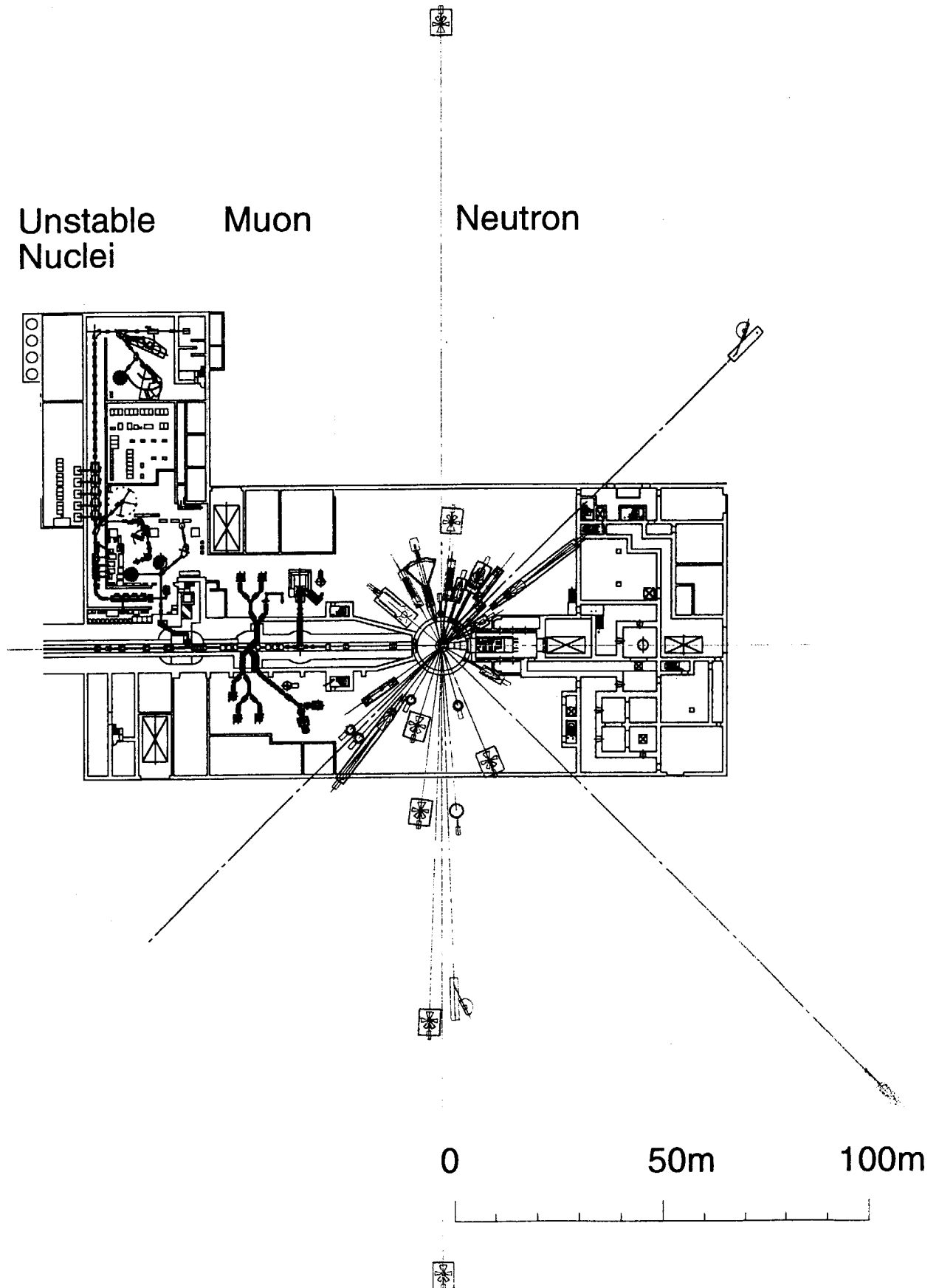
...

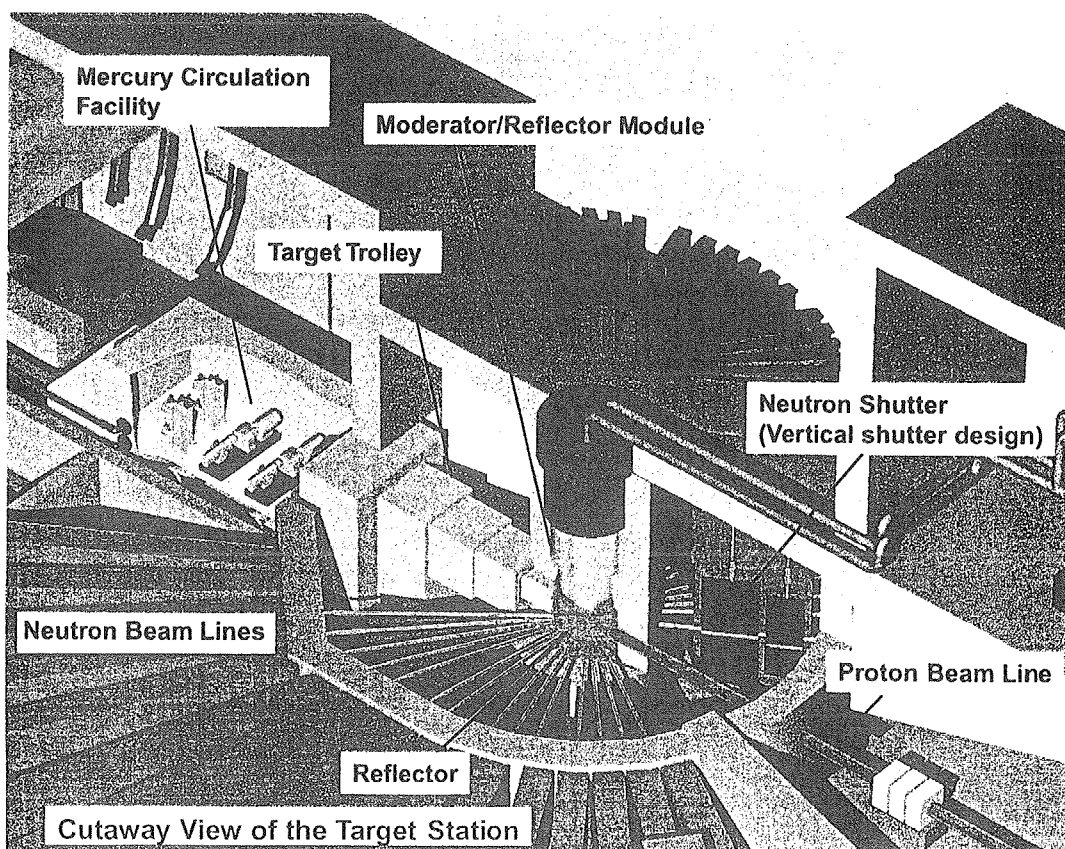
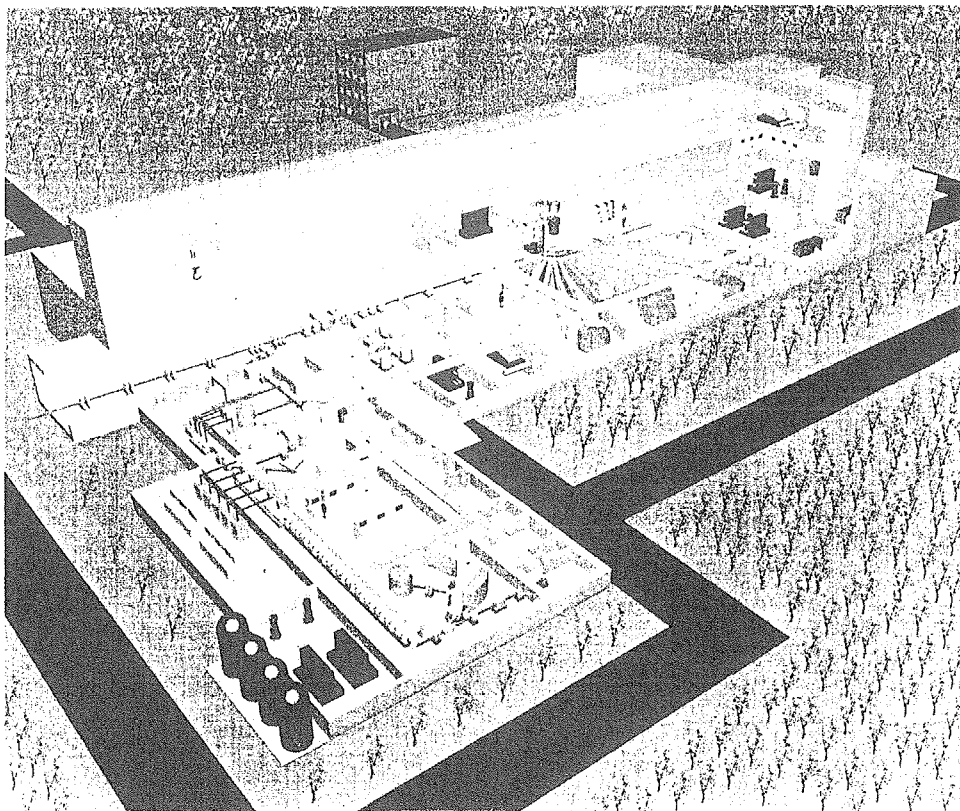
○その他...

...

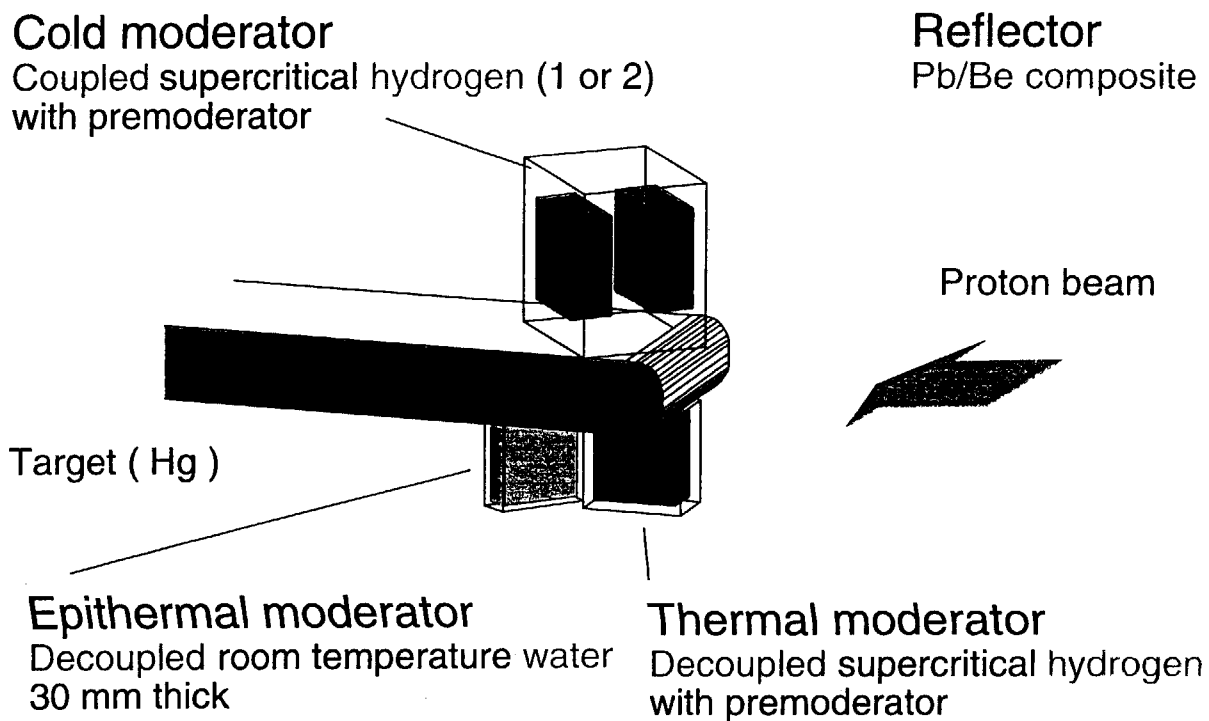
利用者の将来計画への関わり

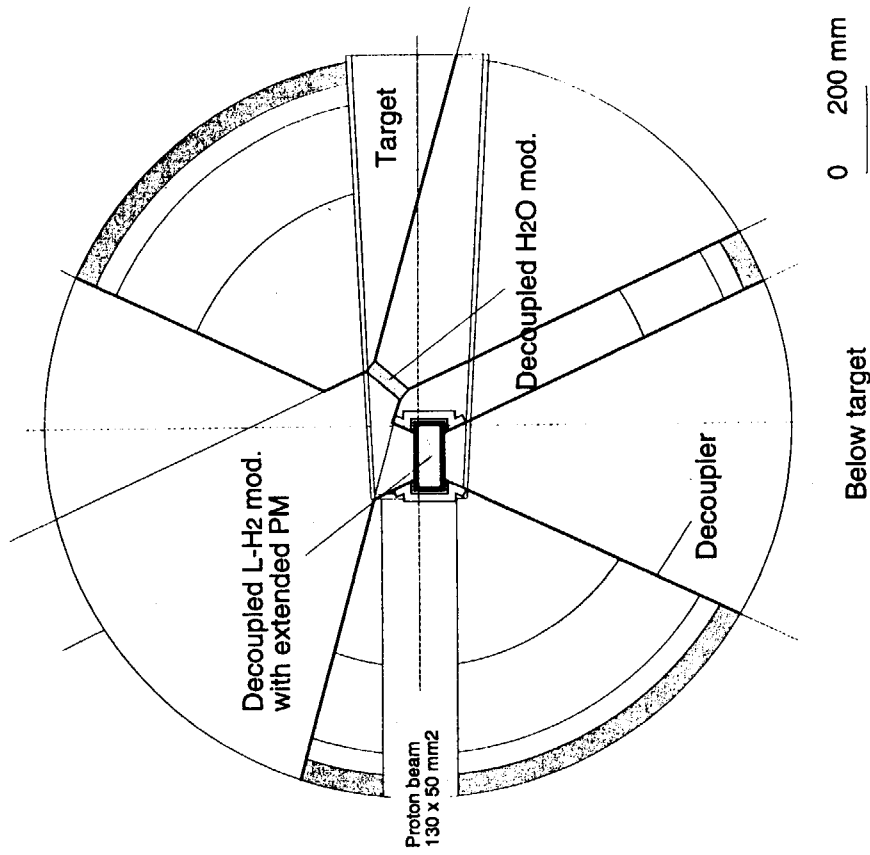




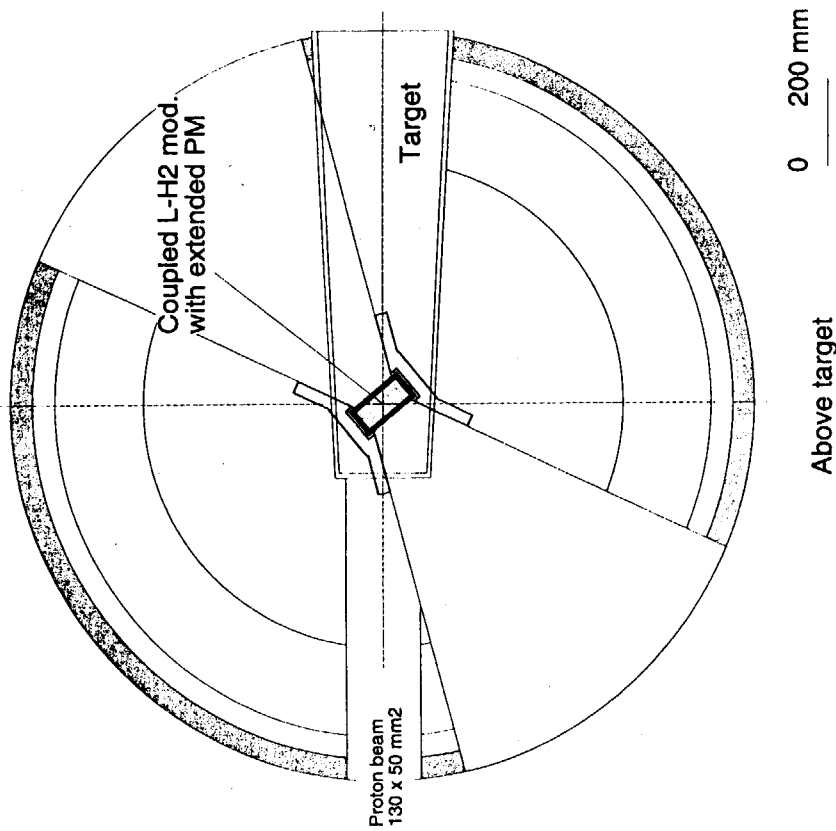


TMRA configuration for the JSNS

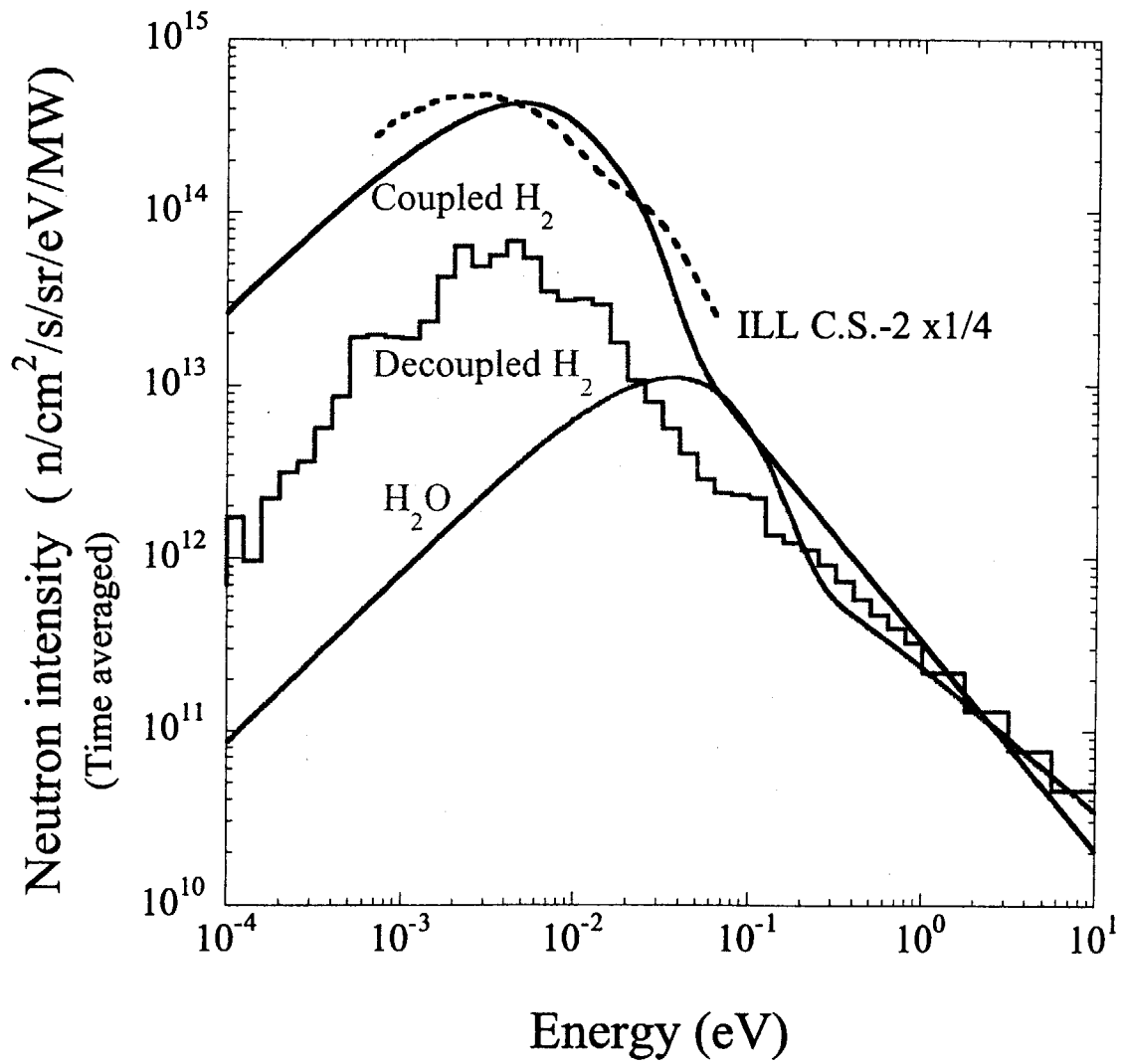


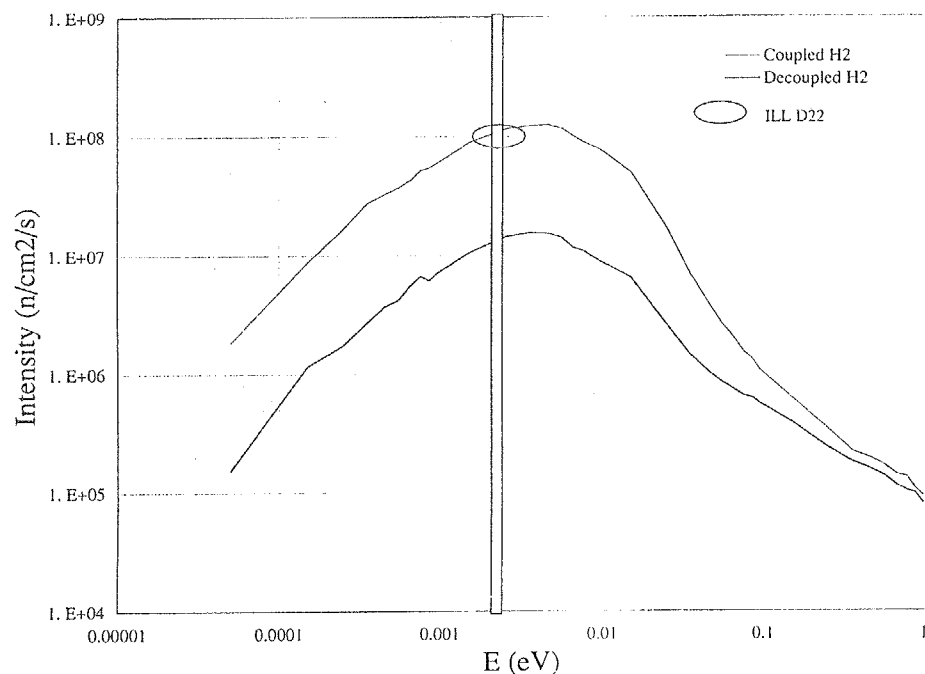


The model of target-moderator-reflector
(Decoupled moderator)



The model of target-moderator-reflector
(Coupled moderator)

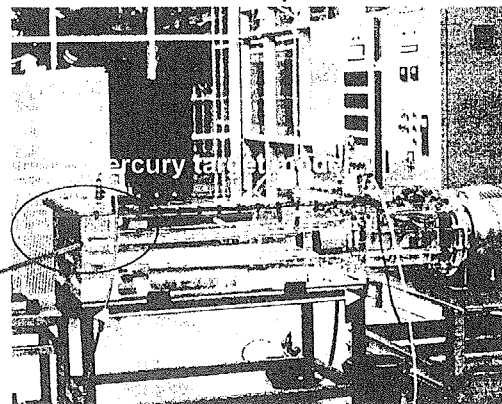
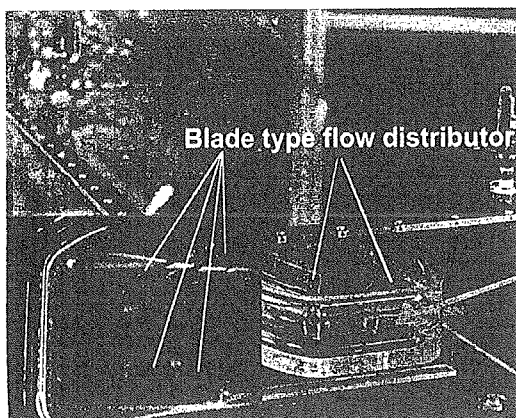




Outer View of the CFT Target Model for Flow Pattern Measurements

JAERI / KEK
Japanese Neutron Project

¥This model was fabricated to verify the analytical code (Star-CD)
¥Experiments will be carried out under water flow conditions up to
6m³/min, and flow patterns will be measured with the PIV system.
¥Experiments were started from the beginning of this September.



◆ 生物試料をどう測定するか。

◆ 装置による分類

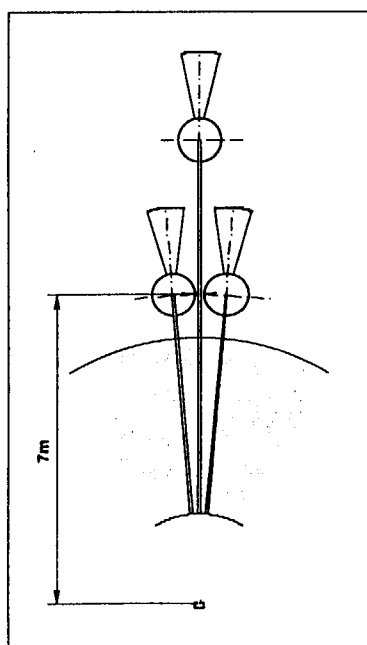
- ◆ 単結晶回折装置
 - ◇ これが王道？
 - ◆ 中性子強度が弱い。
 - ◇ 結晶が小さい
 - ◇ 将来計画でどこまで行けるか？
 - 中性子収束素子
 - ◆ 粉末結晶法も有るが、原理的に困難を伴う。
 - ◇ Long d, high resolutionが必要
 - ◇ 高分解能のためには大きな結晶子が必要
 - ◆ 小角（広角）散乱
 - ◇ $10^{-4} \text{ \AA}^{-1}$ 台からの測定
 - ◇ $10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ 台から $1 \text{ \AA}^{-1}$ まで
 - 中性子収束／高平行度ビームの必要性
 - ◇ コントラストパリエーション
 - ◇ 偏極中性子
 - ◆ 非弾性散乱
 - ◇ Low Q, low energy
 - ◇ スピンエコー
 - ◇ マイクロeV
 - ◆ 偏極中性子
 - ◆ スピンコントラストパリエーション
 - ◇ 通常は核偏極のために低温（ $\sim 1\text{K}$ ）が必要
 - ◇ 室温（窒素温度）偏極

◆ 使用方法による分類

- ◆ 宅急便サービス
 - ◆ 専用装置
 - 生物専用単結晶
 - ◆ 生物専用小角散乱装置
 - ◇ 試料が小さくて良いのなかなかなり多数の装置をおける可能性がある。

マイクロ小角散乱（反射計）装置

- ◆ 専用の装置は欲しいがビームラインが足りない
 - ◆ もしも2-3mm程度の小さい試料しか測定しないのなら
 - ◇ 位置分解能1mm程度の2次元検出器 +
 - ◇ Single grooved intense moderator +
 - ◆ 10mm程度の小さな中性子ビーム孔
 - ◇ 高SN、簡単なビームシャッター
 - ◇ ガイド管もいらない。
 - ◇ 一つのビームプラグに3-4台の小角散乱装置が作れる。

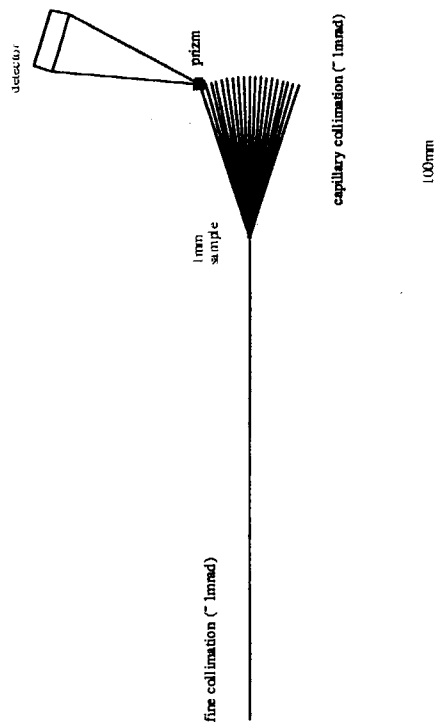


- ◆ 性能は大きな装置と変わらない。
 - ◇ 小さな試料しか使えないだけ。

Motions in Biomolecules (According to J. Trawella)

	Characteristic times (s)	
Bond Vibrations	$10^{-14} - 10^{-12}$	CAT type. $4 \times 10^{-15} \sim 10^{-12}$
Bases in DNA Helixes	$10^{-14} - 10^{-12}$	
Global Stretching (DNA)	$10^{-13} - 10^{-11}$	$4 \times 10^{-12} \sim 1 \text{ ns}$ LAM type
Global Twisting (DNA)	$10^{-13} - 10^{-11}$	
Side-chain Rotations (Surface)	$10^{-11} - 10^{-10}$	Back-scattering
Torsional Librations (Buried)	$10^{-11} - 10^{-9}$	$4 \times 10^{-9} \sim 1 \mu\text{s}$
Hinge Bending / Domain Movements	$10^{-11} - 10^{-7}$	Spin echo
Global Bending (Nucleic Acids)	$10^{-10} - 10^{-7}$	
Allosteric Transitions	$10^{-5} - 10^0$	$4 \times 10^{-6} \sim 1 \text{ ns}$
Local Denaturation	$10^{-5} - 10^{+1}$	Real time.

◇ Low Q and Low energy transfer instrument



◇ $\Delta\Omega_i \cdot A_s = \text{const.}$

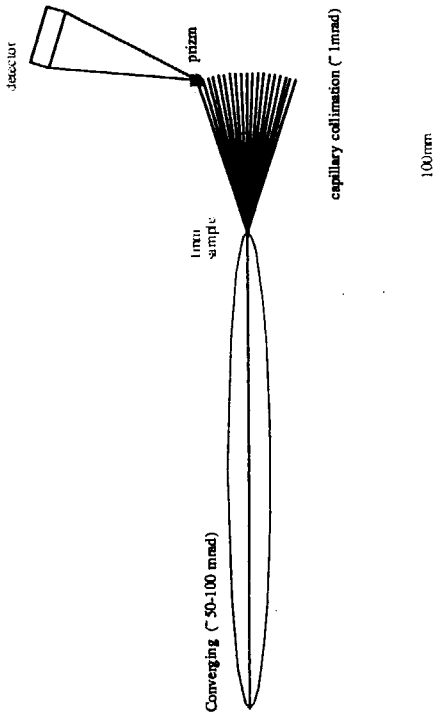
- ◆ Q分解能が同じなら試料の体積だけに依存した実効強度
 - ◇ 試料の大きさを決めて、必要なQ分解能を決めれば決まってしまう量。

◆ Prism: Resolution independent energy analysis

- ◆ Intensity gain: for example $\sim 10^2$ - 10^4
 - ◇ For the same energy resolution
- ◇ same or larger $\Delta\Omega_i$ by using capillary collimation

◆ Cf. Spin-echo SANS

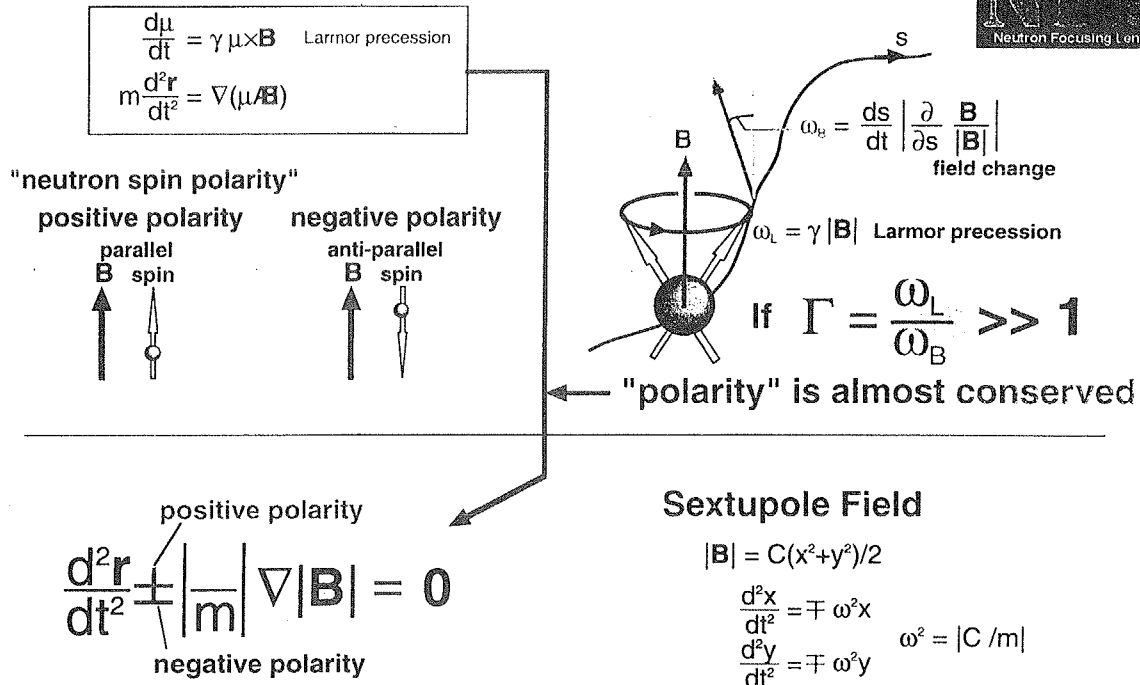
◇ Density of state instrument



◇ 入射中性子Intensity gain: $\left(\frac{100\text{mrad}}{5\text{mrad}}\right)^2 = 400$ 倍

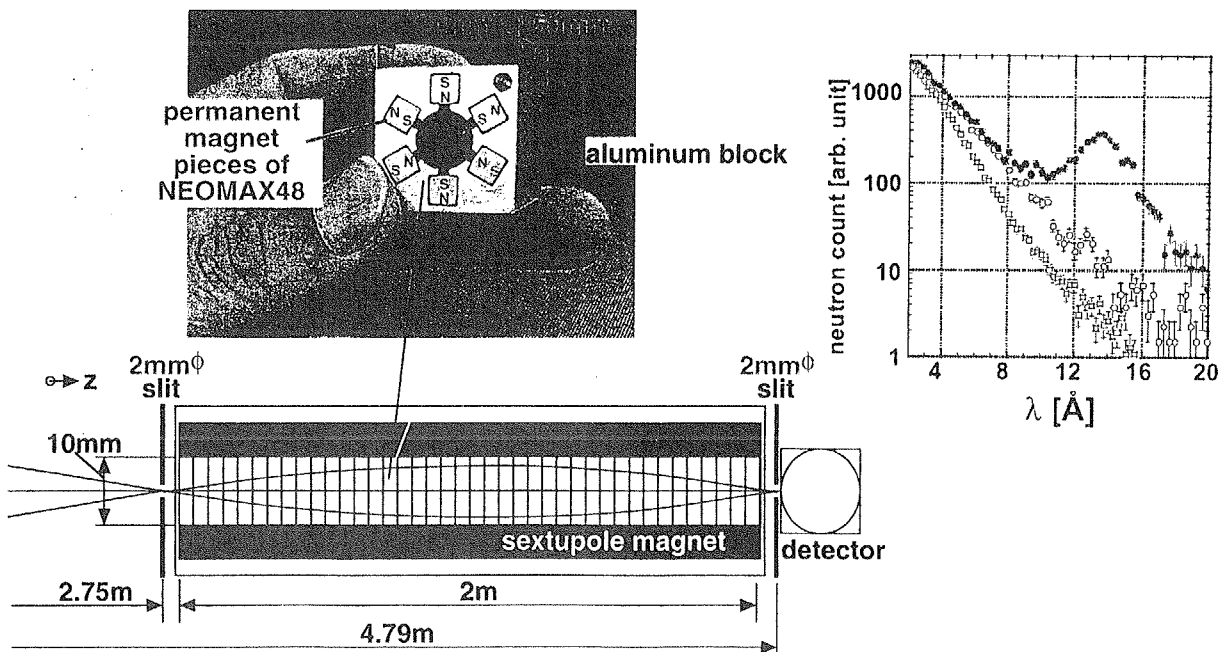
◆ Resolution independent energy resolution

Neutron Motion in Inhomogeneous Magnetic Field



H. M. Shimizu and T. Oku,

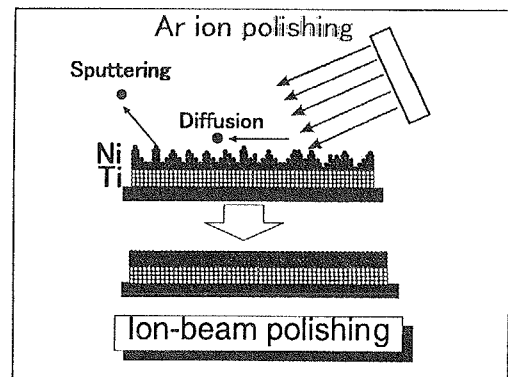
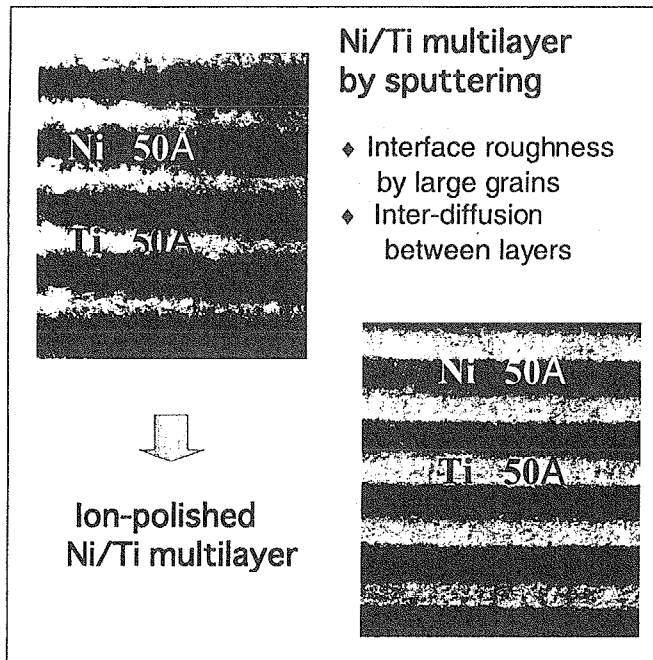
Sextupole Magnet



H. M. Shimizu and T. Oku,

Development of High Performance Supermirror

K. Soyama, CENS, JAERI



◆中性子源、実験室のパラメタ決定に影響を及ぼす分光器の仕様

(第0次案)

◇2000年2月10日 (古坂試案)

◆加速器に関係のある選択肢

◇陽子ビーム強度

◆陽子パルス繰り返し数

◇現在のところ加速器の繰り返しは25Hzだが、理想的な繰り返し数はいくらか？

◇陽子パルス幅

◆安定性

◇どのように数値化できるか？

◆実験室に関係のある選択肢

◆実験室の大きさ、形、高さに対する必要性。

◇実験室中のどの範囲にどの床加重が必要か

◇装置は実験室のどちら方向にどれだけの距離延ばすか？

◇実験室外のビームライン、装置建屋の概略仕様

◇装置用地下構造（ピット）の必要性

◇中性子ビームラインの床面からの高さ

◇中性子ビームラインの地表面からの高さに関する制限

◆クレーン

◇定格荷重、動作範囲

⑦ ◆電力、冷却水、ガス、情報ネットワークなど基盤整備に何がどれだけ必要か？

◇空調はどうするか？

◇除湿はどの範囲で必要か？

◇脱塩は？

◆中性子源に関係のある選択肢

⑧ ◆どんな装置を何台置くか？

◆中性子ビームライン断面の大きさ・形状

◆例えば反射率計用ビームラインでは

◇中性子減速材は上側の方が良い。

◇中性子ビームラインの角度は水平から約10度下向きまで。

◇隣り合った中性子ビーム間の開き角度

◇チャッパ・ハウジングの必要性

◆試料、あるいはチャッパ等の付属装置までの最小の距離

◇どんな装置で必要になるか？

◇遮蔽体の大きさを決めるパラメタ。

◆ガイド管はどこまで入れるか？

◇シャッター内に入れる場合の要求精度

◇線源用ベッセル内までガイド管を入れる必要があるのは、

UCN、VCNビームラインだけか？

◇中性子ビーム収束素子の形状、ターゲットステーションのどこまで入れる必要があるか？

◇中性子シャッターに関係のある選択肢

◇中性子ビームダンプに関係のある選択肢

30分程度

◆減速材に関する関係のある選択肢

- ◇中性子強度、スペクトル、パルス特性
- ◆見たいモデレータの型
 - ◇結合型水素モデレータ。
 - ◇非結合型水素モデレータ
 - ◇水モデレータ
- ◆その他特別なモデレータ
 - ◇例えばどうしても液体メタンが必要とか、ポイズンしてシャープなもの欲しいとか。
- ◆必要な中性子ビームラインの数、一つの減速材面の守備角度
 - ◇最終的にどんな装置を何台置くか
- ◆ある中性子ビームラインで見たい中性子減速材を変更することがあり得るか？
 - ◇あるとしたらどのぐらいの中性子ビームラインがそれに該当するか？
- ◆中性子パルス形状
 - ◆テールをどこまで許せるか
 - ◇具体的に示す必要がある。
- ◆どの程度の大きさが必要か？
 - ◇特に $10 \times 10 \text{ cm}^2$ 以上の大きなモデレータを見ることに意味があるか？

◆モデル装置の提案（第0次案）

- ◆中性子線源設計に用いるモデル装置
 - ◇S：近・中距離
 - ◇L：遠・中距離
 - ◇G：ガイド管あり
 - ◇NG：ガイド管無し
- ◆何が違うか？
 - ◇ガイド管の有り無し、どこまで挿入するか、
 - ◇中性子ビーム取りだし方法
- ◆中性子ビーム間の開き角度
 - ◇パンチングガイド管でよいか？ *cross section*
 - ◇ (b) チョッパの有り無し
- ◆中性子シャッターを置く位置、その構造
 - ◇ガイド管で遠くに置く可能性もある。
- ◇中性子ビームライン遮蔽の必要性
 - ◇中性子減速材が上にあるか、下にあるか？
 - ◇中性子減速材の種類は取りあえず問わない。
- ◆ガイド管無し、近・中距離
 - ◇SNG1型：小角散乱装置、全散乱装置、単結晶回折装置
 - ◇SNG2型：反射率計
- ◆ガイド管有り、近・中距離
 - ◇SG1型：チョッパ分光器
 - ◇SG2型：逆転配置分光器近中距離
 - ◇SG3型：UCN
- ◆ガイド管有り、遠・中距離
 - ◇LG1型：粉末結晶回折装置
 - ◇LG2型：低エネルギー高分解能分光器
 - ◇LG3型：逆転配置分光器遠距離
- ◆ガイド管無し、遠・中距離
 - ◇LNG1型：eV-keV実験装置

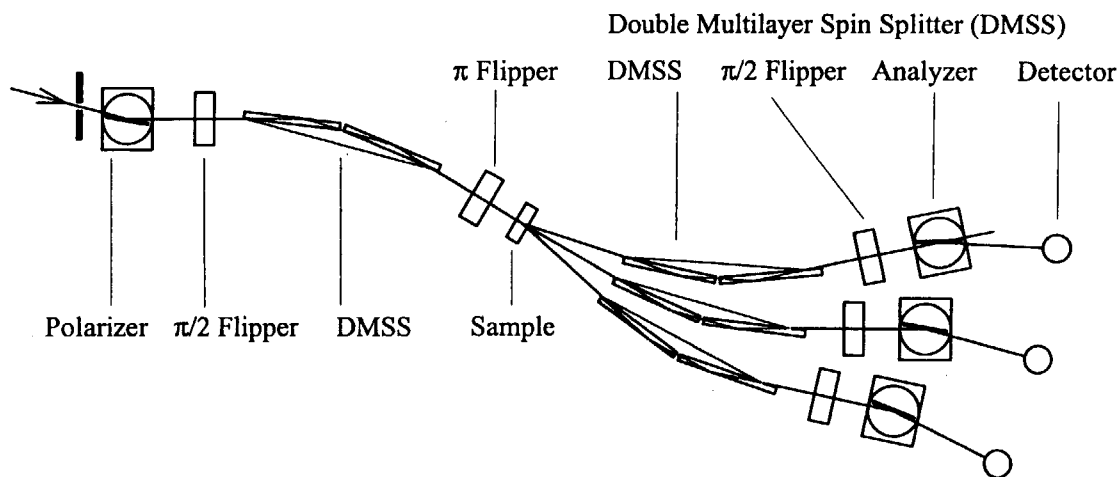
Very high active material.

時分秒の経過

JSNS Part-II

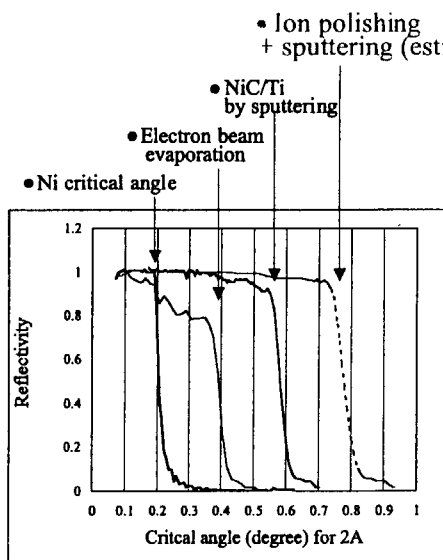
Neutron Phase Echo Spectrometer with DMSS

S. Tasaki, T. ebisawa, M. Hino, KURRI

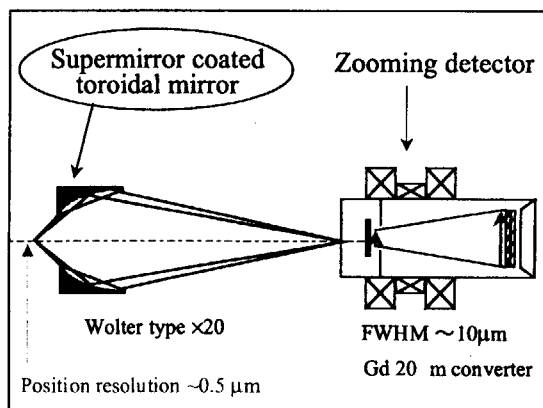


Development of Neutron Microscope

By K. Soyama, CENS, JAERI



Neutron Microscope



Parabolod + Confocal hyperboloid,
D = 20 mm, L = 120 mm, F = 1400 mm

7.2 中性子検出器の現状

ー中性子イメージングプレート応用例からー

日本原子力研究所・先端基礎研究センター

新村信雄、田中伊知朗

試料にあたって方向を変えられた中性子をいかにしてS/N比高く、位置の精度良く、また効率良く記録するかについては、中性子散乱・回折実験における普遍的な問題の1つである。今回は、生体高分子中性子回折用に開発された中性子イメージングプレートを有機的に組み合わせることで原研にあった従来の回折装置を大幅に上回る世界最高性能の中性子回折計(BIX-3)が完成したことと、次世代大強度中性子源に対応した高時間分解能(微分型)2次元中性子検出器についての開発の現状を簡単に報告する。

すでに、世界最大の研究用原子炉のあるフランス ILL には、我々のグループで開発した中性子イメージングプレートを装備することで、準ラウエ法による生体高分子用中性子回折計 LADI が実用に耐える装置となり、数少ない生物用回折計の中で世界一の性能を誇っていた。我々は BIX-3 の建設に際し、数分の一の規模の原研3号炉の環境を十分に生かしながら、性能では LADI を追い越すために、モノクロメータ方式を採用した。これは必要最小限のバンド幅の入射ビームを用いることで、記録する反射強度の精度、反射数を増大させ、最終的に構造解析で得られる構造の精度を上げて、中性子結晶構造解析の目的である水素原子の位置を正確に決定するためである。中性子イメージングプレートや弾性湾曲シリコンモノクロメータなど独自の技術を、設置環境に有機的に組み合わせることで、以前同じ場所に設置されていた BIX-1 に比べて、測定時間で数倍速く実験できることが判明した。また実際タンパク質ミオグロビンおよびルブレドキシンの全水素位置決定実験を行った結果、それぞれ約1ヶ月で分解能 1.5 Å のデータ収集ができたことから、ねらい通り BIX-3 は LADI をはるかにしのぐもので、世界一の性能を有する装置であることが証明された。

最近、より強大な中性子束が得られるとの期待から、次世代大強度中性子(スポレーション)源建設の動きがあり、これに対応した中性子検出器の必要性が高まっている。現在世界最大のスポレーション源 ISIS(英国)の約10倍の中性子強度が計画されているので、定常炉とは異なる TOF 法に対応した高速の微分処理型検出器が必要である。現在稼働している英国 ISIS の ZnS シンチレータ2次元検出器、米国 LANCE の³He2次元検出器、そして製作計画中の¹⁵⁷Gd マイクロストリップ2次元検出器について紹介する。

中性子検出器の現状

-中性子イメージングプレート応用例から-

平成 12 年 2 月 10 日

原研・先端基礎研究センター

中性子構造生物グループ

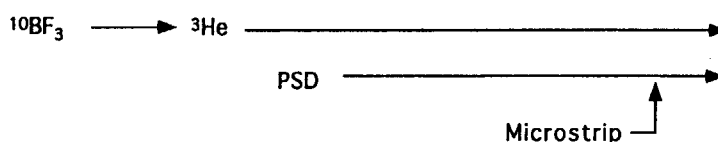
新村信雄、○田中伊知朗

Spallation Source Detector Requirements

	Sample to Detector Distance	Angular Coverage/ Detector Size	Pixel Size	Rate global/local	Stability	Energy Range	Timing Resolution
Single Crystal Diff.	≤ 1 m	2π	≤ 1 mm ²	$10^6 / 10^6$	H	0.3-5 Å	~ 1 μ s
Powder Diff.	1 m	π	5×5 mm ²	10^5	M	0.3-5 Å	~ 1 μ s
Disordered	≥ 1 m	π	5×50 mm ²	10^5	VH	0.1-5 Å	~ 1 μ s
SANS	2-10 m	1 m ²	1×1 mm ² ~ 5×5 mm ²	10^6	H - VH	1-20 Å	~ 1 μ s
Inelastic- Isotropic	2-6 m	10 m ²	20×20 mm ²	10^4	M	meV-1 eV	~ 1 μ s
Inelastic- Single Crystal	2-6 m	10 m ²	20×20 mm ²	$10^4 / 10^6$	M	meV-1 eV	~ 1 μ s
Transmission	NA	50×50 mm ²	~ 100 μ m	10^7	VH	0.1-20 Å	~ 1 μ s

Historical Topology of Thermal Neutron Detector

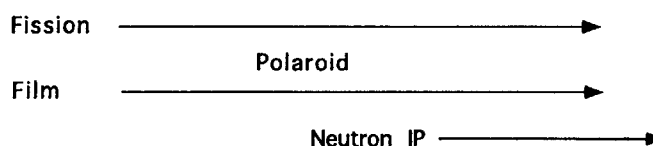
Gas Detectors



Scintillators

$\text{ZnS}/^6\text{Li}/\text{Ce}$
 $^6\text{Li-Glass}/\text{Ce}$
 PSD(Fibre Optics, Anger Camera)

Hybrid & Others



Thermal neutron ($1.8 \text{ \AA}$) capture reactions

Converter type	Reaction	n_{th} Absorption length λ_n n_{th} Capture cross section	Ejectile range R/ atten. length λ_{ce} Ejectile energies [keV]
Gas	$^3\text{He} (n,p)t$	$\lambda_n = 7.59 \text{ bar cm}$ 5 333 b	$R_p = 0.43 \text{ bar cm CF}_4$ p: 573, t: 191
	$^6\text{Li} (n,\alpha)t$	$\lambda_n = 230 \mu\text{m}$ 940 b	$R_t = 130 \mu\text{m}$ t: 2 727, α : 2 055
	$^{10}\text{B} (n,\alpha)^7\text{Li}$	$\lambda_n = 19.9 \mu\text{m}$ 3 836 b	$R_\alpha = 3.14 \mu\text{m}$ α : 1 472, ^7Li : 840 (93.6%)
Foil	$^{157}\text{Gd} (n,\gamma)^{158}\text{Gd}^*$ Abund. 15.65%, $E^* = 7.937$	$\lambda_n = 1.30 \mu\text{m}$ 255 000 b	$\lambda_{\text{ce}} = 11.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ce: 29 - 182 (87.3 $\pm$ 2.5%)
	$^{155}\text{Gd} (n,\gamma)^{156}\text{Gd}^*$ Abund. 14.80%, $E^* = 8.536$	$\lambda_n = 5.38 \mu\text{m}$ 61 400 b	ce: 39 - 191 (84.5 $\pm$ 5%)
	$^{\text{nat}}\text{Gd} (n,\gamma)$	$\lambda_n = 6.72 \mu\text{m}$ 49 122 b	$\lambda_{\text{ce}} = 12.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ce: 29 - 191 (86.5 $\pm$ 1%)

¹⁵⁷Gd: R.C. Greenwood et al., Nucl. Phys. A 304 (1978) 327 - 428

¹⁵⁵Gd: A. Bäcklin et al., Nucl. Phys. A 380 (1982) 189 - 260

^{nat}Gd: C.K. Hargrove et al., Nucl. Instr. and Meth. A 357 (1995) 157 - 169

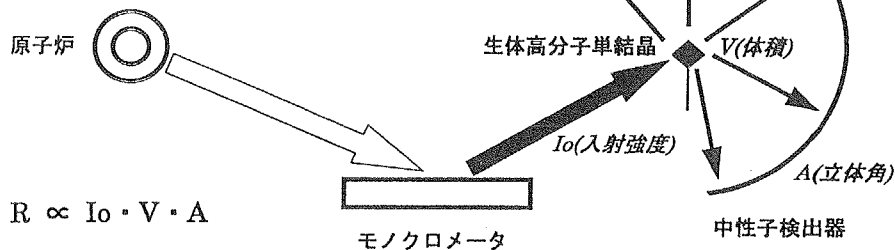
原研における中性子構造生物学

ねらいと方法

構造の精度＝取得された反射強度の精度

⇒ S/N 比の良いモノクロメータ方式を採用

実験原理

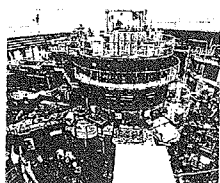


データ収集速度

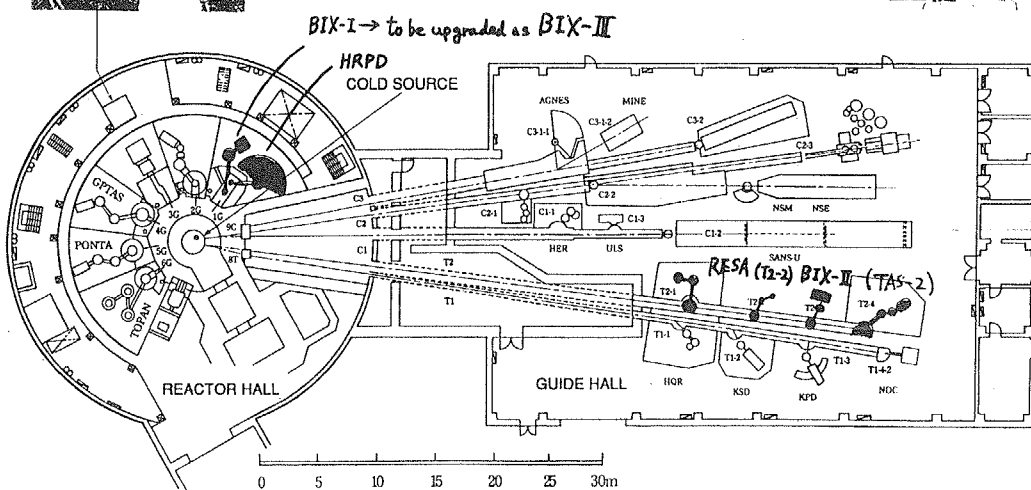
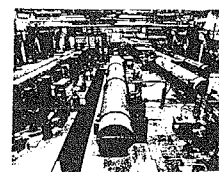
$$R \propto I_0 \cdot V \cdot A$$

研究・開発

- I_0 大 シリコン完全結晶弾性湾曲モノクロメータ (EBP-Si)
- V 大 タンパク質結晶成長機構
- A 大 中性子イメージングプレート (NIP)



JRR-3M FLOOR LAYOUT

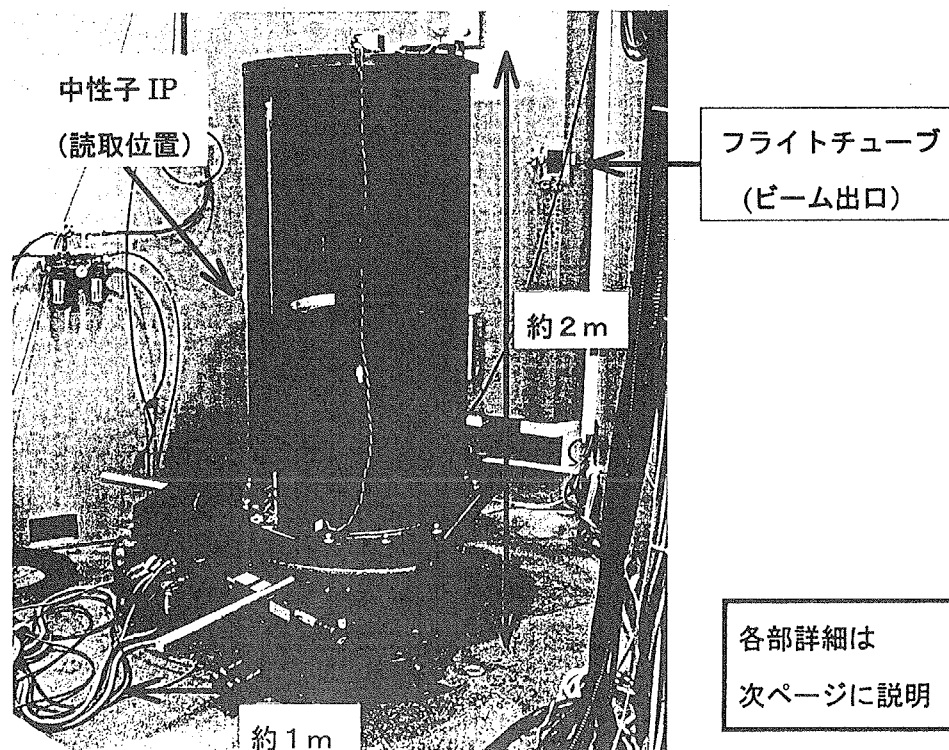


Comparison of Neutron Imaging Plate and ^3He Proportional Area Detector

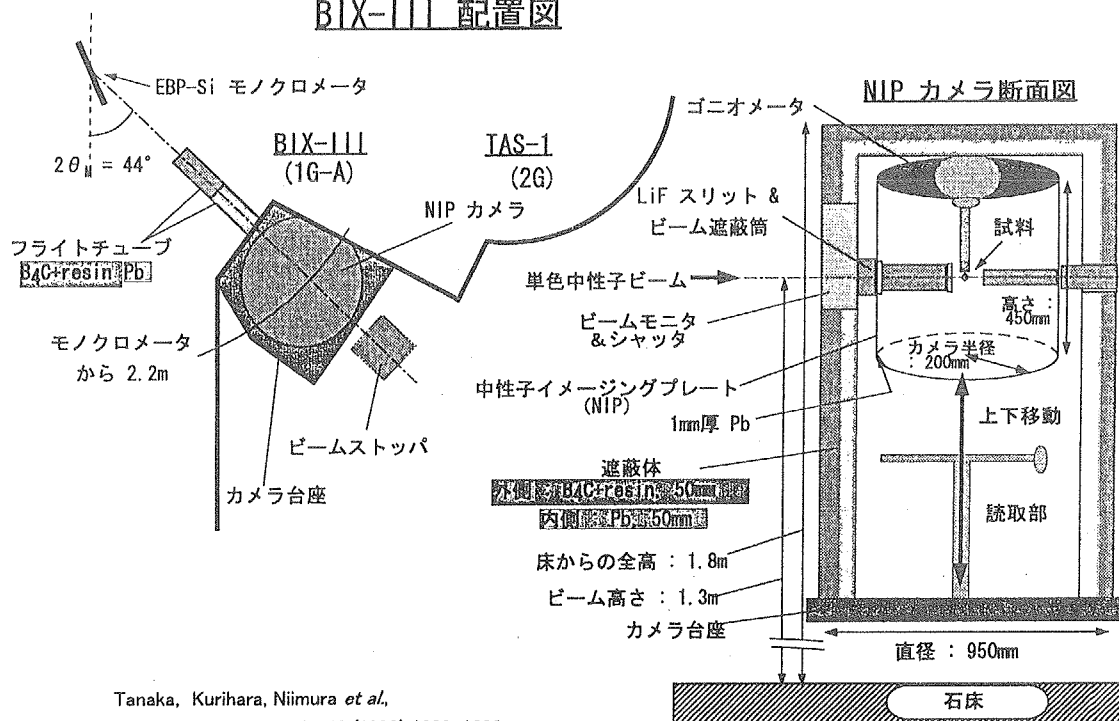
	Neutron Imaging Plate	^3He Proportional Area Detector
Data Taking Method	integral	differential
Neutron Capture Efficiency ($\lambda = 1.8 \text{ \AA}$)	~80%	~70%
Positional Resolution	less than 0.2mm	~2mm (the best quality)
Counting Loss Limit	more than 10^{10} cps	$10^4 \sim 10^5$ cps
Effective Area	no limitation	several 10cm square
Structure	flexible	rigid body
γ -ray	sensitive	easily discriminated

高性能中性子回折計 BIX-III

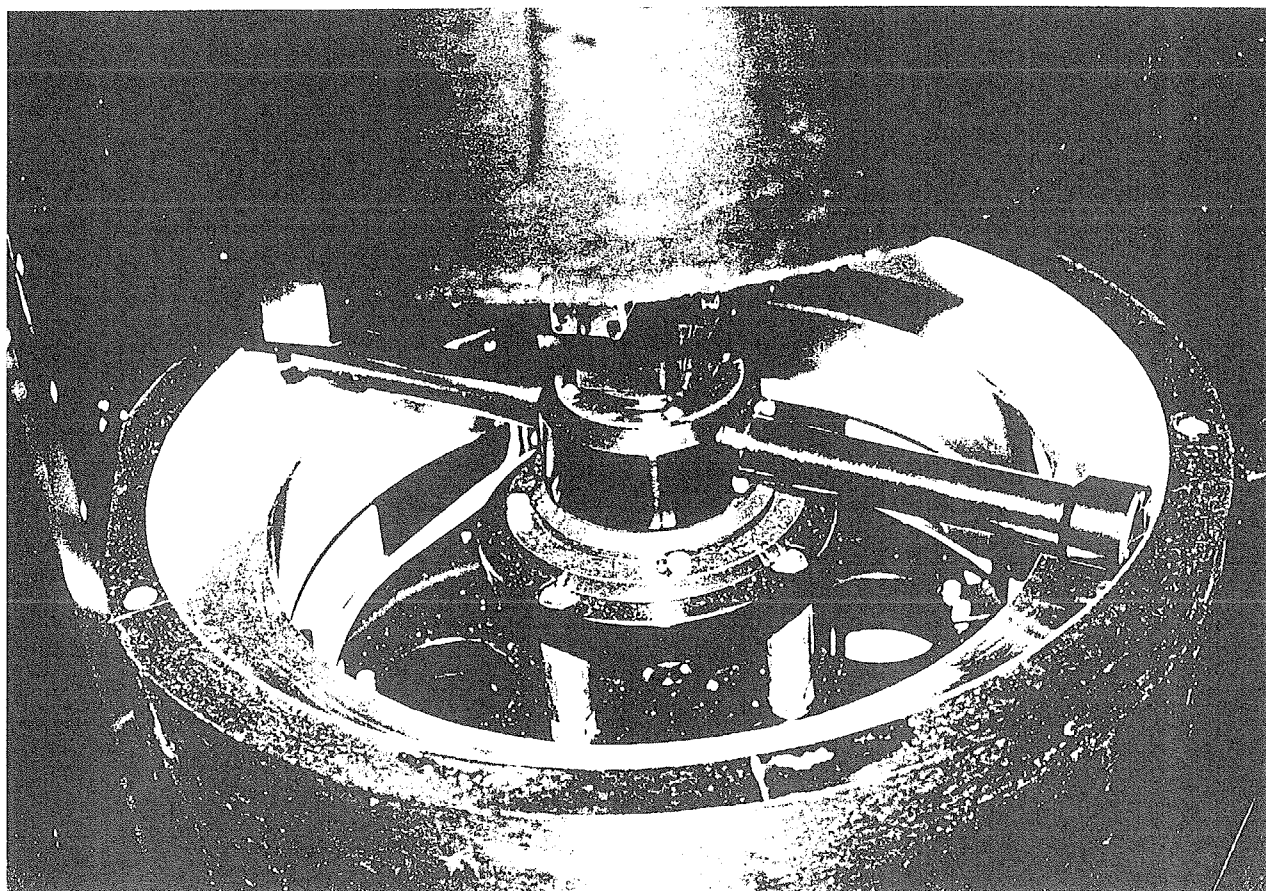
(遮蔽体無しの状態)



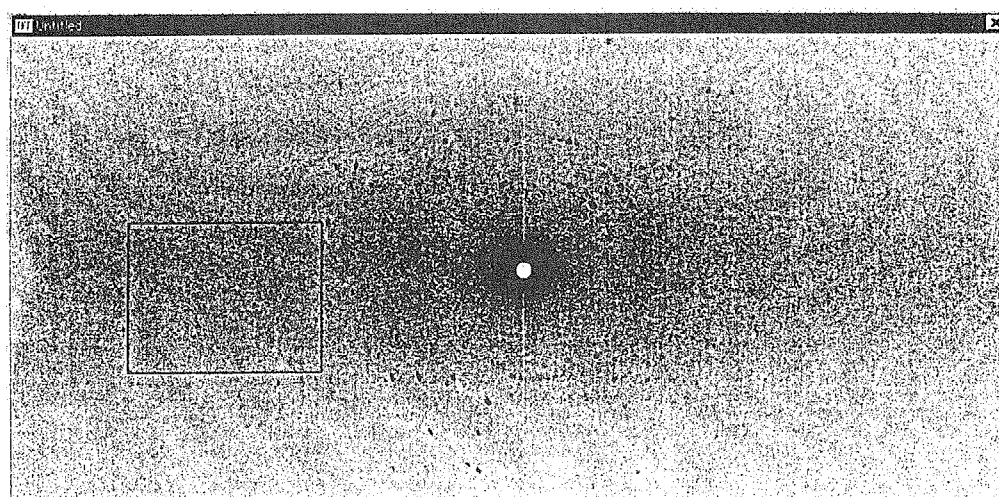
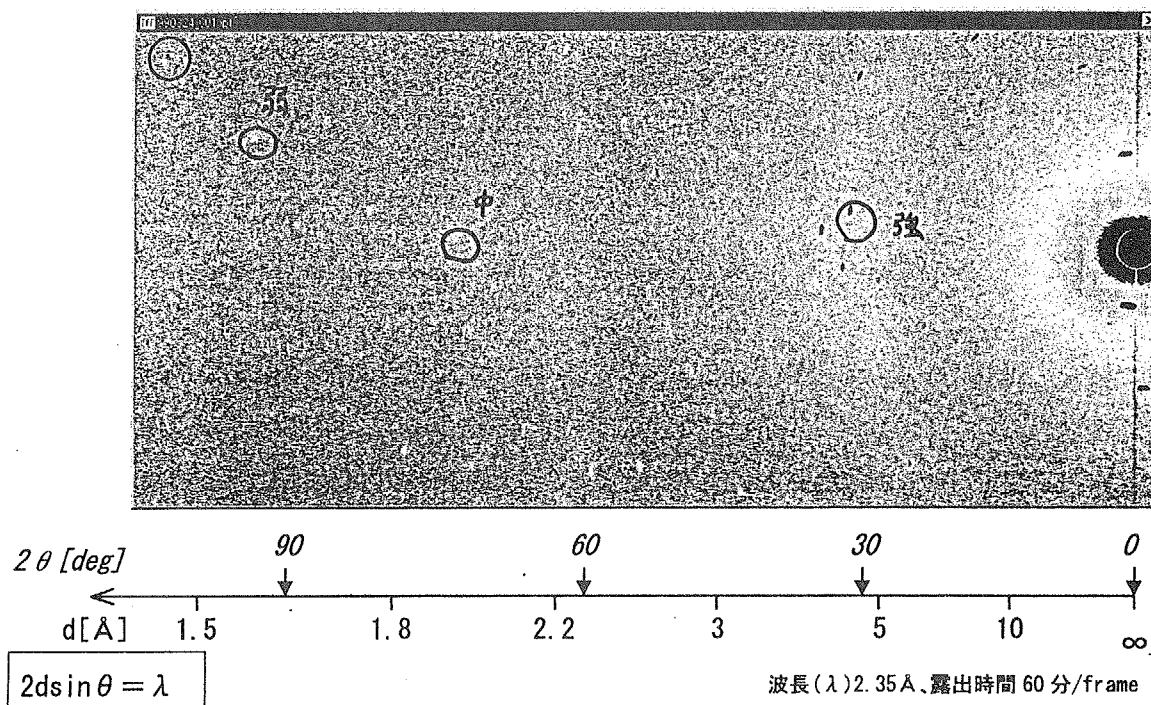
BIX-III 配置図

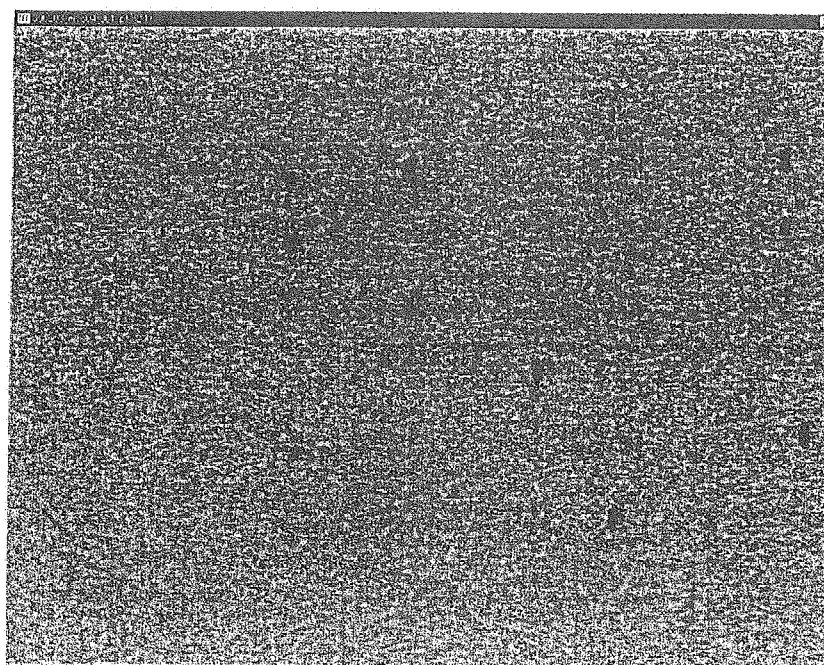


Tanaka, Kurihara, Nimura *et al.*,
J. Phys. & Chem. Solids, 60 (1999) 1623-1626.

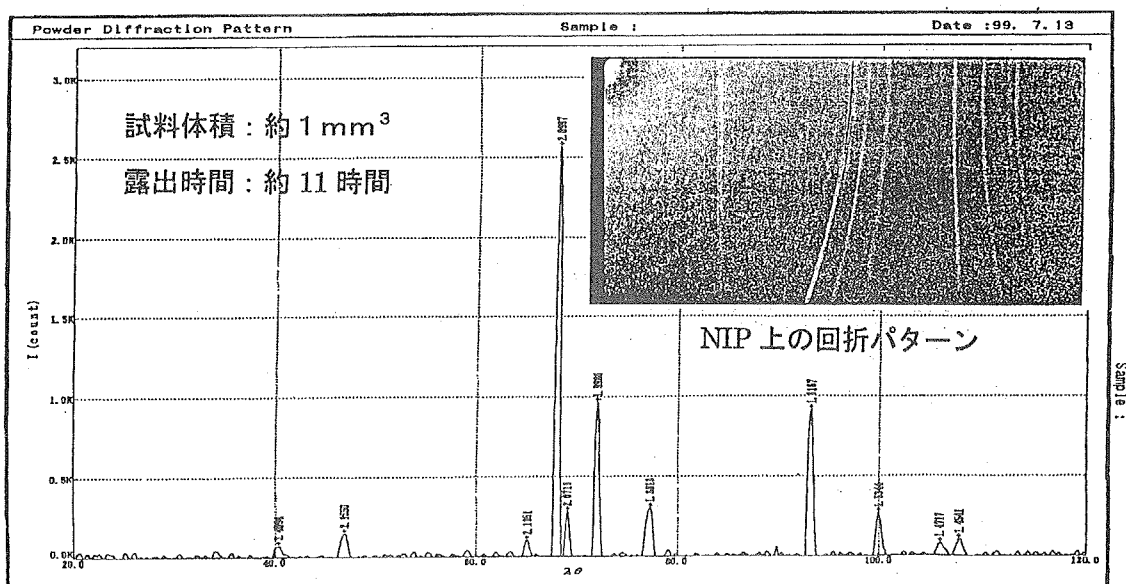


BIX-III で撮ったルブレドキシンの回折スポット



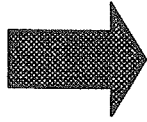


高温高圧下で合成された含水鉱物の粉末中性子回折プロファイル



水の位置決定。(大谷、新村ほか、原研平成 10 年度黎明研究)

次世代大強度中性子源(スポンレーションソース)に向けて



時間分解能(微分型)も必要

ZnS シンチレータ 2 次元検出器(新回折計[newSXD], ISIS, UK)

^3He 2 次元検出器(LANCE, USA)

中性子 IP(パルスイメージング Gr., JAERI, Japan)

^{157}Gd マイクロストリップ 2 次元検出器(HMI, Germany?)

Potential for Biological Structure Determination with Pulsed Neutrons



Figure 5. View of the construction of the current position-sensitive detectors used on SXD. The ZnS scintillator sits on the front of the pixelated grid, and the 16384 optical fibers are coupled to 32 photomultiplier tubes (not shown), allowing 4096 elements to be coded by just 32 PMTs.

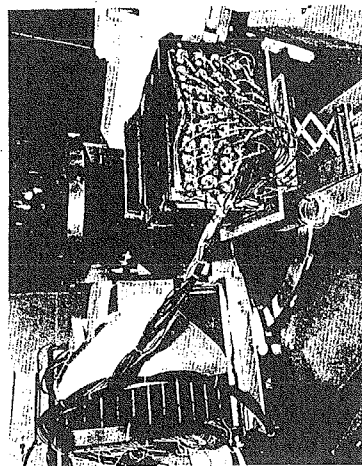


Figure 6. The current set-up on SXD, showing two detectors in position. Geometric constraints at present restrict the detector array to a 'low angle-high angle' pair but the optimised construction of the new modules (on the left) will allow more efficiently stacking of multiple detectors.

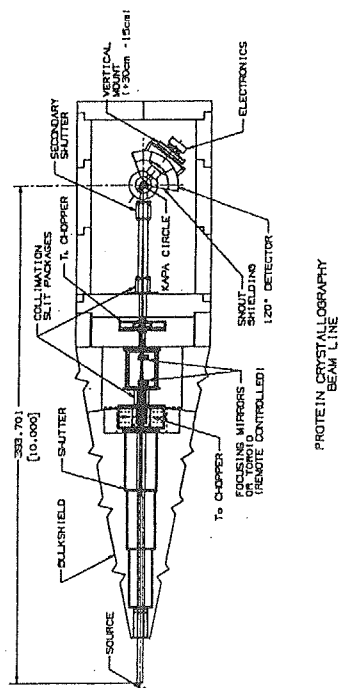


Figure 3. Conceptual design of a protein and membrane diffraction crystallographic station for a pulsed neutron source. This station will use choppers to define the wavelength band used and uses a toroid mirror to focus the beam. The first (T0) chopper opens the beam after the initial pulse with its high γ and fast neutron background is dissipated, thus protecting the sample and the detector from this initial radiation burst. The second chopper is used to prevent frame overlap and selects the long wavelength edge. The wavelength band desired for a particular experiment is easily chosen by tuning the speed of the choppers in synchronism with the accelerator's pulse structure. A large cylindrical position sensitive detector covering an arc of 120° with a 170mm height is planned with a resolution of 1.3mm and a counting rate exceeding 10^6 counts/sec (Albert, 1976; Cain *et al.*, 1976).

B. P. Schoenborn and E. Pitcher

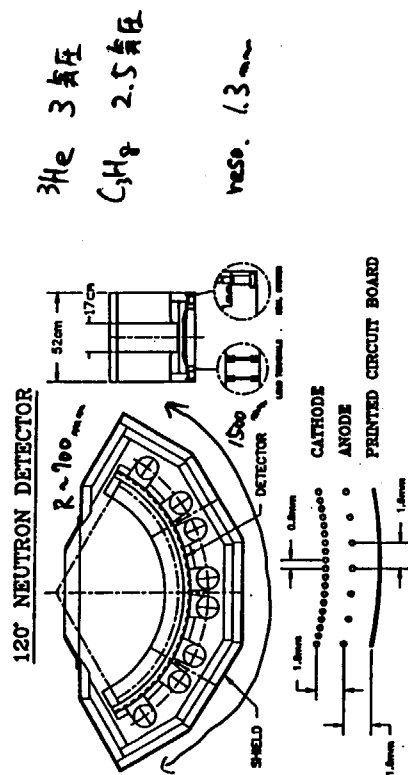


Figure 4. Orthogonal views of the ^3He detector.

This is a blank page.

付録

1. ワークショッププログラム

2. 出席者名簿

This is a blank page.

第182回基礎科学セミナー

中性子構造生物学ワークショップ

『溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究の新しい地平』 プログラム

日時：平成12年2月 9日（水） 9：00～20：00

平成12年2月10日（木） 9：20～14：30

場所：原研東海研 研究第1棟1階 第5会議室

— 2月9日（水）9：00～20：00 —

○Session 1. イントロダクション

(9:00—9:30)

- ・ X線の立場から
- ・ 中性子の立場から

関西医大・木原 裕 15分

原研・新村信雄 15分

— 座長 木原 裕（関西医大） —

○Session 2. 構造ゲノム科学の時代における溶液散乱、中性子散乱

(9:30—11:30)

- ・ 低分解能構造情報で何ができるか、何が期待されるか 京大・木寺詔紀 40分
- ・ 構造予測と溶液散乱 横浜市大・佐藤 衛 40分
- ・ 結晶構造と溶液

Inst. Protein Res., Russian Acad. Sciences: A.A. Timchenko 40分

— 座長 木原 裕（関西医大） —

○Session 3. 溶液散乱で捉える構造変化 その1

(11:30—12:00)

- ・ non-native 構造

奈良先端大・片岡幹雄 30分

◆◆ 昼休み (12:00—13:00) ◆◆

— 座長 新村 信雄（原研） —

○Session 4. 中性子結晶構造解析、中性子散乱は構造生物学に

新しい道をつけることができるか

(13:00—15:30)

- ・ 中性子溶液散乱と水和その他 原研・藤原 悟 30分
- ・ ガラス転移 奈良先端大・片岡幹雄 30分
- ・ 次期パルス中性子源への期待（超広角散乱、核スピン偏極、スピンエコー） 群馬大・平井光博 30分
- ・ 中性子結晶構造解析で見た水和構造 原研・峯崎善章 30分
- ・ 低温X線結晶構造解析と水和構造 東大・中迫雅由 30分

◆◆ 休憩 (15:30—16:00) ◆◆

— 座長 佐藤 衛 (横浜市大) —

○Session 5. 新しい実験のために その1 X線 (16:00—18:00)

5-1. 線源

- ・ X線源 Spring-8・八木直人 30分

5-2. 検出器

- ・ X線検出器についての overview 東大・雨宮慶幸 30分
- ・ CCD 筑波大・伊藤和輝 30分

- 5-3. 放射線損傷 関西医大・木原 裕 30分

***** 懇親会 (18:30—20:00) *****

— 2月10日 (木) 9:20~14:30 —

— 座長 木寺 詔紀 (京大) —

○Session 6. シミュレーションと溶液散乱 (9:20—11:00)

- ・ MD を基にして得られる構造情報 蛋工研・肥後順一 30分
- ・ NMR により決定される溶液構造の特徴と性質 東京薬科大・小島正樹 10分
- ・ MD を基にして得られる構造情報 2. NMR との比較 東京薬科大・小島正樹 30分
- ・ 未知構造決定法の紹介 (GA、DAMMIN、etc) KEK・上久保裕生 30分

— 座長 佐藤 衛 (横浜市大) —

○Session 7. 溶液散乱で捉える構造変化 その2 (11:00—12:00)

- ・ GroEL, GroES, GroEL-GroES 複合体の構造変化
Inst. Protein Res., Russian Acad. Sciences: A.A. Timchenko 30分
- ・ タンパク質のフォールディング中間体の構造 東大・新井宗仁 30分

◆◆ 昼休み (12:00—13:00) ◆◆

－ 座長 木原 裕 (関西医大) －

○Session 8. 溶液散乱で捉える構造変化 その3 (13:00—13:30)

- ・溶液散乱法でえられる構造階層性、水和、表面チャージ

群馬大・平井光博 30分

－ 座長 平井 光博 (群馬大) －

○Session 9. 新しい実験のために 中性子源 (13:30—14:30)

- ・統合計画中性子源における新しい中性子分光器の可能性について

KEK・古坂道弘 30分

- ・中性子検出器の現状

原研・新村信雄 30分

田中伊知朗

出席者名簿 (50 音順)

氏名	所属
安達智宏	高エネルギー加速器研究機構
雨宮慶幸	東京大学
新井栄揮	日本原子力研究所
新井宗仁	東京大学
伊藤和輝	筑波大学
岩崎吉男	(株) 理学電気
岩瀬裕希	群馬大学
A. Ostermann	Tech. Univ. Munich
片岡幹雄	奈良先端科学技術大学
上久保裕生	高エネルギー加速器研究機構
木寺詔紀	京都大学
木原裕	関西医科大学
栗原和男	日本原子力研究所
T. Koetzle	Brookhaven National Laboratory
小島正樹	東京薬科大学
佐藤衛	横浜市立大学
田中伊知朗	日本原子力研究所
A. A. Timchenko	Inst. Protein Res., Russian Acad. Sciences
茶竹俊行	日本原子力研究所
中迫雅由	東京大学分子細胞生物学研究所
中里勝芳	日本原子力研究所
新村信雄	日本原子力研究所
西村良浩	日本原子力研究所
早川智広	群馬大学
肥後順一	生物分子工学研究所
平井光博	群馬大学
藤原悟	日本原子力研究所
古坂道弘	高エネルギー加速器研究機構
前田満	日本原子力研究所
松井拓朗	日本原子力研究所
松本富美子	理化学研究所
峯崎善章	日本原子力研究所
矢尾板憲一	(株) 理学電気
八木直人	高輝度光科学研究センター
矢島博文	東京理科大学
米澤康滋	筑波技術短期大学

国際単位系 (SI) と換算表

表1 SI基本単位および補助単位

量	名 称	記 号
長 度	メ ー ト ル	m
質 量	キ ロ グ ラ ム	kg
時 間	秒	s
電 流	ア ン ペ ア	A
熱力学温度	ケ ル ビ ン	K
物 質 量	モ ル	mol
光 度	カン デ ラ	cd
平 面 角	ラ ジ ア ン	rad
立 体 角	ステラジアン	sr

表3 固有の名称をもつSI組立単位

量	名 称	記号	他のSI単位 による表現
周 波 数	ヘル ツ	Hz	s ⁻¹
力	ニュートン	N	m·kg/s ²
圧 力 , 応 力	パスカル	Pa	N/m ²
エネルギー, 仕事, 熱量	ジュール	J	N·m
工 率 , 放 射 束	ワ ッ ト	W	J/s
電気量, 電荷	クーロン	C	A·s
電位, 電圧, 起電力	ボルト	V	W/A
静電容量	ファラド	F	C/V
電気抵抗	オーム	Ω	V/A
コンダクタンス	ジーメンズ	S	A/V
磁束	ウェーバ	Wb	V·s
磁束密度	テスラ	T	Wb/m ²
インダクタンス	ヘンリー	H	Wb/A
セルシウス温度	セルシウス度	°C	
光 照 度	ルーメン	lm	cd·sr
放 射 能	ルクス	lx	lm/m ²
吸 収 線 量	ベクレル	Bq	s ⁻¹
線 量 当 量	グレイ	Gy	J/kg
	シーベルト	Sv	J/kg

表2 SIと併用される単位

名 称	記 号
分, 時, 日	min, h, d
度, 分, 秒	°, ', "
リットル	l, L
トン	t
電子ボルト	eV
原子質量単位	u

$$1 \text{ eV} = 1.60218 \times 10^{-19} \text{ J}$$

$$1 \text{ u} = 1.66054 \times 10^{-27} \text{ kg}$$

表4 SIと共に暫定的に維持される単位

名 称	記 号
オングストローム	Å
バ ー	b
バ ー	bar
ガ ル	Gal
キ ュ リ ー	Ci
レントゲン	R
ラ ッ	rad
レ ム	rem

$$1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ b} = 100 \text{ fm}^2 = 10^{-28} \text{ m}^2$$

$$1 \text{ bar} = 0.1 \text{ MPa} = 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ Gal} = 1 \text{ cm/s}^2 = 10^{-2} \text{ m/s}^2$$

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

$$1 \text{ R} = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}$$

$$1 \text{ rad} = 1 \text{ cGy} = 10^{-2} \text{ Gy}$$

$$1 \text{ rem} = 1 \text{ cSv} = 10^{-2} \text{ Sv}$$

表5 SI接頭語

倍数	接頭語	記 号
10 ¹⁸	エクサ	E
10 ¹⁵	ペタ	P
10 ¹²	テラ	T
10 ⁹	ギガ	G
10 ⁶	メガ	M
10 ³	キロ	k
10 ²	ヘクト	h
10 ¹	デカ	da
10 ⁻¹	デシ	d
10 ⁻²	センチ	c
10 ⁻³	ミリ	m
10 ⁻⁶	マイクロ	μ
10 ⁻⁹	ナノ	n
10 ⁻¹²	ピコ	p
10 ⁻¹⁵	フェムト	f
10 ⁻¹⁸	アト	a

(注)

- 表1～5は「国際単位系」第5版, 国際度量衡局 1985年刊行による。ただし, 1 eV および 1 uの値はCODATAの1986年推奨値によった。
- 表4には海里, ノット, アール, ヘクトールも含まれているが日常の単位なのでここでは省略した。
- barは, JISでは流体の圧力を表わす場合に限り表2のカテゴリーに分類されている。
- EC閣僚理事会指令ではbar, barnおよび「血圧の単位」mmHgを表2のカテゴリーに入れている。

換 算 表

力	N(=10 ⁵ dyn)	kgf	lbf
	1	0.101972	0.224809
	9.80665	1	2.20462
	4.44822	0.453592	1

$$\text{粘 度 } 1 \text{ Pa} \cdot \text{s} (\text{N} \cdot \text{s/m}^2) = 10 \text{ P (ポアズ)} (\text{g}/(\text{cm} \cdot \text{s}))$$

$$\text{動粘度 } 1 \text{ m}^2/\text{s} = 10^4 \text{ St (ストークス)} (\text{cm}^2/\text{s})$$

圧	MPa(=10 bar)	kgf/cm ²	atm	mmHg(Torr)	lbf/in ² (psi)
	1	10.1972	9.86923	7.50062 × 10 ³	145.038
力	0.0980665	1	0.967841	735.559	14.2233
	0.101325	1.03323	1	760	14.6959
	1.33322 × 10 ⁻⁴	1.35951 × 10 ⁻³	1.31579 × 10 ⁻³	1	1.93368 × 10 ⁻²
	6.89476 × 10 ⁻³	7.03070 × 10 ⁻²	6.80460 × 10 ⁻²	51.7149	1

エネルギー・仕事・熱量	J(=10 ⁷ erg)	kgf·m	kW·h	cal(計量法)	Btu	ft·lbf	eV
	1	0.101972	2.77778 × 10 ⁻⁷	0.238889	9.47813 × 10 ⁻⁴	0.737562	6.24150 × 10 ¹⁸
	9.80665	1	2.72407 × 10 ⁻⁶	2.34270	9.29487 × 10 ⁻³	7.23301	6.12082 × 10 ¹⁹
	3.6 × 10 ⁶	3.67098 × 10 ⁵	1	8.59999 × 10 ⁵	3412.13	2.65522 × 10 ⁶	2.24694 × 10 ²⁵
	4.18605	0.426858	1.16279 × 10 ⁻⁶	1	3.96759 × 10 ⁻³	3.08747	2.61272 × 10 ¹⁹
	1055.06	107.586	2.93072 × 10 ⁻⁴	252.042	1	778.172	6.58515 × 10 ²¹
	1.35582	0.138255	3.76616 × 10 ⁻⁷	0.323890	1.28506 × 10 ⁻³	1	8.46233 × 10 ¹⁸
	1.60218 × 10 ⁻¹⁹	1.63377 × 10 ⁻²⁰	4.45050 × 10 ⁻²⁶	3.82743 × 10 ⁻²⁰	1.51857 × 10 ⁻²²	1.18171 × 10 ⁻¹⁹	1

$$1 \text{ cal} = 4.18605 \text{ J (計量法)}$$

$$= 4.184 \text{ J (熱化学)}$$

$$= 4.1855 \text{ J (15 °C)}$$

$$= 4.1868 \text{ J (国際蒸気表)}$$

$$\text{仕事率 } 1 \text{ PS (仏馬力)}$$

$$= 75 \text{ kgf} \cdot \text{m/s}$$

$$= 735.499 \text{ W}$$

放射能	Bq	Ci
	1	2.70270 × 10 ⁻¹¹
	3.7 × 10 ¹⁰	1

吸収線量	Gy	rad
	1	100
	0.01	1

照射線量	C/kg	R
	1	3876
	2.58 × 10 ⁻⁴	1

線量当量	Sv	rem
	1	100
	0.01	1

(86年12月26日現在)

第182回基礎科学セミナー中性子構造生物学ワークショップ「溶液散乱によって開かれる蛋白質構造研究の新しい地平」報文集
2000年2月9日、10日、東海村