

JAERI-Conf
95-013



第6回「生体物質中性子回折」ワークショップ報文集
1995年3月25日、東海村

1995年6月

(編) 新村信雄

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。

入手の問い合わせは、日本原子力研究所技術情報部情報資料課（〒319-11 茨城県那珂郡東海村）あて、お申し越してください。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-11 茨城県那珂郡東海村日本原子力研究所内）で複写による実費領布をおこなっております。

This report is issued irregularly.

Inquiries about availability of the reports should be addressed to Information Division, Department of Technical Information, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-11, Japan.

© Japan Atomic Energy Research Institute, 1995

編集兼発行 日本原子力研究所

印刷 (株)原子力資料サービス

第6回「生体物質中性子回折」ワークショップ報文集
1995年3月25日，東海村

日本原子力研究所先端基礎研究センター
(編) 新村 信雄

(1995年5月18日受理)

平成7年3月25日に，東海会館で生体物質中性子回折に関するワークショップが開催された。海外，大学，研究所及び民間企業から約18名の出席があり，9件の講演がなされた。この報文集は，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 6 th Workshop on Neutron
Crystallography in Biology
March, 25, 1995, Tokai, Japan

(Ed.) Nobuo NIIMURA

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

(Received May 18, 1995)

The 6 th workshop on neutron crystallography in biology was held on March, 25, 1995 at Tokai Kaikan. 18 scientists not only from university, research institute, and private company in Japan but also from abroad took part in the workshop and there were 9 lectures given. The proceedings collect the figures and tables which speakers have used in their lectures.

Keywords: Neutron Crystallography, Bio-macromolecule, Neutron Diffractometer,
Imaging Plate Neutron Detector, X-ray Protein Crystallography

目 次

まえがき	1
1. Neutron Crystallography in Biology	2
Benno P. Schoenborn (Los Alamos National Laboratory, U. S. A.)	
2. ヒドロゲナーゼX線結晶構造解析と中性子回折実験の可能性	8
樋口 芳樹 (姫路工業大学理工学部)	
3. Changes of Protein Dynamics upon Foldings	16
片岡 幹雄 (大阪大学理学部)	
4. 核酸の低振動数モード	21
菅原 洋子 (北里大学理学部)	
5. 中性子イメージングプレート	32
5.1 現 状	32
唐澤 裕子 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)	
5.2 応用例 その1	40
新村 信雄 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)	
5.3 応用例 その2	47
曾山 和彦 (日本原子力研究所 研究炉部)	
5.4 原研・富士写真フィルム(株)共同研究	53
新村 信雄	
6. 討論 今後の課題	54
出席者全員	
付録1 第6回「生体物質中性子回折」ワークショップ プログラム	55
付録2 出席者名簿	56

Contents

Preface	1
1. Neutron Crystallography in Biology	
Benno P. Schoenborn	
(Los Alamos National Laboratory, USA)	2
2. X-ray Crystal Structure Analysis of Hydrogenase and its Feasibility of Neutron Diffraction Experiment	
Yoshiki Higuchi(Himeji Inst. Technology)	8
3. Changes of Protein Dynamics upon Folding	
Mikio Kataoka (Osaka Univ.)	16
4. Low Frequency Mode of Nucleic Acid	
Youko Sugawara (Kitazato Univ.)	21
5. An Imaging Plate Neutron Detector	32
5.1 Current Status	
Yuuko Karasawa (JAERI)	32
5.2 Several Examples (I)	
Nobuo Niimura (JAERI)	40
5.3 Several Examples (II)	
Kazuhiko Soyama (JAERI)	47
5.4 Joint Research between JAERI and Fuji Photo Film Co., Ltd.	
Nobuo Niimura (JAERI)	53
6. General Discussion and Future Aspects	54
Supplement 1 Program of the 6-th Workshop on Neutron Crystallography in Biology	55
Supplement 2 List of Participants	56

まえがき

日本原子力研究所先端基礎研究センターでは、生体物質中性子回折研究グループが中心になり、今まで重要性を指摘されていたにもかかわらず実現が遅れている中性子回折法による生体物質の構造解析とそれによる生理機能の解明を目指す目的で、「生体高分子結晶構造解析用中性子回折計」（以下、生体物質中性子回折計という）の建設を実施している。

中性子回折法は、生理機能に重要な役割を担う水素原子や水分子の位置の情報を得られる重要な研究手段であることは認識されているが、十分な回折強度を与える回折計の不足から利用が進められて来なかった。ようやく、JRR-3Mが実現したことにより中性子束が向上し、また、最近の生化学・生物物理の著しい進歩をバックに、先端基礎研究センターでも中性子回折法による生体物質の原子・分子レベルでの構造解析と生理機能の解明を実施することになった。

この研究手段の目玉とも言うべき生体物質中性子回折計は、世界1級を目指しており、その設計・建設には慎重に技術的問題を検討する必要がある。そのため中性子回折・散乱装置の建設に経験豊富な中性子散乱研究者、世界的に評価の高いX線蛋白質結晶構造解析研究者及び関連分野の研究者に参加してもらい、すでに5回にわたりワークショップを開催してきた。これらのワークショップでの議論・意見やその後の予備実験の成果をもとに、生体物質中性子回折計の建設を行い、リゾチームタンパク質単結晶からのグラッグ反射を日本で初めて観測することに成功した。

第6回ワークショップでは、生体物質中性子回折研究のパイオニアであり、今なお第一線で活躍しているBenno P. Schoenborn博士を招へいし、御講演をして頂くことができた。また、中性子イメージングプレートの実用が多岐に亘ってきたので、その実例を報告することにした。

このワークショップの発表は、極めて重要な内容を持っており、今後の生体物質中性子回折計による構造研究に資するところが非常に大きいので、編者は発表者及び実行委員の協力を得て、発表資料をJAERI-memo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、生体物質中性子回折研究グループの皆様にお世話になった。ここに感謝する次第である。

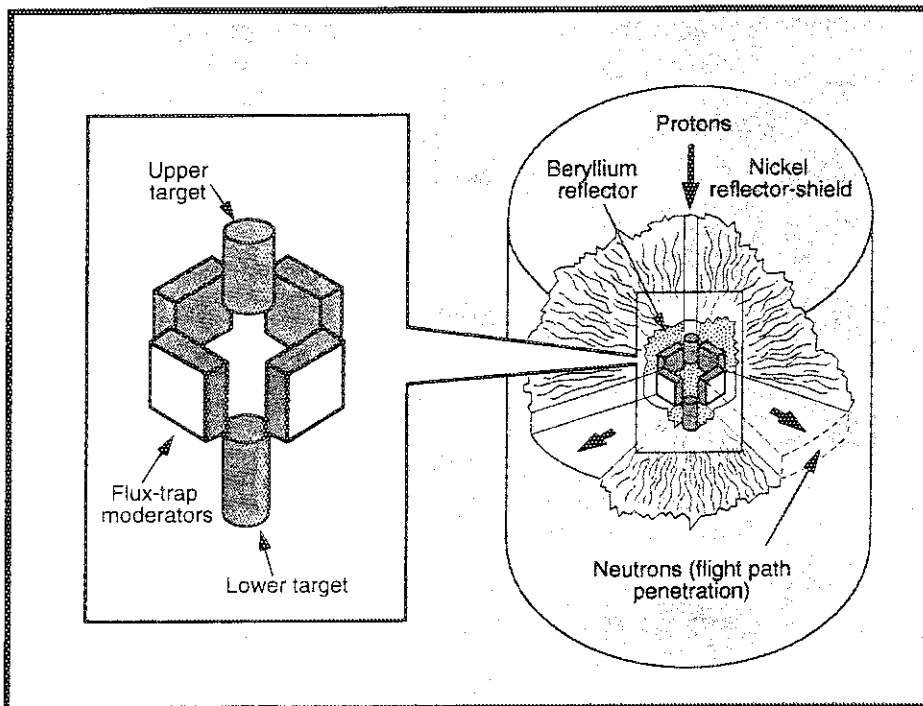
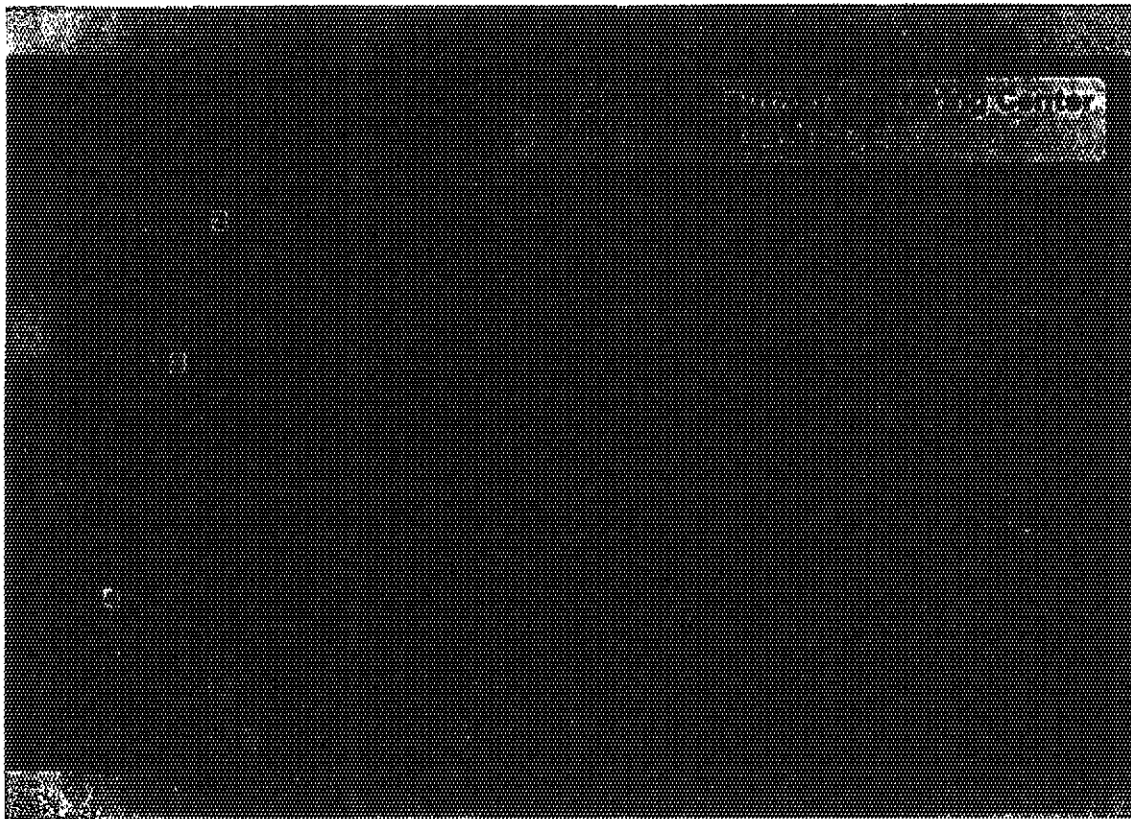
原研・先端基礎研究センター
新村信雄

平成7年4月

座長 京都大学理学部 三木邦夫

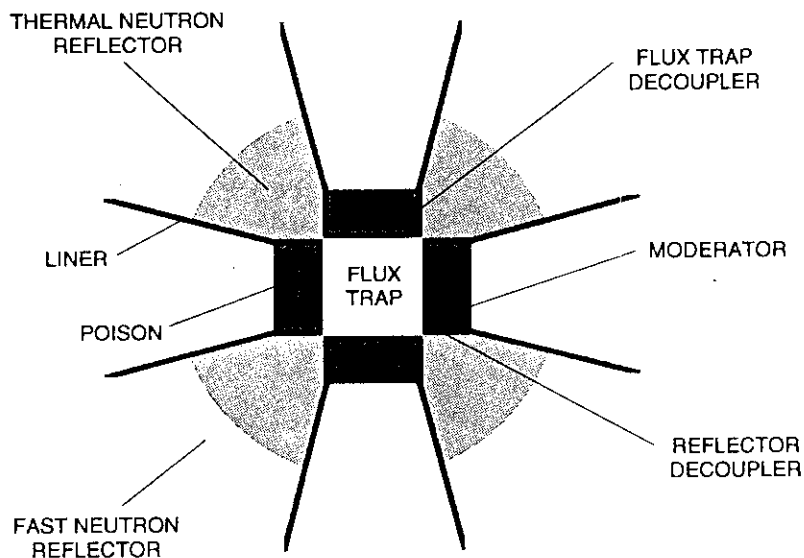
1. Neutron Crystallography in Biology.

Los Alamos National Laboratory Benno P. Schoenborn

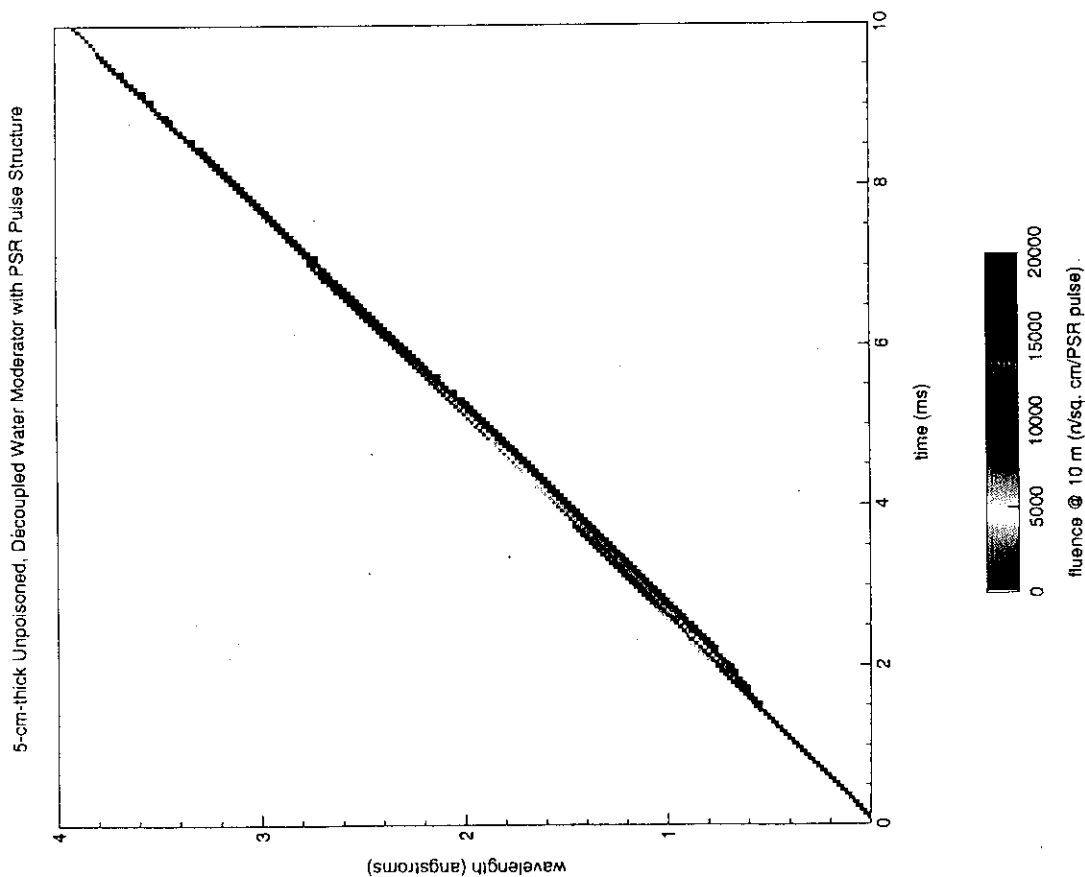


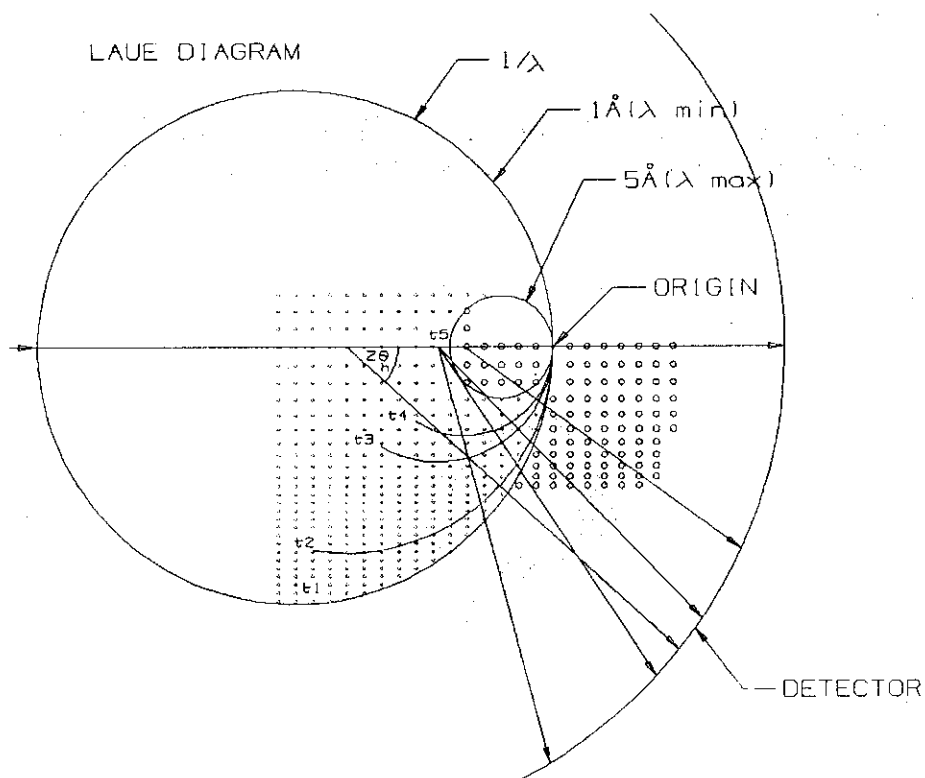
Target design with flux-trap moderators and shielding for the spallation neutron source at LANSCE.

Poisons, Decouplers and Liners



Los Alamos



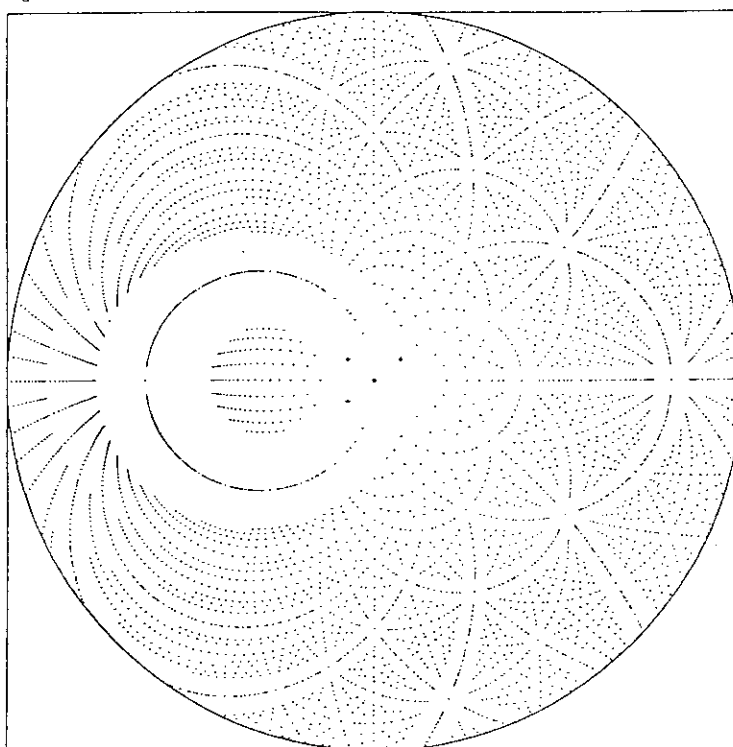


Crystal Parameters

```

SYSTEM MON , P
A      64.5000
B      30.7000
C      34.9000
ALPHA
BETA   106.0000
GAMMA
WMIN   1.0000
WMAX   5.0000
DISTRN 700.0000
DMIN   1.5000
RADIUS 700.0000
SPINDL 0.0000
ORIENT +b* +c*
PX     0.00
PY     0.00
PZ     0.00
    
```

Program NEULAUE



Multiplicity

M	Spots	Lambda	Spots
1	3997	1.267	2558
2	408	1.533	1292
3	94	1.800	613
4	45	2.067	343
5	13	2.333	206
6	4	2.600	134
7	2	2.867	91
8	4	3.133	60
9	0	3.400	44
10	0	3.667	22
11	1	3.933	25
12	0	4.200	27
13	0	4.467	13
14	0	4.733	10
15	0	5.000	11

3/ 5/93 16:15:07

File Projection

Plotter scale: FULL

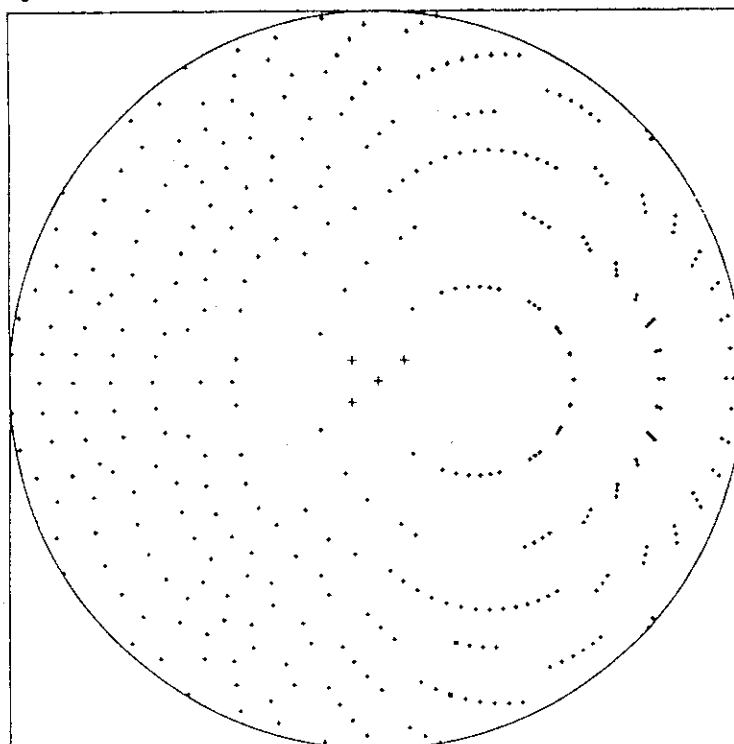
Crystal Parameters

```

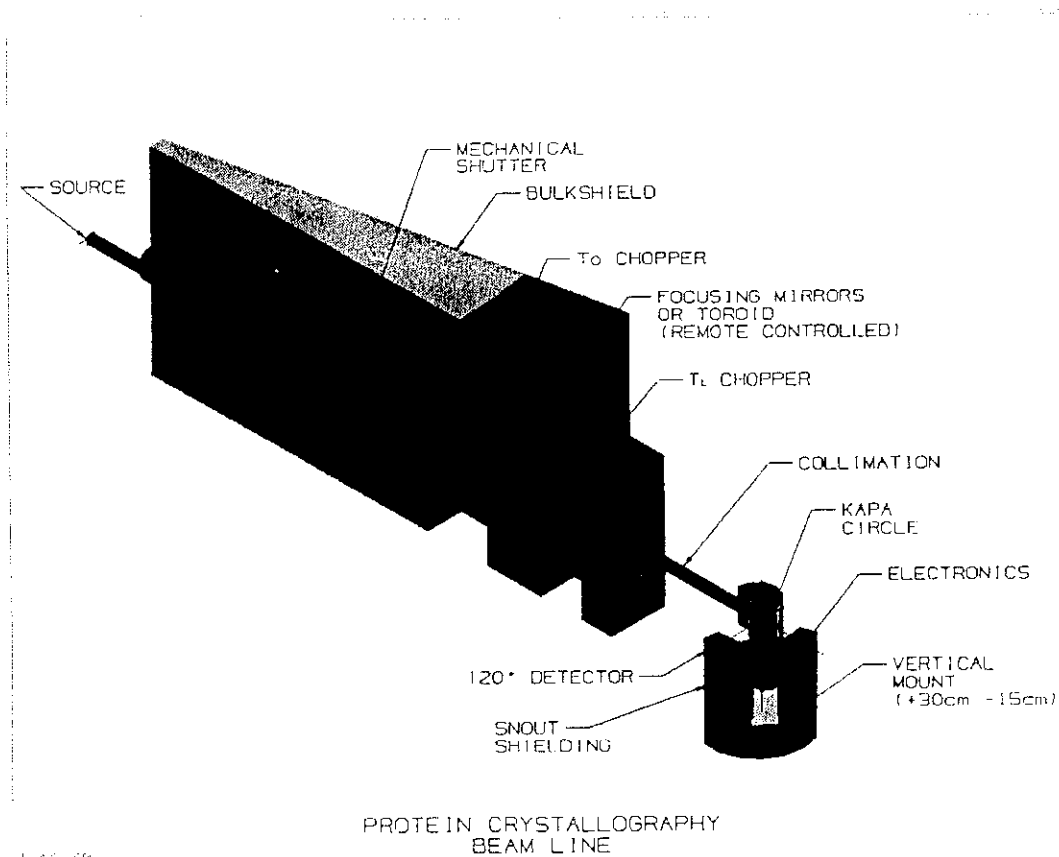
SYSTEM MON , P
A      64.4999
B      30.7000
C      34.9000
ALPHA
BETA   106.0000
GAMMA
WMIN   1.7500
WMAX   2.0000
DISTRN 700.0000
DMIN   1.5000
RADIUS 700.0000
SPINDL 30.0000
ORIENT +b* +c*
PX     0.00
PY     0.00
PZ     0.00
    
```

Multiplicity		Lambda	Spots
M	Spots		
1	363	1.767	37
2	0	1.783	30
3	1	1.800	22
4	0	1.817	32
5	0	1.833	20
6	0	1.850	40
7	0	1.867	24
8	0	1.883	23
9	0	1.900	26
10	0	1.917	11
11	0	1.933	22
12	0	1.950	22
13	0	1.967	22
14	0	1.983	26
15	0	2.000	9

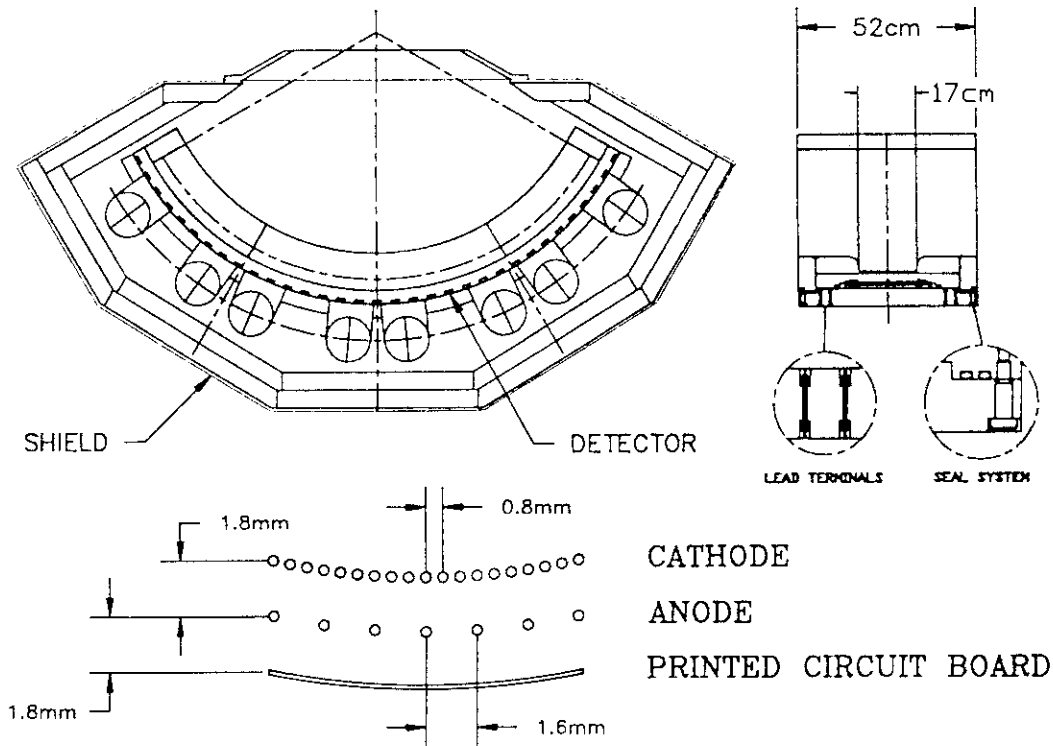
Program NEMAE



6/ 5/93 17:45:86 File Projection Plotter scale: FULL
 Min D lambda = 1.75 TO 2.00
 Single pattern: Single spots+ Multiple spots =



120° NEUTRON DETECTOR

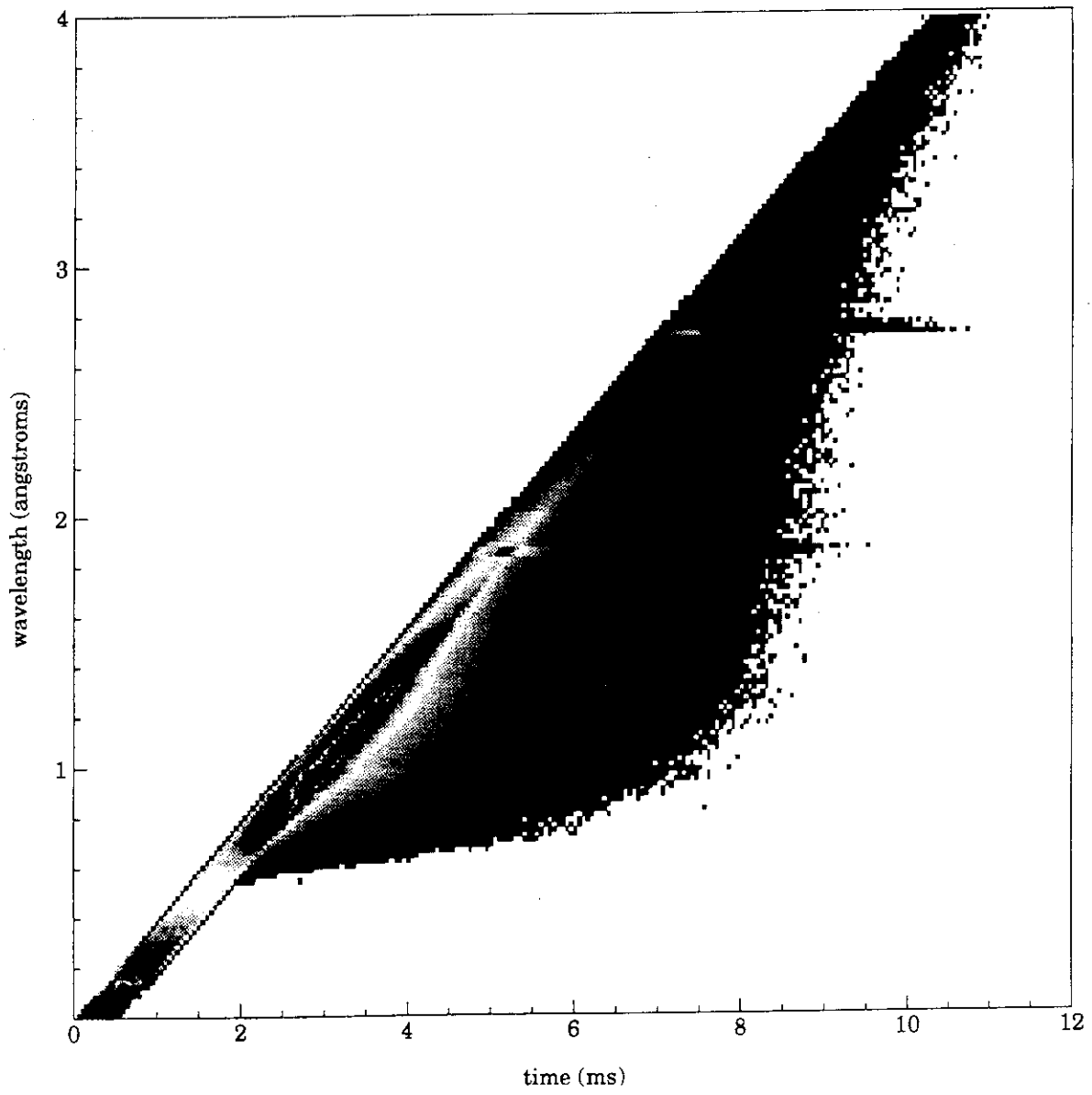


Appendix A

Design criteria for a protein crystallographic station at LANSCE.

Maximize flux unit cells	resolve 120A 1 - 30 mm ³
crystals size quasi Laue technique	1 to 5 Å
λ range (used)	10 - 16 m
flight path	toroid supermirror + bent cylinder supermirror
focusing optics	200 μsec to 250 μsec
pulse width	40 per/sec
repetition rate	6mm ø at sample
beam size	1.5 mm resolutions 120° wide (Cylindrical) 17 cm high divided into 4independent segments
2D wire detector (BNL type)	max counting rate 10 ⁶ per segment ~0.7 milli seconds
time slicing electronics	~.4
time slice interval	
fixed Δt or fixed Δλ	
T ₀ chopper (high energy)	
T ₁ chopper (low energy)	
shutter	

5-cm-thick Coupled Water Moderator with 0.5-ms, 1-mA Pulse



0 5000 10000 15000 20000

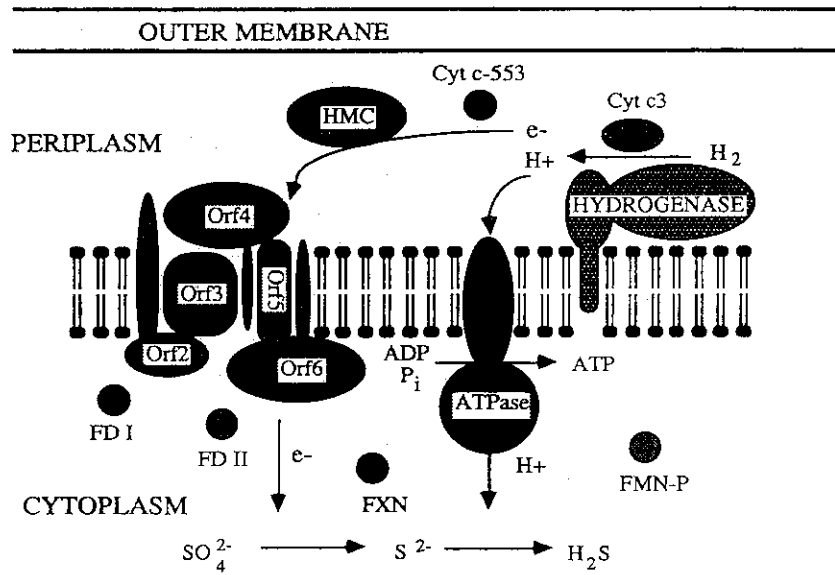
fluence @ 10 m (n/sq.cm/pulse)

2. ヒドロゲナーゼX線結晶構造解析と中性子回折実験の可能性

姫路工業大学理工学部 樋口芳樹

Sulfate-reducing Bacteria
Desulfovibrio vulgaris

Strictly Anaerobic Bacteria
Sulfate Respiration



ヒドロゲナーゼ

硫酸還元菌 (*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F)

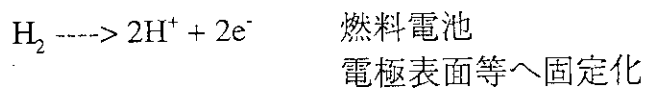
機能	水素の酸化還元触媒
アミノ酸数	267 +566 =833
分子量	28763 +62495=91258
等電点	6.2
活性部位	2(4Fe-4S)、3Fe-4S、Ni
電子伝達体	チトクロム c_3

ヒドロゲナーゼの役割

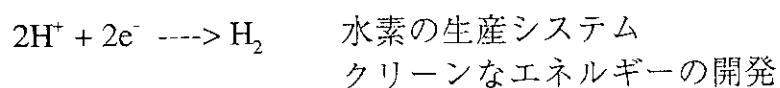
1. 硫酸塩還元に関わる一連の酸化還元
反応とカップリング
2. 細胞内の余剰の電子の処理
3. 膜周辺のプロトン濃度の調節
-----> ATPaseとの関係

ヒドロゲナーゼの工業的利用

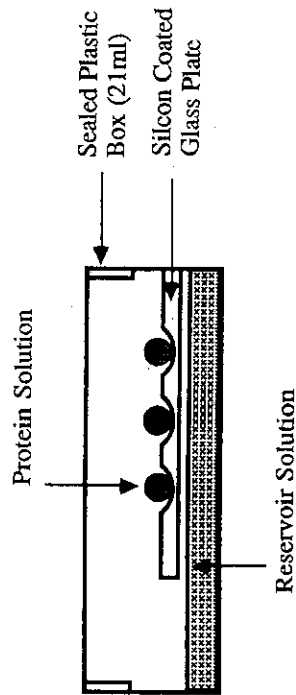
水素を吸収して分解する反応



プロトンから水素を合成する逆反応



Condition of Crystallization of Hydrogenase



補欠分子族の役割 (水素分解合成のメカニズム)

- 3 個の鉄・イオウ クラスタ と
- 1 個のニッケル原子
- 1. Ni・H クラスタ : 水素活性に関係
1 個の鉄・イオウ クラスタ と Ni で構成
- 2. F クラスタ : 電子伝達に関係
2 個の鉄・イオウ クラスタ で構成

チトクロム_c との電子伝達作用機構

どのヘムがどのクラスタと相互作用をするか

サブユニット構造 (α と β) の意味

どちらのサブユニットに活性部位があるか (システイン残基)

鉄・イオウクラスタを持つフェレドキシンとの関係

フェレドキシンの部分構造を持つかどうか

Protein Solution	PEG1000	MPD
Hydrogenase (mg/ml)	50 - 80	50 - 60
Precipitant (%)	15	35
Seeding	micro seeding	
Reservoir Solution		
Precipitant (%)	30	50
Buffer Solution	25mM Tris-HCl (pH=7.4)	
Temperature (°C)	4	15 - 20

重原子同形置換法

結晶化沈澱剤の選択 MPD (2.5 Å), PEG (1.8 Å)
 6 種類の誘導体 Hg (3 種類), U, Ir, Pt (3.0 Å)
 5 つの大きなピーク (ゴースト1個)、大きな負のピーク
 同形性の問題

ローカルスケーリング $K = \Sigma F_{PH}^2 / \Sigma F_P^2$

散乱角 (2θ) に依存

Phasing (PHARE) $m = 0.56$

溶媒領域平滑化 3.0 Å 分解能 ($m = 0.76$)

電子密度図 (3.0 Å 分解能)

4 つの大きなピーク、負の大きなピークなし
 遊離したピーク -----> モデルビルディングの障害

鉄・イオウのクラスターとニッケルの同定 (低分解能)

多波長異常分散データの利用

5 波長 (1.04, 1.73, 1.743, 1.75, 1.48 Å)、1 個の結晶

差フーリエ法

$(F_{1.04} - F_{1.743}) \cdot \exp(i\alpha_{best})$

$(F_{1.04} - F_{1.488}) \cdot \exp(i\alpha_{best})$

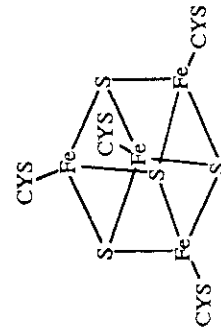
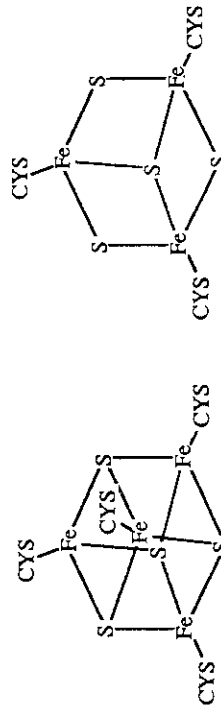
$(F_{1.73}(+) - F_{1.73}(-)) \cdot \exp(i(\alpha_{best} - 90))$

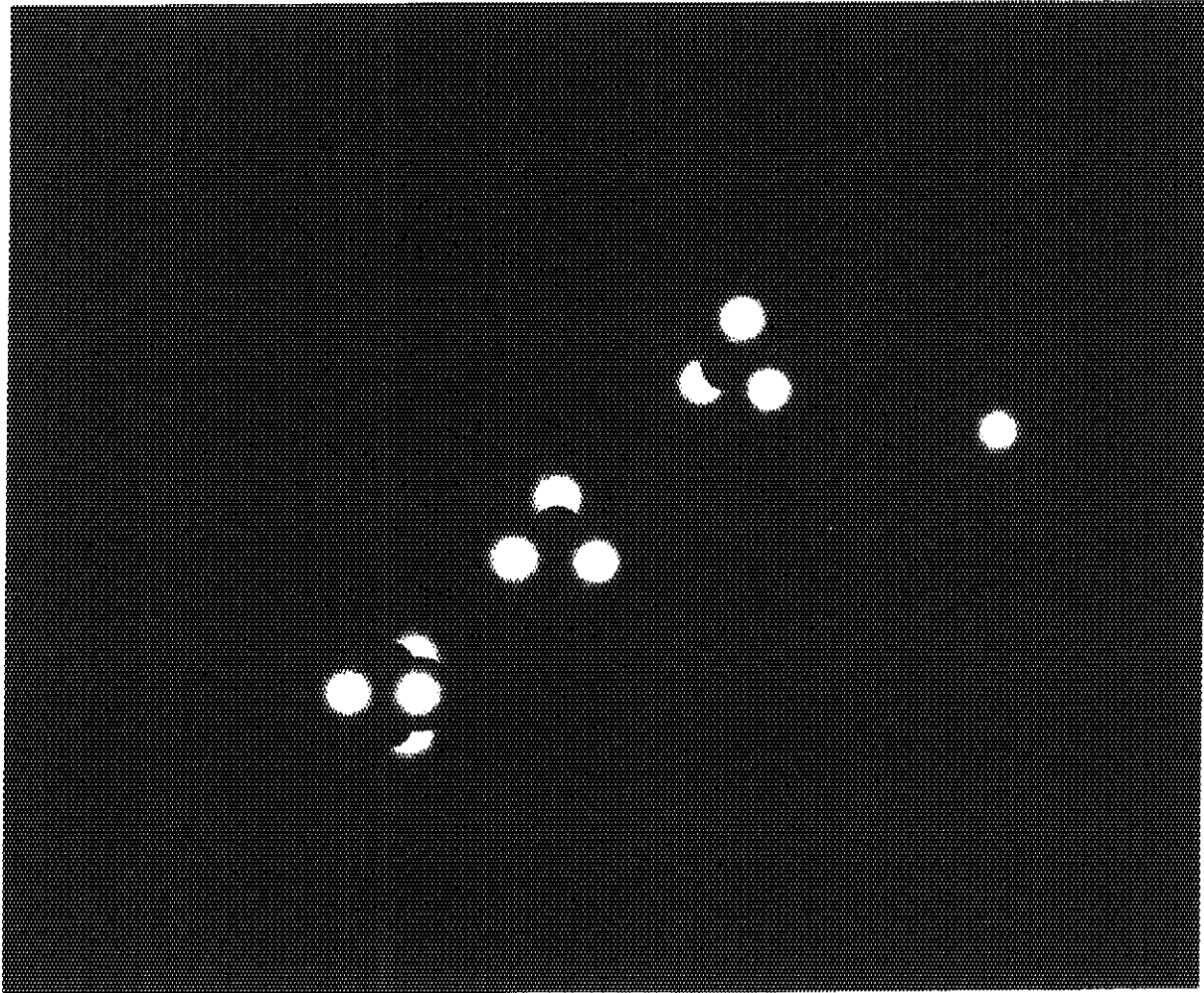
多波長異常分散データを利用した位相の改良

Four Large Peaks in an Asymmetric Unit

Coordinates		ρ	
x/99.17	y/127.93	z/66.68	
0.63	0.35	0.12	16.5
0.59	0.40	0.96	21.7
0.61	0.47	0.84	15.9
0.56	0.38	0.29	14.3

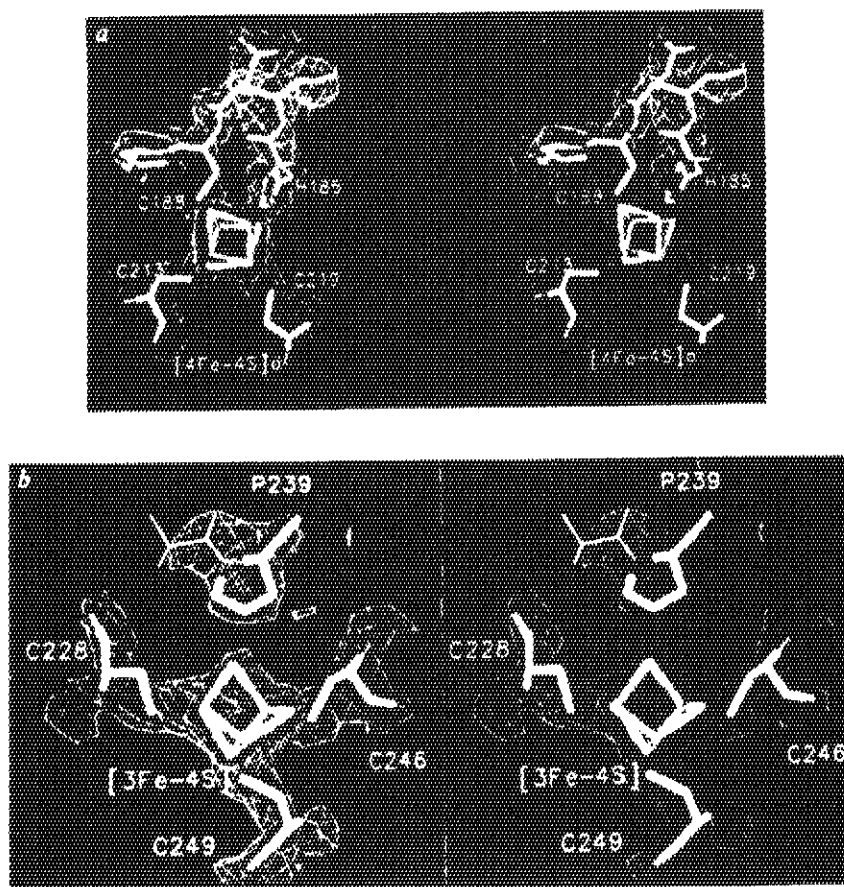
Standard deviation 2.81





ARTICLES

FIG. 2 Structure of two Fe-S clusters fitted to the electron density calculated with $2mF_o - DF_c$ map coefficients²⁷. a. The $[4Fe-4S_{\text{dist}}]$ cluster, including the exposed His 185 that functions as a ligand to one of the four Fe ions. In some Ni-containing hydrogenases this histidine is substituted by a cysteine^{24,25}. b. The $[3Fe-4S]$ cluster, highlighting the cysteine ligands of the three Fe ions, and the proximity of Pro 239 with respect to the empty potential fourth Fe site.



Furthermore, a crown of acidic residues surrounds the partially exposed His ligand of $[4Fe-4S_{\text{dist}}]$ and this might provide a recognition site for the reported²³ redox partner cytochrome c_3 . Still, the role of the $[3Fe-4S]$ cluster is not clear. Although its position suggests an active role in electron transfer, the high redox potential of this cluster and its absence from some hydrogenases cast doubts about its involvement in electron transport in *D. gigas* hydrogenase. Note that Pro 239, which points at the empty potential fourth Fe-site of the $[3Fe-4S]$ cluster (Fig. 2b), is substituted by a cysteine in the Ni-Fe-Se hydrogenase from *D. baculatus*⁸. This and the absence of its typical EPR signal suggests that the $[3Fe-4S]$ cluster has become a $[4Fe-4S]$ cluster in the *D. baculatus* enzyme. Thus, it appears that alternative electron pathways may exist in different classes of Ni-containing hydrogenases.

Another important functional aspect of hydrogenase is how the enzyme disposes of protons formed during hydrogen oxidation, or how they get to the active site for the reverse reaction. Four histidines and a partially exposed glutamate have been located between the active site and the molecular surface (Fig. 5b). Histidines and glutamates have suitable pK values for transferring protons. Moreover, the glutamate and three of the four histidines are highly conserved among Ni-Fe and Ni-Fe-Se hydrogenases^{24,25}. Therefore, a pathway may be proposed for the transfer of protons, first from the active site to His 72 and next from His 72 to His 536 through a flip-flop mechanism of the imidazole ring, and finally from His 536 through ordered water molecules and Glu 46 to the solvent medium. His 468 and His 482 might be involved as well. It should be noted, however, that the active site is inaccessible to solvent protons when the enzyme is in the oxidized Ni-A state^{15,30}. The reasons for this

are not yet understood and are not immediately obvious from the crystal structure.

Possible pathways for H_2 have not been identified in the crystal structure. It is likely that, as in the case of CO access to the heme group of myoglobin³¹, several dynamic pathways exist for molecular hydrogen that depend on fluctuations in the protein conformation.

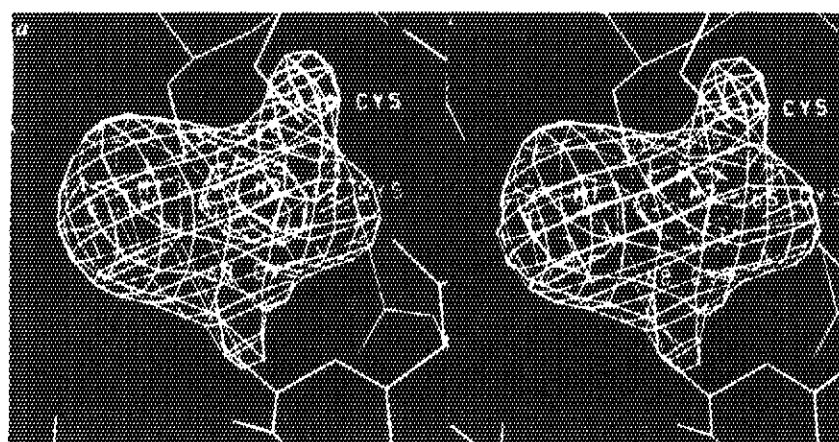
The active site of hydrogenase

The crystallographic analysis of hydrogenase has shown that its active site is buried in the large subunit and contains two metal ions, one of which is Ni. The identity of the second metal ion, here called X, remains uncertain although, as argued above, Fe appears as the most likely candidate. Additional support for the presence of an Fe ion at the active site comes from very recent EXAFS studies (S. Wang, R. A. Scott, R. Franco, I. Moura, J. J. G. Moura, J. Le Gall & A. E. Przybyla, personal communication) which have suggested the existence of an Fe ion at 2.55 Å from the Ni atom in the activated forms of the enzyme.

The presence of a possible Ni-Fe centre would require a reinterpretation of the EPR Ni signals that have usually been assigned to a mononuclear site. Although such reinterpretation may have to invoke some unusual chemistry, one must bear in mind that the geometry of the active site may be greatly conditioned by the protein environment. As an example, only four thiolates may serve as Ni protein ligands in the oxidized hydrogenase, resulting in an uncommon coordination geometry that is neither square planar nor tetrahedral (Fig. 4b). It should also be mentioned here that although the three non-protein ligands of X have been modelled as water, their nature is not known at this time. This is relevant because ligands can influence the spin

ARTICLES

FIG. 4 The active site of hydrogenase. a, Experimental evidence for the presence of two metal ions, a 2.5 Å resolution σ_A - F_o and $2F_o - \sigma_A$ is shown in purple, contoured at the 4 σ level. Phase information comes from a model that contains either the S γ atoms of cysteines 65, 68, 530 and 533 nor the metal ions. The highest feature of this map (18.0 σ) coincides with a significant peak (5.7 σ) in a 4.5 Å resolution anomalous difference map (shown in red), suggesting the presence of a metal X, tentatively assigned as Fe, at the site called M1. After inclusion of an Fe at this site in the model, a next omit map (shown in blue, contoured at the 6 σ level) showed a second metal, assigned to Ni, at site M2, about 2.7 Å away from M1. Subsequent omit maps showed the positions of the S γ atoms of the four invariant cysteines and of three additional non-protein ligands.



b, Observed coordination of the two metal centres. The S γ of Cys 530 is in an apical position at ~ 2.6 Å from the Ni, which may be compared to an average distance of ~ 2.25 Å for the three equatorial Cys ligands. Metal X is bound by three putative water molecules at ~ 2.05 Å, and by only two protein ligands which bridge the two metals, Cys 68S γ at ~ 2.35 Å and Cys 530S γ at ~ 2.15 Å. The Ni coordination site labelled I is not occupied by any protein ligand. In the current model this site, which is also in a coordination position for metal X, is empty. Significant disorder is indicated by the temperature factors of the active site atoms in the two independent hydrogenase molecules, ranging from 12.0 to 27.0 (in Å^2) for the S ligands, from 5.2 to 17.3 for the modelled water ligands, and from 12.0 for metal X (modelled as Fe) to 27.6 for the Ni.

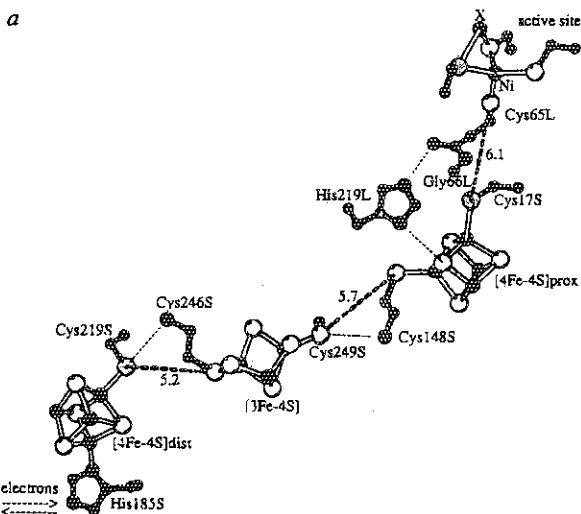
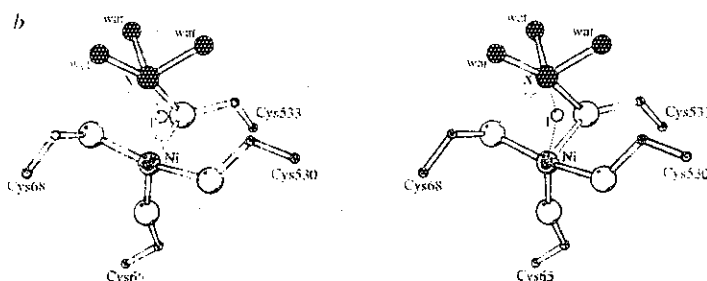
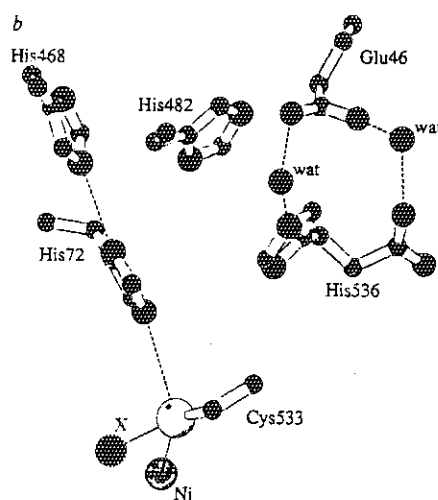


FIG. 5 Electron and proton transfer in the large (L) and small (S) subunit. a, Residues and metal centres involved in a possible electron transfer pathway from the buried active site to the exposed His 185_S. The shortest path⁴⁹ would include, besides the indicated H bonds (thin dashed lines) and metal-ligand interactions, covalent bonds of Cys 65_L, His 219_L, Cys 148_S, Cys 246_S and His 185_S. An alternative pathway between the Ni and [4Fe-4S]_{prox} would involve a 'through space' jump from Gly 66_L to the S γ -atom of Cys 17_S. The numbers next to the thick dashed lines give the nearest edge-to-edge distance (in Å) between subsequent redox centres, assuming that the S γ atoms of cysteine ligands may be counted as part of the respective redox centres¹⁹. The nearest S γ -to-S γ distance between the two [4Fe-4S] clusters in the



crystal structure is 16.4 Å. Using the organic glass model of protein-mediated electron transfer⁵⁰, this would give a maximal electron transfer rate between these two clusters in the order of 10^9 s^{-1} , almost two orders of magnitude higher than the maximal hydrogen turnover rate of the enzyme⁵. Thus, the [3Fe-4S] cluster may not be absolutely required for efficient electron transfer from the active site to the distal cluster, although the detailed implications of its position in between the two [4Fe-4S] clusters are unclear. b, Four buried histidines, one partially exposed glutamic acid and two water molecules possibly involved in a proton transfer pathway from the active site to the surface of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. Except for His 482 all the residues depicted are highly conserved^{24,25}.

中性子線回折への可能性、期待

1. 大きな良質の結晶が得られる。
2. 水素の位置が見えるか？
——>ニッケル周りの水素
3. 反応過程が見えるか？

座長 大阪大学蛋白質研究所 佐藤 衛

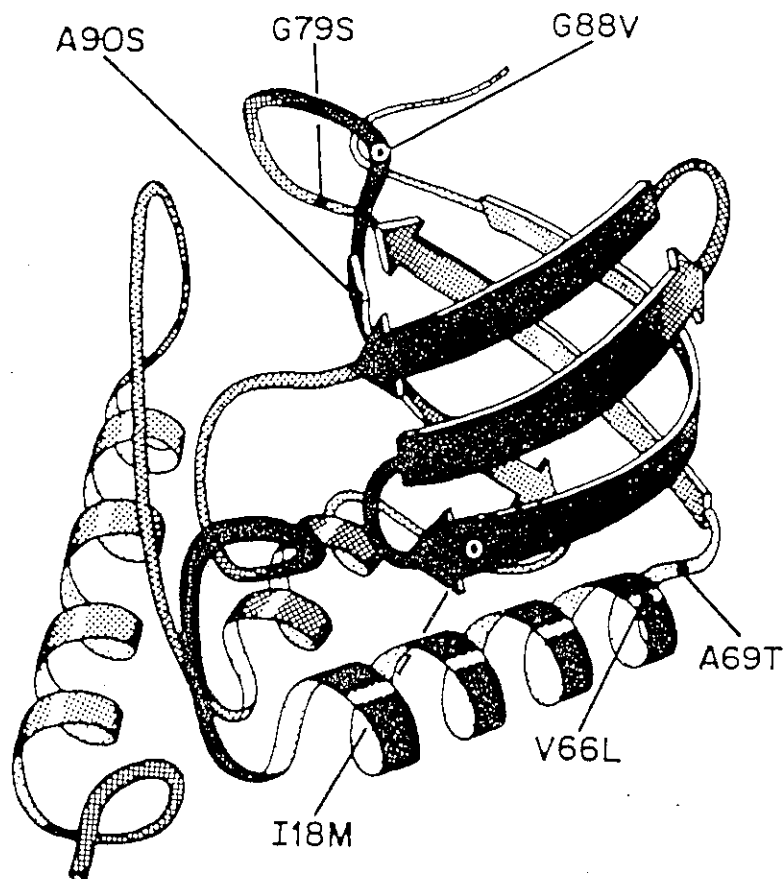
3. Changes of Protein Dynamics upon Foldings.

大阪大学理学部 片岡幹雄

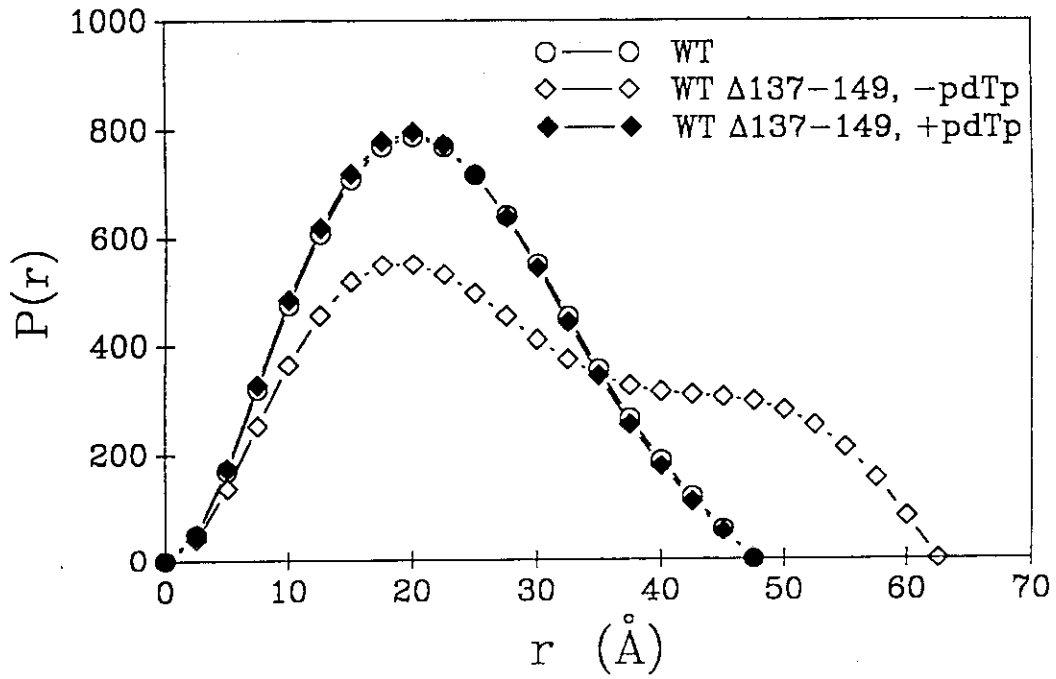
CHANGES OF PROTEIN DYNAMICS UPON FOLDING

KATAOKA, M.¹
KANAYA, T.²
IZUMI, Y.³
FLANAGAN, J. M.⁴
TOKUNAGA, F.¹
ENGELMAN, D. M.⁴

1. Department of Earth and Space Science,
Faculty of Science, Osaka University
2. Institute for Chemical Research, Kyoto University
3. Macromolecular Research Laboratory, Faculty of
Engineering, Yamagata University
4. Department of Molecular Biophysics and Biochemistry,
Yale University

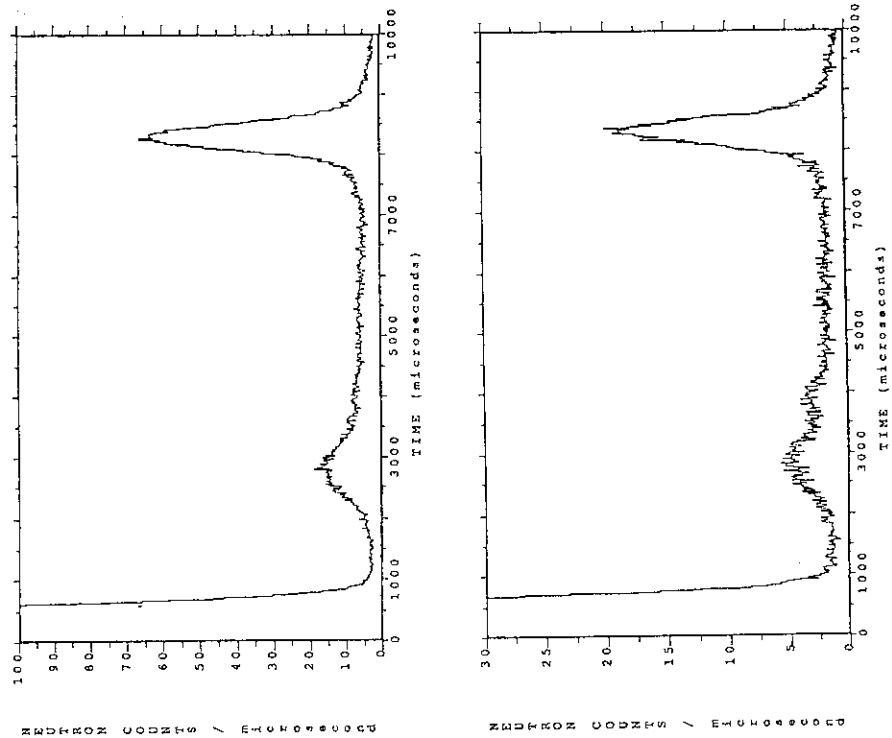


Comparison of P(r)

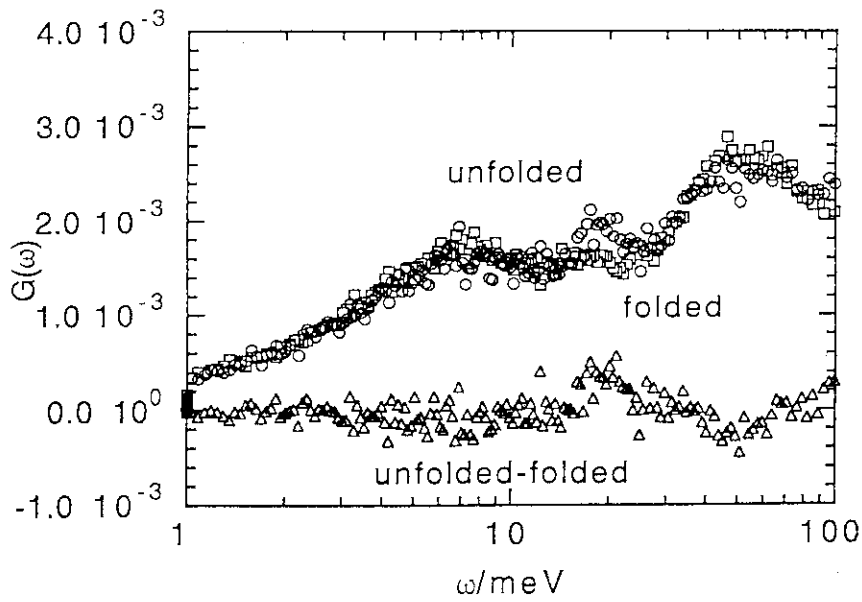


TOF SPECTRUM FOR STAPHYLOCOCCAL NUCLEASE
SOLUTION AT ROOM TEMPERATURE

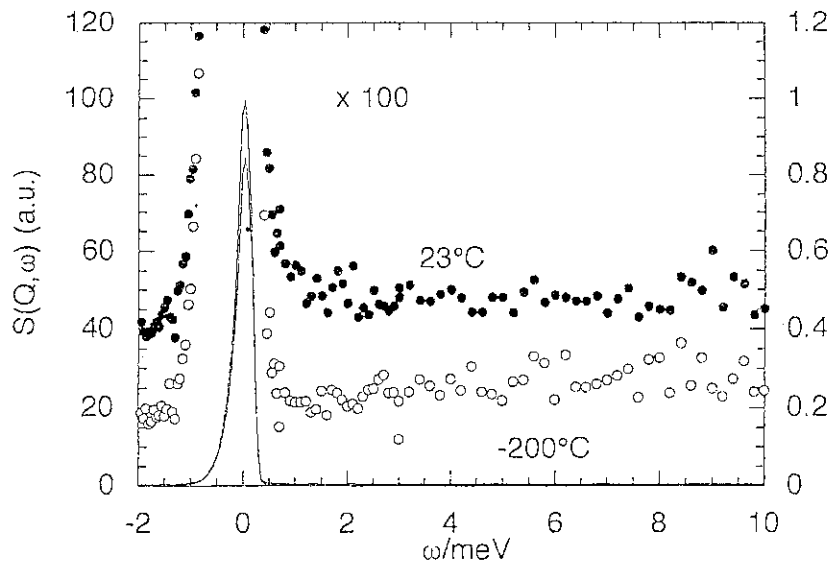
TOP: WILD TYPE WHOLE PROTEIN (FOLDED)
BOTTOM: WILD TYPE FRAGMENT (UNFOLDED)



DENSITY OF STATES DERIVED FROM INELASTIC NEUTRON SCATTERING FOR STAPHYLOCOCCAL NUCLEASE (FOLDED) AND ITS FRAGMENT (UNFOLDED)



QUASIELASTIC AND INELASTIC NEUTRON SCATTERING FROM SNase



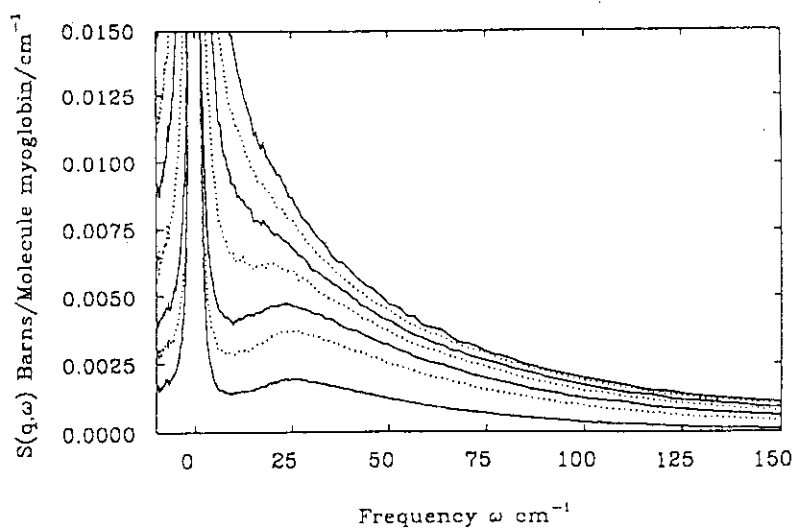
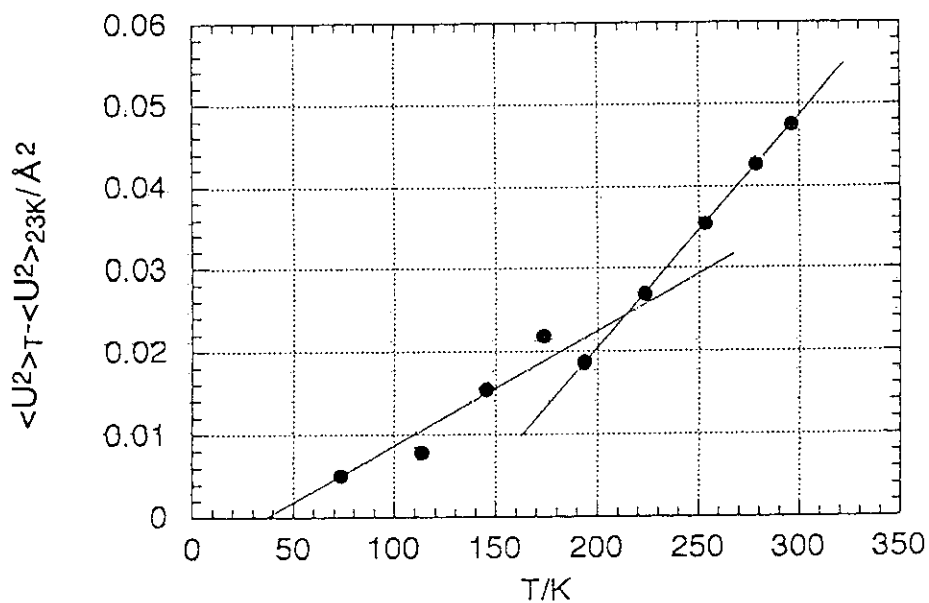


FIGURE 1 The temperature dependence of $S(q, \omega)$ for D_2O -hydrated myoglobin for a mean scattering angle of 108.3° . The temperatures are 100 K (*bottom curve*), 180 K, 220 K, 270 K, 300 K, 320 K, and 350 K (*top curve*). The data are on an absolute scale (with accuracy $\sim 10\%$), as determined by a vanadium standard.

[Cusack and Doster (1990) Biophys. J. 58, 243-251]

TEMPERATURE DEPENDENCE OF MEAN SQUARE DISPLACEMENT



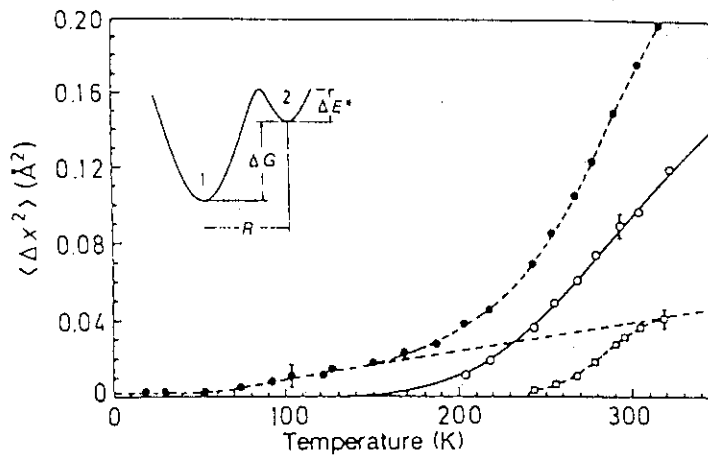
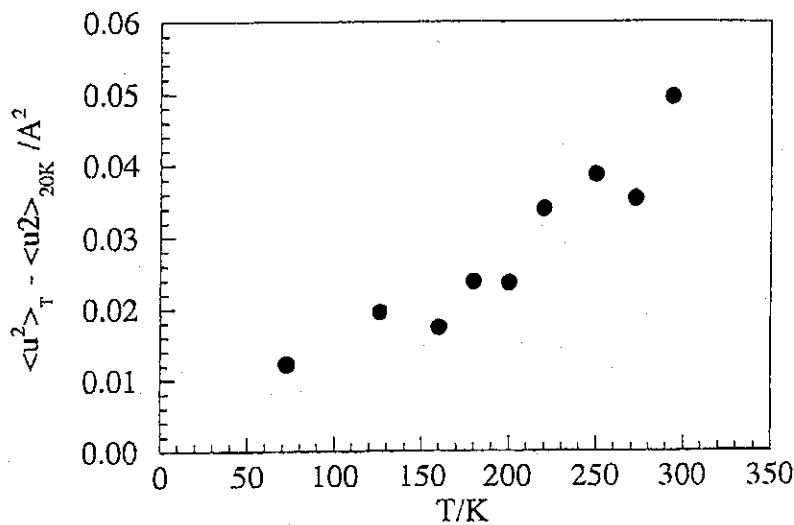


Fig. 2 Average mean-square hydrogen displacements obtained from the analysis of $I_{el}(q)$ assuming an asymmetric two-state model. The full circles give the total mean-square displacement $\langle \Delta x^2 \rangle$ defined by equation (2). The solid line shows $\langle \Delta x^2 \rangle_{\beta} = p_1 p_2 d^2 / 3$ obtained using the parameters in the text and the open circles give the corresponding experimental points. The squares show $\langle \Delta x^2 \rangle_{\alpha}$ (see text). The dashed straight line is the vibrational contribution $\langle \Delta x^2 \rangle_{vib}$ extrapolated linearly from low temperature. A symmetrical model with two excited states may be more appropriate for torsional motion. Such a model does indeed fit the data equally well, but the derived parameters (apart from the entropy, which is lower) are not significantly different. Jump models with multiple ground states are excluded by the data. Quantum effects are important below 50 K, leading to a temperature-independent $\langle \Delta x^2 \rangle$ of $0.005 (\pm 0.005) \text{\AA}^2$.

(Doster *et al.* (1989) Nature 337, 754-756)

TEMPERATURE DEPENDENCE OF MEAN SQUARE DISPLACEMENT
SNase Fragment



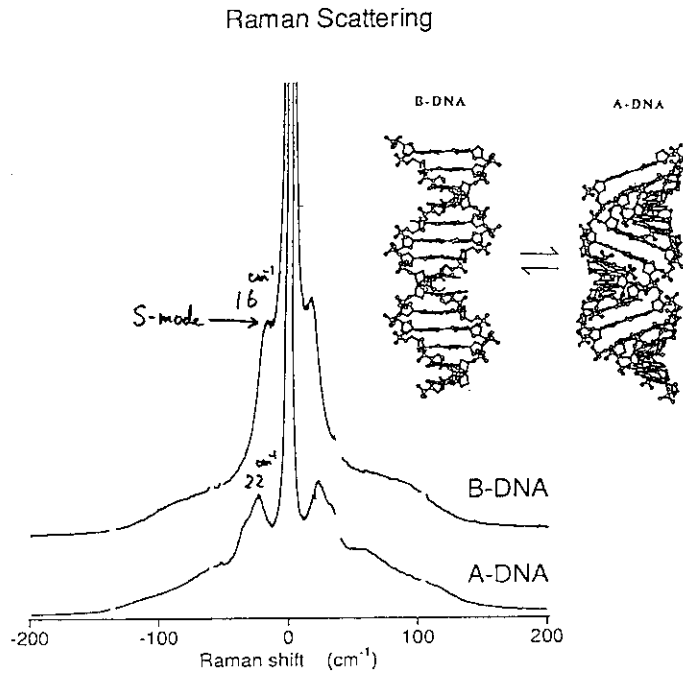
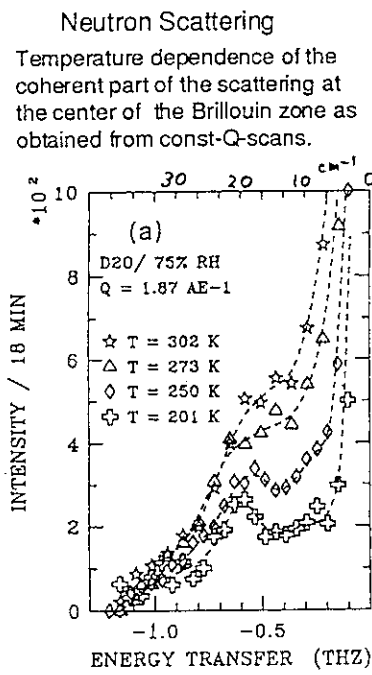
4. 核酸の低振動数モード

— ラマン散乱と中性子非弾性散乱 —

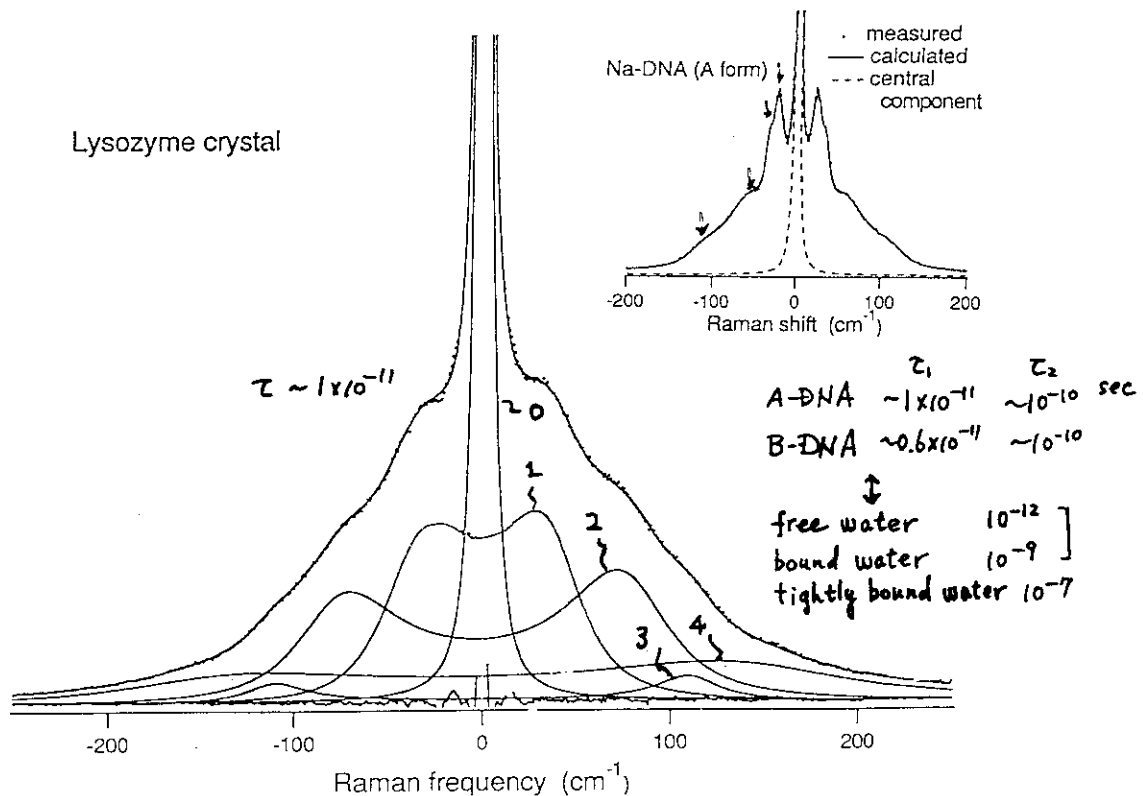
北里大学理学部 菅原洋子

核酸の低振動数モード
— ラマン散乱と中性子非弾性散乱 —

(北里大理) 菅原洋子 (東京家政学院大) 占部久子

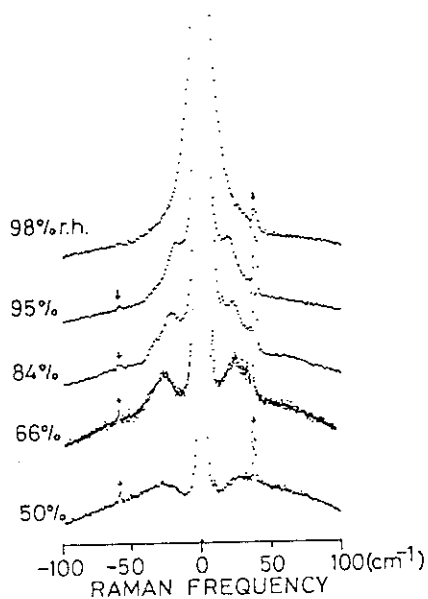


H. Grimm et al. ICNS '94



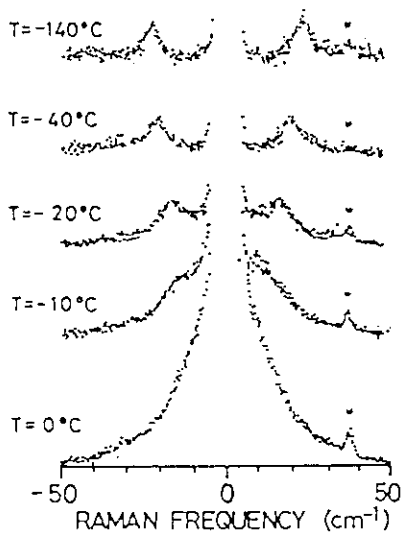
Raman spectra of calf thymus DNA

Humidity dependence
(salt-free, lyophilized)

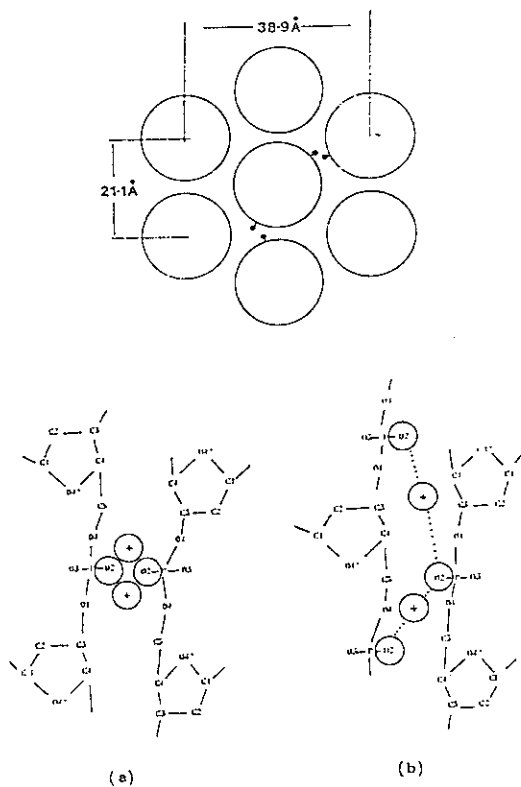


Urabe & Tominaga, 1982

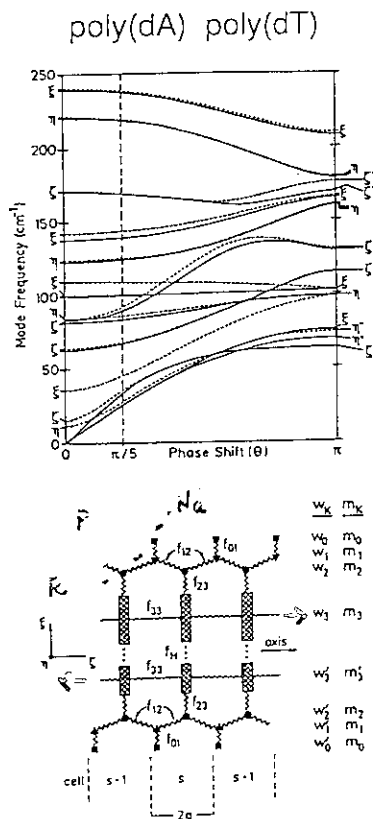
Temperature dependence
(40 w/w %; pH 7.0, 5mM tris HCl, 1.5mM NaCl)



Tominaga et al., 1985

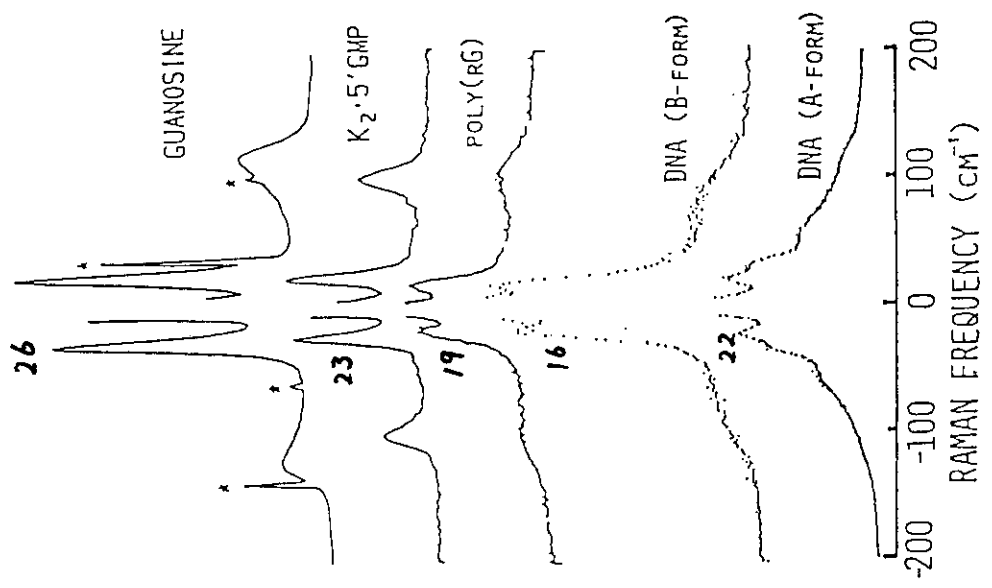
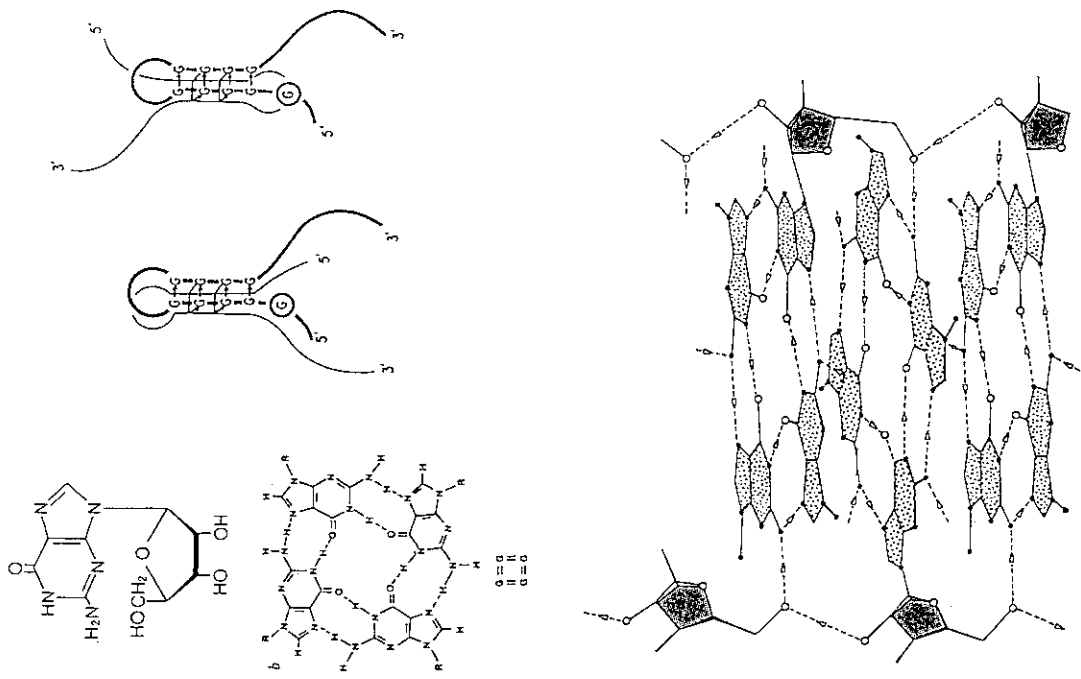


Lindsay, 1986



Powell et al., 1987

Low-frequency Raman spectra of guanosine derivatives in the self-associated state and DNA



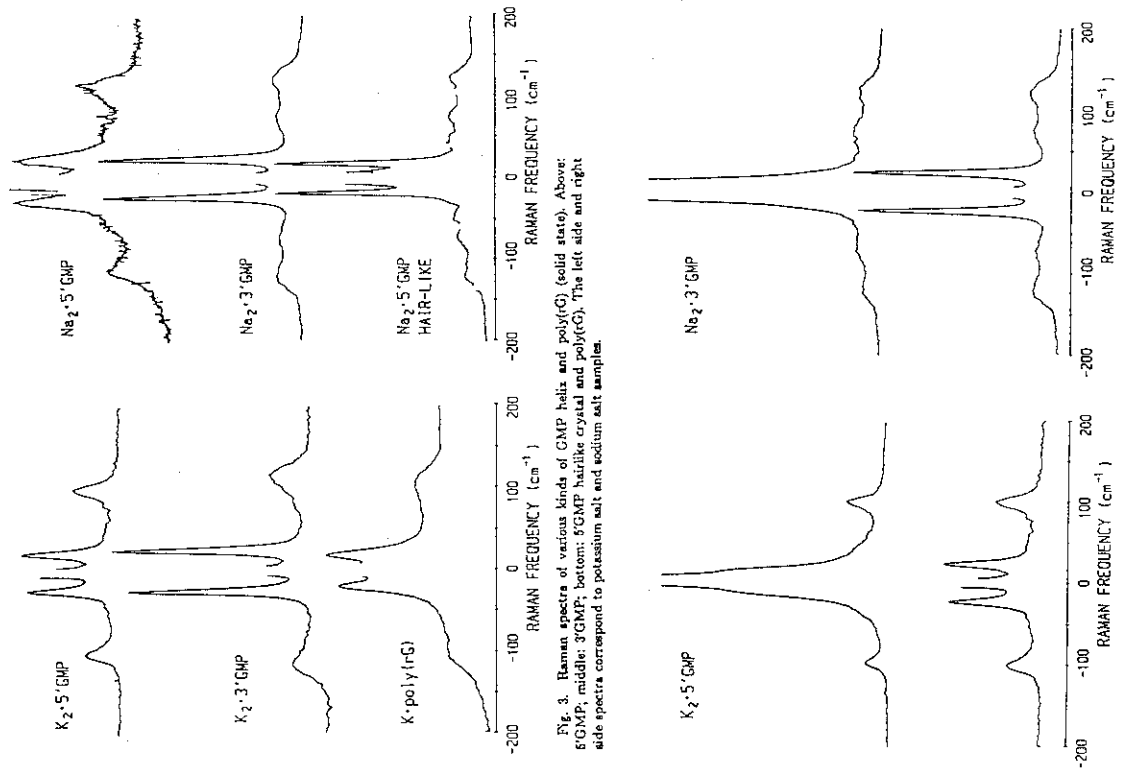


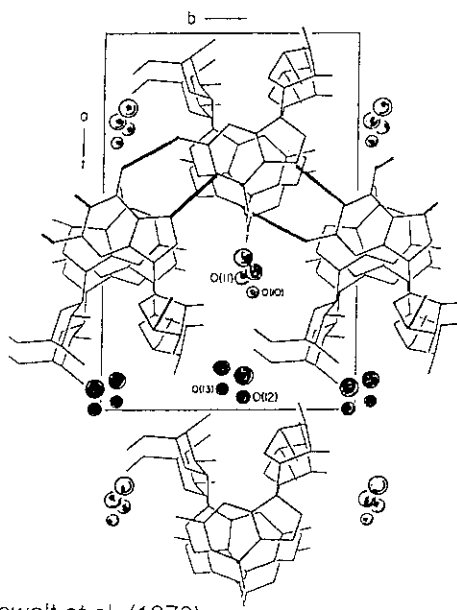
Fig. 3. Raman spectra of various kinds of GMP helix and poly(rG) (solid state). Above: 5'GMP; middle: 3'GMP; bottom: 5'GMP hairlike crystal and poly(rG). The left side and right side spectra correspond to potassium salt and sodium salt samples.

Fig. 4. Raman spectra of K₂·5'GMP (left) and Na₂·3'GMP (right) gels of different water content. Above and below spectra correspond to wet gels (5 w/w% and pH 4.5; net spectra) and dried gels (> 50 w/w%), respectively.

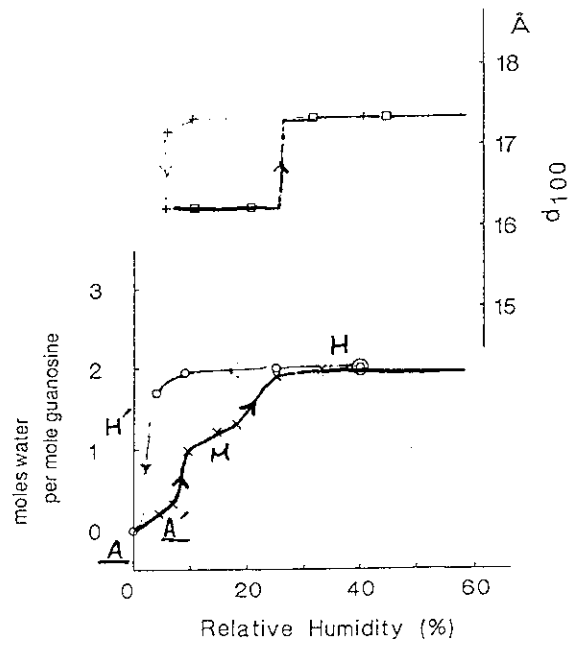
グアノシンの結晶構造転移機構

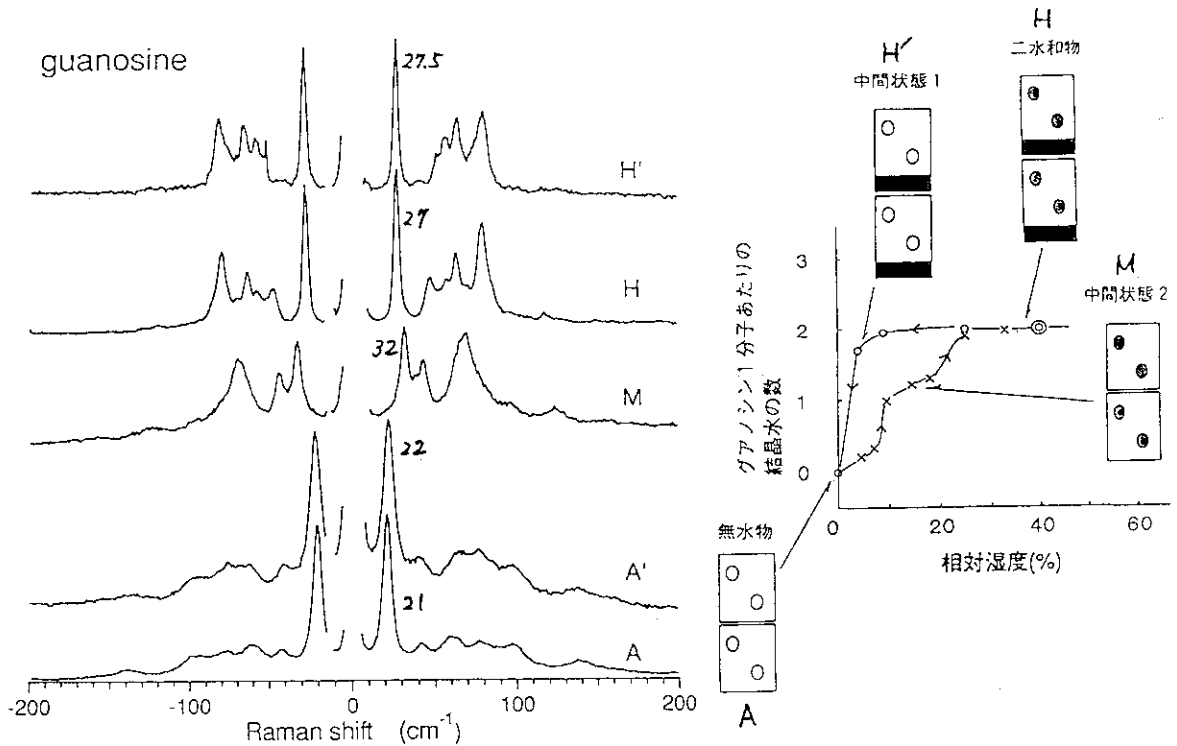
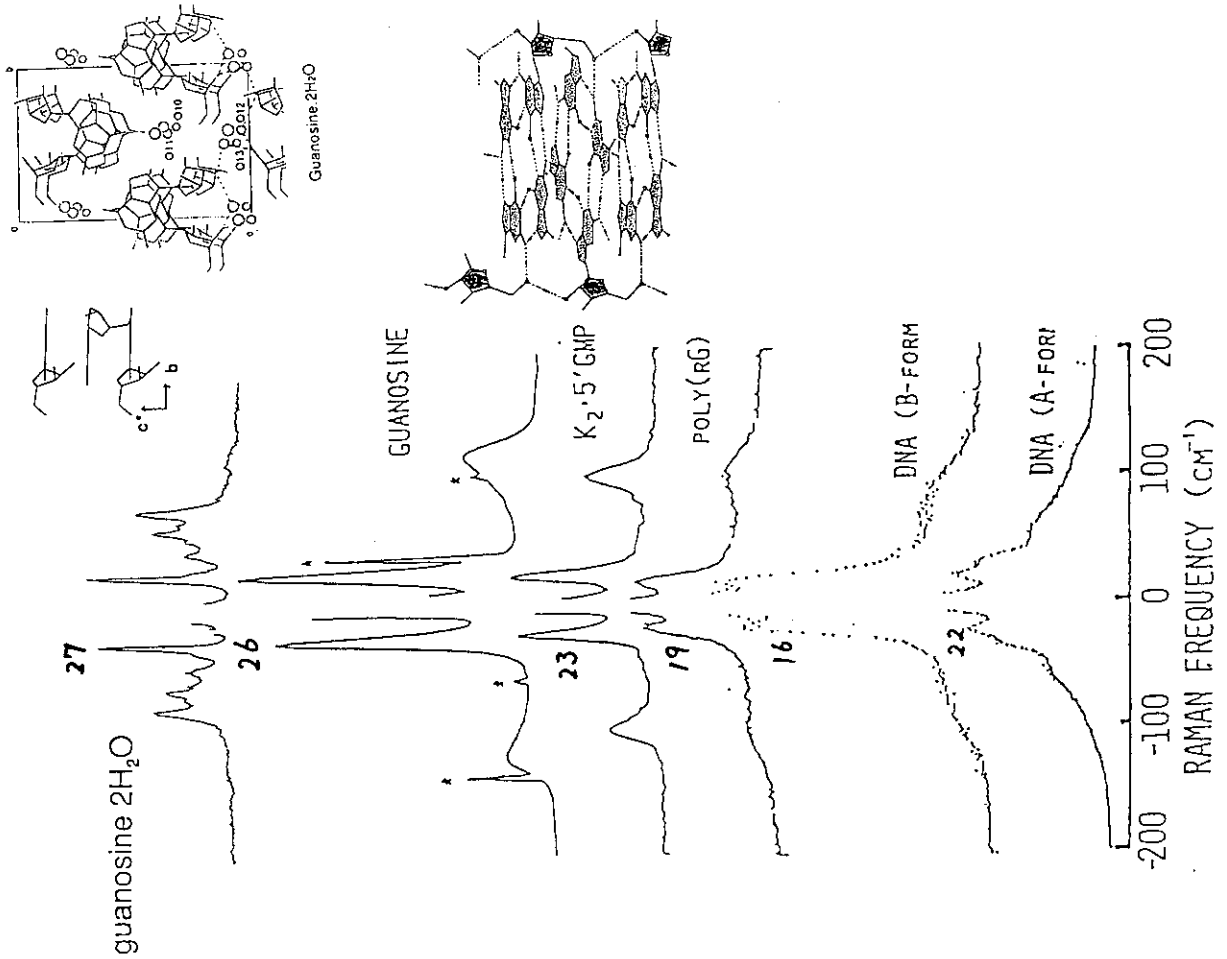
○菅原洋子^A、占部久子^B、飯村康紘^C、岩崎準^C
 (北里大理^A、東京家政学院大^B、理研^C)

Guanosine·2H₂O [P2₁]

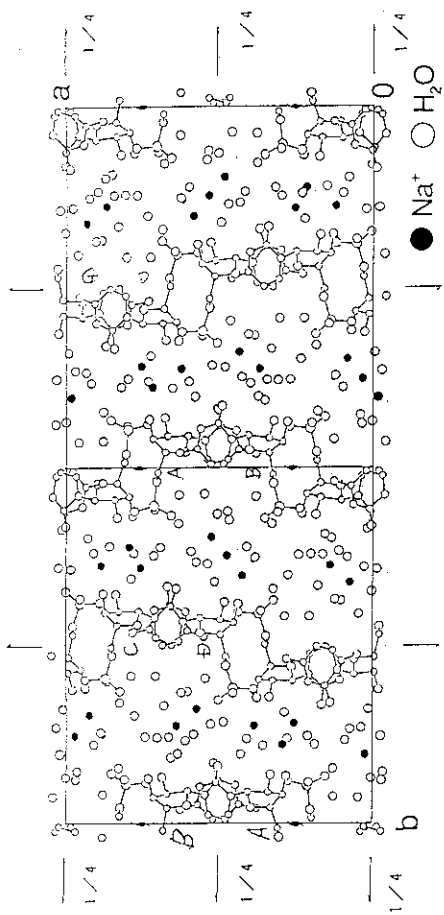
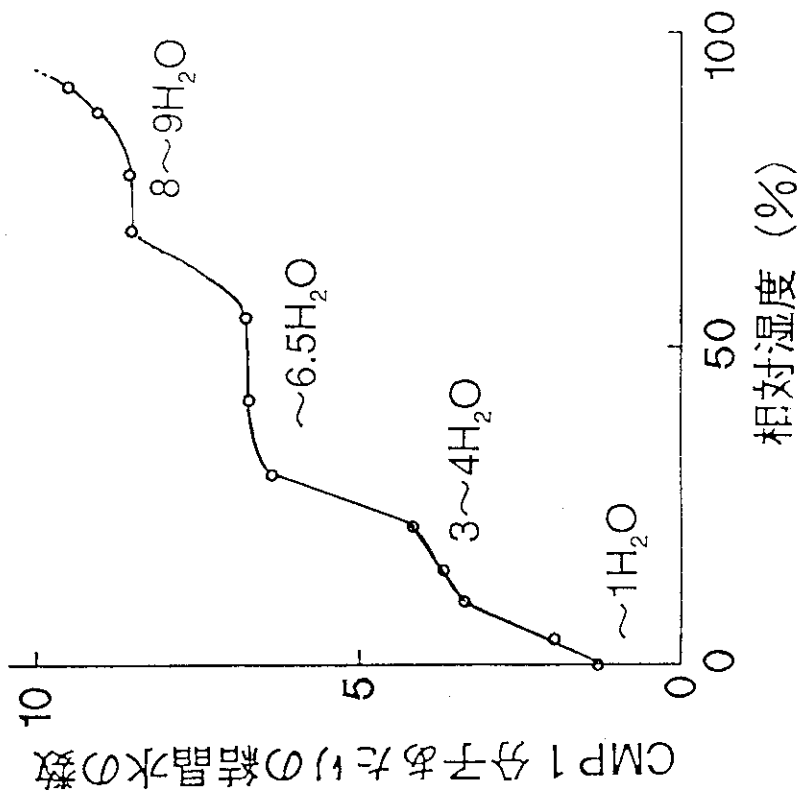


Thewalt et al. (1970)

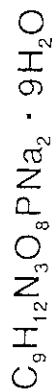




Na₂CMP結晶の吸着過程における結晶水数の変化



Crystal Data



orthorhombic, $P2_12_12_1$

a 20.729 (4) Å

b 47.838 (12)

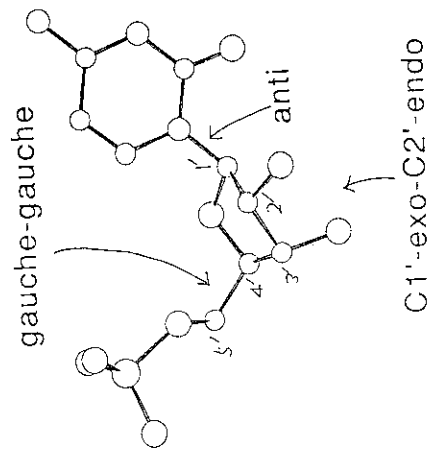
c 9.105 (2)

Z 16

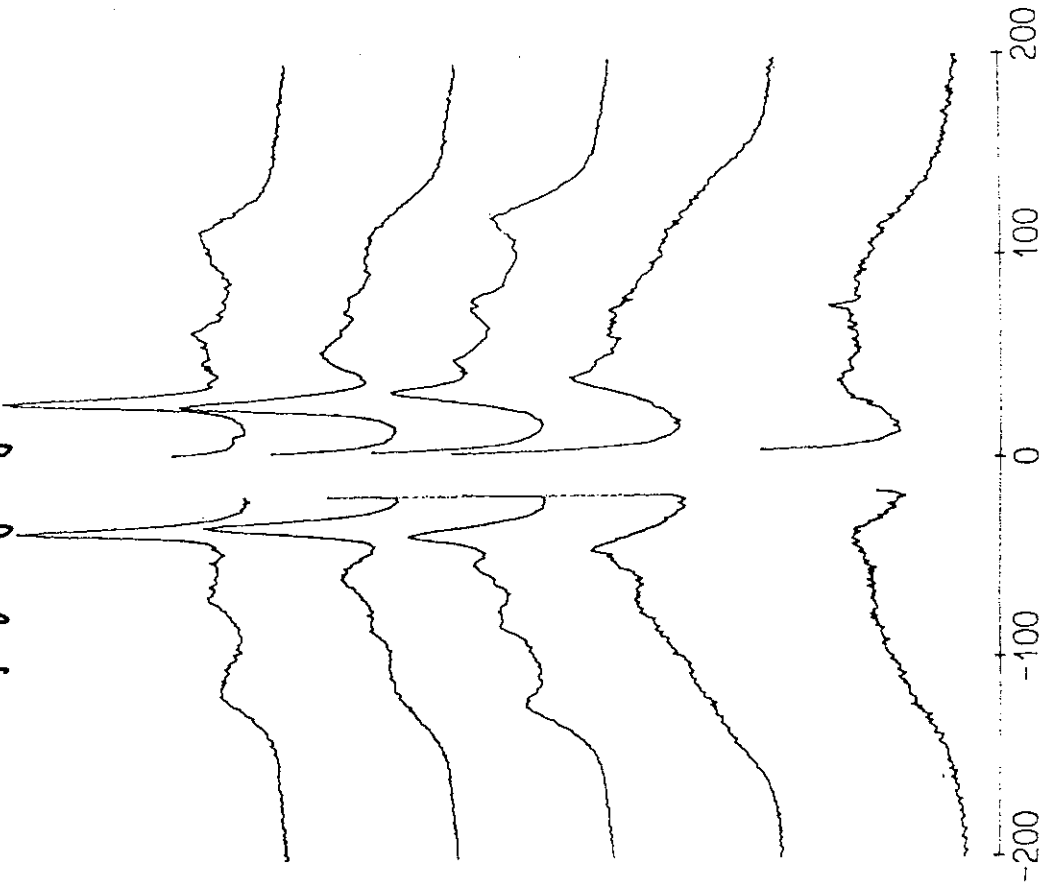
Reflections 5689

[$|Fo| > 3.0 \sigma(Fo)$]

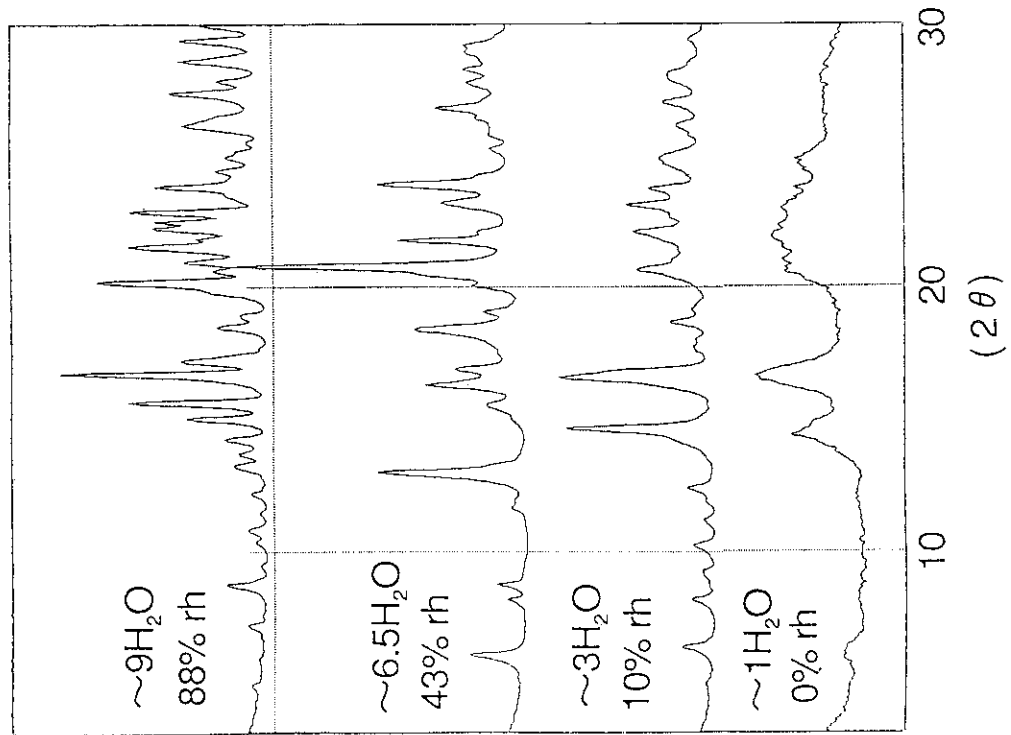
R 0.12



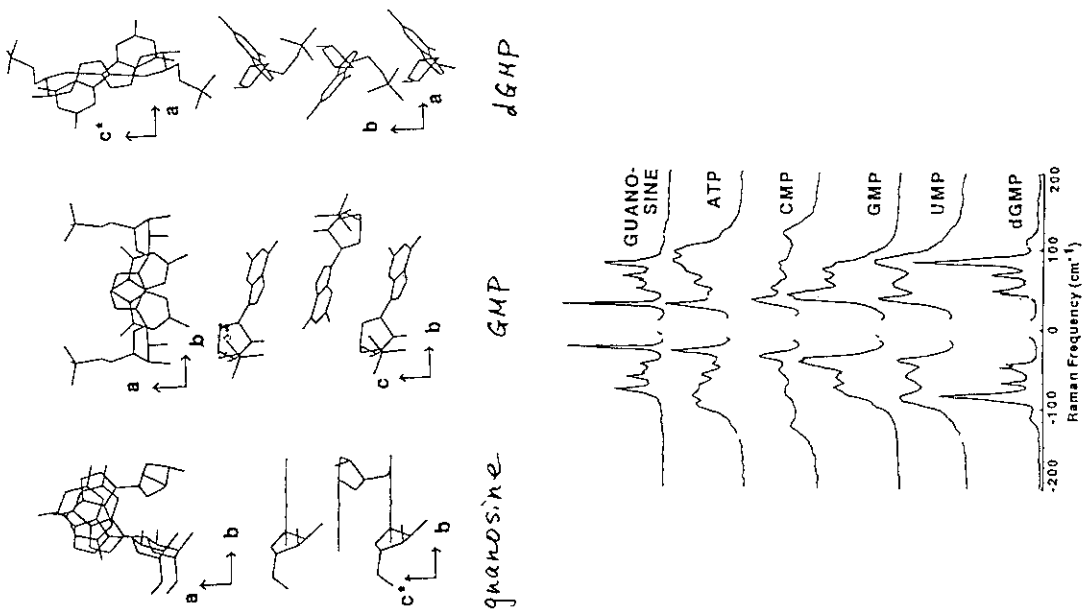
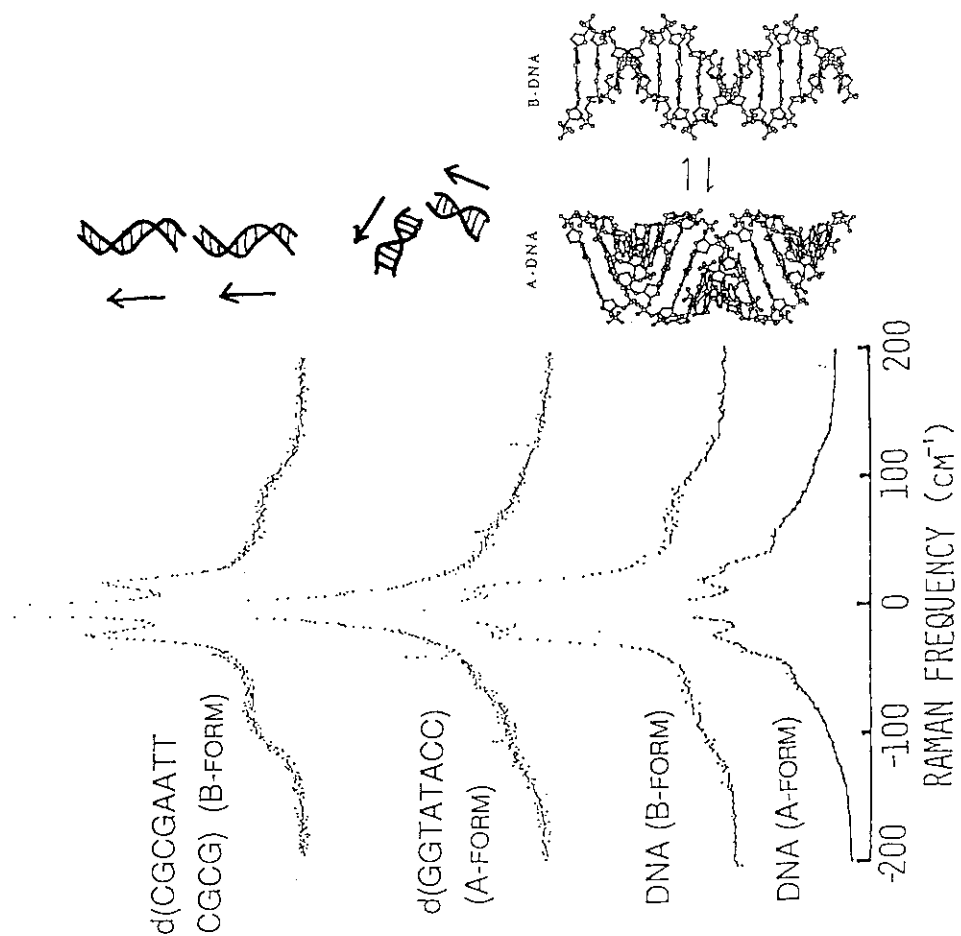
Raman Spectra of Na₂CMP
low frequency region

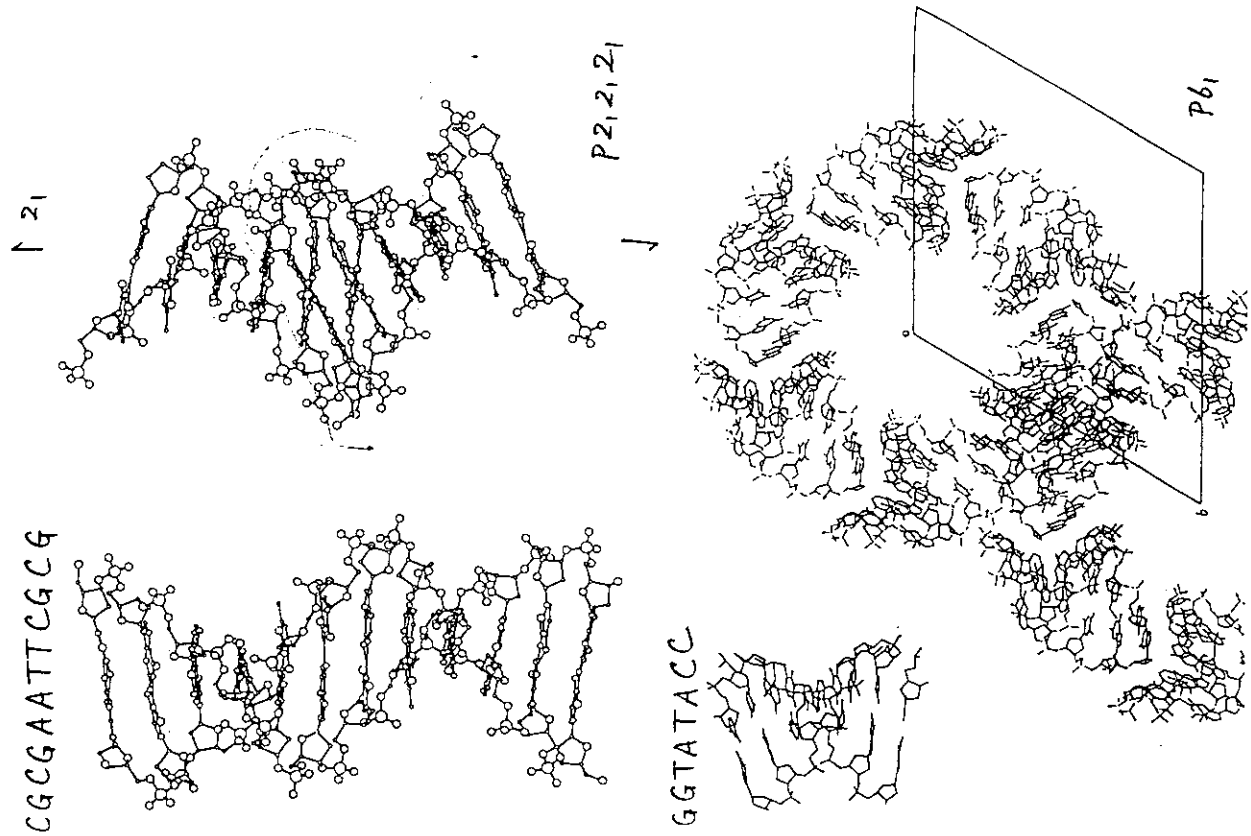


Powder diffraction patterns
Adsorption process



Weidlich *et al.*, 1988





S-mode

necessary

columnar or layered structure made of stacked bases

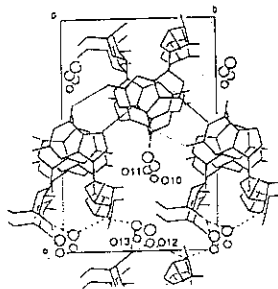
unnecessary

hydrogen bonds between bases

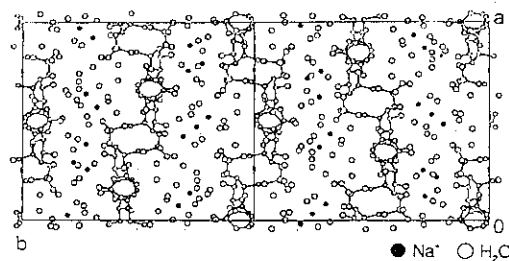
phosphate groups



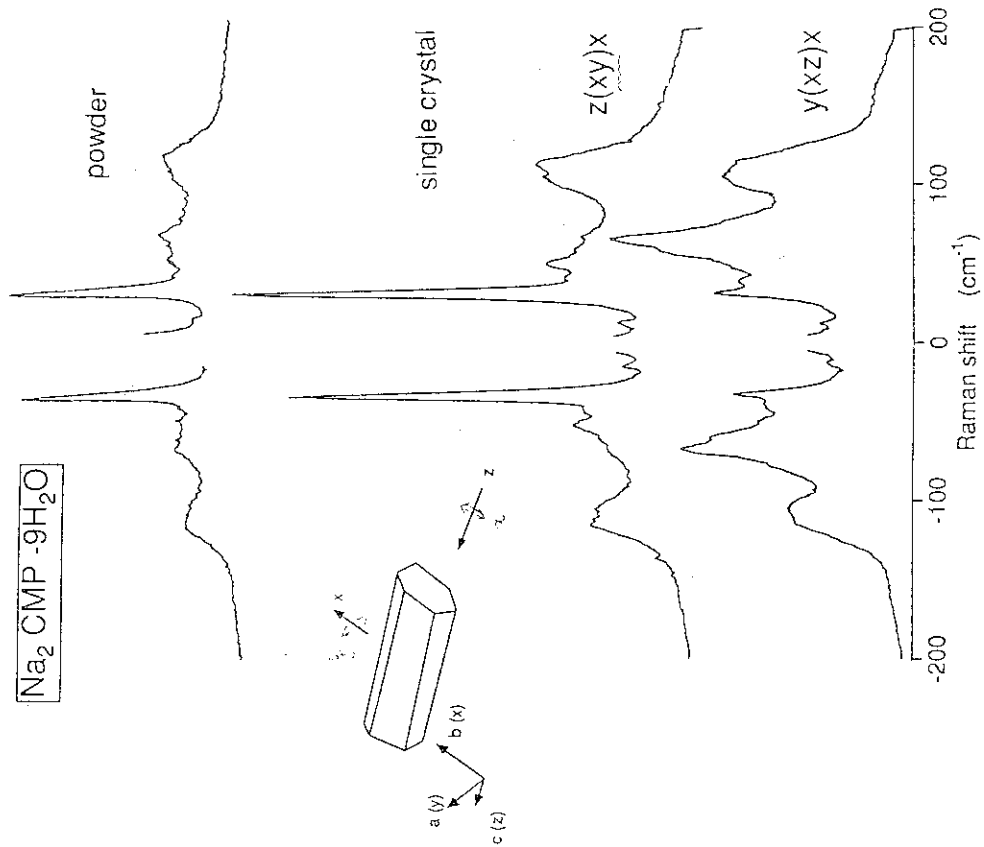
librational mode of stacked bases ?



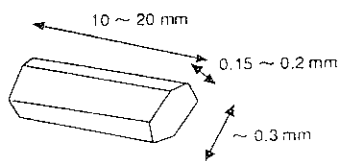
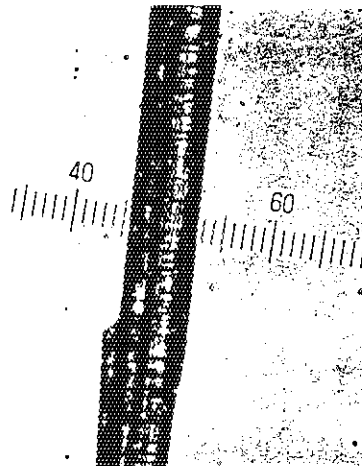
guanosine 2H₂O



Na₂CMP 9H₂O

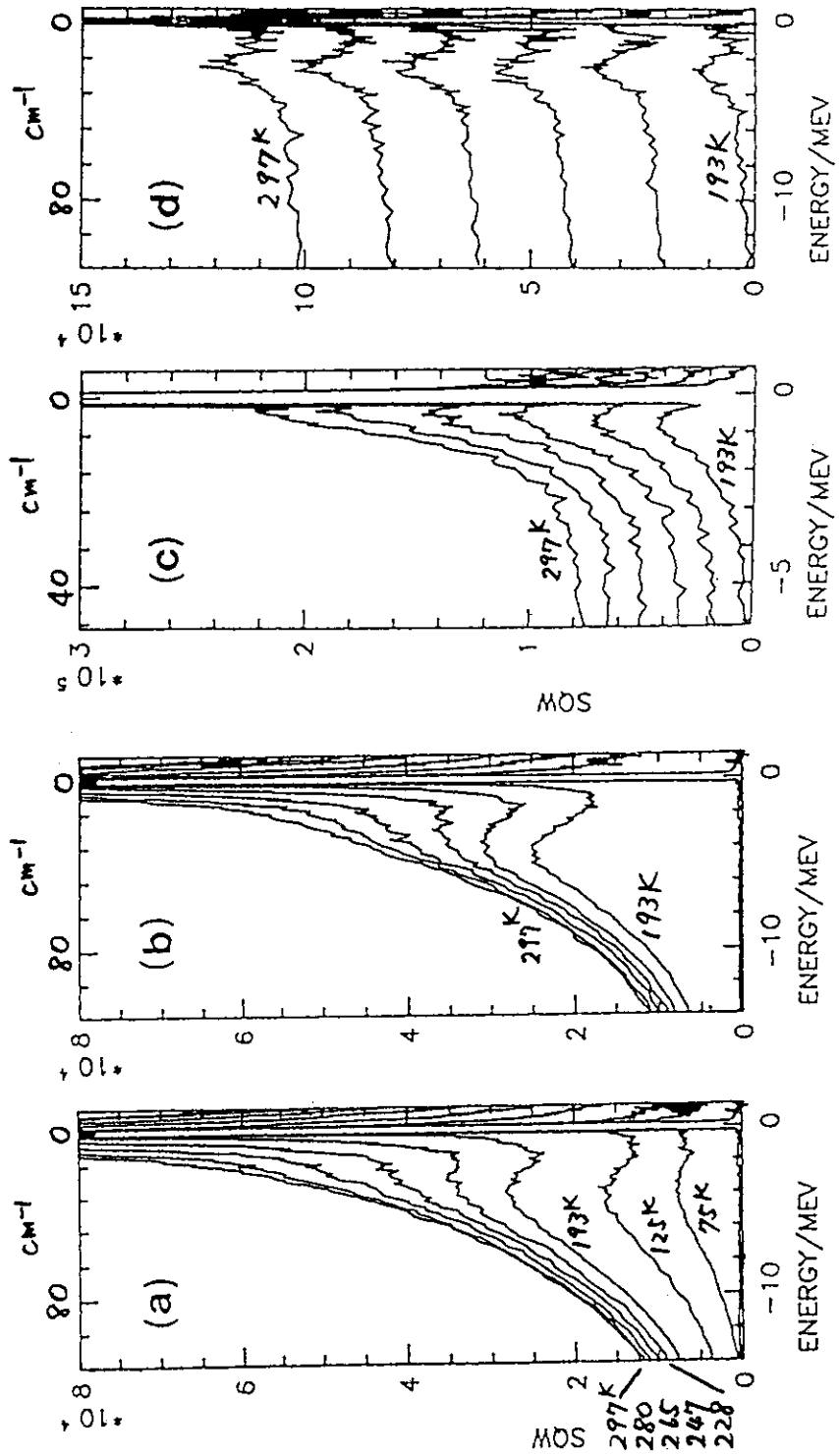


Crystals of Na₂CMP



Temperature dependence of time of flight spectra
 from oriented DNA (B-form; D2O, 75% r.h.)

Average of all detectors
 Orientation of the helical axis within (a) or
 perpendicular (b) to the scattering plane
 Detector group around $\Phi = 90$ (c) or $\Phi = 74$ (d).
 Intensity difference "within" - "prob"



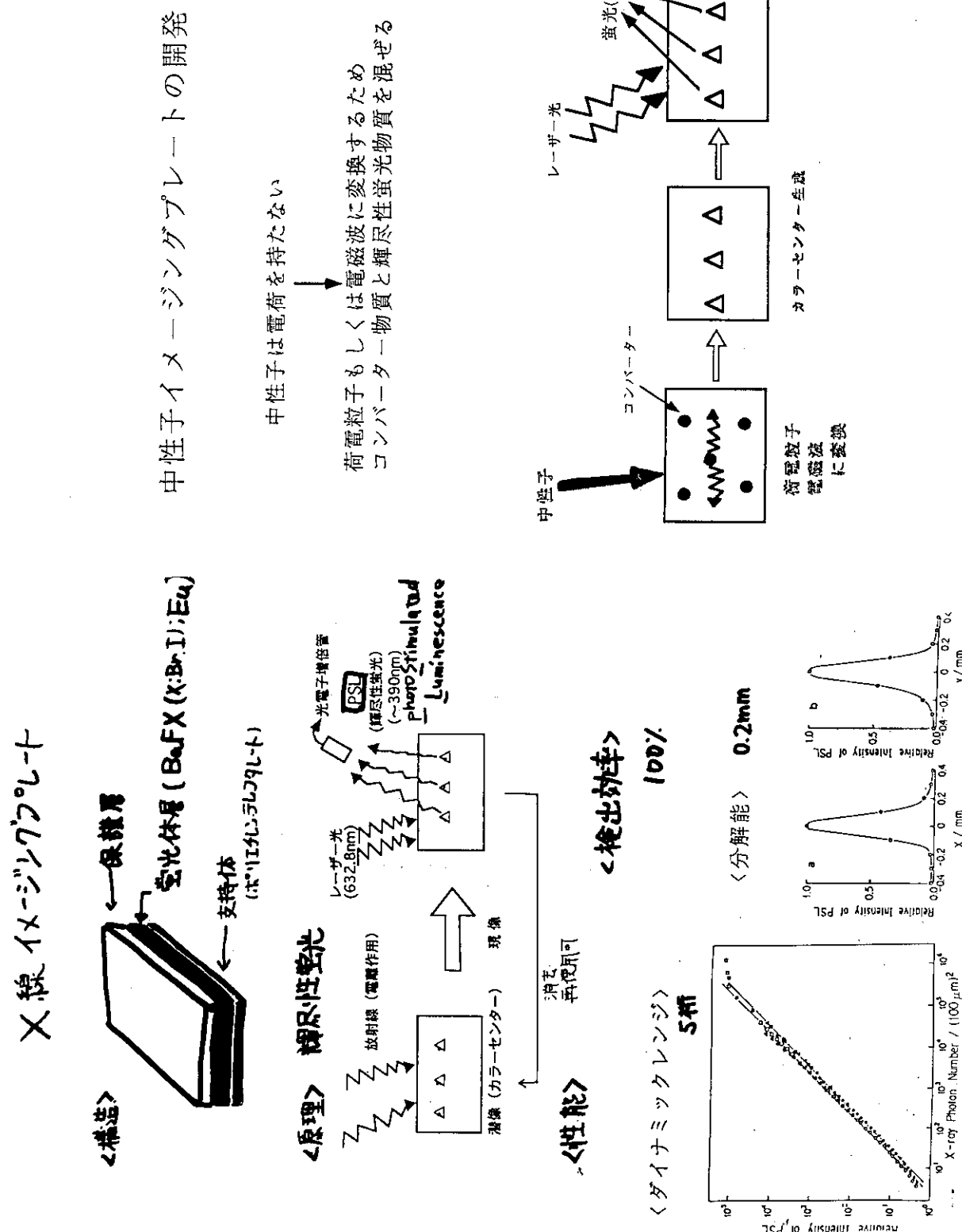
H. Grimm et al. ICNS '94

5. 中性子イメージングプレート

座長 原研アイソトープ部 石川 勇

5.1 現状

原研先端基礎研究センター 唐澤裕子

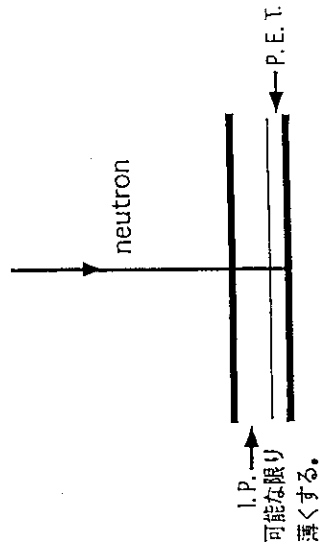
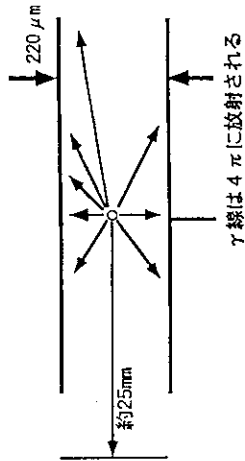


中性子検出に利用される核反応

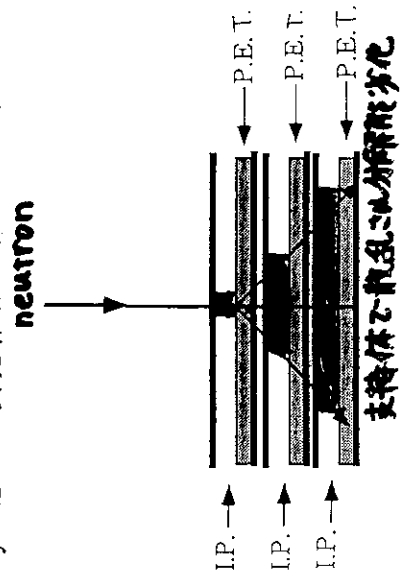
核反応	断面積 (バーン)	放射粒子エネルギー(MeV)	二次粒子の飛程
${}^6\text{Li}(n, \alpha){}^3\text{H}$	520	α : 2.05 ${}^3\text{H}$: 2.74	α : $7.1 \mu\text{m}$, ${}^3\text{H}$: $44.8 \mu\text{m}$
${}^{\text{nat}}\text{Gd}(n, \gamma)$	17000	γ : 0.3, 0.4, 1.2 もしくは内部転換電子 34keV, 74keV	25mm $e(34\text{keV})$: $5.6 \mu\text{m}$ $e(74\text{keV})$: $23.7 \mu\text{m}$
${}^{10}\text{B}(n, \alpha){}^7\text{Li}$	2100	α : 1.47 ${}^7\text{Li}$: 0.83	α : $5.3 \mu\text{m}$ 混合が困難
${}^3\text{He}(n, p){}^3\text{H}$	3000	p : 0.57 ${}^3\text{H}$: 0.20	ガスのため、混合が不可能

各Converterの特徴

${}^{\text{nat}}\text{Gd}$ efficiencyは良い 分解能は悪い → 蛍光体層を薄くする



${}^6\text{Li}$ efficiencyは悪い → 蛍光体層を厚くする (何枚か重ねる)



試作中性子イメージプレート特性

Converter	Material	Converter Molar ratio	Packing density (g/cm ³)	Thickness (μm)	Efficiency (%) (λ=1.0 Å)
^{nat} Gd	Gd ₂ O ₃	Ba:Gd=50:50	Gd ₂ O ₃ 1.58	85	31.6
			BaFX(X:Br,I) 2.06	130	44.0
^{nat} Gd	Gd ₂ O ₃	Ba:Gd=90:10	Gd ₂ O ₃ 0.28	85	6.5
			BaFX(X:Br,I) 3.27	130	9.8
^{nat} Li (Natural Avandance (7.4%))	LiF	Ba:Li=50:50	LiF 0.31	130	0.45
			BaFX(X:Br,I) 2.78	190	0.67
⁶ Li	Li ₂ CO ₃	Ba:Li=50:50	Li ₂ CO ₃ 0.39	190	0.67
⁶ Li	Li ₂ CO ₃	Ba:Li=50:50	BaFBrI 2.54	195	8.8

Size 20x40cm

^{nat}Gd

Ba:Gd=50:50

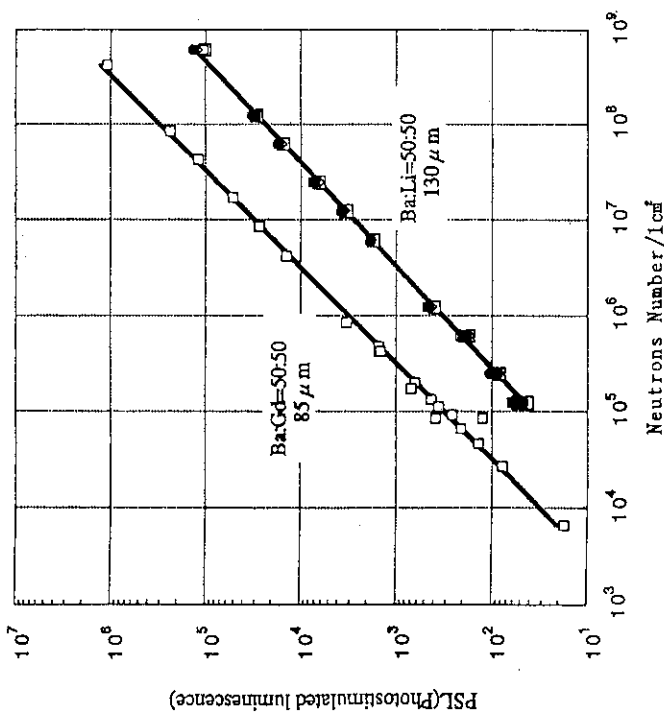
195 μm

82% (λ=1.0 Å)

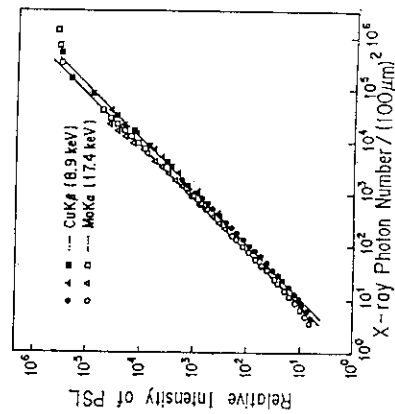
92% (λ=1.174 Å)

(PSD ≈ 90%)

9イオンイメージプレート
Neutron Imaging Plate

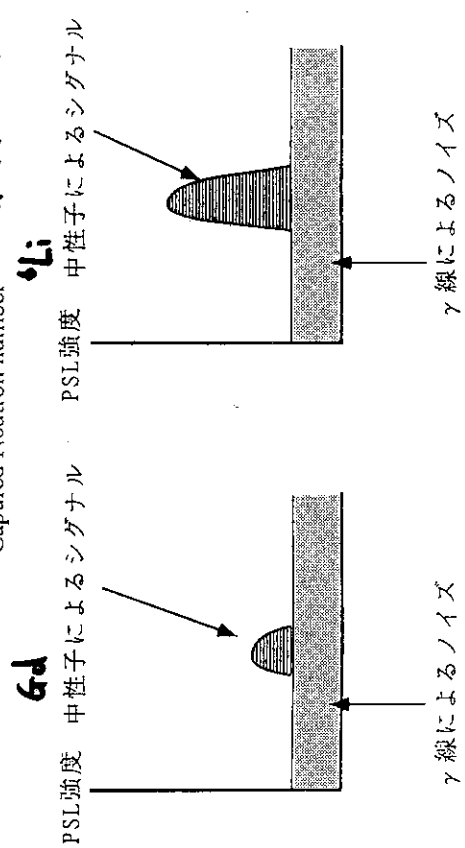
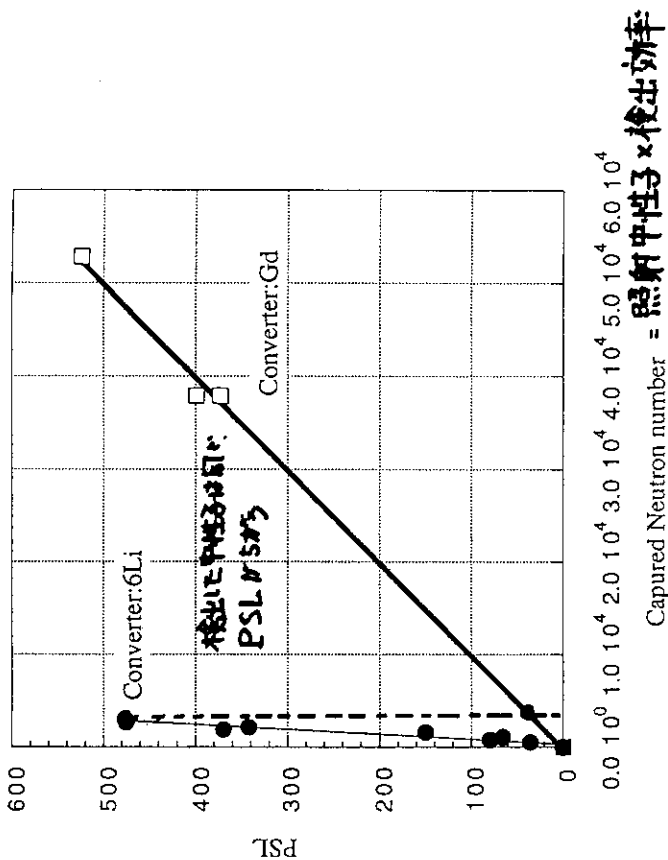


5桁

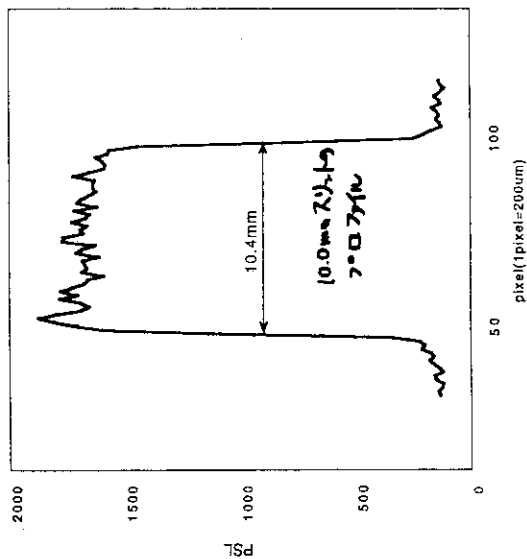


9イオンイメージプレート・5桁
(X線I.P.と同様)

コンバーターによる違い

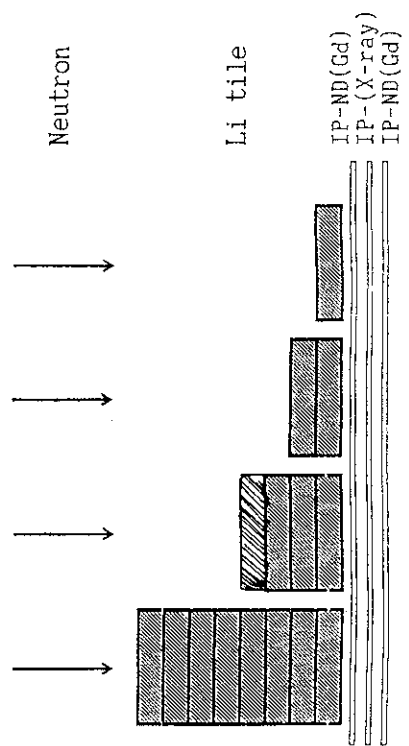
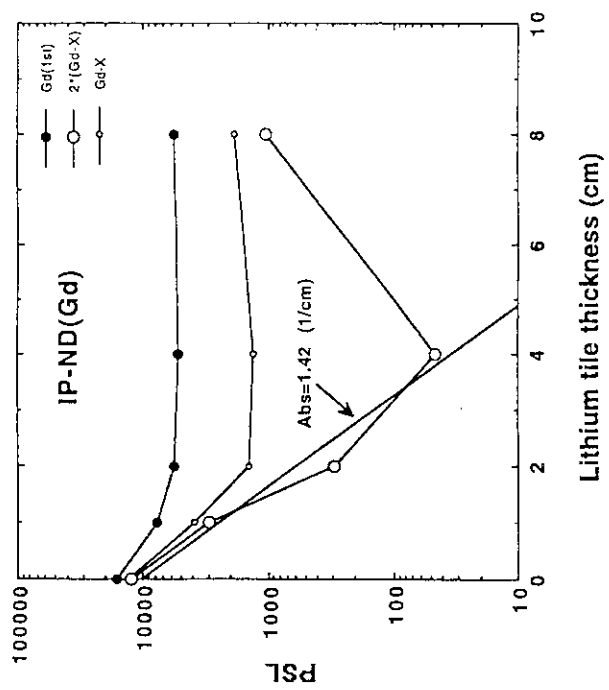
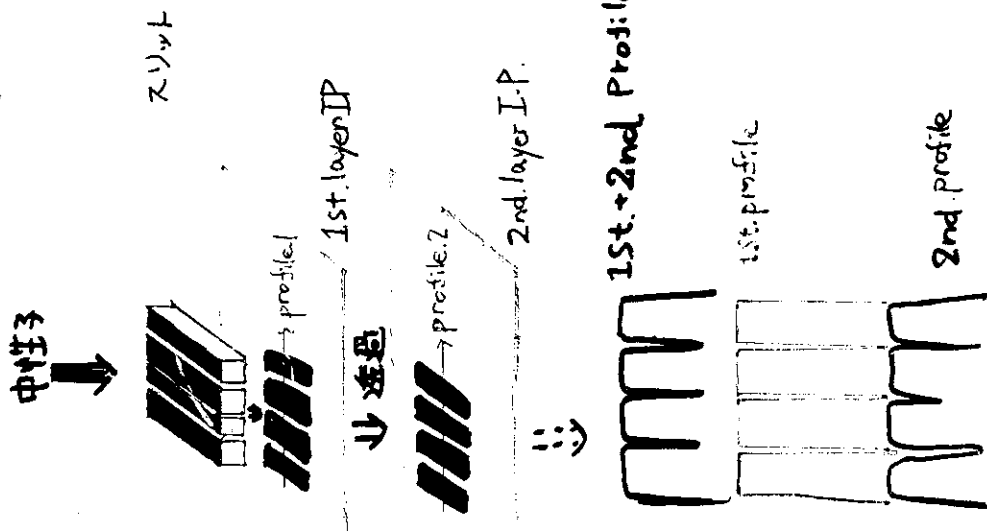


分解能



入射中性子の広がり
読み取りの pixel サイズ (0.2mm)
↓
0.2mm 以下

多重フィルム法



今後の課題

↑ 弱中性子側をいかに測定できるか？

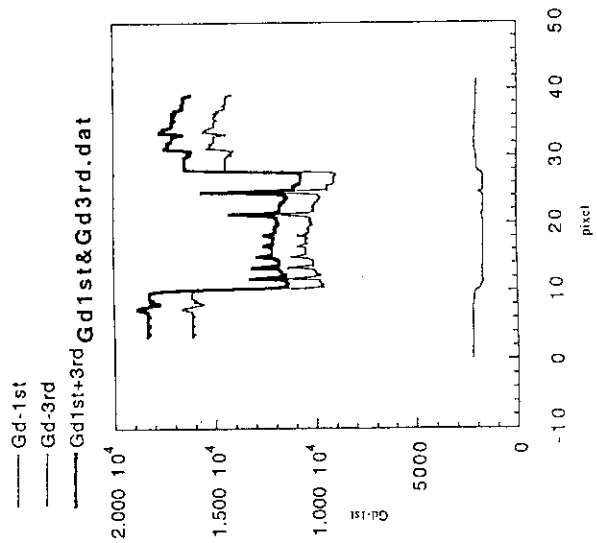
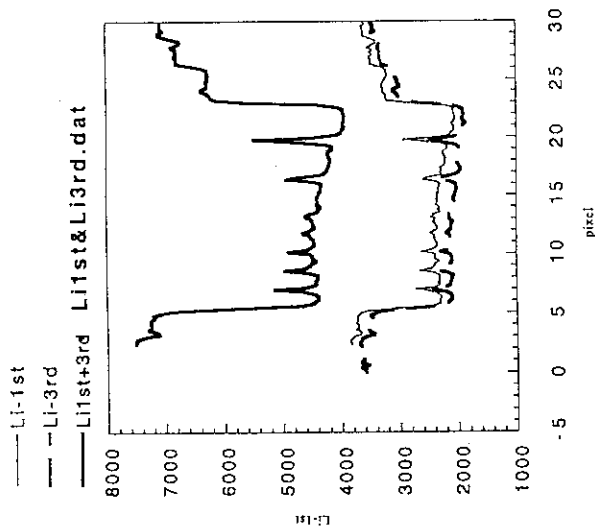
1. 検出効率を上げる

コンバーターの比率を増やす
蛍光体層を厚くする

2. γ 線の対策

遮蔽効率を上げる
多重フィルム法 (X線イメージングプレート使用) によるデータの補正
新しいPSL物質の開発
 γ 線を感じにくい軽元素の物質

3. ^{10}B コンバーターの開発



Eu の放射化による影響
(半減期~9時間)

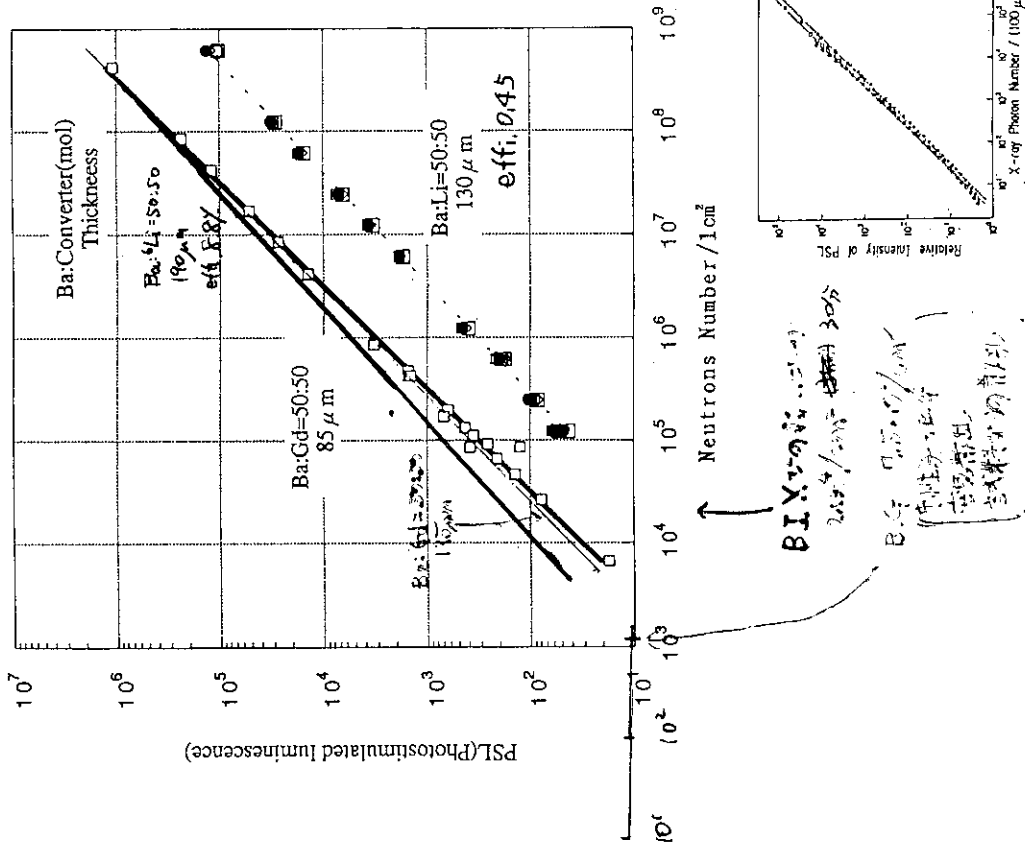
1. 目的

- (1) 放射化Eu から放出されるβ線によって PSL は生成されるか
- (2) そのPSL はどの程度実験に影響するか

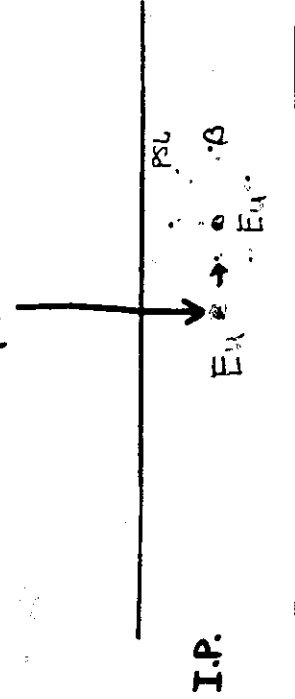
2. 実験

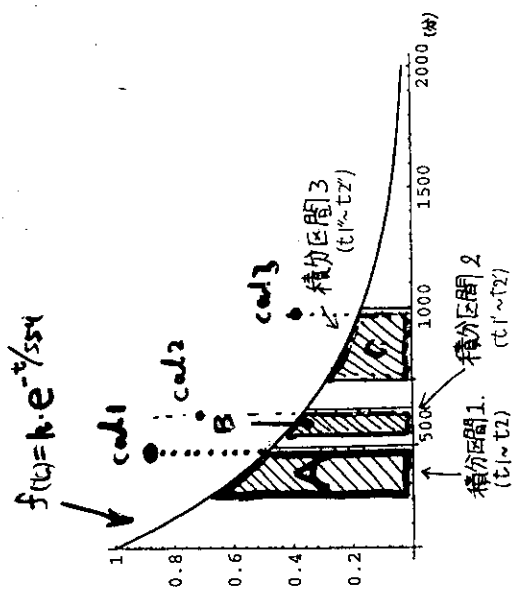
- (3) 中性子をX線用IPに照射し、放射化Euを作る
- (4) 放射化Eu によるPSL の経時変化を追う

Neutron Imaging Plate



中性子





名々の積分値と時間 t の関係

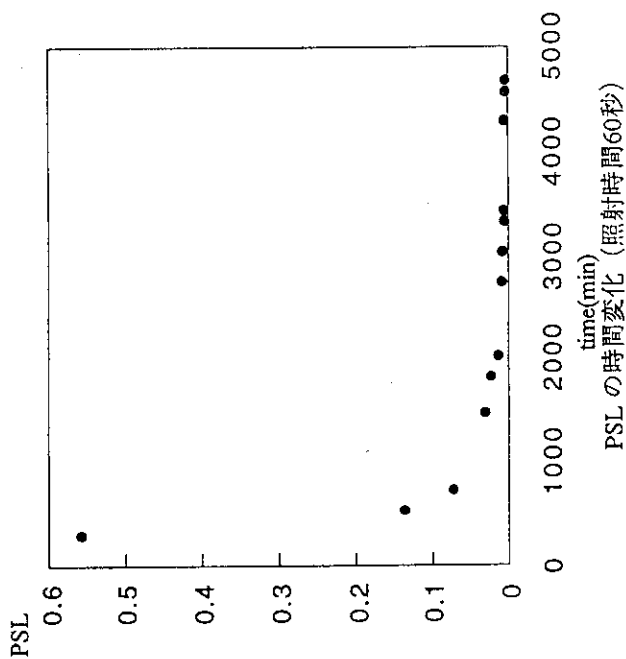
$$cal1 = A / (t2 - t1)$$

$$cal2 = B / (t2' - t1')$$

$$cal3 = C / (t2'' - t1'')$$



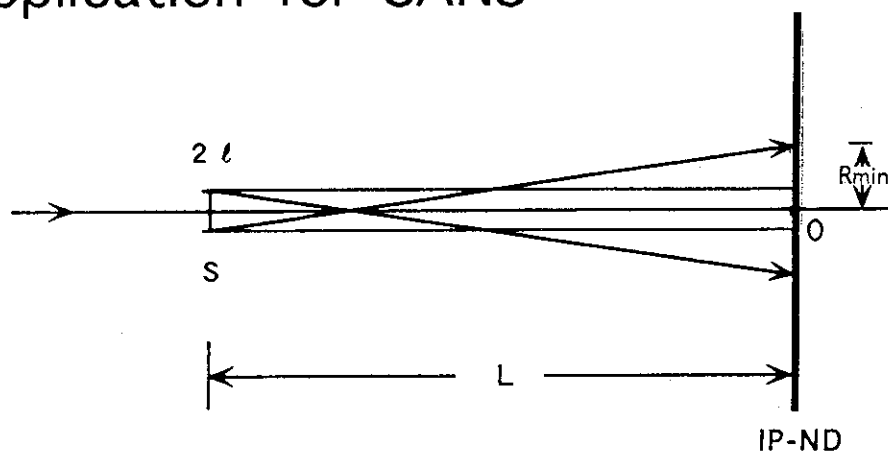
実験時間の流れ



5.2 応用例 その1

原研先端基礎研究センター 新村信雄

Application for SANS



Q-range

Incident Beam Divergence : $\Delta\theta$

Scattering Angle : ϕ

Wavelength : λ

$$\tan(\Delta\theta) = \left(\frac{R_{\min} + \ell}{L} \right)$$

$$Q_{\min} = \left(\frac{2\pi\phi}{\lambda} \right) \quad \text{where} \quad \tan\phi = \left(\frac{R_{\min}}{L} \right)$$

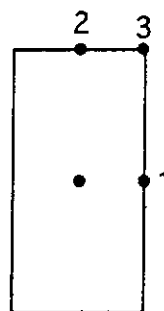
if $\Delta\theta = 0.3^\circ$, $2\ell = 5\text{ mm}$, $L = 2,000\text{ mm}$, $\lambda = 3\text{ \AA}$

$$Q_{\min} = 8.3 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$$

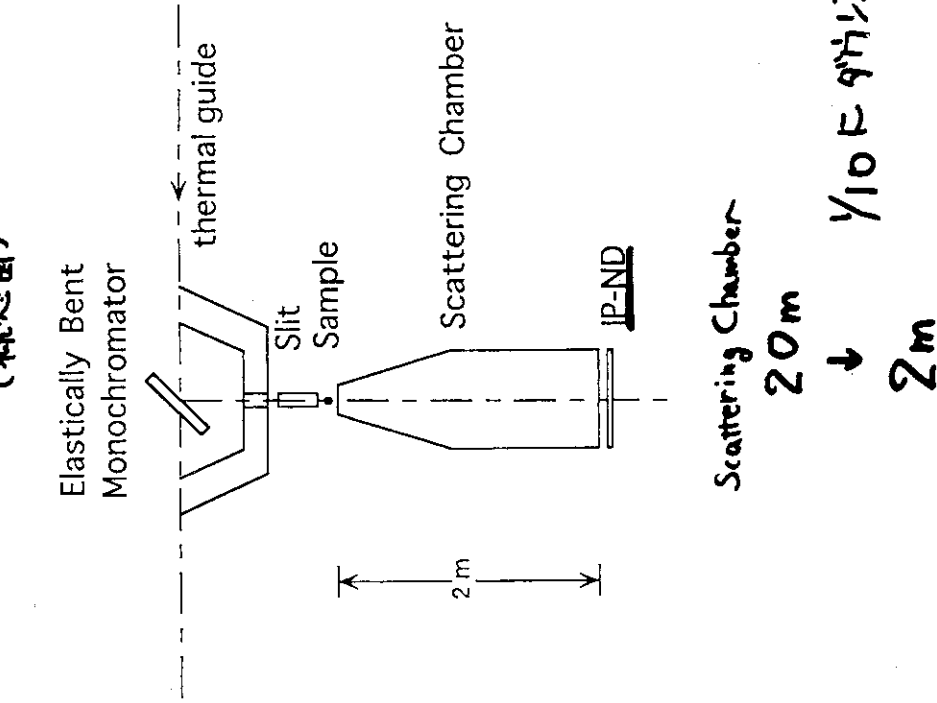
$$(Q_{\max})_1 = 0.21 \text{ \AA}^{-1}$$

$$(Q_{\max})_2 = 0.41 \text{ \AA}^{-1}$$

$$(Q_{\max})_3 = 0.46 \text{ \AA}^{-1}$$



熱中性子小角散乱装置
(概念図)



Q-resolution

$$\left(\frac{\Delta Q}{Q}\right)^2 = \left(\frac{\Delta\phi}{\phi}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right)^2$$

$\frac{\Delta\lambda}{\lambda}$: when an elastically bent Si is used, : ~0.01

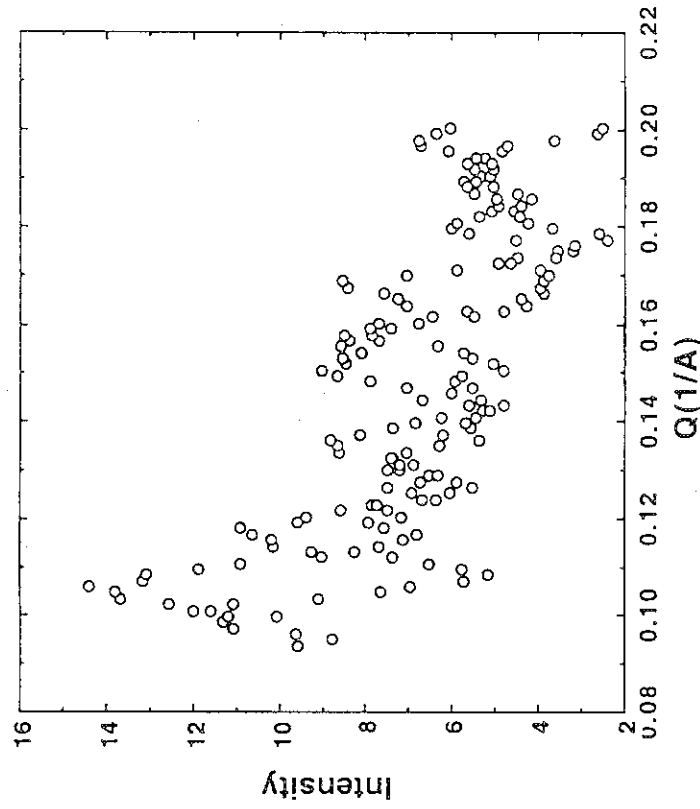
at $\lambda = 3 \text{ \AA}$, Si (111)

negligibly small compared with other terms.

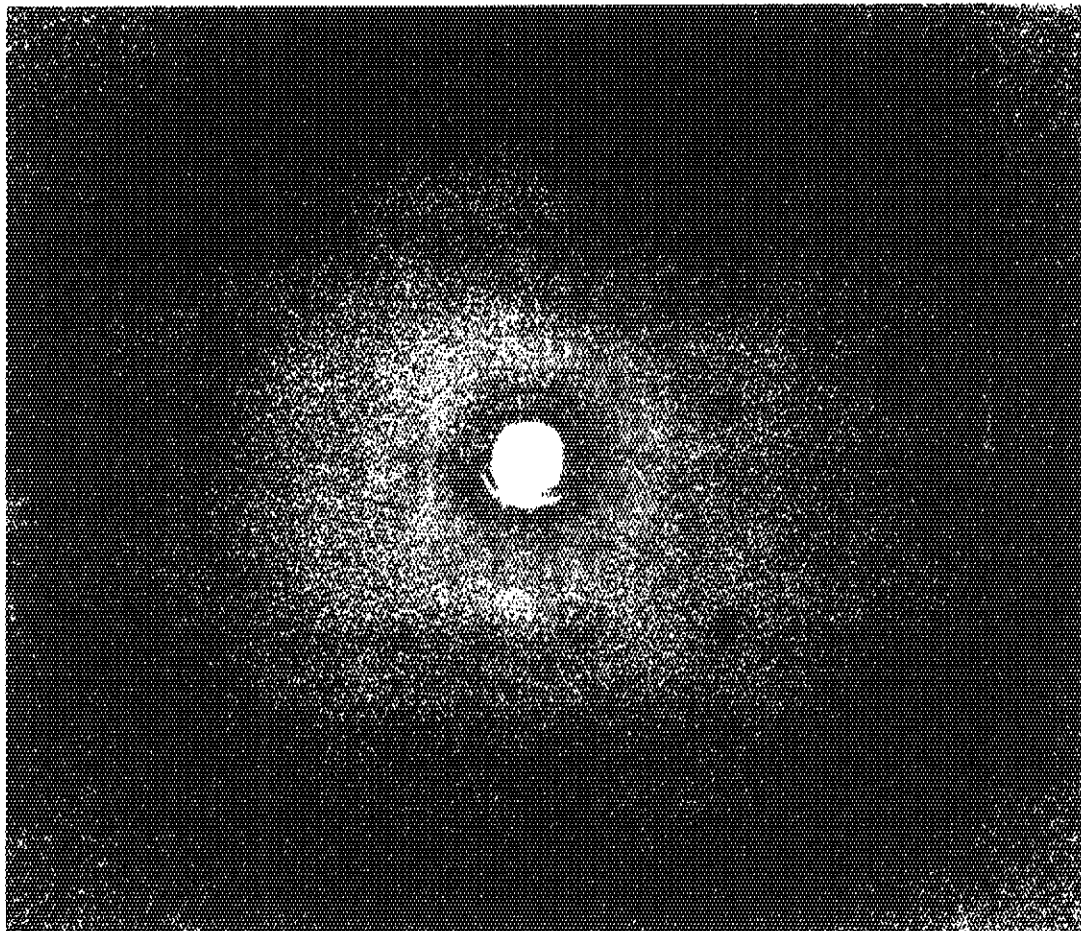
$$\frac{\Delta Q}{Q} \sim \frac{\Delta\phi}{\phi} \sim \text{incident beam divergence}$$

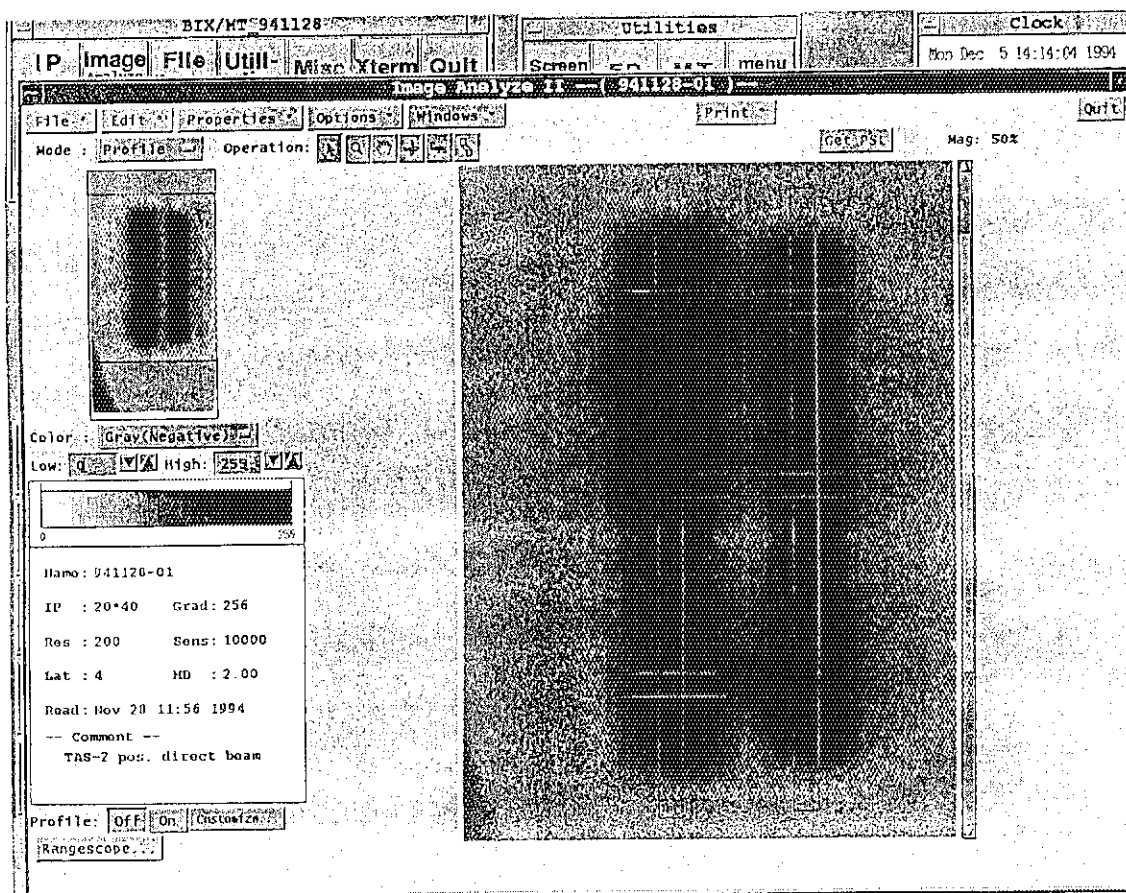
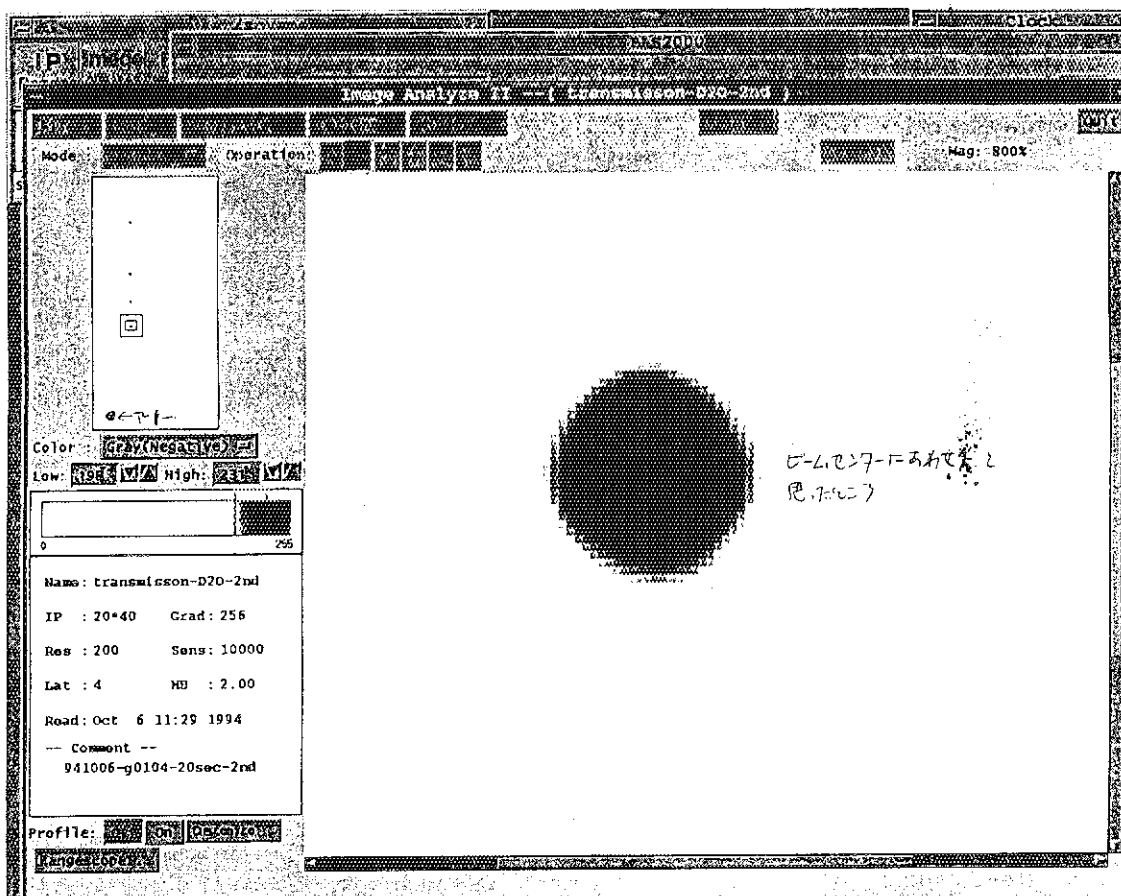
at $Q_{\min} = 8.3 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$, $\frac{\Delta Q}{Q} = 30\%$

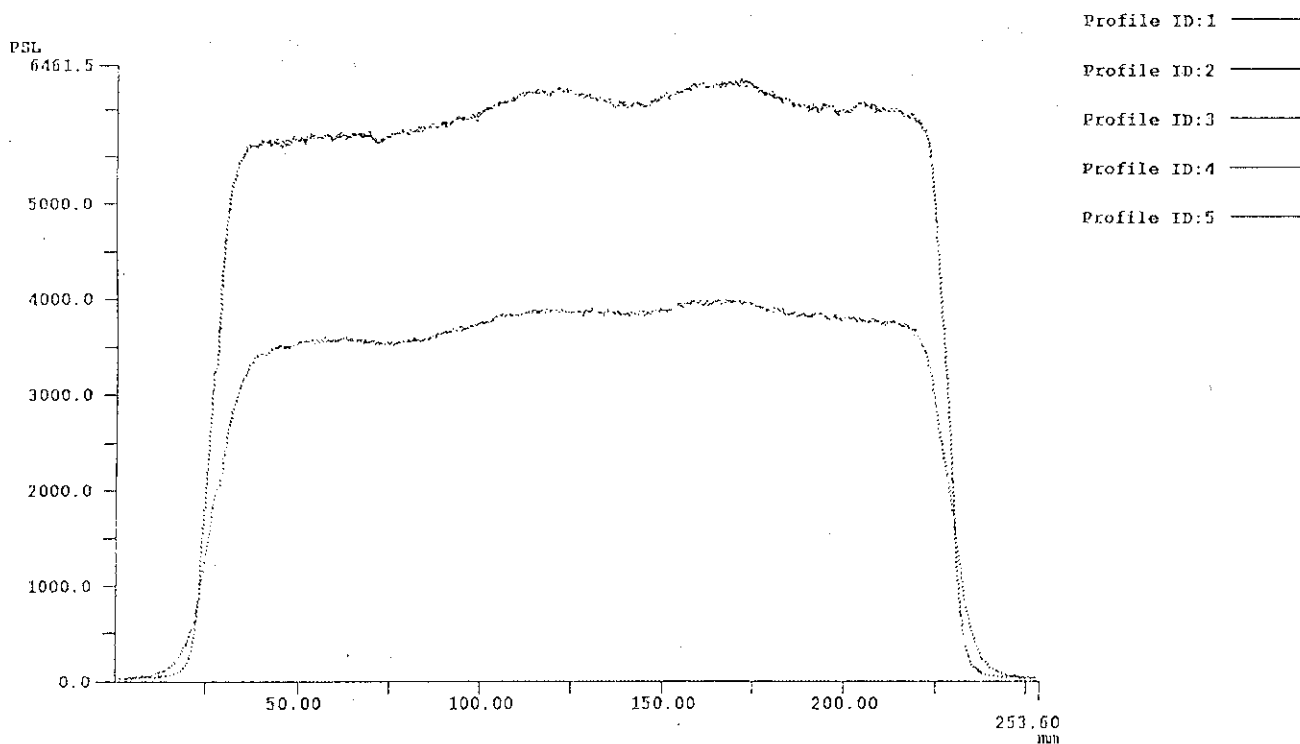
at $Q = 8.0 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$, $\frac{\Delta Q}{Q} = 3\%$



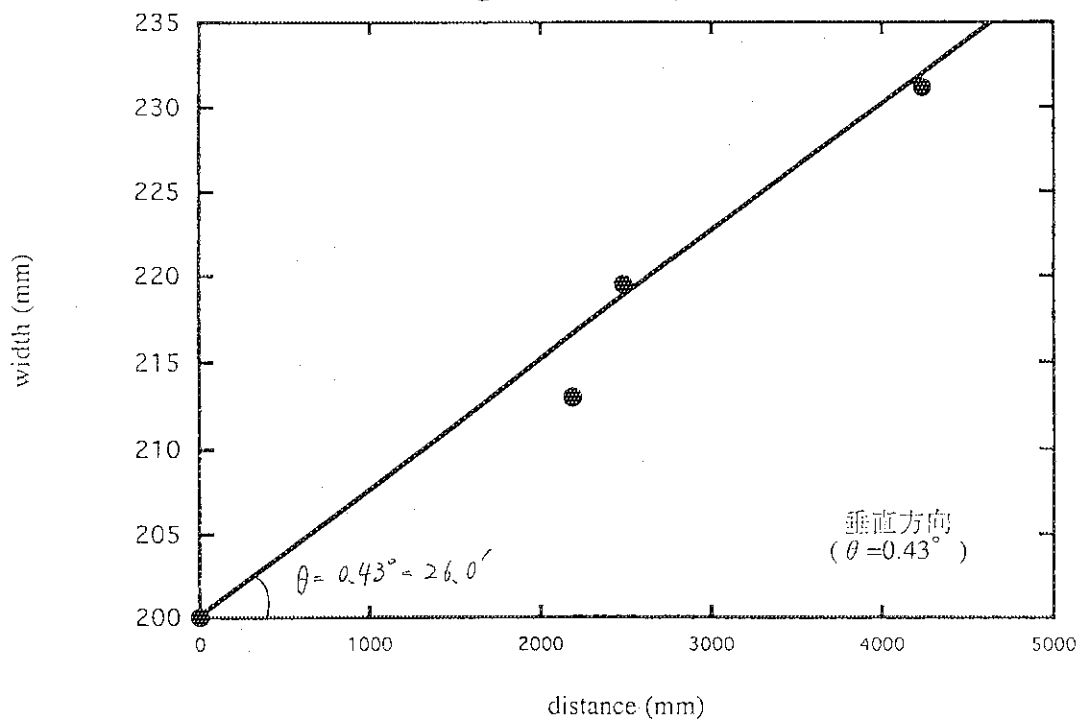
Comment: lyso-sol 2hrs
P: 20°40 Grad: 256 Res: 200 Sens: 10000 Lat: 4 Read: Feb 17 16:24 1995
Width: 193.5mm Height: 226.4mm Mag: 100%



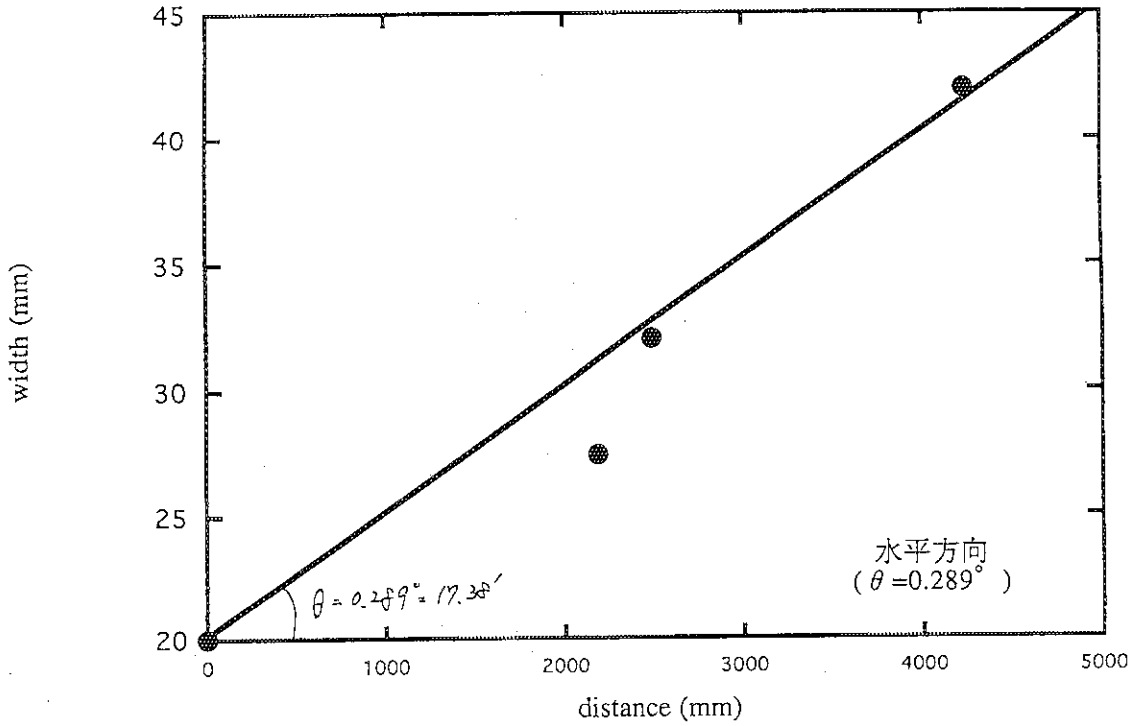




guide beam-profile



guide beam-profile



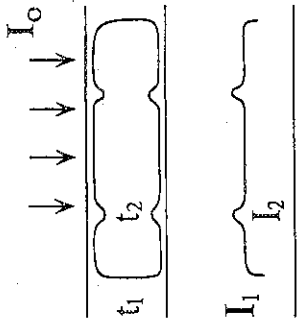
透過強度 $I = I_0 \exp(-N\sigma t)$

$N\sigma$: 吸収係数、(水: 5.55 cm^{-1} 、タンパク質: 3.84 cm^{-1} 、
脂質: 6.18 cm^{-1})

t : 厚さ (Cell $\sim 5 \text{ cm}^{-1}$)

$N\sigma \sim$ 一定

t : 変数



$$T \geq \frac{\sqrt{I_2} + \sqrt{I_1}}{\Delta \cdot I_0 \cdot (I_2 - I_1)}$$

I_0 : $10^8 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$

t_1 : 20mm (16mm)

t_2 : 15mm

Δ : 1%

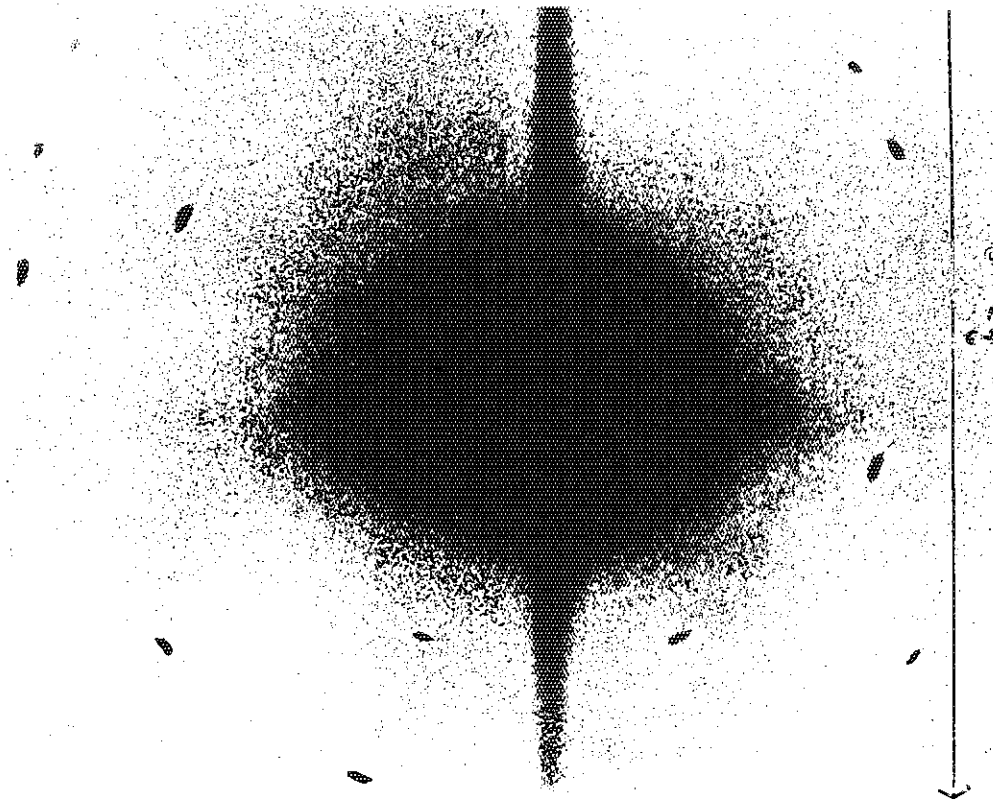
1mm分解能

検出効率100%

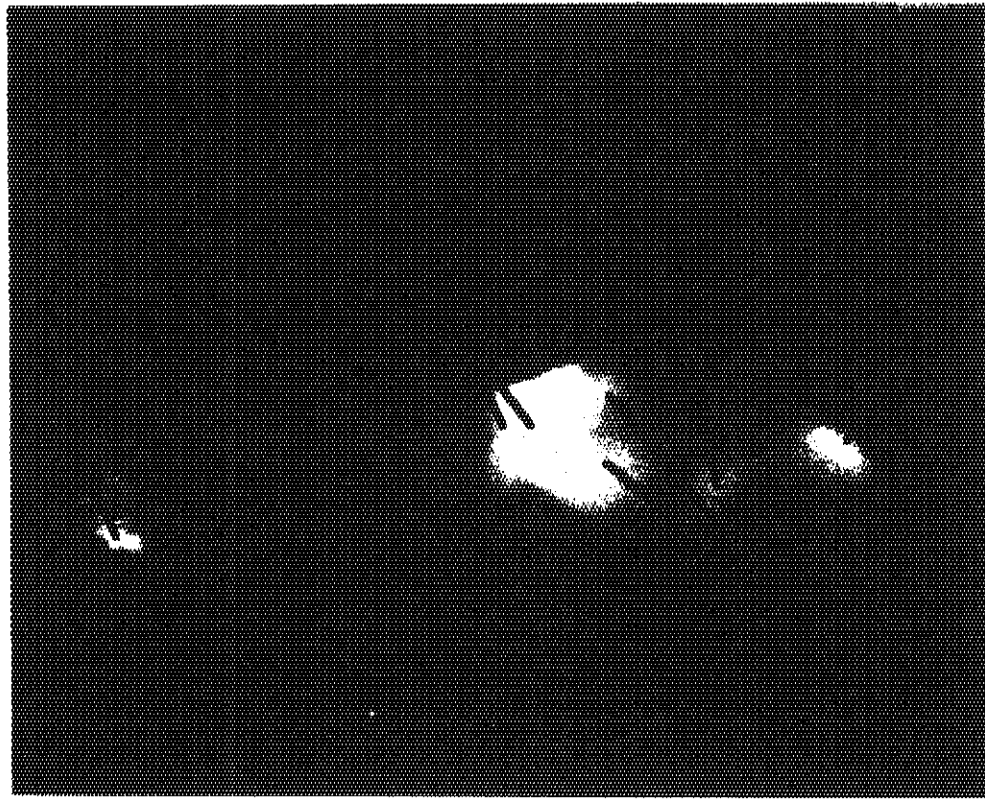
$\sim 0.4 \text{ sec}$
($\sim 190 \text{ sec}$)

ans : D20-lhr-q0104
omment : 941002-145SDshieldlhr
P:20*40 Grad:256 Res:200 Sens:10000 Lat:4 Read:Oct 3 12:19 1994
idth:204.0mm Height:276.0mm Mag:100%

中性子検出器



950126-03-121eq
mouse-100sec-1st4
Grad:1024 Res:100 Sens:400 Lat:4 Read:Jan 26 15:24 1995
2.0mm Height:118.4mm Mag:200%



5.3 応用例 その2

原研研究炉部 曾山和彦

マルチキャピラリーファイバーを用いた
中性子レンズ集束実験への中性子IPの応用

日本原子力研究所

○曾山和彦 鈴木正年 皆川宣明 古平恒夫

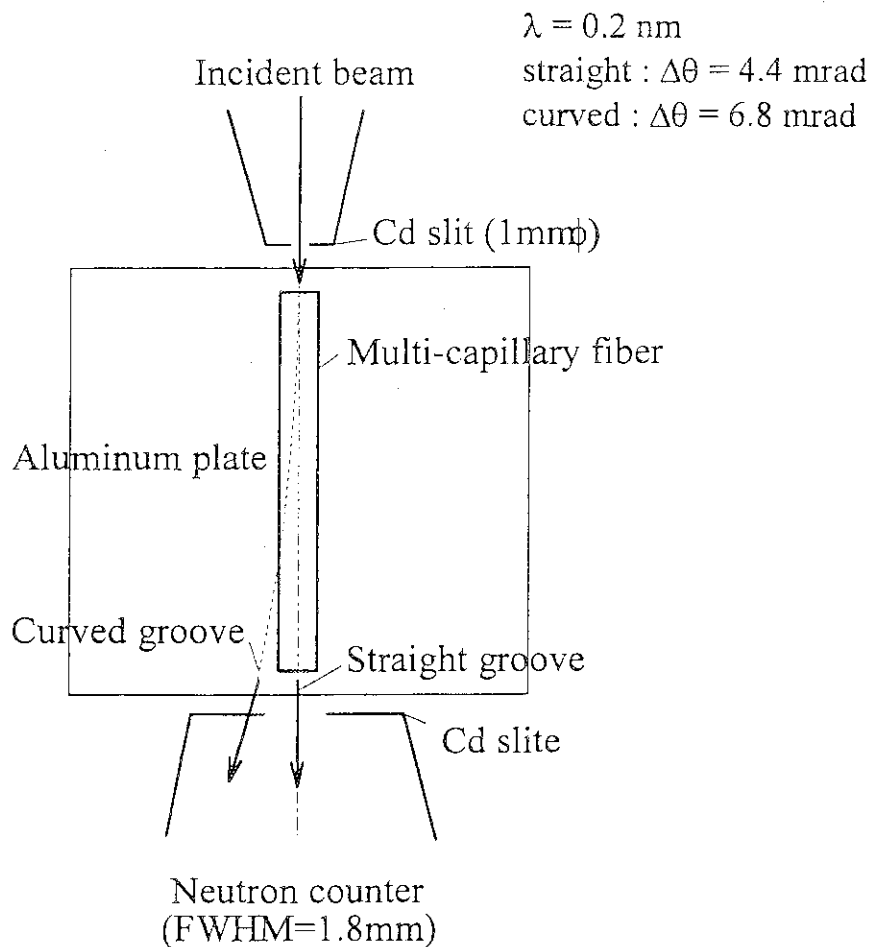
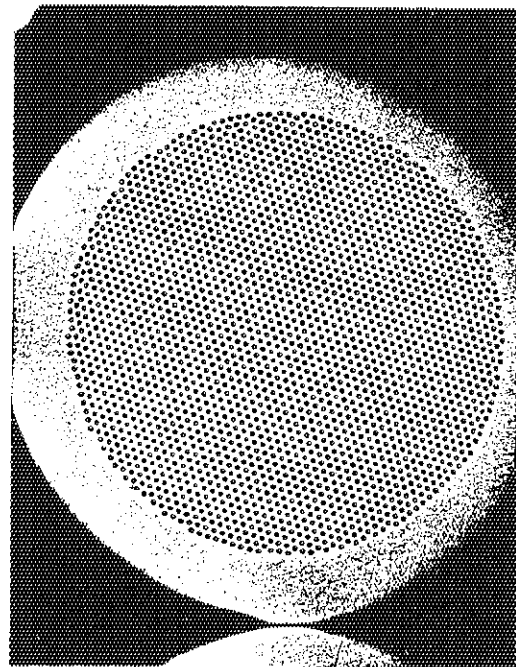
実験目的

中性子ビームをサブmm領域に集束させる技術開発の一環として、マルチキャピラリーファイバーを用いた中性子レンズを設計・製作および集束特性測定を行い、その性能を確認する。

これをもとに、即発 γ 線放射化分析での2次元微量元素分布測定、中性子顕微鏡などの分野で中性子ビーム利用の新たな展開を図る。

マルチキャピラリーファイバーの仕様

Channel diameter	15 μ m
Channel pitch	24 μ m
Open area ratio	43%
Outer diameter	1.2mm
Effective diameter	1.0mm
Materials	SiO ₂



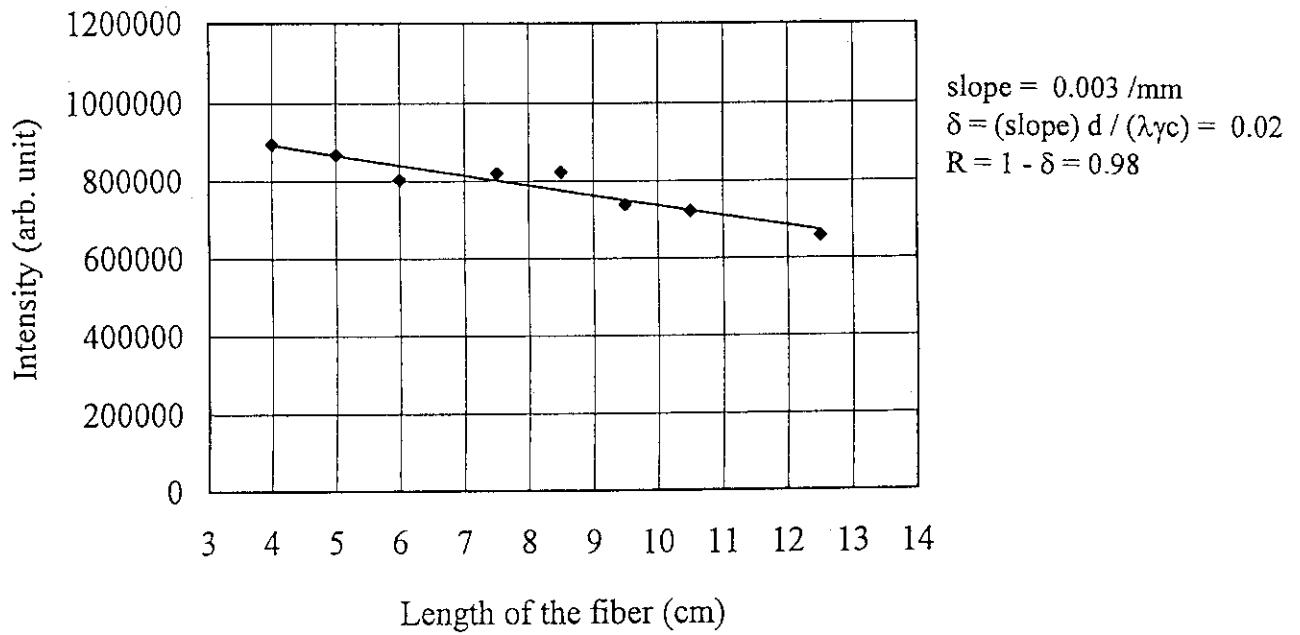


図 マルチキャピラリーファイバーの中性子輸送特性

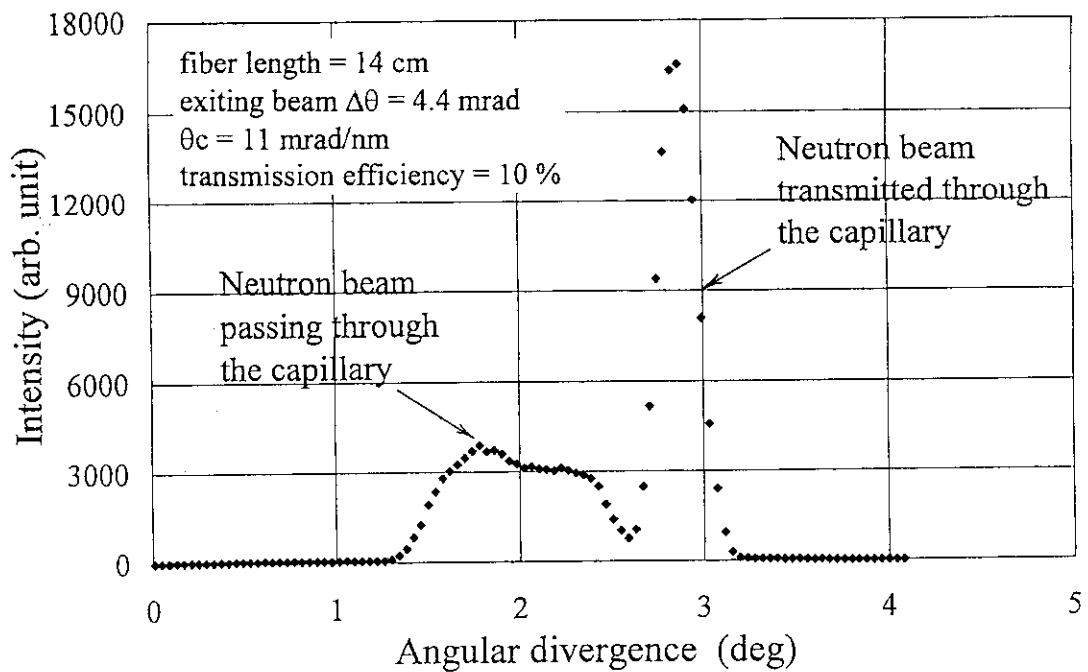
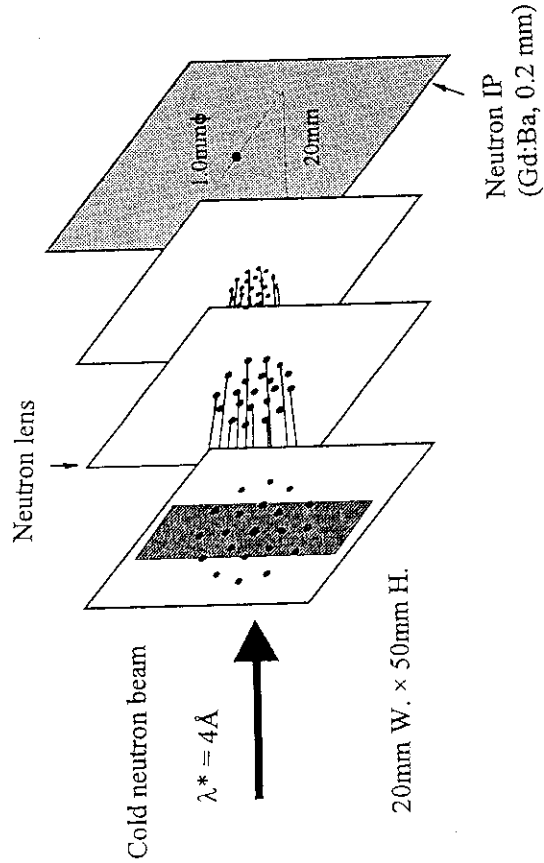


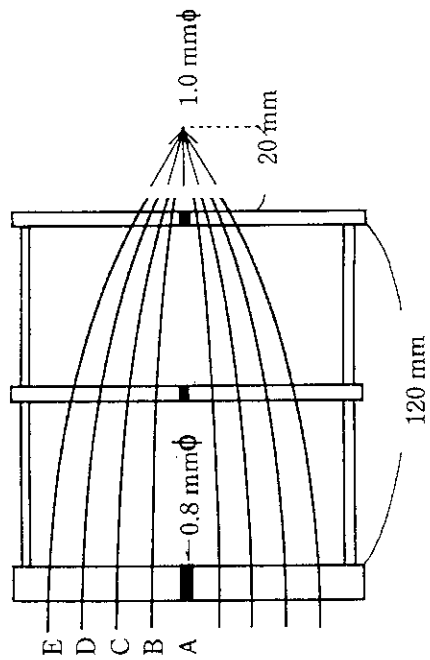
図 湾曲ファイバーの水平方向中性子束分布

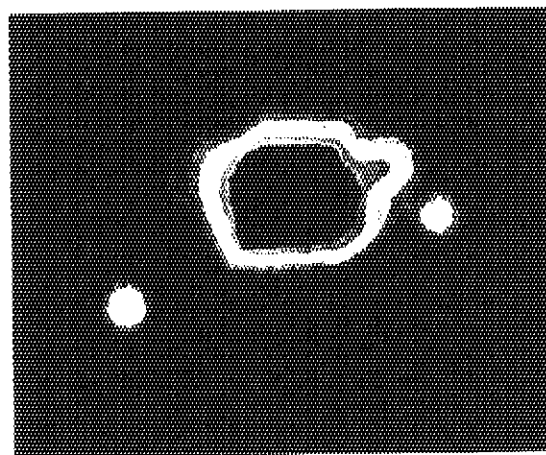
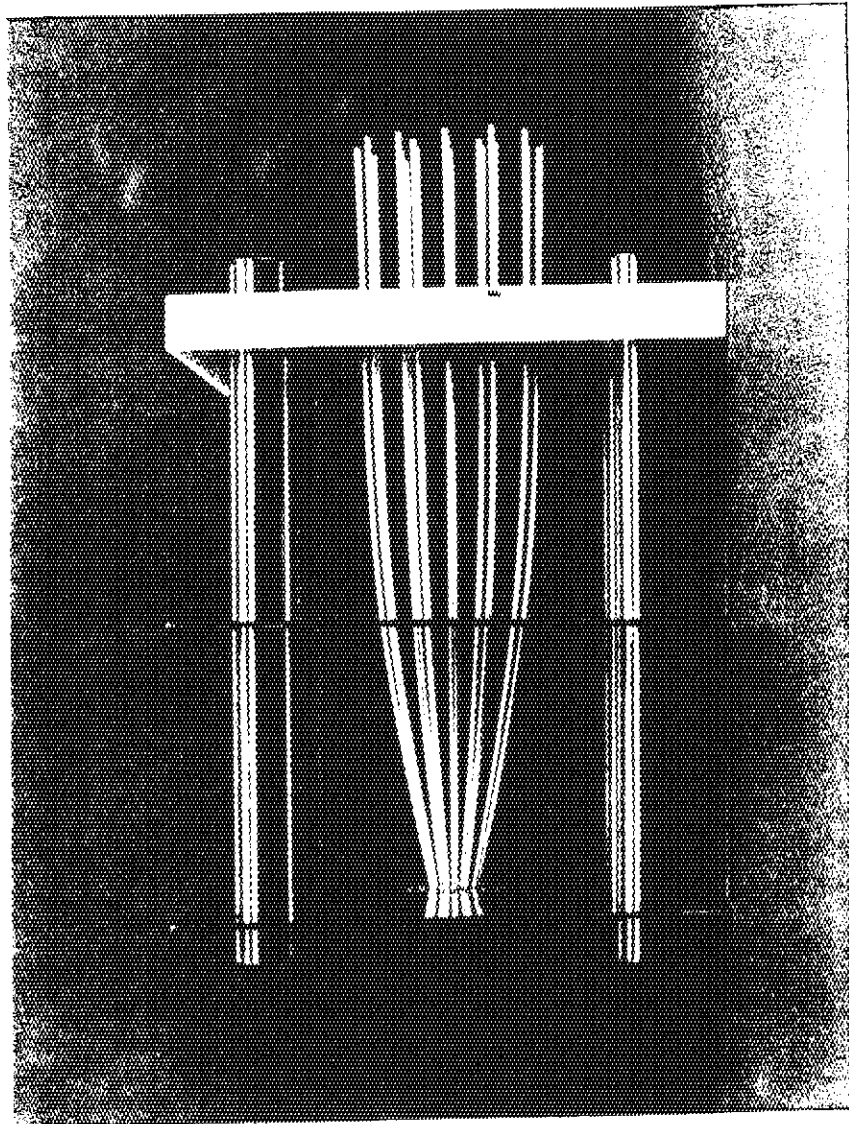
マルチキャピラリーファイバーを用いた
中性子レンズの設計仕様

Ring name	A	B	C	D	E
The number of fibers	pin hole	8	12	16	20
Characteristic wave length (Å)	(4.0)	4.0	5.5	7.0	8.0
Radius of curvature (cm)	-	105.2	55.6	34.4	26.3
Focusing efficiency	0.84	0.88	0.95	0.64	0.56



中性子レンズの集束実験体系





1.0 mm
└──┘

中性子IPによる中性子レンズの集束像

まとめ

- マルチキャピラリーファイバーを用いた中性子レンズの設計、製作および集束特性実験を行い、集束像を中性子IPを用いて観察し、本中性子レンズが実用化への可能性を確認した。
- 集束実験において中性子IPが2次元検出器として、非常に有効であることを確認した。

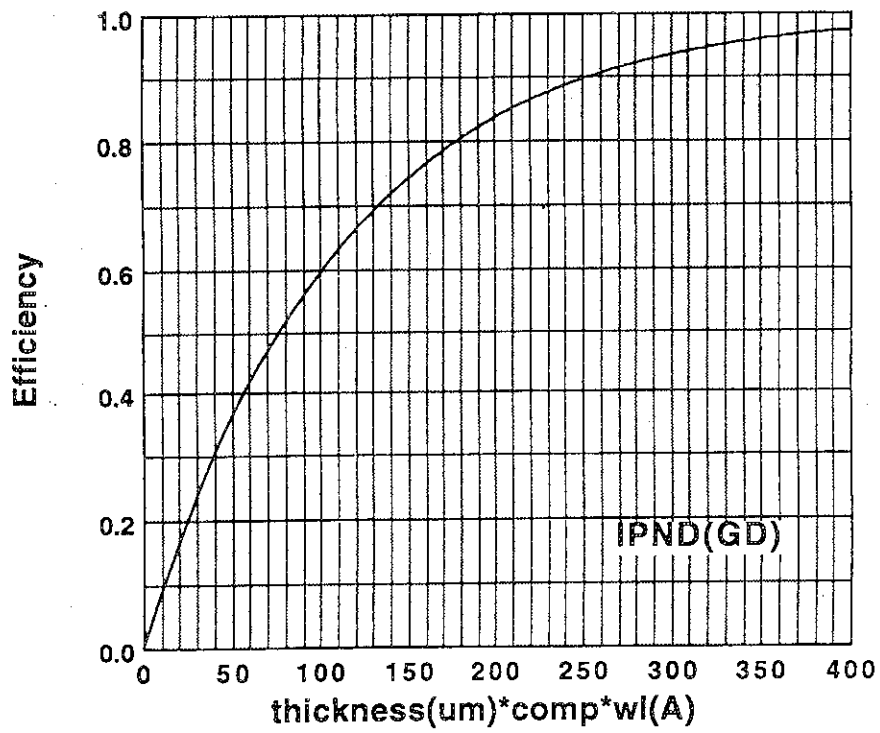
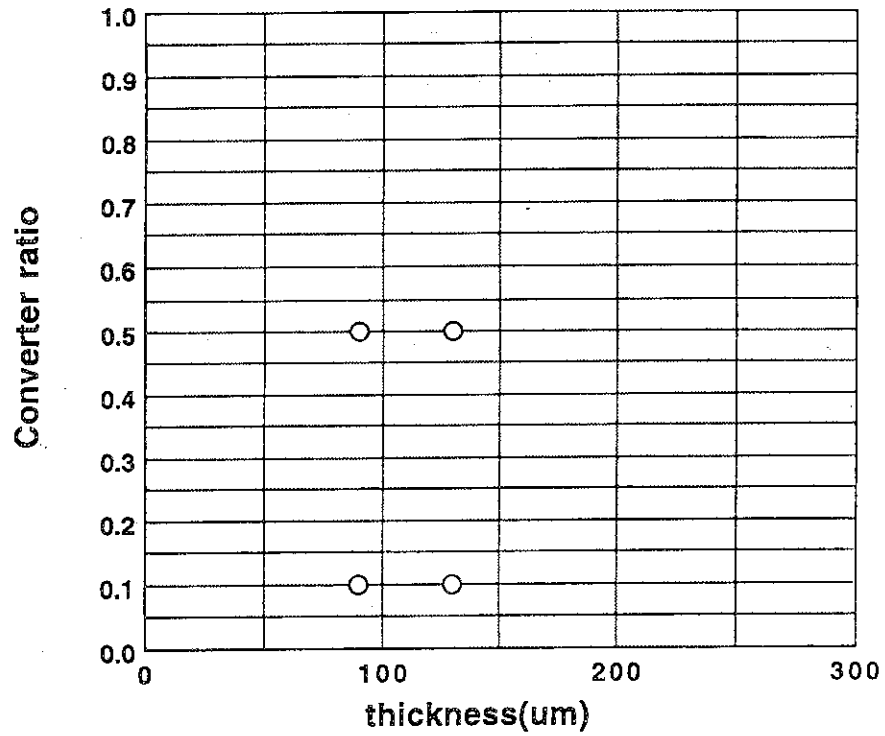
課題

中性子集束効率の測定

- 中性子IPの波長依存検出効率
- γ 線に対する感度
- γ 線を感知しない中性子IPの開発

5.4 原研・富士写真フイルム(株)共同研究

原研先端基礎研究センター 新村信雄



ex) thickness 300 μm.
 comp. 0.5
 λ 1 Å) → 75%

6. 討論 今後の課題

出席者全員

既に6回の「生体物質中性子回折ワークショップ」を開催してきた。このワークショップの成果は、生体物質中性子回折研究推進に大きく寄与している。

次年度以後もワークショップは継続して開催するが、従来とは異なる形態、具体的には1ワークショップ1テーマを原則にし、重要なテーマに時間を割きたいと考えている。テーマの内容については、皆様の御意見を参考に決定して行きたい。

今後御協力を宜しくお願いいたします。

付録1 第6回「生体物質中性子回折ワークショップ」プログラム

日時 : 平成7年3月25日(土) 9:00~17:00
 場所 : 東海会館 晴嵐の間
 〒319-11 茨城県那珂郡東海村船場544-2 ☎0120-288351

9:00 あいさつ 萩原 幸(原研先端基礎研究センター)
 注意事項の説明 新村信雄(原研先端基礎研究センター)

座長 三木邦夫(京都大学理学部)

9:05~10:05

○Neutron Crystallography in Biology. (60分)

Benno P. Schoenborn (Los Alamos)

10:05~10:50

○ヒドロゲナーゼX線結晶構造解析と中性子回折実験の可能性(45分)

樋口芳樹(姫路工業大学理学部)

【 休憩 10:50~11:05 】

座長 佐藤 衛(大阪大学蛋白質研究所)

11:05~11:45

○Changes of Protein Dynamics upon Foldings. (40分)

片岡幹雄(大阪大学理学部)

11:45~12:25

○核酸の低振動数モード

ーラマン散乱と中性子非弾性散乱ー(40分) 菅原洋子(北里大学理学部)

【 昼食兼懇親会 12:25~14:00 】

14:00~17:00

○中性子イメージングプレート

座長 石川 勇(原研アイソトープ部)

*現状(30分)

唐澤裕子(原研先端基礎研究センター)

*応用例 その1 (30分)

新村信雄

*応用例 その2 (30分)

曾山和彦(原研研究炉部)

*原研・富士写真フイルム(株)共同研究(30分)

坪 長(原研研究炉部)

高橋健治(富士写真フイルム(株))

新村信雄

*討議 今後の課題(60分)

近藤泰洋(東北大学工学部)

その他、出席者全員

付録2 第6回「生体物質中性子回折」ワークショップ 出席者名簿

先端基礎研究センター
生体物質中性子回折研究グループ

Benno P. Schoenborn	Los Alamos National Laboratory, U. S. A.
近藤 泰洋	東北大学工学部
高橋 健治	富士写真フイルム(株)
菅原 洋子	北里大学理学部
三木 邦夫	京都大学理学部
佐藤 衛	大阪大学蛋白質研究所
片岡 幹雄	大阪大学理学部
樋口 芳樹	姫路工業大学理工学部
坪 長	原研研究炉部
山田 忠則	原研研究炉部
曾山 和彦	原研研究炉部
石川 勇	原研アイソトープ部
小泉 智	原研材料研究部
萩原 幸	原研先端基礎研究センター
新村 信雄	原研先端基礎研究センター
田中伊知朗	原研先端基礎研究センター
峯崎 善章	原研先端基礎研究センター
唐澤 裕子	原研先端基礎研究センター