

JAERI-Conf
96-001



第42回基礎科学セミナー
「第7回生体物質中性子回折ワークショップ」報文集
1995年10月25日～26日、東海村

1996年2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, 1996

編集兼発行 日本原子力研究所
印刷 株式会社原子力資料サービス

第42回基礎科学セミナー
「第7回生物物質中性子回折ワークショップ」報文集
1995年10月25日～26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

(1996年1月22日受理)

平成7年10月25日～26日に，東海研究所で生物物質中性子回折に関する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43名の出席があり，17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 42nd Basic Science Seminar
(The 7th Workshop on Neutron Crystallography in Biology)
October 25-26, 1995, Tokai, Japan

(Ed.) Nobuo NIIMURA

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

(Received January 22, 1996)

42nd advanced science seminar (the 7th workshop on neutron crystallography in biology) was held on October, 25-26, 1995 at Tokai. Forty three participants from university, research institute and private company took part in the workshop and there were 17 lectures given. The proceedings collect the figures and tables which the speakers used in their lectures.

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

目 次

まえがき	1
1. 低温化での蛋白X線結晶解析	2
中迫 雅由 (理化学研究所)	
2. 補酵素B12タンパク質メチルマロニルCoAムターゼのX線結晶構造解析	30
中川 敦史 (北海道大学理学部)	
3. 中性子イメージングプレート	37
3.1 現 状	37
唐澤 裕子 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)	
3.2 結晶構造解析への応用 (I)	52
岩田 豊 (京都大学原子炉実験所)	
3.3 結晶構造解析への応用 (II)	54
野田 幸男 (千葉大学理学部)	
3.4 粉末回折への応用	62
山口 泰男 (東北大学金属材料研究所)	
3.5 長波長中性子光学への応用	68
海老沢 徹 (京都大学原子炉実験所)	
3.6 小角散乱への応用	74
小泉 智 (日本原子力研究所 材料研究部)	
3.7 非弾性散乱への応用	77
山田 和芳 (東北大学理学部)	
3.8 ラウエ法への応用	82
峯崎 善章 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)	
3.9 ラジオグラフィーへの応用	91
石川 勇 (日本原子力研究所 アイソトープ部)	
4. 生体物質中性子回折計 (BIX)	95
田中伊知朗 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)	
5. モノクロメーター	111
皆川 宣明 (日本原子力研究所 材料研究部)	
6. BIX-II, BIX-LAUE	113
新村 信雄 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)	
7. ウシ心筋のチトクロム酸化酵素のX線結晶解析	121
山下 栄樹 (大阪大学蛋白質研究所)	
8. 結晶成長	130

8.1	高分子の結晶化誘導期における構造形成	130
	今井 正幸 (東京大学物性研究所)	
8.2	タンパク質結晶成長スケーリング	137
	新村 信雄 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)	
付録1	プログラム	145
付録2	出席者名簿	148

Contents

Preface	1
1. X-ray Protein Crystallography under the Low Temperature	2
Masayoshi Nakasako (Inst. Phys. & Chem. Res.)	
2. X-ray Crystal Structure Analysis of Co-enzyme B12 Protein	30
Atsushi Nakagawa (Hokkaido Univ.)	
3. An Imaging Plate Neutron Detector	37
3.1 Current Status	37
Yuuko Karasawa (JAERI)	
3.2 Application for Crystal Structure Analysis (I)	52
Yutaka Iwata (Kyoto Univ. Res. Reactor)	
3.3 Application for Crystal Structure Analysis (II)	54
Yukio Noda (Chiba Univ.)	
3.4 Application for Powder Diffraction	62
Yasuo Yamaguchi (Tohoku Univ.)	
3.5 Application for Long Wavelength Optics	68
Tooru Ebisawa (Kyoto Univ. Res. Reactor)	
3.6 Application for Small Angle Scattering	74
Satoshi Koizumi (JAERI)	
3.7 Application for Inelastic Scattering	77
Kazuyoshi Yamada (Tohoku Univ.)	
3.8 Application for Laue Diffraction	82
Yoshiaki Minezaki (JAERI)	
3.9 Application for Radiography	91
Isamu Ishikawa (JAERI)	
4. Neutron Diffractometer for Bio-crystallography (BIX)	95
Ichiro Tanaka (JAERI)	
5. Monochromator	111
Noriaki Minakawa (JAERI)	
6. Neutron Diffractometer for Bio-crystallography (BIX-II & BIX-Laue)	113
Nobuo Niimura (JAERI)	
7. X-ray Crystal Structure Analysis of Bovine Heart Cytochrome C Oxidase	121
Eiki Yamashita (Osaka Univ.)	

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6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42回基礎科学セミナー「第7回生体物質中性子回折ワークショップ」では、建設を終了した生体物質中性子回折計の概略、性能、実験結果及び新しく開発したイメージングプレートについて報告した。特に、中性子イメージングプレートは、更なる性能の向上と応用の可能性を検討するため、イメージングプレートの現状、応用の実例を討論した。

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-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、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12月

1. 低温化での蛋白X線結晶解析

中迫雅由 (理化学研究所)

- 低温下での
蛋白質 X線結晶解析
1. 低温実験の概要
 2. 応用例.
 β -Trypsin の水和構造

理化学研究所
生物物理
放射光構造生物学
仲迫雅由

放射光構造生物学
研究推進グループ

豊島近 教授

東京大学 分子細胞生物学
研究施設

梅田桂男
(株) ティスコ 精密デバイス部

放射光構造生物学研究推進グループ

結晶学研究室

岩崎 準, 神谷 信夫

光合成科学研究室

井上 頼直, 小野 高明

野口 巧, 北 建仁

生物物理化学研究室

飯塚 哲太郎, 城 宜嗣

足立 伸一

生物物理研究室

種本 龍夫, 藤澤 哲郎

山本 雅賢

3-イソプロピルシロゴ酸脱水素酵素

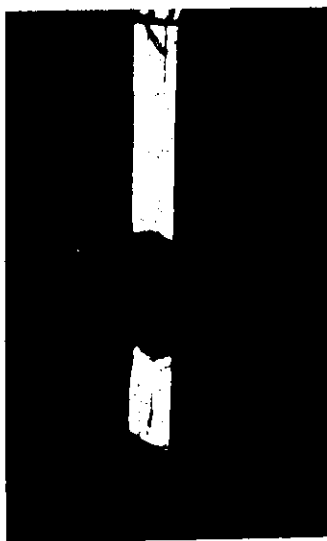
永田親弘氏、田中信夫教授
東工大・生命理工

ニトリルヒドラーゼ

長島重広博士、尾高雅文博士

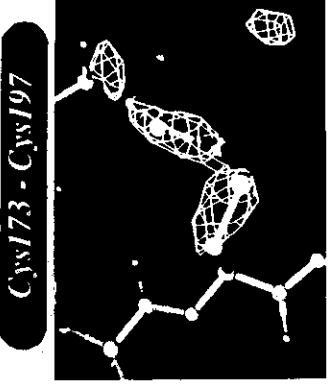
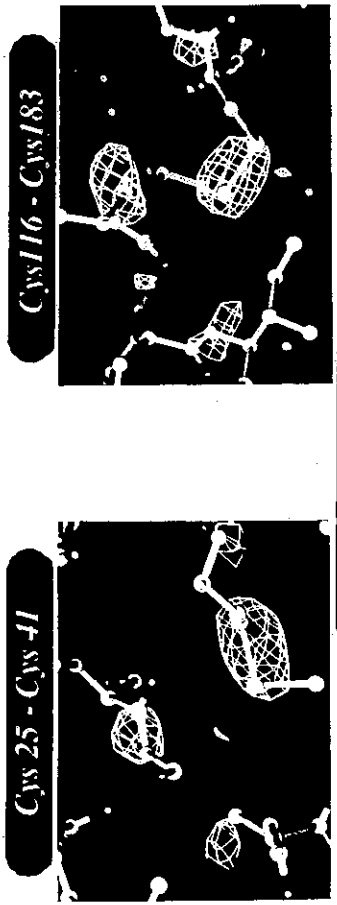
養王田正文博士、遠藤勲博士、主任研究員
理研・化学工学

神谷信夫博士 副主任研究員



0-3. Damage in Protein

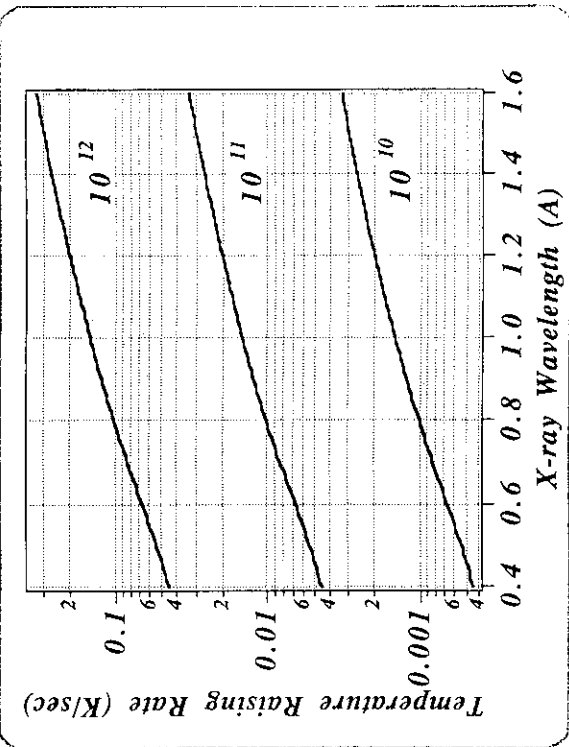
ここに掲げた電子密度図は、トリプシン結晶に195時間にわたってX線を照射した際、最初に測定した強度データと最後に測定した強度データを用いて差 Fourier 図を描いたものである。差の電子密度は、ジスルフィド結合とその周辺のペプチド結合に顕著であった。これらの結合は放射線損傷過程で切断されると考えられる。



Difference Fourier : (Finit - Ffinal) exp(i ainit)
 Bragg Spacing : 8.0 - 1.8 Å
 Lowest Contour : 2.3 Sigma Level

0-1. Heat Load in Protein Crystal

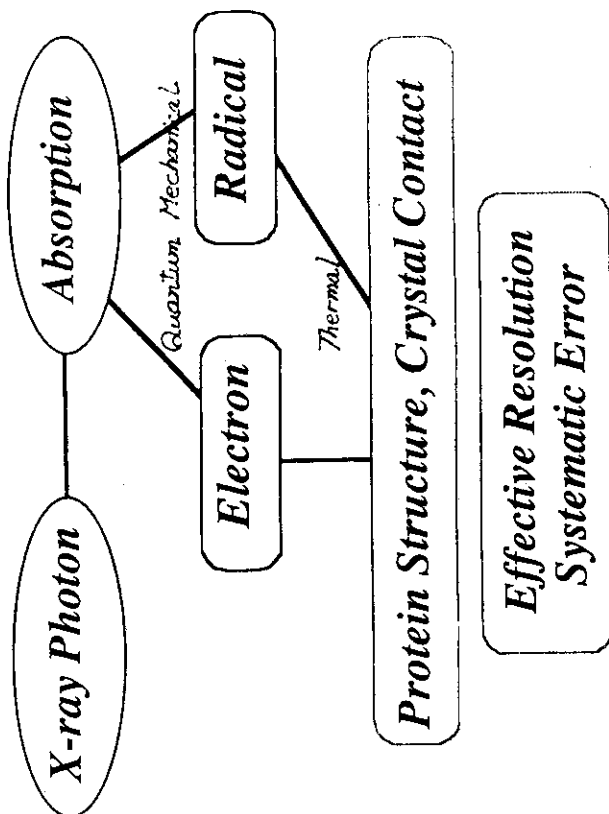
下図に示すは、結晶に吸収されたX線光子エネルギーが全て熱に変換された場合、どの程度の温度上昇が結晶内に生じるか見積もったものである。



$\frac{\partial Q}{\partial t} = I_0 d^{**2} [1 - \exp(-\mu d)] E K (W)$
 μ : 結晶の線吸収係数 (Victreen の経験式)
 I_0 : 入射 X 線強度 (photons/sec mm**2)
 E : X 線エネルギー (eV)
 K : $1.6 \times 10^{**19}$

蛋白質分子量 : 26,000 [C1171H1808O357N301S8]
 結晶母液 : 硫酸 2M, Na Cacodylate 25 mM
 斜方晶系結晶 : 格子定数 a = 56, b = 72, c = 54 Å, z = 4
 溶媒占様率 : 41%
 結晶サイズ : $100 \times 100 \times 100 \mu m^3$ ($\mu = 0.14 \text{ mm}^{**1}$)

Radiation Damage in Protein Crystal

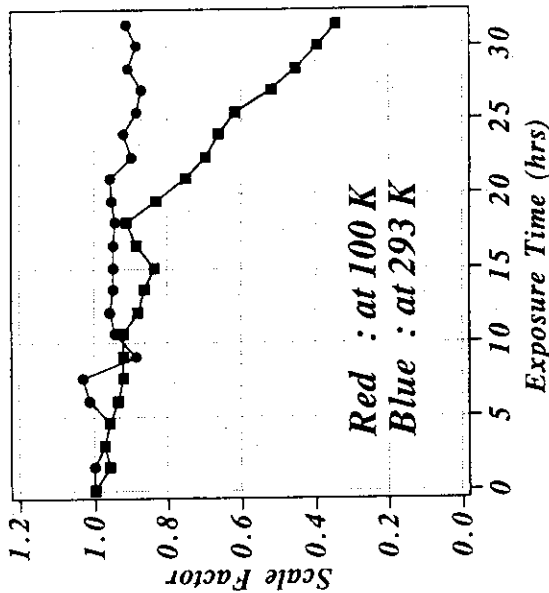


Intensity of Incident X-ray Beam
Exposure Time

Cryogenic Experiment
Exposure Sequence
Fast Data Collection
Short Wavelength X-ray

0-2. Radiation Damage

蛋白質結晶の放射線損傷は、相対尺度計算結果に如実に現われる。下図では、Isopropylmalate Dehydrogenase (IPMDH) 結晶の放射線損傷度を 293 K と 100 K で比較してある。低温測定で結晶の放射線損傷が抑制されていることは明白である。

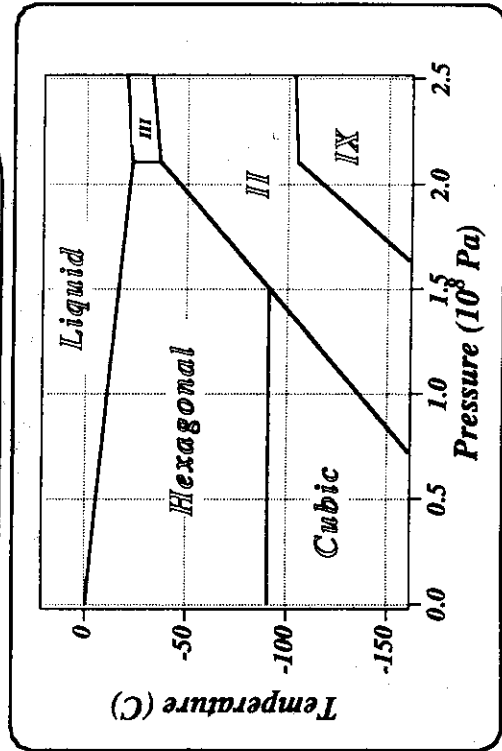
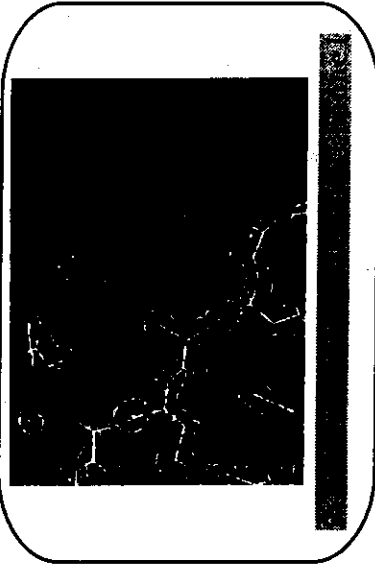


● : at 100 K, IPMDH Crystal Size 300 μm^3
○ : at 293 K, IPMDH Crystal Size 100 μm^3

X-ray Generator : RU-200 (Rigaku) Operated at 55 kV, 80 mA
Double Mirror Focusing System was used.
X-ray Wavelength : 1.5418 Å
Detector : R-Axis IIc (Rigaku)

0-4. Phase Diagram of Water

蛋白質結晶冷却での難点は蛋白質結晶内に存在する大量の水が冷却に伴って凍結することである。この現象を抑制してはじめて、低温下でのX線回折実験が可能となる。結晶冷却では、氷生成阻止、迅速かつ効率的冷却を指標とした技術の開発が必要である。



Methods in cryogenic Protein Crystallography by Masayoshi Nakasako

Table 1-1. Progress in Cryogenic Protein Crystallography

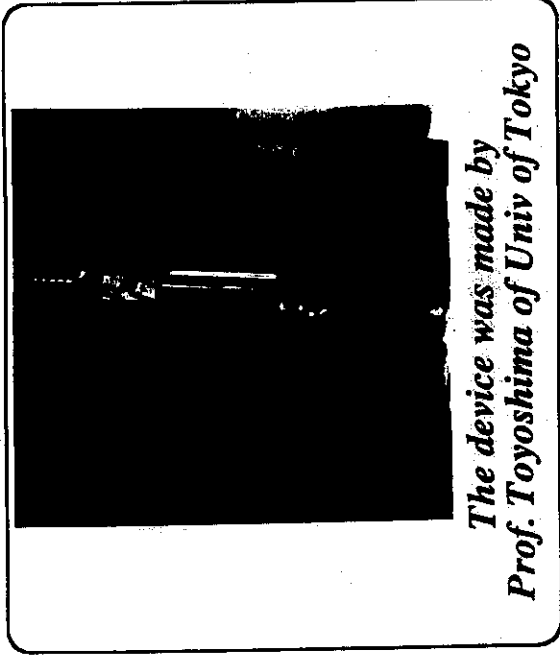
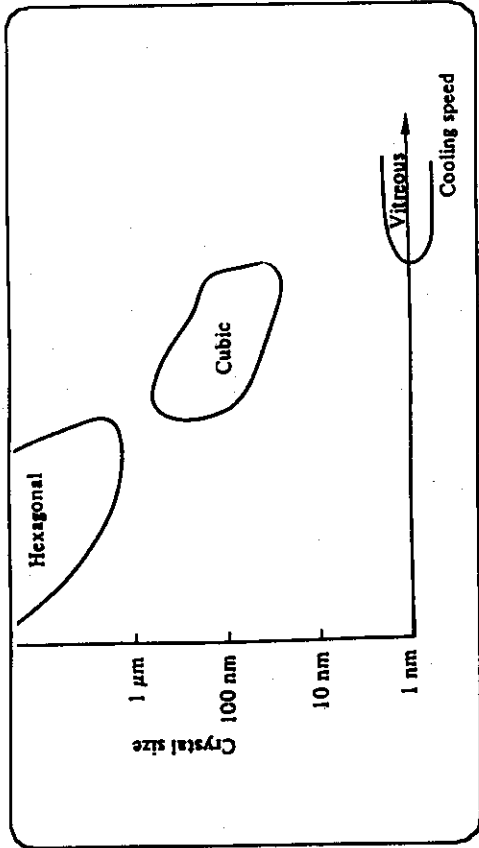
Author	Year	Target Protein Crystal	Anti-freezing Reagent	Temp.
Low et al.	1966	Insulin		123 K
Haas & Rossmann	1970	Lactate Dehydrogenase	Sucrose 3 M	198 K
Petsko	1975	HEW Lysozyme	MPD 70 %	198 K
		Triose Phosphate Isomerase	MPD 70 %	188 K
		Deoxyhemoglobin	MPD 70 %	198 K
		Ribonuclease A	Ethanol 80 %	153 K
		Ribonuclease S	MPD 65 %	198 K
		Thrombin	MPD 75 %	173 K
		Malate Dehydrogenase	MPD 75 %	198 K
		Prealbumin	MPD 75 %	204 K
		Pepsin	Ethanol 60 %	223 K
Alber et al.	1976	Elastase-Substrate Complex	Methanol 70 %	218 K
Frauenfelder et al.	1979	Myoglobin	MPD 75 %	200 K
Drew et al.	1982	B-DNA Dodecamer	MPD 30 %	16 K
Hartmann et al.	1982	Myoglobin	Shock Freezing	80 K
Parak et al.	1987	Myoglobin	Shock Freezing	80, 115, 165, 185 K
Hope	1988	Crambin	Oil	130 K
		Trypsin Inhibitor	Oil	125 K
Hope et al.	1989	Ribosome	Oil	85 K
Teng	1990	Myoglobin	Sucrose 20 %	100 K
Tilton et al.	1992	Ribonuclease A	MPD 50 %	98, 130, 160, 180 K
			98, 130, 160, 180, 220, 240, 260, 300, 320 K	320 K
Young et al.	1993	Lysozyme	Oil	120 K

**Cryoprotectant,
Anti-freezing Reagent**

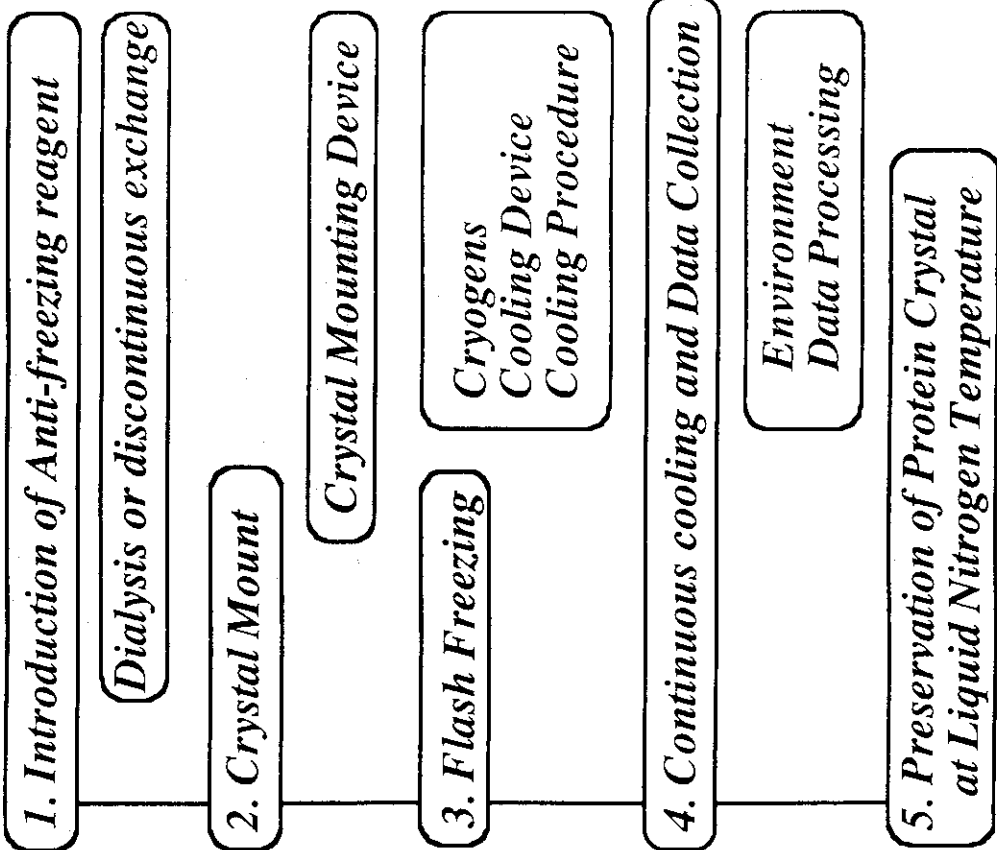
*Suppression of
homogeneous Nucleation of Ice
Glass Forming Property*

Reagent	Mw
Methanol	32
Ethanol	46
Ethylene Glycol	63
Butane-diol	90
Glycerol	92
MPD	118
Xylitol	152
Erythritol	174
Glucose	180
Sucrose	342
Trehalose	378
PEG400	400

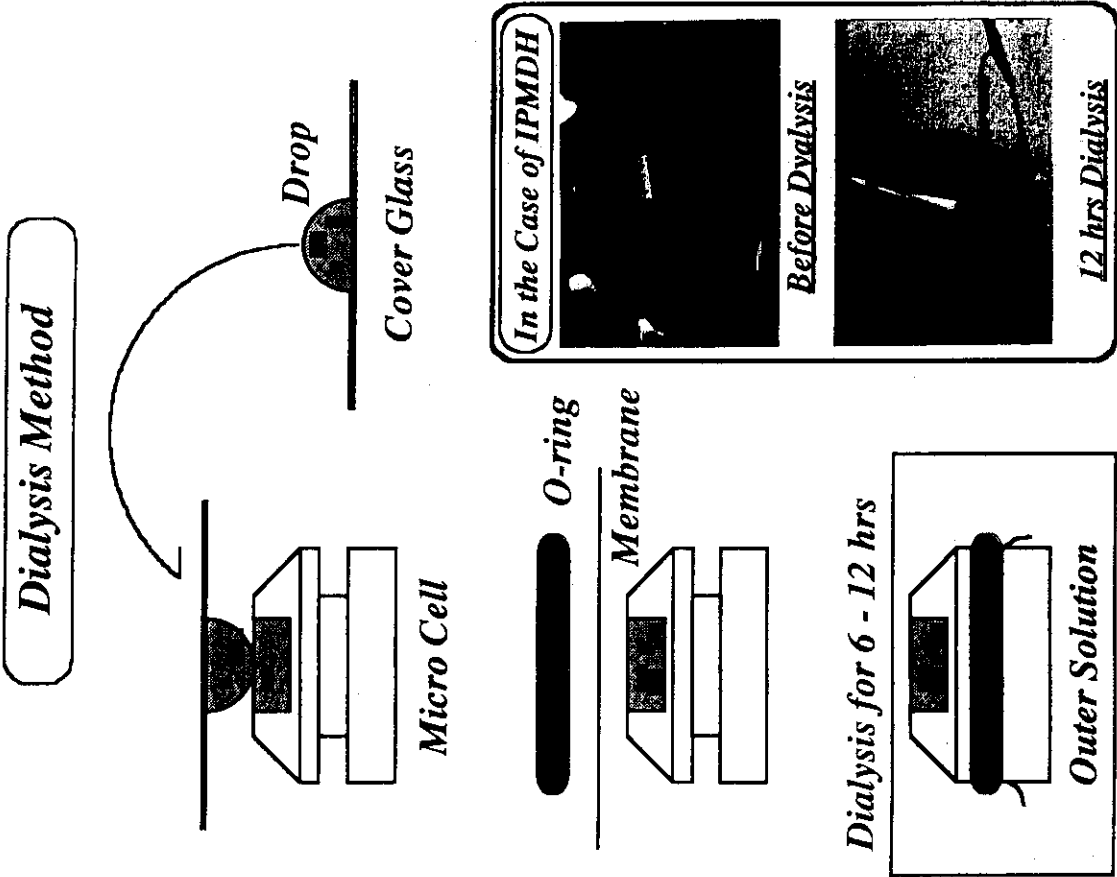
Cooling Rate and Phase of Water



Cryogenic Experiment



1-1. Exchange of Mother Liquor to Anti-freezing Reagent Solution



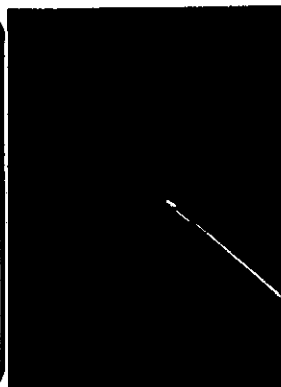
1-2. Examples of Exchange

Crystal	Mother Liquor	Mother Liquor with Cryoprotectant
Trypsin (Orthorhombic)	Ammonium Sulfate 2.1 M	Ammonium Sulfate 2.2 M Sucrose 25 % (w/v)
Trypsin (Orthorhombic)	Ammonium Sulfate 1.6 M	
Trypsin (Trigonal)	Ammonium Sulfate 1.5 M	
IPMDH 10T (Trigonal)	Ammonium Sulfate 1.0 M	Ammonium Sulfate 2.2 M Glycerol 22 % (w/v)
IPMDH cS82R (Trigonal)	Ammonium Sulfate 1.0 M	
IPMDH 2T2M6T (Trigonal)	Ammonium Sulfate 1.0 M	
NHase (Hexagonal)	Ammonium Sulfate 1.0 M	Ammonium Sulfate 2.2 M Glycerol 22 % (w/v)
NHase (Monoclinic)	Ammonium Sulfate 1.0 M	

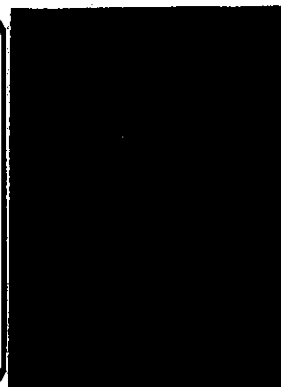
2-2. Crystal Mounting Device

迅速かつ効率的な結晶冷却を行うには、冷却される結晶についても効率的冷却を支える工夫が必要である。海外では、既に、89年頃より低温実験に最適化した結晶マウント具の開発が行われてきた。我々は、より優れたマウント具開発を試み、現在、キャピラリーチューブを薄くスライスしたマウント具を使用している。

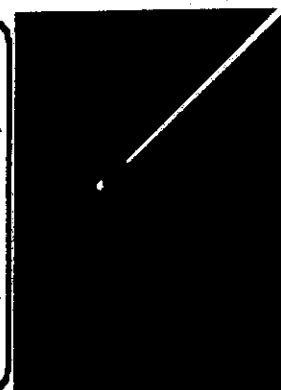
Spatula Type (Hope)



Free-Standing thin Film (Teng)



Sliced Capillary (Nakasako)



Crystal Mount & Flash Cooling

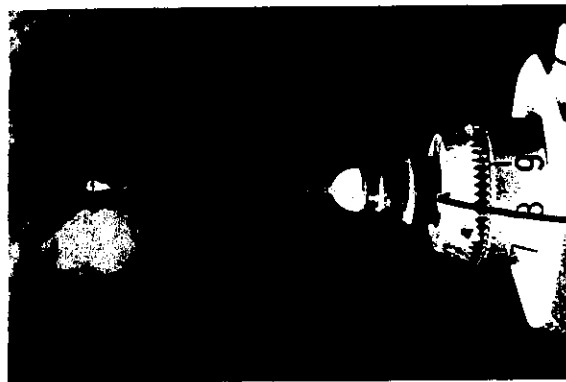
2-1. Selection of Cryogens

Some Physical Properties of Cryogens

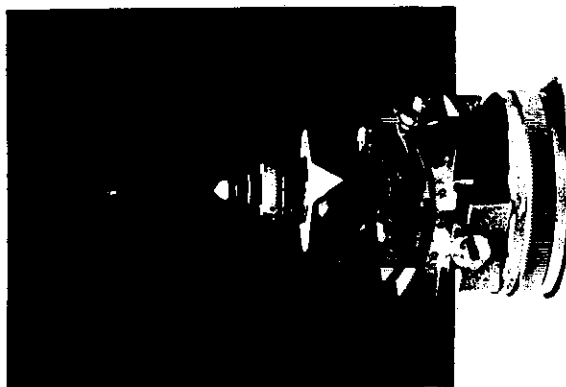
	Melt/Boil (K)	Cooling Rate* (msec)
Liq. Nitrogen	63/ 77	1200 (T.C. size 150-800 μ m)
Liq. Ethane	90/184	60 (T.C. size 800 μ m) 10 (T.C. size 150 μ m)

* : measured with Photo-electric switch and digital-storage Scope

通常、寒剤として多用される液体窒素は、沸点が低いため、冷却物体との界面で熱伝達を著しく阻害する発泡現象を生じやすく、急速冷却用寒剤としては不適當である。液体窒素よりはそれを気化させた低温ガス流が冷却性に優れている。我々は、現在、低温窒素ガスと液体エタン、液体プロパンを使用している。



SmCo Magnet



3. Cryogenic Experiment

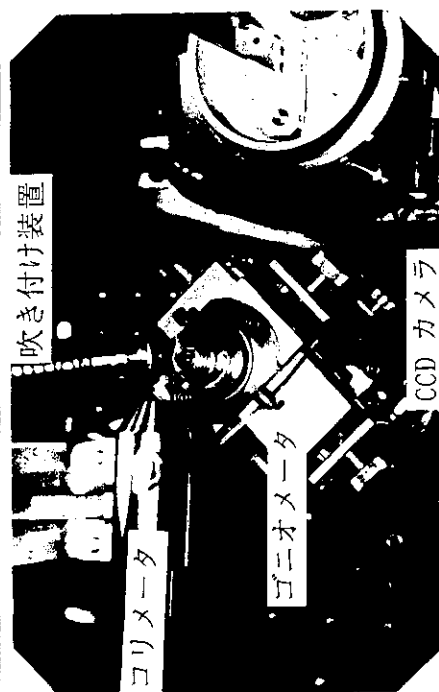
Important Factors

1. Humidity of Experimental Room.
2. Time for Mounting (about 7sec).
3. Exit Nozzle of Cooling Device - Crystal Distance within 1 cm.

Arrangement of Devices in our Lab.



Arrangement of Devices at BL18B of PF

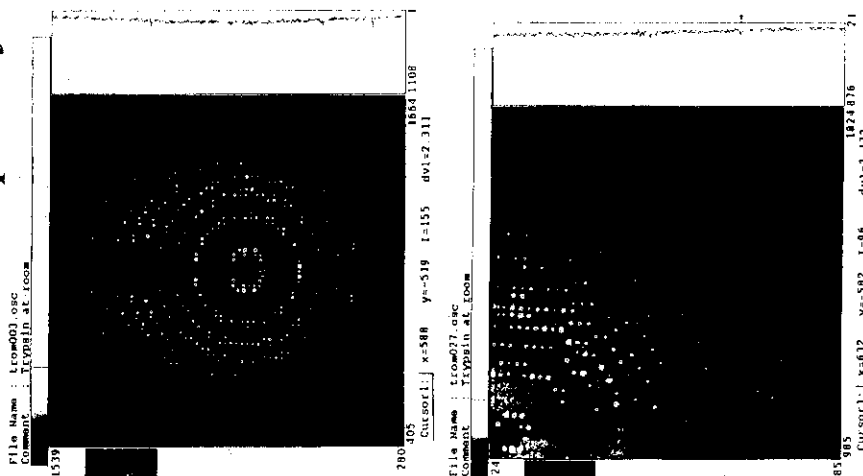


Procedure

1. Centering of Mounting Device
2. Picking up Crystal so that Crystal Axis coincide with the Rotation Axis.
3. Shutter Close (Stop cooled Gas).
4. Set the Mounting Device on Goniometer.
5. Shutter Open (Flash Freezing & Cold Gas Flow Start).
6. Centering of Crystal.
7. Take a Still Diffraction Pattern
8. Check the Still Pattern
9. Measurement.

Diffraction Patterns from Trypsin Crystal at 293 K

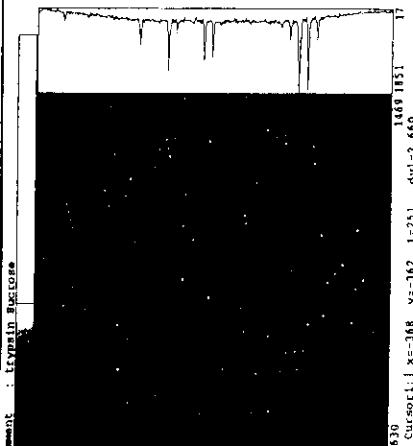
Crystal Mount : Capillary Tube



Diffraction Patterns from Trypsin Crystals at 100 K

P2₁ 2₁ 2₁

low Packing : a = 63.3, b = 68.0, c = 62.6 Å



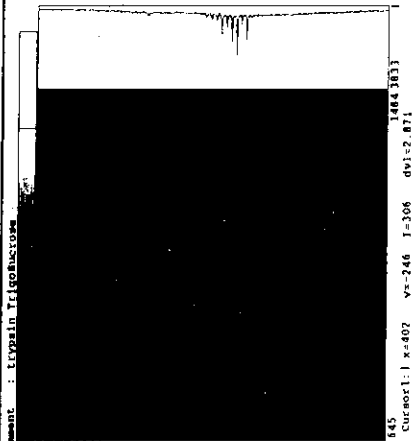
P2₁ 2₁ 2₁

high Packing : a = 58.2, b = 66.4, c = 54.4 Å



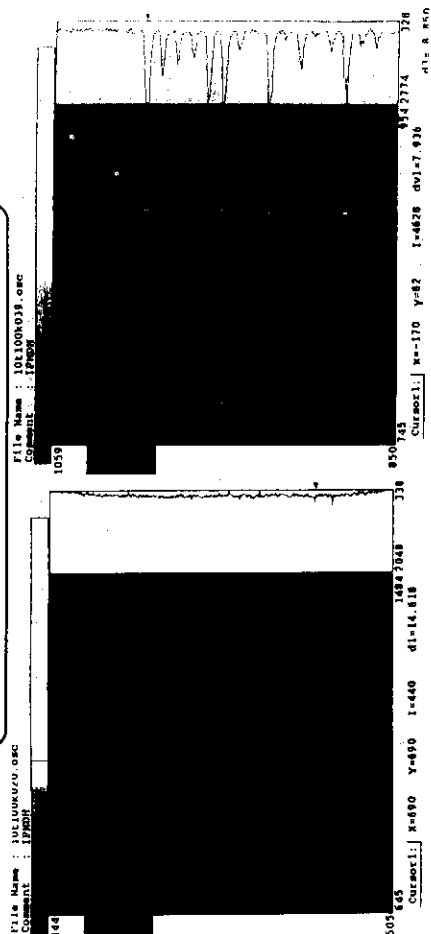
P3₁ 21

Trigonal : a = 54.4, c = 106.8 Å

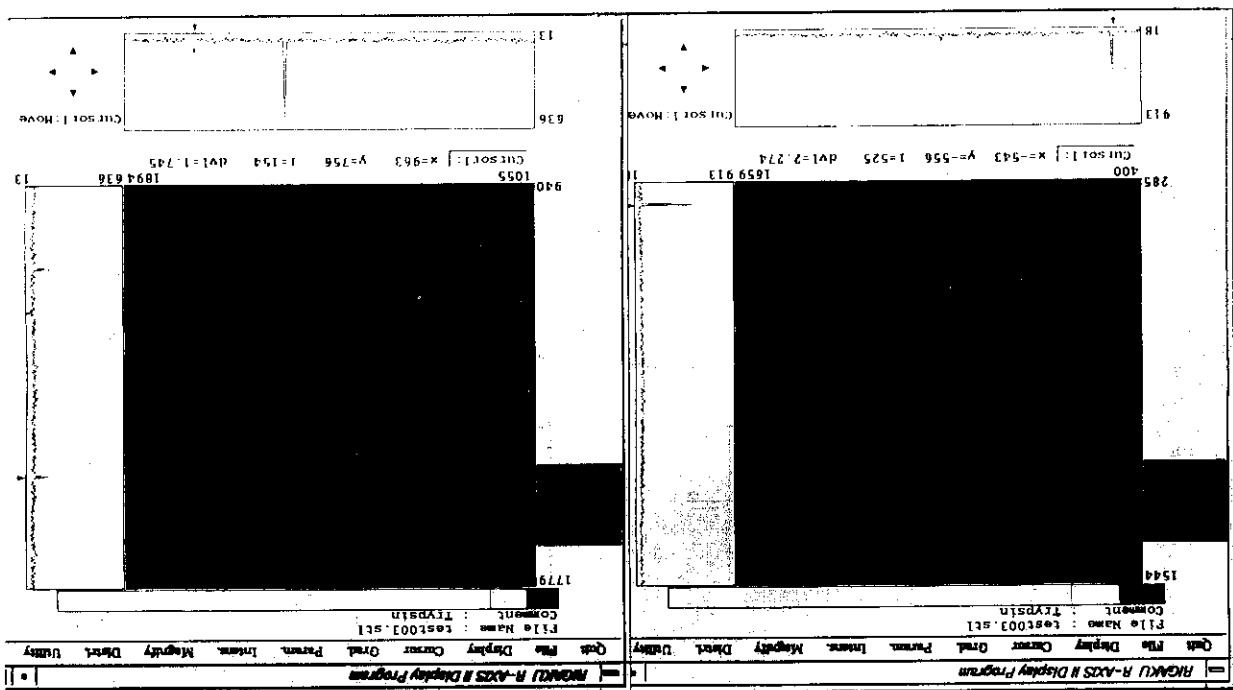
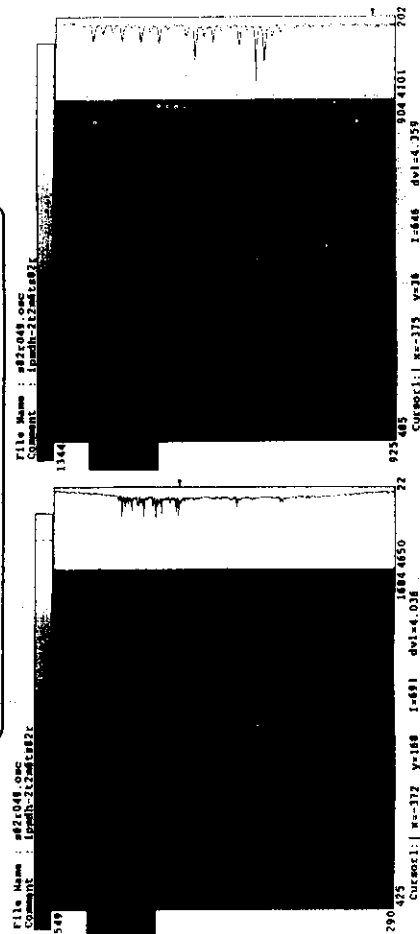


**Diffraction Patterns from IPMDH Crystals
(10T and cS82R) at 100 K**

**10T Crystal at 100 K
P3₂ 2I a = 76.9, c = 156.4 Å**



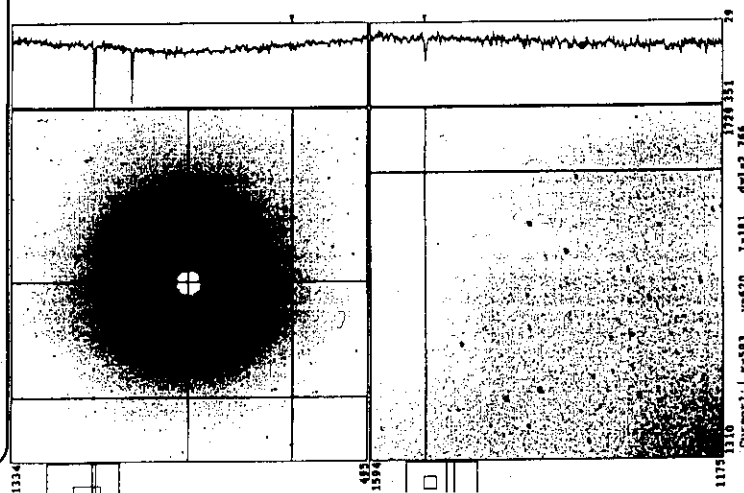
**cS82R Crystal at 100 K
P3₂ 2I a = 77.3, c = 157.1 Å**



Bovine Typsin in the low Molecular Packing Density Form
 Crystal Size: 750 x 250 x 350 μm
 still, λ = 1.5418 (Å)
 X-ray Generator Operated at 55 kV 80 mA
 Exposure Time 10 (min)

Diffraction Patterns from NHase Crystal at 100K

Still diffraction Pattern at 100 K
Exposure Time 1 hour
Diffraction Limit 2.5 Å at 100 K
5.0 Å at 293 K



Hexagonal
 $a = 286.5 \text{ \AA}$
 $c = 69.0 \text{ \AA}$
at 100 K

Applications

1. Trypsin (3 Crystal Forms)

*Water Structure around Trypsin.
 Structural Change at low Temperature.*

2. IPMDH (3 Proteins)

*Structural Analysis for the thermostability
 of IPMDH.*

3. H2-Protease (2 Proteins)

*Multi-wavelength Anomalous Dispersion
 Experiment (Anomalous Scatter : Zn)*

4. NHase (2 Crystals)

*Extend the Resolution Limit
 6 Å at Room Temperature*

-> 2.5 Å at 100 K

*X-ray generator 55 kV 80 mA
 Double Mirror Focusing System
 R-Axis IIc System*

Storage of Protein Crystals after Data Collection in Liquid Nitrogen

*Transport Protein Crystals to PF
without mechanical Damage*

*Check the Quality of Protein Crystals
in your Lab. before Machine Time at PF*

*Save protein Crystals
at their optimum Growth Period*

*Increase the Redundancy of Intensity Data
by iterative Data Collection*

on Mosaic Spread

低温下で結晶のモザイク幅が広がることが報告されており、われわれの測定でも観測された。しかしその結果は、晶系に大きく依存する傾向にあり、低温への冷却が全ての結晶のモザイク性を高めるわけではないようである。例として幾つかの結晶のモザイク幅 (Raxis IIc PROCESS にて算出、光学系の Cross Fire を含む) を下表に掲げておく。

Crystal	Mosaic Spread (deg)
Trypsin Orthorhombic	0.46 (0.29)
Trypsin Orthorhombic	0.30 (0.28)
Trypsin Trigonal	0.24 (0.24)
IPMDH 10T (Trigonal)	0.28 (0.30)
IPMDH cS82R (Trigonal)	0.31 (0.30)

(): at Room Temperature

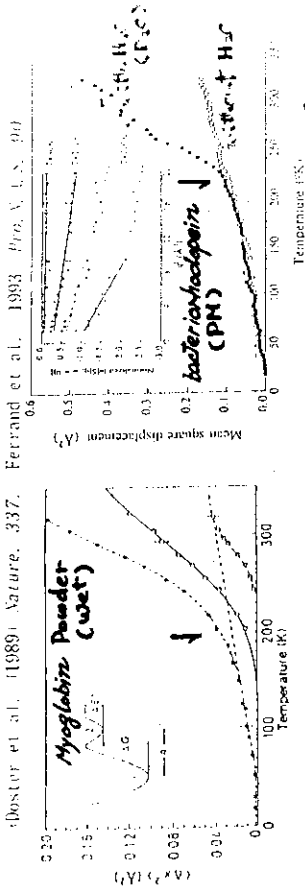
Trypsin : 47.0 · 1.8 Å

IPMDH : 40.0 · 2.1 Å

揺らぎの測定から得られた知見

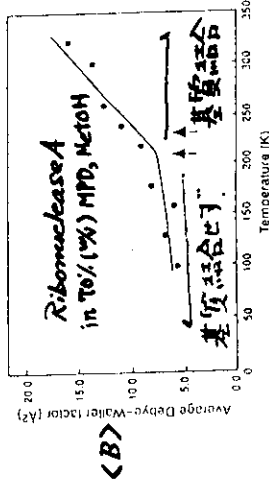
蛋白質のダイナミクスを特徴づける
揺らぎを測定する

水素原子平均自乗揺らぎの温度依存性



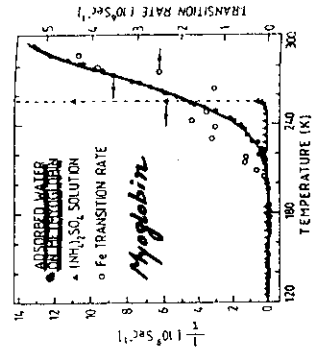
非水素原子平均自乗揺らぎの温度依存性

$$S(Q, \omega) \propto \exp(-Q^2 \langle u^2 \rangle)$$



水和水緩和時間の温度依存性

Singh et al. (1981) Phys. Rev. Lett. 47



結晶構造解析 (空間相関関数)

$$F(Q) = \sum_j f_j(Q) \sum_s \exp(iQ \cdot t \langle r_j \rangle) \exp(-1/2 Q^2 U_{js} Q)$$

Debye-Waller Factor (Gauss)

中性子非弾性非弾性散乱

(時間・空間相関関数)

$$Sinc(Q, \omega) =$$

$$\sum_i f_i \langle \exp[-iQ \cdot R_i(0)] \cdot \exp[iQ \cdot R_i(t)] \rangle \exp(-i\omega t) dt$$

$$R_i(t) = \exp[iHt/h] R_i \exp[-iHt/h]$$

ラマン散乱、ブリュアン散乱、赤外分光法
核磁気共鳴法、マイクロ波分光法
メスバウアー測定、熱測定

X線結晶構造解析法による水和構造研究

蛋白質に強く結合した水： 室温で同定可能
停滞時間の短い水： 同定不可能

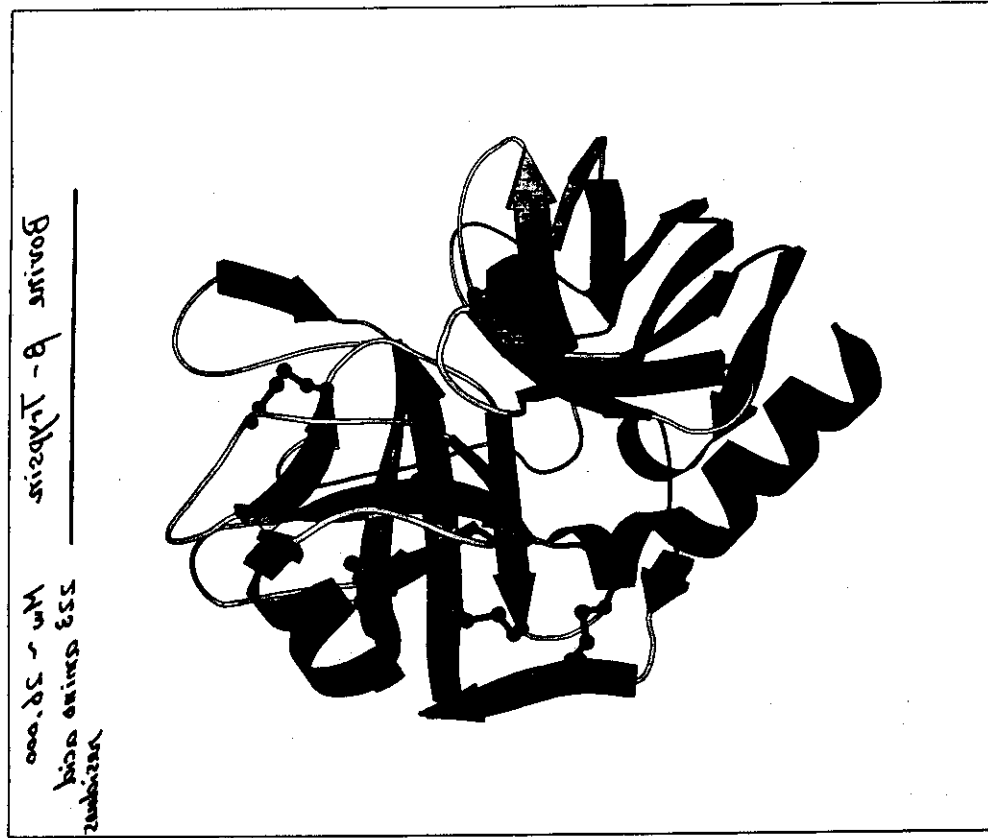
室温と 100 K 程度の低温で水分子が感ずる
蛋白質由来のポテンシャルが変化しない

低温下での水和構造解析

室温下での水和構造のスナップショットの
重ね合せを再現

低温下結晶解析実験の技術上の難点

蛋白質結晶の体積の大部分を占有する
バルクな水の凍結



Statistics of Data Collection

Crystal	Low Packing	High Packing	Trigonal
Crystal Size (mm**3)	0.23 0.15 0.15 (0.30 0.25 0.60)	0.20 0.20 0.40 (0.18 0.18 0.75)	0.20 0.20 0.20 (0.25 0.25 0.25)
Oscillation Angle (deg)	2	2	2
Total Angle (deg/Plate)	90 (a*)	90 (a*)	36 (c*)
Exposure Time (min)	45	45	60
Lattice Constant (Å)			
	a = 63.3 (63.8)	a = 58.2 (58.6)	a = 54.4 (54.8)
	b = 68.0 (69.0)	b = 66.4 (67.5)	
	c = 62.6 (63.6)	c = 54.4 (54.8)	c = 106.8 (109.7)
Bragg Spacing (Å)	46.0 - 1.7	44.0 - 1.7	47.0 - 1.7
Completeness (%) [up to 2.0 Å]	72.5 [88.7]	81.5 [92.5]	71.9 [84.7]
RmergeI	0.049 (0.046)	0.037 (0.072)	0.039 (0.038)
Mosaic Spread (deg)	0.46 (0.29)	0.30 (0.28)	0.24 (0.24)
RmergeI = Sum i,h [abs(Ii(h) - <I(h)>)] / Sum.i,h [Ii(h)]			
() : measured at 293 K			

Statistics of Structure Refinement

Structure Refinement was carried out with X-plor (Brunger et al. (1988) Acta Cryst, A45). Model building and positioning of water molecules were done with turbo-FRODO on SGI iris 3D25. To check the model structure, refined omit (Fo-Fc) maps were used.

Crystal	Low Packing	High Packing	Trigonal
Initial Model	1TLD	2TPN	3TPN
Bragg Spacing (Å)	15.0 - 1.7	15.0 - 1.7	15.0 - 1.7
R	0.160	0.180	0.179
Bond rmsd (Å)	0.013	0.017	0.015
Angle rmsd (deg)	2.77	3.37	2.95
Water Molecules	433	388	267
Sulfate Ions	4	4	2
Benzamidine	3	1	1
Sucrose	None	None	None

Electron Density Maps

293 K

100 K

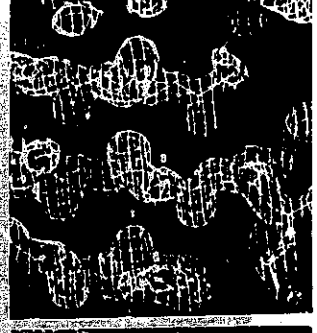
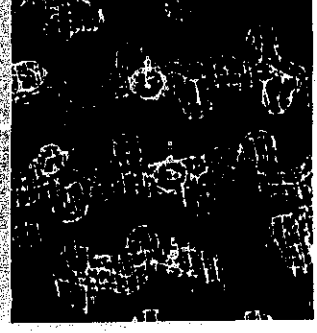
Low Packing



High Packing



Trigonal



Electron Density Maps at 100 K

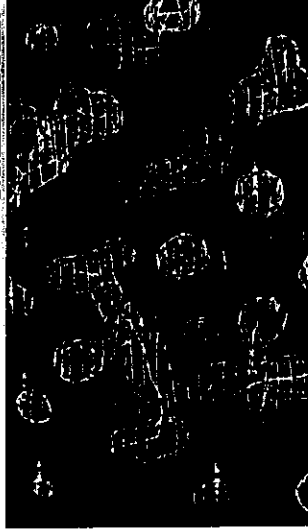
β -sheet



Core

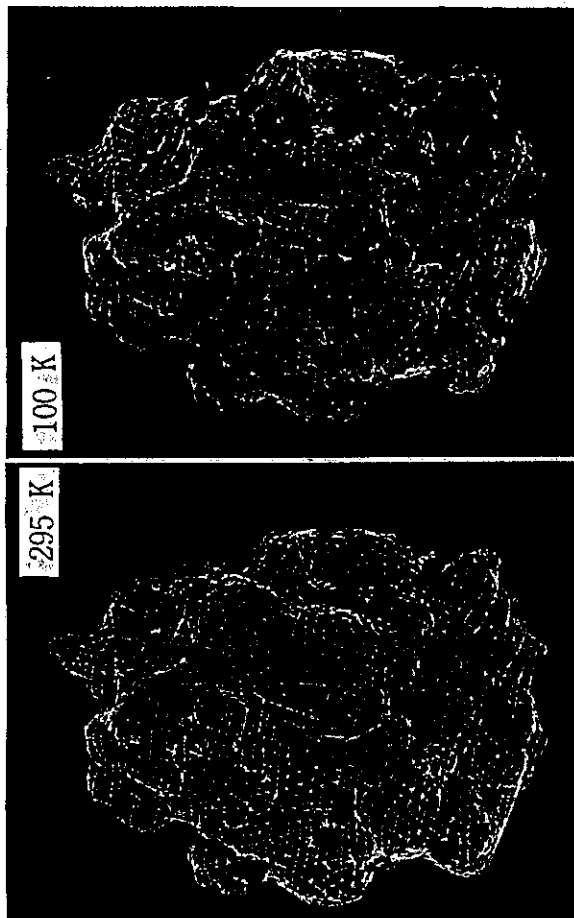


Water



2Fo - Fc Map, 15.0 - 1.8 Å, 1.5 σ level

トリプシン構造モデル



Comparison of Structures
[293 K vs 100 K]

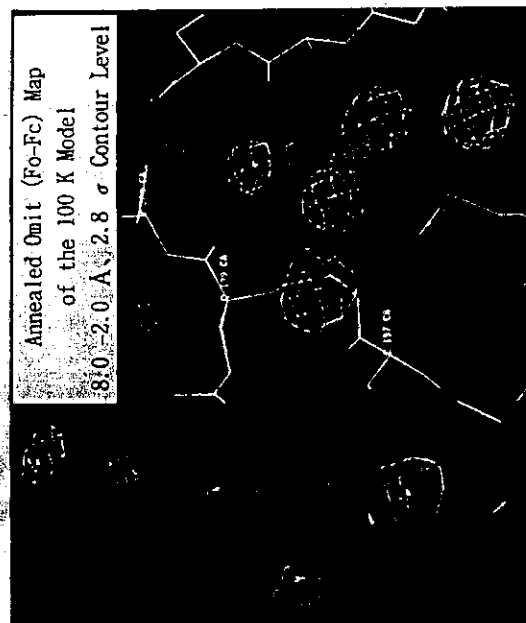
rms Difference for Main Chain Atoms (Å)

	100 K	Low Packing	High Packing	Trigonal
300 K				
Low Packing		0.20	-----	0.33
High Packing		0.35	-----	0.25
Trigonal		0.41	-----	0.26
100 K				
Low Packing		-----	-----	0.33

Movement of Protein Molecule during Freezing

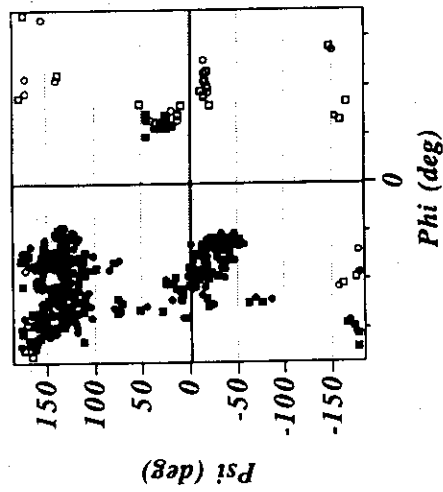
	Rotation (deg)	Translation (Å)
Low Packing	(0.4 0.3 0.9)	(-0.1 0.0 0.6)
Trigonal	(0.9 -0.2 0.4)	(-0.3 -0.3 -0.3)

These calculations can not be applied to the structure in the orthorhombic high packing form, because the conformation of trypsin molecule in the crystal form drastically changed during freezing procedure.

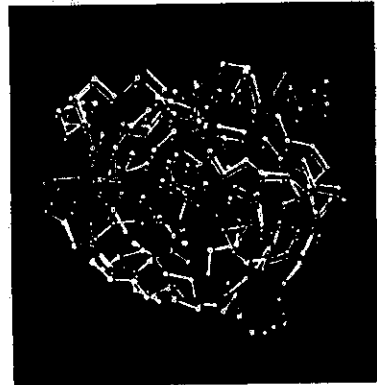


Structural Change of High Packing Form during Freezing

Ramachandran Plot

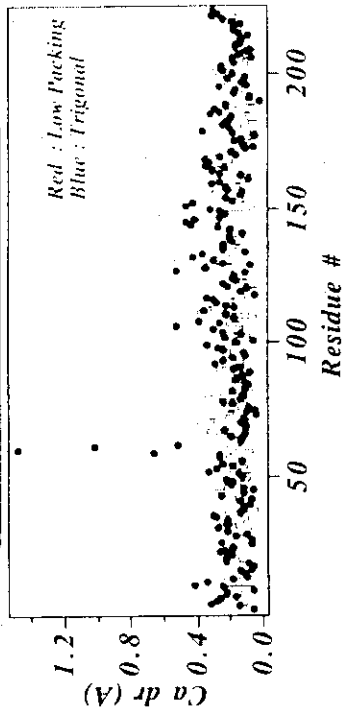


Green : 100 K
Red : 293 K

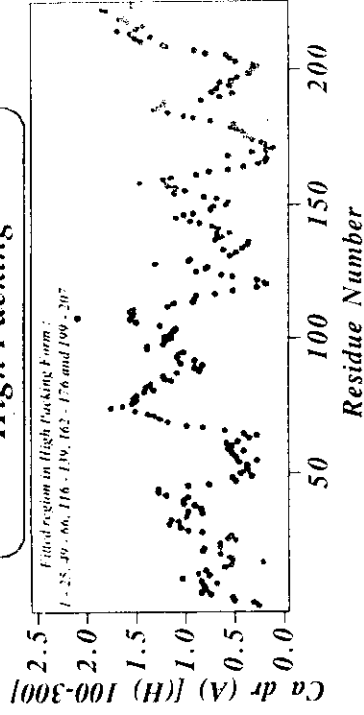


Displacement of Ca Atoms

Low Packing & Trigonal



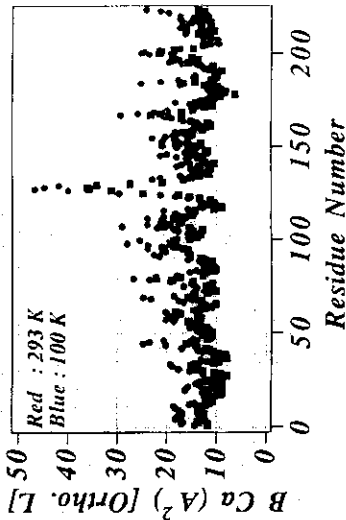
High Packing



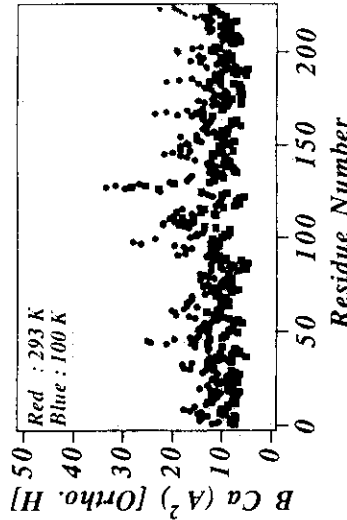
In spite of the large displacement of Ca atoms in the orthorhombic high packing form, the dihedral angles of main chain atoms was not largely changed.

Change of Temperature Factor

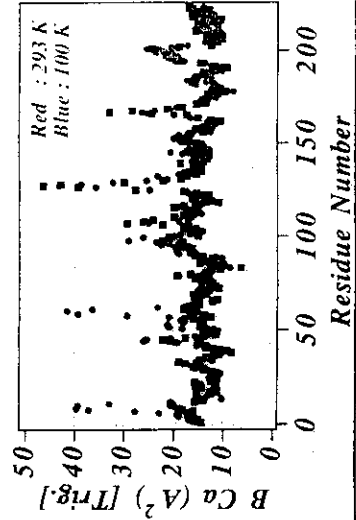
Orthorhombic Low Packing Form



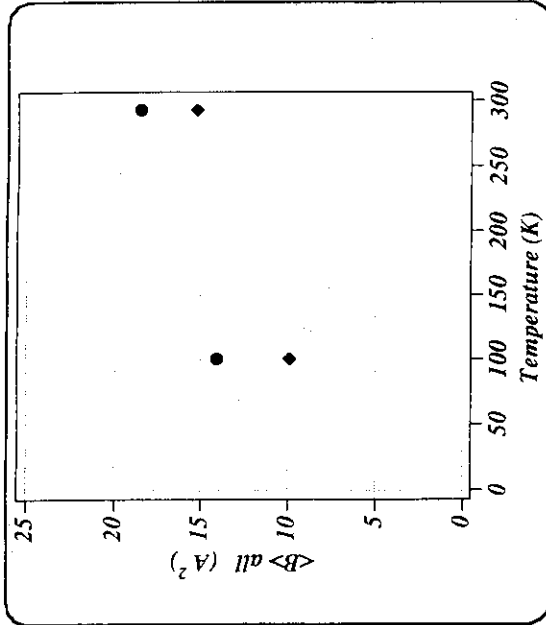
Orthorhombic High Packing Form



Trigonal Form



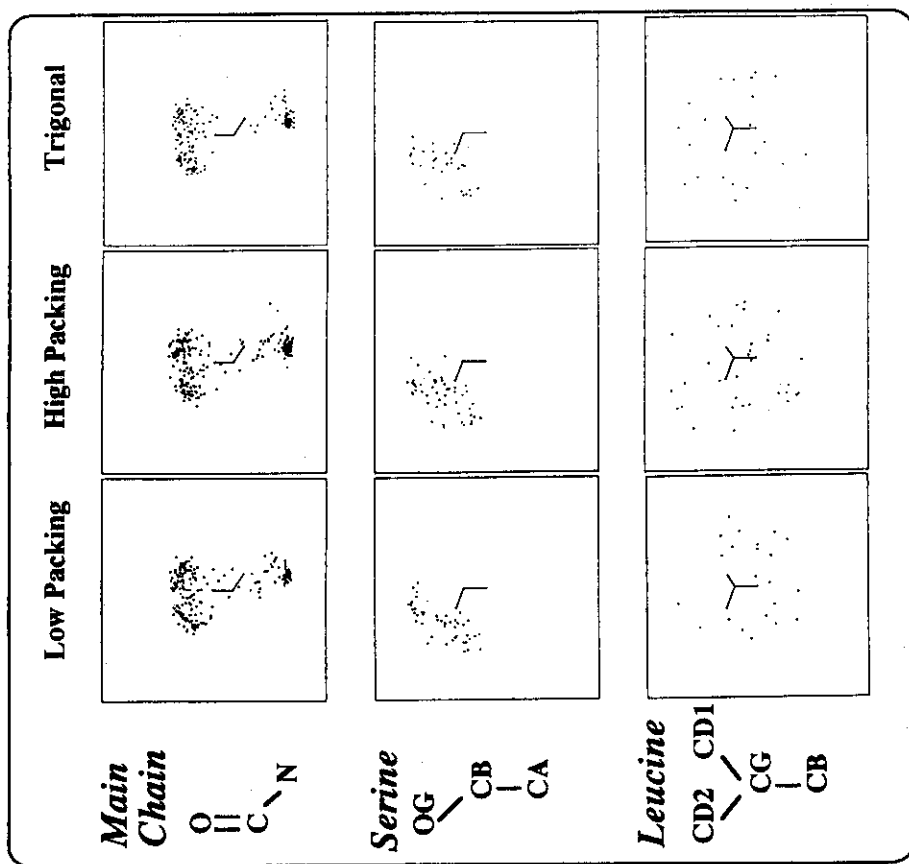
Temperature Dependence of Overall Thermal Factor



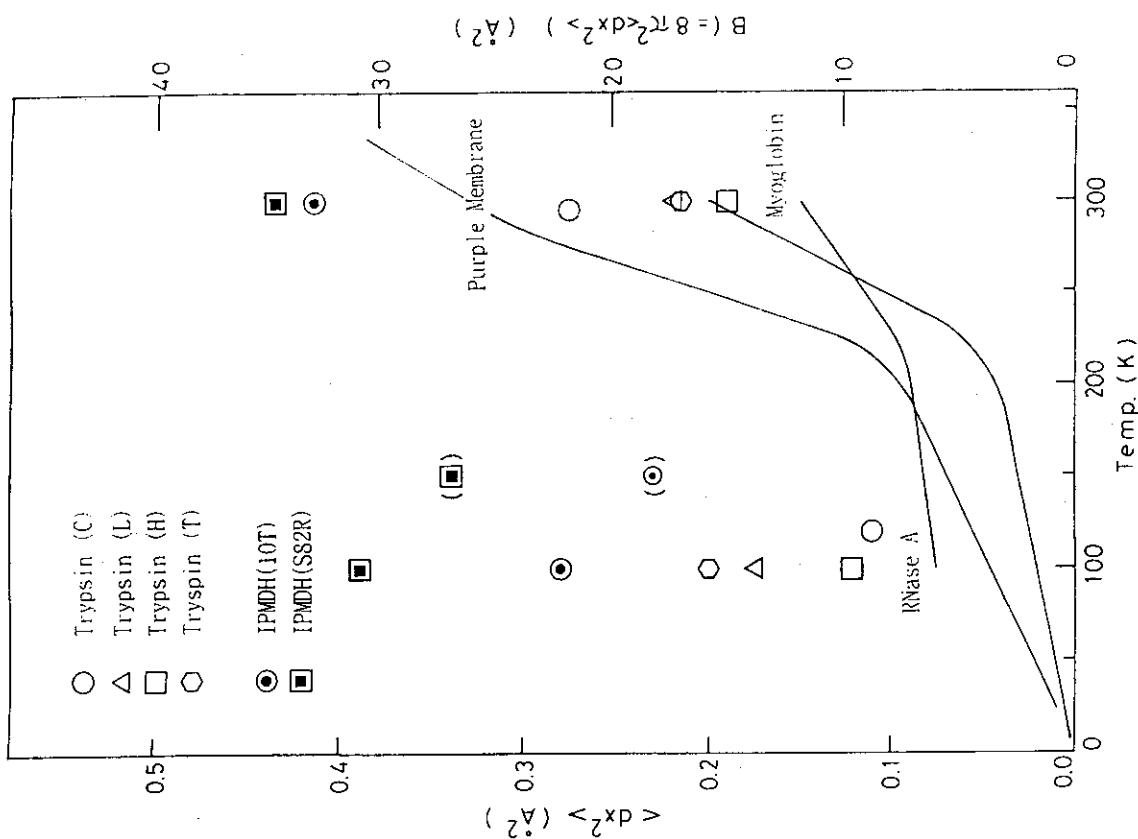
Red : Low Packing Form, Blue : High Packing Form
Green : Trigonal Form, Yellow : Cubic Form
[Earnest et al. (1991)]

In many protein molecules, the thermal factor is raised when the environment temperature is raised. In the low packing form and the high packing form, the overall thermal factors are significantly increased when the temperature is raised. However, the factor in the trigonal form dose not clearly depends on the temperature. At present time, the case for the temperature dependence of the thermal factor in trigonal form is not clear for us.

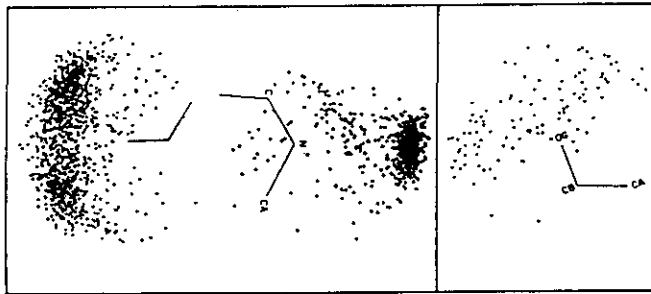
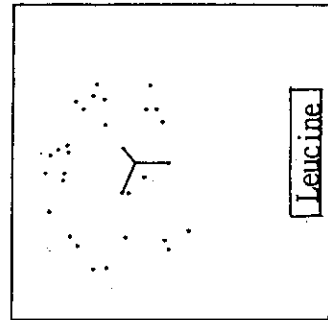
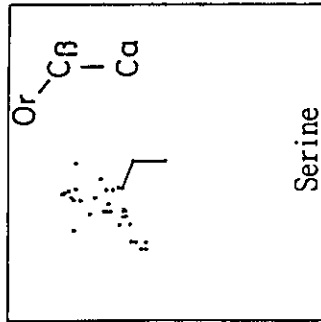
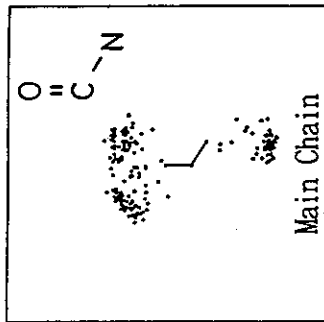
Local Geometry



The geometrical nature of hydrogen bond between hydrophilic residues and waters are not altered at 100 K. The advantage of cryogenic experiment is that we can obtain the structural information about the distribution pattern of water molecules around hydrophobic residues exposed to solvent region.



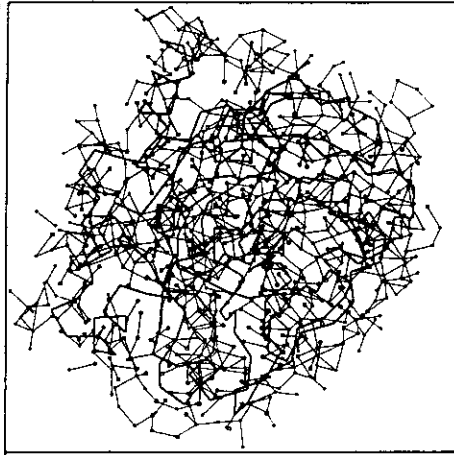
水分子とアミノ酸残基の相互作用様式



Thanki et al. (1988)
J. Mol. Biol. 202

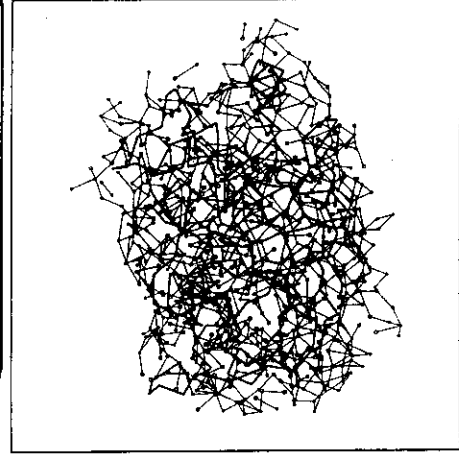
Hydrogen Bond Network

Low Packing Form



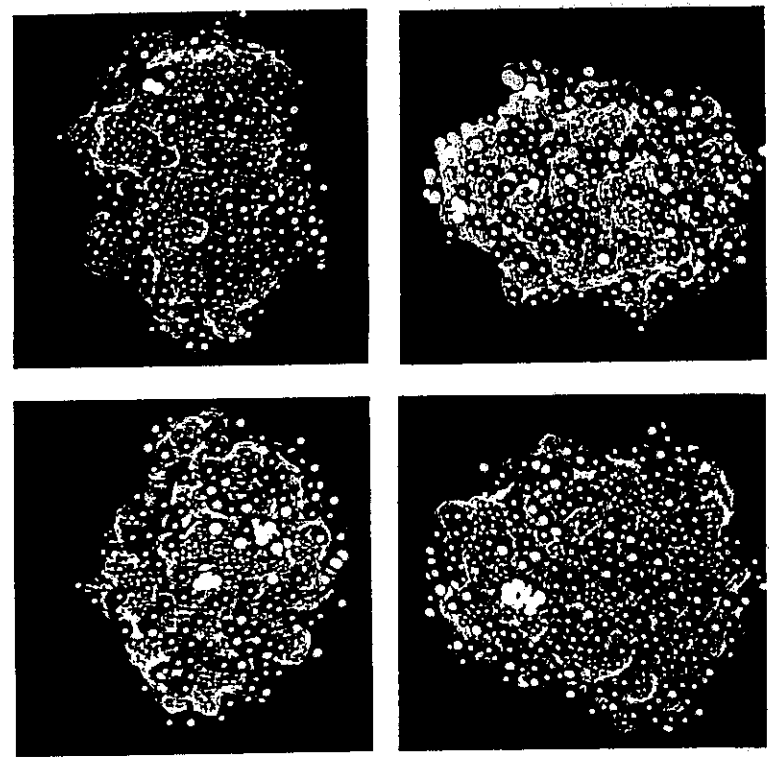
Full Circle: Water O
Open Square: Protein Atom
Line: Hydrogen Bond

High Packing Form



Distribution of Water Molecules around Trypsin

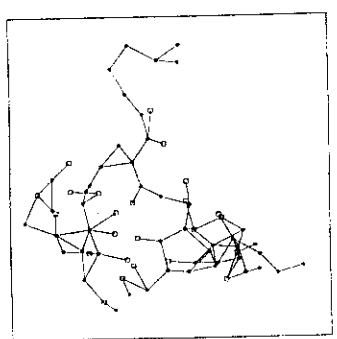
Low Packing Form



Red : 1st Layer Shell 329
 Yellow : 2nd Layer Shell 53
 Green : Inside of Trypsin 27
 Cyan : Mediating Crystal Contact 24

Cluster of Water Molecules

A Cluster in the Low Packing Form

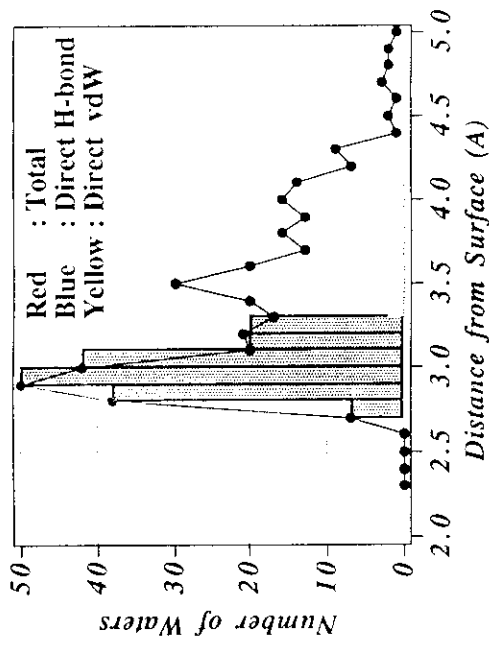


Square : Protein Atom
 Circle : Water

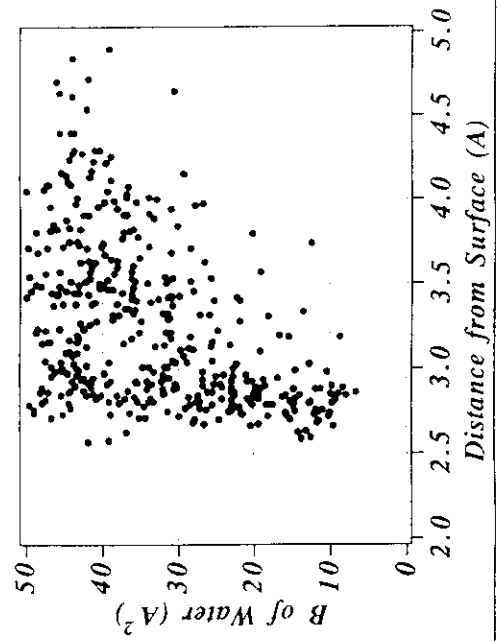
The Size of Clusters

# of Waters in Cluster	Low Packing	High Packing	Trigonal
1 - 5	27	34	47
6 - 10	5	12	10
11 - 15	4	1	3
16 - 20	2	2	3
21 - 25	1	2	
26 - 30	4	1	
31 - 35	1		
36 - 40	1		
41 - 45	1		
46 - 50		1	
51 - 55		1	

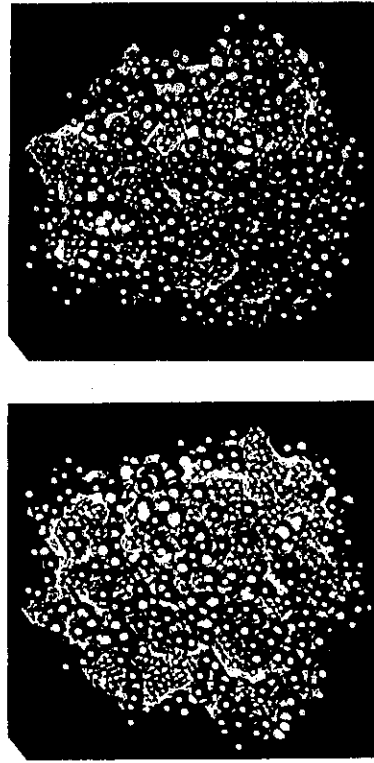
Distance Distribution of Water Molecules around Trypsin in Low Packing Form



Correlation between Thermal Factor and Distance from Surface of Trypsin



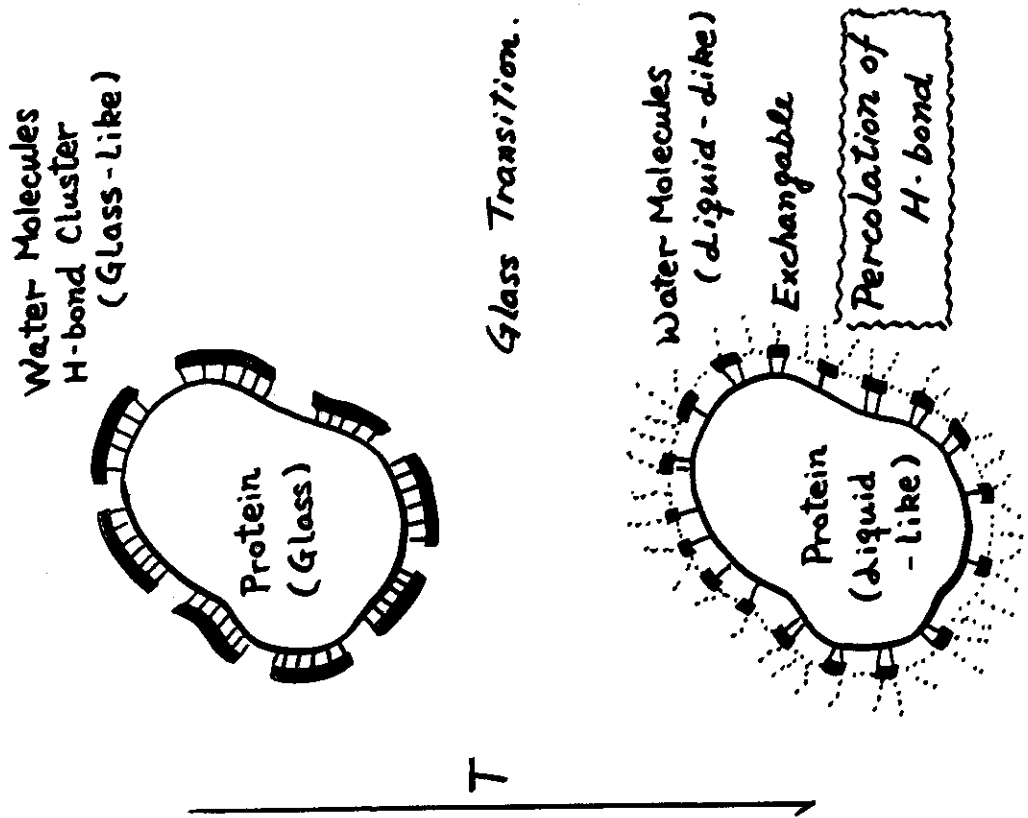
Conservation of Water Molecules among different Crystal Forms



Red : Low Packing at 100 K, Green : Low Packing at 293 K
 Yellow : High Packing at 293 K
 Cyan : Trigonal at 100 K, Purple : Trigonal at 293 K

Conservation of Water Molecules between two crystal states

	Low Packing 100 K 433 Waters	Trigonal 100 K 267 Waters
Low Packing 100 K 433 Waters	132	74
Low Packing 300 K 154 Waters	161	100
Trigonal 100 K 267 Waters	74	82
Trigonal 300 K 105 Waters	94	90
High Packing 300 K 122 Waters		



2. 補酵素B12タンパク質メチルマロニルCoAムターゼのX線結晶構造解析

中川敦史 (北海道大学理学部)

ビタミンB12補酵素タンパク
「メチルマロニル CoA ムターゼ」の構造解析

MRC, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge

Filippo Mancia
Atsushi Nakagawa
Nicholas Keep
Phil Evans

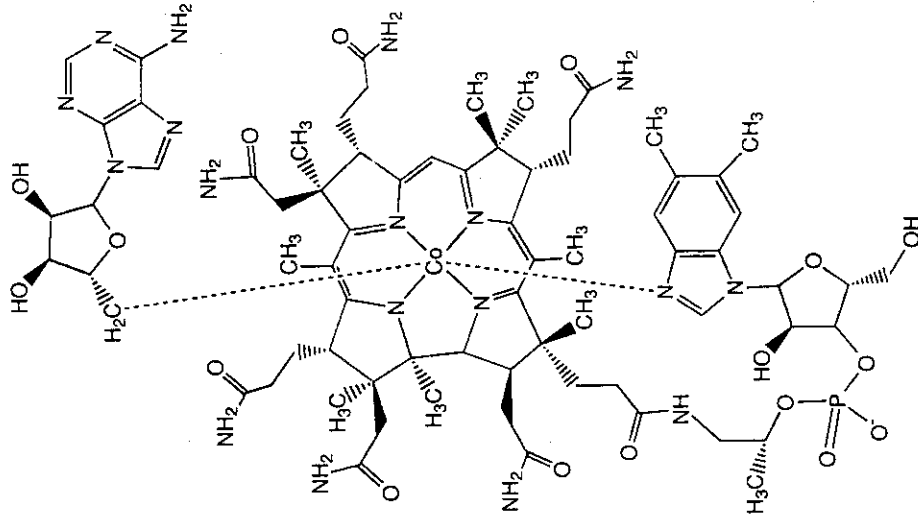
Department of Biochemistry, University of Cambridge
Peter Leadley

SRS, Daresbury

Sean MacSweeney

ESRF, Grenoble

Bjarne Rasmussen

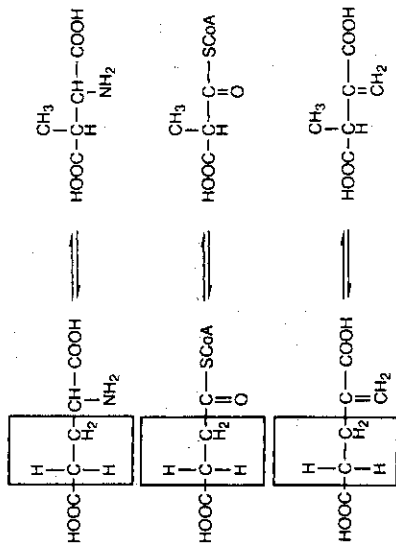


Adenosylcobalamin

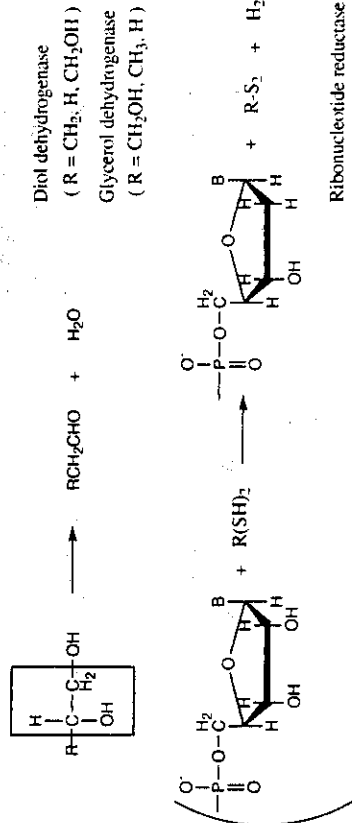
Main Reaction of B12 enzymes



C-C bond cleavage



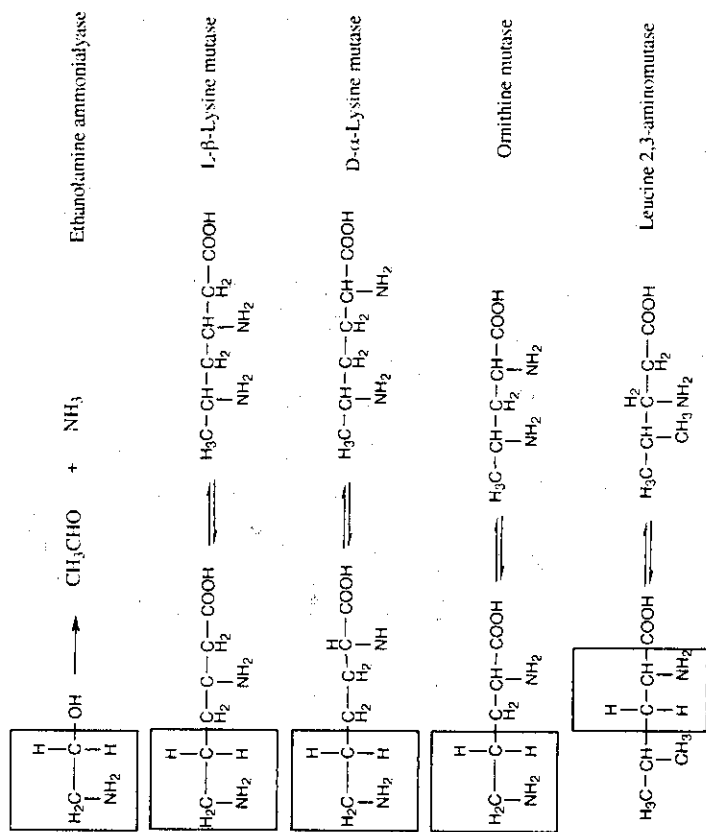
C-O bond cleavage



Main Reaction of B12 enzymes (2/2)



C-N bond cleavage



ビタミン B12 (シアノコバラミン)

- ・悪性貧血の予防と治療に有効な因子として発見され、抗悪性貧血因子とよばれている。
- ・生体内では補酵素型（アデノシルコバラミンあるいはメチルコバラミン）として存在する。
- ・コバルト(III)-炭素 σ 結合を分子内に持ち、異性化、脱離、転移、還元など水素移動を伴う酸素反応に水素移動を伴う酵素反応に水素運搬体として（アデノシルコバラミン）あるいはメチル基移動を伴う酵素反応にメチル基運搬体として関与している。

ビタミン B12 依存酵素

- ・アデノシルコバラミンに依存するものと、メチルコバラミンの関与するものに大別される。
- ・アデノシルコバラミンを持つ酵素は 11 種類が知られているが、このうちでリボヌクレオチドリダクターゼ活性を持つもの以外はいずれも共通の反応様式を示す。
- ・ビタミン B12 依存酵素の立体構造は、これまでにメチオニンシンターゼの B12 結合ドメインの構造解析が報告されているのみである。

メチルマロニル CoA ムターゼ Methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2)

細菌由来のもの

(*Propionibacterium shermanii* など)

$\alpha\beta$ 型のヘテロダイマーを形成

α 鎖が約 80kDa, β 鎖が約 70kDa

α 鎖のみに活性を持つ

真核生物由来のもの

(ヒトなど)

α_2 型のホモダイマーを形成

単量体は約 80kDa

なにが構造解析を困難にしたか

- 回折強度が弱い (非対称単位当たり 300kDa)
- 結晶の再現性が悪い
- 結晶間の同型性が良くない

→改良点

- 結晶化条件の改良
 基質類似体 (desulfoCoA) の導入
 20%グリセロールの添加
 アルゴン雰囲気下での結晶化
 seeding
- 95K でのデータ収集
- 高性能なデータ収集システム
 放射光およびイメージングプレート
- 斜方晶系結晶の白金誘導体の MAD データ
- 1 個の結晶を Native および誘導体として利用
- Density modification

構造解析に用いた結晶

結晶化条件

PEG+glycerol, pH7.5

アポタンパク+アデノシルコバラミン+
 CoA (あるいは desulfoCoA)

1. monoclinic $P2_1$ (pseudo-orthorhombic)
 $a=120$, $b=162$, $c=89\text{\AA}$, $\beta=104.5^\circ$
 非対称単位中に 2 分子
2. orthorhombic $P2_12_12_{(1)}$ (pseudo-monoclinic)
 $a=166$, $b=162$, $c=124\text{\AA}$
 非対称単位に 2 分子

構造解析に用いた電子密度図

4分子の平均化

monoclinic form 2分子

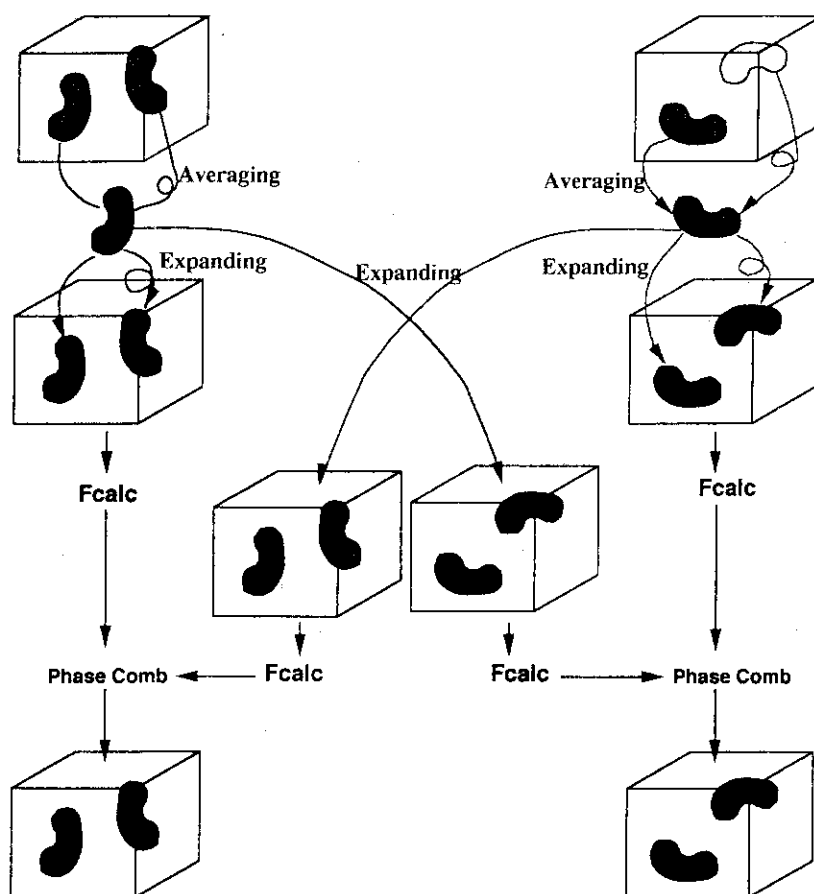
MIR

1つの誘導体が3.0Å, 残りの2つが3.15Å

orthorhombic form 2分子

MAD

Pt 誘導体 (計6波長) 3.2Å



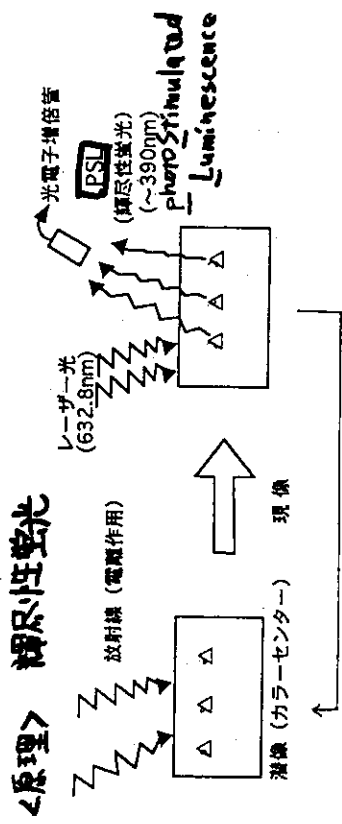
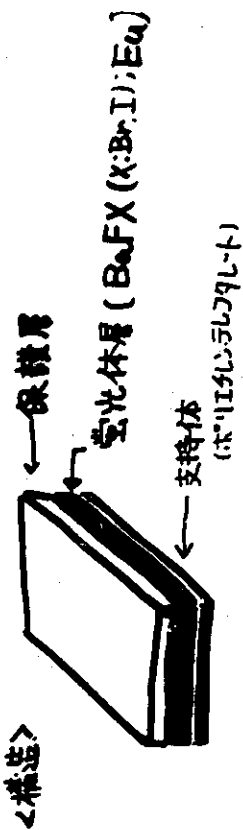
3. 中性子イメージングプレート

3.1 現状

唐澤裕子（日本原子力研究所 先端基礎研究センター）

中性子イメージングプレート

X線イメージングプレート



＜性能＞

＜検出効率＞

100%

＜ダイナミックレンジ＞

5桁

原研・研究炉利用課

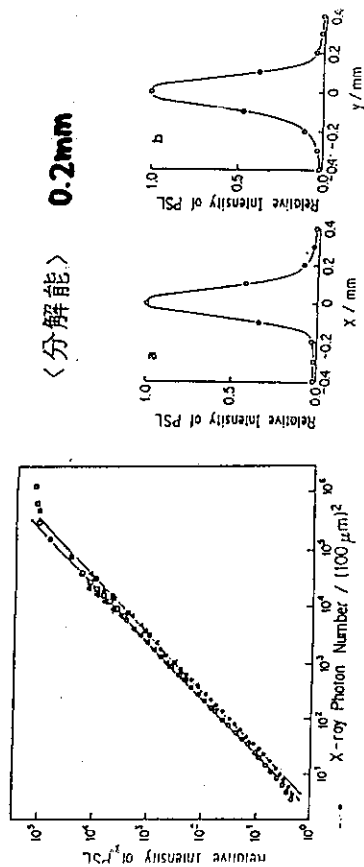
山田忠則

富士写真フイルム

高橋健治
田崎誠二

原研・先端基礎研究センター

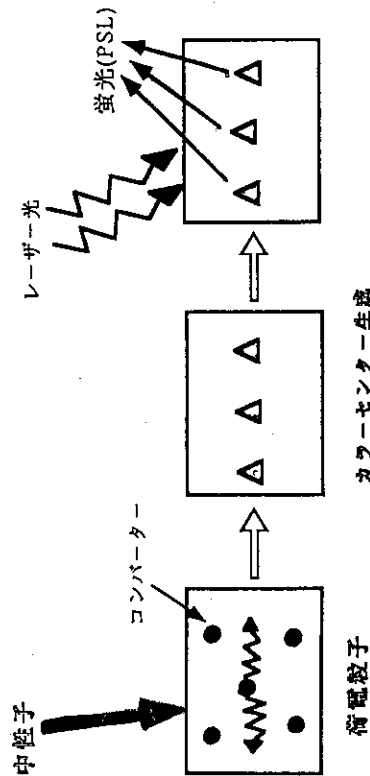
唐澤裕子
新村信雄



中性子イメージングプレートの開発

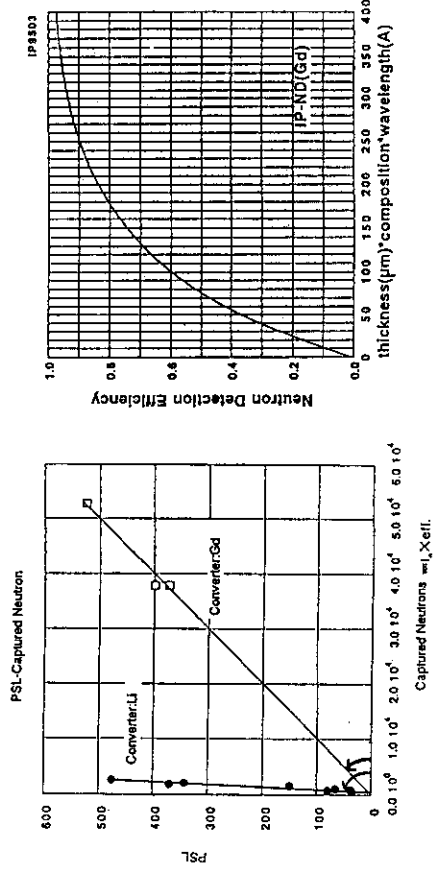
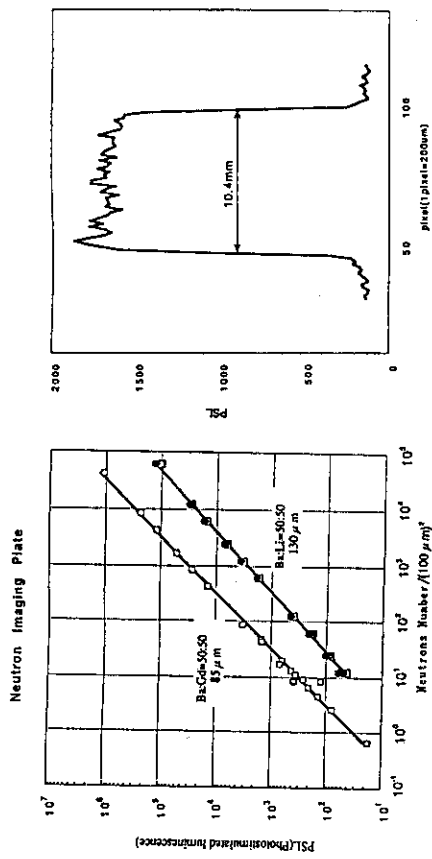
中性子は電荷を持たない

荷電粒子もしくは電磁波に変換するため
コンバーター物質と輝尽性蛍光物質を混ぜる



$n + \text{Gd} (n, e)$ 17,000 barn $e^- \sim 70 \text{keV}$
 $\bullet \text{Li} (n, \alpha)^3\text{H}$ 520 barn $\alpha: 2.05 \text{MeV}$
 $ \phantom{\text{Li}} \phantom{^3\text{H}}$ 2.74 MeV

中性子イメージングプレートの性能



新中性子イメージングプレート (IP-ND) の作製と性能実験

*IPの膜厚とコンバーターのモル比がIP-NDに与える影響を調べる

考え得る影響

中性子検出効率

捕獲中性子の厚み方向への分布

PSL (蛍光) の吸収

IP-NDの性能を

全て駆逐させる

→ 統一形式パラメータを

決定

*各実験にもっとも適したIP-NDを探す

波長、バックグラウンドの条件、など。

設計

コンバーター毎 (Gd, ⁶Li) に、膜厚、コンバーターのモル比を振る

実験

JRR-2 ビームポート

波長2.3Åの中性子

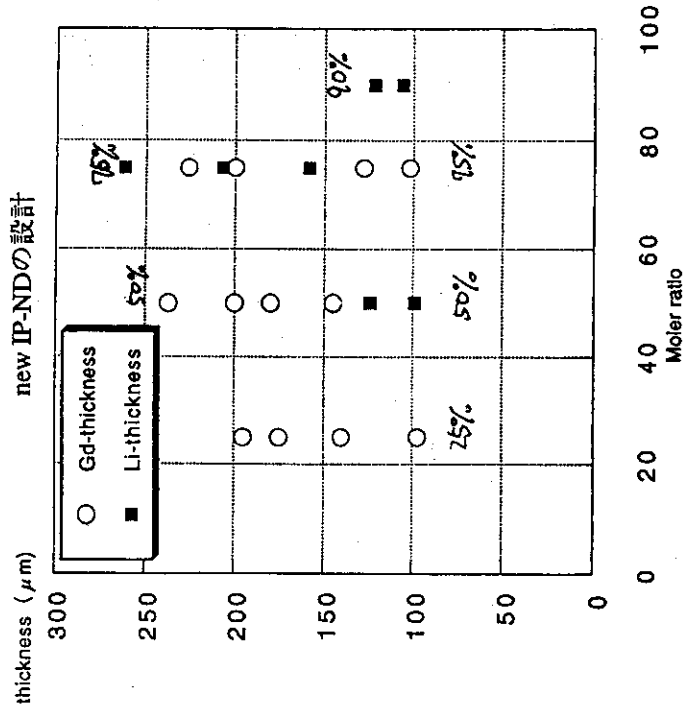
1.膜厚とモル比の影響

2.表入射と裏入射の違い

励起レーザーとPSL(揮発性蛍光) の減衰率をもとめる

膜厚とモル比の影響

*IP-NDで実用中



I. 中性子捕獲

↓

II. PSL 形成

↓

III. 読みとり

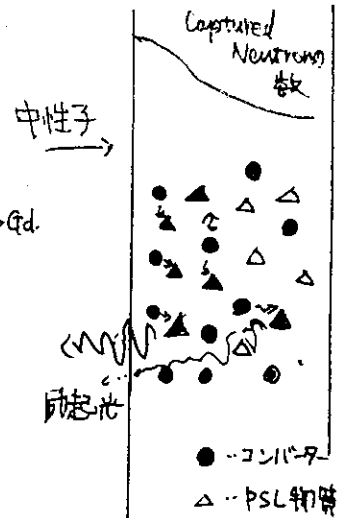
中性子検出効率 $1 - e^{-N\sigma t}$

ここで中性子が
検出されるが(厚み依存性)
(σ はPSL材での σ)

二次粒子エネルギー (PSL性能) $Li > Gd$

PSL物質の量 N_{psl}

レーザーと励起光の
透過率 e^{-at}



Gd-IP-検出効率の計算

Gd-IP

name	Density (Gd)	thickness	lambda	lambda			
				1	3	5	10
bg27-102 75%	2.39	102	74.47	98.34	99.89	100.00	
bg27-128	2.39	128	81.97	99.41	99.98	100.00	
bg27-200	2.39	200	93.12	99.97	100.00	100.00	
bg27-226	2.39	226	95.14	99.99	100.00	100.00	
bg55-145 50%	1.44	145	68.94	97.00	99.71	100.00	
bg55-180	1.44	180	76.58	98.72	99.93	100.00	
bg55-200	1.44	200	80.07	99.21	99.97	100.00	
bg55-237	1.44	237	85.21	99.68	99.99	100.00	
bg72-97 25%	0.66	97	30.13	65.89	83.35	97.23	
bg72-140	0.66	140	40.40	78.82	92.48	99.43	
bg72-175	0.66	175	47.63	85.64	96.06	99.84	
bg72-195	0.66	195	51.36	88.49	97.28	99.93	

Li-IP検出効率の計算

6Li-IP

name	Li-IP	Density	thickness	lambda			
				1	3	5	10
b127-159	15%	0.58	159	10.89	29.24	43.81	68.42
b127-207		0.58	207	13.94	36.25	52.78	77.70
b127-262		0.58	262	17.30	43.44	61.32	85.04
b155-99	50%	0.386	99	4.66	13.35	21.25	37.98
b155-124		0.386	124	5.81	16.43	25.86	45.03
b119-106	90%	0.696	106	8.81	24.17	36.94	60.24
b119-122		0.696	122	10.07	27.27	41.18	65.40

実験

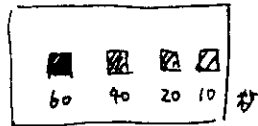
JRR-2

$\lambda = 2.3 \text{ \AA}$ ダイヤモンド

1. 全てのIP-NDに照射

Gd - 10, 20, 40, 60 sec

Li - 5, 10, 15, 20, 30 sec



↓
丸1日放置

($T_1 - T_2$ の効果をなくすため)

24 hrs. 以上おくと誤差は約 2% 以下になる

↓
読み取り (積分強度を以て B.G. を差し引く)

↓
単位 sec 当りの PSL 点を測り出す

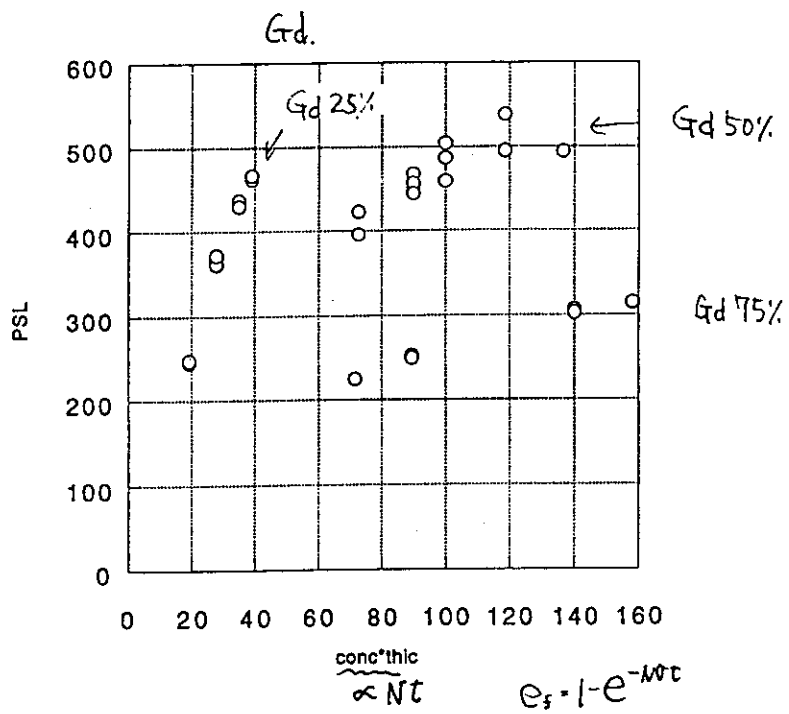
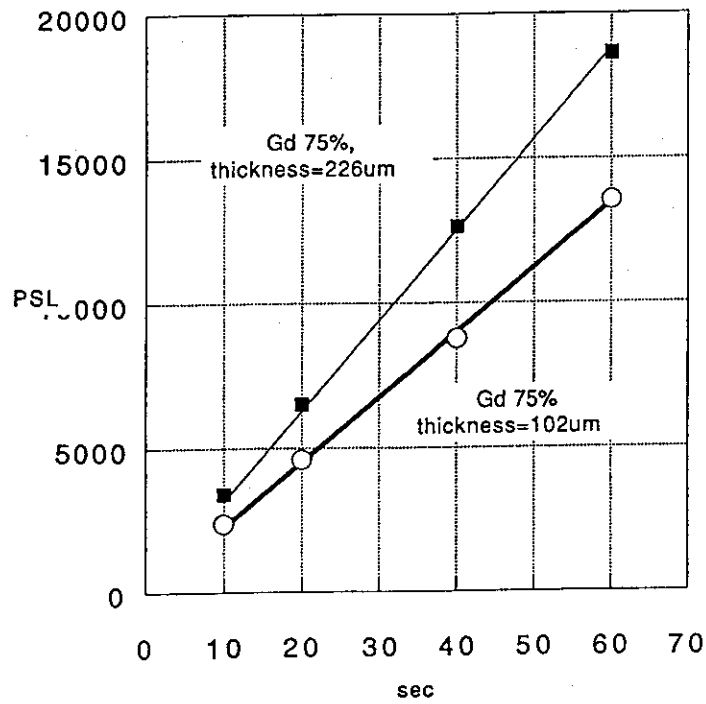


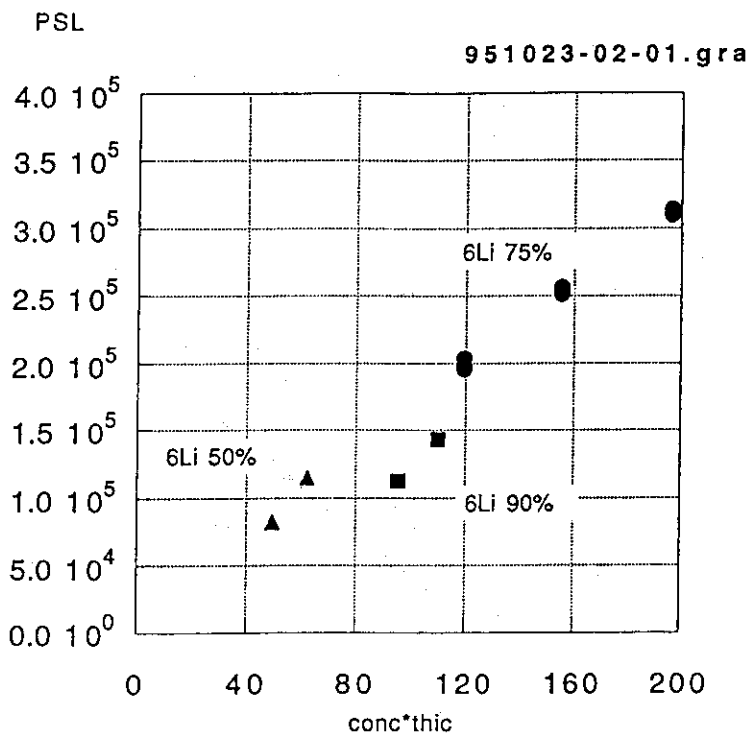
2. 表と裏の比較

表に 2ヶ所 裏から 2ヶ所照射

↓
積分値をとり、各々の平均値を出す







IP-ND. 厚み・比依存性.

I, II のプロセスをみる.

(中性子捕獲, PSL生成)

$$PSL = I_0 (1 - e^{-N\sigma t}) \cdot P \cdot N_{psl}$$

P: 1つの Captured Neutron が作りうる PSL の回数

N_{psl} : PSL物質の単位体積当りの回数.
(\propto 充填密度)

P: Converter に依存する値

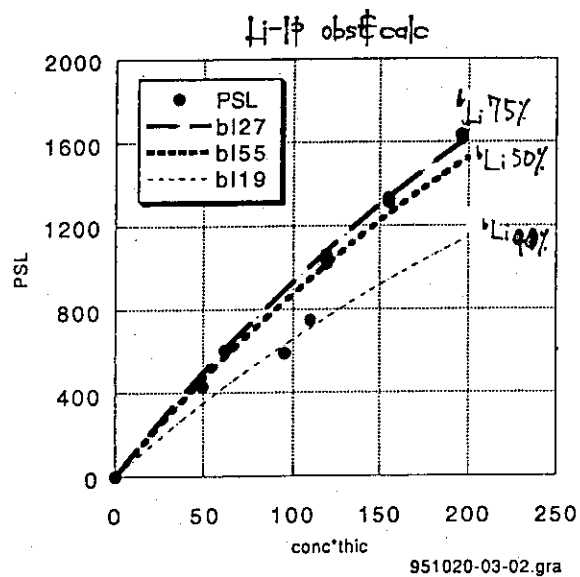
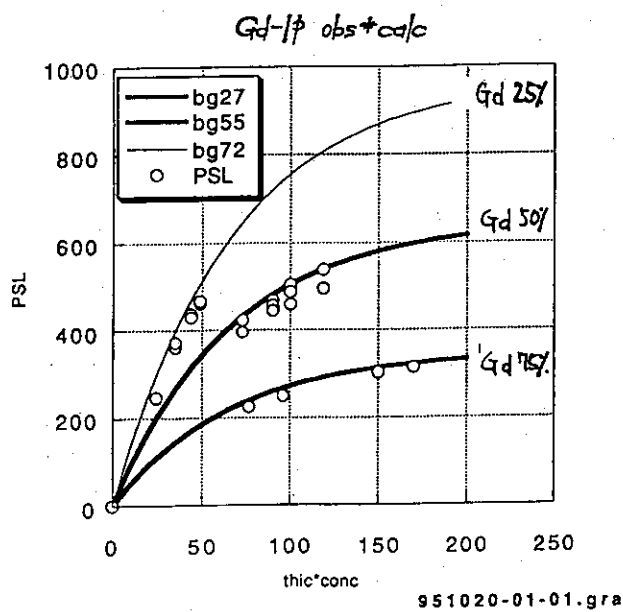
$$G_d \dots P \times I_0 (1 - e^{-N\sigma t}) > N_{psl}$$

(IP-ND に含まれる PSL物質が足りないとき)

制約は PSL物質の量

$$G_{Li} \dots P \times I_0 (1 - e^{-N\sigma t}) < N_{psl}$$

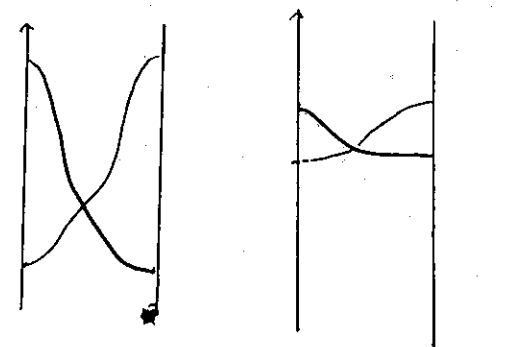
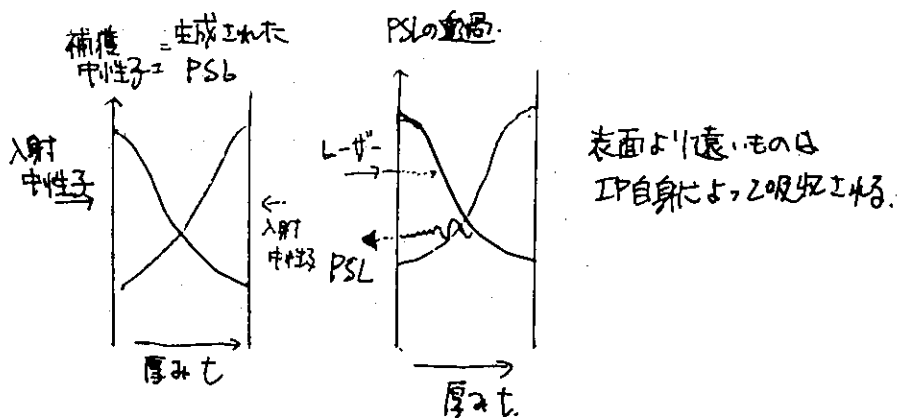
制約は 検出効率



IP-ND 表と裏の効果

II. III. のプロットをみる

(どこに中性子がひたるか、PSLの透過率)

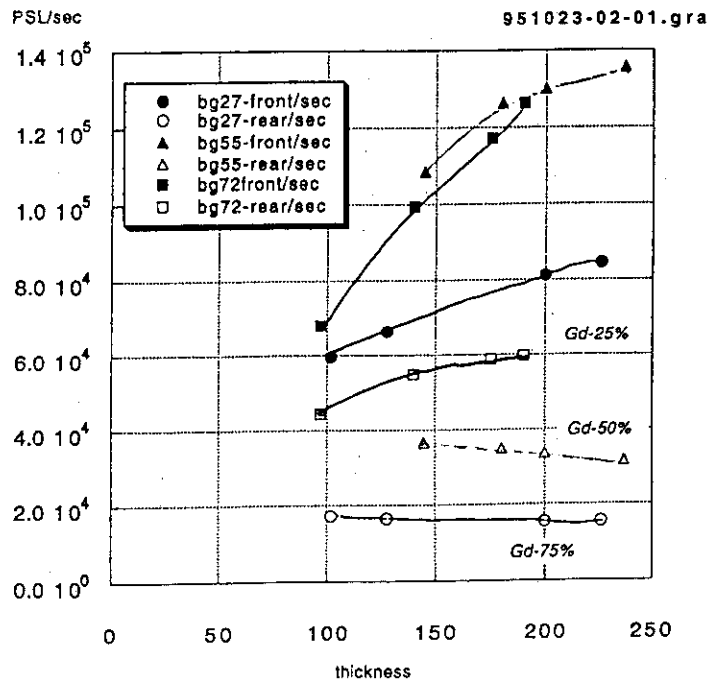


コンバータが近い
(検出効率が高い)

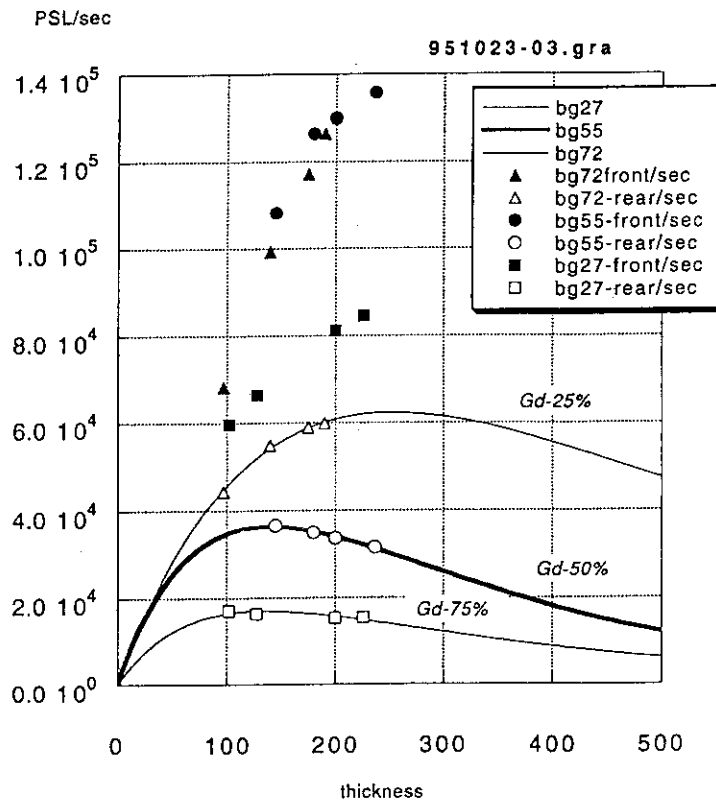
コンバータが近い

表と裏のちがいが
大きい

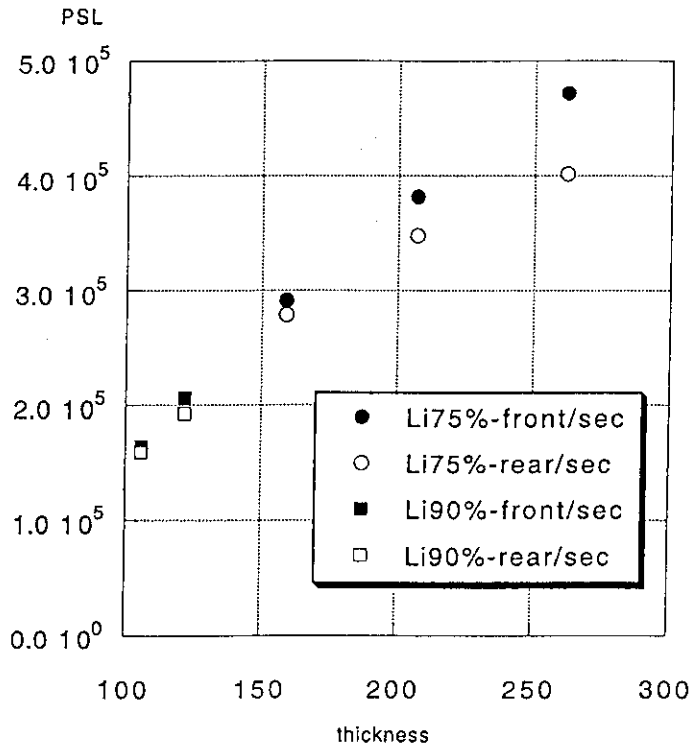
小さい



強度補正後



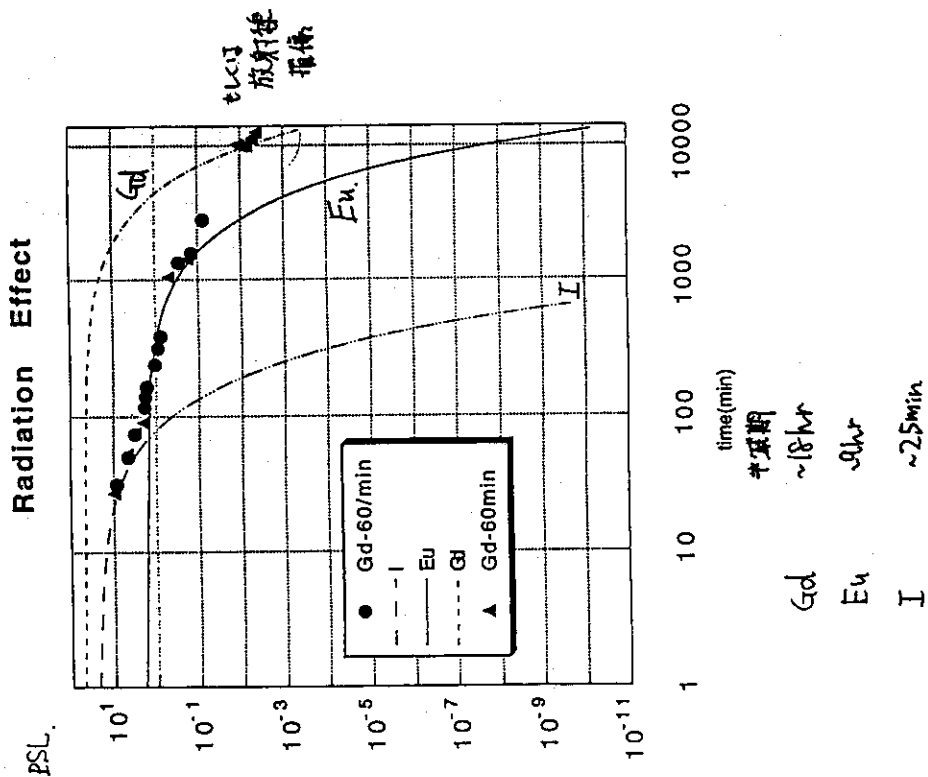
表裏 Gd-ID
強度補正後



Gd と ⁶Li の比較

	Gd	⁶ Li
Cross Section (A)	17.000	520
反応	Gd(n, e)	⁶ Li(n, α) ³ H
2次粒子のエネルギー	e ~ 70 keV	α (2.05 MeV) ³ H (2.74 MeV)
PSL生成能	1	~30
検出効率	~100%	~15% (短波長) ~70% (長波長)
S/N		長波長側では高い。
特徴	短波長での実験	長波長での実験 Neutron/Gamma ratio が 高い。

JRM00011: 241004-41F505HAWAII
 (P:20*40 Grad:256 Res:200 Sens:10000 Lat:4 Read:Oct 3 12:19 1994
 Width:204.0mm Height:276.0mm Mag:100%

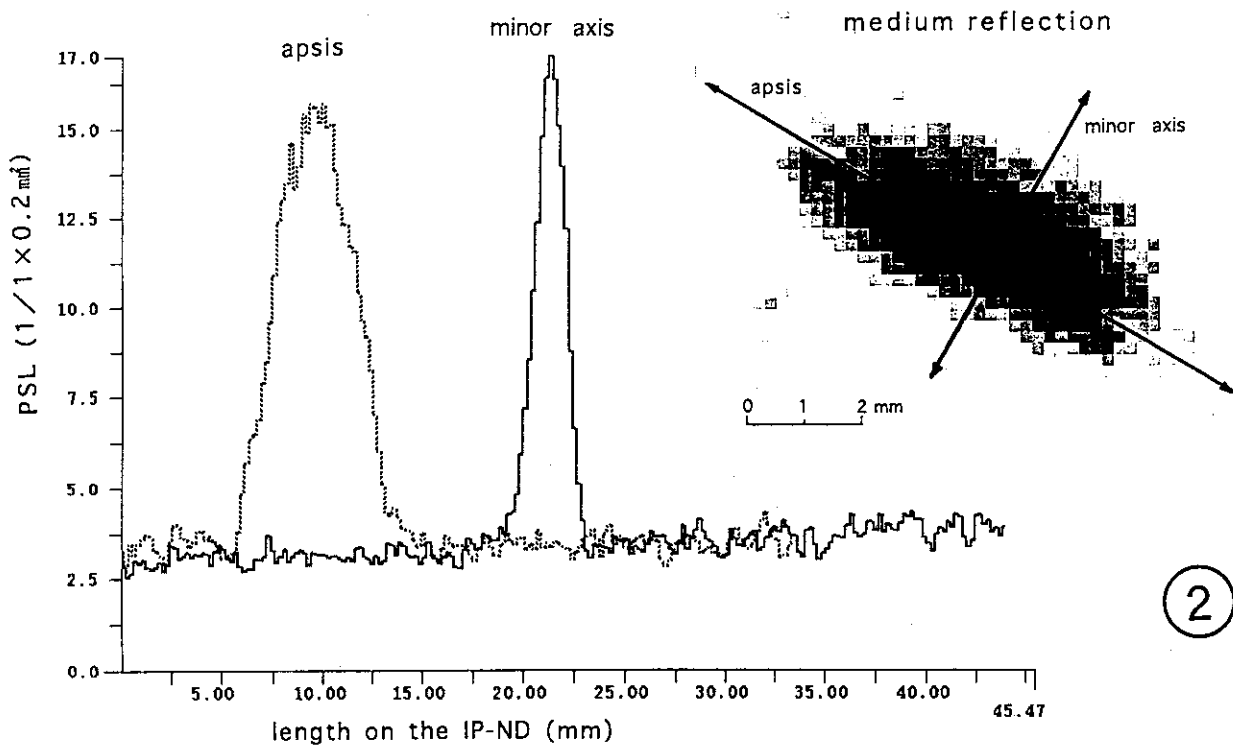
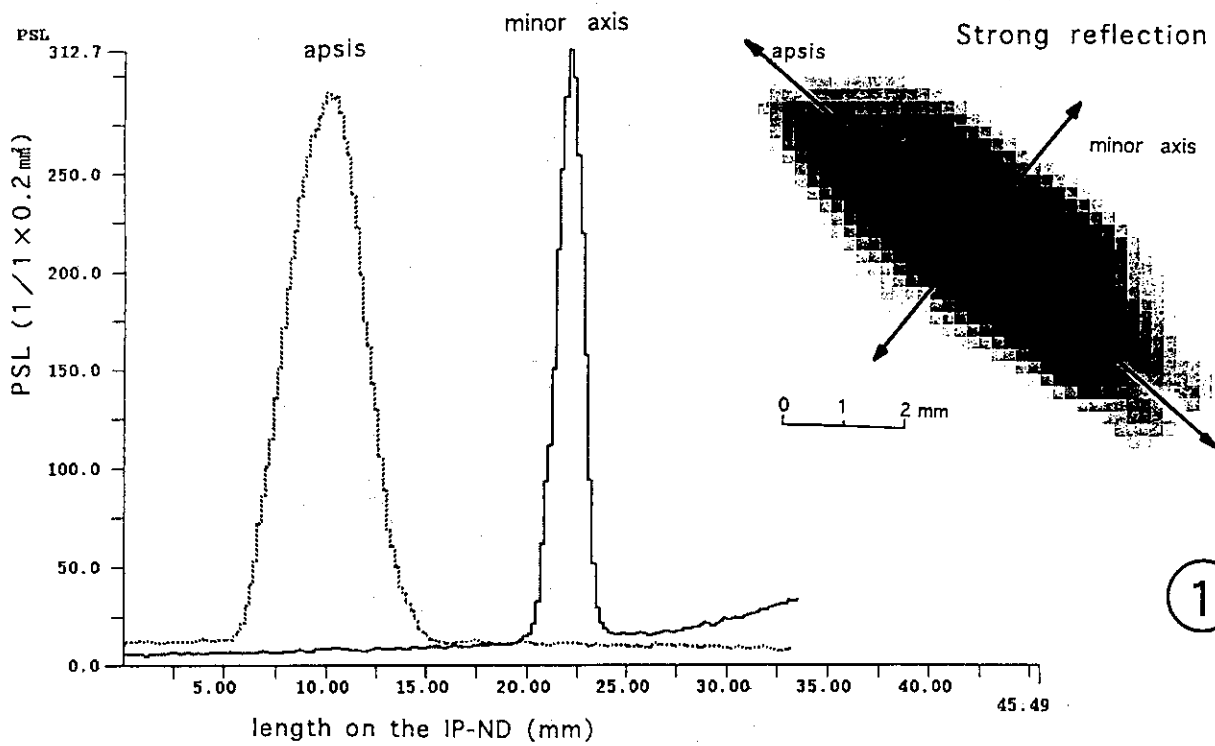


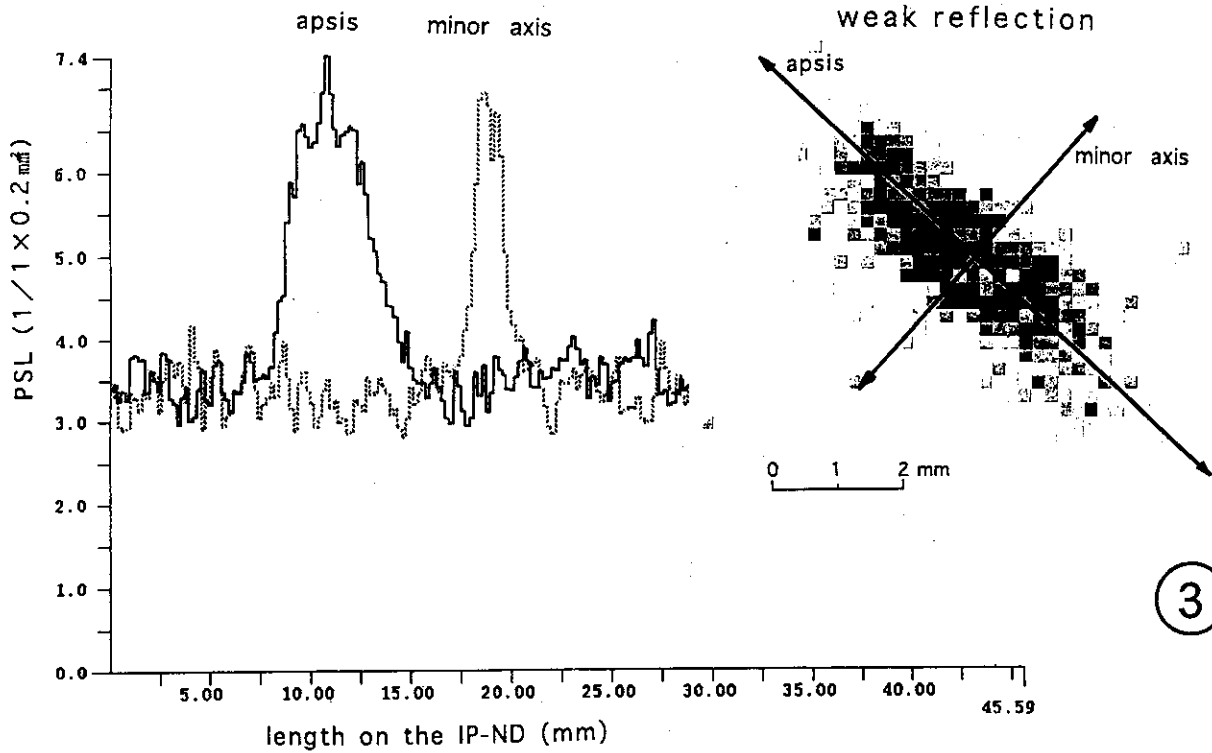
0 10 20 30mm

③

①

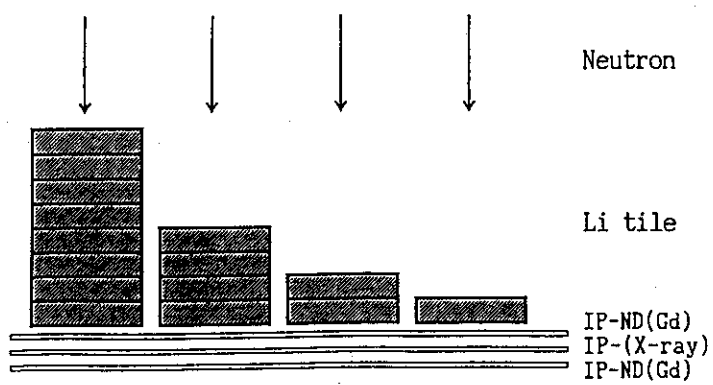
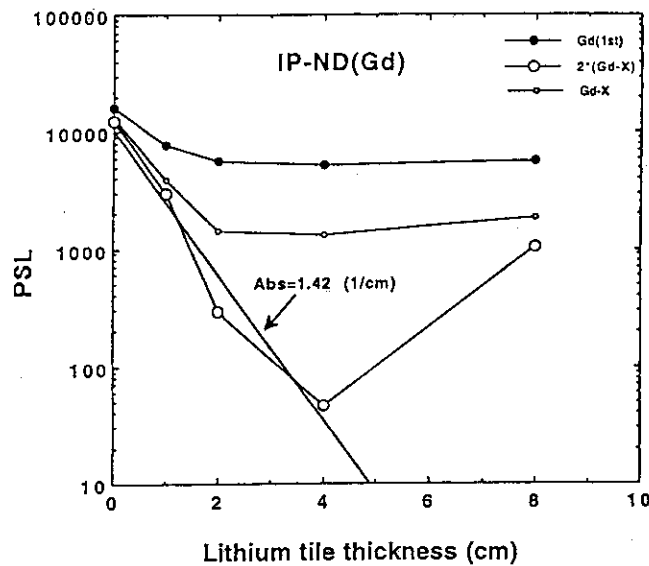
②





3

丁線 9 のひきかた



3.2 結晶構造解析への応用(1)

岩田 豊 (京都大学原子炉実験所)

結晶構造解析への応用 (1)

I P-ND と 4 軸型単結晶中性子回折計との組み合わせに関する検討

京大炉 岩田 豊

中性子検出器としての IP-ND の中性子検出効率が格段に上昇した事を考慮して、回折計の性能の改善と言う観点から KUR の単結晶用 4 軸型中性子回折計において現在使用中の面積 BF₃ カウンターと I P-ND 使用の利点について再検討した。

KUR 4 軸型単結晶中性子回折計の仕様 :

中性子束 : $4 * 10^4$ n/cm².sec , at sample position

角度範囲 : 100 degree in 2-theta

波長 : 1.015 Å

Sample to Counter distance : 100 cm

Step scan mode

[Example として]

試料 : d-Lithium-thallium-tartrate-mono hydrate (d-LTT)

(LiTlC₄H₄O₆ H₂O ; 0, 30, 70, 95% deuterated)P 2₁2₁2 --> P 2₁ ? (phase transition)

a=7.894(3) b=14.658(6) c=6.401(3) Å

displacive phase transition at 10 K (H-salt, D-salt ?)

2θ, within 100 degree

number of independent reflections=1453

He Cryostat (4 K) 使用

同一サンプルによるデータの比較が必要か? -----> B I X へ

構造解析用装置への応用 :

中性子ワイセンベルク法カメラとして高感度、高精度のものが期待できる

逆格子空間の探索 :

中性子用プリセッションカメラとして散漫散乱、超格子反射、異方性消衰 効果等の研究に有効であろう。(平板と曲板の利用)

「結論」 微分型と積分型の特長を考慮すれば、反射強度測定、温度変化等の実験目的によってカウンター法とフィルム法の双方が測定法として共存してしかるべきであるが、構造解析用の強度測定装置に限定すれば IP のメリットは大きく、更に読みとり系の大型化、又は装置の小型化によっては、温度変化の測定も含めて(ソフトによる工夫要?) IP は全く新しい発想での回折装置の開発の可能性を秘めていると云えよう。

3.3 結晶構造解析への応用(II)

野田幸男 (千葉大学理学部)

イメージングプレートを使用した結晶構造研究

千葉大学理学部
野田幸男

構造相転移に伴う原子の微少変位
.....物性の発現、微視的相互作用

回折実験
.....超格子反射の出現

現在、X線回折の装置で使用している

装置と測定例を示す

中性子回折で実現すれば
どのような価値があるか

生体物質

格子定数が大きい
..... $1/v$ で強度が弱い
.....逆格子が短いので多数の回折点

通常の物質

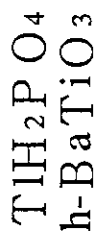
強度は比較的強い
Braggの数はそれほど多くない

構造解析は4軸回折計で出来る
3日程度でデータは取れる

構造相転移で現われる超格子反射
非常に弱い
どこにも出ない
.....写真法が有効

中性子散乱のX線回折との違い

- 重い原子と軽い原子が混在するとき
 酸素、水素は誘電体で重要
 遷移金属など重い原子も重要



- 低温での構造解析
 X線用クライオスタットの吸収
- 一次転移に伴うドメインの発生
 中性子粉末回折

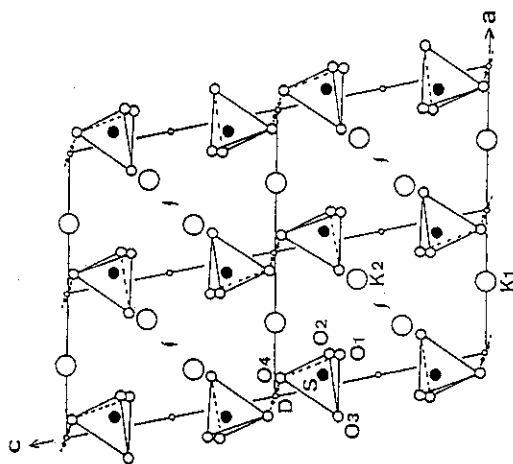
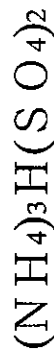


図 1.3: K₃HS の室温相での構造⁽¹⁴⁾。水素結合は SO₄-H-SO₄ ダイマー内には存在しない。

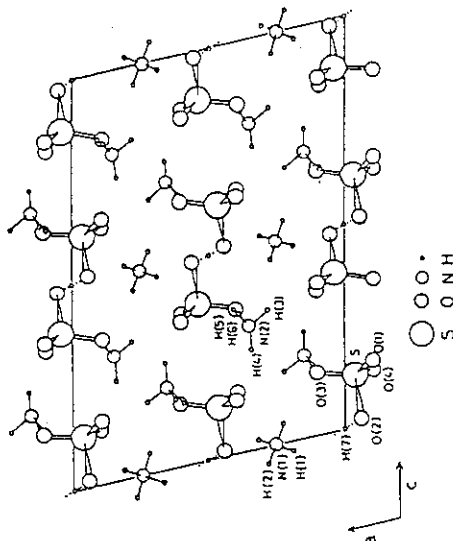


図 1.4: A₃HS の室温相での構造⁽¹⁵⁾。K₃HS の室温相での構造と非常によく似ている。

低温の構造と相転移の機構

V点 (0 1/2 1/2) ··· q₁, q₂
 Z点 (0 1 1)
 Γ点 (0 0 0)

の凍結の競合

物理学会講演集 田村、石橋、秋山、黒岩、野田 1993年秋

物理学会講演集 田村黒岩、野田 1994年秋

primary order parameter
 secondary order parameter

原子変位のパターン
 低温での構造解析

III相の構造解析

我々の結論 ··· Z点の凍結のみ
 P2/n

塩崎さん達の結論 ··· Z点とΓ点

P2 Acta Cryst Tanaka and Shiozaki C42(1986)776.

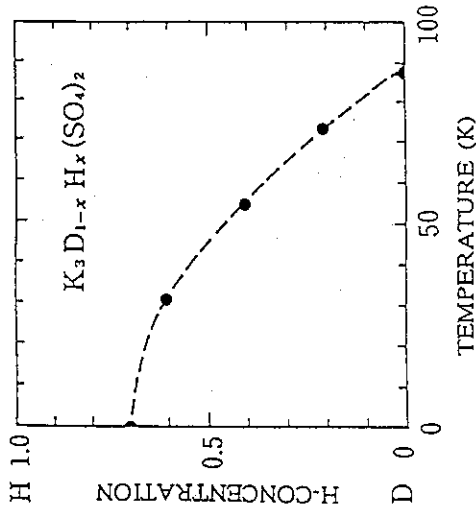


図 1.1: K₃H₂D_{1-x}(SO₄)₂の x (重水素置換率) と相転移温度との関係⁽¹²⁾

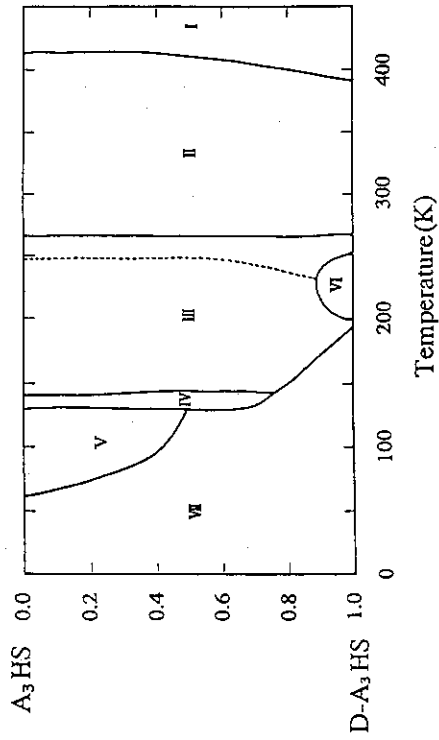


図 1.2: (NH₄)₃H_{1-x}D_x(SO₄)₂の x (重水素置換率) と相転移温度との関係⁽¹³⁾

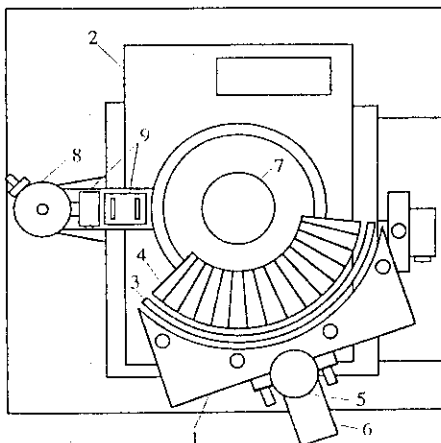
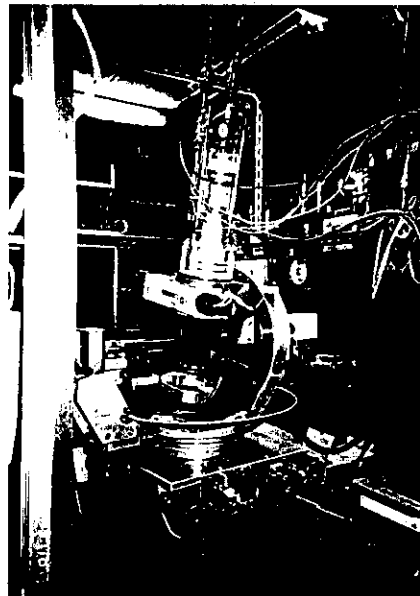
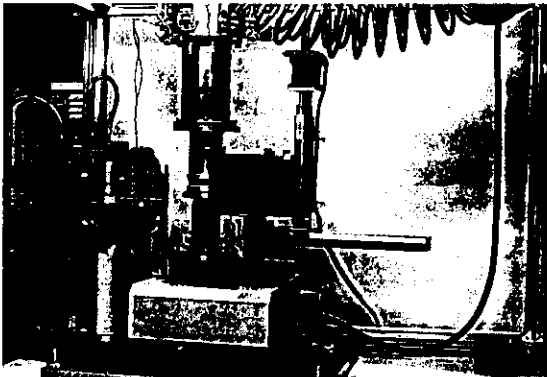
X線装置

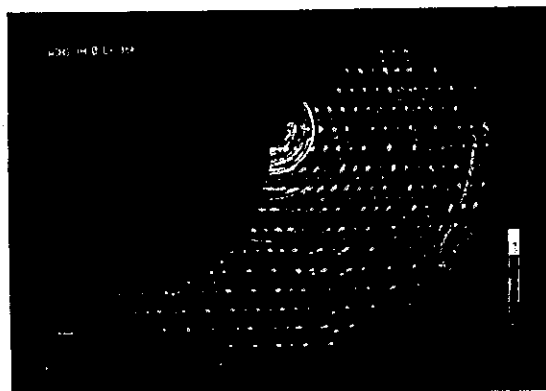
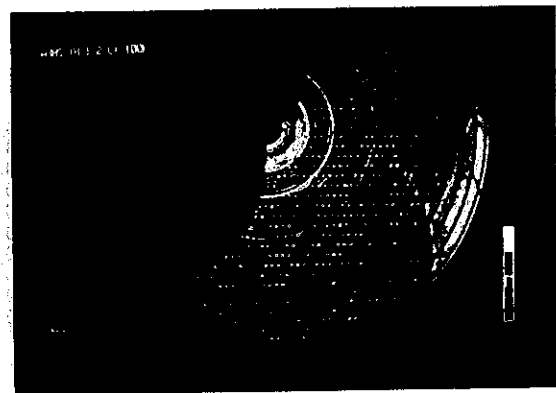
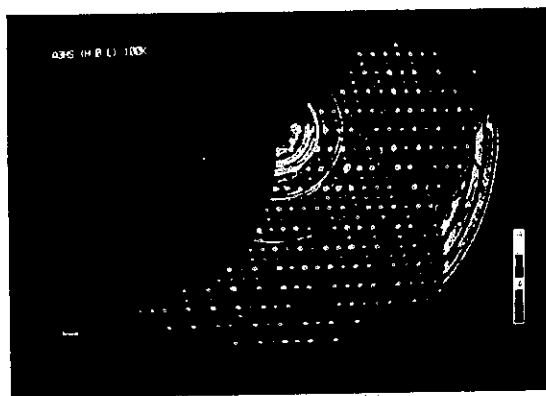
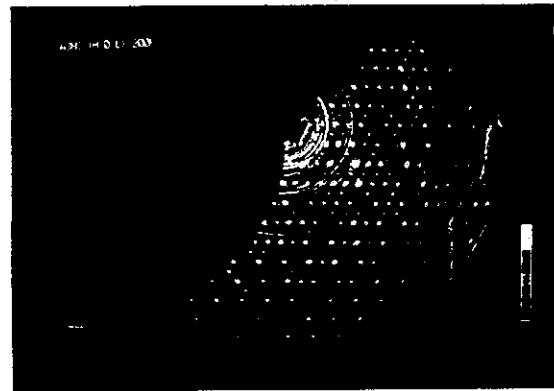
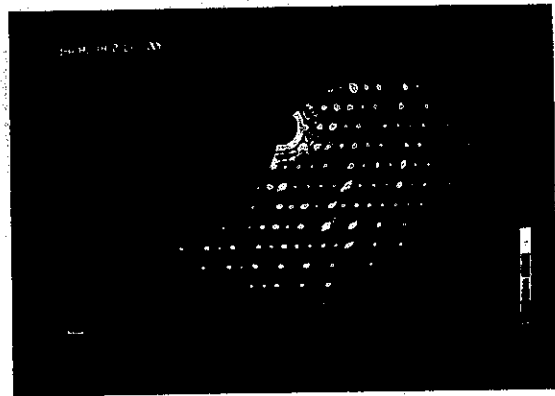
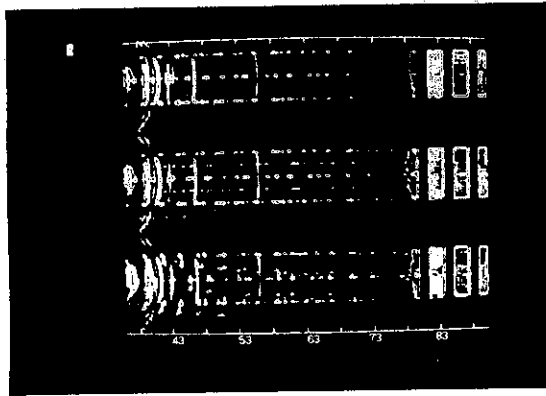
[空間群の決定]

イメージングプレート使用のワイセ
ンベルグカメラとクライオスタット

[強度測定]

オフセンター型4軸回折計とクライ
オスタット





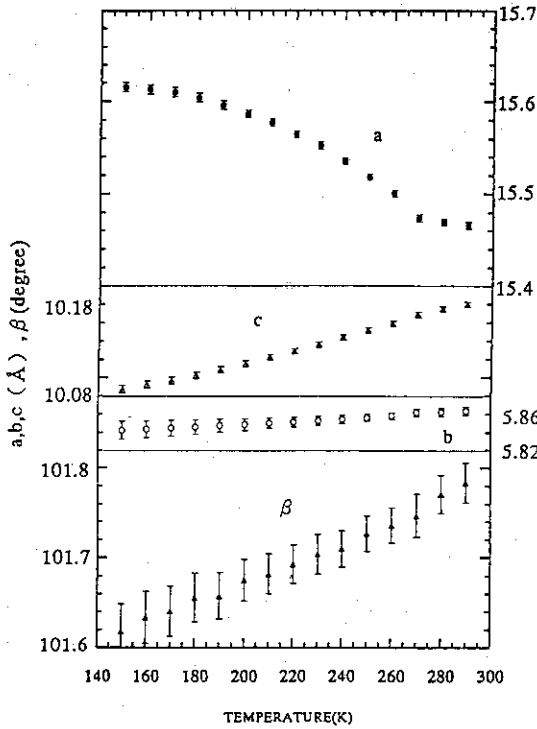


図8: A₃HSの格子定数a,b,c, βの温度変化

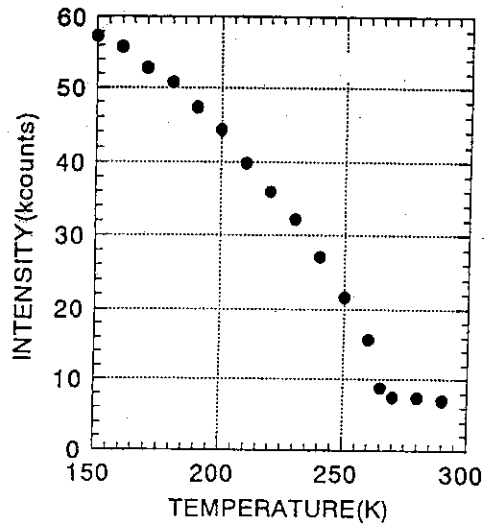


図9: A₃HSのZ点(90 l)の強度の温度変化

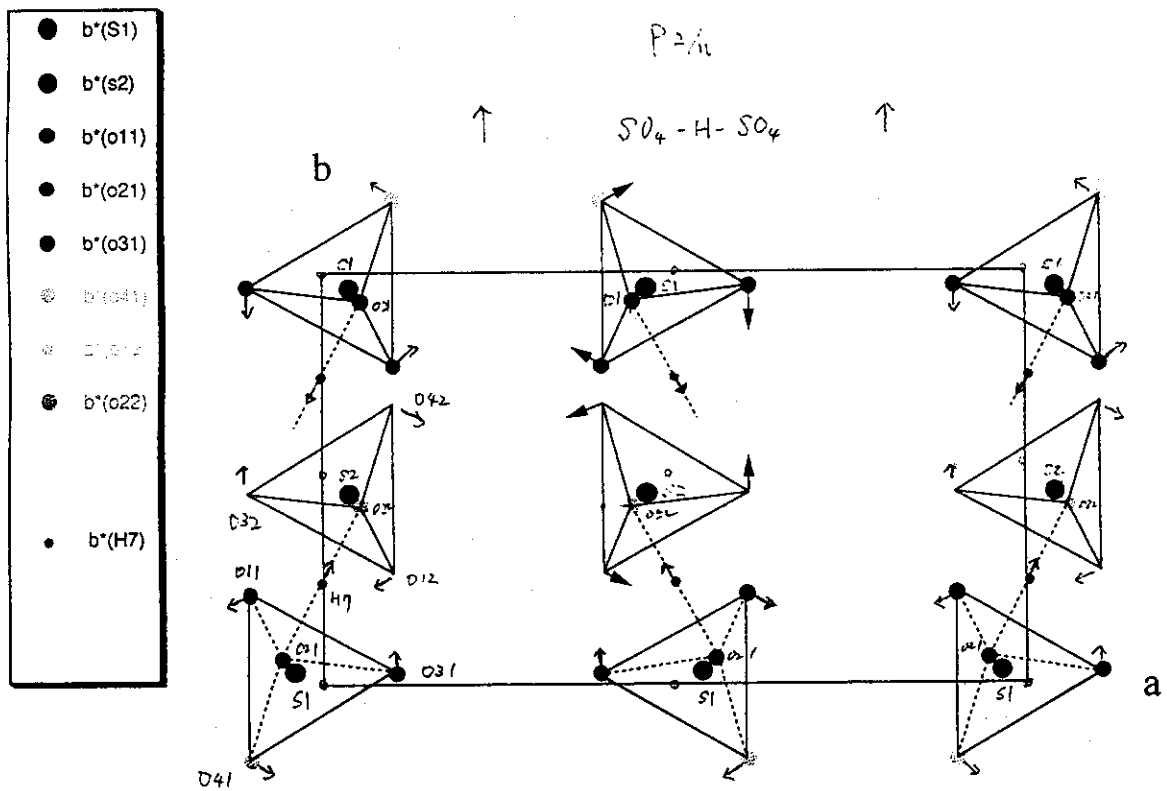
ATWCOD2. XLS

C2/c (room temp structure)	P2/n model (starting)	P2/n 150K (result)	
N1 0 -0.26986 0.75	N11 0.25 -0.01986 -0.25	N11 0.25 -0.02116 0.75	
N2 0.19907 -0.72389 0.65242	N12 0.75 0.48014 -0.25	N12 0.75 0.47563 0.75	
S 0.11420 -0.21817 0.46134	N21 0.44000 -0.47389 -0.34758	N21 0.45118 -0.46923 0.64788	
O1 0.14901 -0.02697 0.39796	N22 0.94000 0.02611 -0.34758	N22 0.94966 0.02248 0.65671	
O2 0.01454 -0.18452 0.44273	S1 0.36420 0.03183 0.46134	S1 0.36055 0.03450 0.46235	
O3 0.15058 -0.22282 0.60501	S2 0.86420 0.53183 0.46134	S2 0.86625 0.52940 0.46047	
O4 0.12842 -0.43325 0.39830	O11 0.39901 0.22303 0.39796	O11 0.39405 0.20630 0.37926	
H1 0.02398 -0.67491 0.30547	O12 0.89901 0.72303 0.39796	O12 0.90254 0.73902 0.41492	
H2 0.03788 -0.79247 0.22347	O21 0.26454 0.06548 0.44273	O21 0.26340 0.07124 0.44753	
H3 0.18527 -0.72292 0.71978	O22 0.76454 0.56548 0.44273	O22 0.76637 0.56077 0.43727	
H4 0.25560 -0.70637 0.64580	O31 0.40058 0.02718 -0.39499	O31 0.40069 0.06380 0.60708	
H5 0.16108 -0.61319 0.61098	O32 0.90058 0.52718 -0.39499	O32 0.89784 0.49147 0.60590	
H6 0.17698 -0.86426 0.62297	O41 0.37842 -0.18325 0.39830	O41 0.37477 -0.19883 0.41600	
H7 0 0 0	O42 0.87842 0.31675 0.39830	O42 0.88081 0.33037 0.38009	
	H11 0.27398 -0.42491 0.30547	H11 0.28681 -0.39425 0.31203	0.942
	H12 0.77398 0.07509 0.30547	H12 0.78569 0.07456 0.31110	3.645
	H21 0.28788 -0.54247 0.22347	H21 0.28458 -0.54138 0.23606	3.098
	H22 0.78788 -0.04247 0.22347	H22 0.78998 -0.05626 0.23173	2.017
	H31 0.43527 -0.47292 0.71978	H31 0.43416 -0.42637 0.71646	1.176
	H32 0.93527 0.02708 0.71978	H32 0.92842 -0.04835 0.72548	1.657
	H41 0.50560 -0.45637 0.64580	H41 0.50659 -0.44970 0.65610	0.166
	H42 1.00560 0.04363 0.64580	H42 1.00674 0.03862 0.68201	1.940
	H51 0.41108 -0.36319 0.61098	H51 0.41243 -0.38254 0.57319	1.082
	H52 0.91108 0.13681 0.61098	H52 0.92305 0.17761 0.63499	2.065
	H61 0.42698 -0.61426 0.62297	H61 0.43897 -0.63177 0.63141	0.894
	H62 0.92698 -0.11426 0.62297	H62 0.93249 -0.07254 0.58069	0.815
	H71 0.25 0.25 0	H71 0.25492 0.29366 -0.01976	2.808

Rf=3.45

原点を1/4 1/4 0 移動
C格子で等価な原子を非等価とする

Rf=3.68%



ガイドホール(T22)に

4軸回折装置と

イメージングプレート使用の

写真法を

バックグラウンドが少ないので
 弱い超格子反射の発見の仕事に
 効果的

3.4 粉末回折への応用

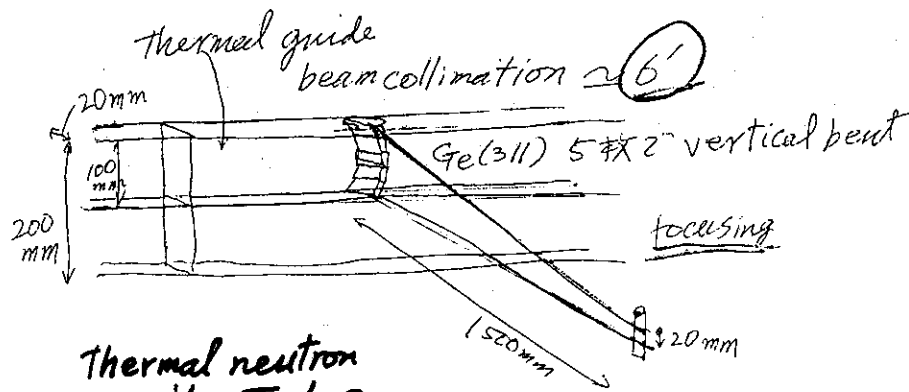
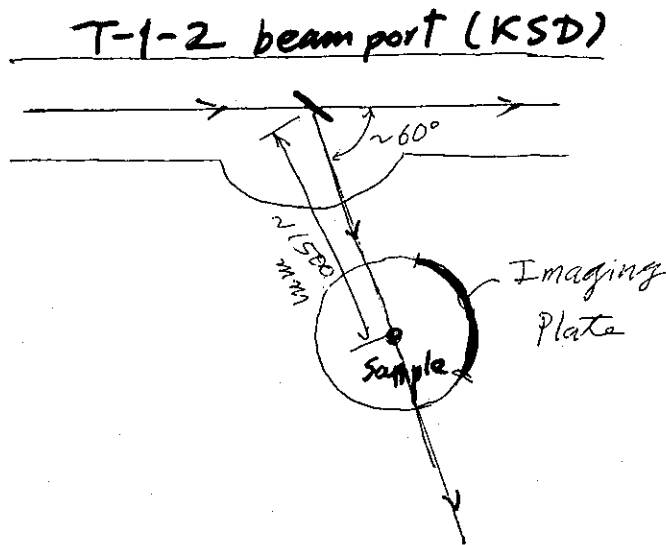
山口泰男 (東北大学金属材料研究所)

中性子イメージングプレートへの 粉末回折への応用

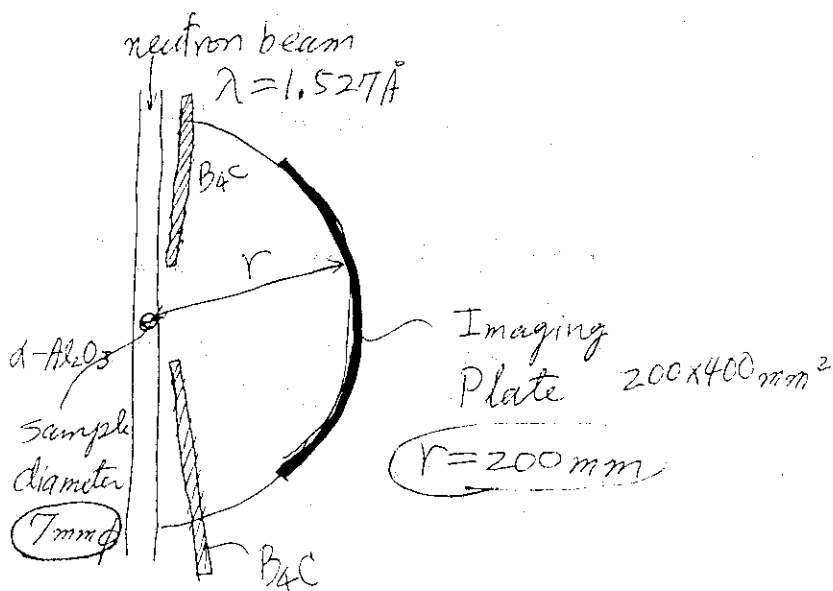
山口泰男 (東北大金研)

唐沢祐子 (原研先端基礎
研究センター)

新野信雄 (")



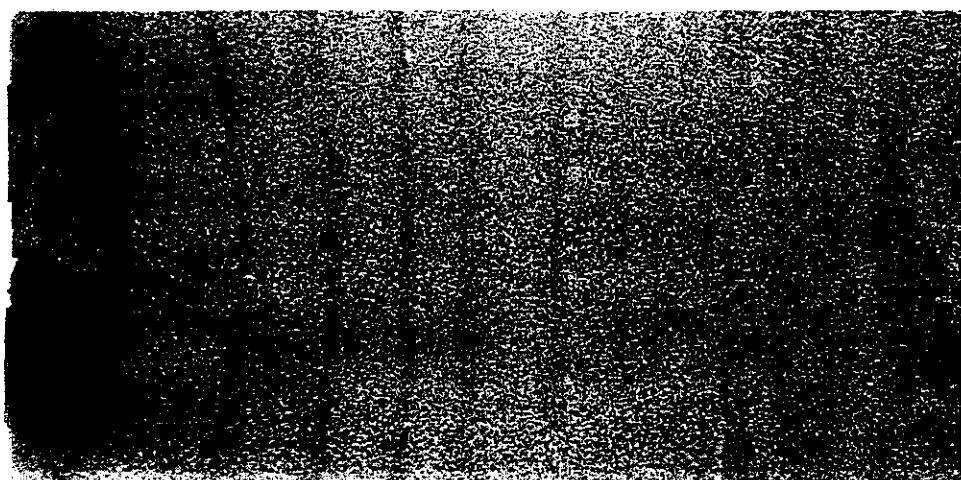
Thermal neutron
guide T-1 の
上側 10cm の beam を使用 (211)。



(B)

Sample $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (7mm ϕ のV容器入り)
 film 半径 200mm

film 18
 200 X
 400
 mm²



低角

2 θ →

高角

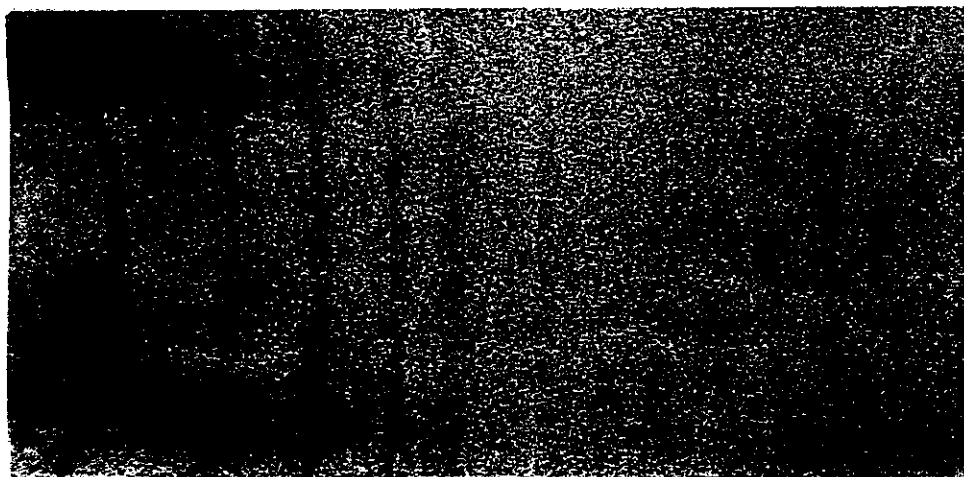
Width: 196.0mm Height: 197.6mm

Mag: 50x

③

Sample α - Al_2O_3 (7mm ϕ のV容器入り)
 film 半径 200mm, B_4C 遮蔽
 film size 200x400mm²

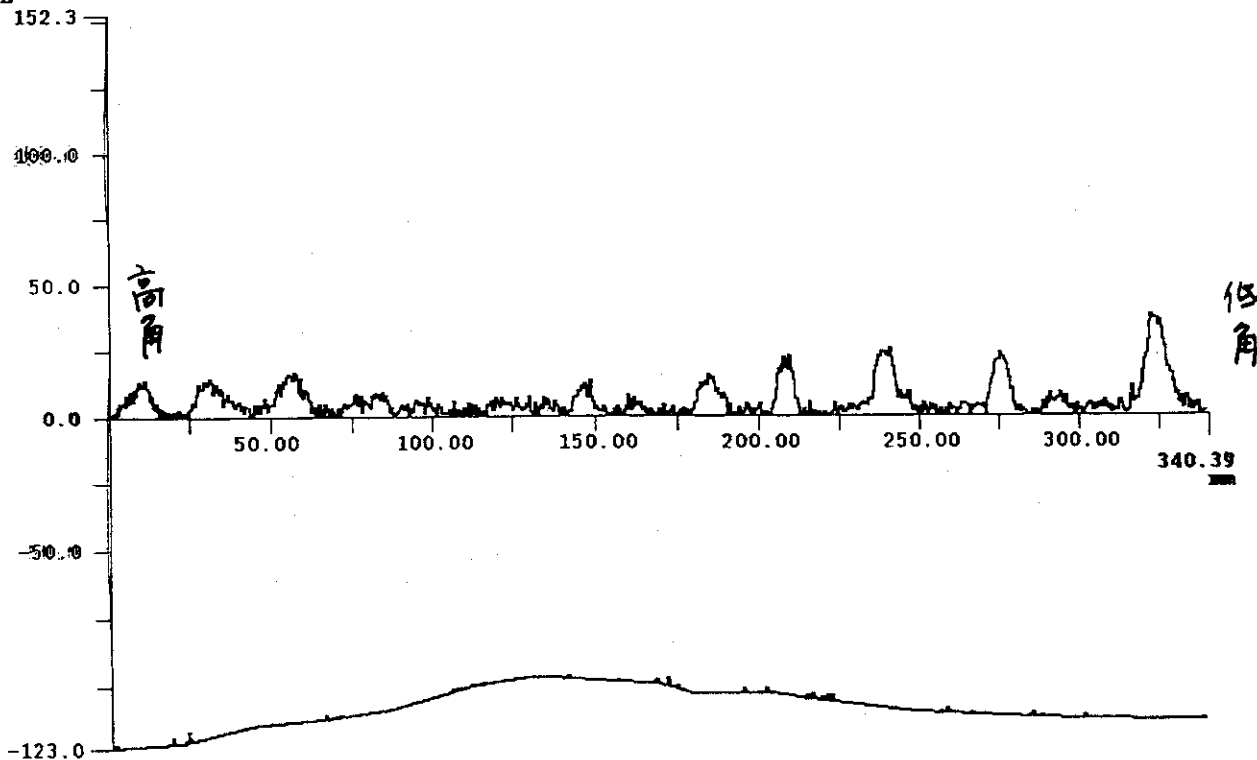
Name : 950822-01
 Comment : 55min-Beam:10000
 IP:20*0 Grad:256 Res:200 Gen:10000 Lat:4 Read:Aug 22 14:53 1995
 Width:195.2mm Height:391.2mm Mag:50

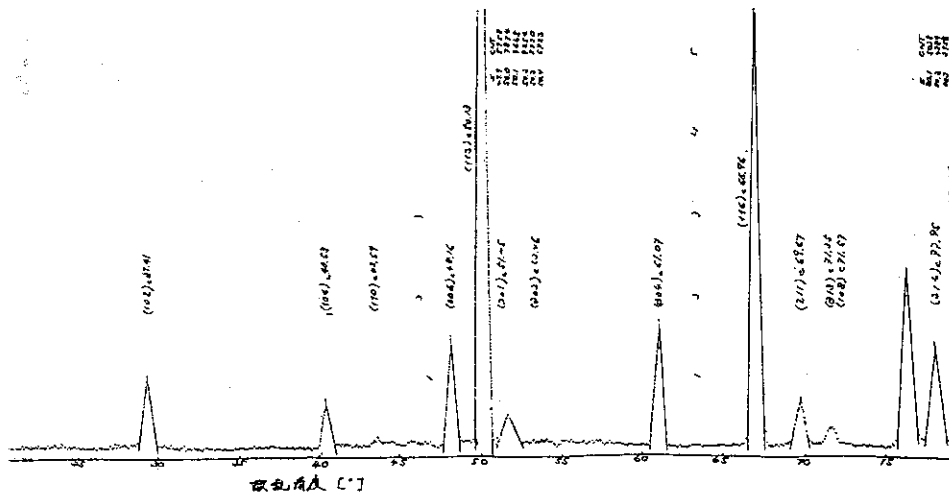
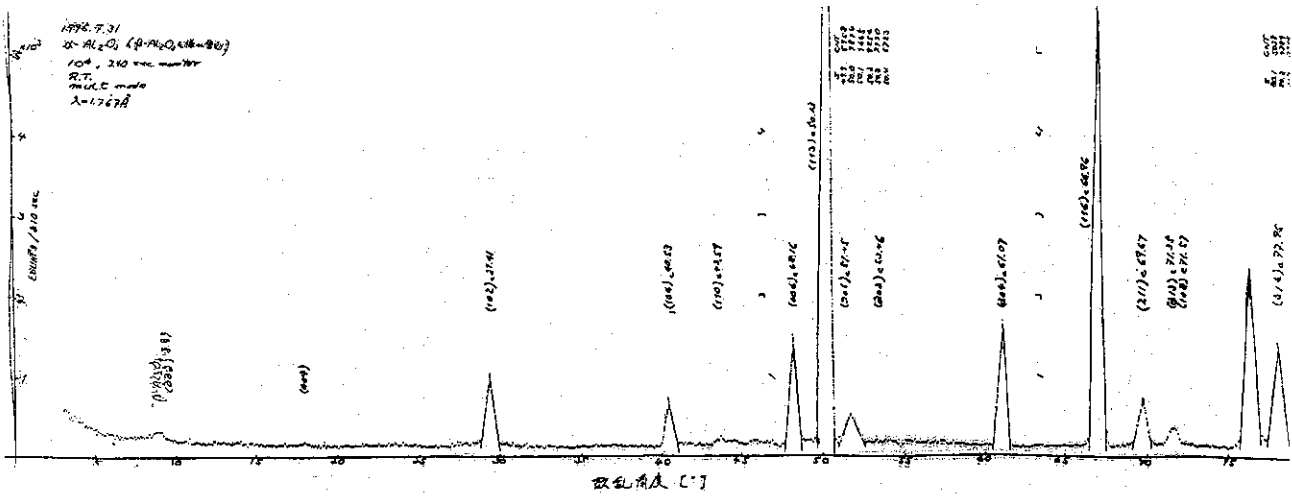


低 角 \uparrow (113) \uparrow (114) \uparrow (300) 高 角
 42.8° 57.0 67.6° $2\theta \rightarrow$

Profile ID = 1

PSL

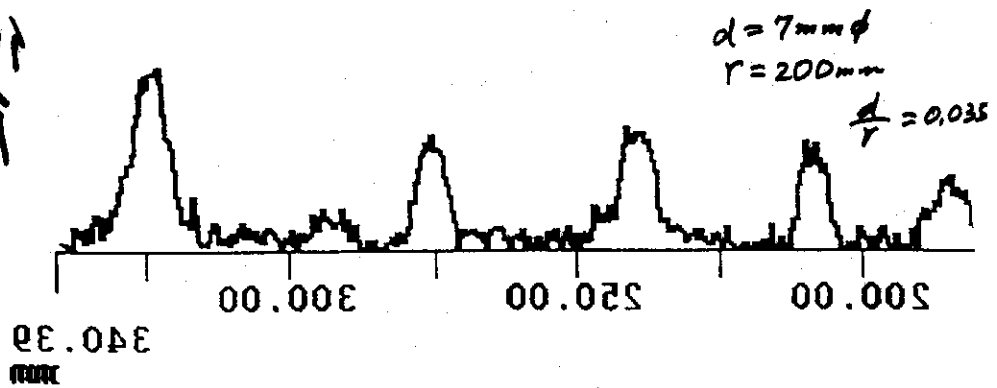




$d = 10 \text{ mm } \phi$
 $r = 1100 \text{ mm}$

$\frac{d}{r} = 0.0091$

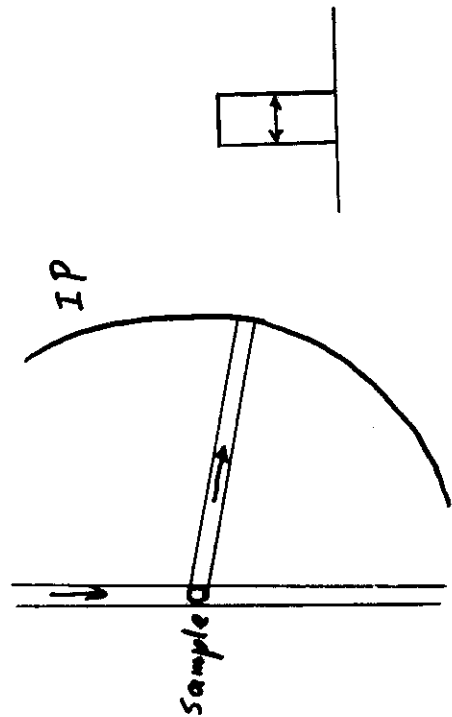
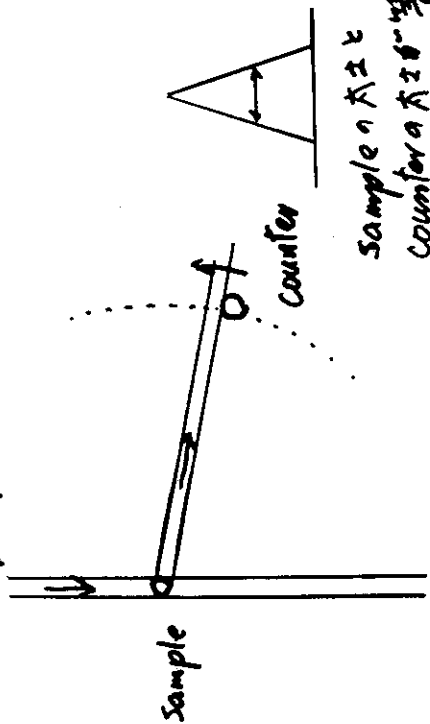
↑
 ↓



$d = 7 \text{ mm } \phi$
 $r = 200 \text{ mm}$

$\frac{d}{r} = 0.035$

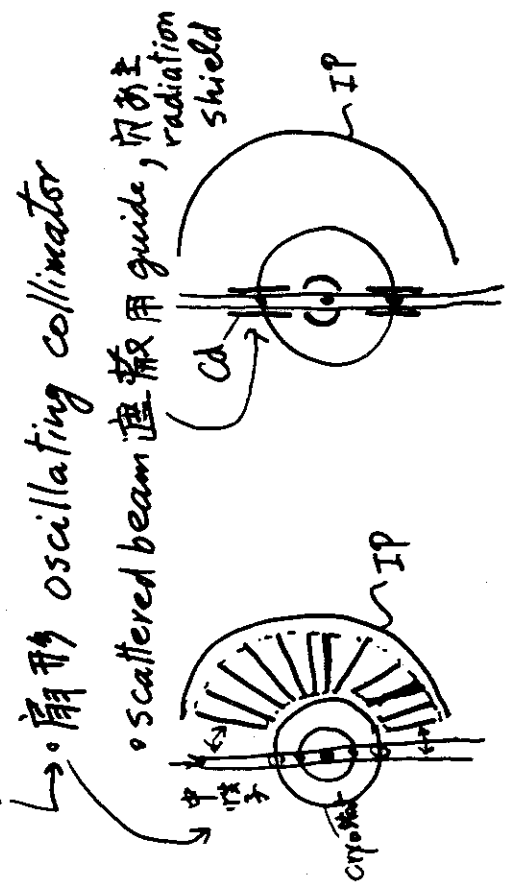
IP film と ^3He counter を使う
line profile の違い。



改善可能なことは

- back ground を下げることは
↳ 中性子遮蔽の箱を作ること。
- resolution を上げることは
↳ sample diameter (d) を小さく
sample-film 間距離 (r) を大きく
($\frac{d}{r}$ を小さく)
- 露出時間との兼ね合いである。
(intensity $\propto \frac{d^2}{r^2}$)

◦ cryostat の壁からの散乱を防ぐこと。



3.5 長波長中性子光学への応用

海老沢 徹 (京都大学原子炉実験所)

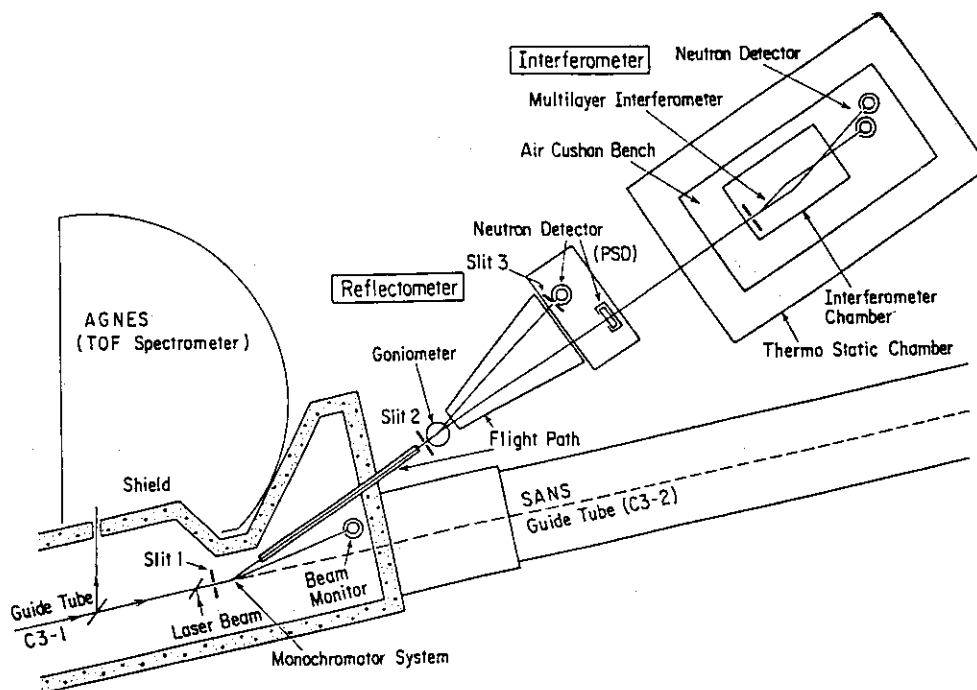
長波長中性子波動光学研究とイメージングプレート

海老沢徹(京大炉)

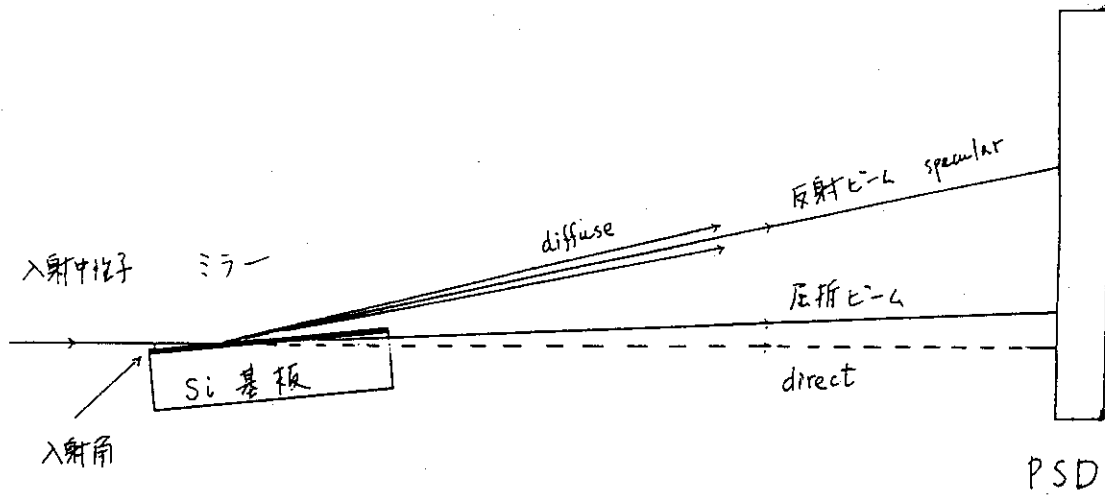
1. 長波長中性子波動光学研究とは
 - 多層膜ミラーによる長波長中性子波動光学研究
 - 冷中性子制御デバイスとしての多層膜ミラーの開発
 - 高分子の層構造の研究
 - 一次元ポテンシャルにおける物質波の挙動の研究
 - 多層膜冷中性子干渉計の開発と応用
 - 原研炉における波動光学実験装置(C3-1-2)の構造
 - 反射率計の構造： $\theta - 2\theta$ スキャン反射率の測定
 - PSDによる反射ビーム profile の測定

2. PSD情報の必要性
 - ミラー試料の質的評価：良い鏡かどうか
 - 屈折現象の測定
 - V/Ti多層膜ミラー、Si基板の屈折
 - 反射メカニズム、透過メカニズムの研究：
 - 表面粗さの影響、Bragg現象の研究
 - モワレパターンの検出
 - トンネル現象の研究
 - 多層膜分波器による分離ビームの直接測定

3. イメージングプレートに対する要求
 - 長波長中性子(12.6 Å)、強度が弱い：
 - γ -rayバックとの識別、高効率の検出：
 - Li-6(or B-10)の必要性、Li-6でも良い。
 - Position resolution : 0.1 mm が当面の目標

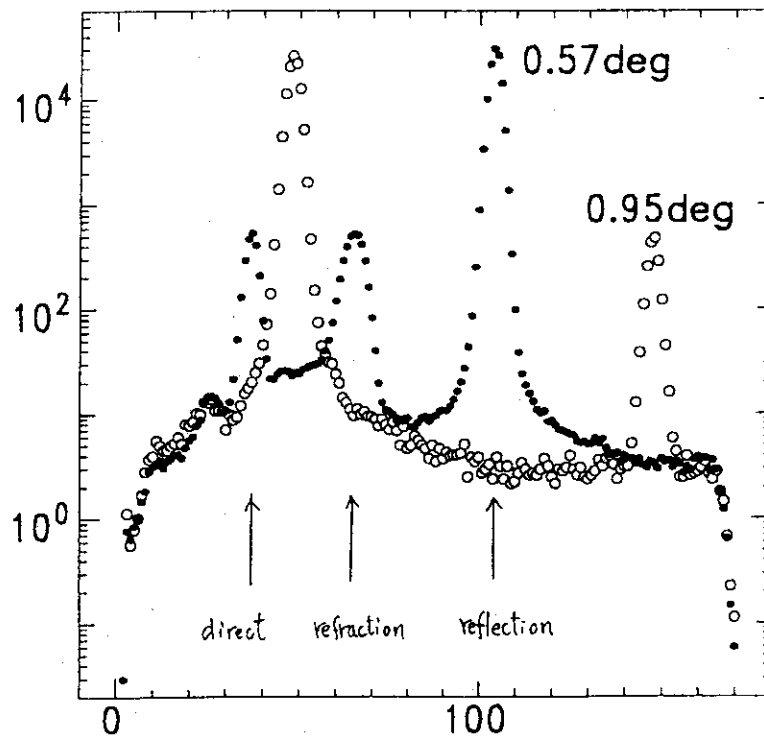


原研 JRR-3M 炉 C3-1-2 ビームポートにおける反射率計と Mach-Zehnder 型多層膜中性子干渉計の配置。



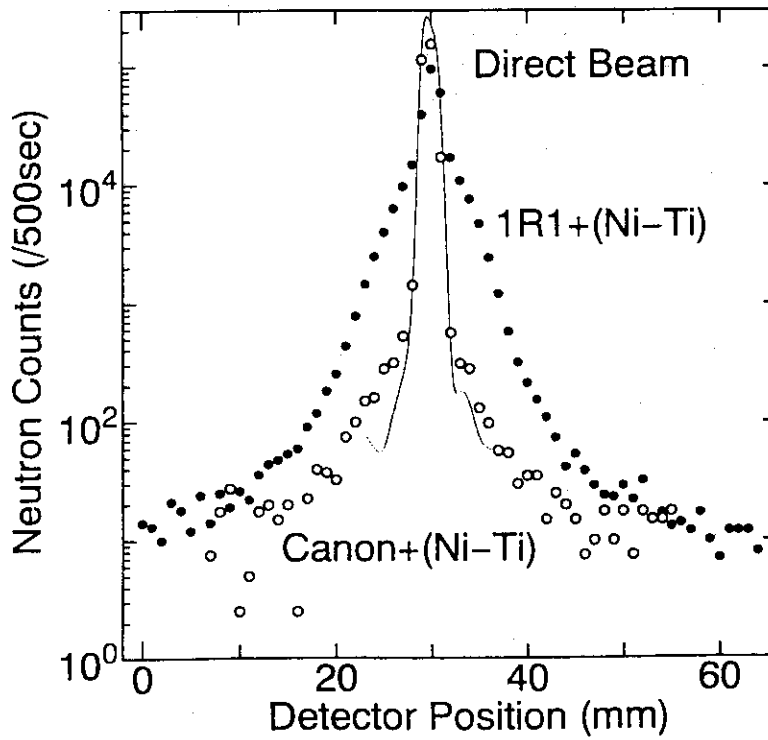
反射率測定における屈折、反射現象。PSDによりそのプロフィールを測定する。

Silicon PSD 095deg and 057deg

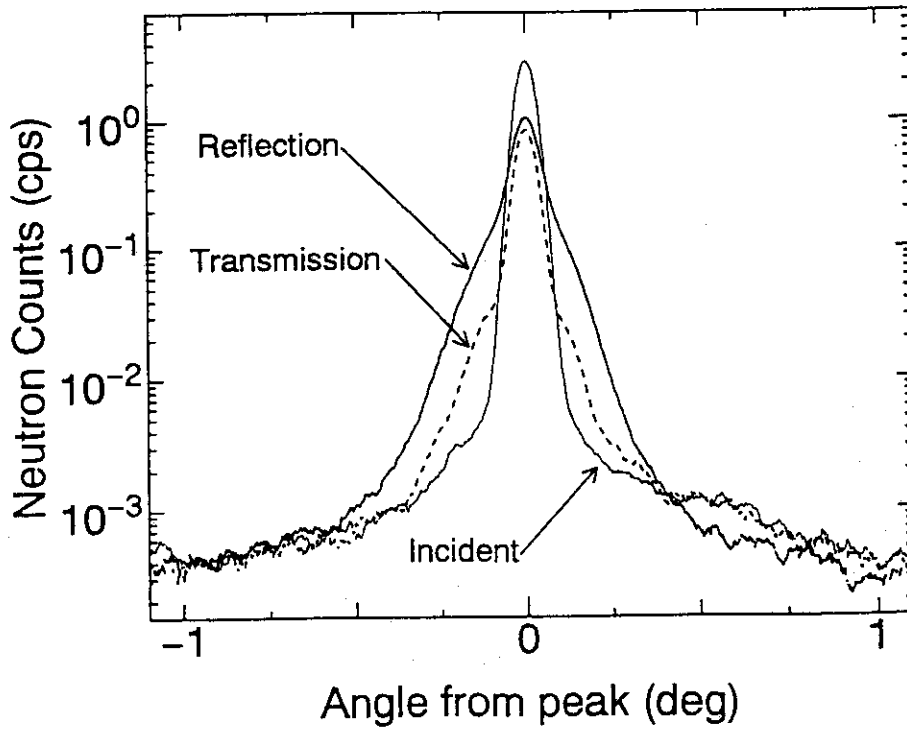


シリコン基板におけるDirect、屈折、反射ビームのPSDによる測定。
中性子の入射角は0.57度、0.95度である。

Diffuse Reflection



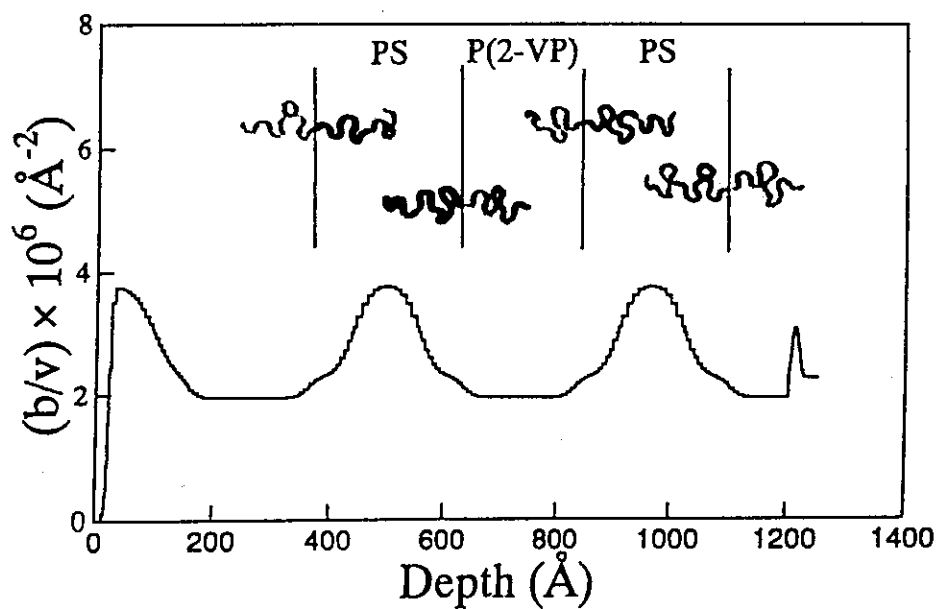
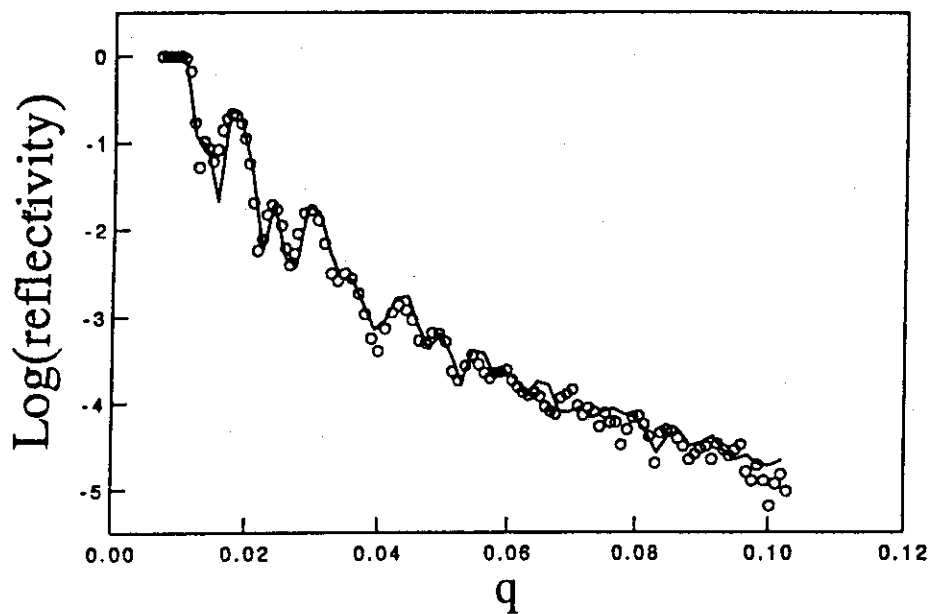
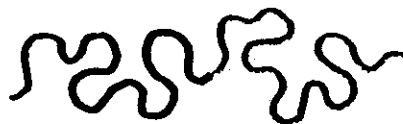
PSD(He-3)を用いた基板の粗さに依存する反射ビームの拡がりの測定。その拡がりはミラーの不完全さの指標である。



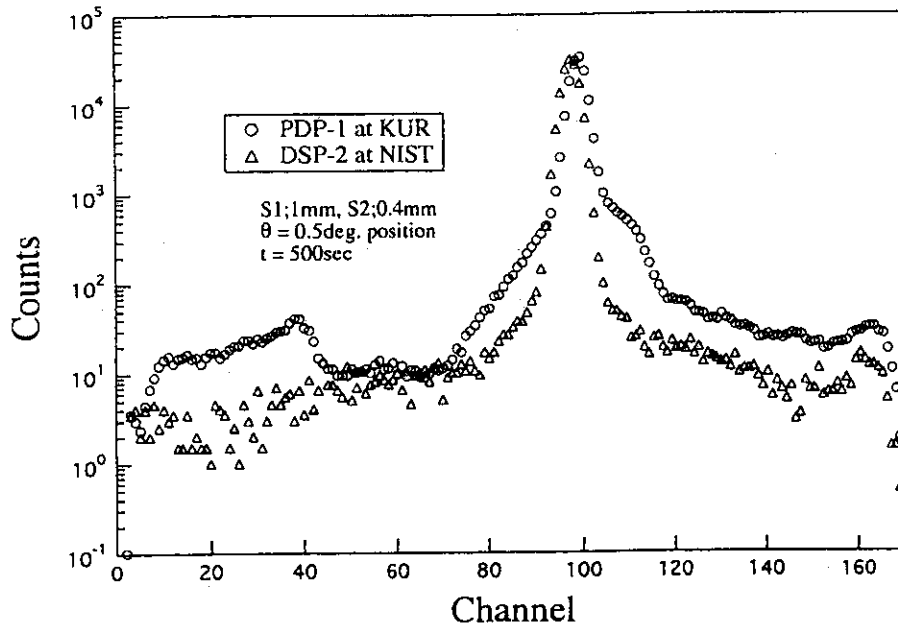
Bragg散乱による反射及び透過ビームの拡がり。この拡がりにはBragg散乱が多重散乱であることを示している。

Poly(styrene-d₈-b-styrene-hg-b-2-vinylpyridine) (DSP-2)

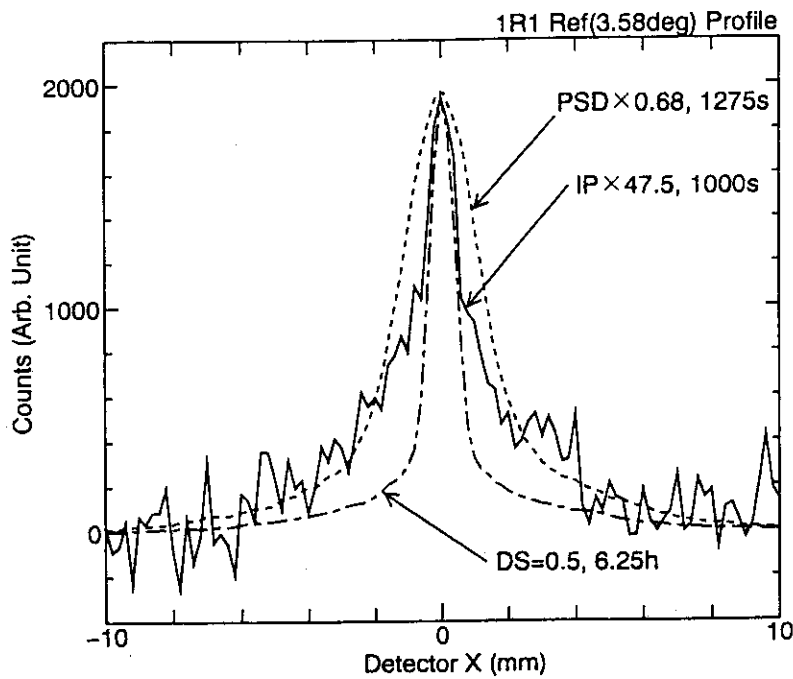
Component	$b/v \times 10^6 (\text{\AA}^{-2})$
PS-hg	1.4
PS-d ₈	6.5
P(2-VP)	1.9



反射率測定による高分子層構造の研究例(松下裕秀等)。



PSDによる高分子薄膜試料の一様性の評価。ビームの拡がりは試料の不完全さを示す。



PSD(He-3)、IP(Gd type)、He-3検出器(slit width=0.5mm)によるDirectビームの測定による性能の比較(原研グループによる測定結果)。

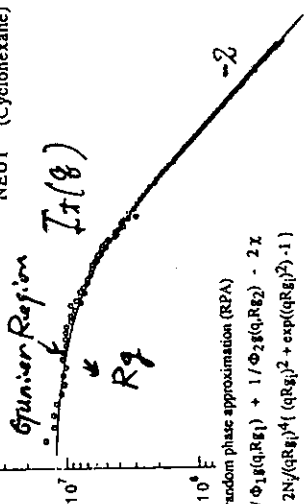
3.6 小角散乱への応用

小泉 智 (日本原子力研究所 材料研究部)

高分子混合系 均一相状態での散乱パターン

$I(q)$: Scattering originating from thermal concentration fluctuation

NEUT (Cyclohexane)



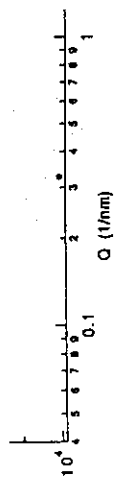
Mean field random phase approximation (RPA)

$$I(q) = 1/\Phi_1 g(q, Rq_1) + 1/\Phi_2 g(q, Rq_2) - 2\chi$$

$$g(q, Rq_i) = 2N_i/(qRq_i)^4 (1 + \exp(-qRq_i)^2 - 1)$$

$$I(q) \sim \Phi_1(1-\Phi_1)g(q, Rq) - q^{-2} \quad (qRq \gg 1)$$

$$(N = N_1 = N_2)$$

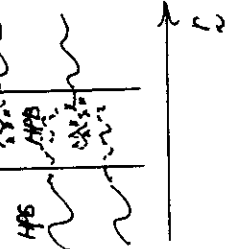
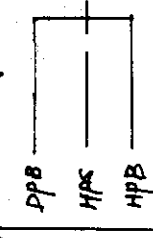


Wps/Wpa (HPS/HPB)
51.2/48.8 (HPS/HPB)
56.2/43.8 (HPS/HPB)

TOKI12 1.0x10⁵ 1.02
B7 8.5x10⁴ 1.02

Control Monitor

AB scattering length



イメージングプレートの冷中性子小角散乱への応用

原研 中性子散乱 小泉 智

- I 中性子小角散乱でどのような散乱パターンが期待されるか？
高分子濃厚系の場合、(1) 均一相状態 (2) 相分離状態

II イメージングプレート (IP)

- 1 異方的散乱パターンの視覚化
- 2 広いダイナミックレンジ
- 3 高い位置分解能
- 4 チャンネル中が可変
- 5 湾曲カウンターの作成可

III 問題点

- 1 Decay Rateの評価 (バックグラウンドの補正)
感度、検出効率の補正
- 2 読み取り機構 IPの交換 (遮蔽の移動 窓材の選択)
IPと消去、読み取り機構の一体化
- 3 入射ビームの素性とのバランス (波長分解能、コリメーション)
速度選別器 vs モノクロ結晶
- 4 時分割測定? 時間発展のある系

高分子多相混成系での散乱パターン

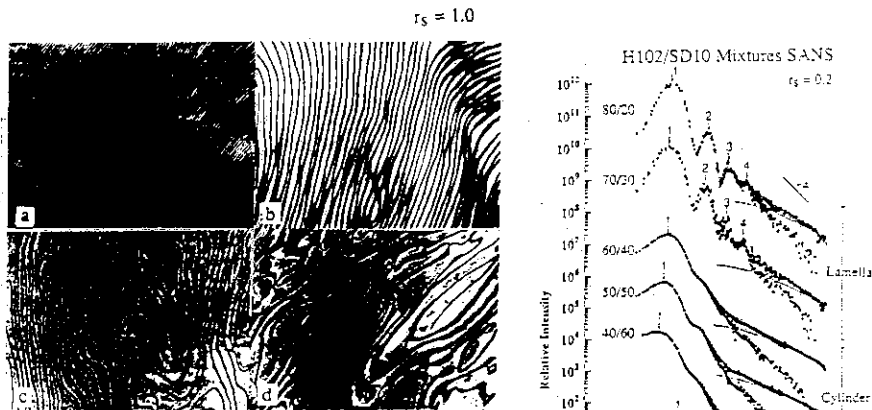
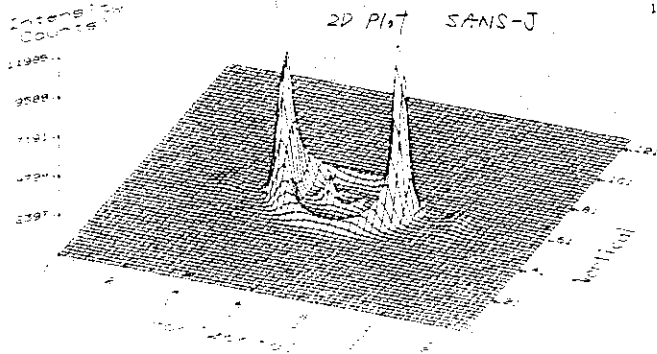
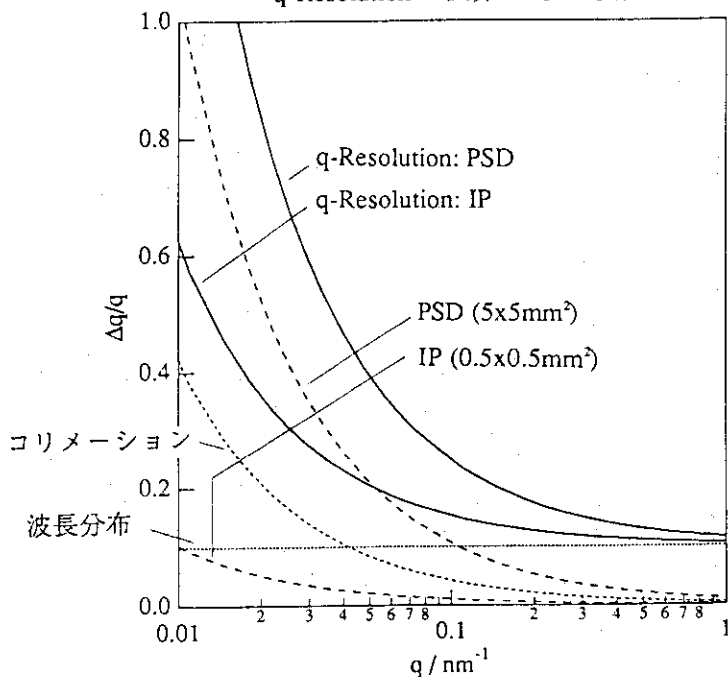


Figure 2 Electron micrographs of the binary mixtures of SI/HS with the compositions of (a) 100/0, (b) 40/60, (c) 30/70 and (d) 20/80. The dark and bright regions (stained and unstained by OsO₄) correspond to the PI-rich and PS-rich phases, respectively. No morphological transition from lamellae is observed in these mixtures but the lamellae start to undulate with increasing HS content.



q-Resolution の試算 PSD vs IP



3.7 非弾性散乱への応用

山田和芳（東北大学理学部）

中性子非弾性散乱とイメージングプレート(IP)

1995. 10. 25
東北大学大学院 山田和芳

位置敏感検出器は中性子非弾性散乱実験に必要か？

yes!!

「究極」の中性子非弾性散乱実験

----->>>>> Time-of-flight(TOF)法 + 2次元検出器
(+スピン偏極解析)

IPは中性子非弾性散乱実験に利用出来るか？

難しい(現在のところは)

内容

- 1) 非弾性散乱信号の弱さ
- 2) 非弾性散乱での2次元検出器の有効性
- 3) 現状でのイメージングプレートの問題点
- 4) どうすればいいのか？

1) 非弾性散乱の散乱強度

- $10^5 \sim 10^6$ カウント /cc/sec. 弾性散乱(Bragg 反射)
- $10^1 \sim 10^2$ カウント /cc/sec. 非弾性散乱 (格子振動)
- $10^2 \sim 10^0$ カウント /cc/sec. 非弾性散乱 (磁気励起)

低いバックグラウンド

2) 非弾性散乱実験になぜ2次元検出器が有効か？

(Q,ω)空間での全体像が見えること

3) 現状でのイメージングプレートの問題点

i) 積算型検出器

TOF法への利用が難しい
角度分散法への利用の可能性

ii) ガンマ線のバックグラウンド

電気信号処理法が利用出来ない
(パルス高、幅による中性子-ガンマ線の識別)

画像処理方法の可能性?

(中性子信号とガンマ線信号のコントラストを変える)

4) どうすればいいのか?

(ガンマ線のバックグラウンドは充分小さいと仮定して)
3軸法+大面積アナライザ+イメージングプレート

⁶Li ガラスシンチレーターによる中性子と γ線の識別

核理研

山田和芳・新村信雄・窪田融雄

§ 1. 序 論

⁶Li ガラスシンチレーター(Li-GS) を用いて中性子散乱実験を行なう上で、最も大きな問題はγ線によるバックグラウンドである。このことはLi-GSが熱中性子検出器として優れた特徴を持つにもかかわらず、広く普及していない理由の一つになっている。ところがこのバックグラウンドが、実際の散乱実験でどの程度の障害になっているか、あるいはこれを減少させるには、どのような手法が最も適当かを調べた例は少ない。¹⁾

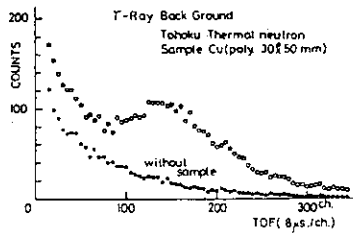
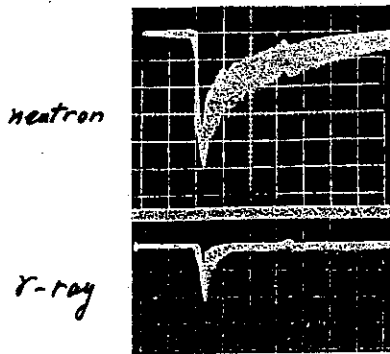
従来、γ線バックグラウンド除去としては、二種類の方法が試みられてきた。一つは中性子とγ線による発光の波高(光量)分布の違いを利用する方法(「波高法」と呼ぶ)、もう一つは発光波形(特に発光の減衰時間やパルス幅)の差を利用するもの(「波形法」と呼ぶ)である。波高法でγ線の波高を小さくするには、シンチレーターを薄くするのがよい。この場合には、γ線によって励起された電子が全てのエネルギーを失なう前に、シンチレーターから飛び出す確率が高くなる。Harris らによれば¹⁾、そのためにはシンチレーターの厚さは1mm以内がよい。しかし、この方法では、肝心の中性子検出効率を高く出来ない。しかも波高法では中性子の波高分布幅を狭くすることが重要であり、そのためには、ガラス組成の均一性を良くするためLi₂Oの量を少なくする必要がある。従って、中性子の検出効率はますます悪くなり、Wrightらの結果では67meVの熱中性子に対して33%という低さである²⁾。

一方、熱中性子に対しても、十分な検出効率を得ようとするとは5-10mm程度の厚さが必要となるが、この場合にはγ線の波高は大きくなり波高法だけでγ線を除くのは無理である。

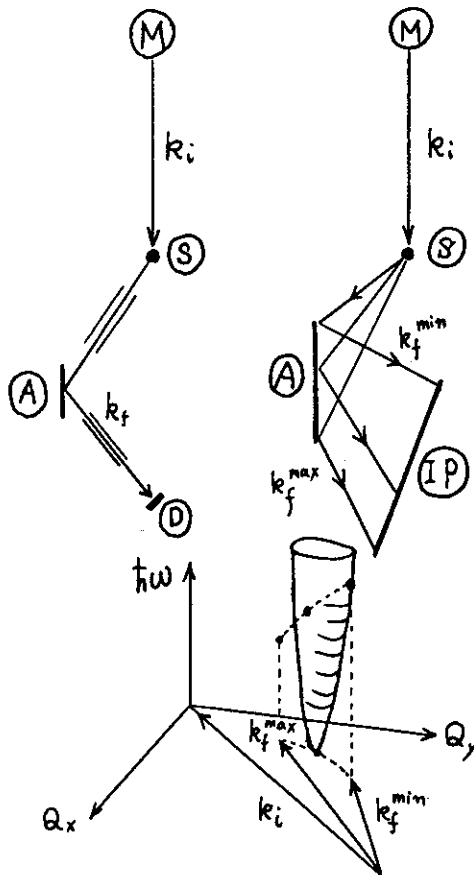
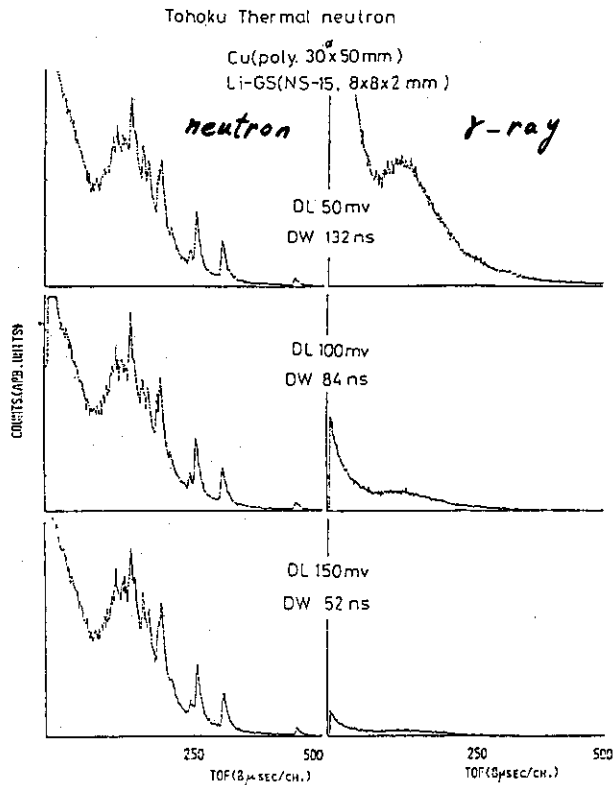
波高法でのもう一つの問題点は、波高分布が光学系*によって大きく変化する点にある。シンチレーターを直接、光電子増倍管(PM)の光電面につけるのが光量の減衰は最も少ない。しかしこの様な測定系はむしろ稀で通常は、光学系によって光量は減衰する。例えば、エンコ

* シンチレーターの発光を光電子増倍管に導く系をここでは光学系と呼ぶ。

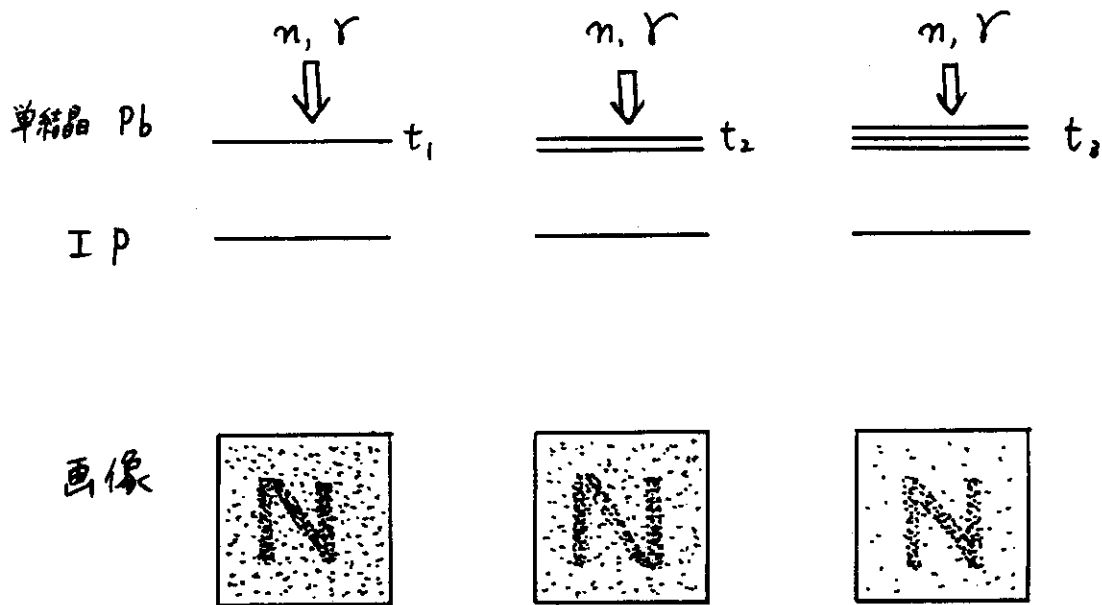
Liガラスシンチレータによる中性子とγ線の識別
核物理研究報告(1982)



Sample からの γ-線が
無視出来る



画像処理法

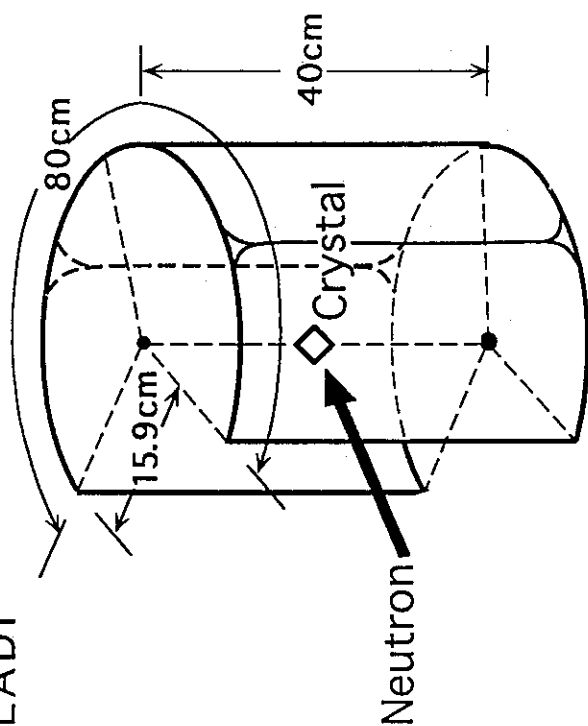


$$I^{obs}(x, y) \cong R_N(t) \cdot \underline{I_N(x, y)} + R_Y(t) \cdot I_Y(x, y)$$

3.8 ラウエ法への応用

峯崎善章（日本原子力研究所 先端基礎研究センター）

LADI



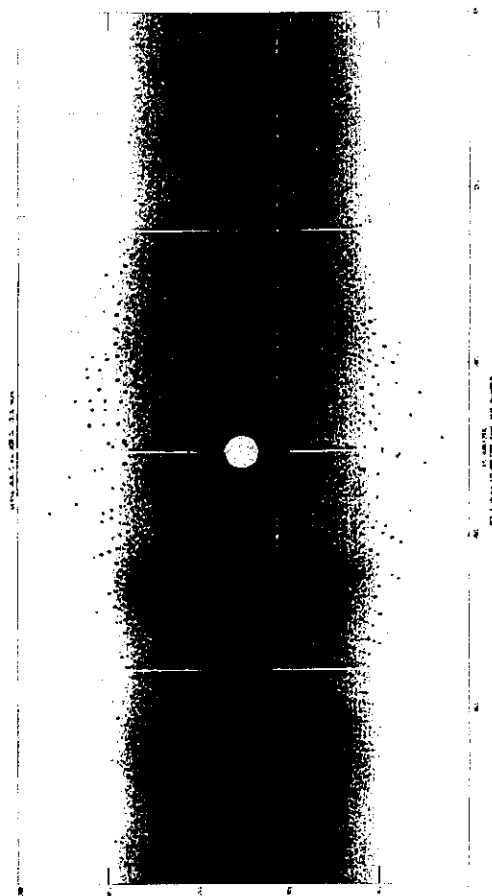
Imaging Plate Neutron Detector

$3.1 \text{ \AA} < \lambda < 3.9 \text{ \AA}$, beam size $2.5 \text{ mm} \phi$
flux $2.0 \times 10^7 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$

HEW Lysozyme P4₃2₁2
 $1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$ ($a = b = 79.1 \text{ \AA}$
 $c = 37.9 \text{ \AA}$)

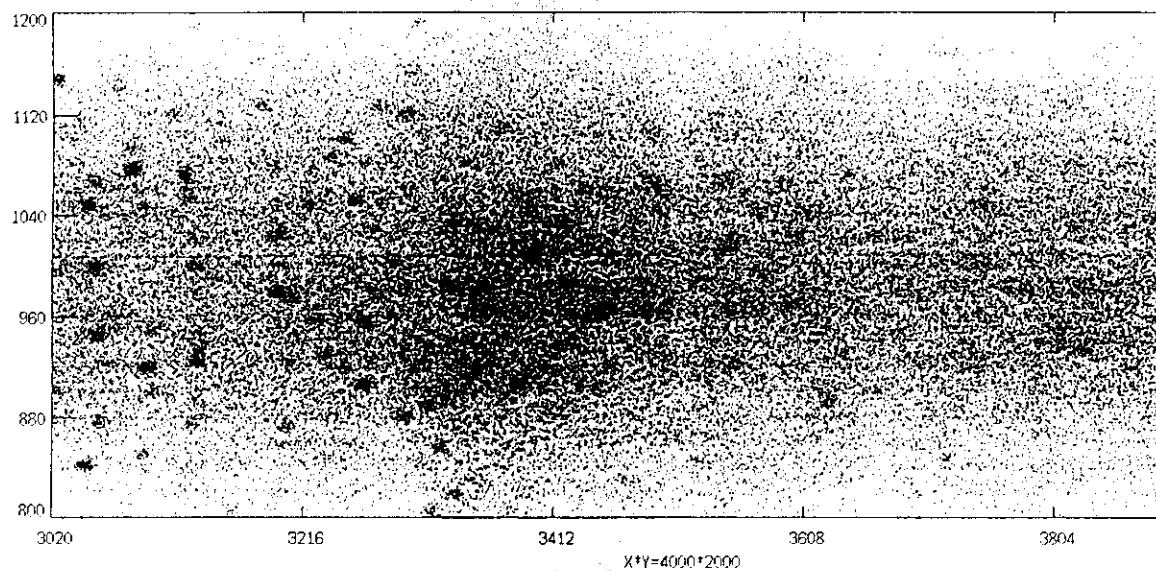
7° step (1 day)

Sptrus 0828.02 and 0829.01, 23:30 hours



0828.02_NN_bin X*Y=4000*2000 Min=0.00000 Max=65535.0

11/11



828.02_NN bin X*Y=4000*2000 Min=-32751.0 Max=32738.0

LADI data 解析フローチャート

CCP4 laue suite を用いました。

指数付け - lauegen : autoindexing
nordal spot を入力 → Laue pattern を予測

精密化 - lauegen : refinement
各パラメーターを最小自乗法で精密化

強度積分計算 - intlaue
profile fitting 法

I_{λ} 補正 - lauenorm
 λ の異なった等価な反射点を比較し、
correction curve を作成 → 補正

Refinement Options Menu

Match Spots and Refine

Select, Search and Refine

Nodals Search and Refine

Write .ge Files

Refinement Completed

Abort Refinement

current pack:
 current plate:

system:
 lattice:
 symmetry:

rotation axis:
 beam axis:

pack id:
 spindle (Deg):

Edits allowed

Refinement Parameters

Refine PhiX: Yes
 Refine PhiY: Yes
 Refine PhiZ: Yes
 Refine c_to_f: Yes
 Refine x_c: Yes
 Refine y_c: Yes

Refine cell: No
 Refine a: No
 Refine c: No

Distortion: No
 Refine y scale: No
 Refine twist: No
 Refine tilt: No
 Refine roff: No
 Refine toff: No

Method: LSR
 Shift limit: 0.0010
 Deriv. step: 0.100E-09
 Damp factor: 0.50

Basic/pack Parameters

image type: ip rcrast: 1200
 image data: i2 nyrast: 1200
 numpack: 1 raster (au): 150.00
 nplates: 1 axis order: +x+y z

fiducials: no rmin (mm): 10.00
 distortion: r/toff rmax (mm): 90.00
 detector tilt: 0.00
 spot eps (mm): 0.05 xLow (ras): 0.00
 spot thresh: 200.00 xhigh (ras): 0.00
 overload pix: 32767 ylow (ras): 0.00
 template: img###, yhigh (ras): 0.00

Histogram of

```

=====
1 2
5 136
9 622
Nodal spot se
201 nodal spot
Box size (mm)
Threshold abo
---Searching
RMS = 0.035 f
Number of spo
Difference pl
RMS = 0.035 m
    
```

Profile bins: 8
 Profile min I: 600.0
 No. 'dmin' bins: 50
 Bin width (dmin): 0.05
 No. 'lmin' bins: 50
 Bin width (lmin): 0.02
 Start fraction: 0.80
 Sigma test: 5.0
 Fraction test: 0.15

Plate 1

filename: /datal/jvc/
 ctof (mm): 199.83
 x_cen_f (ras): 583.00
 y_cen_f (ras): 593.00
 x_c offset (mm): 0.202
 y_c offset (mm): -0.563
 w_c offset (deg): 0.000
 y_scale: 1.000
 twist (.01deg): -6.645
 tilt (.01deg): -20.610
 roff (10au): 10.65
 toff (10au): 26.18

spot length (mm): 0.90
 spot width (mm): 0.00
 spot factor: 0.00
 Spot border (ras): 2.0
 spot delta (mm): 0.50
 refined flag: 1

18-fig.6.ps

Crystallographic/pack Parameters

current pack: 1 a (Angstroms): 79.10
 current plate: 1 b (Angstroms):
 c (Angstroms): 36.35
 system: Tet. alpha (Deg):
 lattice: P beta (Deg):
 symmetry: no gamma (Deg):

image type: ip rcrast: 4000
 image data: i2 nyrast: 2000
 numpack: 1 raster (au): 200.00
 nplates: 1 axis order: +x+y z
 fiducials: no rmin (mm): 0.00
 rmax (mm): 430.00

Min 0 Max 5000 Cursor position

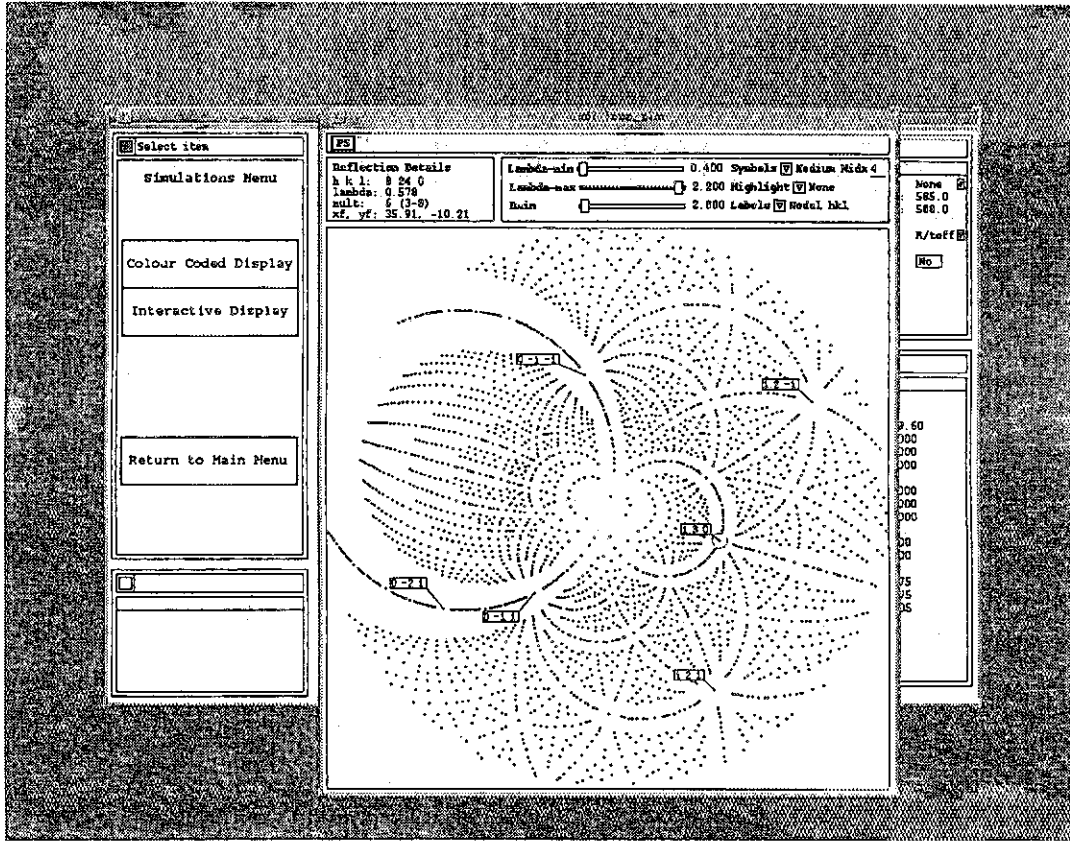
Overlay on inc. Contrast

Colour Black on white Mag x4

0028_02_mn.
 159.33
 1992.00
 996.00
 -0.163
 -0.123
 0.000
 0.998
 0.966
 0.867
 0.0000
 1
 1
 0.50
 0.00
 0.00
 2.0
 0.50
 1

refined flag: 1

18-pic3.ps



INTLAUE: Loue Image Integration Software
 T.J. Greenough and A.K. Shrive
 University of Keele and Daresbury Laboratory
 (with thanks to P.A. Mochin & A.J. Wonnacott)
 Latest Update March 2nd, 1994.

```

data/0825_01_nm
input ge file is data/0825_01_nm
IMAGE PLATE DATA (Y/N) [N]: y
INNER REF AND AVERAGE SPOT PROFILE AFTER IMAGE CENTERING(Y/N) [No] n
OUTER REFINEMENT (Y/N) [No] n
CALC AND DISPLAY AV SPOT PROFILES IN PROCESS(Y/N) [No] y
DO YOU REQUIRE PROFILE FITTING(Y/N) [Yes] y
PROFILES AND BOX INTEGRATION(Y/N) [No] n
DO YOU WANT TO CORRECT FOR OVERLAP? (Y/N) [No] n
ENTER BG FRAC ,NUMBER OF BINS (5,9,17): 0.2000, 17] :+ 0.2000 17
INNER BIN RADIUS IN RASTERS [ 832] :+ 200
OUTER BIN RADIUS IN RASTERS [1905] :+ 700
ENTER MIN I FOR PROFILES AND MAX.OB. [- 150 65000]:+ 15065000
DO YOU REQUIRE VARIABLE WEIGHTED PROFILES?(Y/N) [Yes] n
DO YOU REQUIRE VARIABLE RADIAL MASKS?(Y/N) [Yes] y
ENTER Anamor,mask,mask,minor, border [ 0.8,100.0,0.0,0.4,1.0]:+ 3.0000159.4700 0.0000 4.0000 2.000
DO YOU REQUIRE VARIABLE BINNING?(Y/N) [No] n
PLOT IMAGE AND CALCULATED PATTERN?(Y/N) [No] n
    
```

```

Control data:
Image plate processing ON
Inner ref and average spot OFF
Outer refinement OFF
Average expanded spot display ON
Profile fitting ON
Radial Masking ON
Mask Definition (a,d,k,b,bg) 3.0000159.470 0.000 4.000 2.000
Variable binning OFF
Bin variation (amoz,amin,themoz) 0.000 0.000 0.000
Overlap deconvolution OFF
Variable weighted profiles OFF
Profile and Box integration OFF
Number of profile bins 17
Inner bin radius (rasters) 200
Outer bin radius (rasters) 700
Bg cutoff, pk cutoffs (H,I) 0.200 0.000 0.000
Profile min and max 00 150 65000
PACK NUMBER (FREE FORMAT):+ 1
APPROX NUMBERS OF REFINEMENT NODALS [300,1000]:+ 300 1000
    
```

```

Summary of reflection data
Total number of reflections : 1602
SINGLETs : 1596
Measurable Weak : 0
Separated : 0
Overlapped : 0
MULTIPLETS : 6
Measurable Weak : 0
Separated : 0
Overlapped : 0
REFINEMENT NODALS : 900
SINGLET MULTIPLETS
    
```


LADI data result

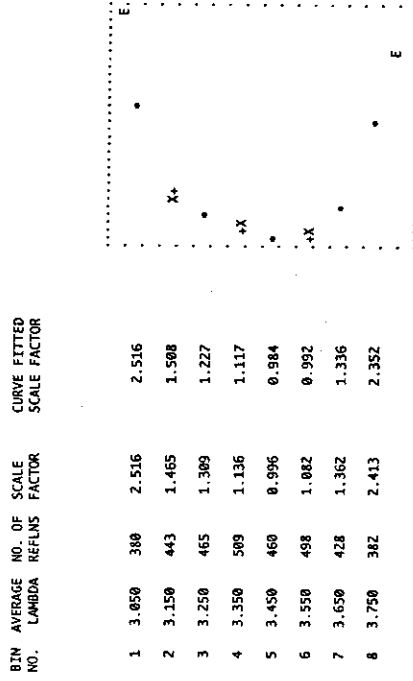
angle	time	total	R-merge
0	19:05	2512	0.149
-10	07:41	2197	0.157
-7	06:25	2056	0.167
-14	08:54	—	—
-21	08:00	2348	0.150
-28	15:45	2761	0.153
-35	10:00	2848	0.160
-42	12:00	3350	0.198
+7	23:32	2748	0.141
+14	23:04	2567	0.158
+21	13:02	2454	0.147
+28	16:25	2297	0.156
-42 ~ +28	—	40186	0.221
+35	16:37	3103	0.183
+42	23:38	2613	0.177
+49	23:36	2555	0.203
+35 ~ +49	—	11363	0.209

SUMMARY OF WAVELENGTH BINS DATA:

IBIN	NO.REFLNS	NO._FOR_SCALING	SCALE	RANGE
1	380	380	1.000	WAVELENGTH RANGE 3.000 TO 3.100
2	443	443	1.000	WAVELENGTH RANGE 3.100 TO 3.200
3	465	465	1.000	WAVELENGTH RANGE 3.200 TO 3.300
4	509	509	1.000	WAVELENGTH RANGE 3.300 TO 3.400
5	460	460	1.000	WAVELENGTH RANGE 3.400 TO 3.500
6	498	498	1.000	WAVELENGTH RANGE 3.500 TO 3.600
7	428	428	1.000	WAVELENGTH RANGE 3.600 TO 3.700
8	382	382	1.000	WAVELENGTH RANGE 3.700 TO 3.800

LAMBDA BINS OVERLAP ANALYSIS

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	25	61	44	36	30	34	16	18
2	61	30	82	58	37	31	32	32
3	44	82	48	98	41	34	31	34
4	36	58	98	55	100	58	33	26
5	30	37	41	100	42	83	43	31
6	34	31	34	58	83	52	94	38
7	16	32	31	33	43	94	45	53
8	18	32	34	26	31	38	53	36



EXTRAPOLATED SCALE AT FIRST POINT = 3.672
 EXTRAPOLATED SCALE AT FINAL POINT = 3.172

KEY: E - EXTRAPOLATED POINT ON GRAPH
 X - POINT USED FOR CURVE FITTING
 + - CALCULATED POINT FROM FITTED CURVE
 . - POINTS OVERLAP (OR X AND + OVERPRINTED)

全体の結果
 全反射数：5 1 5 4 9 独立な反射：7 2 2 9 completeness：87.6%

3.9 ラジオグラフィへの応用

石川 勇 (日本原子力研究所 アイソトープ部)

ラジオグラフィへの応用

アイソトープ部 茂木照十三

石川 勇

先端基礎研究センター 唐澤 裕子

1. 現状

中性子源 ^{252}Cf

熱中性子束 $< 8 \times 10^2 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

照射野 直径 20 cm

- (1) 最適撮像条件に係わるデータ収集
および画像解析法の検討
- (2) Direct Beam の撮像
- (3) アルミニウム金属の腐食検知

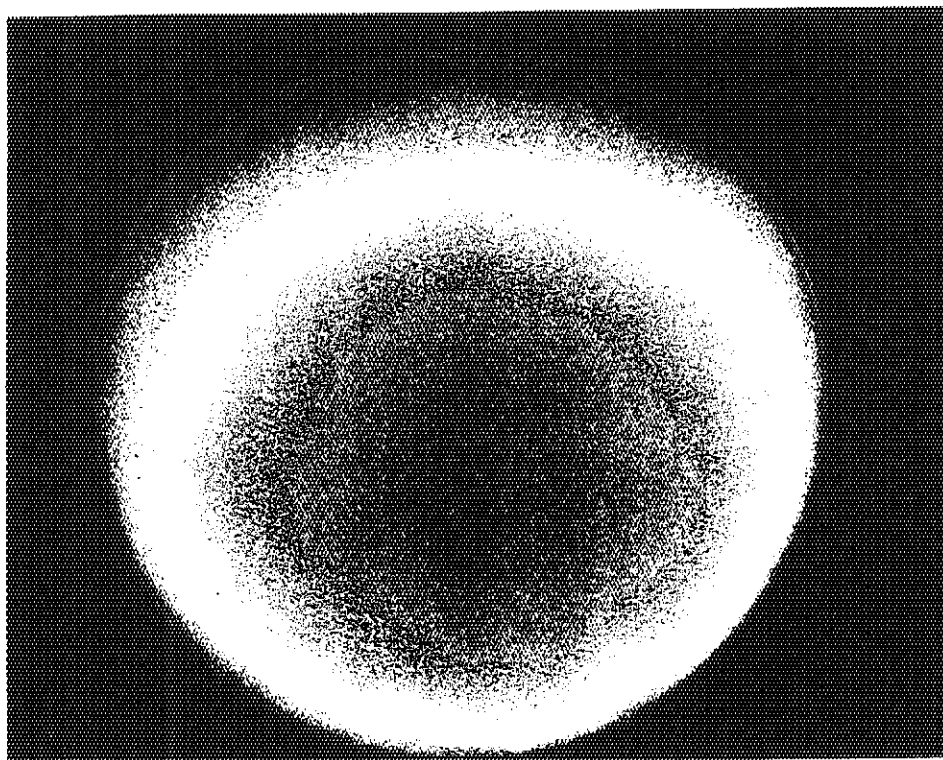
2. 可能性

- (1) 各分野の利用に適したIPの開発
- (2) 反射型検知（撮像）システムの開発
- (3) 冷中性子ラジオグラフィによる像質の改良

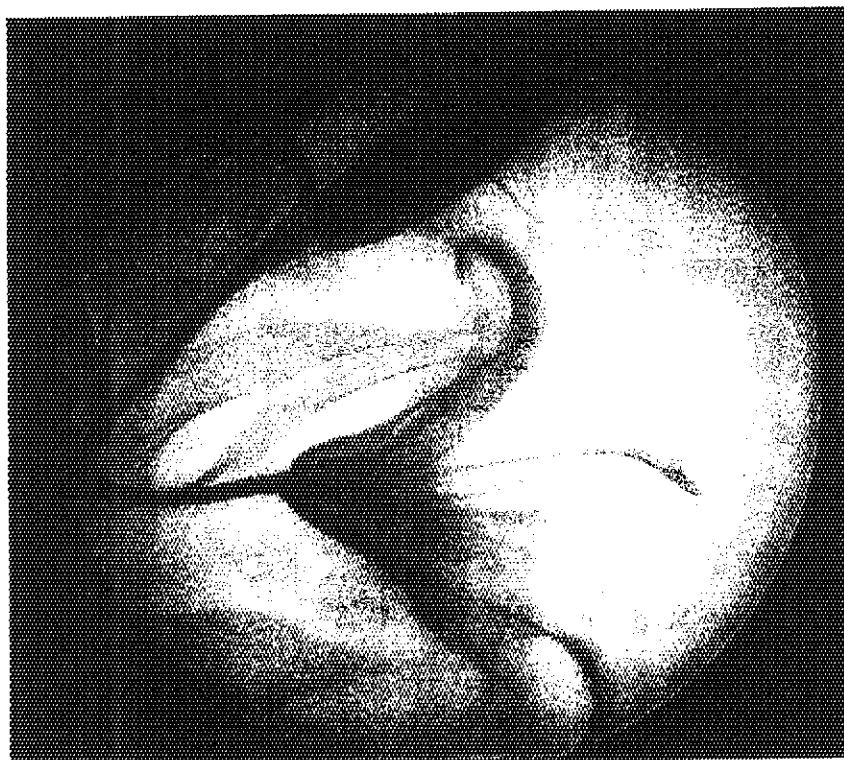
イメージングプレートによる撮像



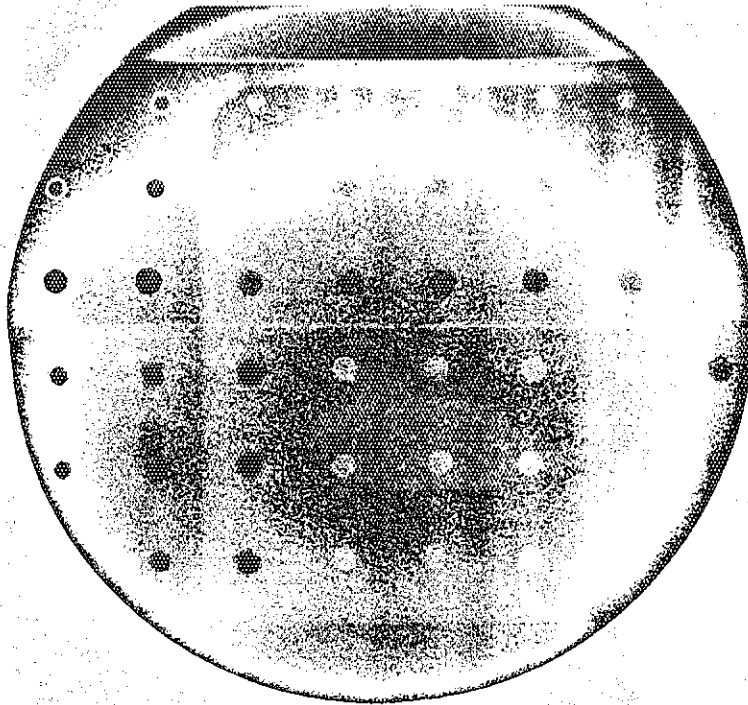
Name : 950908-bq55-237-1
Comment : direct beam
IP:20*25 Grad:1024 Res:200 Sens:10000 Lat:4 Read:Sep 8 16:26 1995
Width:204.0mm Height:256.0mm Mag:100%



Name : bq55-200
IP:20*25 Grad:256 Res:200 Sens:10000 Lat:4 Read:Sep 6 16:52 1995
Width:204.0mm Height:228.8mm Mag:100%



Name : 950908-0015-20C-1
Comment: Corrosion -3
IP:20*25 Grad:1024 Res:200 Sens:10000 Lnt:4 Read:Sep 8 16:06 1995
Width:204 02m Height:256 02m Mag:100%



4. 生体物質中性子回折計 (B I X)

田中伊知朗 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)

生体物質中性子回折計
(BIX)

内容

1. 回折装置 (BIX)
 - 1-1. 設計
 - 1-2. モノクロメータ
 - 1-3. 中性子ビームの特性
 - 1-4. 検出器・遮蔽
 - 1-5. データ集積ハードウェア
2. 試料結晶 (HEW-Lysozyme, tetragonal)
3. データ処理ソフトウェア
 - 3-1. ピークサーチ
 - 3-2. 結晶方位 (U行列) 決定
 - 3-3. 積分強度 $I(hkl)$ 算出
 - 3-4. スケジューリング
4. 構造解析
5. 現状報告
6. 今後の予定

原研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

田中伊知朗

—生体物質の原子・分子レベルでの構造決定—

X線回折法の強壇場

(例：ワトソン・クリック等のDNAの分子構造の決定を含め、
この分野で5件のノーベル賞受賞あり。)

—それなのに、何故中性子回折法か—

	性質	エネルギー
X線	電子と相互作用する波 (水素の位置決定しにくい)	~20 KeV (放射線損傷受け易い) 6~7桁の差
中性子	水素原子と同じ重さの粒子 (水素と強い相互作用)	~数meV (放射線損傷受けにくい)

—生体物質と水素—

生体物質は構成元素の約半分が水素原子
生命は水のない世界では生きられない。

にもかかわらず ↓

生体物質中の水素の位置、及び生体物質に結合する水の構造は、
従来、殆ど決定されていない。

—目的—

生体高分子の中性子回折法により、水素の位置、結合水分子
の構造、運動の様子を調べ、生理機能のメカニズムを解明する。

↓
2 Å 以下の分解能をめざす

物理的制約条件

1. 下流の高分解能粉末回折計 (HRPD) とのビーム共有の必要性。

下半分 (4×4 cm) がモノクロメータ断面として割り当てで、汎用モノクロメータ結晶 (PG, Pyrolytic Graphite) の使用は
実質上無理。

2. モノクロメータ角は32度と44度のみ。
3. モノクロメータ・試料間が3 m 以上と比較的遠距離セッティング。
4. ゴニオメータや検出器 (PSD) を設置する場所がかなり狭い。

生体高分子単結晶の特徴からの要請

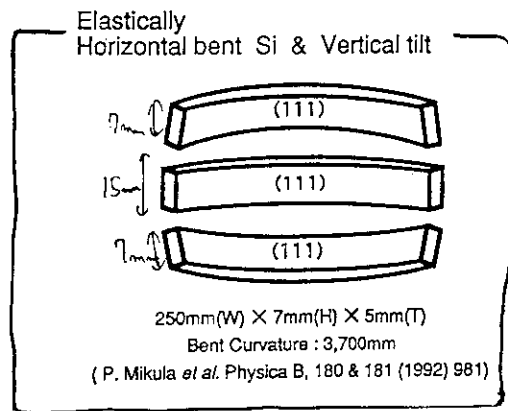
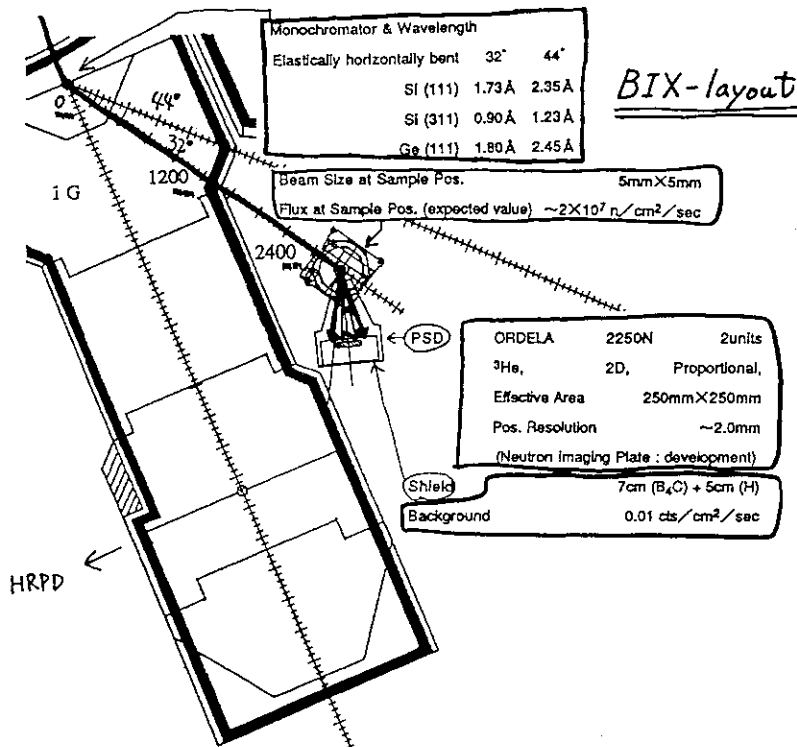
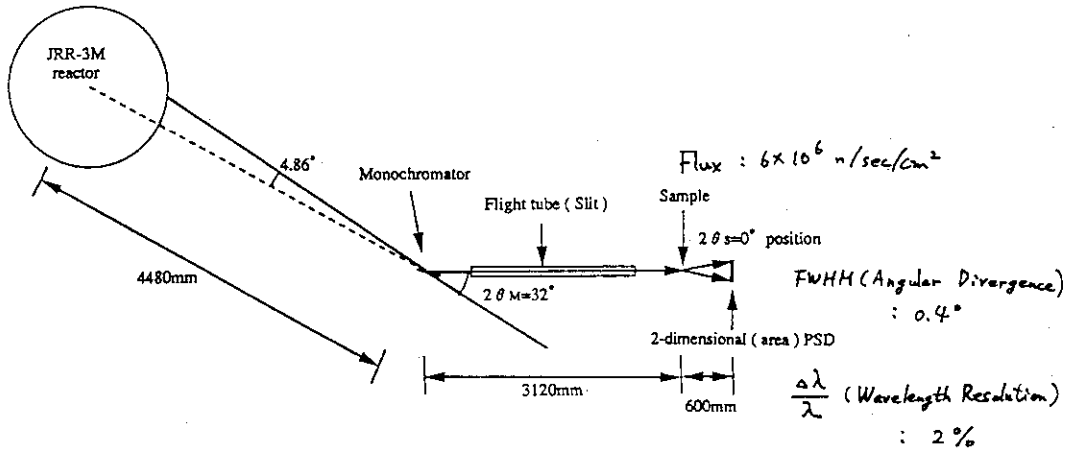
1. 大きさがせいぜい5 mm 立方程度にしかならない。

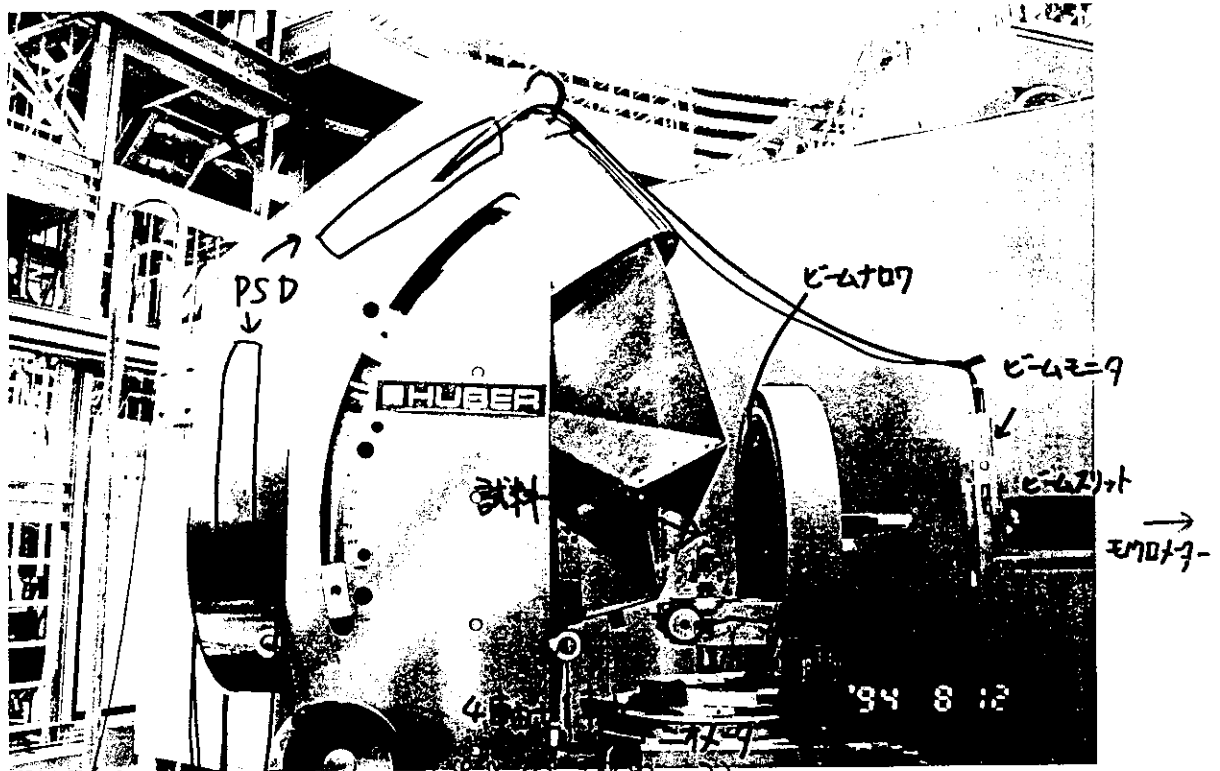
試料位置において中性子ビーム断面は5×5 [mm] で十分。

2. 単位格子長が200 Å と長いので回折斑点が重なることがあり区別できない。

入射ビームの分散は0.4° 以下でなければならない。

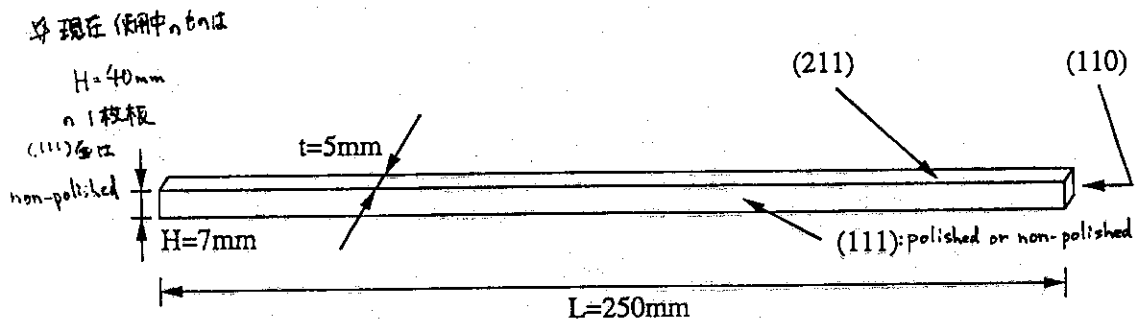
BIX beam arrangement



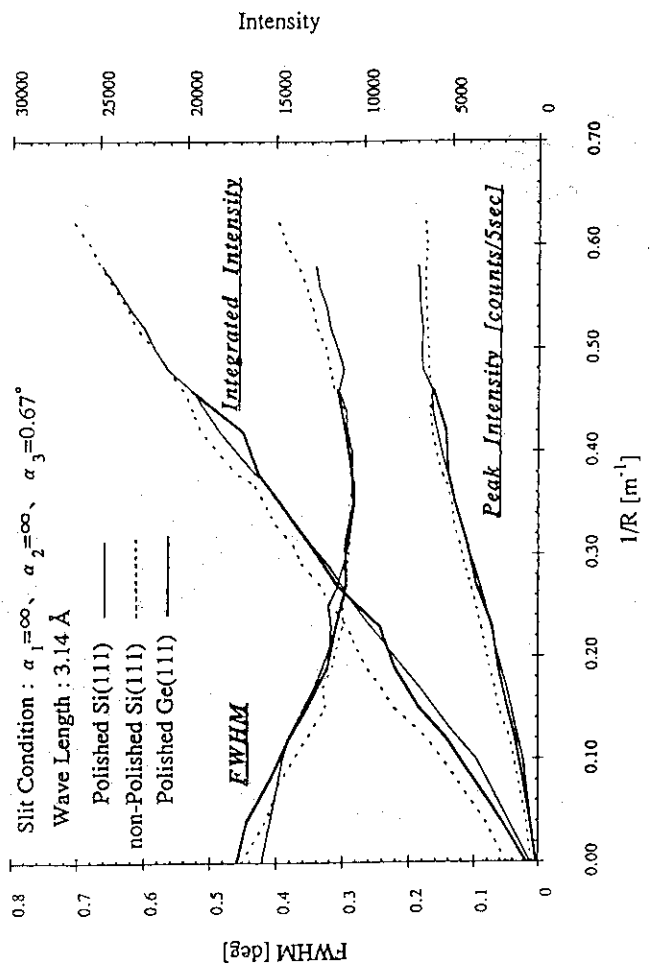


(P.K.W. 2008, D)
BLX コーナーと検出器 (PSD)

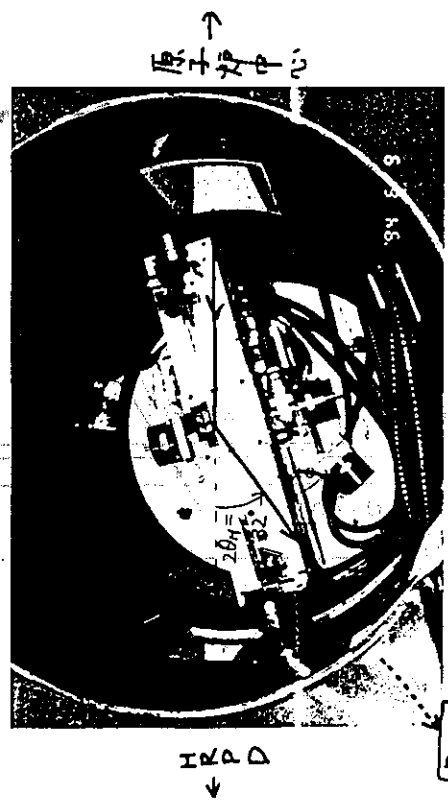
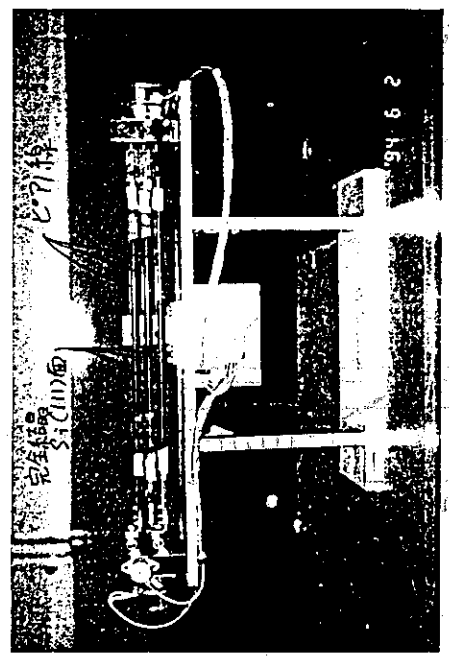
Si single crystal



モロメ-7用テストベンダー
強度分散テスト



モロメ結晶ベンダー



遮蔽体内部のモロメ-7-

中性子線の絶対強度計算

全角測定も計画中。

試料位置での真の中性子束： Φ_0 [n/sec/cm²]

☆ 0次元カウンタ-数え落とし関係式

$$\frac{n_{obs}}{n} = \frac{1}{1+n\tau}$$

分解時間： τ [sec] ($<< 1$)
Attenuator透過後の減衰した中性子束： n [n/sec/cm²]

☆ ビームトランスミッション関係式

Attenuatorの厚さ： t が十分小さい時成立

$$n = \Phi_0 e^{-At}$$

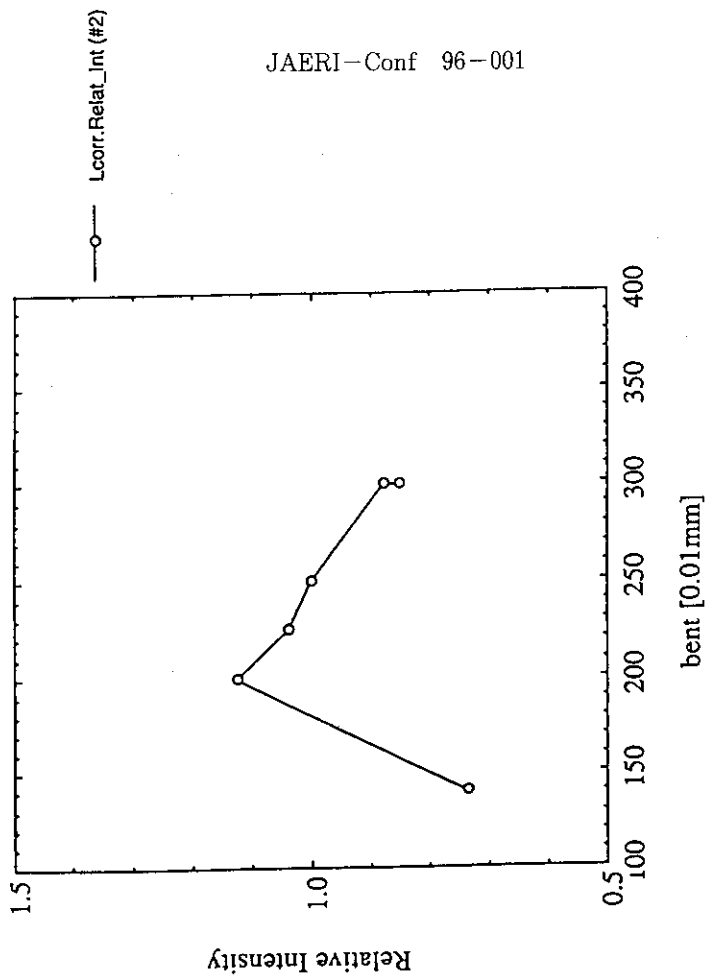
Attenuatorの吸収係数： A [1/mm]

>>>>> 以上の式を3組の (t, n_{obs}) 測定値から
連立して Φ_0 を解く

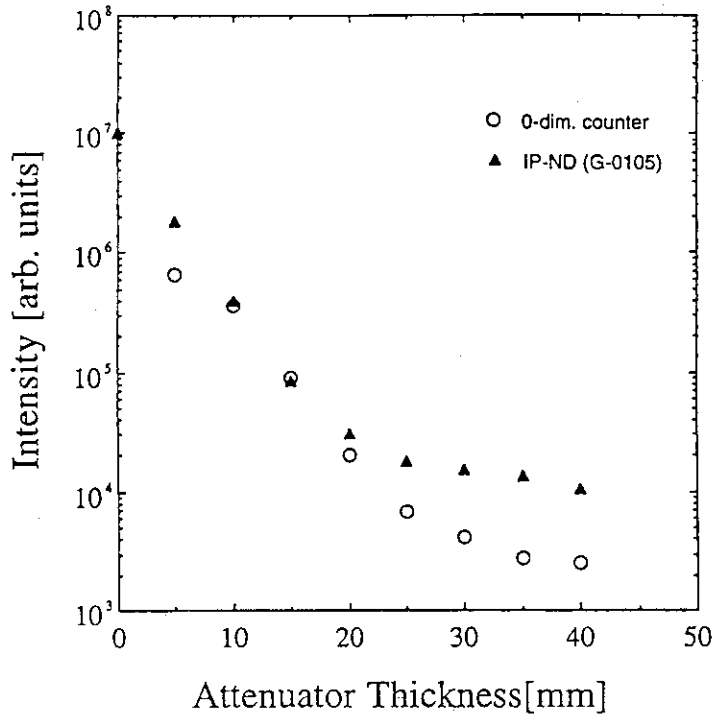
結果： $\Phi_0 = 5.4 \times 10^6$ [n/sec/cm²]

相対精度は H_2O の ^{16}O Cell
IP-ND
等により測定可。

Focusing Effect of Elastically Bent Monochromator



Comparison Intensity vs. Attenuator Thickness between 0-dim. gas counter and IP-ND



検出器と遮蔽テスト

0次元カウンターとPSDの比較

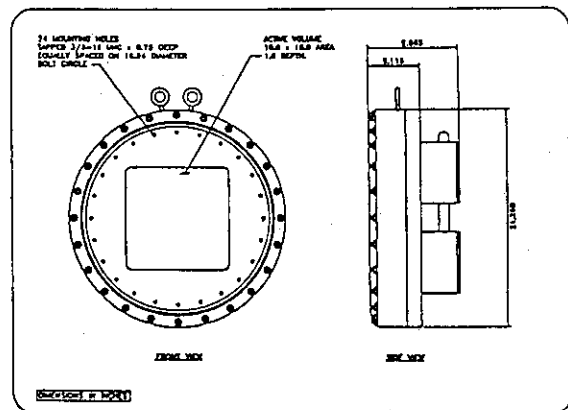
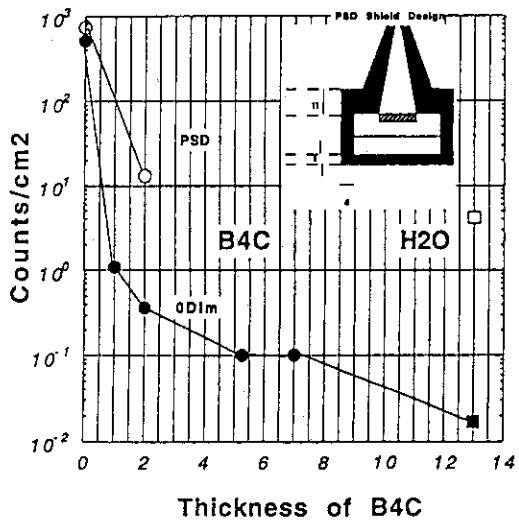
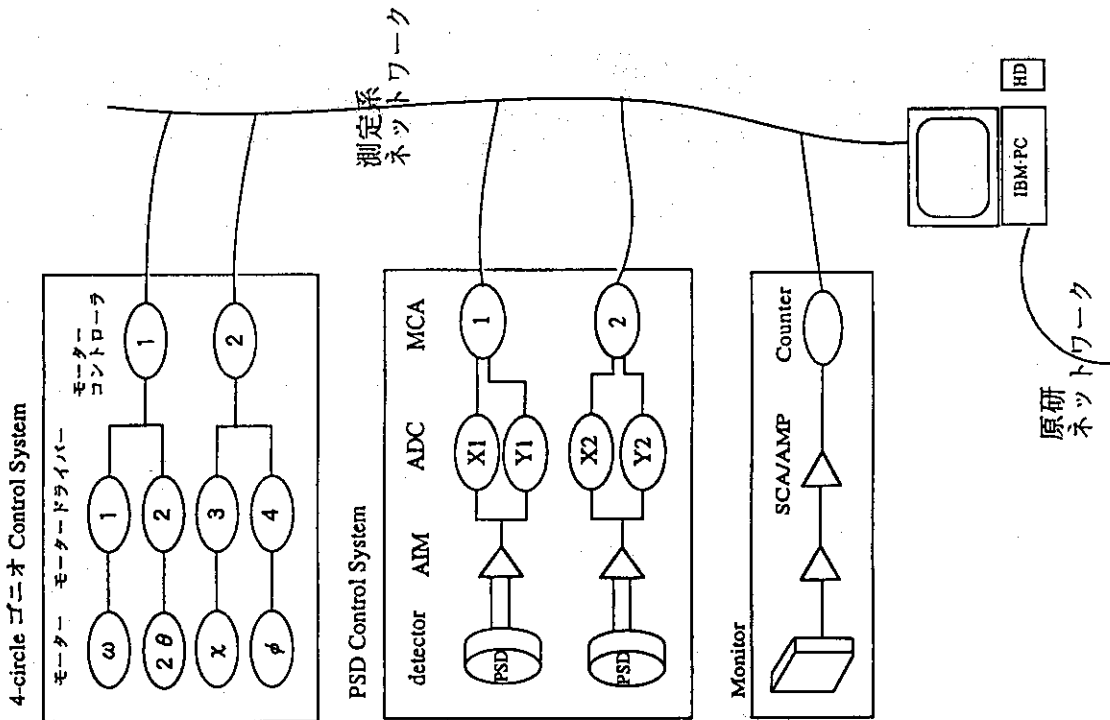
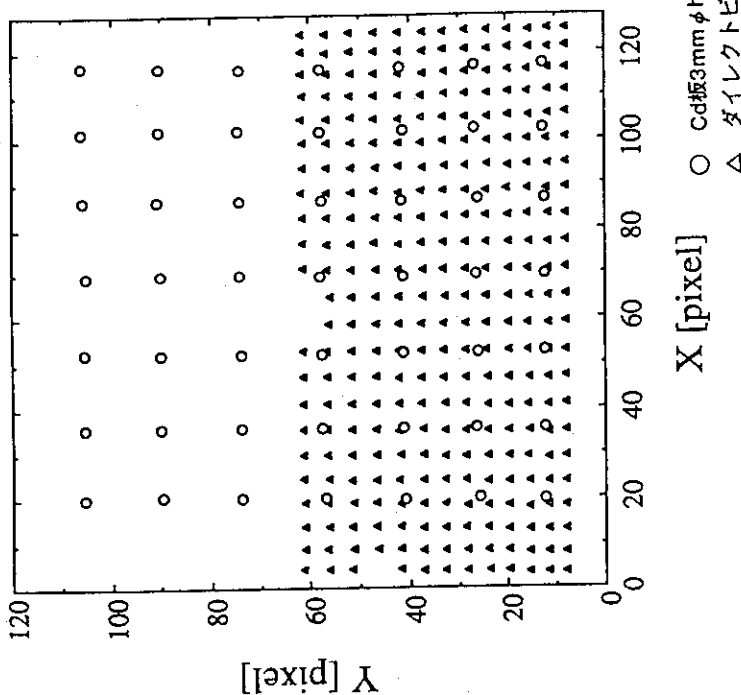


Fig. 1. ORSOLA Model E350H PEPC outline and dimensions.

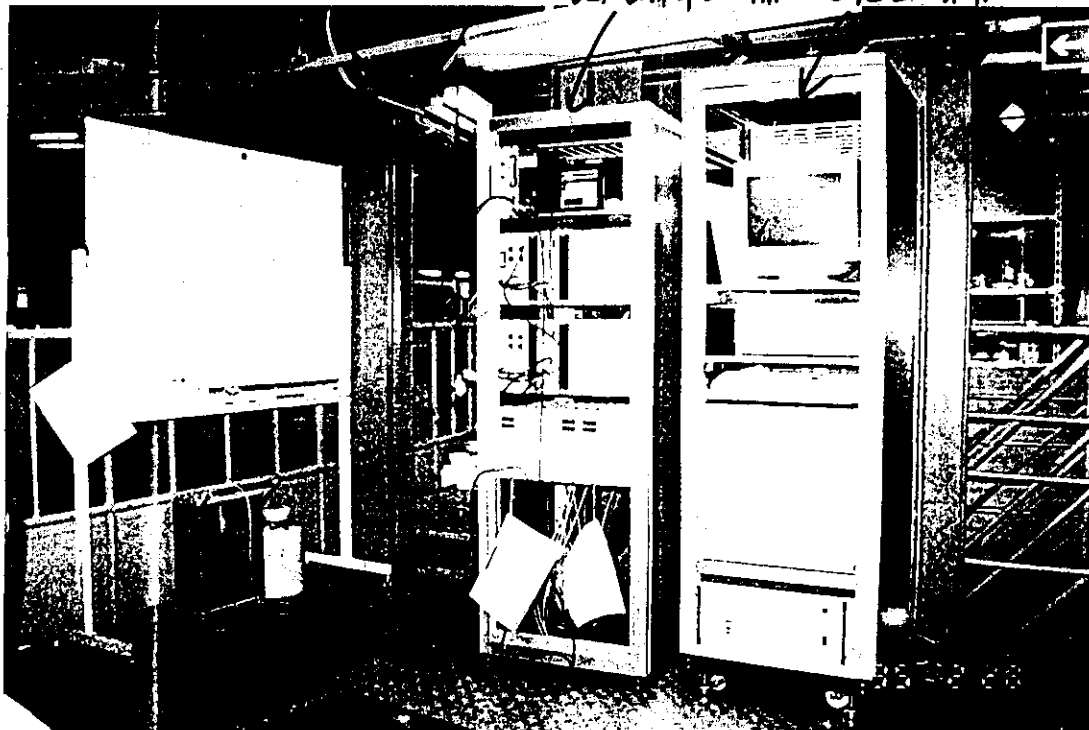
BIX データ集積システム



検出器 (PSD) の位置直線性



BIX 試料用 170 コニ用

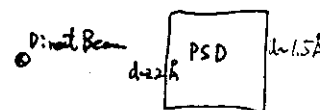
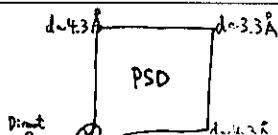


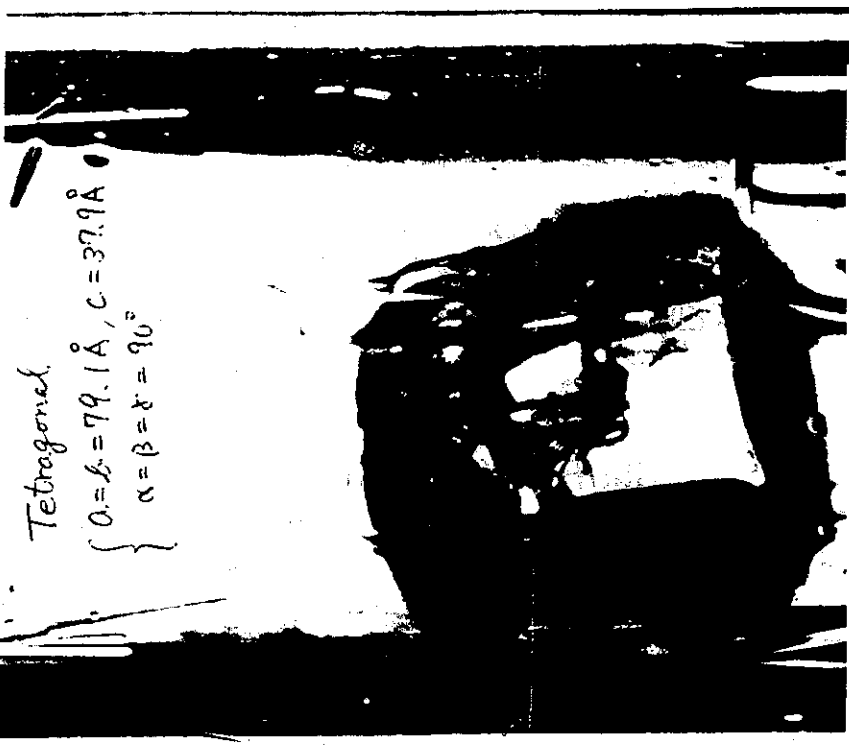
BIX 制御ラック

1995年10月現在

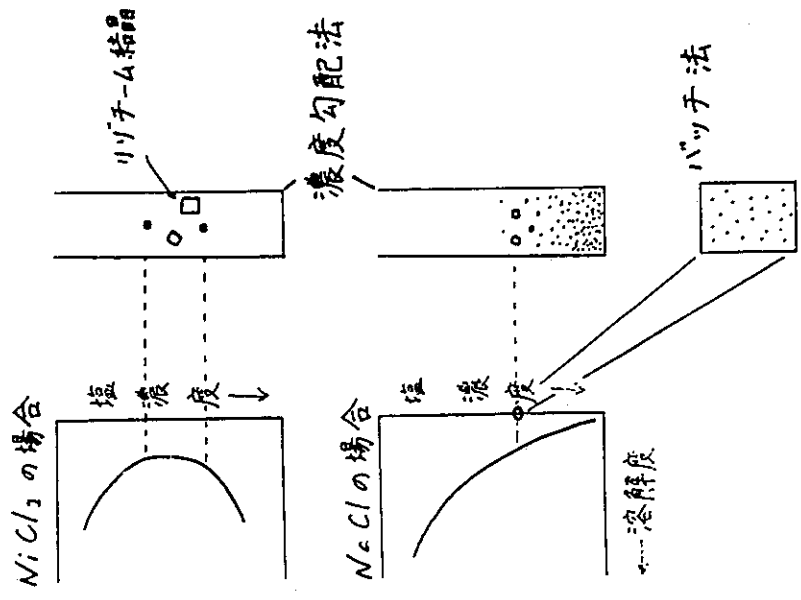
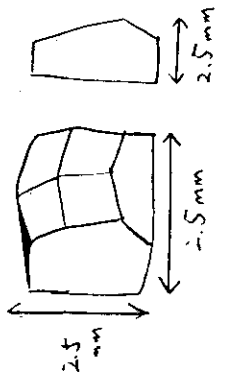
生体高分子結晶構造解析用中性子回折計 (BIX) Specifications

Monochromator, Wavelength	Elastically Horizontally Bent Si(111) ; 1.73 Å
Monochromator-Sample Distance	3100 mm
Beam Properties	Size : 5×5 mm, FWHM : 0.4° , $\Delta \lambda / \lambda$: 2%
Flux at Sample Position	5.4×10^6 n/cm ² /sec
Sample-Detector Distance	600 mm
Position Sensitive Detector	2 units, ³ He-2D-proportional, Area : 250×250 mm, Resolution ~ 2 mm
Shielding	Material : 7cm(B ₄ C)+5cm(H), Background : 0.1 counts/cm ² /sec
Crystallographic Resolution	$(\gamma, \nu) = (-12^\circ, 12^\circ) : 3.3 \text{ \AA}$, $(\gamma, \nu) = (-58^\circ, 0^\circ) : 1.5 \text{ \AA}$





HEW lysozyme
 crystallized in D_2O

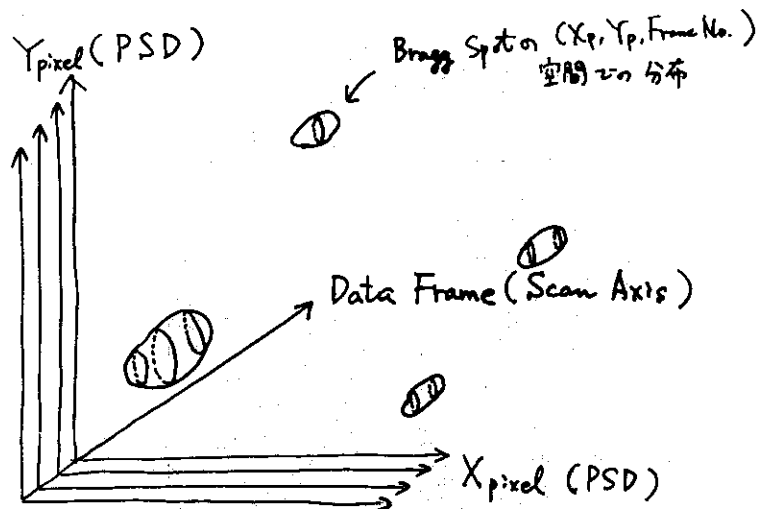


from 宇光 増良, 第2回「生体結晶化」国際会議, 7-7/8/77

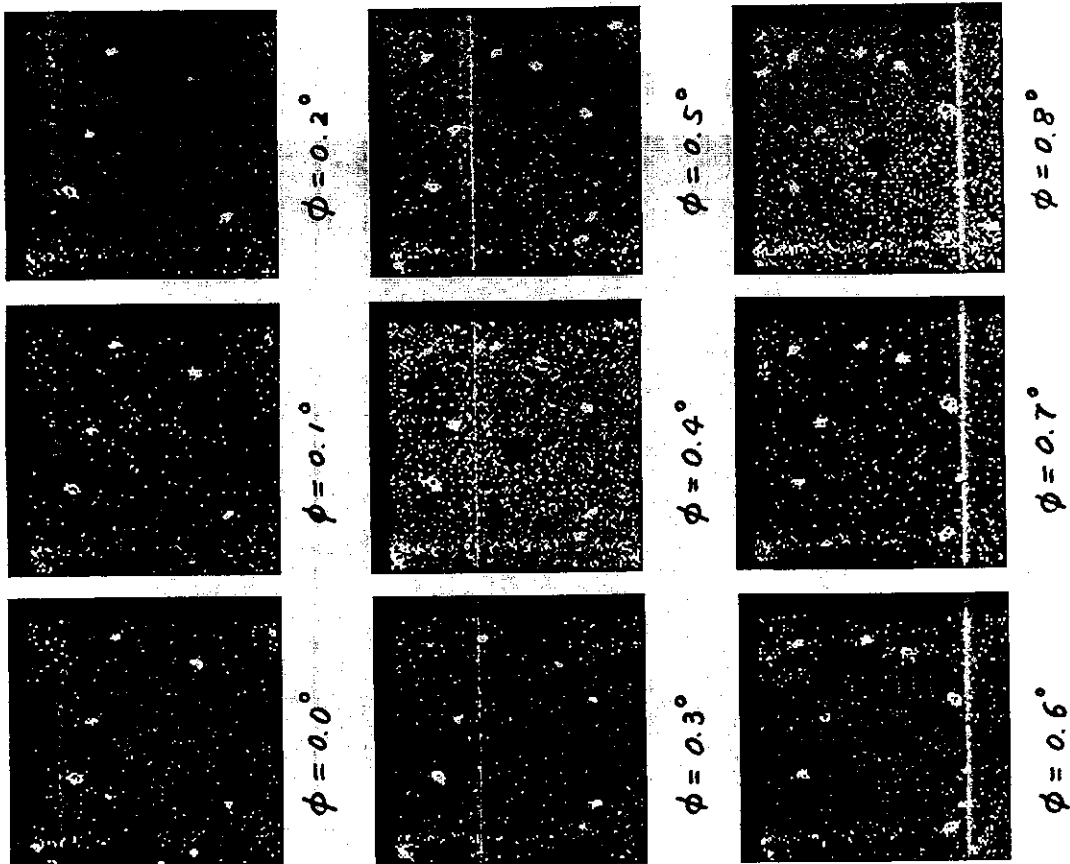
BIX Data Collection Planning

1. $\omega = \chi = 0^\circ$ で、 $\phi = 0.0^\circ$ から 200.0° まで $\Delta\phi = 0.2^\circ$ の step scan
2. 結晶方位決定、反射の指数付け
3. この検出器配置 (γ, ν) において、1. で取れなかった独立な反射を取るための角度の組 (ω, χ, ϕ) を算出、scan の計画をする (スケジューリング)
4. 3. のスケジューリングに従い、この検出器配置 (γ, ν) で取れる反射を ω -scan ですべて集める

反射 Spot の重心を求める



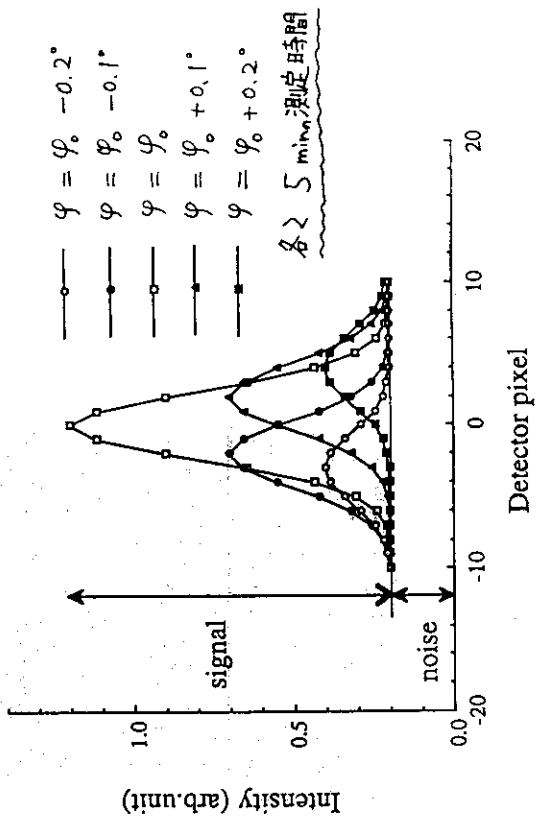
Sample: HEW lysozyme
crystallized in H₂O



ϕ axis step scanning
exposure time : 5 min

Lysozyme, tetragonal (111)

BIX-overlay example



各 φ での S/N 比 : 3.3 ~ 1.1



$\varphi_0 - 0.2 \leq \varphi \leq \varphi_0 + 0.2$ の signal 分の φ の重ね合せの結果、

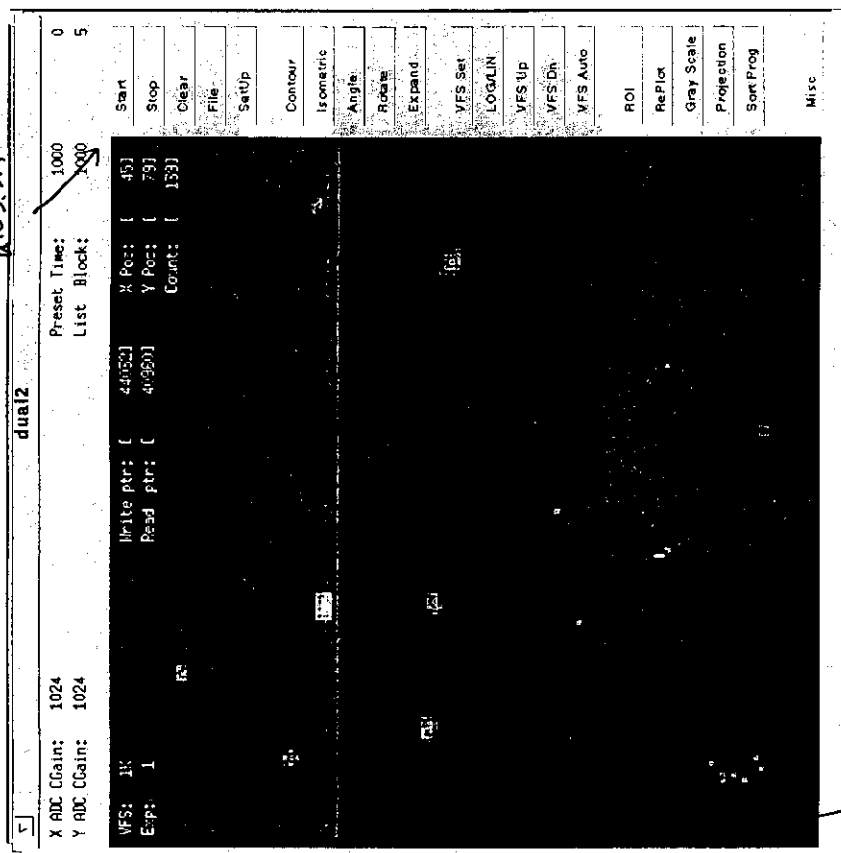
S/N 比 = 34.7

に向上。

Detector Position

$$(\theta, \nu) = (-12^\circ, 12^\circ)$$

$d \sim 3.3 \text{ \AA}$



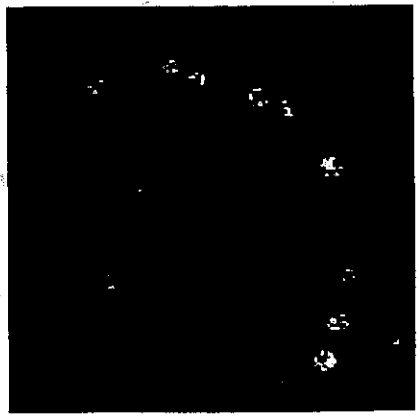
$d \sim 4.3 \text{ \AA}$

Direct Beam

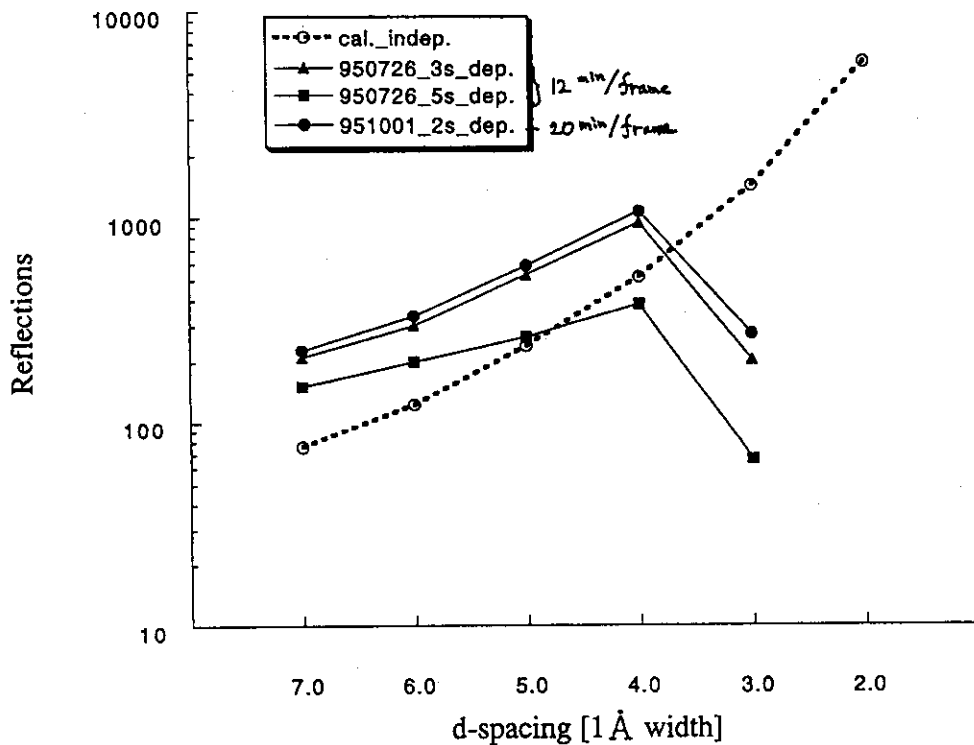
1. Background was subtracted in each frame.
2. Overlay of the above treated data.



Simple overlay of 9 frames



Effective Detector Region : $4.3 \text{ [\AA]} < d < 8.0 \text{ [\AA]}$
 $(\gamma, \nu) = (-12^\circ, +12^\circ)$



現在の進行状態

1. 生体物質中性子回折計 (BIX) の完成
2. リゾチーム (HEW, Tetragonal) のデータ取り開始
3. $3.3 < d < 8.5 \text{ \AA}$ の2,571個の反射を15日間で収集
4. 反射指数を導出する結晶方位行列 U を決定
5. $4.0 < d < 6.0 \text{ \AA}$ の範囲で約80%のcompleteness
6. $2.1 < d < 4.3 \text{ \AA}$ の反射を取り続けており、現在約300

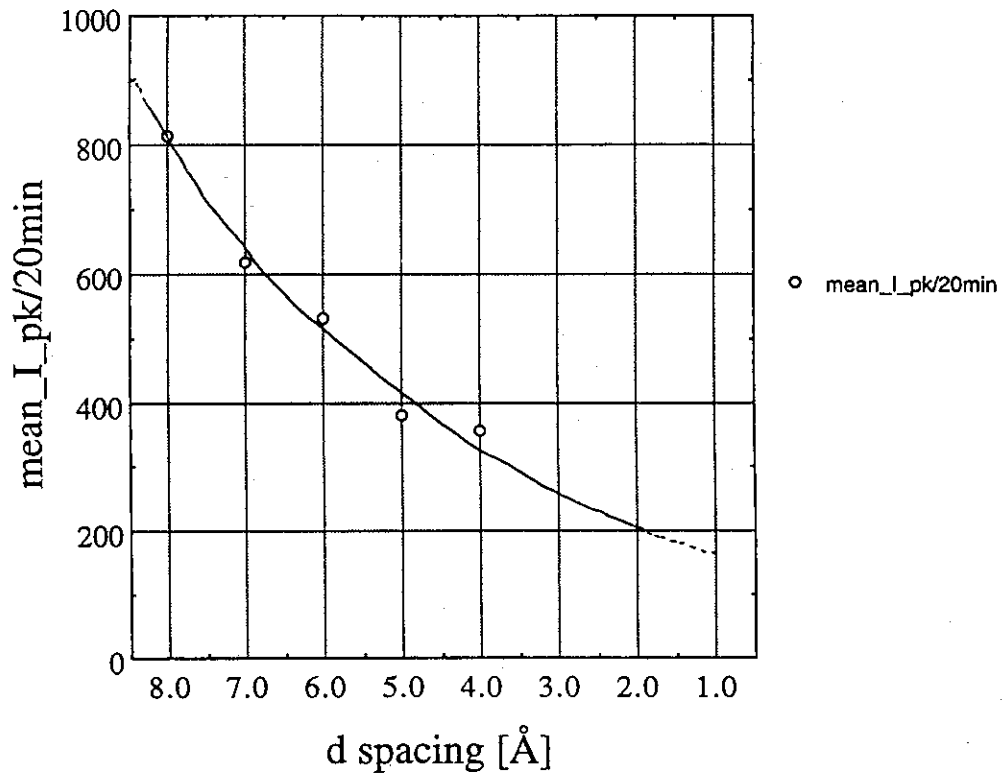
個取ったところである

$(\gamma, \nu) = (-34^\circ, 12^\circ)$ Position :

d- λ	
3.2	2.1
PSD	
4.3	2.2

⊗
Direct Beam

Data from "I_est._from951004.dat"



今後の予定

1. $3.3 \text{ \AA} < d$ の残りの反射、及び $2.0 \text{ \AA} < d$ の反射収集



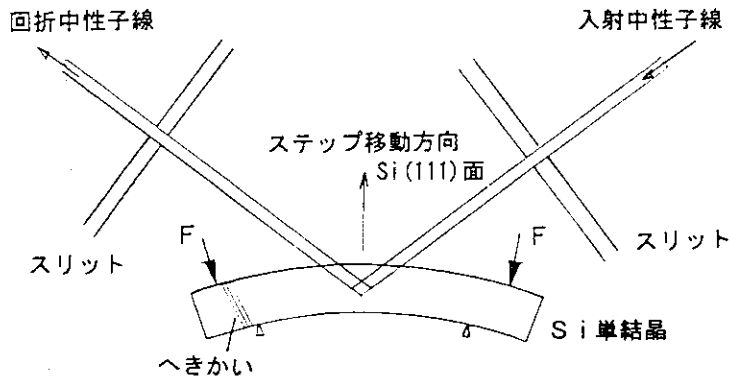
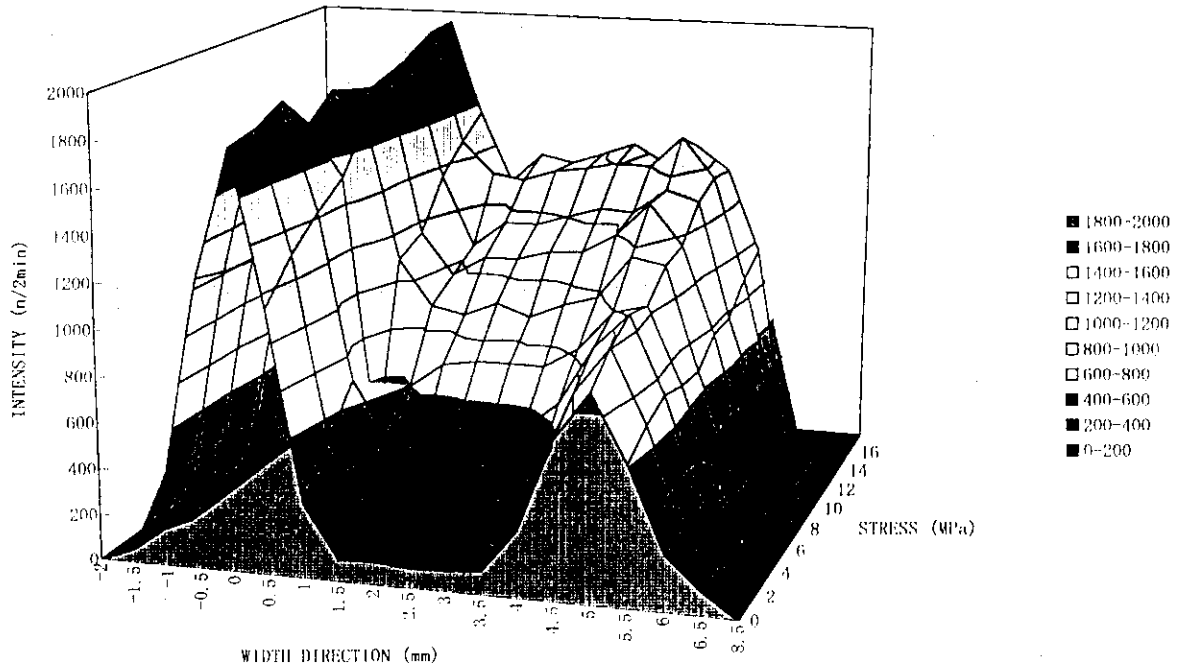
あと75日間かかると予想

2. ILLでのLaue法による同等な結晶のデータと比較・検討
3. 中性子用にセットアップしたソフトウェア：
CCP4、X-PLOR、FRODOを使い、構造解析を始める

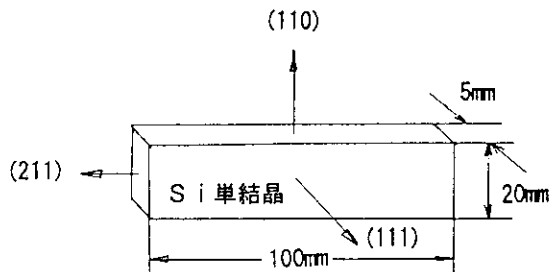
5. モノクロメーター

皆川宣明 (日本原子力研究所 材料研究部)

Stress and scattering intensity of bent Si(111) crystal



16Mpaの応力を越えたところで、へきかい((111)面)による破断が発生した。



Si単結晶に曲げ応力を加えた回折強度測定

曲げ応力をステップ状に加え、その都度、表面から裏面にかけて回折強度を測定した。

6. BIX-II、BIX-LAUE

新村信雄（日本原子力研究所 先端基礎研究センター）

中性子イメージングプレート まとめ

日本原子力研究所
先端基礎研究センター
新村信雄

生体物質中性子回折計(BIX)

- BIX - I
単色中性子、
二次元比例計数管 (PSD) : 2 台

- BIX - II
単色中性子
中性子イメージングプレート

- BIX - LAUE
準白色中性子 (広帯域速度選別機)
中性子イメージングプレート

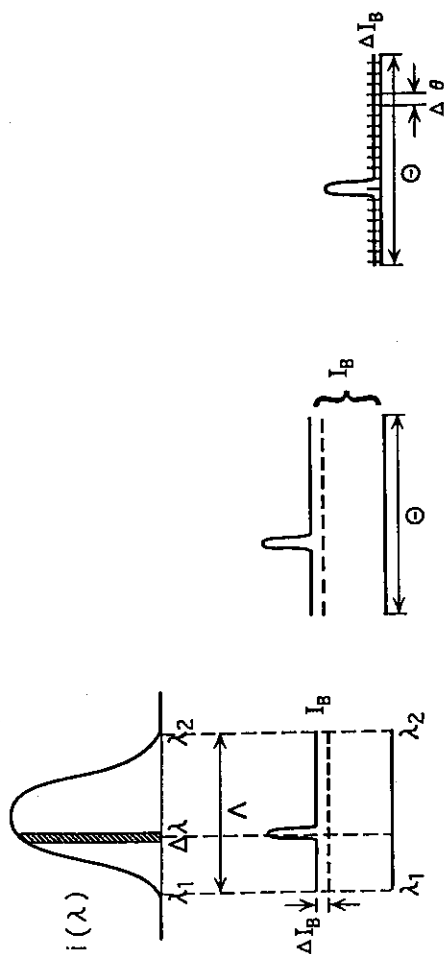
緊急提案

中性子イメージングプレートを装備した
生体物質中性子回折計

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
新村 信 雄

Step Scan

Oscillation

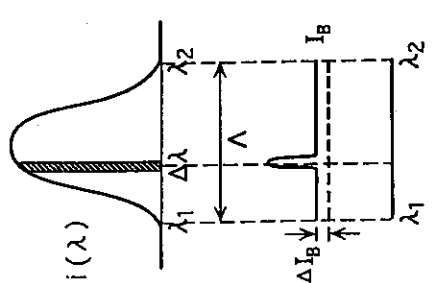


$$I_B = \frac{\Theta}{\Delta\theta} \cdot (\Delta I_B)$$

$$\Theta \sim 5^\circ, \Delta\theta \sim 0.2^\circ$$

$$I_B = 25 \cdot \Delta I_B$$

LAUE



$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = \cot \theta \cdot \Delta\theta$$

$$\lambda = 3\text{ \AA}, d = 3\text{ \AA}, \theta = 30^\circ$$

$$\Delta\theta = 0.01 \text{ radian}$$

$$\Delta\lambda = 0.06 \text{ \AA}$$

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \sim 6\%$$

$$I_B = 17 \cdot \Delta I_B$$

<提案理由>

生命現象の理解に生体物質(タンパク質・DNA等)の立体構造の決定は必須で、これらはX線結晶構造解析で行われてきた。しかも、放射光及びX線用イメージングプレートを使用したX線結晶構造解析報告数は、指数関数的に増加してきている。しかし、生理機能の重要な役割を担っている水素原子の位置や振動は、X線法では観測困難で、多くは類推で議論せざるを得なかった。一方、中性子回折法では水素原子の位置決定が可能である。そのため中性子回折法の重要性は指摘されていたが、実験上の困難から、容易に実験できるものではなく、優れた特徴を有しているが、忘れられつつあった。その技術上の問題の一つは、高い効率を有する中性子イメージングプレートの実現が遅れていたことである。最近、我々がX線用イメージングプレートに匹敵する性能を有する中性子イメージングプレート(IPND)を開発するのに成功したことにより、事情が一変した。

従来の生体物質中性子回折計は、比例計数管を用いており、最高性能の装置を用いても、年1~2ヶの試料のデータを取得するのが限度であった。これは、多種多様な生命現象のほんの一面を垣間見るに過ぎない役割しか担えない危惧があり、多くの研究者の関心を引き付けるに乏しかった。中性子イメージングプレートの総合的な性能は、従来の中性子検出器の10倍もあり、これを用いると年10~20ヶの試料のデータが取得可能となる(資料1)。現時点でもすでに多種多様な生命現象に併せて、多くの試料が多くの研究者等により準備されており(資料2)、中性子イメージングプレートを装備した生体物質中性子回折計は、これらの需要を十分満足することができるとある。

生体物質中性子回折実験を行っているグループは、世界でラウエ・ランジュバン研究所(ILL、仏国)、ブルック・ヘブン国立研究所(BNL、米国)と日本原子力研究所先端基礎研究センターである。我々の中性子イメージングプレートの成果を学術誌に発表したところ、ILL、BNLからテストを兼ねた予備使用のための借

要求事項名：中性子イメージングプレート付生体物質中性子回折計
(新しい産業の創出につながる科学技術)

1. 概要

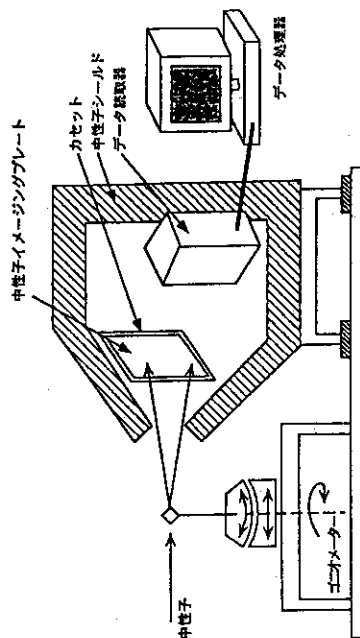
タンパク質やDNAの三次元立体構造を原子レベルで決定することは、生命現象の理解にとって重要なことである。これはX線結晶構造解析で決定されるが、生理機能に重要な役割を果たす水素の位置は、中性子回折法で初めて観測される。ただし、中性子回折法はX線回折法に較べて中性子強度が弱いため、高効率の中性子検出器を装備した生体物質中性子回折計を用いる。

2. 科目、要求額

1. 法人の出資金
(目) 日本原子力研究所出資金
53,000千円
2. 科目
(項) 原子力試験研究費 53,000千円

3. 新産業創出に対する効果

タンパク質やDNAの三次元立体構造を水素原子まで含めて決定できる生体物質中性子回折計は、構造生物学の分野に大きな貢献をする。つまり、遺伝子工学、遺伝子治療、薬学、農業等へ大きな影響を与える。
また、中性子イメージングプレートは、従来の中性子検出器の性能をはるかに越えたもので、この実用化は、中性子検出法に開拓するすべての原子力分野で中性子イメージングプレートを用いるきっかけとなる。
特に、イメージングプレートからのデータをオンライン化することで、大量イメージデータの処理技術に関する産業分野にも大きな効果を与える。
本件は、所外からのニーズも高く、共同利用に資するものでもある。



用申し出があり、世界の構造生物学研究は一気に中性子イメージングプレートを用いた実験に変化しようとしている。原研グループのIP-NDの開発の成功により、生体物質中性子回折法の容易さが現実のものとなったことは事実であり、世界は争ってその方向に進んでおり、この分野で世界の後塵を拝するようなことは避けたい。

高エネルギー物理学研究所放射線実験施設では、坂部グループにより世界に先駆けてワイセーベルカメラを設置したことで、高エネルギー物理学研究所はX線構造生物学分野の頂点を築いたが、中性子イメージングプレート付生体物質中性子回折計(資料3)を緊急に製作(必要工期4ヵ月)することで、原研は中性子構造生物学の分野で頂点を築き、世界をリードする成果をあげることが可能となる。

資料1：中性子イメージングプレート付生体物質中性子回折計と従来の生体物質中性子回折計の比較

資料2：生体物質中性子回折のための現存試料

資料3：中性子イメージングプレート付生体物質中性子回折計

生体物質中性子回折計 (BIX-II)

【検討項目】

1. 場所

T2-3

ビームサイズ、ビーム高さ、Shield、ビーム分散

2. モノクロメーター

種類 PG、bent Si

波長範囲、波長分散、角度分散

モノクロ-Sample間距離

3. 回折計

κ サークル、 χ サークル、温度変化、

ビームナローワー、ビームストッパー

4. 検出器

IP、種類、枚数、

camera半径、

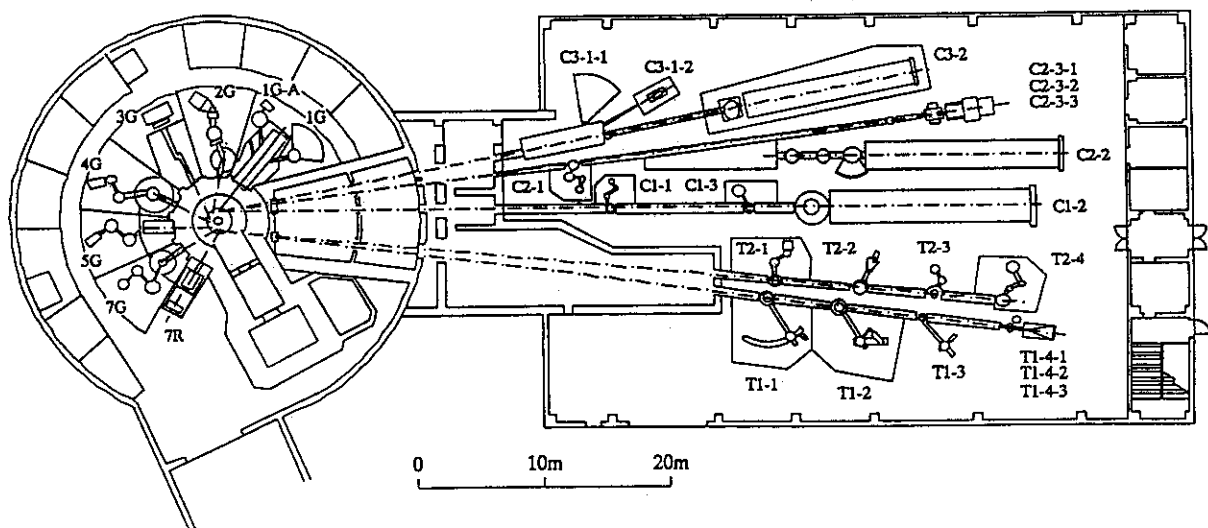
配置、

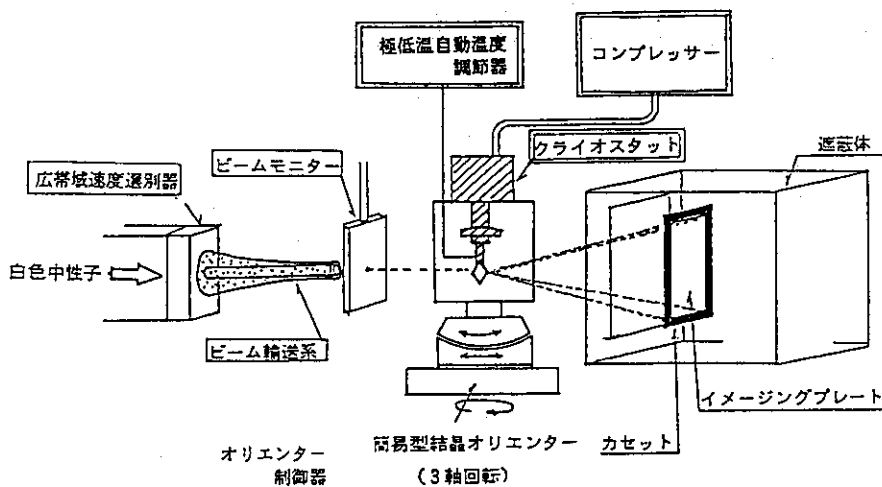
読取方式

5. シールド

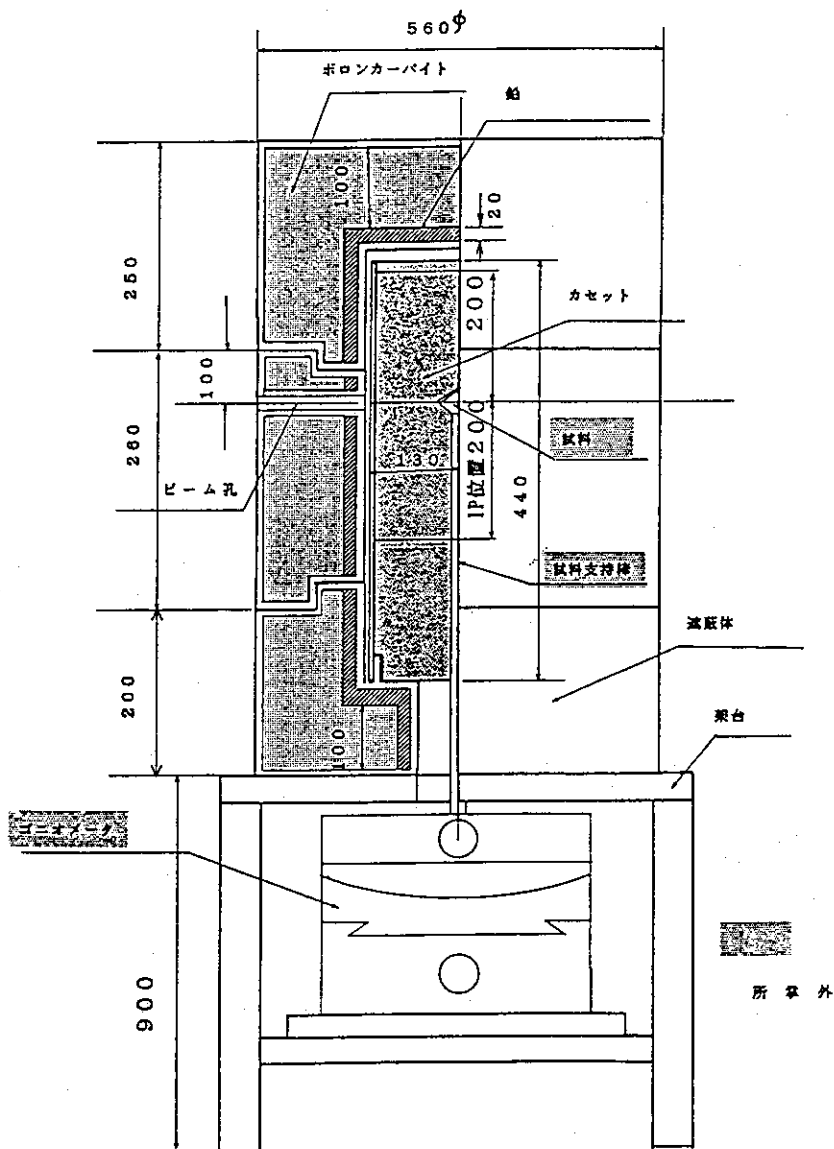
6. データ集積

JRR-3ビーム実験装置配置図





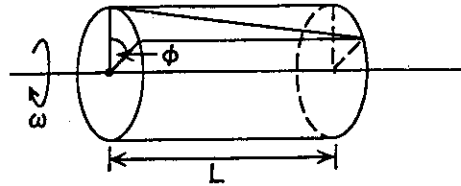
白色中性子回折装置の概念図
(仮称)



概念図

広帯域速度選別器

波長範囲 3~10Å
 波長域 $\Delta\lambda/\lambda \sim 50\%$



V : neutron velocity (cm/sec)
 L : length of chopper (cm)
 ω : chopper angular velocity (radian/sec)
 ϕ : phase difference (radian)

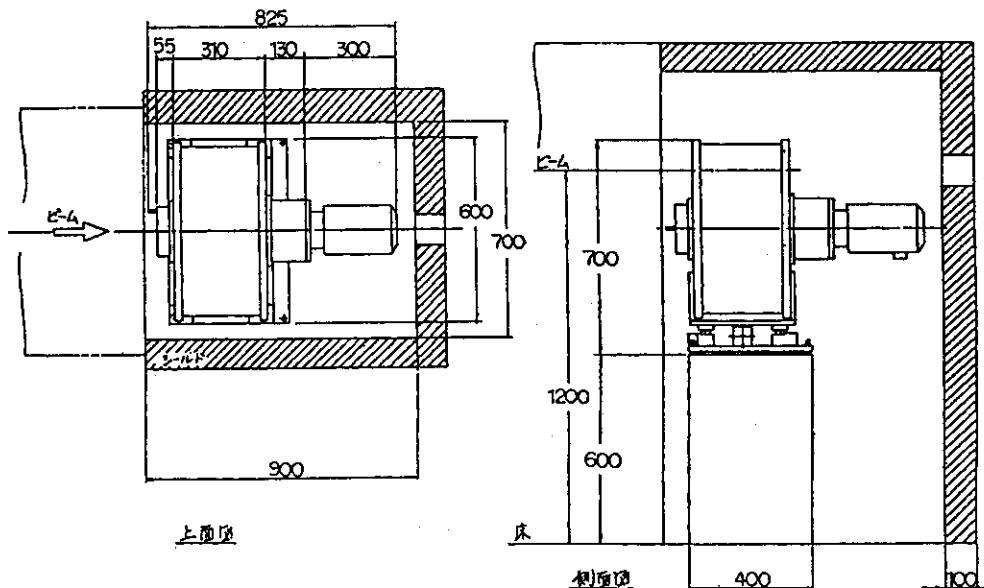
$$V = L \omega / \phi$$

$\lambda = 4 \text{ \AA}$, $V = 10^5 \text{ cm/sec}$
 $L = 20 \text{ cm}$
 $\omega = 2\pi n / 60$, $n = 15,000 \text{ r.p.m.}$
 $\phi = 2\pi / 20 \text{ radian}$

L=20cm, 15,000 r.p.m. のchopper の
 $\lambda = 4 \text{ \AA}$ の中性子の入口、出口の位相差は $2\pi / 20$ ラジアンである。
 この chopper で $\Delta\lambda/\lambda \sim 50\%$ 、つまり $\Delta\lambda = 2 \text{ \AA}$ の時
 $\lambda_{\min} = 3 \text{ \AA}$ 、 $\lambda_{\max} = 5 \text{ \AA}$ の ϕ を求める。

$\lambda_{\min} = 3 \text{ \AA}$, $V = 1.33 \times 10^5 \text{ cm/sec}$, $\phi_{\max} = 2\pi / 26.6$
 $\lambda_{\max} = 5 \text{ \AA}$, $V = 0.8 \times 10^5 \text{ cm/sec}$, $\phi_{\min} = 2\pi / 16.0$

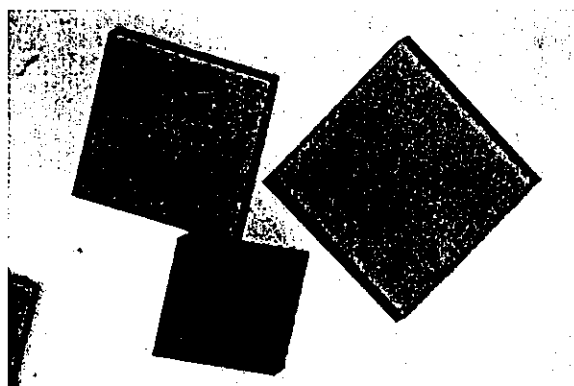
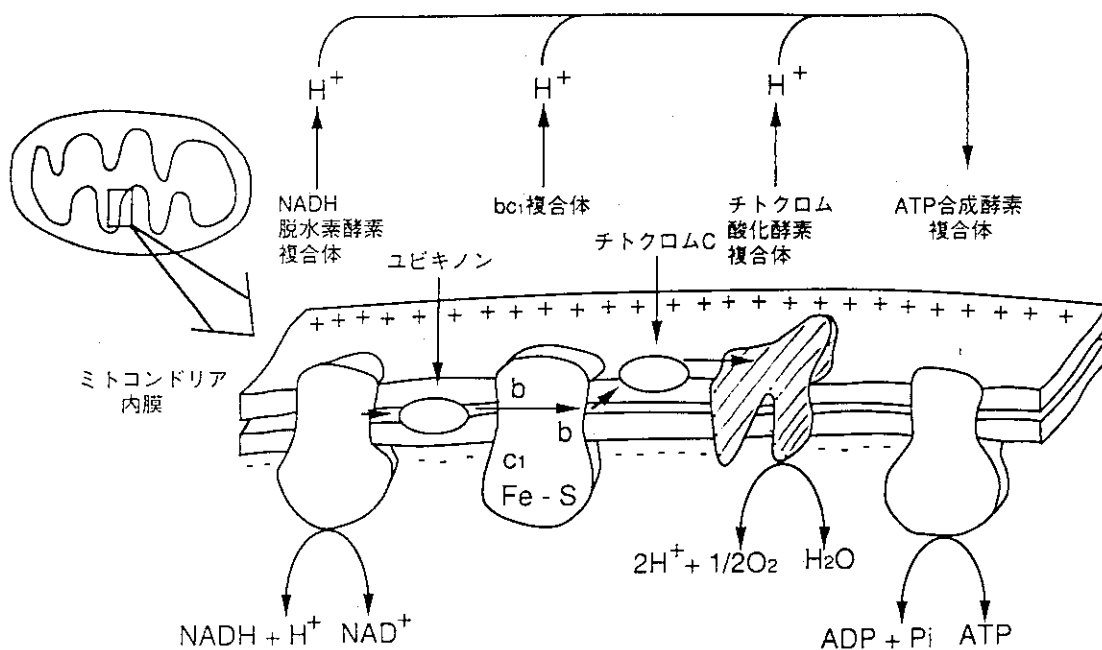
$$\therefore \Delta\phi = 9^\circ, \text{ at } \phi = 18^\circ$$



	現時点での実用化	将来の可能性	備考
生体物質結晶構造解析	◎		γ感受性
ラジオグラフィ	◎		γ感受性
粉末回折	テスト実験あり	◎	詳細設計
長波長中性子光学	テスト実験あり	◎	詳細設計
単結晶構造解析	テスト実験なし	○	テスト実験要
小角散乱	テスト実験あり	△	熱中性子には使える
非弾性散乱	テスト実験なし	×	現時点でメリットなし

7. ウシ心筋のチトクロム酸化酵素のX線結晶解析

山下栄樹 (大阪大学蛋白質研究所)



結晶学的データ

晶系 : 斜方晶系

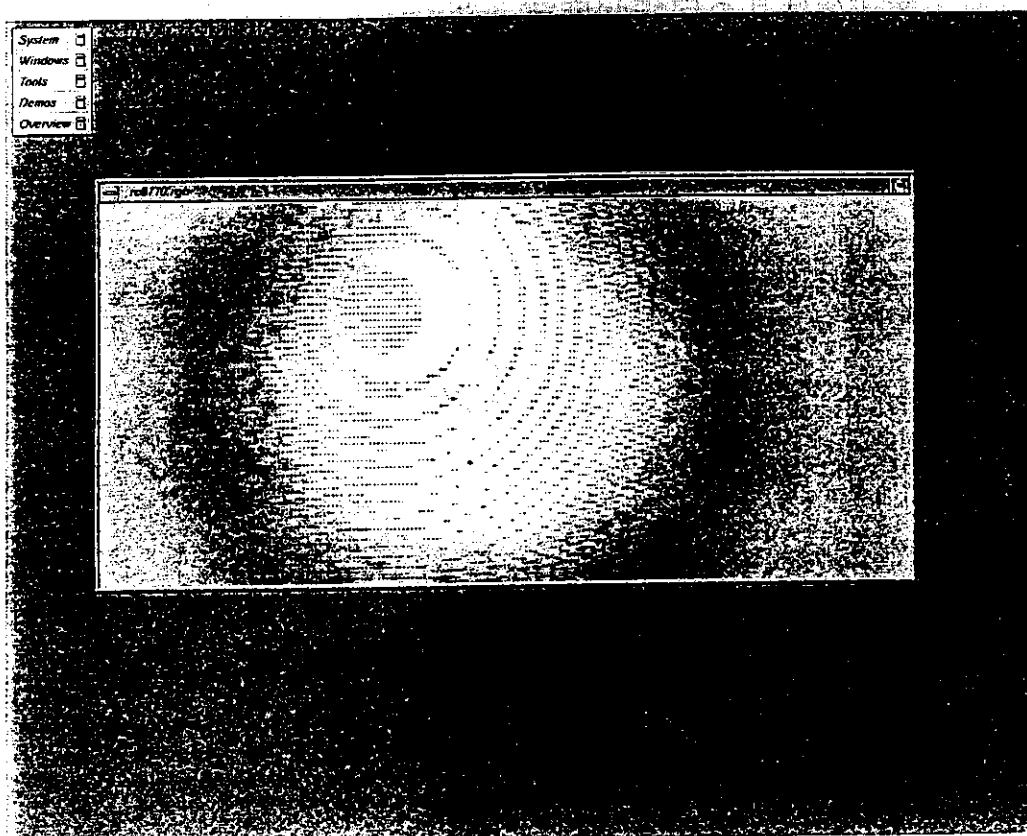
空間群 : $P2_12_12_1$

格子定数 : $a=189.1, b=210.5, c=178.6 \text{ \AA}$

$V_m=4.44 \text{ \AA}^3/\text{Da}$

(非対称単位中の分子数 : 2)

分子量 : 200KDa/分子



Native結晶の回折強度データ

分解能 (Å)	100-2.8	2.9-2.8
観測された反射数	518,054	24,542
独立な反射数	159,742	13,074
completeness (%)	90.1	74.4
Rmerge (%)	7.8	29.0

beam line:BL-6A2

露出時間:180sec

振動角:1.0deg

オーバーラップ:0.0deg

カップリング定数:25.0deg/mm

使用 I P 枚数:135

$$R_{merge} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h,i)}$$

重原子誘導体結晶の回折強度データ

	Na ₂ IrCl ₆ (I)	Na ₂ IrCl ₆ (II)	CH ₃ HgCl
分解能	3.0	3.0	3.0
観測された反射数	319,358	381,828	328,484
独立な反射数	125,036	133,245	127,548
completeness (%)	86.3	93.0	88.3
Rmerge (%)	9.0	6.2	8.5
Riso (%)	7.3	5.7	9.0

beam line:BL-6A2

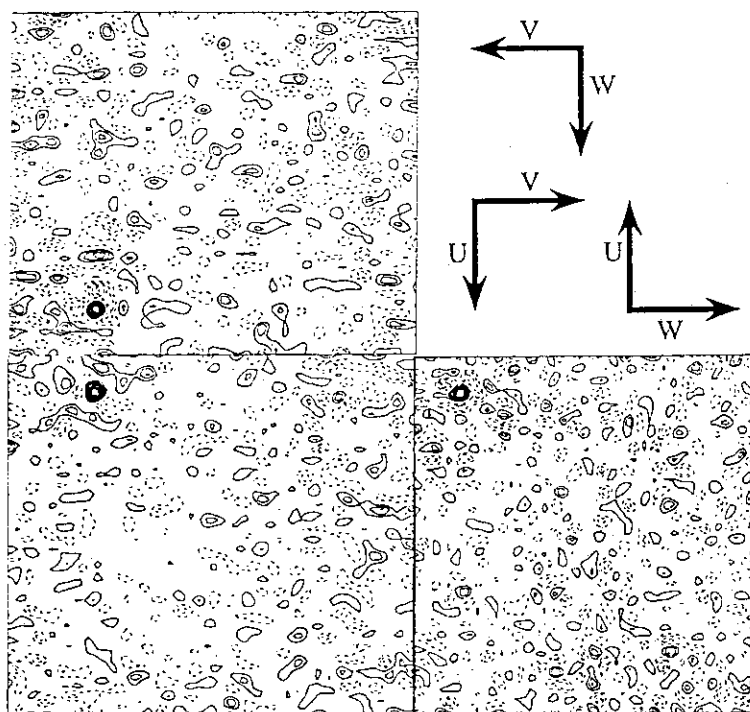
振動角:1.0deg

オーバーラップ:0.0deg

カップリング定数:25.0deg/mm

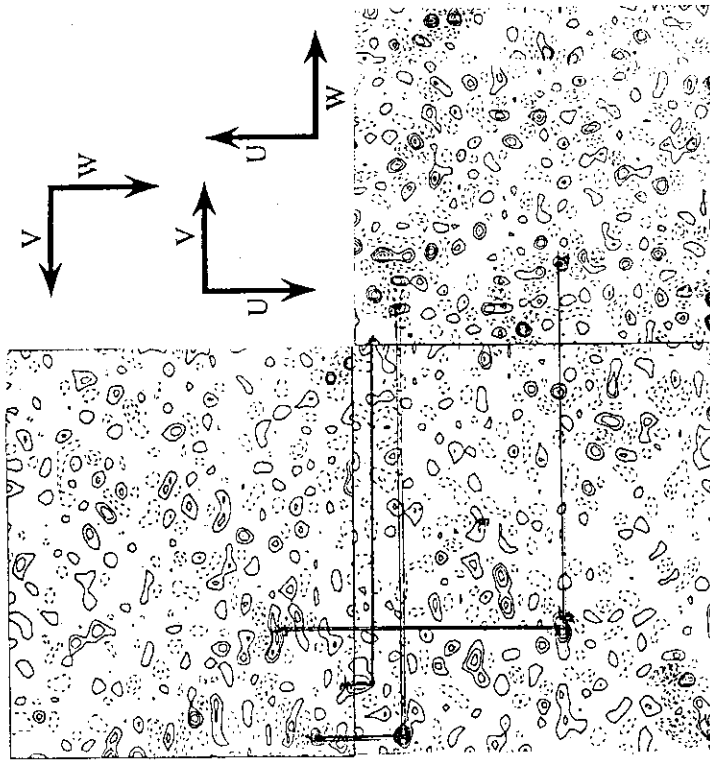
$$R_{merge} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h,i)}$$

$$R_{iso} = \frac{\sum |F_{ph} - F_p|}{\sum F_{ph}}$$

IrCl₆(II)の差パターン関数

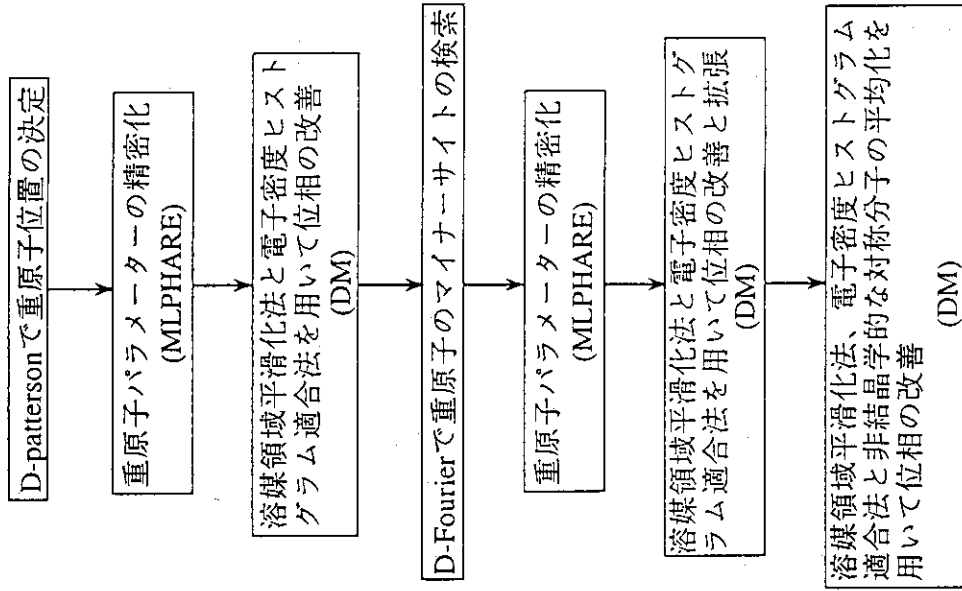
分解能: 7.0-3.0 Å

CH₃HgClの差パターン関数



分解能 : 7.0-3.0 Å

位相決定の流れ図



MLPHAREの結果

	IrCl ₆ (I)	IrCl ₆ (II)	CH ₃ HgCl
分解能 (Å)	—	3.0	3.0
重原子サイトの数	—	1	8
R _{Cullis}	—	0.89	0.86
Phasing power	—	0.43	0.57

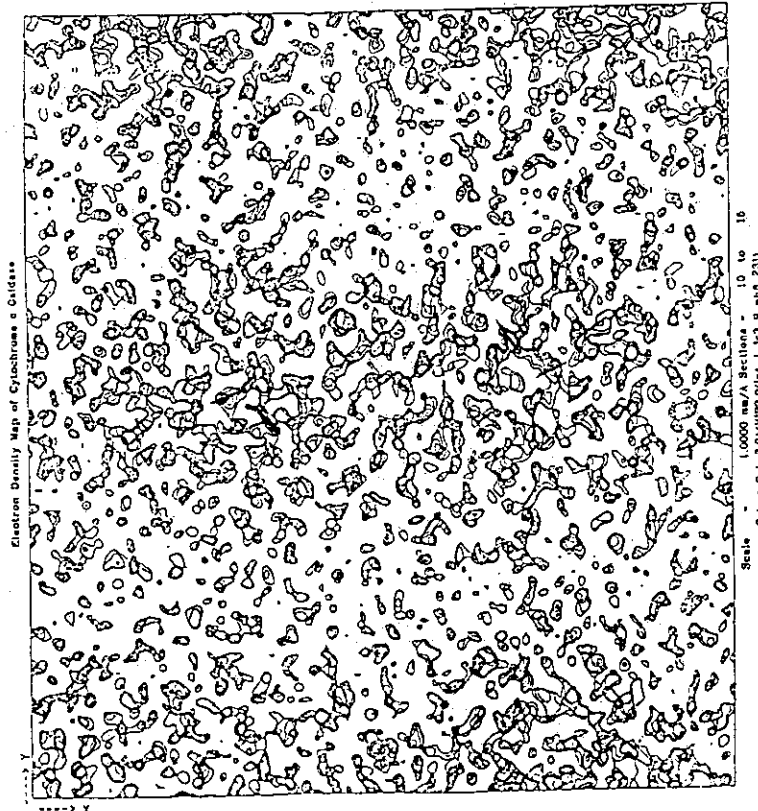
分解能 (Å)	9.71	7.18	5.69	4.72	4.03	3.51	3.12	3.00	total
Figur of merit	0.45	0.45	0.43	0.36	0.25	0.17	0.10	0.06	0.22
反射数	4222	6057	10077	15192	21350	27968	33469	11837	130172

マイナーサイトを加えた後の
MLPHAREの結果

	IrCl ₆ (I)	IrCl ₆ (II)	CH ₃ HgCl
分解能 (Å)	3.0	3.0	3.0
重原子サイトの数	9	1	23
R _{Cullis}	0.90	0.86	0.79
Phasing power	0.38	0.54	0.74

分解能 (Å)	9.71	7.18	5.69	4.72	4.03	3.51	3.12	3.00	total
Figur of merit	0.64	0.60	0.57	0.48	0.38	0.28	0.16	0.18	0.33
反射数	4226	6058	10082	15197	21386	28122	34169	12333	131573

重原子同型置換法から求めた
位相を使って計算した電子密
度図 (位相改善前)



非結晶学的な関係にある分子間
の相関係数は49%

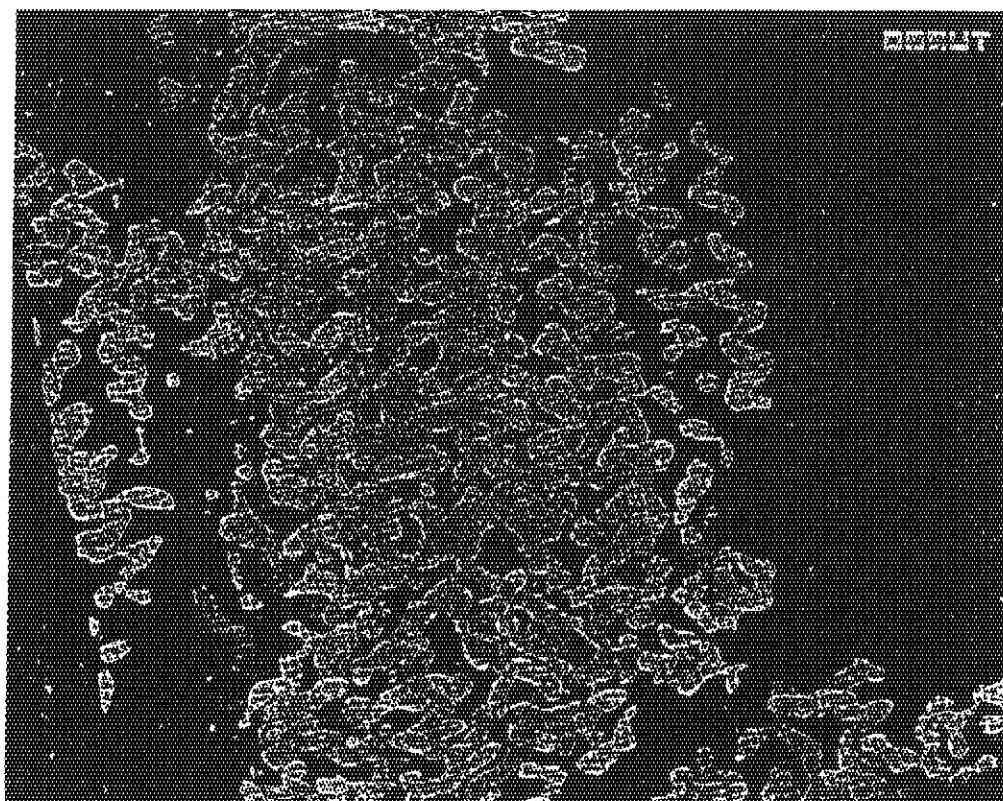
15.3.0 Å分解能の電子密度図
Z軸を224等分 (0.79 Å/セクション) したもので
6セクション (セクション番号: 10~15) を重ねている。
等高線は各セクション15である。

非結晶学的な対称を用いて
分子の平均化を行った後の
電子密度図 (位相改善後)



非結晶学的な関係にある分子間
の相関係数は92%

15.3.0 Å分解能の電子密度図
Z軸を224等分 (0.79 Å/セクション) したもので
6セクション (セクション番号: 10~15) を重ねている。
等高線は各セクション15である。



各金属のピークの高さ

	2.8 Å分解能 電子密度図	4.5 Å分解能 Native異常分散 差フーリエ図
Cu _A	12.1σ	14.3σ
Zn	10.9σ	9.7σ
Cu _B	11.4σ	9.3σ
Fe _{A3}	10.3σ	5.1σ
Fe _a	10.0σ	5.3σ
PO ⁴	9.6σ	
PO ⁴	9.3σ	
PO ⁴	8.3σ	
Other highest	7.8σ	3.5σ

PO⁴:リン酸

Feの電子数: 26

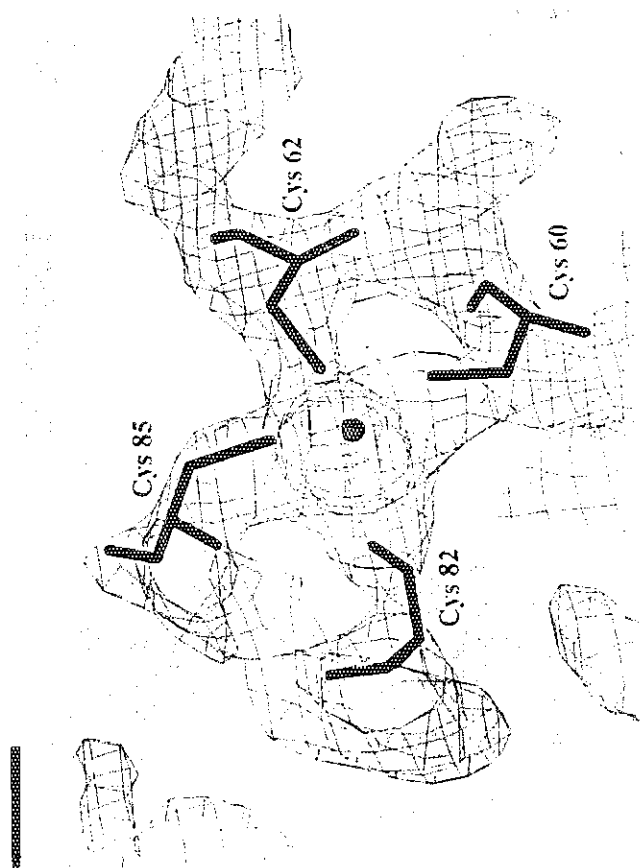
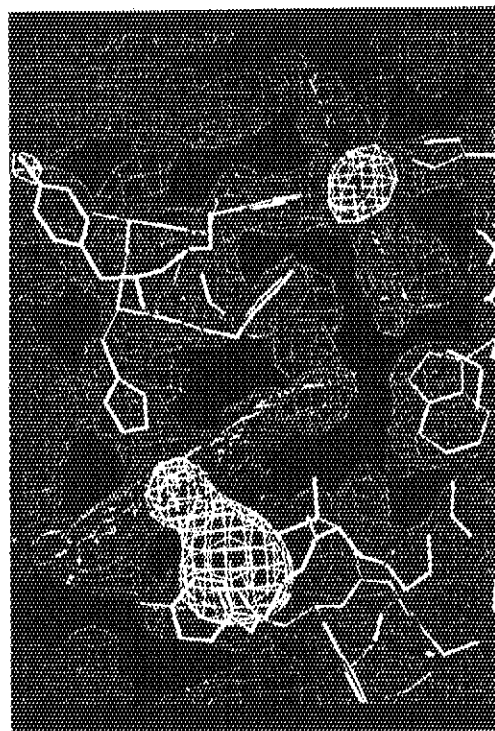
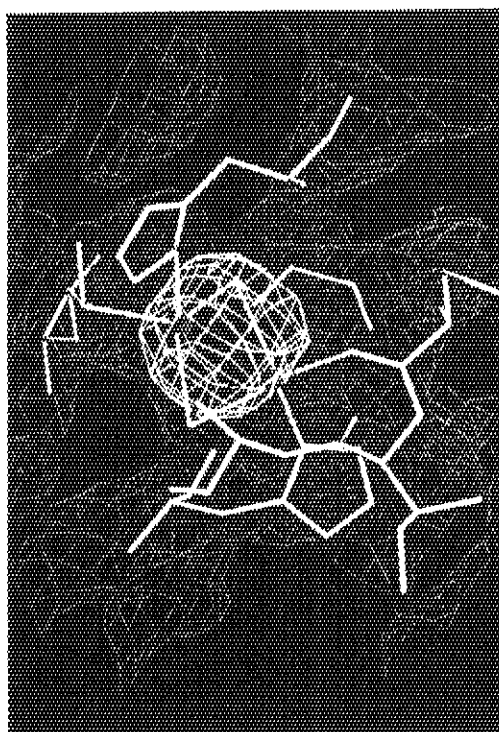
Cuの電子数: 29

Znの電子数: 30

Feの $f'_{1.0\text{Å}}$: 1.555

Cuの $f'_{1.0\text{Å}}$: 2.282

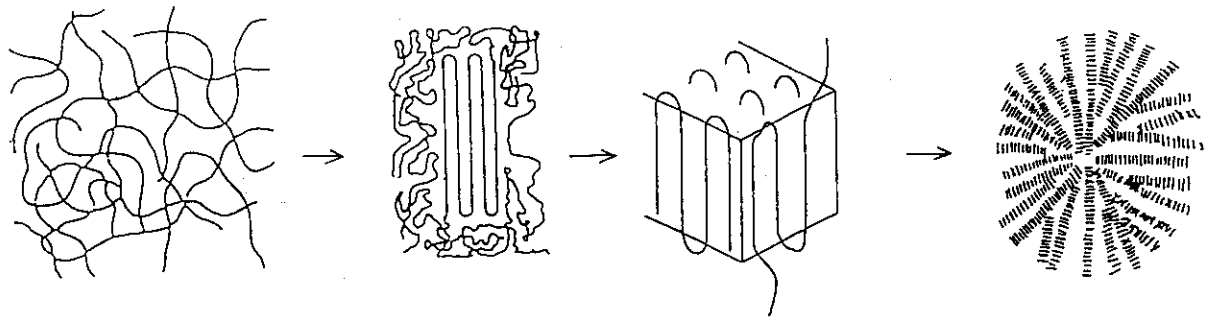
Znの $f'_{1.0\text{Å}}$: 2.564



8. 結晶成長

8.1 高分子の結晶化誘導期における構造形成

今井正幸 (東京大学物性研究所)



Nucleation

Crystal Growth

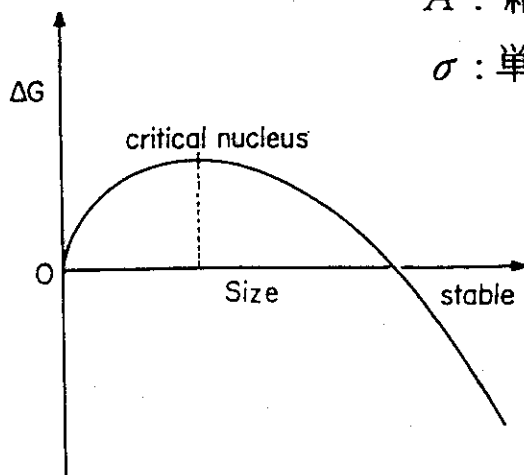
Spherulite

$$\Delta G = \Delta G_c + \Sigma A \sigma$$

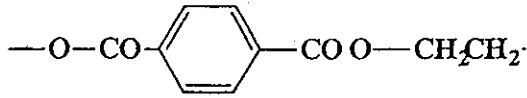
ΔG_c : 結晶相と非晶相との自由エネルギー差

A : 結晶相の表面積

σ : 単位面積当たりの界面エネルギー



Poly (ethylene terephthalate) PET



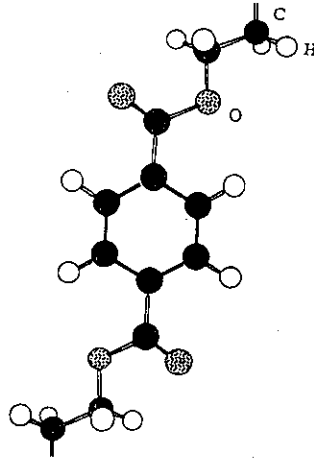
$M_n=25000$, $M_w/M_n=2.5$
 $T_g=75^\circ\text{C}$, $T_m=250^\circ\text{C}$

Sample Preparation

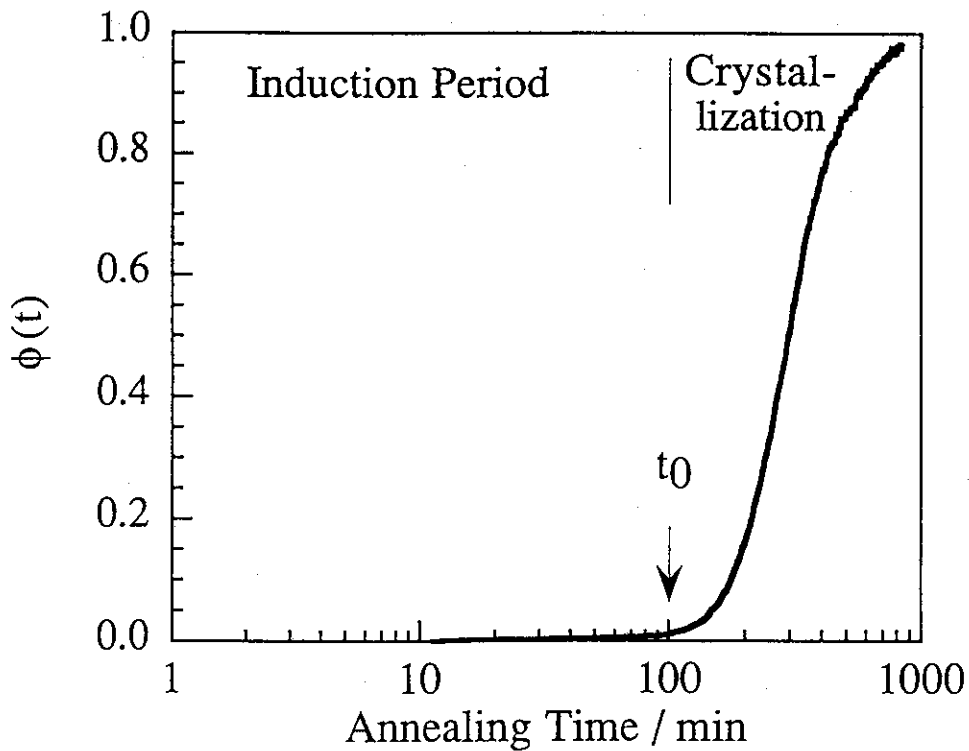
Melt at 290°C for 2 min

Quench in ice water

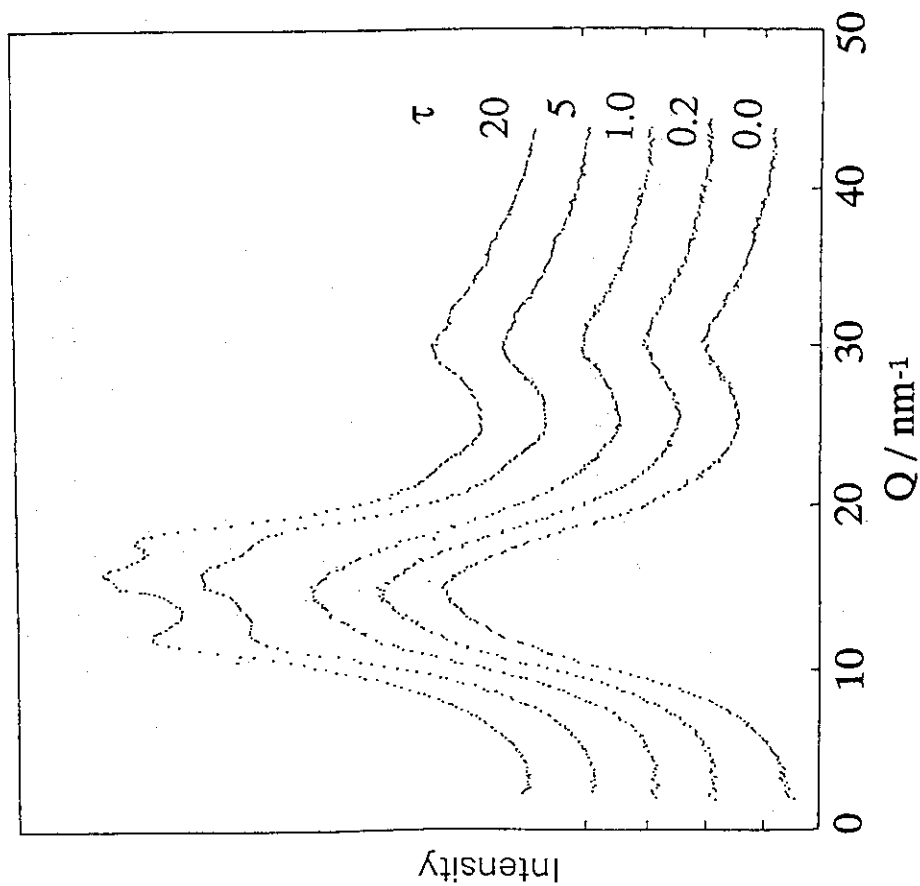
Annealed isothermally



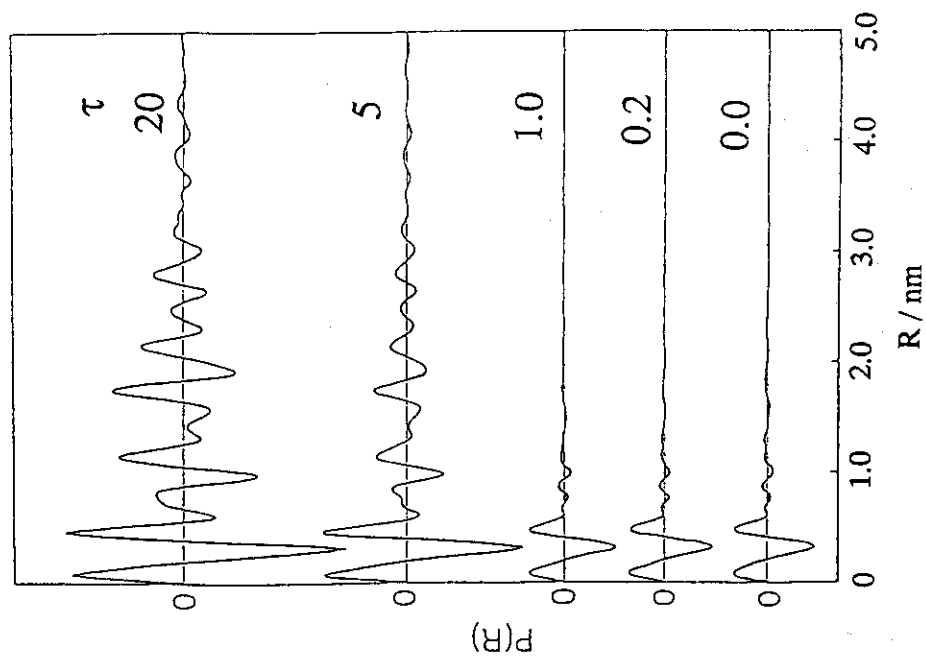
Crystallization Isotherm for PET at 80°C



Time Evolution of WAXS Profiles

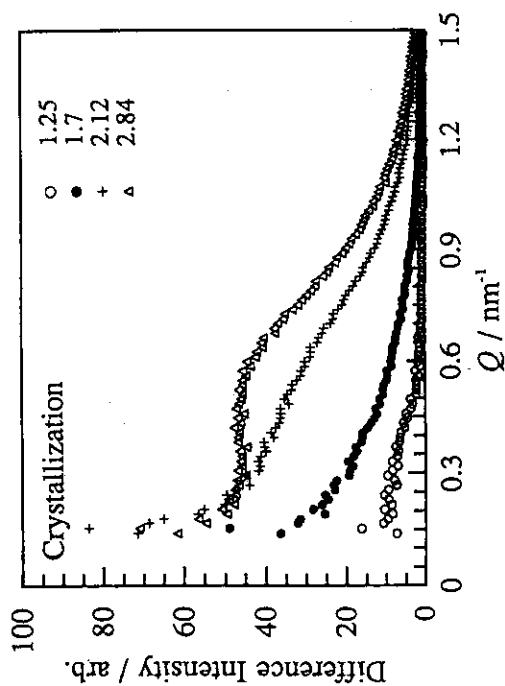
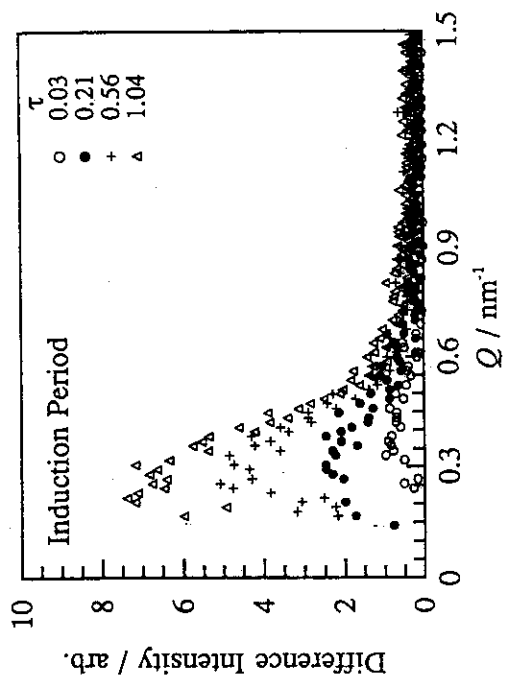


Time Evolution of P(R) Functions



$$\tau = t / t_0 \quad t_0 : \text{Induction Period}$$

Time Evolution of SAXS Profiles

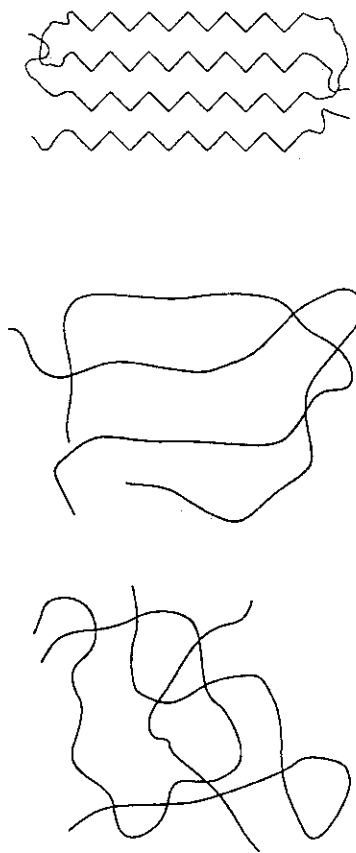


$$\tau = t / t_0 : \text{Induction Period}$$

Two Steps Crystallization Model

- 1) Parallel Ordering of Polymer Segment before Crystal Packing
- 2) Packing of the Chains in the Parallel State

Flory, P.J. Proc. R. Soc. London A234, 60 (1956)



Dynamics of Stiff Polymer Chains

$$\frac{\partial f}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial \mathbf{R}} [D_{\parallel} u u + D_{\perp} (I - u u)] \left[\frac{\partial f}{\partial \mathbf{R}} + f \frac{\partial}{\partial \mathbf{R}} W \right] + D_r \nabla^2 [f + f \mathcal{R} W]$$

$$f_{\mathbf{e}}(u, t) = \frac{1}{V} \int d\mathbf{r} e^{i\mathbf{e} \cdot \mathbf{r}} f(\mathbf{R}, u, t)$$

$$\frac{\partial f_{\mathbf{e}}}{\partial t} = -\Omega_{\mathbf{e}} f_{\mathbf{e}}$$

S_Q : Orientation Fluctuations

$$S_{Q\alpha\beta} = \int d\mathbf{u} f_Q(u, t) (u_{\alpha} u_{\beta} - \frac{1}{3} \delta_{\alpha\beta})$$

$$\frac{\partial S_{Q\text{bend}}}{\partial t} = -\frac{D_{\parallel}}{7L^2} \left[12 \left(1 - \frac{v}{v^*} \right) K^2 + \frac{25v}{9v^*} K^4 \right] S_{Q\text{bend}}$$

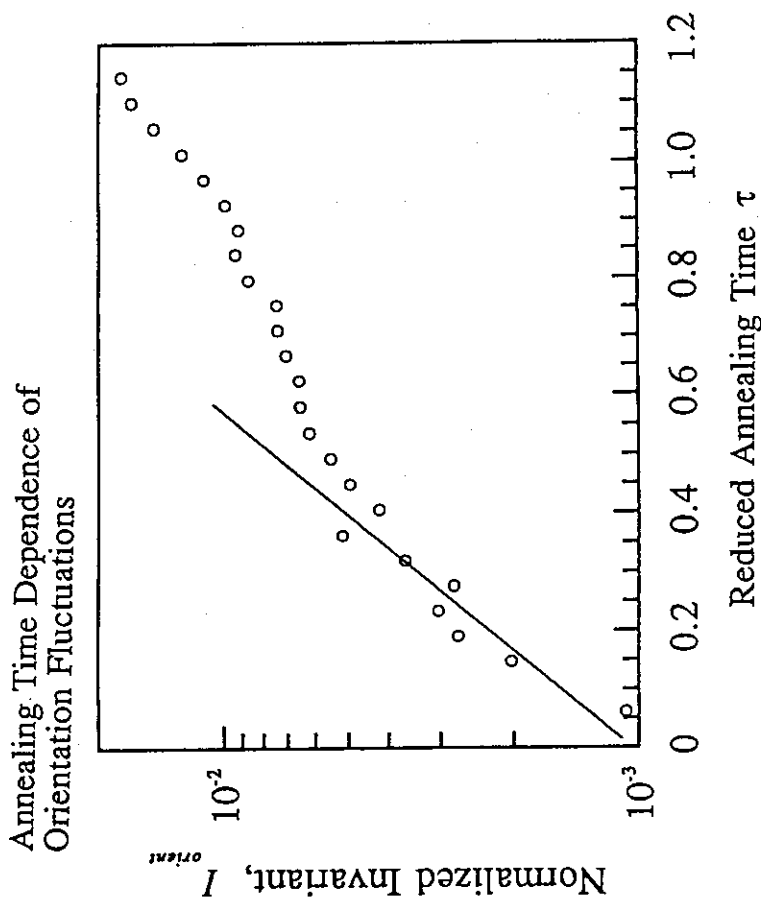
$$K = QL/2$$

v : concentration of rod-like segments

$$v^* = \frac{16}{\pi dL^2}$$

d : diameter of the rod

L : length of the rod



Concluding Remarks

- 1) New ordering process was observed in the *induction period* of crystallization.
- 2) The growth process of density fluctuations has very similar kinetics to the spinodal decomposition.
- 3) This ordering process is parallel ordering of polymer segments due to the increasing of polymer rigidity.
- 4) After this ordering, longitudinal adjustment occurs resulting in crystal packing.

8.2 タンパク質結晶成長スケーリング

新村信雄 (日本原子力研究所 先端基礎研究センター)

タンパク質結晶成長スケーリング

日本原子力研究所
 先端基礎研究センター
 新村信雄

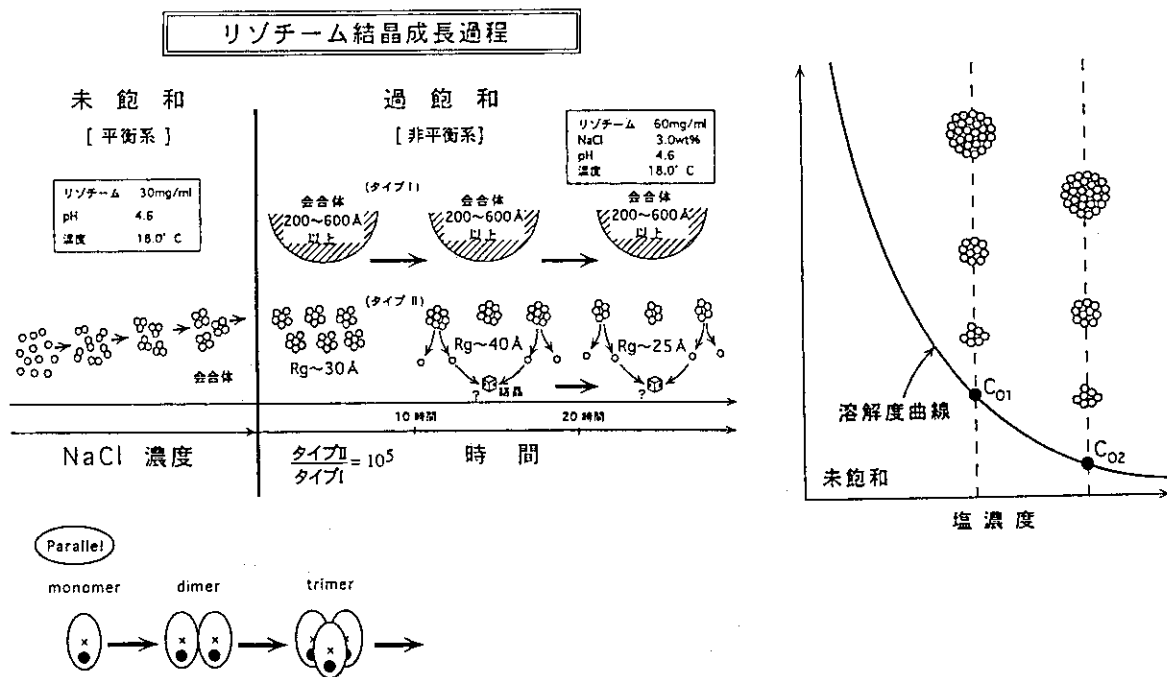
【協同研究者】

安宅 光雄(生命工学工業技術研究所)

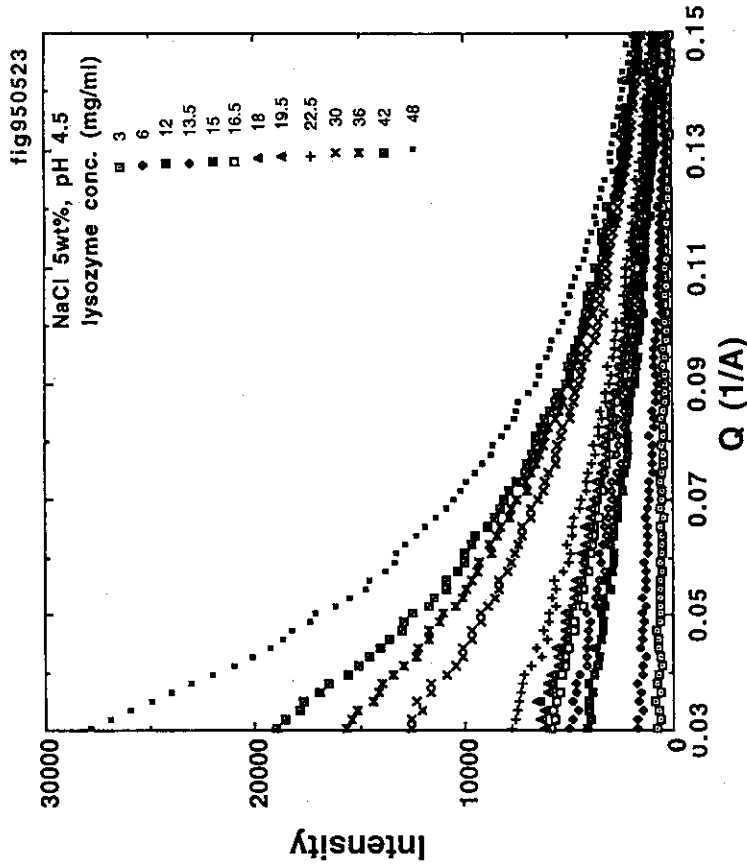
田中伊知朗(原研先端基礎研究センター)

峯崎 善章(原研先端基礎研究センター)

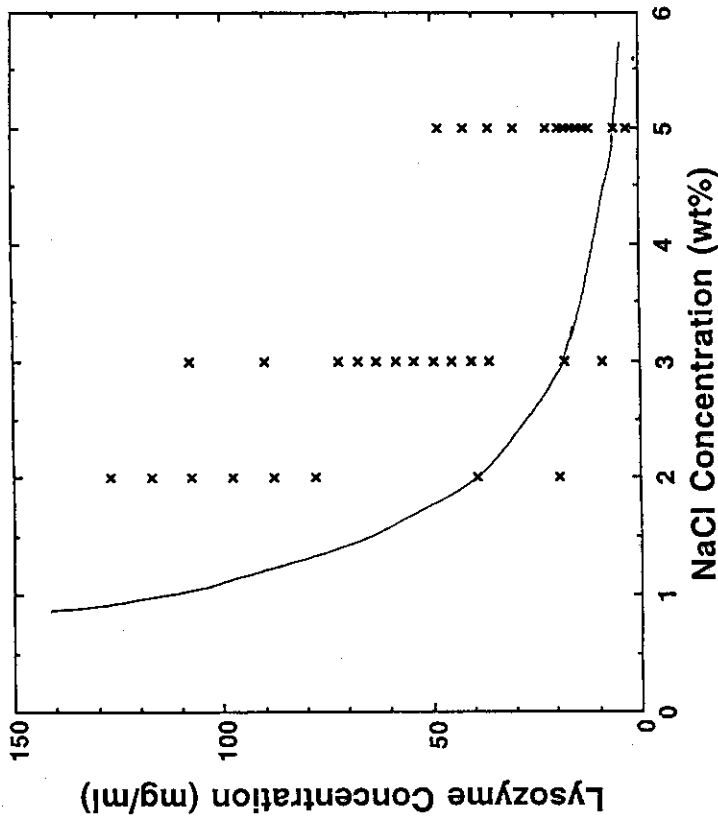
唐澤 裕子(原研先端基礎研究センター)



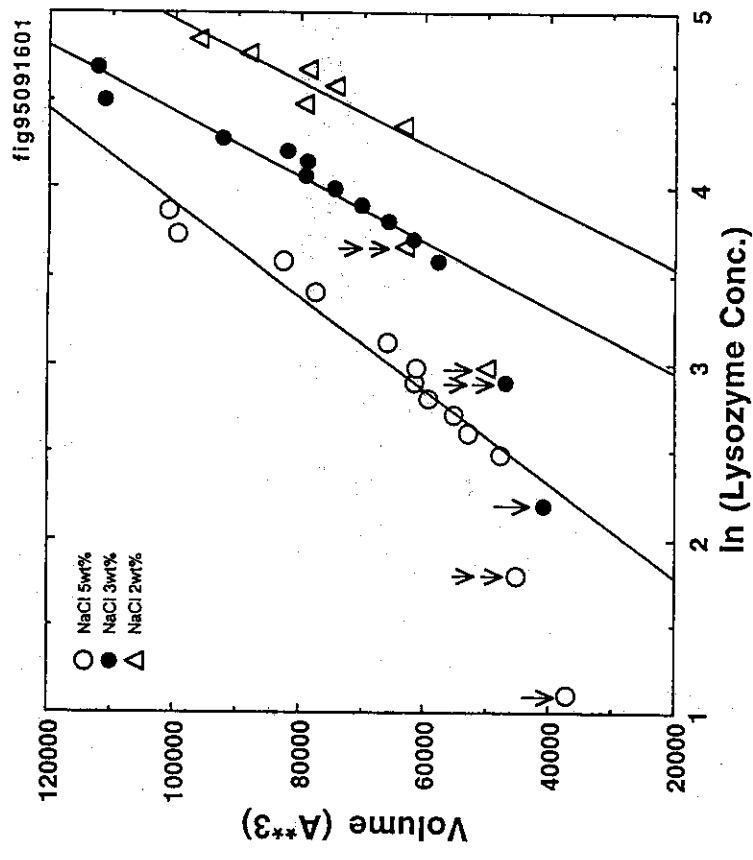
X線・中性子小角散乱実験から得られたモデル(全体像)



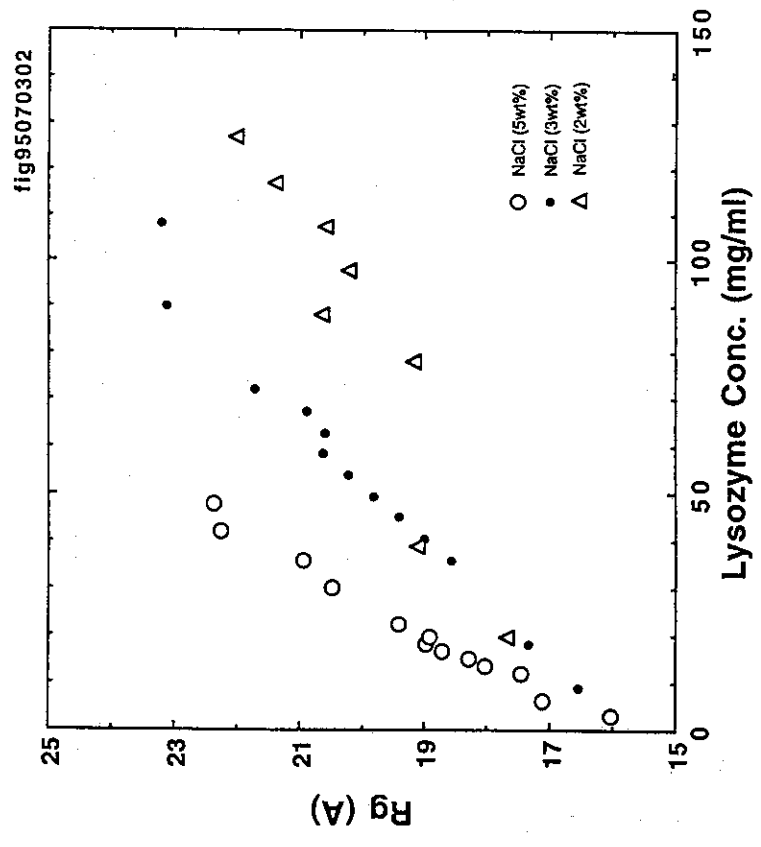
過飽和状態でLysozyme濃度を変えた時の
X線小角散乱。NaCl 5wt% 固定



Lysozyme相図とX線小角散乱観測点

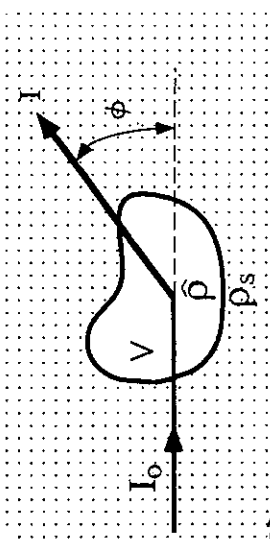


過飽和状態でのLysozyme凝集体の体積の
Lysozyme濃度依存性



過飽和状態でのLysozyme凝集体のRgの
Lysozyme濃度依存性

中性子溶液小角散乱法 (I)



<定義>

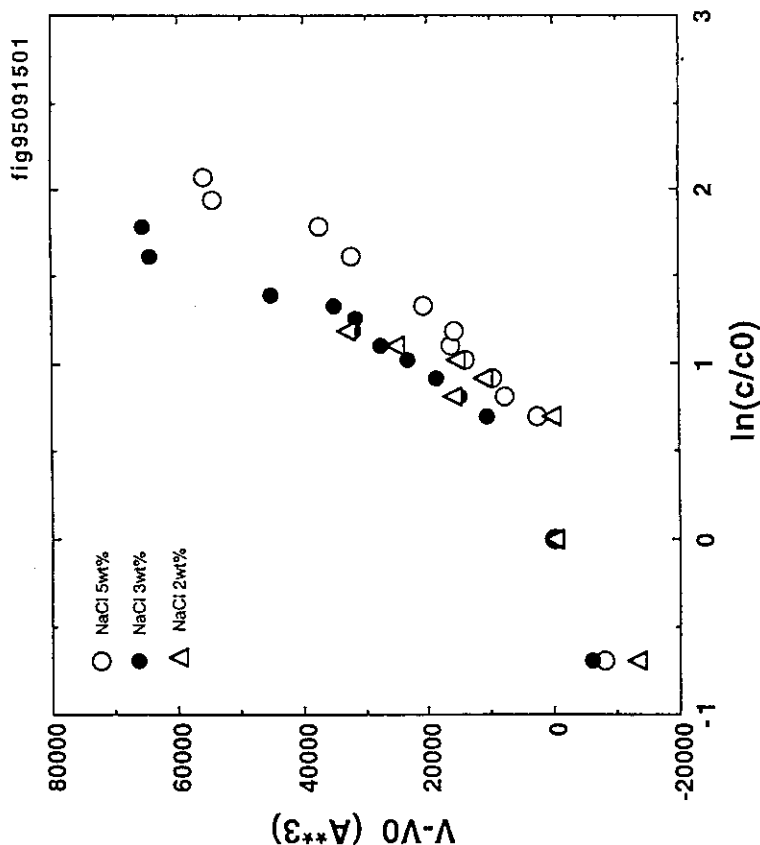
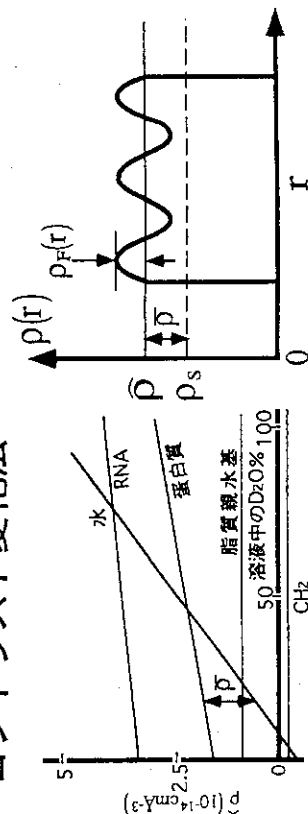
- $\hat{\rho} = \Sigma bi / V$: 平均散乱長密度
- $\rho_s = (-0.562 + 6.966X) \cdot 10^{10} \text{cm}^{-2}$
- 水 (X: D₂O / H₂O 混合割合) の散乱長密度
- $\bar{\rho} = \hat{\rho} - \rho_s$: コントラスト
- $\rho(r)$: 局所散乱長密度
- $\rho_F(r) \doteq \rho(r) - \hat{\rho}$: excess scattering length

小角散乱強度

$$I = I_0 \cdot \int \int (\rho(r) - \rho_s) \exp(iQ \cdot r) dV^2$$

ここで $Q = 4\pi \sin \frac{\phi}{2} / \lambda \approx 2\pi\phi / \lambda$

コントラスト変化法



過飽和状態でのLysozyme凝集体の臨界体積からのずれの過飽和度依存性

中性子溶液小角散乱法 (II)

ギニエ近似

$$Q R_g \ll 1$$

$$I(Q) = (\bar{\rho} V)^2 \exp\left(-\frac{R_g^2}{3} Q^2\right)$$

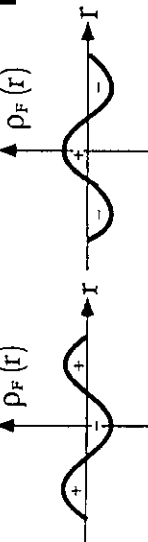
$$R_g^2 = \frac{1}{\bar{\rho} V} \int_V r^2 (\rho(r) - \rho_s) dV$$

$$= R_{gv}^2 + \alpha \frac{1}{\bar{\rho}} - \beta \left(\frac{1}{\bar{\rho}}\right)^2$$

R_{gv} : コントラスト無限大での R_g

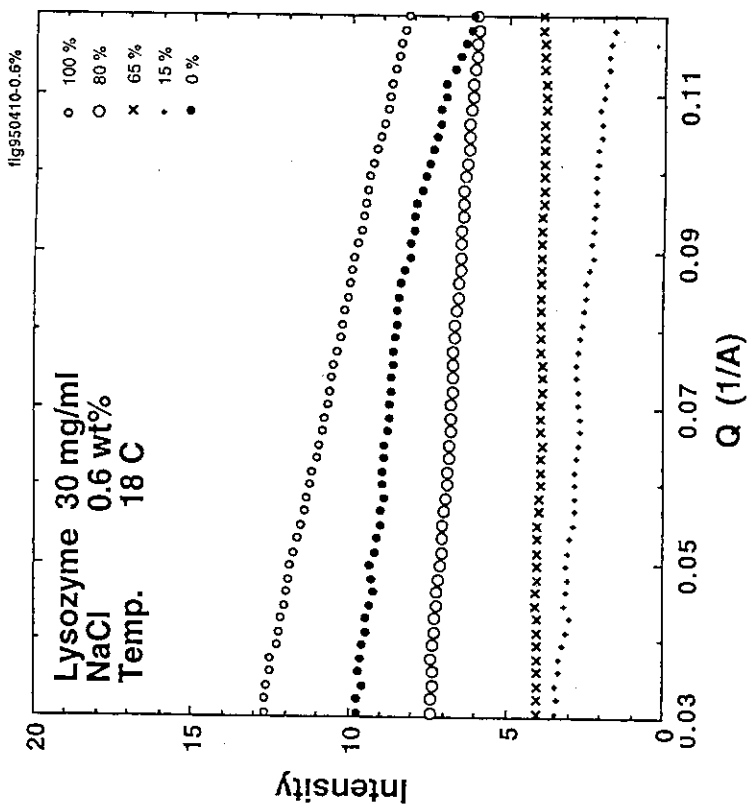
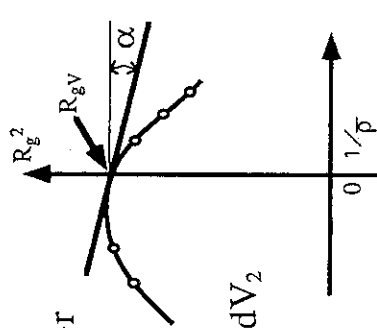
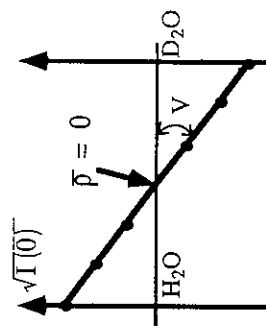
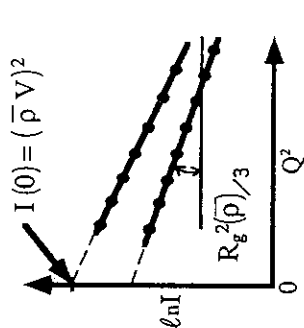
$$\alpha = \frac{1}{V} \int_V \rho_F(r) r^2 dV$$

$$\alpha > 0 : \rho_F^{outer} > 0 \quad \alpha < 0 : \rho_F^{outer} < 0$$



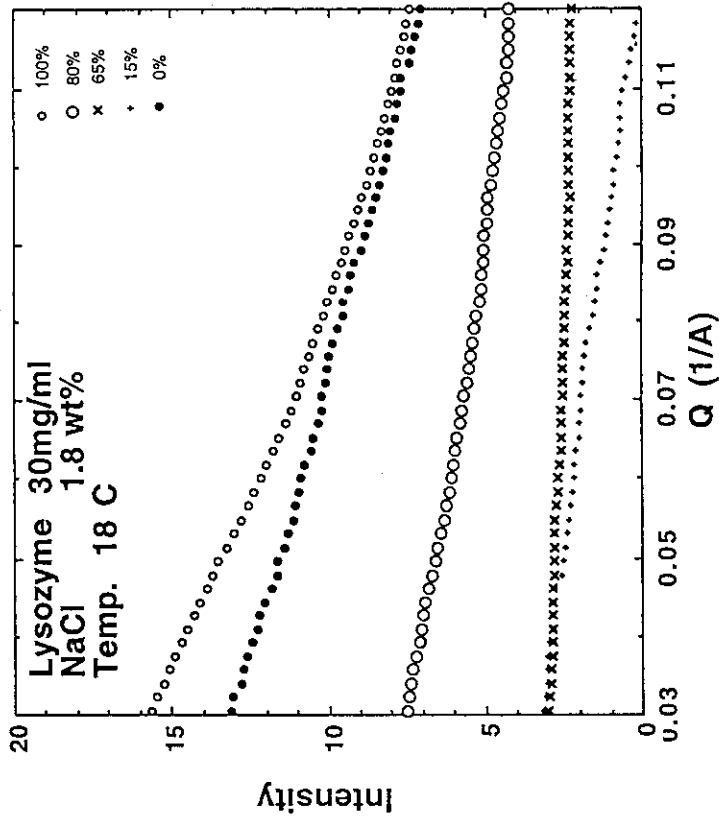
$$\beta = \frac{1}{V^2} \iint \rho_F(r_1) \rho_F(r_2) r_1 r_2 dV_1 dV_2$$

$\beta \neq 0$: 幾何学的重心と散乱能重心が不一致



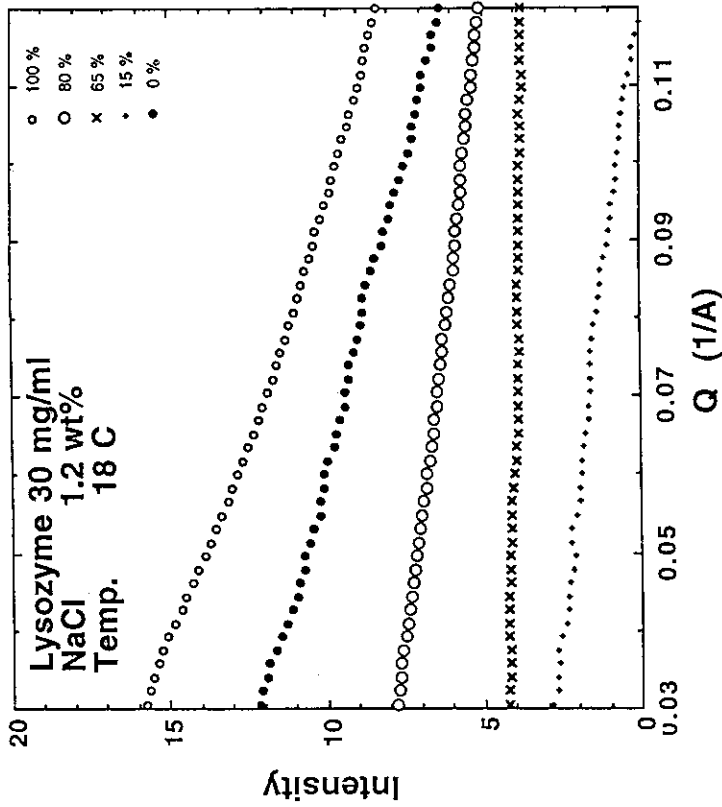
未飽和状態でのLysozyme凝集体の
コントラスト変化中性子小角散乱
NaCl 0.6 wt%

fig950410-1.8%



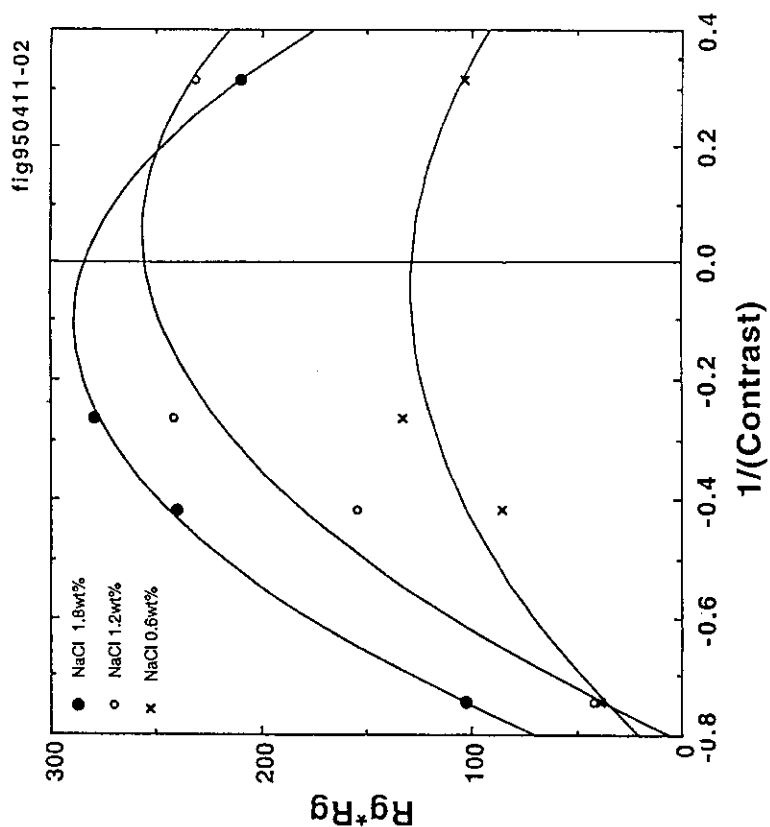
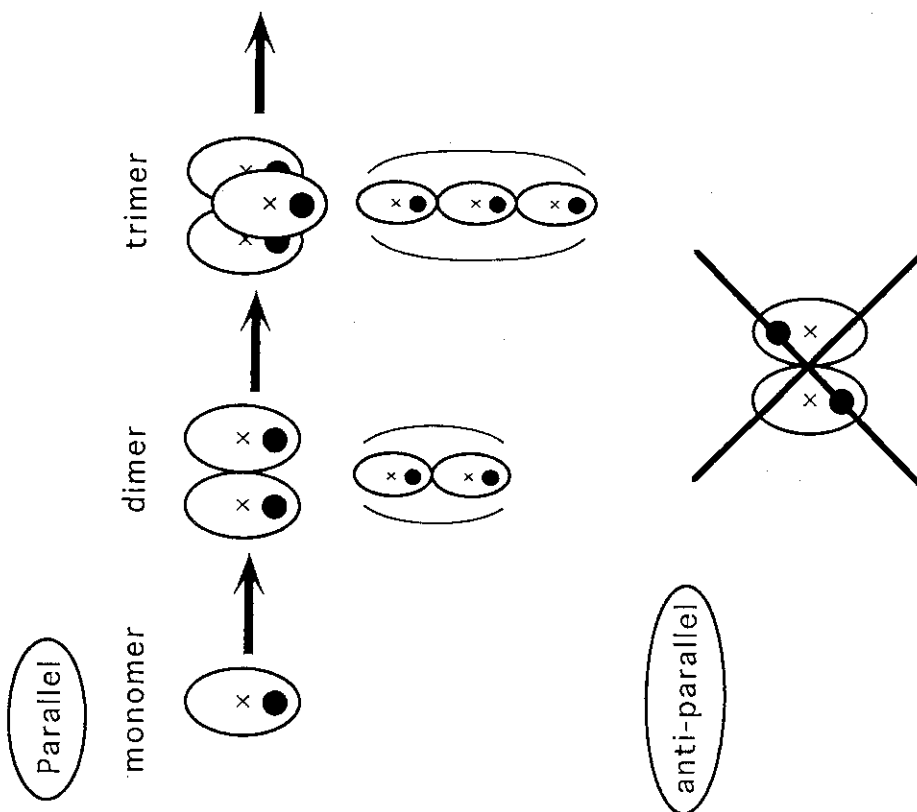
未飽和状態でのLysozyme凝集体の
コントラスト変化中性子小角散乱
NaCl 1.8 wt%

fig950410-1.2%



未飽和状態でのLysozyme凝集体の
コントラスト変化中性子小角散乱
NaCl 1.2 wt%

Lysozyme Aggregates in Undersaturated States



未飽和状態でのLysozyme凝集体のコントラスト変化中性子小角散乱より求めたStuhrmann plot.

付録1 プログラム

第42回基礎科学セミナー

第7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10月25日（水）13：00～18：00
26日（木）9：00～15：00
場所：日本原子力研究所 第1研究棟 第7会議室

-10月25日（水）-

13:00 ○あいさつ 永井士郎（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）

13:05～14:05 座長 野中孝昌（長岡技術科学大学工学部）
○低温化での蛋白X線結晶解析 中迫雅由（理化学研究所）

14:05～15:05 座長 松島正明（創薬技術研究所）
○補酵素B12タンパク質メチルマロニルCoA
ムターゼのX線結晶構造解析 中川敦史（北海道大学理学部）

【 休憩 15：05～15：15 】

15:15～18:00 座長 近藤泰洋（東北大学工学部）
○中性子イメージングプレート
*現状 (40) 唐澤裕子（原研先端基礎研究センター）
*結晶構造解析への応用（I）(10) 岩田 豊（京都大学原子炉実験所）
*結晶構造解析への応用（II）(10) 野田幸男（千葉大学理学部）
*粉末回折への応用 (15) 山口泰男（東北大学金属材料研究所）
*長波長中性子光学への応用 (15) 海老沢徹（京都大学原子炉実験所）
*小角散乱への応用 (10) 小泉 智（原研材料研究部）
*非弾性散乱への応用 (10) 山田和芳（東北大学理学部）
*ラウエ法への応用 (15) 峯崎善章（原研先端基礎研究センター）
*ラジオグラフィへの応用 (15) 石川 勇（原研アイソトープ部）
*コメント・討議 (25) 渡邊 康、出席者全員

18:30～20:30 【 懇親会 於：阿瀧ヶ浦クラブ 】

-10月26日(木)-

- 9:00~11:30 座長 渡辺信久 (高エネルギー物理学研究所)
田中伊知朗 (原研先端基礎研究センター)
- 生体物質中性子回折計 (BIX)
*モノクロメーター
*中性子ビームの性能
*中性子検出器、遮蔽
*データ集積・ソフトウェア
・U決定
・スケジューリング
・ピークサーチ
・積分強度
*構造解析
*今後の予定
- コメント・討議 日高昌則、米澤康滋、出席者全員
*モノクロメーター (15) 皆川宣明 (原研材料研究部)

- 11:30~12:00 座長 濱口由和 (原研研究囑託)
○BIX-II、BIX-LAUE(30) 新村信雄 (原研先端基礎研究センター)

【 昼食 12:00~13:00 】

- 13:00~14:00 座長 佐藤 衛 (大阪大学蛋白質研究所)
○ウシ心筋のチトクロム酸化酵素のX線結晶解析
山下栄樹 (大阪大学蛋白質研究所)

- 14:00~15:00
○結晶成長
*高分子の結晶化誘導期における構造形成
今井正幸 (東京大学物性研究所)
*タンパク質結晶成長スケーリング 新村信雄 (原研先端基礎研究センター)

- 15:00 ○閉会にあたって

付録2 出席者名簿

第42回基礎科学セミナー

「第7回生体物質中性子回折ワークショップ」出席者名簿

氏名	所属
中川 敦史	北海道大学理学部
近藤 泰洋	東北大学工学部
山田 和芳	東北大学理学部
大矢 陽平	東北大学理学部
江口 昌之	東北大学理学部
加賀美和宏	東北大学理学部
小松 啓	東北大学金属材料研究所
山口 泰男	東北大学金属材料研究所
松島 正明	創薬技術研究所
野中 孝昌	長岡技術科学大学工学部
濱口 由和	原研研究嘱託
今井 正幸	東京大学物性研究所
渡辺 信久	高エネルギー物理学研究所
佐野 洋	食品総合研究所
渡邊 康	食品総合研究所
刈 新旗	食品総合研究所
米澤 康滋	筑波技術短期大学
中迫 雅由	理化学研究所
野田 幸男	千葉大学理学部物理学科
鈴木 朝雄	仁木工芸(株)
高橋 健治	富士写真フイルム(株)
山下 栄樹	大阪大学蛋白質研究所
佐藤 衛	大阪大学蛋白質研究所
岩田 豊	京都大学原子炉実験所
海老沢 徹	京都大学原子炉実験所
阿知波紀郎	九州大学理学部
日高 昌則	九州大学理学部
皆川 宣明	材料研究部中性子散乱研究室
小泉 智	材料研究部中性子散乱研究室
石川 勇	アイソトープ部利用開発室
茂木照十三	アイソトープ部利用開発室
堀口 洋二	研究炉部研究炉利用課
山田 忠則	研究炉部研究炉利用課
市村 茂樹	研究炉部研究炉利用課
盛合 敦	研究炉部研究炉利用課
鬼沢 孝治	研究炉部研究炉利用課
笹島 文雄	研究炉部研究炉利用課
鶴野 晃	研究炉部研究炉技術開発室
永井 士郎	先端基礎研究センター
新村 信雄	先端基礎研究センター
田中伊知朗	先端基礎研究センター
峯崎 善章	先端基礎研究センター
唐澤 裕子	先端基礎研究センター