

中性子回折法を利用したタンパク質結晶構造解析(研修課題) 実験報告書

2024.4.12

1.はじめに

本報告書は、令和5年(2023期/第8回)茨城県中性子ビームライン実験課題として、株式会社エイ・イー・エス(以下、「AES」という。)が受講した中性子回折法を利用したタンパク質結晶構造解析(課題番号:2023BX0001)の研修内容及び成果を報告するものである。

2.研修の背景

AESでは、高品質タンパク質結晶生成実験業務に従事しており、X線を用いたタンパク質の構造決定支援を行っている。しかし、タンパク質の立体構造で機能発現に重要な役割を果たしているとわかってきた水素原子については、X線構造解析での水素原子位置の決定が難しく、水素原子がタンパク質にどのような位置と方向で結合しているのかわからないなどいくつかの課題が存在する。一方中性子を用いたタンパク質の結晶構造解析は中性子が軽元素である水素原子核で強く散乱されるので水素原子を可視化できるという特徴がある。

そこでタンパク質の中性子結晶構造解析を実際に体験し、手法や原理を理解すること、結晶学の基礎を学び、結晶構造解析への理解を深め、X線と中性子の相補利用に向けた課題やニーズを発見することを目的とし、本研修に参加した。

3.研修概要

本研修の内容は以下の通りである。

- 研修日:2024年3月27日(水) 9:00-18:00
2024年3月28日(木) 9:00-12:00
- 場所:AYA'S LABORATORY量子ビーム研究センター (AQBRC)
J-PARC 物質・生命科学実験施設(MLF) BL03 iBIX
- 指導者:一般財団法人 総合科学研究機構(CROSS)
日下勝弘様、杉山晴紀様、坂倉輝俊様、安田淳一様
- 研修受講者:AES 佐藤真理、藤高弥生
- 研修項目:
 - 1.装置・測定手法の説明
 - 2.大型結晶観察、キャピラリー詰め実習
 - 3.試料マウント/アンマウント・センタリング実習

- 4.測定ソフトの説明
- 5.予備測定・測定データ確認実習
- 6.プログラム測定の説明
- 7.オーバーナイト測定データの確認実習
- 8.低温測定方法の説明

4.研修内容

4.1 装置・測定手法の説明

研修資料を基に茨城県生命物質構造解析装置(iBIX)について装置の構成、特徴について説明していただいた。説明の概略を以下に示す。

- 中性子回折は中性子が原子核と相互作用によって散乱することを利用する。対して、X線回折は電子との相互作用を利用するため、原子中の電子数に依存し、軽元素は見えにくい。そのため、X線では位置決定が困難な水素が中性子散乱によって位置決定を行えることが大きな特徴である。その性質を利用し、タンパク質の酵素反応や阻害剤の結合、タンパク質複合体の相互作用に係わる水素原子の位置決定などに使われている。
- iBIXの性能として、最大格子長135 Å (格子体積:135 Åx135 Åx135 Å)であるが、1軸のみなら180 Åまで見ることができる。(例:180 Åx70 Åx70 Å)
- iBIXの検出器は64台設置可能だが、現在は34台の検出器が設置されている。
- 中性子回折法の課題として、入射中性子の強度が弱いため大きな試料の準備が必要だった。しかし、J-PARC/iBIXにより世界最大強度のパルス中性子の照射が可能になり、試料準備の難易度が軽減された。
- iBIXの構成について、上段側にはがあり、高エネルギー中性子のエネルギーを液体水素で減速し実際に使用できる中性子のエネルギーに下げている。その後段にはチョッパーという光を切り取る装置があり、設定を変更することで切りかけを通過する入射中性子の波長(λ)の幅を変更することができる。さらに後段はガイド管が25m設置されており、試料位置まで中性子発生源から全長40mの距離がある。中性子の遮蔽には、主に鉄やコンクリートの遮蔽材を用いている。
- J-PARCの中性子は陽子ビームが25Hz(1秒間に25回)の頻度で水銀標的に衝突することにより、発生してゐる。
- パルス中性子はiBIXの場合40mの距離を飛行してくるが、中性子はエネルギー(=波長)による飛行速度の違いがあるため、検出器までの到達時間を計測することにより、波長(λ)を知ることができる。ブラッグの式より、 $2d\sin\theta = \lambda$ の波長(λ)と回折角 θ が分かると格子面間隔 d を求めることができる。しかし、発生したパルス中性子をそのまま使用すると25Hz間隔で入射する粒子のIの速度が遅い粒子とIIの速度が速い粒子が重なって試料に照射され、いつ発生した粒子か判別できず、波長(λ)を決めることができなくなる(重なった粒子を分離することはできない)。

そのため、チョッパーを用いて I, II のパルス粒子が重ならないように、特定の波長だけを切り取り、パルスごとに区別できるようにする。

- 連続した波長(λ)を用いた回折をラウエ回折といい、X線の単一波長回折とは異なる。
- スーパーミラーガイド管は、中性子線と共に発生する γ 線を除去するために湾曲している。 γ 線は曲げられないため、湾曲を利用して、試料に γ 線が照射されないようにしている。また中性子についても反射される角度と透過する角度の臨界角があり、反射されて試料に届く波長は選別されている。中性子は空気中では散乱してしまうので、スーパーミラーガイド管内は真空となっている。
- 試料を囲むように133mm×133mmの検出面を持った検出器が球状に置かれている。
- 検出は中性子がシンチレータに入射し、 α 線→光と変換される。変換された光はX,Yの2方向に輸送され、光電子倍增管(PMT)で増幅された後、電気信号に変換される。各方向の信号はエンコーダモジュールで計数され、2方向同時に検出されたものは中性子、片方のみの場合はノイズとして処理する。
- 単色法のため、測定できる範囲に限りがあるが、パルス中性子線は、TOF法のため、広い範囲の測定ができる。TOF法はXY平面に時間軸を加えた3次元データを積算している。

4.2 大型結晶観察、キャピラリー詰め実習

事前に研修資料を基に実習内容をご説明いただいた。説明の概略を以下に示す。

- 使用するタンパク質「リゾチーム」は、大型結晶を作りやすいモデルタンパク質であり、空間群が $P4_32_12$ と正方晶系の対称性が高い結晶ができる。
- 大型結晶化はFalcon組織培養用のディッシュを用いてSitting Dropで行うことが多い。中性子の結晶を作るには大容量の結晶化溶液が必要であり、Hanging Drop法ではDropが落下してしまう可能性がある。また今回50 μ lずつ混合しているが、これ以上多く入れすぎてもDropの形状が維持できないため、結晶化溶液としてはこのくらいの量が丁度良い。
- 結晶化の工夫として、結晶がディッシュに接着しないようにシリコンガラスを敷く。Dropを揺らすと液がシリコンガラスの下にしみ込んでしまうため、移動時は注意が必要。また蒸発を防ぐためにディッシュと蓋はシリコングリースで接着している。
- 結晶生成については、核形成の少ない条件が良く、見つかった条件で溶液を追加し、スケールアップを行う。ただし、スケールアップすると良好な条件が異なる可能性があるため、注意が必要。
- X線では厚いガラスキャピラリーは使用できないが、中性子線はガラスを透過して試料に照射できるため、石英キャピラリーに詰めた状態で測定を行う。

【実習内容(研修者1人、1つずつ実施)】

I. 回折実験用石英キャピラリの作製

- 石英キャピラリ(ヒルゲンベルグ社、 ϕ 3.5mm、厚さ0.01mmの薄いキャピラリ)をケースから取り出し、20mmの位置に線を描く。
- 20mm線の内側に溶かしたロウ(Capillary Wax/Hampton HR4-328)をつけて補強する。
- ロウの下で石英キャピラリをカットする。



図1. キャピラリの作成作業

II. 結晶のピックアップ

- ピックアップする大型結晶を選択する。結晶サイズは2mm程度あるものが望ましい。
- ループで結晶を拾う。
- 結晶が下に貼り付いている場合は、ヘラで結晶を剥がす。



図2. 結晶のピックアップ作業

III. 結晶を石英キャピラリに入れ、封止

- 結晶を石英キャピラリの壁面に付ける。
- 位置が石英キャピラリ切断面から20mmの位置になるように、ループで位置を調整する。

- サンプルピンに母液 20 μ lを入れ、周りにエポキシボンドを流し入れる。
- 石英キャピラリー内の不要な母液を濾紙で吸い取り、サンプルピンに設置する。
設置の際、エポキシボンドを流し入れた部分に空気が残ると乾燥の原因になるため、石英キャピラリーをゆっくり上下させ、空気を抜いてから奥まで差し込む。
- 1時間ほど乾燥させる。
- 乾燥後、キャップをして天地反転状態で輸送する。



図3. 左:母液除去作業、右:風乾中の試料



図4. 左:佐藤封入試料、右:藤高封入試料

4.3 試料マウント/アンマウント・センタリング実習

【実習内容(各研修者が3.2項で準備した試料で実施)】 ※入室時は鍵を持って入ること。

I. 試料マウント

- ゴニオンメータヘッドに石英キャピラリー封止試料をマウントする。
- ゴニオンメータヘッドをゴニオンメータに固定する。
※設置の際に中性子線照射口には当たらないようにすること。位置がずれてしまう。

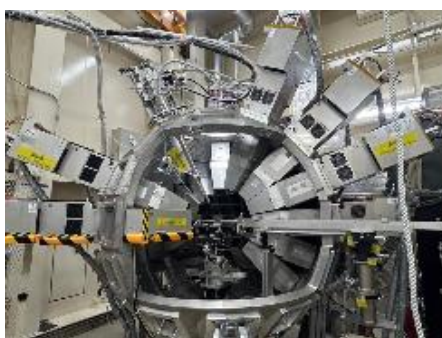


図5. 実験室内の装置

II. センタリング

-ゴニオンメータヘッドには3軸の位置を変える調節ネジがあるため、まずイモネジをゆるめ、固定を外す。

-1軸ずつ画面を見ながら結晶の中心が画面の中心になるように位置を調整する。

X,Y軸は90° 回転させながら調整し、調整後は360° 回転させても画面の中心と結晶の中心が重なることを確認する。

-位置調整後はゴニオンメータヘッドのイモネジを固定する。



図6. ゴニオンメータヘッド

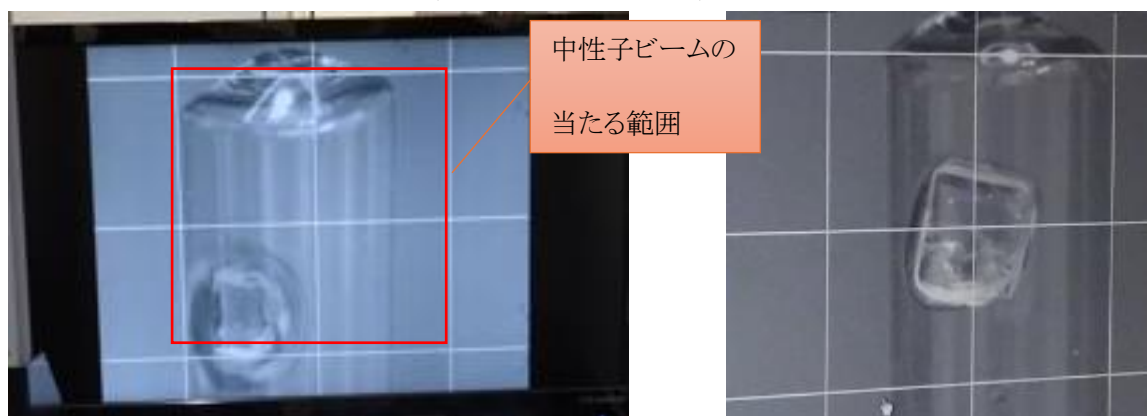


図7. 左:センタリング前、右:センタリング後

III. 実験室のLOCK

-全員が退室後、最終退室者が退避確認ボタンを押し、部屋を退出して、扉を閉め、操作盤でドアロックを行う。

-ドア操作盤のカギを外し、シャッタ操作盤に鍵を挿す。同様に入室時に持った鍵を挿し、全員分のカギがあるなら、をロックするシャッタを開ける。

※ビームラインの信号機が赤色

※実験室のUNLOCKは、操作盤でシャッタを閉め、鍵を1本抜き、ドア制御盤に挿して、ドアロックを解除する。

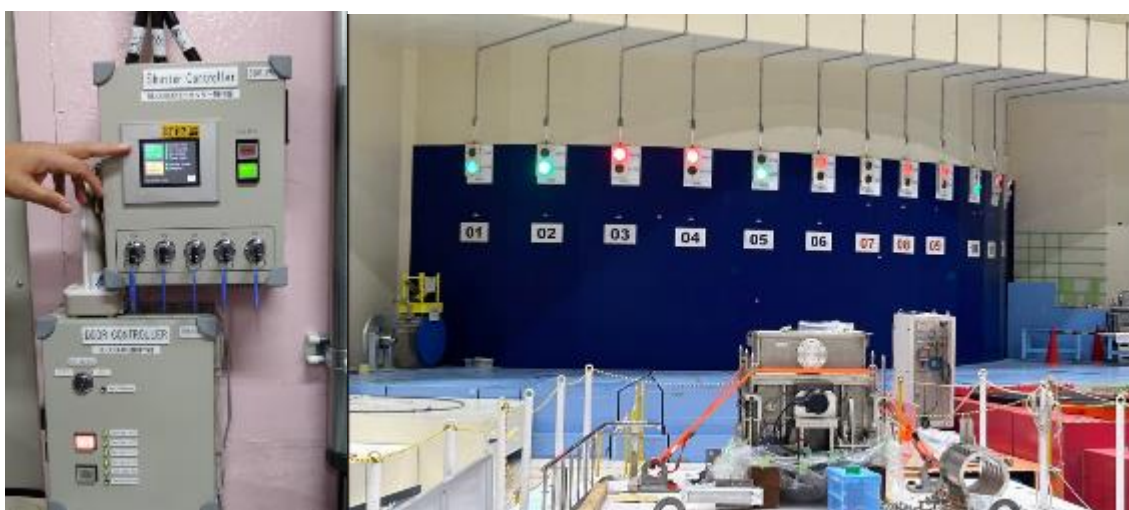


図8. 左:実験室制御盤、右:シャッタ解放中の表示(赤点灯)

4.4 測定ソフトの説明

研修資料を基に測定ソフトについての説明していただいた。説明の概略を以下に示す。

- 測定制御プログラムは、ゴニオンメータ(3軸回転)やチョッパー(回転の位相角)、検出器(測定開始、終了)を制御することができる。その他に、各種カメラ画像を確認する画面と照射結果が各検出器に出力される回折像の画面がある。
- iBIXではチョッパーの回転位相を「 -43° 」に設定している。これは、波長(λ)が $2.1 \sim 6.1 \text{ \AA}$ (パルス発生から(TOF) $20,000 \sim 60,000 \mu\text{s}$)の部分のみを通過させる設定である。ただし、 $\lambda = 2.1 \text{ \AA}$ 付近はチョッパーの開き始めのため、十分な照射が行われていない。そのため、回折データはTOF= $30,000 \mu\text{s}$ 、 $\lambda = 2.9 \text{ \AA}$ 降のデータを用いる。



図9. 左:カメラ画像確認画面、右:回折像出力画面

4.5 予備測定・測定データ確認実習

I. キャプチャ写真撮影

-カメラ画像確認に映っている試料の写真をキャプチャ撮影する。

撮影は0° と90° の2枚を撮影し、90° 動かす際は、ゴニオンメータ操作画面で実施する。

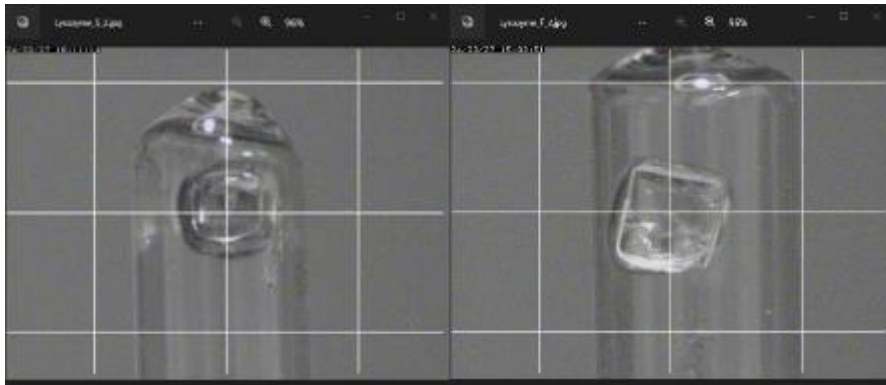


図10. 左:藤高準備試料、右:佐藤準備試料

II. 結晶の大きさを測定する。

-Image Jソフトを使用し、表面積と厚みを2枚の写真で計測する。

表1. 結晶の大きさ測定結果

	藤高準備試料	佐藤準備試料
表面積(mm ²)	2.627	1.459
長さ(mm)	0.75	0.444
体積(mm ³)	1.97	0.648

III.ゴニオンメータの位置を設定し、予備測定を実施する。

-ゴニオンメータの位置を(ϕ , x , ω)=(0, -44, 150)と設定する。

-測定は、カウント(パルス数)30,000と設定する。

※ $30,000/25\text{Hz} = 1200\text{s} = 20\text{分}$

-設定を確認後、測定を開始。

III.分解能を確認する。

-回折像出力画面で測定したい検出器を選択する。

※回折斑は中性子ビームの入射口から遠い(低角)程、検出しやすいが、分解能はあまりよくない。逆に入射口に近い(高角)程、回折斑は検出しにくい、分解能が高くなりやすい。

低角:検出器番号32,8など

高角:検出器番号30,9,29,6,22など

-回折像のXY-Sliceで一番後ろ(最後に撮影された画像)から前に戻るように回折斑を確認し、最も良い分解能の回折斑でRUN No、波長(λ)、分解能(d)をノートに記録する。

表2. 波長(λ)と分解能(d)の測定結果

	藤高 Run#26794			佐藤 Run#26795		
検出器番号	No.4	No.28	No.29	No.3	No.4	No.29
波長(λ)	4.34 Å	4.34 Å	5.98 Å	4.20 Å	3.99 Å	5.00 Å
分解能(d)	2.77 Å	2.64 Å	3.21 Å	3.69 Å	2.60 Å	2.70 Å

本実習では分解能に有意な差は見られなかったため、結晶サイズの大きいRun#26794(藤高準備試料)をもちいてプログラム測定を実施した。

4.6 プログラム測定の説明

I. プログラムの設定

-本実習では以下の通りのプログラムを設定していただき、内容の確認を行った。

※今回は翌日のまでの時間から1方向7.5時間x2方向の測定を行う(時間の設定は6.0-8.0hとなるように設定を行う)。

チョッパーの設定:Frequency=1, Phase_delay=-43.6

※Frequencyはチョッパーの速さで、iBIXでは設定は変更しない。

※Phase_delayはチョッパー遅延で、基本的に-46.3° 設定。

Loop設定:varname=ome1, listdef=frange(90,180,90)

(ϕ , π , ω)=(0, -44, ome1)

toCount=570000

※varnameはループ変数定義

※listdef=frange(90,180,90)は、変数ome1に入力される値設定。

(90,180,90) =(初期値,最終値,変化量)

つまり、1回目はome1=90、2回目はome1=90+90=180、ome1が180になるため、2回でloopは終了。

※toCountは570000/25Hz/(60x60sec)/0.85=7.5hくらいとして設定。

0.85は、中性子パルスは25Hzではあるが、1日のうち中性子がMLFに来ない、又はハドロン実験施設の方に行くので、測定器に入射する中性子線の実行値として85%程度であることを考慮するため。

-設定したプログラムをブックイングし、測定を開始した。

4.7 オーバーナイト測定データの確認実習

4.5項Ⅲと同じように、分解能の確認を行った。計測結果を表3に示す。

表3. 波長(λ)と分解能(d)の測定結果

検出器番号	No.29	No.6	No.31	No.30	No.9	No.22
波長(λ)	4.03 Å	3.99 Å	3.72 Å	4.23 Å	3.95 Å	3.64 Å
分解能(d)	2.18 Å	2.14 Å	1.99 Å	2.13 Å	2.02 Å	2.02 Å

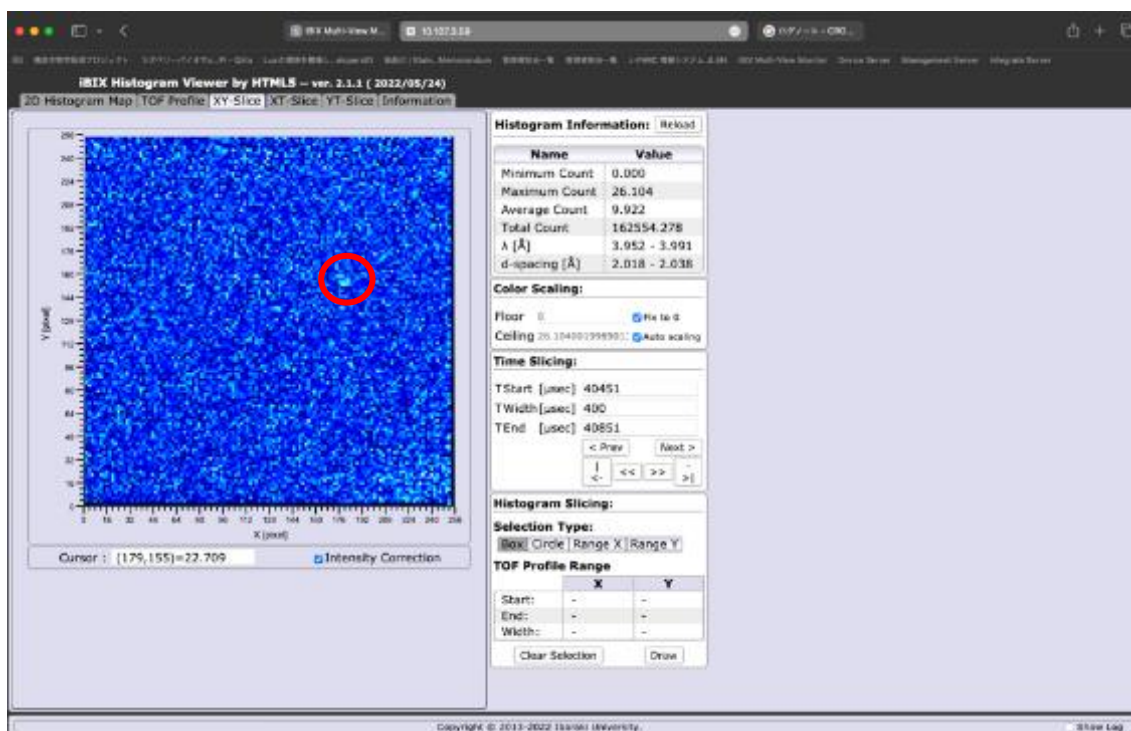


図11. 分解能確認画面(Run26796 検出器No.9 d=2.02)

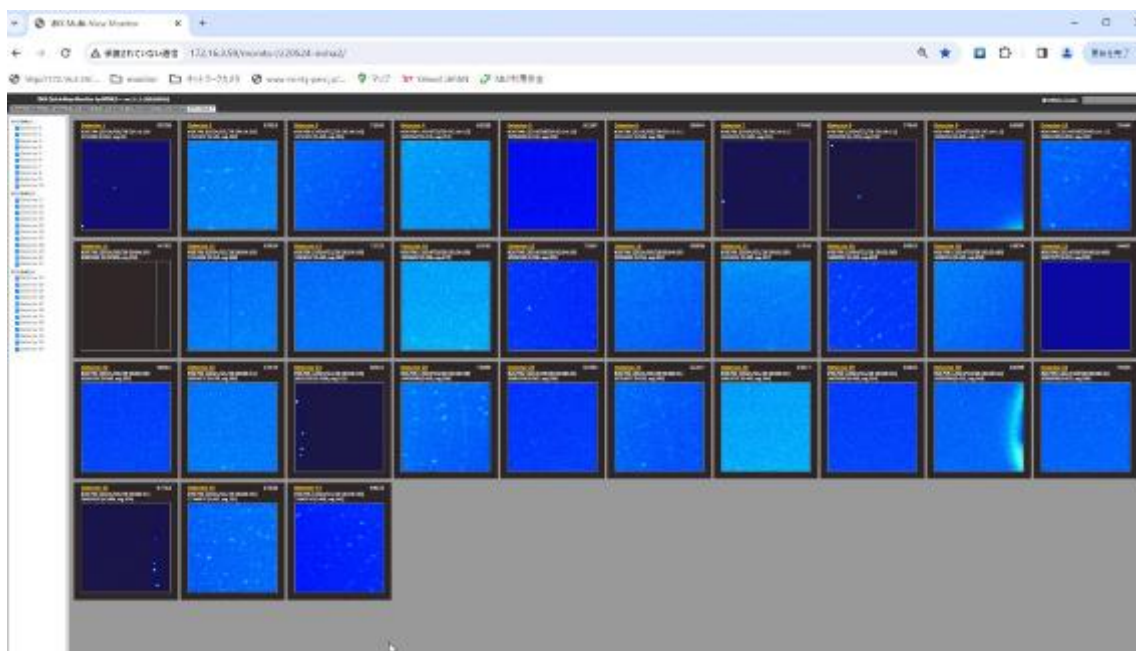


図12. オーバーナイト測定 1回目測定結果

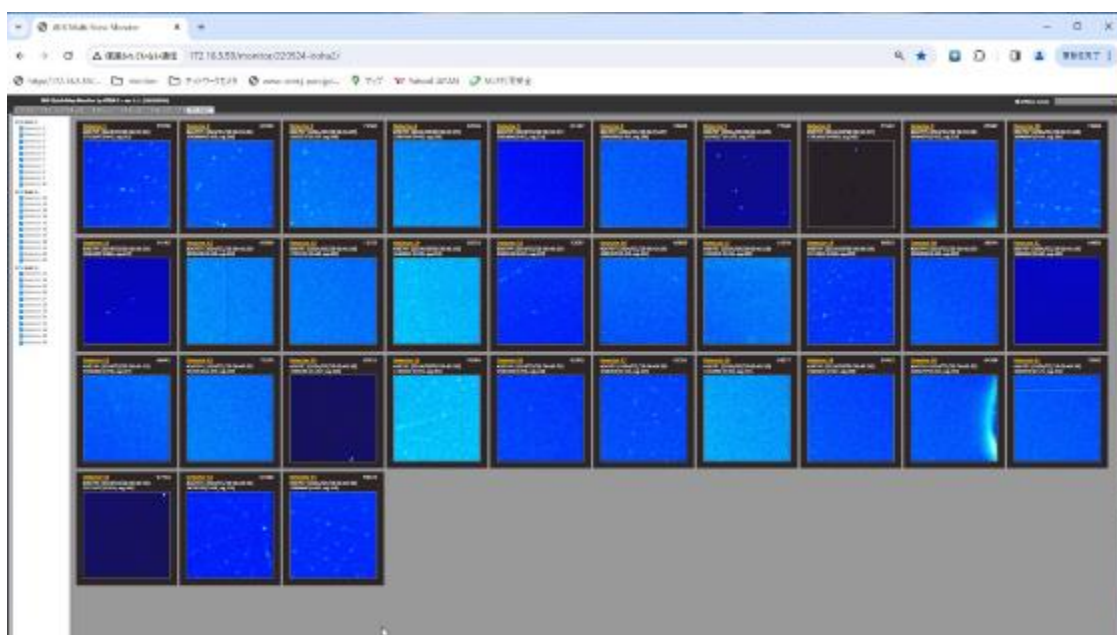


図13. オーバーナイト測定 2回目測定結果

測定方法、回折について、補足説明をしていただいた。

- ・目視確認した回折斑によるd値は自動処理すると少し悪くなる。
d値は元素による強度が反射により異なり、目視では強く反射が出るもののみを見ている。データ解析すると弱い反射のデータも拾うため、d値が上がりやすい。ただ差としてはおおよそ0.1Å程度。目視でd=2.0Åの場合、水素位置も測定可能で、d=2.5Å程度なら水素の有無は

わかるが、方向などは正確にはわからない。・X線と中性子線ではおおよそ分解能が0.4Å
中性子線のほうが下がる。

例:X線1.5Å⇒中性子線2.0Å

原因としては、大型化による結晶の劣化が考えられる。

・中性子線の解析では、X線解析で2.0Å程度の分解能がないと解析できない。中性子の予備測定でタンパク質では2.3Å以下であれば本測定を実施する。。

・ラウエ群とは、回折強度の対称性を表す点群。

例えば、リゾチームは「4/mmm(正方晶系)」である。

4回軸(C4軸)と鏡映面(m面)の組み合わせで、2次元平面90°ごとの回転繰り返し構造が、高さ方向の鏡面で対称性を持つ。またmm⇒X軸、Y軸にも鏡面を持ち対称性を持つため、16点が同じ強度を持つ。このように対称性が高いため、測定のセット数が少なく、1セットの測定時間を長くとれるメリットがある。

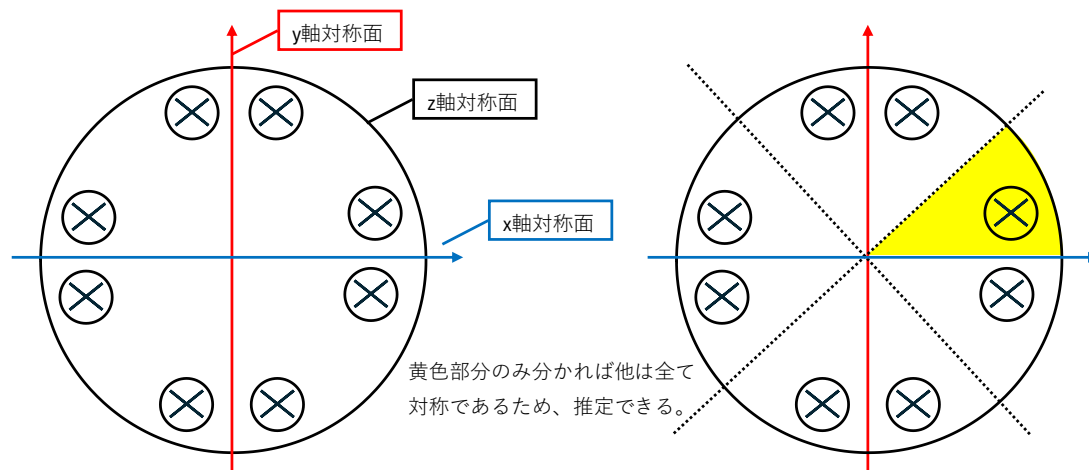


図14. ラウエ群 4/mmmの模式図

・予備測定でd=2.0Å程度なら、本測定でも同じ波長で測定する。

予備測定でd=1.5Å程度なら、本測定の波長は短くして、より高分解能になるようにする。

・構造解析としては、以下の順で測定を行い、構造を決める。

- ① 事前にX線で骨格構造、初期位相を推測しておく。
- ② ①の初期をもとに中性子線で軽元素の位置決め。
- ③ ②で測定した同じ結晶をX線にあて、②とともに解析して詳細な構造を決める。

4.8 凍結測定方法の説明

凍結試料のマウント、アンマウント方法について実際の道具を使いながら説明いただいた。

・取り出し手順は以下の通り。

- ① ドライシッパで輸送したボックスを開封し、試料ピンは磁力付きの棒で接着して取り出す。
- ② 液体窒素中で試料ピンのカバーを外す。
- ③ 試料ピンを専用のホルダーで挟み、磁力付きの棒から外す。
- ④ 試料ピンホルダーごと移動し、ゴニオンメータに試料ピンをセットする。

アンマウントの際は、この逆手順を実施する。

・凍結試料は試料へのダメージを少なくするため、使用する器具はあらかじめ予冷しておき、試料は液体窒素を満充填した容器中で実施する。

容器に液体窒素を満充填するのは、液体窒素が少なく、容器中に空気層があると試料がそこを通過する際に、少しでも冷やされてから液体窒素で凍結される2段階冷却となってしまうことを避けるため。



図15. 試料ピンカバーの外し作業

5. おわりに

本研修を受けて、実験作業の指導、原理の説明など学ぶことができ、中性子線回折について理解を深めることができた。特にX線照射とは異なり、石英キャピラリー内で母液とともにマウントされた結晶は室温でも中性子回折実験を行うことができ、水素原子の観測が可能であることを知ることができたことは今後の構造解析支援に非常に有効であった。封入準備や試料のマウント実習では、新しい技術を学ぶことができ、途中でガラス管を割ってしまう場面もあったが、繊細な作業が重要だと肌で感じることもできた。さらに、タンパク質結晶構造解析の中性子線回折実験を行うためにはX線回折実験で事前に初期位相を推測しておく必要があるなど、事前に実施すべき準備についても知ることができた。また本研修を受けるにあたって、iBIX実験に関わる各種申請についてご指導いただき、申請手続きについても把握することができた。

今後、さらに中性子用大型結晶の作製方法や重水素置換、また本測定で得られたデータから結晶構造を決定していく方法など、まだまだ学んでいかなければならないことがあると感じている。

本研修を通して中性子回折実験の利点について知ることができ、実習を経て作業内容の理解を深めることができたため、弊社が関わる業務の中で中性子線を利用したニーズの発掘に活用していきたい。

本研修に際し、事前の準備から当日のご指導までご尽力いただきました一般財団法人 総合科学研究機構(CROSS)の皆様、茨城県産業戦略部の皆様に、感謝申し上げます。

以上