

供用を開始した J-PARC の新しい生物用中性子回折装置 (iBIX)

田中伊知朗,^{*,a,b} 日下勝弘,^b 細谷孝明,^{a,b} 大原高志,^c 栗原和男,^c 新村信雄^b

Beginning of Open Use of a New Biological Neutron Diffractometer (iBIX) in J-PARC

Ichiro TANAKA,^{*,a,b} Katsuhiro KUSAKA,^b Takaaki HOSOYA,^{a,b}
Takashi OHHARA,^c Kazuo KURIHARA,^c and Nobuo NIIMURA^b

^aCollege of Engineering, Ibaraki University, 4-12-1 Naka-narusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan,

^bFrontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University, 162-1 Shirakata, Tokai,

Ibaraki 319-1106, Japan, and ^cQuantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency (JAEA), 2-4 Shirakata-Shirane, Tokai, Ibaraki 319-1195, Japan

(Received October 16, 2009)

Ibaraki Prefectural Government together with Ibaraki University and Japan Atomic Energy Agency (JAEA) has almost finished constructing a time-of-flight (TOF) neutron diffractometer for biological macromolecules for industrial use at J-PARC, IBARAKI Biological Crystal Diffractometer (iBIX). Since 2009, Ibaraki University has been asked to operate this machine in order for users to do experiments by Ibaraki Prefecture. The diffractometer is designed to cover sample crystals which have their cell edges up to around 150 Å. It is expected to measure more than 100 samples per year if they have 2 mm³ in crystal volume, and to measure even around 0.1 mm³ in crystal volume of biological samples. The efficiency of iBIX is also expected about 100 times larger than those of the present high performance diffractometers at JRR-3 in JAEA when 1MW power realizes in J-PARC. Since December 2008, iBIX has been open to users and several proteins and organic compounds were tested under 20 kW proton power of J-PARC. It was found that one of their proteins was diffracted up to 1.4 Å in d-spacing, which was nearly comparable resolution to that of BIX-3 in JRR-3 when used the same crystal as at iBIX for reasonable exposure time. In May 2009, 14 detector units were set up. By the end of fiscal year 2009, the basic part of data reduction software will be finished and an equipment blowing low temperature gas to the sample will be installed with the cooperation of JAEA.

Key words—neutron protein crystallography; J-PARC; industrial use; protonation; hydrogen; hydrated water

1. はじめに

単結晶中性子回折法による原子レベルでの構造解析は、一般的に X 線や NMR では観測不可能なプロトン化の状態や観測が非常に困難な水素に関して、その向きまで含めた水和水の構造を決定することができる。その結果、生体内で約半分を占める水や分子表面の水素原子の有無等の詳細な情報から、生体高分子の分子認識や化学反応機構の解明のための重要な知見をもたらしてくれると期待されている。

中性子回折法のタンパク質などの生体高分子への

適用は 1960 年代末から行われてきたが、¹⁾ 数 mm 角の非常に大きなサイズの試料結晶が必要とされ、測定に要する時間は 1 年以上ということも稀ではなく、さらに解析にも長い年月を要するなど、得られる結果の有用性をしのぐ悪条件が重なり、ユーザーは次第に遠のいていった。

その後 1990 年代に入り、新村らは画期的な技術である中性子イメージングプレート (NIP) の開発に成功した。²⁾ この技術開発により、中性子の分野にタンパク質結晶学の新時代が切り開かれた。NIP を装備した生体高分子用中性子回折計 BIX-3 及び BIX-4 が、当時の日本原子力研究所、現在の日本原子力研究開発機構 (JAEA) の研究用原子炉 JRR-3 に建設^{3,4)} され、高分解能データの収集及び年に数個の測定が可能となり、ユーザーの負担も軽減された。中性子の長を活かした注目すべき成果も出てきていたが、^{5,6)} それでも X 線 (数十–数百 μm 角)

^a茨城大学工学部 (〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1), ^b茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター (〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1), ^c日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門 (〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2-4)

*e-mail: i.tanaka@mx.ibaraki.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S30 で発表したものを中心に記述したものである。

に比べると非常に大きな結晶 (1 mm 角以上) が必要であり, その間われわれは巨大結晶作成技術の開発を始め必要な周辺技術の開発も行ってきたが, 結果的には測定に1ヵ月以上要する場合が多く, 依然として中性子実験の敷居が高い状態が続いている。

タンパク質結晶には, タンパク質由来の水素原子と水分子由来の水素原子が全原子数の半分以上含まれ, これらの水素原子による非干渉性散乱はバックグラウンドを上昇させ, データ精度を低下させる。したがって, S/Nを向上させるためには長い測定時間を必要とし, 測定効率を低くしている要因の1つとなっている (最近, バックグラウンドを軽減させるために試料中の水素を重水素に置換する重水ソークや完全重水素化の技術が確立されている)。

そこで, これらの問題を解決すべく, 次世代中性子源である大強度陽子加速器施設 (J-PARC) の物質・生命科学実験施設 (MLF) に建設された茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) では, 数年後に到達予定のフルパワー1 MWでの稼動時に, JRR-3の既存の装置であるBIX-4の約100倍の測定効率が実現する予定である。⁷⁻¹⁰⁾ この結果, 測定時間の短縮や試料結晶サイズの小型化, さらに大型の単位格子 (分子量) の試料に対しても測定可能となり, これまで事実上不可能であった系統的な測定や適用可能な試料数を増やすことができる。

本稿では, 稼動を開始して間もないiBIXの概況及び現状, 将来展望, 実験申請方法などを紹介する。

2. 大強度陽子加速器研究施設 J-PARC 及び物質・生命科学実験施設 MLF

J-PARCの詳細に関してはWebサイト (<http://j-parc.jp/>) を参照されたいが, 初めに簡単に概要を紹介する。

J-PARCは, 日本原子力研究開発機構 (JAEA) と高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の共同計画であり, 世界最高の大強度陽子ビームを作り出す加速器と, この陽子ビームを利用して研究を推進する3つの実験施設—原子核素粒子実験施設, 物質・生命科学実験施設, 核変換実験施設—から構成される複合型研究施設である。J-PARCの施設配置図をFig. 1に示す。茨城県東海村のJAEA東海研究開発センター原子力科学研究所に2001年から建設を開始し, 2008年にはMLFが竣工, 同年12月からiBIXを含む一部のビームラインの利用が開始され

た。

MLFでは, 加速器で生成した大強度陽子ビームが導入され, 中性子源及びミュオン源により中性子及びミュオンビームを生成し, これらのビームを利用して実験を行う。中性子実験については23本のビームポートが用意されており, これらのポートに沿ってビームラインが設置される。

3. 茨城県生命物質構造解析装置 iBIX

iBIXの経緯については, 茨城県が策定し, 推進する「サイエンスフロンティア21構想」の下, 世界最高性能のJ-PARC/MLFを最大限に活用するために, 国内外における基礎研究の発展, さらには成果の産業への応用・利用を目指して建設, 運営されている。本構想により, J-PARC/MLFには, iBIXとともに材料構造解析装置 iMATERIAの2つの装置が建設され, 両装置の運用・維持管理は茨城大学に委託されている。また, 現在, iBIX高度化の一部についてはJAEAにも委託され, 茨城大学と協力して進めている。

iBIXはJ-PARC/MLFの第1実験ホール内のビームラインBL03に位置している (Fig. 2)。iBIXの外観と測定室内の様子をそれぞれFig. 3, Fig. 4に示す。

次世代中性子源のJ-PARC/MLFでは, 1秒間に25回のパルス中性子が発生する。1パルス毎に発生する中性子は短波長から長波長まで, 試料に時間差で届き, 検出器まで到達した中性子データを時間分析することで, どの波長成分のブラッグ反射がどの位置 (方向) に到達したかが分かる。これは, 中性子がX線などの電磁波とは異なり, 速度が波長依存するため, 試料に入射するほぼ全波長を有効に利用できる理由である。時間平均するとJRR-3とほぼ同じ中性子強度になるが, パルスピークでの中性子強度は, JRR-3の500–1000倍程度になる波長領域もある。iBIXの場合, JRR-3の装置と比較して100倍程度の測定効率を享受可能となるような仕



田中伊知朗

茨城大学工学部准教授 博士 (理学)。1996年東北大学大学院理学研究科修了, 日本原子力研究所先端基礎研究センター博士研究員。1999年同センター研究員。2004年茨城大学工学部助教授。2005年より現職。2008年同大学フロンティア応用原子科学研究センター兼務。専門は中性子構造生物学。

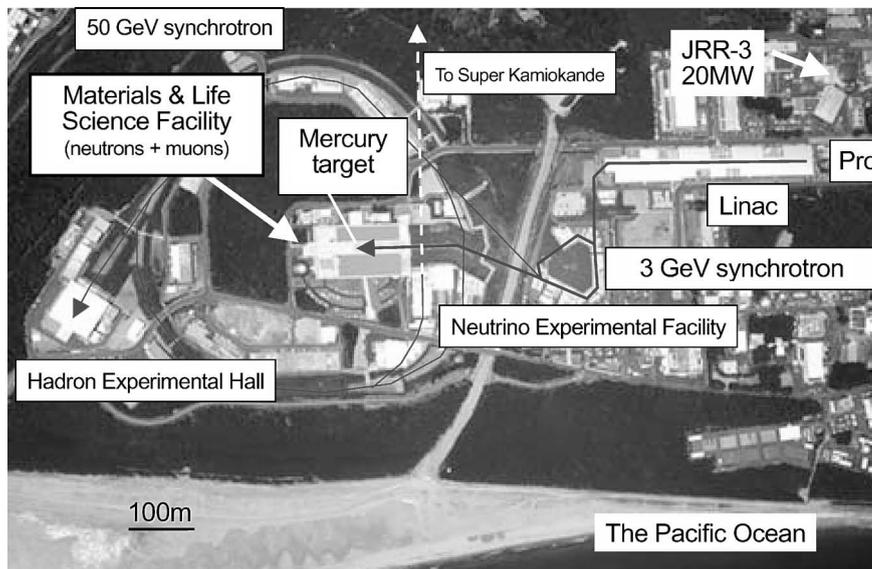


Fig. 1. J-PARC Aerial Photograph in July 2009
Modified from J-PARC HP.

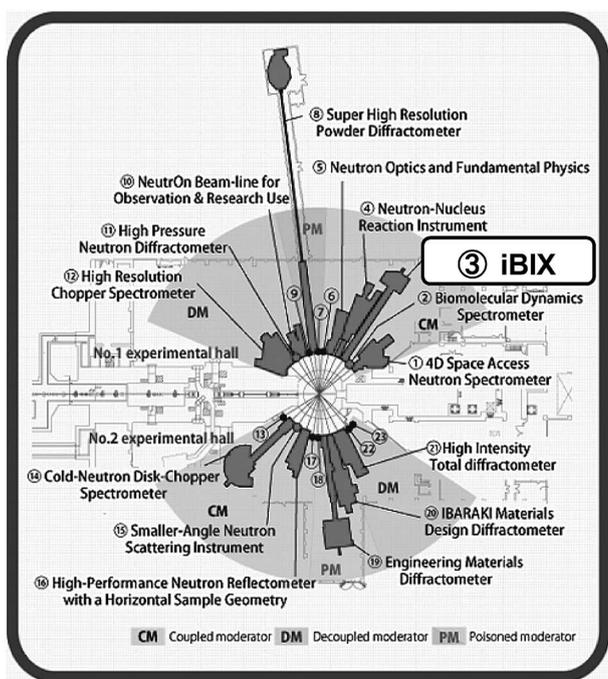


Fig. 2. Neutron Instruments at MLF in J-PARC
Modified from J-PARC HP.

様を設定した。

設計に際して、生体高分子の中性子回折実験は、入射強度が弱いため高角側（面間隔 d が小さい方）のブラッグ反射が全く観測できない事態が起こるので、強度確保を第一優先にした。検討の結果、結合型減速材を選択することで、標準では 1 mm^3 、J-PARC フルパワー稼働時には 0.1 mm^3 の試料体

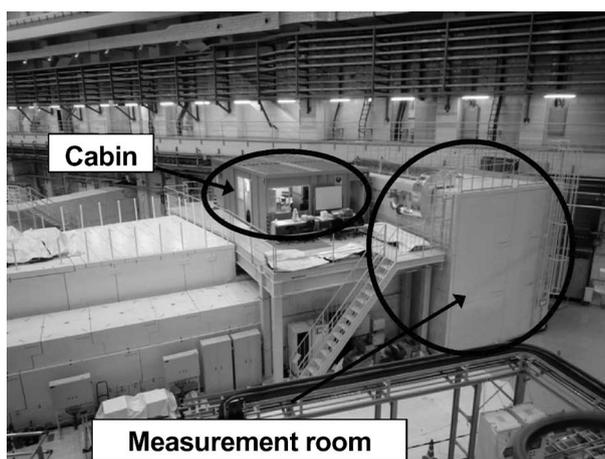


Fig. 3. BL03 Appearance (iBIX Cabin and Measurement Room)

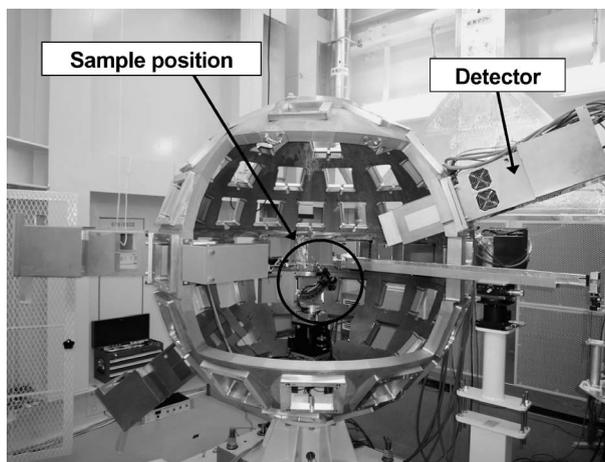


Fig. 4. iBIX View (Sample Position and Detectors in Measurement Room)

積でも測定が可能となる。また、もし 2 mm^2 の体積の試料なら、年間 100 個の測定も可能となる。次に優先したのは格子定数による反射分離で、中性子入射ビームの角度分散を 0.2° 以下にすることで、無機・有機化合物では単位格子長 75 \AA 程度なら面間隔最小値 $d_{\min}0.7\text{ \AA}$ の分解能が（比較的小さい有機化合物では 0.5 \AA までの観測実績有）、生体高分子では単位格子長 150 \AA 以下なら分解能 d_{\min} は 2.1 \AA 、 140 \AA 以下なら $d_{\min}1.2\text{ \AA}$ までのデータが観測可能となる。¹¹⁾ iBIX の他の仕様も含めて、Table 1 に示す。

建設に当たり最も開発要素が大きかったのは検出器である。パルス中性子を活かした実験を行うためには、時間分析可能な検出器が必要であり、NIP

Table 1. iBIX Specification Table

Item	J-PARC iBIX (Beam Line No.: BL03)
Moderator	Coupled H ₂ (para) 100×100 mm ²
Measurement region in d-spacing	0.35 Å < d < 50 Å (Maximum unit cell length=150 Å)
Neutron wavelength and flux	0.5 Å < λ < 8 Å or more than that 7×10 ⁷ n/s/cm ² (estimation between 0.5 Å < λ < 3.9 Å when 1 MW)
Obtainable information	3-dimensional positional information in Angstrom scale especially for proton, hydrogen and waters
Research field	Crystallography of inorganic, organic compounds and biological macromolecules
Standard size of sample	1 mm ³ , minimum 0.1 mm ³ (when 1 MW)
Special sample environment	Low temperature (20–90 K)
Standard measurement time	0.5 days (organic compounds) 3 days (biological macromolecules) (When sample volume 2 mm ³ , 30 detectors and 1 MW)
Outstanding point of iBIX	The best performance diffractometer in the world's pulsed neutron single crystal diffractometers for biological macromolecules (9.1%; 2 times larger detector solid angles than that of PCS in LANSCE, USA when 14 detectors in May 2009).
State of operating	Open use program has started in December 2008

は適さなかった。JAEA の片桐らは、 2μ 秒程度以下の時間分解能を持ち、 1 mm 程度以下の高位置分解能、不感領域が小さく、試料に対する立体角を大きくすることが可能で、試料結晶にダメージを与えるガンマ線に低感度の検出器の開発に成功した。¹²⁾ 2009 年 9 月現在、 $^{10}\text{B}_2\text{O}_3$ がコンバーターで ZnS をシンチレータとした波長変換ファイバーシステムの検出器 14 台が設置されている。また、データ処理ソフトウェア¹³⁾ はプロファイルフィッティングを利用して重なったブラック反射の分離が適用できるよう最終調整中で、2009 年末には最低限の機能が整備完了予定である。なお、2009 年度中には窒素やヘリウムの低温吹付装置を設置する予定で、試料位置の温度を $20\text{--}90\text{ K}$ に保持した測定が可能になる。Fig. 5 に iBIX の最新の検出器配置と試料位置の写真を示す。

2008 年度の iBIX は 20 kW 供用運転において、JRR-3 の BIX-4 とほぼ同様の分解能の反射が確認されているタンパク質が複数あり、3–4 年後の 1 MW 運転時には、検出器の増設も考慮すると、BIX-3 や BIX-4 のおよそ 100 倍の測定効率が確実に実現することが確認できた。

Figure 6 に、iBIX で 18.7 時間露光により 1.4 \AA 分解能の反射まで確認された RNaseA タンパク質の実験生データを示す。BIX-3 で同じタンパク質を 30 分の静止写真で撮影すると、同様に 1.4 \AA 付近までの反射像が観測された。なお、iBIX のような

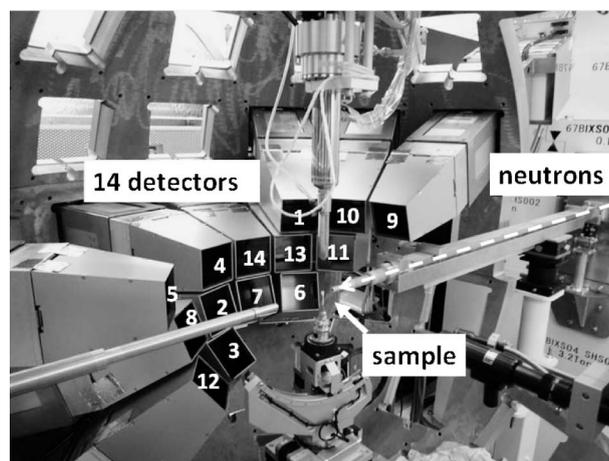


Fig. 5. iBIX Sample Position and 14 Detectors (since May 2009)

Neutrons come from the right side. Distance between sample and detector surface is about 45 cm.

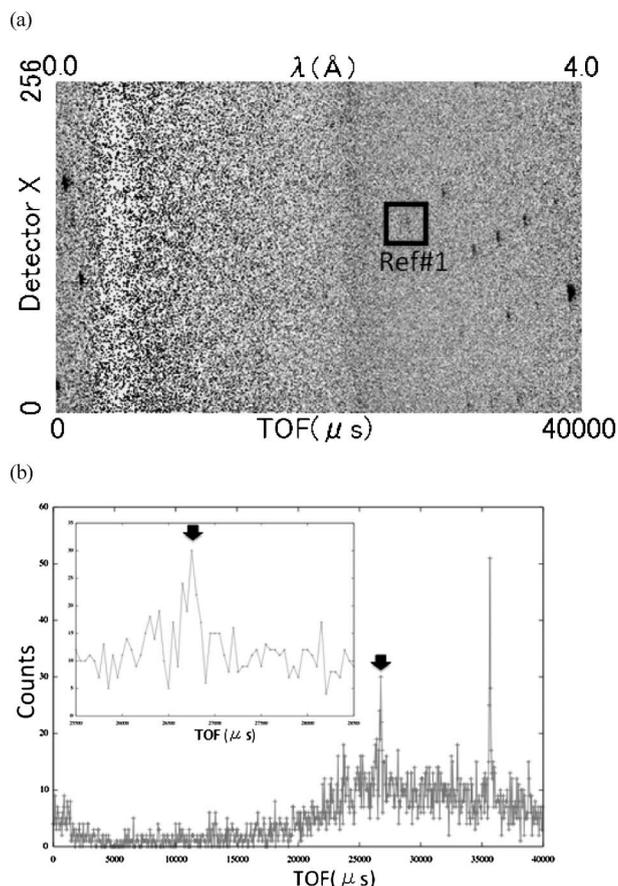


Fig. 6. iBIX Diffraction Spots of RNaseA Protein

(a) Neutron intensity at Xth pixel on a detector, where the horizontal axis is time/wavelength and the vertical axis is intensity integrated along Y direction. A black square region shows a minimum d-spacing reflection. (b) Neutron intensity profile of an integration over black squared area in Fig. 6 (a), where the horizontal axis is time. An inset figure is a magnification of around a black arrow peak. It was found this reflection to be 1.4 Å in d-spacing. Exposure time: 18.7 h, about 20 kW power operation of J-PARC, sample crystal volume: 12.5 mm³, unit cell dimensions: a=30.4 Å, b=38.6 Å, c=53.4 Å, $\beta=105.8^\circ$.

擬似ラウエ法では、BIX-3, BIX-4のようなモノクロメータ法に比べて、1フレームの露光時間は長くなるが、取得できる反射数は多くなるので、上記のそれぞれの測定時間は現時点での実際的な露光時間と考えてよい。なお、1 MW 運転時においては、検出器が30台になる予定なので、iBIXの方が測定効率分だけ短時間で測定が完了できることになる。

4. 将来展望

iBIXを用いた具体的な実験応用例としては、前述のように測定試料の個数を増やして系統的な実験を行ったり、結晶成長が困難である小さな単結晶試料でも測定可能となったり、より大きな分子（格子定数）への適用といったことが考えられる。この結果、標的タンパク質の活性部位の水素原子の詳細な

位置情報や水素結合情報を得ることにより、効率的な医薬品の設計、相互作用や反応機構を解明することも可能になることが期待される。また、標的タンパク質と候補化合物との複合体の詳細な構造解析を行うことにより、効率的な分子モデリングやシミュレーションへの貢献も期待できる。

一方、J-PARCの大強度パルス中性子の特徴を活かし、25 Hz（繰返周期0.04秒）を基本とした時分割測定も、試料の選択によっては可能となるだろう。さらに、R&Dが必要になるが、水素原子の散乱長 b （X線では電子数若しくは原子散乱因子 f に相当）を10倍近く強調して、より精度の高い水素原子の位置情報の構造解析を行うために、動的核偏極法を偏極中性子と組み合わせて使用することも、将来的な展望として示しておく。前述のように中性子実験用の生体高分子試料は一般に重水素化が必要であるが、同位体効果が無視できない懸念が常に指摘されており、この解決方法としてもこの観測手法は注目される。

5. 実験申請方法など

一般にiBIXを利用するには、大きく2つの窓口がある。1つは茨城県の産業利用枠であるが、申請代表者が企業等に所属している必要がある。

詳細は「茨城県中性子ビームラインの産業利用」のWebサイト（<http://www.sf21-ibaraki.jp/index.html>）の「ビームラインの利用について」の「募集要項・申請書」の項目を参照されたい。

もう1つは、J-PARCが直接募集する一般利用枠である。詳細はJ-PARCの「実験課題申請システム」（<https://gamusha1.j-parc.jp/j-pas/auth/menu.jsp>）の「物質・生命科学実験施設」の「公募要項」（入力は英語）を参照されたい。

双方とも夏と冬の年2回課題を募集し、それぞれ当該年度下期、次年度上期の利用の申請を受け、審査後、採択された課題に対して実験が許可される。いずれにしても、特に中性子実験が初めての方は、技術的な相談も含めて、われわれ装置グループのほか、茨城県でも十分な専門知識と豊富な経験を有するコーディネータを配置しているので、一度ご相談されてから実験申請等を検討して頂くことをお勧めする。

また、これら一般申請とは別に啓蒙活動として、茨城県中性子利用促進研究会（

ibaraki.jp/kenkyukai/index.html) や MLF 利用者懇談会 (<http://is.j-parc.jp/MLFuser/>), 中性子産業利用推進協議会 (<http://www.j-neutron.com/>) において, iBIX も含めた中性子装置の利用促進を目指した研究会が設けられており, 産官学の研究者の参加が可能となっている。これらの研究会では, 中性子施設での実験及び中性子結晶構造解析のノウハウから最新の研究情報, J-PARC の詳細な状況等に関する情報交換を行っている。これらへの積極的な参加を通して, 中性子結晶構造解析に対する理解, さらには中性子単結晶回折装置の利用が広まることを期待する。

謝辞 iBIX 建設プロジェクトにおける最も重要な部分の1つである検出器開発において, 世界に先駆けて成功を収め, さらに高度化に向けて開発を進めている日本アドバンステクノロジー (元 JAEA) の片桐政樹氏及び JAEA の曾山和彦氏ほか関係者の皆様には, 特別の敬意を表す。また, JRR-3 での重要な比較測定においては, JAEA の黒木良太氏のタイムリーな対応で可能となったので感謝したい。さらに J-PARC の中でも特に MLF の建設・運転と iBIX の円滑な設置作業に対して, JAEA 及び KEK の多数の関係者にお世話になった。最後に, スポンサーであり, かつ中性子の産業界への PR のパイオニアでもある, 茨城県庁の関係者の皆様に深謝する次第である。

REFERENCES

- 1) Schoenborn B. P., *Nature (London)*, **224**, 143–146 (1969).
- 2) Niimura N., Karasawa Y., Tanaka I., Miyahara J., Takahashi K., Saito H., Koizumi S., Hidaka M., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, **349**, 521–525 (1994).
- 3) Tanaka I., Kurihara K., Chatake T., Niimura N., *J. Appl. Crystallogr.*, **35**, 34–40 (2002).
- 4) Kurihara K., Tanaka I., Refai-Muslih M., Ostermann A., Niimura N., *J. Synchrotron Rad.*, **11**, 68–71 (2004).
- 5) Niimura N., Bau R., *Acta Crystallogr., Sect. A*, **64**, 12–22 (2008).
- 6) Blakeley M. P., Langan P., Niimura N., Podjarny A., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **18**, 593–600 (2008).
- 7) Tanaka I., *Hamon*, **16**, 3–6 (2007).
- 8) Tanaka I., Kusaka K., Tomoyori K., Niimura N., Ohhara T., Kurihara K., Hosoya T., Ozeki T., *Nihon Kessho Gakkaishi*, **50**, 13–17 (2008).
- 9) Tanaka I., *Materia Japan*, **48**, 369–371 (2009).
- 10) Tanaka I., Kusaka K., Tomoyori K., Niimura N., Ohhara T., Kurihara K., Hosoya T., Ozeki T., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, **600**, 161–163 (2009).
- 11) Kusaka K., Ohhara T., Tanaka I., Niimura N., Ozeki T., Kurihara K., Aizawa K., Morii Y., Arai M., Ebata K., Takano Y., *Physica B*, **385–386**, 1062–1065 (2006).
- 12) Hosoya T., Nakamura T., Katagiri M., Birumachi A., Ebine M., Soyama K., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, **600**, 217–219 (2009).
- 13) Ohhara T., Kusaka K., Hosoya T., Kurihara K., Tomoyori K., Niimura N., Tanaka I., Suzuki J., Nakatani T., Otomo T., Matsuoka S., Tomita K., Nishimaki Y., Ajima T., Ryufuku S., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, **600**, 195–197 (2009).