

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04737

研究課題名(和文) 膜蛋白質構造解析を可能にする新奇パルス中性子回折強度積分法の開発

研究課題名(英文) Development of a new integration method of neutron time-of-flight single-crystal Bragg peaks from a membrane protein crystal

研究代表者

友寄 克亮 (Tomoyori, Katsuaki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・研究員
(任常)

研究者番号：10455909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質中性子結晶学では、蛋白質内に存在する水素や、その周囲の水分子からくる日干渉性散乱が非常に大きく、中性子回折実験ではバックグラウンドとなる。また蛋白質からの平均的回折強度は、格子サイズが大きくなるにつれて反射の数が増加するため非常に弱くなる。したがって大型格子蛋白質単結晶によるブラッグ反射は特に信号とバックグラウンドの区別が難しいものとなる。我々は、J-PARC/MLFにおいて大型蛋白質向けの単結晶中性子回折計の建設を計画しており、本研究では、そのような弱い反射を精度良く積分することを目的とした調査研究を実施し、新しいデータ処理プロトコルの開発と回折装置の設計を行った。

研究成果の概要(英文)：In neutron protein crystallography, the incoherent scattering from hydrogen atoms involved in a protein single-crystal and the surrounding water molecules is significantly large, resulting in backgrounds on neutron diffraction experiment. The diffracted intensities from a protein single-crystal are very weak as the number of reflections increases with larger unit cells. This has difficulty in discriminating between coherent signal and backgrounds especially for the Bragg reflections diffracted from biomacromolecules with large unit-cells. We are planning to build the neutron single-crystal diffractometer in J-PARC/MLF. In this study, I performed the feasibility studies to precisely integrate weak reflections characterized by the single-crystal neutron diffractometry and developed the new data reduction protocol. In addition, I designed a new versatile diffractometer dedicated for biomacromolecules with large unit cells.

研究分野：原子核 生物物理

キーワード：原子核 散乱 蛋白質科学 生物物理 中性子科学 量子ビーム データ処理 構造生物

1. 研究開始当初の背景

英国ISISのパルス中性子単結晶回折装置では、世界に先駆けて実空間での一次元TOFプロファイル関数を用いた積分方法が、取り入れられ、パルス形状の時間方向の非対称性を再現するため、半経験的な畳み込解析関数やバックグラウンド解析関数を用いたプロファイルフィッティングが行われている。日本においても実空間での積分処理が採用されており、主にピーク領域内をカウントするBOX和によるものが用いられているが、プロファイルフィッティングによる積分方法はまだ確立されていない。いずれの手法においても、ピークサーチによって反射の位置情報から決まる逆格子点の位置を特定し、各反射スポットに対してX-Y-TOFピークマスクを決める。そのマスクの局所的な範囲においてバックグラウンドの評価を行い、積分強度を算出している。一方、世界のパルス中性子の回折強度のデータ精度は、単色中性子の場合に比べて悪く、その原因として申請者はプロファイル関数とバックグラウンド除去方法に一つの要因があると考えている。

米国SNSでは、逆空間(Q空間)上での一次元プロファイルフィッティングによる積分方法の開発も進められている(A. J. Schultz *et al*, *Journal of Applied Crystallography*, 2014)。逆空間においては、空間の幅が縮小し、反射幅も狭窄するので実空間TOF方向の非対称度も緩和されるという長所はある。しかし、バックグラウンド構造が明瞭な一次元方向にスペクトルを切り出し、バックグラウンドを除去し積分強度を算出するという手法は、我々が行っているTOF方向のものとは本質的に変わらない。問題にする必要があるのは、実空間あるいは、逆空間の一次元プロファイルフィッティング積分処理いずれにおいても、いったん一次元にしてしまうと、落とされた次元方向のバックグラウンド情報が失われ、これにより3Dブラッグ反射自身に載っているバックグラウンドの精度の高い数値化が困難となる。

申請者らはこれまでに類を見ない250Åを超える大型格子結晶からのラウエ中性子回折データ収集を可能とする新たな生体高分子専用単結晶中性子回折装置の建設準備をJ-PARCにおいて進めている。この装置では大型格子蛋白質を取り扱うため反射強度が弱く、また検出器の同時計数測定に起因する時間方向の偶発コインシデンスや、蛋白質内外の水素原子由来の非干渉性散乱によるTOF方向の非常に大きな構造的なバックグラウンドが、干渉性散乱であるブラッグ反射の下に存在しているためより精度の高いバックグラウンド処理方法が必要となる。

一方我々が今後建設を予定している装置は中性子捕獲によって発生する γ 線を測定するのではなく、散乱される中性子を検出するものであるが、中性子捕獲 γ 線は逆にバックグ

ランドとなるため測定精度を悪化させる要因となる。測定の目的および対象は異なるが、我々の実験も 4π 立体角球状分光器を用いた低エネルギー原子核散乱実験であり、測定方法は共通したものがあり、分光器設計への応用が可能であると考え。世界のパルス中性子の回折強度のデータ精度は、単色中性子の場合に比べて悪く、その原因としてデータ処理手法の戦略以外にも分光器由来のバックグラウンドの影響も少なからず存在すると申請者は考えている。大型生体高分子を対象にしたパルス中性子回折計は国内ではiBIX、米国のSNSではManDiが稼働しているが、いずれも膜蛋白質や巨大複合体蛋白質を対象としたものでなく厳格なバックグラウンドの低減化が要求されないため、散乱/核反応の素過程に基づく分光器設計は行われてこなかった。これまで熱中性子は、X線と比較してエネルギーが低く、透過性も良いため蛋白質試料に対する放射線損傷などは起こらないとされてきた。しかしながら、これまで述べたように熱中性子の周りの高エネルギーの捕獲 γ 線や、電磁シャワーによって生成された γ 線、電子や陽電子が、蛋白質分子内の分子軌道に存在する電子に作用し、中性子自身の放射線損傷による影響はないが、これら二次粒子による蛋白質分子の酸化や還元反応などは少なからず起こり得ると考えている。新装置のサンプル環境設計の最適化を行い、ソフトウェアばかりでなく、ハードウェアの観点からも大型蛋白質測定実現に向けた基盤技術の確立を行う。

2. 研究の目的

微弱な回折強度を精度よく評価する手法として、プロファイル関数を用いた積分法が回折分野では広く用いられている。パルス中性子源施設に設置された高分子単結晶回折装置では、異なる速度を有する中性子を利用したtime-of-flight(TOF)法が採用されており、空間方向の統計的なバックグラウンドに加えて、時間方向には、大きな水素原子由来の非干渉散乱に信号が埋没される。さらに、反射スポットは、時間方向に中性子線源に由来するテイルを有する。このようなピーク形状を精度よく評価するためには、従来の局所的なバックグラウンド評価法や、半経験的な畳み込み関数を用いた手法では、X, Y, TOFに強度を加えた四次元実空間での積分法としては十分な精度を有しているとは言えない。

そこで、本申請では、時間方向のパルスの非対称性を精度良く再現する関数と、時間に応じてピーク幅が異なりかつ膜蛋白質結晶由来の弱い反射に対してもバックグラウンドを正しく見積もる手法を組み合わせ、新しいデータ処理法を提案し、その処理ソフトの開発を行う。

3. 研究の方法

従来の古典的なデータ処理に比べて、本申請で提案する新たなデータ処理においては、X, Y の 2 次元の空間方向に加えて時間方向 (TOF 方向) の軸が一軸増えている。TOF 方向には、水素からの中性子非干渉性散乱由来の入射中性子スペクトル概形のバックグラウンドと、その上に中性子線源を含む装置由来の非対称性形状とサンプル由来形状を畳み込んだブラッグ反射が存在する。特に蛋白質分子内においては、半分以上水素原子を占めており、非干渉散乱のバックグラウンドは低分子結晶からのもの比べて遥かに大きい。さらに膜蛋白質や複合蛋白質の場合では、格子体積が一般に大きく、観測される積分強度も弱い。

申請者はこれまでに類を見ない 250Å を超える大型格子結晶からの中性子回折データ収集を可能とする新たな生体高分子専用単結晶中性子回折装置の建設準備を J-PARC において進めている。この装置においては iBIX と同様に X, Y 方向のファイバを 2 枚の ZnS:Ag (中性子吸収材: ホウ素 10 またはリチウム 6 を含む) シンチレータで挟んだ構造をもつ検出器を採用する予定である。吸収材に捕獲された中性子は、核反応により荷電粒子に変換され、その場所では、ZnS:Ag から比較的大きな光量が発生する。X, Y 方向のファイバを経由した光子は、PMT (光電子増倍管) を通して電気信号の同時計数処理により散乱中性子のイベントとして観測される。実際にファイバを通して光電面に到達する光子はさらに減少するため、信号処理はアナログ方式ではなくフォトンカウンティング方式が採用されている。ZnS:Ag 自身は、光に対する透明性が悪いので、その分布は鈍るため発光に伴う離散的な弱い信号も沢山生じる。さらに ZnS:Ag の発光では大きなアフターグローも伴うため、1 中性子が来てからもしばらくの間弱い離散的な信号が来る。これらの状況から空間方向の偶発コインシデンスも無視できない。

古典的なこれまでの積分法では、ピークの予測位置に対してピクセル領域あるいはプロファイル形状を最隣接の反射情報から仮定しピークマスクを指定する。その上で最小自乗法により平均的なバックグラウンドを評価し、バックグラウンド除去後積分強度とその強度誤差を算出している。TOF 単結晶中性子回折実験においても、古典的な手法によりピークのピクセル領域内カウント数の和あるいは斜影によるフィッティング積分が行われている。一方、強度を含む x, y, TOF 4 次元のオリジナル次元を保存したままのプロファイルフィッティングによるピーク積分は、精度は高いと考えられるが時間方向の非対称性もあり困難である。したがって積分するには次元を落とす必要があるが、ただしそのことによりバックグラウンドの情報が欠落するというペナルティもある。よって、弱い反射下に存在する高いバックグラウン

ドをより正確に区別可能なオペレータと、ピーク幅を考慮可能な多次元バックグラウンド処理が必要である。申請者の新提案は、初めの段階で X-Y-TOF の 3 次元ヒストグラムデータから上記条件を兼ね備えたバックグラウンド処理方法により除去を行う。得られた X-Y-TOF ヒストグラムから結晶の方位を特定する行列 (UB-Matrix) により反射を同定し反射に対してピークマスクを決め TOF 方向に斜影し、一致度が高いプロファイル関数を用いて数値積分を行う。

4. 研究成果

Landau/Vavilov 関数は、もともと電磁相互作用によるラザフォード散乱から導出されたものであり、中性子の減速に関与する強い相互作用である核力とは、性格的に異なる。しかし、申請者は関数の形状に関わる背景にある確率的な原理は類似していることに着眼し、本関数が積分の TOF プロファイル関数として有効であることを実際の回折データを用いて立証した(雑誌論文⑥)。

さらに反射強度が弱くかつ構成原子の約半分を占める水素原子からの中性子非干渉散乱による高いバックグラウンドを特徴とする蛋白質の場合では強度積分を目的とした形状プロファイル関数に加えて、高度なバックグラウンド評価機能が重要となる。本申請では統計揺らぎに強く弱いピークが強調可能である多次元対応の Statistics-sensitive Nonlinear Iterative Peak-Clipping (SNIP) アルゴリズムの導入を行った。この手法は、原子核の γ 分光や、ラマン分光、マススペクトルデータなどの分光学の分野でのバックグラウンドの評価にも使用されている実績があるが、これまで結晶学の分野では採用されたことはない。SNIP は弱いピークでもバックグラウンドの識別が可能なオペレータを保持し、非対称性のピークでもその識別が可能である。

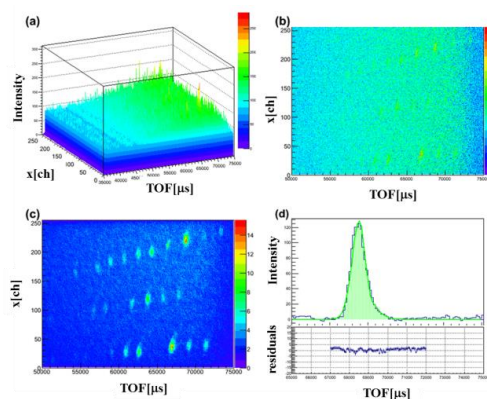


図 1 X-Y-TOF+強度ヒストグラム生データに SNIP 適用: BG 除去後の X-TOF 射影スペクトル (c), TOF 射影 (d) SNIP 適用前: (a) (b)

単結晶中性子解析の場合は粉末中性子解析のように一次元 TOF でなく多次元スペクトルである。このアルゴリズムは簡単に多次元に応用することが可能であり、申請者はこの点に着眼した。申請者は iBIX を用いて測定した蛋白質結晶の反射にも適用し SNIP 法の有効性を確認した (図 1)。

SNIP では、ピークの幅に合わせて各ビンごとにベースラインを評価してゆく方法であり、ピークの幅に応じたウィンドウ値が初期

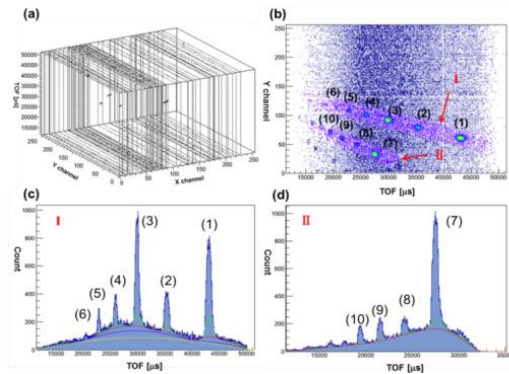


図 2 SNIP による TOF 方向ウィンドウ値評価

パラメータとして割り当てられる。ウィンドウ初期値が大きすぎるとベースラインが過小評価となり、逆にウィンドウ値が小さい場合、ベースラインが過大評価となる (図 2)。特に空間以外の TOF 方向には線源の減速材に起因するテイル構造が存在する。TOF のピークの幅は d 値によって変化するため初期値は d 値に応じたウィンドウ値が必要である。実際の蛋白質データを用いて網羅的に解析を行い大型蛋白質データに適用するための空間方向および時間方向の最適な初期値は、おおよそ半値幅の約 1.5 倍であることが分った。この結果は雑誌論文③に報告済である。

これまでに、バックグラウンド評価のための SNIP アルゴリズムおよび Landau/Vavilov 関数を組み合わせたデータ処理を既存のデータ処理方法と突き合わせて新たなプロトコルの開発を行った。従来のスポット単位の

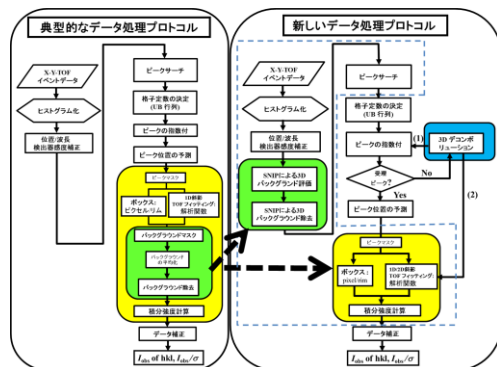


図 3 大型格子蛋白質を対象にした新しいデータ処理プロトコルの提案

局所的なバックグラウンド評価では、連続的なバックグラウンドとシグナルの境界識別が難しいため積分強度算出の系統誤差が生じ得る。したがって、新しいデータ処理法においては、ピークスポット単位でのバックグラウンド評価は行わず、X, Y, TOF 方向全 bin に対して忠実に連続的なバックグラウンドの形を再現できるようなアルゴリズムをデータ処理の初期段階で適用し (図 3 黄色部: 個々の反射の処理、緑部: バックグラウンド処理) 除去後、ピークごとに BOX SUM や TOF 解析関数を用いた積分処理に移行するデータ処理プロトタイプを試作した。

現在 J-PARC/MLF に設置された BL10 に生体高分子専用高分解能単結晶中性子回折度装置の建設を予定しており、建設に必要な線源の選定 (雑誌論文⑤)、ビーム輸送のための中性子ガイドおよび分光器の設計を J-PARC と共同で進めており (図 4)、そのおおよその基本設計はすでに完了しているが (雑誌論文①、④)、これまで分光器および試料周りの環境の設計が未確定のままであった。

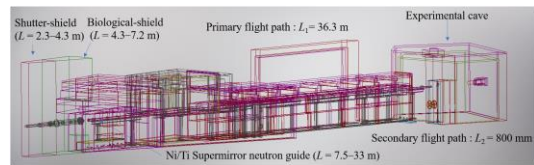


図 4 中性子ビーム輸送系の設計

本装置では、膜蛋白質や巨大複合体蛋白質を対象にしており反射強度も非常に弱い。このような大型格子蛋白質の構造解析に必要な典型的な強度精度を得るためには、1 セットアップの測定で約 5 日必要であり、仮に 10 セットアップの反射を取得し、検出器セットアップや中性子ガイド等の損失因子を 2 とした場合、おおよそ 100 日の測定時間を必要とすることになる。S/N を改善するためのデータ処理の手法を考案し、ほぼその実現への目途が付いているが、これをもってしても平均的回折強度は弱く、さらに中性子特有の問題である水素原子由来の非干渉性散乱によるバックグラウンド上昇もあるため、微弱な回折強度を精度良く測定するためのハードウェア設計の実現が、中性子をライフサイエンス研究に適用する上で避けられない。したがって、ハードウェアレベルでの S/N の改善も必要であると考えている。分光器形状は、散乱の立体角を確保するために球状支持台を考えているが、大型蛋白質の場合には格子定数が大きいため反射の数も多く、結晶学的により効率的に反射の数を確保できるような支持台構造が理想である。ビーム進行方向に対して垂直に左右に二つの半球支持台が稼働し、試料へのアクセスが可能な支持台の設計を行った (図 5)。これにより従来の iBIX

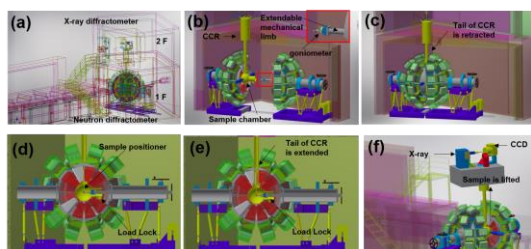


図5 大型蛋白質測定に向けた分光器設計

よりも約 20%の立体角の確保が可能である。

これまで、法的な放射線規定に基づいた遮蔽計算は行ってきたが、中性子検出器に対してのクリーンな環境を実現するためのバックグラウンドの評価や、蛋白質単結晶試料に対する放射線の影響についてはこれまで調査されてきていない。実験に使用する熱中性子は、透過性がよく分光器室内には非常に多くの隙間空間に分布し、熱中性子は物質に対する捕獲断面積を持っているため、周囲には多くの高エネルギー γ 線 (keV~MeV) が存在している。このような特性をもつ熱中性子によるバックグラウンドの寄与は、空气中で散乱された熱中性子や、捕獲 γ 線によるもの以外にも宇宙線による影響も大きいかもしれない。この問題解決のためには、トリガーの方法にも改善の余地は残されているが、中性子線源の地下に分光器を設計することが可能であれば、宇宙線の影響が低減可能である。さらに重力の影響によりビームの位相空間の縮小化と発散の低減にもつながる可能性もあるので、上記は効果的かもしれない。

試料周りでは、材質的に γ 線による遮蔽効果を高め、中性子の散乱および吸収断面積が小さい材料のものを採用した。また空気散乱の寄与を少なくするために、検出器支持体内は一次真空を保持した設計を行った(雑誌論文①)。またこれに加えて X 線と中性子の同時精密化のためのデータ測定のために X 線装置と組み合わせた汎用的な分光器の設計も行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① The design of a versatile TOF neutron diffractometer providing a complementary use of neutron and X-ray diffraction from biomacromolecular single-crystal with large unit cells K. Tomoyori, K. Kurihara, T. Tamada *Journal of Physical Society Japan* in press 2017
- ② New data reduction protocol for Bragg reflections observed by TOF single-crystal

neutron diffractometry for protein crystals with large unit cells K. Tomoyori, T. Tamada *Journal of Physics* **762** 012040 2016

- ③ Background elimination using the SNIP algorithm for Bragg reflections from a protein crystal measured by a TOF single-crystal neutron diffractometer K. Tomoyori, Y. Hirano, K. Kurihara, T. Tamada *Journal of Physics* **664** doi:10.1088/1742-6596/664/7/072049 2015

- ④ Evaluation of the resolvable capacity of Bragg reflections for a new diffractometer at J-PARC/MLF designed for protein crystals with large unit cells K. Tomoyori, K. Kurihara, T. Tamada, and R. Kuroki *Journal of Physical Society Japan* 036004 DOI:10.7566/JSPSC.8.036004 2014

- ⑤ Evaluation of intensity and pulse width of different moderators for designing a new diffractometer for protein crystals with large unit cells in J-PARC/MLF Tomoyori K., Kusaka K, Yamada T, Tamada T. *J. Struct. Funct. Genom.* **15**, 131-135 2014

- ⑥ Profile functions to reproduce Bragg reflection shapes observed by a time-of-flight single-crystal diffractometer installed at a coupled moderator pulsed neutron source in J-PARC Tomoyori K., Kusaka K, Yamada T, Hosoya T, Ohhara T, Kurihara K, Tanaka I, Katagiri M, and Niimura N. *Nucl. Instr. and Meth. Phys. Res. A* **723**, 128-135 2013

[学会発表] (計 4 件)

- ① The design of a versatile TOF neutron diffractometer providing a complementary use of neutron and X-ray diffraction from biomacromolecular single-crystal with large unit cells K. Tomoyori, K. Kurihara, T. Tamada *International Conference on Neutron Optics (NOP) Nara Japan 2017 July*
- ② The design of a TOF neutron diffractometer providing high availability with the combined use of X-ray and neutron scattering from a protein single-crystal with large unit cells. K. Tomoyori, T. Tamada, *International Conference on Technology and Instrumentation in Particle Physics (TIPP)*, Beijing China 2017 May
- ③ Data reduction protocol for TOF neutron single protein crystal diffractometry K. Tomoyori, *International Workshop on*

- ④ Background elimination using the SNIP method for Bragg reflections from a protein crystal measured by a time-of-flight single-crystal neutron diffractometer K. Tomoyori, K. Kurihara, T. Tamada, 21st International Conference on Computing in High Energy and Nuclear Physics (CHEP) Okinawa Japan 2015 April

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友寄 克亮 (TOMOYORI Katsuaki)

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発
機構 高崎量子応用研究所 東海量子ビー
ム応用研究センター 研究員 (任常)

研究者番号：10455909

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者