

特集 広がる加速器の利用 中性子

加速器中性子源の利用

中性子で展開される生命科学とその周辺のサイエンス

中川 洋^{*1}・片岡 幹雄^{*2}

Basic and Applied Life Science Extended by Neutron

Hiroshi NAKAGAWA ^{*1} and Mikio KATAOKA ^{*2}

Abstract

Life science is expected to be one of the major subjects of neutron research. The quantum beam properties of neutron, isotope effect and inelastic/quasi-elastic scattering are useful for studying crystal structures, solution structures and dynamic structures of biomolecules. Research on physical properties of biological materials by inelastic scattering is promising as applied research such as food science. The high-intensity pulse neutrons realized by the accelerator not only has developed the life science research so far, but also is opening a gate to the academic field which has never been used before.

1. はじめに

生物学の研究では、対象物の形態、構造、動きを観察することが、生命現象を理解するために大切である。鋭い観察によって、生命現象に普遍的な原理や規則性を追求するような研究だけでなく、相違点を見つけ出して分類するような博物学的な考察も必要とされる。それは、個体や細胞といった肉眼や顕微鏡で見えるような大きさの対象物だけでなく、マイクロなスケールの生体分子を扱う場合でも同様である。

X線回折から解明されたDNAの二重らせん構造は、全ての生命に普遍的な遺伝情報の複製メカニズムを見事に説明した。またX線結晶構造解析で解かれた膨大な数の蛋白質の立体構造を眺めてみると、 α ヘリックスや β シートと呼ばれる全ての蛋白質に共通する構造的特徴が見えてくる。一方で、個々の蛋白質の立体構造は実に多様である。バイオインフォマティクスと呼ばれる分野では、計算機を用いて立体構造の特徴を抽出したり構造を比較・分類したりするといった博物学的な

考察により蛋白質の機能解析が行われる。生命科学の研究では、分子の姿を如何にして観察するかが重要となる。

このような分子レベルでの生命現象を追求する生命科学の研究では、計測分析技術がそのカギとなる。近年、その技術開発は著しく、分子構造だけではなく、ダイナミックに繰り広げられる動的な生命反応を観たり、生体分子の一分子だけを操作したり、観測したりするといった手法が開発されている。中性子では、他の計測手法では得がたい生体分子の動態（構造やダイナミクス）が分かる。また生命科学は生命現象の解明などの理学的な研究だけでなく、医学・薬学・農学などの応用科学とも密接に関係する。本稿では、生命科学とその周辺のサイエンスで、中性子のどのような特性が活かされるか、何が分かるかなどを紹介する。

2. 生命科学研究に活かされる中性子の特性

散乱・回折実験で用いられる中性子は、原子サイズと同程度の波長（ $\sim \text{\AA}$ ）と、分子の熱揺らぎと同程度のエネルギー（ $\sim \text{meV}$ ）を持つ。その

*1 日本原子力研究開発機構 JAEA, Japan Atomic Energy Agency
(E-mail: nakagawa.hiroshi@jaea.go.jp)

*2 奈良先端科学技術大学院大学 Nara Institute of Science and Technology
(E-mail: kataoka@ms.naist.jp)

ため、分子からの散乱波の干渉が起こると共に、測定分子とのエネルギーのやり取りが生じる。中性子散乱は、散乱波の位相がそろった干渉性散乱部分と、位相がランダムな非干渉性散乱部分に分けることができる。

中性子はX線と比較して、水素原子による散乱が特徴的である。それは、主として(1)水素原子と重水素原子の散乱長や散乱断面積の大きな違い、(2)水素原子の強い非干渉性散乱を利用した非弾性・準弾性散乱、の2つに集約される。主要な生体物質である蛋白質、脂質、核酸、あるいは生体中に大量に存在する水分子は、いずれも水素原子が分子組成の大きな割合を占める。水素原子を直接観測対象とできる中性子計測は、生命科学において今後重要な技術となることが期待される。これまでもこのような中性子の特性を活かすことで、生体物質の構造やダイナミクスの興味深い解析がなされてきた¹⁾。上述(2)の測定には、加速器によって発生されるパルス中性子を用いた飛行時間測定が強力な武器となり、J-PARCに対する期待は大きい。

2.1 重水素ラベル～HとDの散乱長・散乱断面積の違いの利用～

中性子散乱の原理は、基本的にはX線散乱と同じである。散乱過程の違いにより、中性子で“見えるもの”は、X線とは異なる。表1は、生体物質の主要な構成原子の中性子散乱長と散乱断面積である。水素原子の散乱長が負の値を持つが、これは散乱過程で位相が通常と逆転することによる。水素原子と重水素原子の散乱長は符号が異なるため、中性子では水素原子と重水素原子を識別できる。また、散乱長の大きさも他の元素と同程度であるため、水素原子を他の原子と同じ程度に観ることができる。

表1 中性子の散乱長と散乱断面積
(干渉性散乱振幅 b_c , 干渉性散乱断面積 σ_{coh} , 非干渉性散乱断面積 σ_{inc})

元素	b_c (fm)	σ_{coh} (10^{-24} cm ²)	σ_{inc} (10^{-24} cm ²)
H	-3.74	1.76	80.27
D	6.67	5.59	2.05
C	6.65	5.55	0.001
N	9.36	11.01	0.50
O	5.81	4.23	0.00

X線は電子によって散乱するため散乱断面積は原子番号におよそ比例するが、中性子の場合そのような規則性はない。

水素原子の非干渉性散乱断面積は他の原子よりはるかに大きい。非干渉性散乱を利用した実験の場合、分子を部分重水素化させることで特定部位からの散乱を小さくして、見たい部分だけを際立たせて観測することも可能となる。

2.2 非弾性散乱と準弾性散乱～分子の運動性の解析～

もう一つ中性子のユニークな点が、非弾性・準弾性散乱による分子の運動性の解析である。広い波長帯の中性子が利用できる加速器によるパルス中性子が有効に活用できる手法でもある。干渉性散乱を用いたフォノンの分散曲線の測定と、非干渉性散乱を用いた振動状態密度の測定があるが、水素原子を多く含む生体物質では散乱断面積の大きい非干渉性を扱うことが多い。この手法は、水分子のダイナミクスの解析によく利用されるほか、構造科学的な視点から生体分子の振動モードを解析したり、テラヘルツ周波数領域に特徴的なガラス化した生体物質の分子ダイナミクスなど、熱物性と関係した分子運動性の解析にも利用されたりする。図1に蛋白質の典型的な中性子散乱スペクトルの模式図を示す。スペクトルは、そのエネルギー移動の大きさにより、非弾性散乱、準弾性散乱、弾性散乱に分けることができる。これらを解析することで、分子の拡散定数、構造緩和時間、分子間相互作用による単純拡散からジャンプ拡散への運動の変化などの分子運動を解析できる。蛋白質の場合には、構造遷移やガラス転移における非振動的な運動、生体分子周りの水和水の分子運動の解析に用いられることが多い。

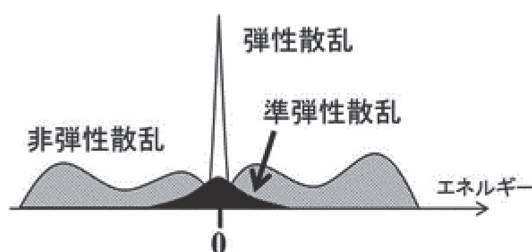


図1 中性子散乱スペクトルの模式図

3. 中性子構造生命科学～次世代の生体分子の構造とダイナミクス研究～

中性子ではX線と同様、結晶構造解析や溶液小角散乱が行われる。これらはX線でも得られる情報であれば中性子を使う必要はないが、中性子の特性を活かすことができればその利用価値は高くなる。また中性子でなければ難しいのが非弾性・準弾性散乱による動的構造解析である。

3.1 結晶構造

生体分子の結晶構造解析の多くはX線で行われているが、X線では電子を観るのに対し、中性子では核を観ることから、水素原子や水和水を見る際には中性子の利用が大きなアドバンテージとなる。触媒反応などに直接関わる水素原子の状態を知るためには、電子分布(X線)と原子核の位置(中性子)を併用することで、水素原子の正確な位置や、その分極状態などを明らかにすることが可能となる。これまでに、酵素活性に関与する水やアミノ酸のプロトン化状態を詳細に解析したり²⁾、プロトン伝達経路を含んだ機能構造が解明されたりしている³⁾。またイエロープロテインにおいて特殊な水素結合やプロトン化状態が見出され論争的になっている⁴⁾。今後もこのような中性子を用いなければ分からないような構造・機能解析が期待される。パルス中性子の利用のためには、その特性を活かした検出器の開発等が重要になる。

3.2 動的構造

結晶構造では原子分解能で生体分子の分子構造が分かるが、溶液中で構造を柔らかく変化させながら機能する状況を調べることはできない。近年、このような生体分子の構造変化や揺らぎといった考え方が特に強調されるようになってきており、生理環境に近い溶液中での生体分子の構造情報が求められている。生理的条件下での溶液中で構造解析ができる小角散乱は、きわめて有効な方法である。中性子小角散乱は、データ精度という点ではX線小角散乱に劣るが、コントラスト変調法や分子の重水素化によって、中性子の長所を活かした溶液構造解析が可能となる。すなわち、表1に示した水素原子と重水素原子の大きな散乱長の違いから、軽水と重水の比を変えることで、溶媒のコントラストを自在に制御できる。蛋白質と

DNAなどの2成分系では、一方の成分の平均散乱長に溶媒の散乱長を一致させることで、散乱プロファイルからその成分を消すことができる。複数の蛋白質からなる複合体蛋白質の系では、一部の蛋白質を重水素化することで見たい構造だけを解析することも可能である。

3.3 動的構造

蛋白質ダイナミクスの理論では、約10 meV程度以下の低エネルギーの振動モードが蛋白質の機能に重要であると言われている。例えば、ターゲット分子が結合する前後の結晶構造の違いは、この低エネルギーモードによる構造変化で説明できることも多い。このような動きを捉える振動分光法として中性子非弾性散乱は利用される。

図2に、蛋白質の中性子非弾性散乱スペクトル

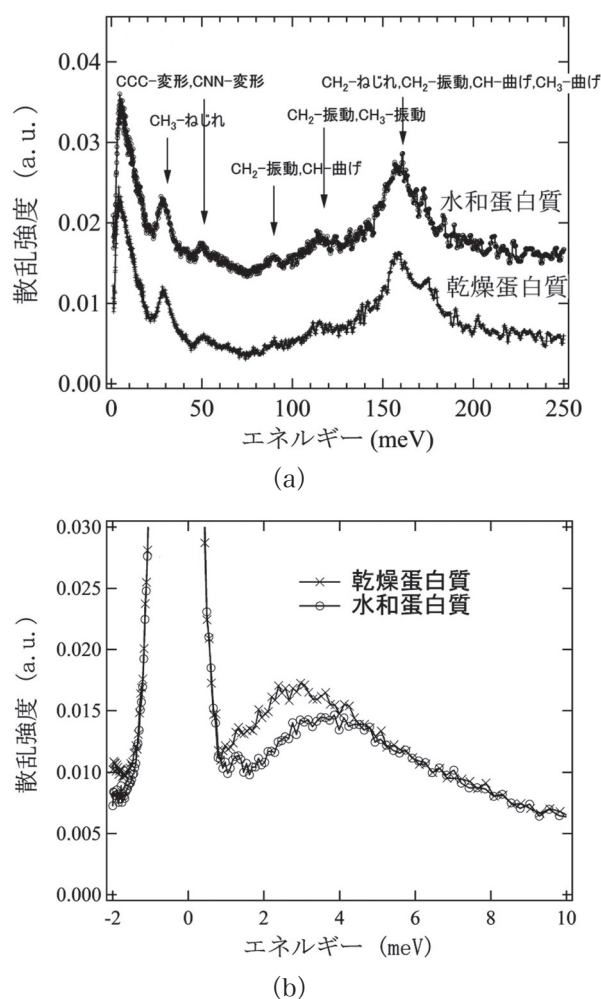


図2 乾燥蛋白質と水和蛋白質の、(a) 高エネルギー領域と、(b) 低エネルギー領域の中性子振動スペクトル

の例として、蛋白質の脱水和した粉末試料および水和粉末試料のスペクトルを示す。図2(a)では、高振動スペクトルに水和による変化は見られず、メチル基などの分子基の局所的なダイナミクスには水和の影響はあまりないことが分かる。一方、図2(b)のように、低振動ダイナミクスには変化が見られる。数 meV に見られる励起スペクトルは、合成高分子やガラス形成物質と共通にみられるボソンプークである。これまでの研究で、蛋白質の場合には、ボソンプークのピーク位置は分子量依存性があることから、分子全体にわたる振動モードにアサインされている⁵⁾。ピーク位置は水和によって高エネルギー側へシフトし、低温では蛋白質の構造は水和水との水素結合によって硬くなることが推察される。蛋白質の構造が揺らぐとき、周囲の水和構造も同時に変化するはずである。ボソンプーク位置のシフトから、蛋白質全体にわたる構造の揺らぎが、水和水とカップルしていることが分かる⁶⁾。

立体構造に基づくダイナミクスの解明は、蛋白質間相互作用、細胞レベルの活動など、より高次の生命活動を理解するための分子基盤となる。蛋白質の立体構造（静的構造）は Protein Data Bank (PDB) のデータベースに登録されるが、これになぞらえ、フランスの中性子生物の研究チームが主体となって Neutron Dynamics Data Bank (nDDB) の設立が提案されている⁷⁾。中性子非弾性・準弾性散乱は、これらのデータベースを整理するための一つの基軸となることが期待されている。

4. 非弾性・準弾性散乱による動的構造解析

ここでは、非弾性・準弾性散乱の研究と、今後期待される応用研究を紹介する。

4.1 DNA 配列とダイナミクス

ゲノム解析により多くの生物種で DNA 配列が明らかにされている。しかし、遺伝子の読み出しに関わる蛋白質のアミノ酸配列と DNA の塩基配列の相互作用には明確な対応関係が見られない。最近の研究で、蛋白質と DNA の直接的な相互作用（直接認識）だけでなく、配列依存的な構造の変形のしやすさ（間接認識）も DNA 配列にコードされていることが分かってきたが、それを裏付ける実験データがなかった。そこで、理論的な解析

で硬いと予測されている 5'CGCGAATTCGCG3' と柔らかいと予測されている 5'CGCGITAACGCG3' の二種類の配列の DNA について、中性子非干渉性準弾性散乱実験を実施した（図3(a)）。当初より微細な散乱の違いであることが想定されたが、J-PARC/MLF の AMATERAS 装置を用いることで、精密な(Q- ω)空間のスペクトルからその違いを検出することに成功した⁸⁾。図3(b)は準弾性散乱の半値幅を示す。散乱ベクトル Q の大きい値での漸近値から、DNA の構造遷移の時定数が分かる。一つの構造状態の滞在時間は AATT と TTAA で、 45.2 ± 1.5 ps と 40.9 ± 1.1 ps と違いが見られ、AATTの方が硬い構造であるという理論予測を実証した⁸⁾。このような配列依存的な DNA 構造の揺らぎについて系統的に調べ

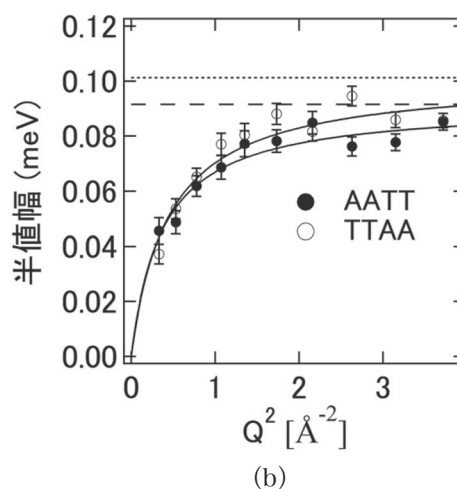
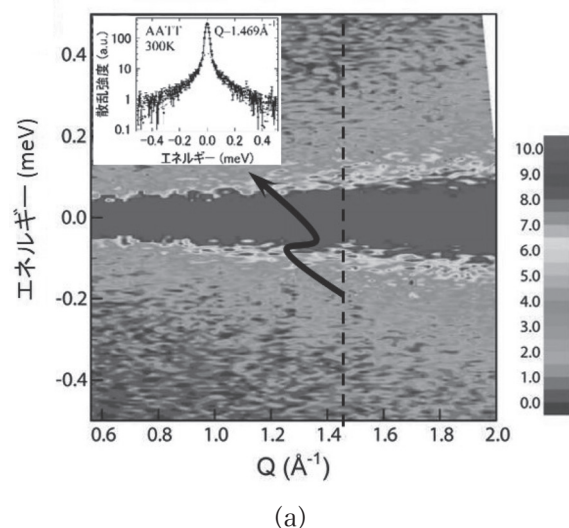


図3 (a) AATT の中性子準弾性散乱スペクトル、(b) 準弾性散乱の半値幅の Q 依存性

ば, 新たな DNA 結合蛋白質の分子設計などが可能になってくると期待できる. また, このような微細な変化を精度よく観測できたことは, J-PARC における生体物質のダイナミクス研究にとって大きな福音である.

4.2 蛋白質の水和と動力学転移

図 2 で蛋白質の揺らぎが水和とカップルしていることを示したように, 蛋白質の揺らぎを議論するうえで, 水和水の存在は重要である. では, 水和水は蛋白質表面でどのように振舞うのであろうか? 水素原子と重水素原子の非干渉性散乱断面積の大きな違いを利用することで, 蛋白質と水和水を分離して観測した (図 4 (a))⁹⁾.

中性子非干渉性弾性散乱の Q 依存性からは, 平均自乗変位 (MSD) として分子の揺らぎが分かる. ここでは, 表面に約 1 層程度の水和水を吸着させた水と蛋白質の MSD の温度依存性を調べた (図 4 (b)). 温度を上げていくと蛋白質の MSD は増加するが, 約 240 K でその増加が顕著になる. この揺らぎの増大は動力学転移あるいはガラス転移と呼ばれ¹⁰⁾, 転移温度以上で活性化される揺らぎが機能発現に重要であると考えられている. 蛋白質と水和水の MSD の温度依存性を

見ると, 低温では, 蛋白質と水和水の揺らぎの大きさはほぼ一致しているが, 動力学転移温度で水分子の揺らぎが急激に増大する. このことから, 蛋白質と水和水の揺らぎが連動していることが分かる. これらの結果は, 蛋白質にとって水を単なる環境媒体と考えるのではなく, 基本的な生体分子ととらえ, 生体分子との相互作用をあらわに議論することが重要であることを示している. 水和は蛋白質構造の安定性や機能発現に重要であると考えられてきたが, 水和水を観測する実験手法は限られていたためその実態に迫ることは難しかった. 蛋白質と水和水を選択的に観測できる中性子非干渉性散乱法は, このような研究に対して有望である. 今後は, (Q- ω) 領域を自在にスキャンできる J-PARC のパルス中性子による詳細なスペクトル解析への期待は大きい.

4.3 生体物質の低温物性とその応用科学

ガラス転移という現象は物性物理学の謎として精力的に研究されているが, 現象論的には高分子・食品などの様々な学術分野のほか, 生体中の水の物性と関連した生体物質の低温挙動や植物の種子・細胞・臓器の保存技術といった応用研究でも広く議論されている.

最近の研究では, 砂漠などに棲息する生物が, 極限環境下で生き延びる手段としてガラス化を利用していることが分かってきた. また生体系のガラス化には天然変性蛋白質と呼ばれる蛋白質が関与している場合があることが知られている. この一群の蛋白質は, 構造科学的には生理的環境で変性状態というランダムな構造を取っていることが特徴である. 興味深いことに, ガラス化に関わるある種の天然変性蛋白質では, 脱水に伴って変性構造から規則的な構造に変化すると共に, ガラス化する. 非干渉性中性子準弾性散乱は, ランダムな運動を解析でき, また脱水に伴うガラス化の熱力学的な状態変化を解析するのに有用である. 一見, 生命現象と無関係に見える水和水やガラス化といった物質科学としての現象が, 環境変化の適応機構などの生物機能をどのように支えているかを解き明かすことは, 次世代の中性子生命科学の重要なテーマの一つとなるであろう.

生体物質の低温物性として注目すべきもう一つの視点が, 食品科学である¹¹⁾. 多くの食品の由来が生物であることから分かるように, 生体物

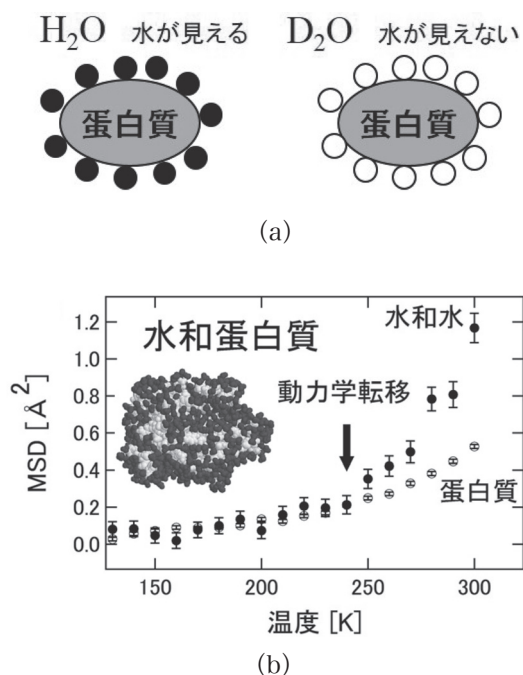


図 4 (a) 重水ラベルによる蛋白質と水和水の分離観測, (b) MSD の温度依存性と水和構造

質は食品でもある。伝統的な乾燥食品や最新の技術による冷凍食品などは、ガラス化によって保存性を高めている。ガラス転移は食品自体が持つ物性だけでなく、そこに含まれる水分の影響も強く受け、乾燥食品では水分量を減らすことでガラス化が実現している。また水分量や温度の低下に伴う水分活性の低下は、食品中の微生物の生育を抑制する。したがって、水和や分子運動というミクロな現象は、食品の保存性や食感といったマクロな食品の品質に大きく関わる。非干渉性中性子散乱は生命科学研究だけでなく、様々な応用研究への適用が期待される。

5. さいごに

微量サンプルを扱う生命科学研究での中性子の利用は、これまで絶対的な強度不足に悩まされてきた。しかし、J-PARC など、加速器がもたらす大強度中性子は系統的な生命科学研究を可能にしつつある。また中性子による生命科学研究の周辺のサイエンスにも中性子の利用が検討されはじめている。中性子による生命科学の基礎研究が、別

の分野の新たな基礎研究や応用研究として発展しており、このような流れは将来的には産業利用にも結びついていくことを大いに期待したい。

参考文献

- 1) J. Fitter, T. Gutberlet, J. Katsaras (Eds.): Neutron Scattering in Biology: Techniques and Applications, Springer (2005).
- 2) M. Unno et al.: J. Am. Chem. Soc., 137, 5452 (2015).
- 3) A. Nakamura et al.: Science Adv., 1, e1500263 (2015).
- 4) S. Yamaguchi et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 106, 440 (2009).
- 5) M. Kataoka et al.: J. Phys. Chem. Solis., 60, 1285 (1999).
- 6) H. Nakagawa et al.: Biophys. J., 95, 2916 (2008).
- 7) L. Rusevich et al.: Eur. Phys. J. E. Soft Matter, 36, 80 (2013).
- 8) H. Nakagawa et al.: Phys. Rev. E., 90, 022723 (2014).
- 9) H. Nakagawa et al.: J. Phys. Soc. Jpn., 79, 083801 (2010).
- 10) W. Doster et al.: Nature, 337, 754 (1989).
- 11) 中川洋, 片岡幹雄: 日本食品科学工学会誌, 61, 323 (2014).