

実習 溶液散乱 ビームライン :BL40B2

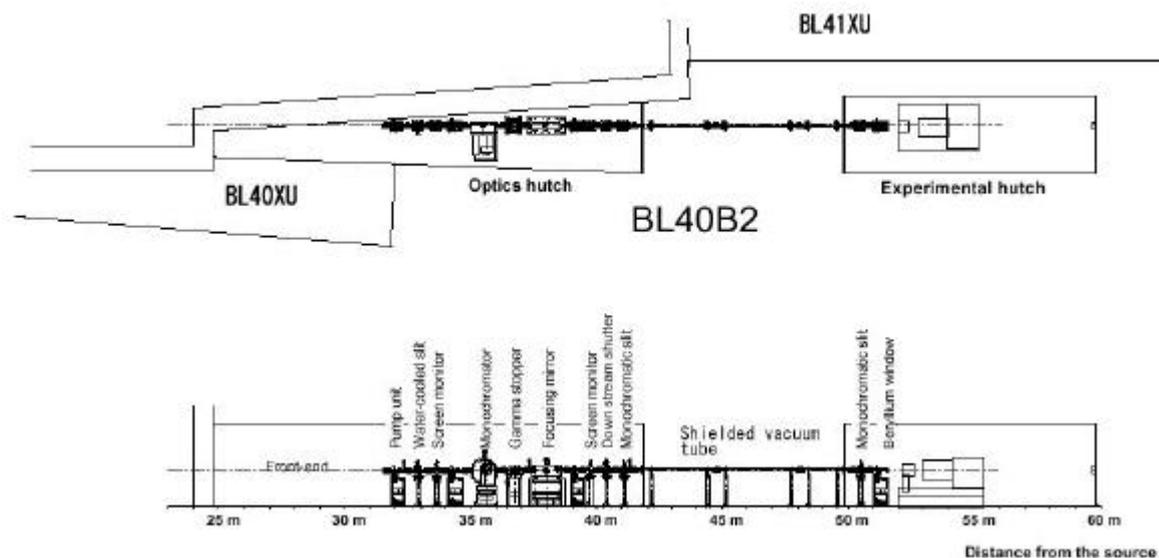
SPring-8/JASRI 利用研究促進部門 II 井上勝晶

1) はじめに

X線溶液散乱法は、溶液中における蛋白質分子の構造を調べるために非常に有効な手法である。この方法は、蛋白質分子が溶液中で実際に機能を発現している状態で測定が可能のため、蛋白質分子の構造-機能相関を明らかにするためには欠かせない手法である。また、未知の蛋白質分子については、非常に時間のかかる結晶化の手間をかけることなく測定が可能のため、初期段階の構造予測にも非常に強力な手法になり得る。BL40B2 はたんぱく質の構造解析が比較的簡単に短時間に行えることをめざし、溶液散乱測定および結晶構造解析の二種類の測定ができるように設計、建設されたビームラインである。特に溶液散乱測定については、光学系の改良や検出効率の高い二次元検出器を用いることにより、これまでになく精度の高い散乱データの収集が可能になってきている。本実習ではたんぱく質の溶液散乱測定を通して、溶液散乱のデータがいかなるもので、どのように解析し、そこから何がわかるのかということを経験するだけでなく、この手法を用いていかに意義のある研究を進めることができるのか考察していく。

2) BL40B2 について

BL40B2 の模式図を以下に示す。



前述したように BL40B2 は汎用小角散乱実験および蛋白質結晶解析実験を行う構造生物学ビームライン II として立ち上げられた。光源である偏向電磁石で発生する放射光は、水冷式第一スリットで高さおよびサイズを調整され SPring-8 標準二結晶分光器により単色化される。分光器では実験に使用するエネルギー領域 (7 ~ 18 keV) を考慮して Si(111)面を用いている。単色化された X 線は、石英を母材としロジウムコートされた 1m のシリンダー型ミラーにより集光され、スリットで整形された後実験ハッチに導入される。実験ハッチ内の試料位置では下記のようなパラメータを持つ X 線が使用できる。

- ・波長 : 0.73 ~ 1.5 で連続的に可変
- ・フォトン数 : $\sim 10^{10}$ photons/sec
- ・ビームサイズ : $150 \mu \times 250 \mu$ (FWHM)

溶液散乱測定で重要なことは広い角度領域の測定が行える光学系（検出器まで含む）を構築することにある。たんぱく質溶液からの散乱はダイレクトビームのごく近傍（いわゆる小角領域）から、ごく弱い強度（小角領域の 1/100 から 1/1000）でしか観測されない広角領域までにわたり、これらを総合的に解析することでより精密な構造解析が可能になる。このような精密な測定を可能にするため、BL40B2 にはいくつかのスリットが設置されており、さらに溶液散乱測定の際にはこれらのスリット系に加えて円形のコリメータを導入することで寄生散乱を除去し、ダイレクトビームのより近傍までの散乱測定を可能にしている。これに対して広角領域の測定は受光面積の広い（30cm × 30cm）二次

元検出器（イメージングプレート）を用いることで精度の高い測定を実現している。

実験ハッチ内の装置構成を下の写真で示す。



(カメラ長 : 1m)

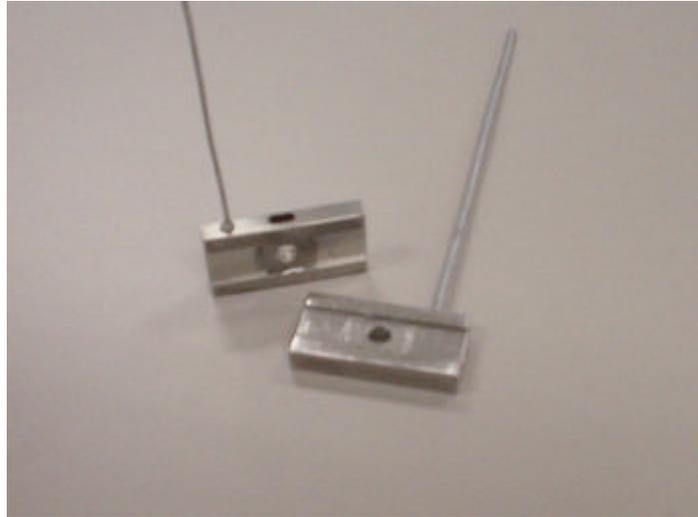


(カメラ長 : 40cm)

試料から検出器までの距離を”カメラ長”と言う。写真左はカメラ長 1m の、写真右はカメラ長 40cm のセットアップをそれぞれ写したものである。散乱曲線は試料に含まれる分子の大きさに依存して大きく変化する。つまり大きな分子からの散乱はより小角領域で観測され、小さい分子になるほど散乱曲線は広角に広がって観測される。また試料に入射する X 線の波長によっても散乱角は変化する。すなわち、長い波長の X 線を入射すると散乱角は大きくなり、短い波長になるほど散乱角は小さくなる。これらのことより溶液散乱測定では、試料に含まれる分子の大きさに合わせてカメラ長および X 線の波長を適当なものを選択して組み合わせ、最も観測したい角度領域を選択して測定を行う。このとき、写真でもわかるように試料と検出器の間には、試料からの散乱強度が減衰するのを防ぐため、真空パスを設置する。BL40B2 には 1m と 40cm の二種類の真空パスがあり、カメラ長はこの二つの距離から選択する。また分光器によって単色化され実験に使われる X 線の波長は 0.73 から 1.5 の間で連続的に可変である。要するにカメラ長 1m で波長 1.5 の条件が、最も小角領域の測定ができる（しかし、広角領域の測定はできない）セットアップで、逆にカメラ長 40cm で波長 0.73 の条件にすると最も広角領域まで測定できる（しかし小角領域は測定できない）セットアップとなる。

次に試料セルについて述べる。溶液散乱の測定では、試料の形態は”溶液である”ということだけが共通しており、測定条件など非常にバリエーションに富む。そのため、試料を保持する試料セルはサンプルによってさまざまに工夫を凝らす必要がある。逆に言うと、試料セルを工夫してきちんと作れば、いろいろな条件下での測定が可能になる。これは溶液散乱測定の特徴のひとつであり、生理条件下（つまり生体内に近い条件）から圧力変化、温度変化を試料に加える極限条件下での測定も可能である。また本実習では溶液状態の試料のみを扱うが、試料の形態にも制限はなく、繊維状のものあるいは固体状のもの、さらにはガラスのようなアモルファス状の試料の測定も可能である（このような場合も考えると、”溶液散乱”という言葉は一般的ではなく、本実習で行うような実験方法は”小角散乱測定”と言うほうがより一般的である）。BL40B2 でもさまざまな形態の試料についての散乱測定が行

われている。特にたんぱく質関係についていえば、そのほとんどは溶液状態での測定で、そのため試料セルは特別に作られたものが用意されている。BL40B2 で使われている溶液散乱用のセルを下の写真に示す。

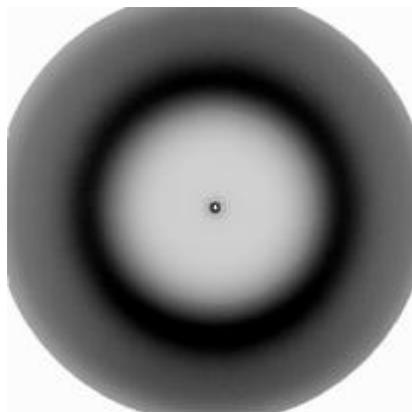


これらのセルはステンレス製、光路長 3mm で、直径 4mm のセルの窓には厚さ 20 ミクロンの石英が貼り付けてある。試料はセル上部にある穴からマイクロピペット等を用いて注入する。このセルを保持するセルホルダーは実験ハッチ内に設置してあり、そのセルホルダーに水を循環させることで試料の温度を変化させることができるようになっている。

3) 測定から解析までの流れ

下記に測定から解析までの流れを簡単に記す。

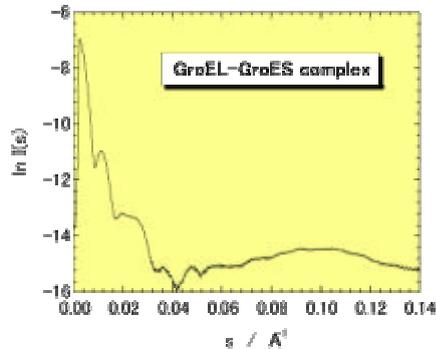
- ・ 試料の散乱測定



- ・ 溶媒の散乱測定

・ 散乱強度の円周積分

・ (試料の散乱強度) - (溶媒の散乱強度)



・ 慣性半径 (Rg) の算出 等

BL40B2 では二次元検出器を使っているので、測定される散乱はダイレクトビームを中心とした同心円として記録される。得られた散乱強度は円周積分することによって一次元化され、その後の解析を行う。観測された散乱曲線から ”曖昧さなしに” 得られる構造情報は溶液中の分子の慣性半径 Rg や体積といった量である。慣性半径は力学における慣性モーメントに対応する量で、重心に関する慣性距離で粒子の広がりをおおよそ尺度、もっと簡単に言うならば溶液中での分子の大きさを示す量である。慣性半径は ”ギニエプロット”($\ln\{I(s)\}$ vs s^2 プロット) において、直線の傾きから求めることができる。本実習ではこの流れに沿ってたんぱく質溶液の散乱測定から、慣性半径の算出までを行う。(操作手順の詳細は実習当日に説明する。)

得られたデータの解析で慣性半径の導出以外に最も重要なことは、分子モデルシミュレーションから理論的な散乱曲線を計算し、実験から求めた散乱曲線との一致を見て、分子構造を明らかにすることである。このような構造解析では溶液中における分子のドメイン構造の変化といったレベルまでの解析は可能である。しかし、原子レベルといった高い分解能での解析は直接できない。これはこの測定法の限界に起因するためであり、より精密な構造解析を行うためには結晶構造解析あるいは NMR といった解析法から得られた原子座標データを利用し、互いに相補的な実験方法という立場で研究を進めていくことが必要である。