

応用講座 4 溶液散乱

理化学研究所・播磨研究所・構造生物化学研究室 藤澤哲郎

1. 小角散乱とは

X線が非結晶質の物体に照射されると、物体の内部構造、すなわち電子密度の空間分布を反映した散乱現象が起こる。蛋白質、核酸、脂質などの生体分子からの散乱の場合、1nm から 100nm に相当する小さな散乱角領域に特徴的な散乱が見受けられる。小角散乱とはこのような散乱角が 10 度以下の回折・散乱を総称しており、その内訳は大きく分けて入射光に対して円対称な溶液からの散乱、粉末回折のような膜系からの散乱、そして配向したゲルや筋肉ファイバーからの回折の 3 種に大別される。

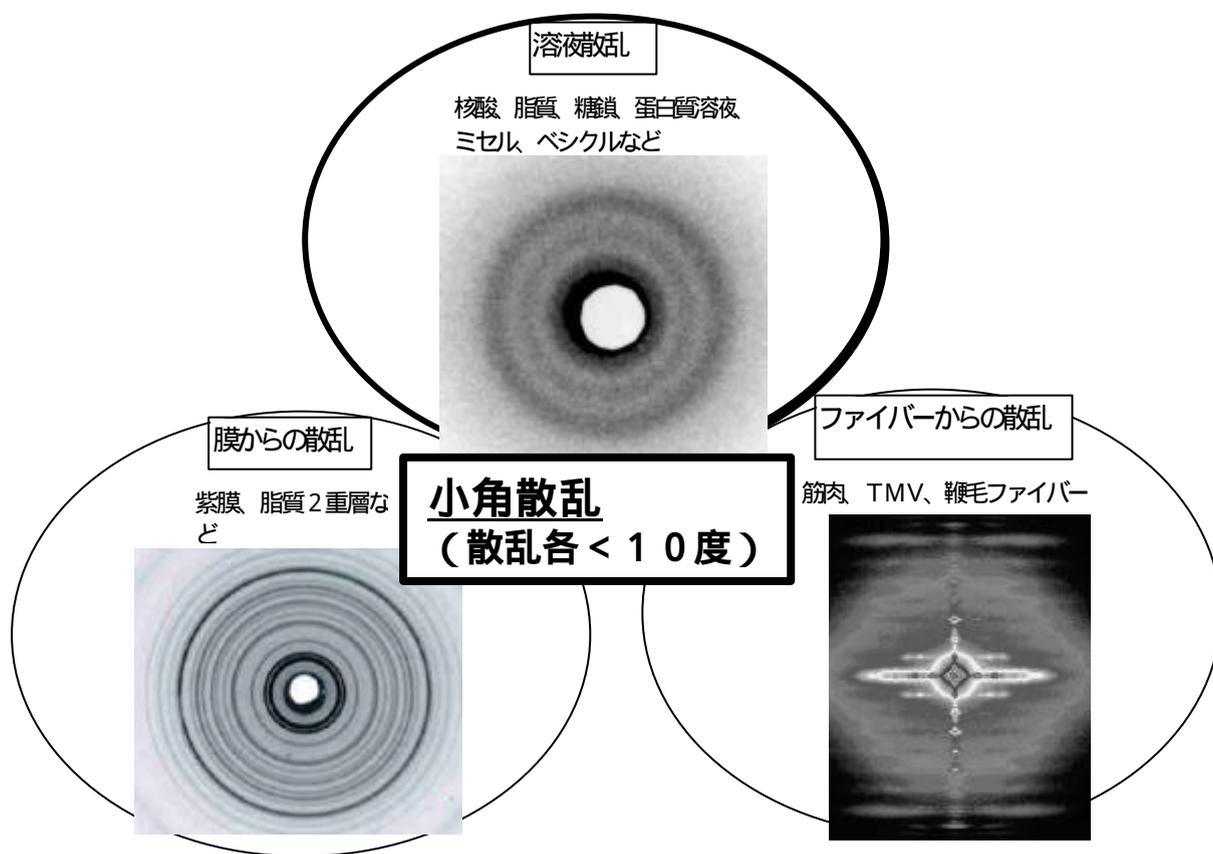


図 1. 様々な小角散乱の例

2. 散乱強度

蛋白質（あるいは核酸）溶液は水に対して電子密度が高いので蛋白質溶液の散乱から水の溶液散乱を

引くと蛋白質の内部構造だけからの散乱を計測する事ができる。溶液散乱の場合蛋白質は溶液中で360度等方的に動くので散乱は入射強度に対し同心円状となる。図2は散乱現象の原理を示した図となる。今1個の物体からの散乱を考える。A点で散乱されたX線と原点O点で散乱されたX線が散乱角 2θ の方向でどのように強めあうかは光路長の差と波長の関係により決まる。入射ベクトルを S_0 、散乱角 2θ 方向のベクトルを S_1 とすると光路長の差は $r \cdot S_1 - r \cdot S_0$ である。弾性散乱の場合波長は変わらないので $|S_0| = |S_1| = \frac{1}{\lambda}$ 、 $S = S_1 - S_0$ 、 $S = |S| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}$ と散乱ベクトルを定義すると、2つの波の位相差は $\exp(2i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S})$ となる。

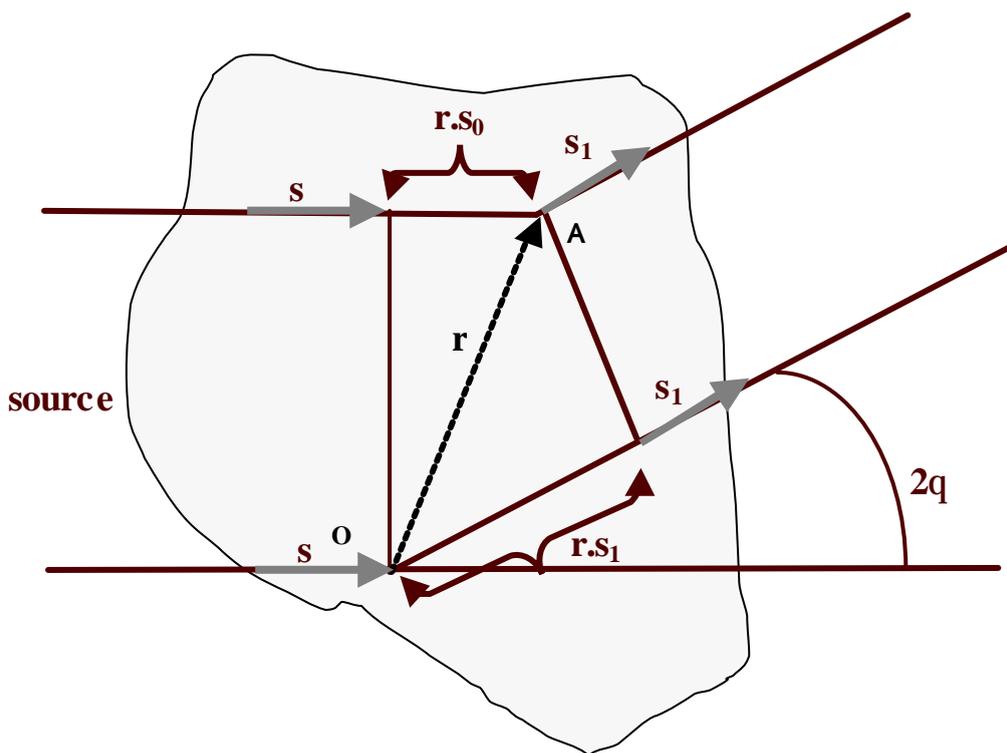


図2 . 散乱模式図

物体内 r 点での水の電子密度より電子密度差 $\Delta\rho(r)$ を持つ物体 1 個からの散乱振幅 $F_1(S)$ は、

$$F_1(S) = \int_{V_r} \Delta\rho(r) e^{2i\mathbf{r} \cdot \mathbf{S}} dVr \quad \text{となる。すなわち、散乱振幅は電子密度のフーリエ変換であると言える。}$$

溶液中では入射 X 線に対し任意の方向を取るのて散乱は等方的となり散乱関数を球平均された強度 $i_1(S)$ しか観測できない。

$$i_1(S) = \langle i_1(S) \rangle_{Time} = \langle F_1(S) \cdot F_1^*(S) \rangle \quad \text{また、N 個の物体からの散乱も}$$

$$I(S) = \langle I(S) \rangle_{Ensemble} = \langle F(S) \cdot F^*(S) \rangle_{Ensemble} \quad \text{となり、粒子間の相互作用が無い理想的な単分散系}$$

の場合には、エルゴード仮説により N 個の蛋白質からの散乱は単純に 1 個の蛋白質の空間平均された散乱強度の N 倍となる。 $I(S) = Ni_1(S)$

3 . 実空間と逆空間

前述の 1 個の散乱強度 $i_1(S)$ において、A のフーリエ変換 $FT(A)$ と B のフーリエ変換 $FT(B)$ の積 $FT(A) \cdot FT(B)$ は A と B のコンボリューション $A * B$ のフーリエ変換 $FT(A * B)$ と等しい事から

$$i_1(S) = \langle FT[\Delta\mathbf{r}(r)]FT[\Delta\mathbf{r}(-r)] \rangle = \langle FT[\Delta\mathbf{r}(r)\Delta\mathbf{r}(-r)] \rangle \quad \text{ここで自己相関関数 } (r)$$

$$\mathbf{g}(r) = \Delta\mathbf{r}(r) * \Delta\mathbf{r}(-r) = \int \Delta\mathbf{r}(r+u) * \Delta\mathbf{r}(u) dVu \quad \text{を導入すると}$$

$$i_1(S) = \langle FT[\mathbf{g}(r)] \rangle = \langle \int_{Vr} \mathbf{g}(r) e^{2iprS} dVr \rangle$$

$$i_1(S) = 4p \int_0^\infty r^2 \mathbf{g}(r) \frac{\sin(2prS)}{2prS} dr = 4p \int_0^\infty p(r) \frac{\sin(2prS)}{2prS} dr \quad P(r) \text{関数を動径分布関数という。}$$

上記の式を対称な形式で書くと

$$si_1(S) = 2 \int_0^\infty r \mathbf{g}(r) \sin(2prs) dr$$

$$r \mathbf{g}(r) = \frac{1}{p} \int_0^\infty si_1(S) \sin(2prs) dS$$

という関係になる。つまり、動径分布関数はモデルによらず実験データから直接求めることができるが、我々の知りたい実空間での (r) の情報は溶液散乱では直接求める事ができず、 (r) を仮定し散乱強度に対してフィッティングをする事により形を決めていく事になる。最近では非常に良いプロ

グラムがでまわっているが、どういう仮定の基で計算を行い、どのような特性があるか充分理解しておくことがひつようであろう。また、実験的な制約として観測できる散乱曲線は0からの散乱角ではなく有限の角度であるということも動径分布関数の計算の際に留意する必要がある。

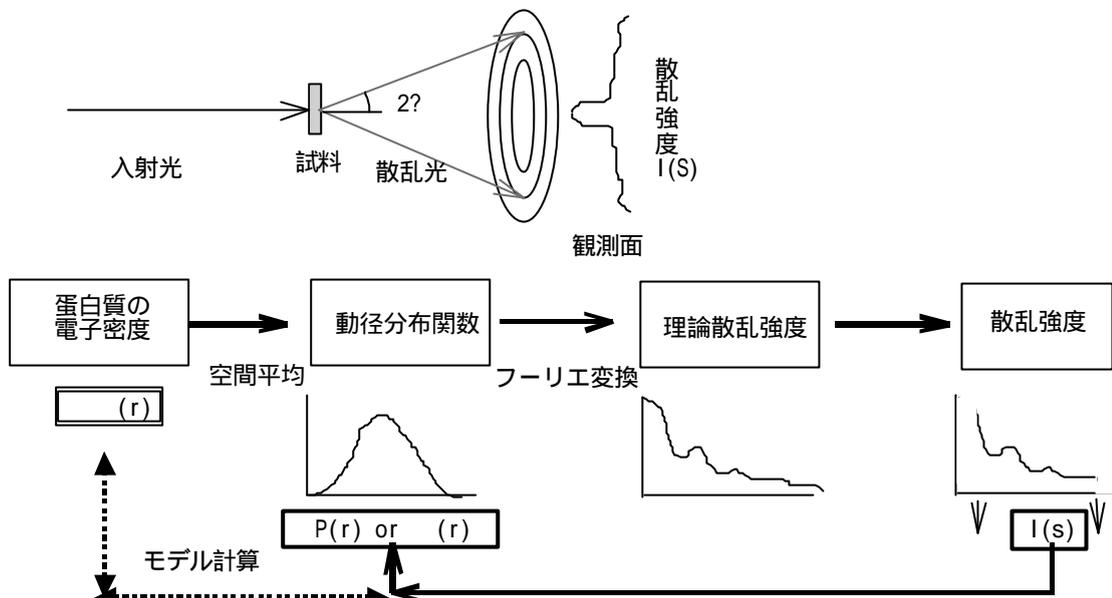


図3 . 溶液散乱における実空間と逆空間の関係

4 . Debye の式

1 個の蛋白質の散乱を構成する原子の散乱の総和と考えると

$$i_1(S) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i(S) f_j(S) e^{2ip(r-r_j)S}$$

$f_i(S)$ は i 番目の原子の原子散乱因子で空間平均された散乱強度は Debye により

$$f_i(S) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i(S) f_j(S) \frac{\sin(2pr_{ij}S)}{2pr_{ij}S} \quad \text{ここで } r_{ij} = |r_i - r_j| \quad \text{である。}$$

上の式を Debye の式と呼びモデル計算で多く使われている。離散的な原子ではなく連続的な電子密度を考えると上式は

$$i_1(S) = \int_{V_1} \int_{V_2} \Delta r(r_1) \Delta r(r_2) \frac{\sin(2pr_{12}S)}{2pr_{12}S} dV_1 dV_2 \quad \text{とも表現できる。}$$

4 . 原点での強度 $I(0)$

上の式において $S=0$ すなわち散乱角 0 の原点での散乱強度は

$$i_1(0) = \int \int_{VrVr'} \Delta \mathbf{r}(r) \Delta \mathbf{r}(r') dVr dVr'$$

すなわち水の電子密度より高い蛋白質電子数の総和であるから

$$i_1(0) = \Delta m^2 = (m - m_0)^2 = \left[\frac{M}{N_A} \mathbf{n}_p(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) \right]^2$$

ここで m, m_0 は 1 個の蛋白質体積内の蛋白質の電子数と水の電子数、 M, ρ_p はそれぞれ蛋白質の分子量と偏比容、 ρ_0 は蛋白質と水の電子密度である。

照射体積 V ml 中に N 個蛋白質が存在する系からの散乱では、蛋白質濃度 $c = \frac{NM}{N_A V}$ 単位は mg/ml

を使って

$$I(0) = N i_1(0) = \frac{cMV}{N_A} [\mathbf{n}_p(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)]^2$$

偏比容、蛋白質の電子密度が似通った分子量の違う蛋白質の原点散乱強度 $I(0)/C$ を比較すればそれが分子量に比例する事がわかる。実際の実験にはこのことを使い溶液中の分子量を推定する事をしばしば行い、重要なパラメーターである。

5 . ギニエ近似

$$I(S) = 4p \int_0^\infty p(r) \frac{\sin(2prS)}{2prS} dr$$

という式において散乱角が小さな領域 $S \sim 0$ の領域を考える。

$$\frac{\sin(2prS)}{2prS} = 1 - \frac{(2prS)^2}{3!} + \frac{(2prS)^4}{5!} \quad \text{というふうに Taylor 展開する事ができるので}$$

$I(S) \cong I(0)[1 - kS^2] \cong I(0)e^{-kS^2}$ という近似が成立する。ここで

$$I(0) = 4p \int_0^\infty P(r) dr \quad k = \frac{4p^2 \int_0^\infty r^2 P(r) dr}{6 \int_0^\infty P(r) dr} \quad \text{である。つまりどのような形の蛋白質の散乱であ}$$

れ、その散乱曲線は小角領域においてガウス曲線の形をしている。この Taylor 展開を Debye の式に行くと

$$I(S) = \int_{Vr_1} \int_{Vr_2} \Delta \mathbf{r}(r_1) \Delta \mathbf{r}(r_2) \frac{\sin(2\mathbf{p}r_{12}S)}{2\mathbf{p}r_{12}S} dVr_1 dVr_2$$

$$I(S) = \int_{Vr_1} \int_{Vr_2} \Delta \mathbf{r}(r_1) \Delta \mathbf{r}(r_2) dVr_1 dVr_2 - \frac{4\mathbf{p}^2 S^2}{6} \int_{Vr_1} \int_{Vr_2} \Delta \mathbf{r}(r_1) \Delta \mathbf{r}(r_2) |r_1 - r_2|^2 dVr_1 dVr_2$$

$$k = \frac{4\mathbf{p}^2}{6} \frac{\int_{Vr_1} \int_{Vr_2} \Delta \mathbf{r}(r_1) \Delta \mathbf{r}(r_2) |r_1 - r_2|^2 dVr_1 dVr_2}{\int_{Vr_1} \int_{Vr_2} \Delta \mathbf{r}(r_1) \Delta \mathbf{r}(r_2) dVr_1 dVr_2}$$

座標を変換して r_0 を重心とすると

$$k = \frac{4\mathbf{p}^2}{6} \frac{2 \int_{Vr} \Delta \mathbf{r}(r) r^2 dVr}{\int_{Vr} \Delta \mathbf{r}(r) dVr} = \frac{4\mathbf{p}^3}{3} Rg^2 \quad \text{となり、最終的に}$$

ギニエの法則 $I(S) \cong I(0) \exp\left[-\frac{4\mathbf{p}^2}{3} Rg^2 S^2\right]$

を得る。ここで回転半径 Rg は電子密度の 2 次モーメントである。

$$Rg^2 = \frac{\int_{Vr} \Delta \mathbf{r}(r) r^2 dVr}{\int_{Vr} \Delta \mathbf{r}(r) dVr}$$

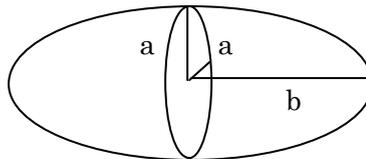
Rg は蛋白質の形状を示す重要な指標で、同じ分子量でも蛋白質の形が球からずればずれるほど大きくなる、球からのずれの指標であることがわかる。ちなみに体積一定の際最も小さな Rg を与える形が球で、球の半径 R とは

$$Rg = \sqrt{\frac{3}{5}} R \quad \text{という関係が成り立つ。}$$

回転楕円体の時には

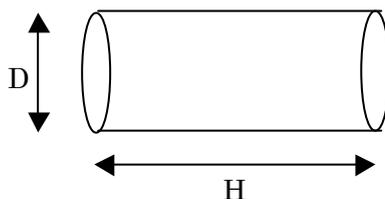
$$Rg = \sqrt{\frac{2a^2 + b^2}{5}}$$

円柱の時には



$$R_g = \sqrt{\frac{D^2}{8} + \frac{H^2}{12}}$$

となる。



6. ギニエプロットの実際

ギニエの法則において両辺の対数をとると

$$\ln[I(S)] = \ln[I(0)] - \frac{4p^2}{3} R_g^2 S^2$$

となり、横軸に S^2 縦軸に $\ln[I(S)]$ をとると直線領域が存在し、その傾きから回転半径 R_g がその Y-切片から $I(0)$ が求められる。 S^2 vs. $\ln[I(S)]$ プロットを特にギニエプロットという。

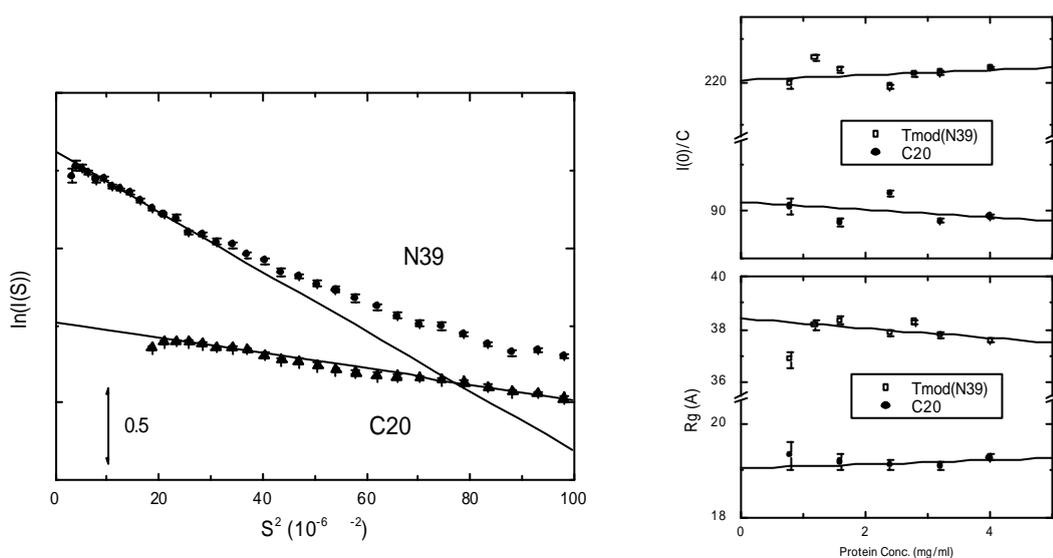
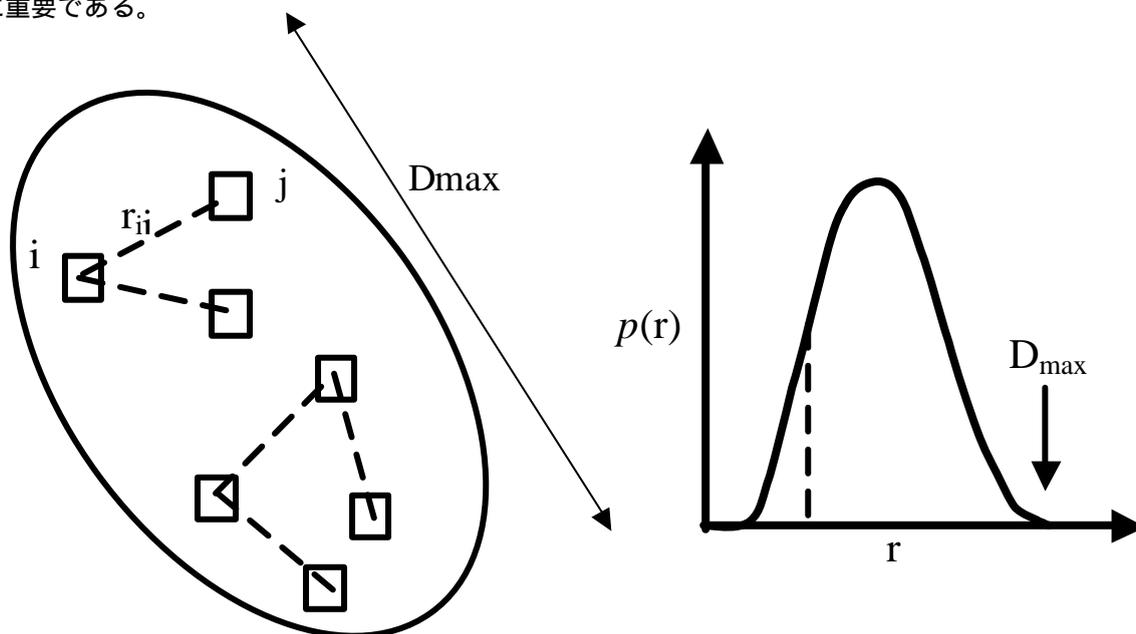


図4. トロポモジュリンとの分子断片のギニエプロット

上図はトロポモジュリンという 39kDa の長細いたんぱく質 (N39) とその 20kDa の C 端断片 (C20) のギニエプロットである。N39 の方が分子量が大きいので傾きが大きく、C20 の方が小さい。非常に小さな S で散乱点がないのは通常の実験では直接光はビームストップにより遮られ、原点散乱強度は観測できないからである。Y-切片も C20 のそれが N39 より小さい。直線領域、あるいはギニエ領域は定義より $0 < 2 R_g S < 1.0$ であるが通常 1.3 までの S 領域で R_g を決定する。

7. 動径分布関数 $P(r)$

溶液散乱の実験において R_g と $I(0)$ が最も信頼できるパラメーターであるが、動径分布関数 $P(r)$ も非常に重要である。



$P(r)$ 関数は蛋白質内の i 点と j 点の間の距離 r_{ij} のペアがどれだけ分布しているかを表すため距離分布関数とも言われる。 $P(r)$ 関数は0になる点が蛋白質粒子の最大長を示し D_{max} という。

参考文献

小角散乱の論文は *Journal of Applied Crystallography* や *Biochemistry*, *Journal of Molecular Biology* によく見られます。

1. Small Angle Scattering of X-rays: A. Guinier and A. Fournet, (1955), in English, ed. Wiley, NY (絶版)
2. Small-Angle X-ray Scattering: O. Glatter and O. Kratky (1982), Academic Press. (絶版)
3. Structure Analysis by Small Angle X-ray and Neutron Scattering: L.A. Feigin and D.I. Svergun (1987), Plenum Press. (品切れ)
4. Neutron, Xray and Light scattering: Introduction to an investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems P. Lindner and Th. Zemb (ed.), (1991), North-Holland