解説

X線小角散乱でタンパク質の内部構造を探る

東北大学理学部物理学教室 片岡 幹雄

The radius of gyration, which is the most important structural parameter obtainable by small-angle X-ray scattering (SAXS), comprises the information of the inner structure of protein in solution as well as the bulk structure. The rough distribution of electron density is revealed by contrast variation measurement. Heavy atom labeling with contrast variation reveals the number of heavy atoms binding to the protein and the distribution of heavy atoms in the protein. In the case of the oligomeric protein, other than the radius of gyration of the whole molecule, the radius of gyration of a subunit and the distance between subunits are obtainable by SAXS. Some examples are also summarized.

small-angle X-ray scattering / synchrotron radiation / contrast variation / heavy atom labeling / bacteriorhodopsin / troponin C

§1. まえおき

X線小角散乱法は、散乱角の小さな領域の散乱X線強度分布から構造情報を抽出する方法である。構造研究の手段としては古典的な方法で、優れた成書^{11,21}が出版されているし、本誌にも初期の頃に既に解説³¹がなされている。X線小角散乱から得られる情報は、対象を溶液中のタンパク質に限れば、慣性半径、体積、分子量等であるが、X線結晶構造解析に比べてその情報量は遙かに乏しいことは否めない。しかし溶液中の分子の構造の概略が得られるという長所を持っている。

近年、シンクロトロン放射光の利用が可能になり^{41,51}、構造研究にとってX線小角散乱の需要は着実に増加している。それは、放射光実験施設への共同利用申請の増加を見てもわかる。特に、時分割測定が現実のものとなり、反応速度論的研究に新しい局面を開いたことが、X線小角散乱法の重要性を高める一因となっている^{41,51-111}。また、静的測定においても、溶媒条件を様々に変えて測定することが容易になった。しかし、これら実験面での進展が必ずしも解析面の進展をもたらしていないように思える。短時間で精度にの良いデータが得られるようになったことは、より密度の高い解析を要求するということのはずである。にもかかわらず、現状では情報量が乏しいということが不

当に強調され過ぎているように思う。

ここでは、古典的な解析より得られる慣性半径から、更にどのような構造情報を読み取れるか等について、最近の我々の研究結果を中心に解説する。前半で述べるコントラスト変調測定については、中性子の場合について矢吹による丁寧な解説¹²¹があるので参照して頂きたい。

§2. コントラスト変調^{13),14)}

溶質の電子密度分布 $\rho(\mathbf{r})$ は、平均電子密度と平均からのゆらぎ（内部構造）の2成分に分けて考えることができる。

$$\rho(\mathbf{r}) = \bar{\rho}\rho_c(\mathbf{r}) + \rho_f(\mathbf{r}) \quad (1)$$

ここで $\bar{\rho}$ は平均電子密度、 $\rho_f(\mathbf{r})$ は平均からのゆらぎを表す関数である。 $\rho_c(\mathbf{r})$ は溶質の形状を表す関数で、溶質内部で1、それ以外では0となる。

X線が観測するのは溶質と溶媒の電子密度の差である。

$$\rho_{\text{obs}}(\mathbf{r}) = (\bar{\rho} - \rho_{\text{sol}})\rho_c(\mathbf{r}) + \rho_f(\mathbf{r}) \quad (2)$$

ここで $\bar{\rho} - \rho_{\text{sol}} (= \Delta\rho)$ をコントラストと呼ぶ。溶媒の電子密度はショ糖を加えることによって変えることができる。即ち、コントラストを変えて測定することが可能となる（コントラスト変調測定）。

コントラストを用いると、慣性半径 R_g は次の様に書きあらわされる。

Information of Protein Inner Structure Derived by Small-angle X-ray Scattering

Mikio KATAOKA

Department of Physics, Faculty of Science,
Tohoku University

$$R_g^2 = R_c^2 + \frac{\alpha}{\Delta\rho} - \frac{\beta}{\Delta\rho^2} \quad (3)$$

ここで R_c は形状に由来する慣性半径, α はゆらぎの二次のモーメント, β はゆらぎのモーメントの2乗量である. α から定性的に次のような構造情報を読み取ることができる: $\alpha > 0$ の時は溶質の外側の方が電子密度が高く, $\alpha < 0$ の時は溶質の内側の方が電子密度が高い. β は0または正の値を取り, 0の場合は形状の中心と電子密度の重心が一致し, 0でなければ一致していないことを示す. このように慣性半径には内部構造の情報が含まれている. 様々なコントラストで得られた慣性半径の2乗を $1/\Delta\rho$ に対してプロットすれば, コントラスト無限大 ($1/\Delta\rho = 0$) の時の切片と接線の傾きから R_c と α が求まり, 曲率から β が求まる.

散乱強度関数はコントラストを用いて次のように書ける.

$$I(S) = \Delta\rho^2 I_c(S) + \Delta\rho I_{cf}(S) + I_f(S) \quad (4)$$

ここで $I_c(S)$ は形状のみに由来する項, $I_f(S)$ はゆらぎに由来する項, $I_{cf}(S)$ は両者の干渉による項である. この式は少なくとも3点のコントラストで散乱を観測すれば, 強度関数を構成する3成分が分離できることを示している. これはより高角のデータを用いるX線溶液散乱法にとって有力な解析手段である. 具体的な例は原論文を参照されたい^{3),5)}. ここでは原点散乱のみを考える. $S = 0$ では $I_{cf}(0) = I_f(0) = 0$ となる.

$$I(0) = \Delta\rho^2 I_c(0) \quad (5)$$

図1. コントラスト変調の原理. 溶質の電子密度分布は平均電子密度と平均からのゆらぎ(内部構造)によって表現される. コントラスト $\Delta\rho$ は平均電子密度 $\bar{\rho}$ と溶媒の電子密度 ρ_{sol} の差として与えられる. ρ_{sol} が $\bar{\rho}$ を越えると負のコントラストとなる.

図2. コントラスト変調測定の実例(1): 平均電子密度の決定. □, ヘモグロビン¹⁵⁾, ○, 可溶性bR, ●, 可溶性ヨード化bR. 溶媒の電子密度はショ糖添加により変化させている. 負の値は負のコントラストを意味する.

(5)式より $I(0) = 0$ となる時が $\Delta\rho = 0$, 即ち溶媒の電子密度と溶質の平均電子密度が一致する点である. これより溶質の平均電子密度が求められる.

コントラスト変調測定の実例を示そう. 図2はヘモグロビン¹⁵⁾, 可溶性バクテリオロドプシン(以下bRと略)及び可溶性ヨード化bRについて, 原点散乱強度の平方根を溶媒の電子密度に対してプロットしたものである. これよりそれぞれの試料の平均電子密度が $0.398\text{e}/\text{\AA}^3$ (ヘモグロビン)¹⁵⁾, $0.358\text{e}/\text{\AA}^3$ (可溶性bR), $0.361\text{e}/\text{\AA}^3$ (可溶性ヨード化bR)と求まる. 可溶性ヨード化bRの平均電子密度が可溶性bRの値よりも高いのはヨード原子の結合によるもので, これについては後述する. bRもヘモグロビンも共に α ヘリックス含量の高いタンパク質である. にもかかわらず, 可溶性bRの平均電子密度がヘモグロビンより遙かに小さいことは, 界面活性剤(今の場合(TRITON X-100)が大量に結合していることを物語っている. TRITON X-100の平均電子密度は $0.350\text{e}/\text{\AA}^3$ であった.

図3は可溶性bR及び可溶性ヨード化bRについて, (3)式に基づくプロットを示している.

3図から構造パラメータが表1のように求められた.

表1 コントラスト変調測定により求められた可溶性bRについての構造パラメータ

	可溶性bR	可溶性ヨード化bR
R_c (Å)	36.7 ± 0.6	37.3 ± 0.4
α (e/Å)	0.5 ± 0.3	1.4 ± 0.4
β (e ² /Å ⁴)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01

図3. コントラスト変調測定の例(2): 慣性半径のコントラスト依存性。○, 可溶性bR, ●, 可溶性ヨード化bR.

可溶性bRについて考えてみよう。界面活性剤は、タンパク質を取り囲むように結合しているであろうから、 α は大きな負の値をとることが期待された。ところが実際は0に近い。これはbRが三量体様構造をとったまま可溶性化されていることを強く示唆する。モデル計算によれば、単量体を界面活性剤が取り囲む時 α は-9にもなるが、三量体の時は-1程度である。 β が0でないことは、界面活性剤の結合が非対称であることを示唆している。

§3. コントラスト変調と重原子修飾

タンパク質のX線結晶構造解析にとって重原子置換体は、位相の決定のために重要な意味を持っている。溶液散乱法においても、重原子修飾により特定のアミノ酸残基間の距離が求められる等、重原子修飾の有効性が示されている¹¹⁾。では、小角散乱領域では重原子修飾はどのような構造情報を与えてくれるであろうか。

(1)式で与えられる電子密度分布は重原子修飾により

次のようになる。

$$\rho(r) = \bar{\rho}_c(r) + \rho_t(r) + \rho_h(r) \quad (6)$$

$\rho_h(r)$ が重原子による付加項である。(6)式は次のように書き換えられる。

$$\rho(r) = \bar{\rho}' \rho_c(r) + \rho_t'(r) \quad (7)$$

$\bar{\rho}'$ は重原子修飾体の平均電子密度である。この時溶質の形状は重原子の結合により変化しないとする。前章で述べたコントラスト変調測定により、 $\bar{\rho}'$ 及び重原子が結合した時の R_c , α , β が求められる。これらのパラメータから重原子の結合について次のような情報を得ることができる。

まず平均電子密度について考えてみよう。平均電子密度の変化分は重原子の結合によるものであるから、

$$\bar{\rho}' - \bar{\rho} = \frac{n\sigma_h}{V} \quad (8)$$

ここで n は結合した重原子の数、 σ_h は重原子1個の結合により増加する電子数、 V は溶質の体積である。 V は小角散乱によって求めることができるから(8)式によって重原子の結合数がわかる。この方法は、平均電子密度決定の実験誤差を越えて、平均電子密度の差が観測される場合に利用できる。特に、膜タンパク質の会合数の決定に有用であろう。

図2によれば、可溶性bRと可溶性ヨード化bRとでは平均電子密度に明らかに差が見られる。可溶性bRの体積は形状由来の散乱関数から $3.4 \times 10^5 \text{ Å}^3$ と求まった。ヨードは水素と置換しているの、電子数の正味の増加分は52である。これより可溶性ヨード化bRに結合しているヨード原子の数は 20 ± 4 と計算される。ヨード化はbR1分子について6~7原子のヨードが結合する条件^{16), 17)}で行われている。従って、可溶性ヨード化bR、即ち可溶性bRにはbRの三量体が含まれていると考えられる。この結論は、コントラスト変調測定で得られた α の値からの推定を支持するものである。

次に R_c , α , β について見てみよう。分子の形状が重原子の結合により変化しないという仮定は、 R_c によって妥当性が調べられる。 R_c が変化しなければ形状は変化しない、即ち重原子の結合により大きな構造変化はしないということを示す。この同型性についての判定は形状由来の散乱関数によっても可能である。 α , β は共に重原子の分布についての情報を担う。

α は重原子の結合によって増加する。但し、 α の変化は平均電子密度の変化とも関係しているため、一般的な結論は導き出せない。 α の定量的評価は今後の課題である。一方、 β については、重原子の結合により変化しなければ重原子は対称的に分布し、変化すれば重原子は局在して結合している、という定性的な知見を得ることができる。

可溶性 bR の場合、Rc はヨードの結合によって大きく変化することはなく、実験誤差範囲内で一致していることがわかる。形状由来の散乱関数からも構造変化が起きていないことが確認された。 β が変化していないから、ヨードは bR の表面で対称的に分布していると推定される。即ち、紫膜状態では膜の両側で均等にヨード化されると考えられる。 α の値の変化から、三量体の外側がよりヨード化されているらしいことが示唆された。

このように小角散乱についても重原子修飾は有用な構造情報を与える。

§4. サブユニットからなる系

ヘモグロビンやトロポニン C のようにはっきり区別できるサブユニット（或いはドメイン）からなるタンパク質は多い。このようなタンパク質の小角散乱はどうなるであろうか。

以下の議論ではサブユニットは同一であり、球対称の電子密度分布を持つとしよう。この仮定は、多くの場合、小角散乱領域では悪い近似ではない。このような場合、強度分布は次のように表される。

$$I(S) = |f(S)|^2 \cdot \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{\sin 2\pi d_{ij} S}{2\pi d_{ij} S} \quad (9)$$

ここで $f(S)$ はサブユニットの散乱因子、 d_{ij} はサブユニットの重心間の距離、 N はサブユニットの数である。第二項は干渉関数と呼ばれる。この関数は S が大きくなると一定値 (N) に収束する。この領域では

$$I(S) \propto |f(S)|^2 \quad (10)$$

となる。この時サブユニットの大きさに対してはまだ小角とみなせるならば、この領域でもギニエ近似^{17,21)}が成立することになる。それ故、ギニエプロットは2本の直線領域を持ち、小角側の直線領域からは通常の（分子全体の）慣性半径が、外側の領域からサブユニットの慣性半径が得られることになる。

図4にトロポニン C の例を示す¹⁸⁾。トロポニン C は亜鈴型の構造をしている¹⁹⁾。図4は明らかに2本の

図4. トロポニン C の小角散乱のギニエプロット¹⁸⁾。上は Ca 非結合状態、下は 4 原子の Ca が結合している状態。

直線で近似できる。これよりトロポニン C について Ca 非結合の時、分子の慣性半径 $20.4\text{\AA}$ 、ドメインの慣性半径 $13\text{\AA}$ と求められる¹⁸⁾。

サブユニット間の距離が一つしかない系（二量体、三量体、正四面体の頂点にサブユニットが位置するような四量体）については、分子の慣性半径、サブユニットの慣性半径、サブユニット間の距離 d の間に次のような関係が成立つ¹⁸⁾。

$$\begin{aligned} R_{g(f)}^2 &= R_{g(\text{サブユニット})}^2 + \frac{d^2}{4} & (\text{二量体}) \\ R_{g(f)}^2 &= R_{g(\text{サブユニット})}^2 + \frac{d^2}{3} & (\text{三量体}) \\ R_{g(f)}^2 &= R_{g(\text{サブユニット})}^2 + \frac{3d^2}{8} & (\text{四量体}) \end{aligned} \quad (11)$$

ヘモグロビンの慣性半径はオキシ型で $24.7\text{\AA}$ 、デオキシ型で $26.2\text{\AA}$ である²⁰⁾。サブユニットの慣性半径としてミオグロビンの値 $15.5\text{\AA}$ ¹³⁾ を用いると、サブユニット間の距離はオキシ型で $31.4\text{\AA}$ 、デオキシ型で $34.5\text{\AA}$ と求まる。ヘモグロビンは各サブユニットが必ずしも正四面体の頂点に存在する訳ではないが、この値はかなりよく構造の特徴を表している。例えば、 β サブユニットのヘム鉄間の距離はオキシ型で $33.4\text{\AA}$ 、デオキシ型で $39.9\text{\AA}$ 、また最も接近したヘム鉄間の距離は $25\text{\AA}$ である。

トロポニンCのような亜鈴型構造に対しては、サブユニットの慣性半径をより正しく評価する方法が藤沢らによって考案された¹⁸⁾。この方法によるとトロポニンCのCa非結合時のサブユニットの慣性半径は15.6Åと求められた¹⁸⁾。これと分子の慣性半径から、サブユニット間の距離は26.3Åと求められる¹⁸⁾。結晶構造解析によれば、サブユニット間の距離は40Åである¹⁹⁾。この差はトロポニンC分子の慣性半径が顕著な濃度効果を示すため、濃度0への外挿値25Åを用いるとサブユニット間の距離は39Åとなり、結晶構造解析の結果とよい一致を示す¹⁸⁾。

ここで述べた方法は、構造が未知なタンパク質でも小角散乱から構造の第一近似として、サブユニットの慣性半径とサブユニット間の距離が求められることを示している。何らかの手段でサブユニット構造をもつことが知られている場合には有力な手法であろう。

§5. あとがき

X線小角散乱のデータから内部構造の情報を探る試みについて紹介した。より高角のデータまで用いて内部構造を解析する方法もいくつか考案されている^{11), 15)}。これらをも有効に用いることで溶液中のタンパク質の構造についての知見を深めたいものである。

現在、時分割測定は主に解離会合反応のように、慣性半径が大きく変化するような場合について行われている。コントラスト変調と時分割測定を併用すれば、内部構造についての情報も分離できるので、解離会合以外の様々な反応についても反応速度論的解析が、或いはより進んで動力学的解析が可能になるであろう。

ここで紹介した研究は、§2, §3については中迫雅由氏、徳永史生博士(東北大・理)、§4については藤沢哲郎氏、猪子洋二博士、植木龍夫博士(阪大・基礎工)との共同研究として行われました。ここに深く感謝致します。また実験は全て高エネルギー物理学研究所放射光実験施設において共同利用研究(課題番号86-028,85-037)として行ったものです。

かたおか みきお

1949年長崎県生。1974年京大理学部物理学科卒業後、阪大院・基礎工学研究科へ。1980年工博。OD生活の後1981年10月京大理学部物理学教室に助手として勤務、現在に至る。高校時代からオーケストラ活動に没頭し、他人より長く学生生活を送る。趣味は音楽だったが、オケを離れてから無趣味無教養となりつつある。3ヵ月毎の筑波通いが趣味のようなもの。

文 献

- 1) Guinier, A., Fournet, G. (1955) *Small-Angle Scattering of X-ray*, John-Wiley & Sons Inc., New York.
- 2) Glatter, O., Kratky, O. (1982) *Small-Angle X-ray Scattering*, Academic Press Inc., London.
- 3) 角戸正夫 (1968) 生物物理, 8, 72-80.
- 4) Stuhrmann, H. B. (1982) *Uses of Synchrotron Radiation in Biology*, Academic Press Inc., London.
- 5) SOR ワーキンググループ (1983) 生物物理, 23, 152-156.
- 6) Moody, M. F., Vachette, P., Foote, A. M., Tardieu, A., Koch, M. H. J., Bordas, J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4040-4043.
- 7) Mandelkow, E. -M., Harmsen, A., Mandelkow, E. L. (1980) *Nature*, 287, 595-599.
- 8) Inoko, Y., Kihara, H., Koch, M. H. J. (1983) *Biophys. Chem.*, 17, 171-174.
- 9) Ueki, T., Hiragi, Y., Kataoka, M., Inoko, Y., Amemiya, Y., Izumi, Y., Tagawa, H., Muroga, Y. (1985) *Biophys. Chem.*, 23, 115-124.
- 10) 木原裕 (1985) 蛋白質核酸酵素, 別冊28, 263-265.
- 11) 植木龍夫 (1986) 生体分子系を測る(生命科学の基礎, 5)(和田, 旅野編), 161-175, 学会出版センター, 東京.
- 12) 矢吹貞人 (1981) 生物物理, 21, 237-246.
- 13) Ibel, K., Stuhrmann, H. B. (1975) *J. Mol. Biol.*, 93, 255-265.
- 14) Stuhrmann, H. B. (1982) *Small-Angle X-ray Scattering* (Glatter, O., Kratky, O., eds.), 197-213, Academic Press Inc., London.
- 15) Ueki, T., Inoko, Y., Kataoka, M., Amemiya, Y., Hiragi, Y. (1986) *J. Biochem.*, 99, 1127-1136.
- 16) Scherrer, P., Packer, L., Seltzer, A. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.*, 212, 589-601.
- 17) Kataoka, M., Takeda, K., Morimoto, Y., Sato, N., Tanaka, N., Tokunaga, F. (1986) *Photobiochem. Photobiophys.*, 13, 187-196.
- 18) Fujizawa, T., Ueki, T., Inoko, Y., Kataoka, M. (1987) *J. Appl. Cryst.*, 20, 349-355.
- 19) Hertzberg, O., James, M. N. G. (1985) *Nature*, 313, 653-659.
- 20) Conrad, H., Mayer, A., Thomas, H. P., Vogel, H. (1969) *J. Mol. Biol.*, 41, 225-229.