(MS20) 躍動するシステムを 時間分解 X 線散乱・回折法で観る

副座長：名古屋大学大学院理学研究科 秋山修志

Shuji AKIYAMA: (MS20) Time Resolved and Coherent X-ray Scattering

いま、生命科学から物質材料にわたる広い分野で、X 線散乱・回折を用いたダイナミクス計測が注目されている。生命科学の分野では、生命体を構成する部品の振る舞いを生理的条件下で調べるための手法として利用されている。溶液中のタンパク質分子を例に挙げると、アミノ酸側鎖はピコ～ナノ秒の時間スケールで揺らぎ、ドメインはナノ～ミリ秒で剛体的に位置を変化させ、ポリペプチド鎖はマイクロ～ミリ秒で大規模に折り畳まれる。このような動的性質は生体分子の機能発現と密接に関連しており、実験と理論の両面からその重要性が指摘されつつある。躍動感溢れる生命現象を深く理解するためには、ダイナミクス計測—「構造変化の規模」と「それに要する時間」を計測し、両者の相関や階層性を解明すること—が必要不可欠である。

分子や集合体の動的側面は、物質材料の分野においても重要視されている。材料の評価・改良などが良い例であり、手元にある材料の物性がどのような構造的要因によって生み出されているか把握する必要がある（生命科学に置き換えれば、表現型と遺伝子・タンパク質変異の対応付け

に相当する）。このとき、分子や集合体の静的構造だけでなく、変形・光といった外的刺激への応答、熱的揺らぎ、といった動的様相を考慮しなければならない。すなわち、材料内の微視的な構造揺らぎを的確に捉え、それらを巨視的な物性（粘弾性など）と関連付ける必要がある。

分野を問わず、より短い時間スケール・より高い空間分解能で系を観察しようとする昨今の情勢は、躍動するシステムをより深く理解したいという研究者の願望の表れであろう。このような状況の下、座長である P. Thiyagarajan 博士 (Argonne National Laboratory, USA) とともに本シンポジウムを企画し、「サブミリ秒 X 線溶液散乱」、「時間分解・斜入射 X 線小角散乱」、「コヒーレント X 線を利用した X 線光子相関法」、「イメージング」の 4 つを主要テーマとして設定した。2007 年 5 月より講演者の選定を進め、海外から Stephan V. Roth 博士 (HASYLAB, Germany), Robert L. Leheny 博士 (Johns Hopkins U, USA), Qun Shen 博士 (CHESS, USA) の 3 名、そして国内より高橋聡博士 (大阪大学) と篠原佑也博士 (東京大学) に参加いただいた。シンポジウム全体として、生命科学から物質材料にわたる幅広い分野の時間分解計測をカバーする講演内容となった。シンポジウム当日は 50～70 名の参加者が集い、シンクロtron放射光を利用した最新の時間分解計測技術について活発な議論があった。

高橋博士および篠原博士には、ご多忙の中、講演内容についての解説記事を執筆いただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。次項以降に掲載されている解説記事を是非ともご一読いただき、本シンポジウムが目指したところ、そしてシンポジウム当日の雰囲気的一端を感じ取っていただければ幸いです。

X線小角散乱と一分子蛍光観察による タンパク質の折り畳みダイナミクスの観察 (MS20)

講演者：大阪大学蛋白質研究所 高橋 聡

Satoshi TAKAHASHI: Protein Folding Dynamics by Time-Resolved SAXS and Single Molecule Fluorescence Spectroscopy (MS20)

1. はじめに

タンパク質は、ひも状にゆらいだ変性状態から、アミノ酸の一次配列により規定される固有の三次元構造に折りたたむ能力をもつ高分子である。われわれは、タンパク質が折りたたむ過程で示す構造変化を観察することで、タンパク質の一次配列と三次元構造の関係を理解することを目指している。特に、X線小角散乱法と一分子蛍光追跡法を用いた観測に集中して取り組んできた。

約十年前にわれわれが研究を開始した当時、タンパク質の折り畳み運動の実時間観察は大変難しい課題だった。これは、タンパク質の折り畳みが短時間内に起こる構造変化であることと、溶液条件におけるタンパク質の構造解析が困難であることが主要因である。しかし、X線小角散乱法は、タンパク質のおおまかな構造情報を溶液条件で引き出すことができるほか、大型放射光施設におけるX線源と組み合わせることで、短時間内における良質のデータ収集も可能にする。これらの利点を活かしてタンパク質の折り畳み観察に応用するために、われわれは高速で溶液を混合するセルとSPRING-8のビームラインを組み合わせ、時分割X線小角散乱観察装置を開発した。¹⁾

開発した装置を用いて、二次構造含量が異なる3種類のタンパク質の折り畳みダイナミクスを観察した。すなわち、 α ヘリックス含量の多いシトクロムc¹⁾ (103残基)とアポミオグロビン²⁾ (153残基)、 β 構造を多く含む一本鎖モネリン³⁾ (94残基)を対象とした。その結果、これらのタンパク質に共通して、折り畳み開始後数百マイクロ秒以内に起こる主鎖の収縮と、その後数十ミリ秒から数秒の時間領域で起こる二次構造と三次構造の形成とが観察された。これらの運動が、二次構造含量の異なるタンパク質で共通に観察されたことは、運動の一般性を示唆している。

以上の観察を基に、われわれはタンパク質の一般的な折り畳み機構として「収縮と検索」機構を提案した。²⁾ この機構では、タンパク質は折り畳みの最初に収縮を示し、折り畳み中間体を形成する。形成された中間体は、収縮したまま最終的な折り畳み構造を探索する。提案した機構の一般性を確かめ、機構の成立要因を探るために、われわれはさらにX線小角散乱を用いた研究を進めた。

2. 初期収縮はタンパク質の高分子鎖としての性質を反映する

高分子の収縮に関する最も基礎的な理論は、フローリーの高分子理論である。この理論では、良溶媒中におけるホモポリマーはコイル状態と呼ばれる広がった構造をもつが、貧溶媒中においては、グロビュール状態と呼ばれるコンパクトな構造に転移する。この転移をコイル・グロビュール転移という。われわれは、タンパク質の初期収縮はコイル・グロビュール転移の性質をもつのではないかと考え、理論の予測を確認するための以下の観測を行った。

フローリーの理論によると、モノマー数 N の高分子鎖がコイル状態にあるとき、回転半径 R_g は $N^{3/5}$ に比例する。多くのタンパク質の変性した構造について、この比例関係が成立することが知られている。一方で、グロビュール状態における R_g は $N^{1/3}$ に比例するとされる。したがって、もし初期収縮運動がコイル状態からグロビュール状態への転移に対応するなら、初期収縮状態の R_g をさまざまな大きさのタンパク質についてプロットすると、 $N^{1/3}$ に比例することが期待される。

以上の考えに基づいて、アミノ酸残基数が267であるヘムオキシゲナーゼの折り畳み過程を観察した。⁴⁾ このタンパク質について初期収縮状態の R_g を決定しほかのタンパク質と比較したところ、 R_g が $N^{1/3}$ と比例関係をもつことが示された。一方で、 R_g と配列の疎水性度や二次構造形成能との間には相関がなかった。このように、得られたデータは、初期収縮状態が高分子鎖のグロビュール状態と近い性質をもつことを示している。

次に、アミノ酸残基数が106であるバルナーゼの折り畳み過程について、時分割X線小角散乱観測を行った。⁵⁾ バルナーゼは、折り畳み中間体をもつタンパク質のモデルとして数多くの研究がなされている。観測の結果、折り畳み中間体は収縮しておらず、 R_g は変性状態と近い値を示すことが判明した。この結果について、われわれは、アミノ酸残基数が比較的小さいタンパク質の場合、折り畳み初期にコイル・グロビュール転移が観察されないと解釈した。実際、ほかのグループからも、アミノ酸残基数が小さいタンパク質の場合には初期収縮が観察されないことが報告

されている。

以上の結果をまとめると、アミノ酸残基数が100以下のタンパク質の場合、折り畳み開始後もタンパク質主鎖の大規模な収縮は観察されない。一方で、100よりも大きいタンパク質の場合は、コイル・グロビュール転移と似た性質をもつ収縮運動が観察され、折り畳み中間体が形成される。100残基よりも大きいタンパク質と小さいタンパク質の違いは、コイル・グロビュール転移のアミノ酸残基数依存性で説明できる可能性がある。以上のように、折り畳みの初期に観察される収縮運動が、タンパク質の個別の性質ではなくアミノ酸残基数に強く依存する事実は、この運動がタンパク質の高分子鎖としての性質を反映して起こることを示している。

3. 一分子蛍光観察法を用いた折り畳み過程の追跡

X線小角散乱法をはじめとする実験手法は、試料に含まれる多数の分子の平均値として物理量を観測する。そのため、個々の分子が平均値からどの程度ずれた構造をもち、どの程度の速度で運動しているのかを観測することはできない。しかし、タンパク質の折り畳みとは、無数に存在する変性構造の中から唯一の折り畳み構造が選出される過程であり、分子ごとの構造や運動性の違いを捉えることは本質的な重要性をもっている。われわれは、蛍光分光法を用いてタンパク質を一分子レベルで追跡観察する装置の開発を行った。

一分子が発する蛍光を観察するために、いくつかの手法が提案されている。第一に、蛍光色素をラベルしたタンパク質を光学基板に固定し、全反射蛍光顕微鏡を用いて観察する手法が知られている。この手法は、S/N良く一分子蛍光を連続的に追跡できる利点をもつが、タンパク質の折り畳み転移に応用しようとする、光学基板と変性したタンパク質が相互作用してしまう欠点があった。第二に、共焦点顕微鏡を用いて顕微レンズの焦点を分子が流れる瞬間の蛍光を観察する手法も使われる。この手法の場合、基板に固定しない一分子の検出が可能だが、分子を連続観察することができない欠点をもっていた。

われわれは、これら二つの手法の欠点を補う手法の開発を行った。⁶⁾ われわれの手法は、蛍光色素をラベル化した試料を、低濃度でキャピラリーセルに流し、キャピラリーに同軸に導入したレーザー光で試料を励起することで、試料が蛍光を発しながら流れる様子をイメージングするものである。検出される信号は二次元検出器に輝線として記録されるため、輝線の強度変化は、一分子が発する蛍光強度の時間変化に対応する。

開発した手法を使って、酵母由来のシトクロム *c* のC末端付近に存在するシステインに蛍光色素 Alexa をラベル化した試料 (cyt *c*-Alexa) について、一分子観察を行った。シトクロム *c* はN末端付近に共有結合したヘムをもち、

Alexaの蛍光を消光する。したがって、cyt *c*-Alexaの蛍光強度を観察することで、ヘムとAlexaの間の距離を手がかりにした構造情報を得ることができる。

異なる変性剤濃度で cyt *c*-Alexa 一分子の蛍光を観測し、数多くの蛍光トレースを得た。これらを、信号強度を手がかりに、変性状態 (U 状態) と中間状態 (I 状態) の2つの状態に分類した。さらに、それぞれの状態ごとにトレースの自己相関関数を計算した。得られた結果は、I 状態の場合には自己相関関数が数ミリ秒以内に減衰したのに対し、U 状態の場合には自己相関関数が16 msの時定数で減衰することを示した。後者の時定数は、変性状態における試料のエネルギー曲面がでこぼこしており、変性タンパク質の構造変化がゆっくり起こることを示している。

以上のように、一分子蛍光観察装置を用いることで、タンパク質が変性状態で示す揺らぎ運動の検出が可能になった。開発した装置は、データのS/Nが十分ではなく、信号検出に多大な試行錯誤を要するなどの欠点をもっている。これらの欠点の改良が急務である。

4. 終わりに

われわれは「タンパク質の折り畳み過程を直接見ることを目標に、X線小角散乱法と一分子蛍光分光法を用いた研究を続けてきた。まず、時分割X線小角散乱法を用いることで、一般的な「収縮と探索」機構を提案した。さらに、タンパク質の収縮が高分子鎖の性質を反映して起こることを見出した。また、一分子蛍光検出法を用いることで、変性タンパク質には比較的遅い運動が含まれることを明らかにした。

今後の課題として、われわれが提案した「収縮と探索」機構の中で、最初の収縮相の分子機構の理解を深めることが挙げられる。これまでに比較的多くの情報が集められている探索相に比べ、収縮相がどの程度の時定数をもって起こるのかという基礎情報でさえも、コンセンサスが得られていない。実験の時間分解能や得られる情報の種類を増やすための装置開発と、さらなる研究の展開が必要である。

SPring-8におけるX線小角散乱実験を主導していただきました藤澤哲朗博士(岐阜大学)をはじめとして、多くの共同研究者の方々にお礼を申し上げます。

文 献

- 1) S. Akiyama, S. Takahashi, T. Kimura, K. Ishimori, I. Morishima, Y. Nishikawa and T. Fujisawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1329 (2002).
- 2) T. Uzawa, S. Akiyama, T. Kimura, S. Takahashi, K. Ishimori, I. Morishima and T. Fujisawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 1171 (2004).
- 3) T. Kimura, T. Uzawa, K. Ishimori, I. Morishima, S. Takahashi, T. Konno, S. Akiyama and T. Fujisawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 2748 (2005).
- 4) T. Uzawa, T. Kimura, K. Ishimori, I. Morishima, T. Matsui, M.

Ikeda-Saito, S. Takahashi, S. Akiyama and T. Fujisawa: *J. Mol. Biol.*, **357**, 997 (2006).

5) T. Konuma, Y. Goto, T. Fujisawa and S. Takahashi *et al.*: *manuscript*

in prep.

6) M. Kinoshita, K. Kamagata, A. Maeda, Y. Goto, T. Komatsuzaki and S. Takahashi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10453 (2007).

時間分割極小角 X 線散乱法と X 線光子相関法による ゴム中でのシリカ凝集構造とそのダイナミクスに関する研究 (MS20)

講演者：東京大学大学院新領域創成科学研究科 篠原佑也

Yuya SHINOHARA: Study of Silica Aggregate Structure and its Dynamics in Rubber Using Time-Resolved USAXS and XPCS (MS20)

1. はじめに

シリカやカーボンブラックなどのナノ粒子をゴムに充填すると、粘弾性特性や力学物性が向上する補強効果が発現することがおよそ百年前から知られている。この補強効果は例えばタイヤにおいては燃費やグリップ性能などの特性に重要な寄与をしているが、肝心の補強効果の機構は未解明な部分が多い。ナノ粒子はゴム中で数オングストロームから数百ミクロンに及ぶ階層的な凝集構造を形成することが電子顕微鏡観察などから示唆されているが、例えばゴムを大変形した際にそれらの階層的凝集構造がどのように変形するのか、あるいは動的な変形・外力を受けた際にそれらの構造がどのような時間スケールで応答するのか、といったことは電子顕微鏡観察で調べることは困難でありまったく明らかではなかった。

われわれはこれらの挙動を小角 X 線散乱の手法を用いて明らかにすることを試みている。ゴム中でのナノ粒子は階層的な構造を示すため従来の小角 X 線散乱法では小角分解能（どこまで小さな角度の散乱まで測定できるか＝どこまで大きな構造を測定できるか）が不足している。そこで新たに時間分割極小角 X 線散乱法 (2D-USAXS) を開発して、ゴム変形時のナノ粒子凝集構造変化を観察した。一方、ゴム中でのナノ粒子ダイナミクスに関しては、X 線領域の動的散乱法である X 線光子相関法 (XPCS) を用いて観察することに成功した。本発表では SPring-8 における 2D-USAXS と XPCS について説明するとともに、ナノ粒子充填ゴムへの応用で得られた結果について紹介する。

2. 実験手法について

2.1 時間分割極小角 X 線散乱法

実験は、SPring-8 の BL20XU および BL40B2 を組み合わせて実施している。¹⁾ 図 1 に示すとおり、一般に階層的な凝

図 1 ゴム中でナノ粒子が形成する階層構造と対応する散乱の模式図。(Typical information on hierarchical structure of nanoparticles in rubber obtained with X-ray scattering.)

集構造からの散乱強度を解析するためには、数桁に及ぶ構造スケールにわたる散乱強度を測定する必要がある。現在、一般的な小角散乱ビームラインで利用することのできる角度範囲は $q > 0.02 \text{ nm}^{-1}$ 程度であり、ゴム中でナノ粒子が形成する凝集構造に応用するには小角分解能が足りない。そこでわれわれは BL20XU を利用した時間分割二次元極小角散乱測定システムを構築した。試料をリング棟の第 1 ハッチに、検出器を医学利用棟の第 2 ハッチに設置することで、およそ 160 m もの長さの試料・検出器間距離を実現し、極小角の散乱像を測定することができる。スリット系などの最適化を実施することで、 $q > 0.0015 \text{ nm}^{-1}$ 程度の極小角 X 線散乱像を二次元測定することが可能になった。広角側の散乱に関しては 2 つのハッチをつないでいる真空パスの内径により制限されているので、 $q > 0.02 \text{ nm}^{-1}$ の

領域に関してはBL40B2での測定を実施した。それぞれのビームラインにおける測定を高精度化することで、強度にして6桁強、空間スケールにして3桁近い範囲の二次元散乱像を時間分割測定することが可能になった。

2.2 X線光子相関法

実験はSPRing-8のBL40XUを用いて実施している。²⁾ BL40XUはヘリカルアンジュレーターを光源としており、モノクロメーターなしで準単色のX線 ($\Delta E/E \sim 1\%$) を利用することができる。したがって通常のビームラインと比べて大強度なX線を用いることができ、数ミクロン径のピンホールを挿入するだけで容易に大強度なマイクロビームを生成することができる。BL40XUではピンホール位置でのX線の空間コヒーレント長が数 μm 程度あるため、3～5 μm 径のピンホール挿入により、XPCSを実施するのに必要な部分コヒーレントなX線を利用することができる。試料から3 m程度下流で、スペックル回折像を測定した。検出器としては像縮小をしないタイプのX線 Image Intensifier と組み合わせたCCD型X線検出器 (浜松ホトニクス(株) C4880-80) を用いた。

3. 実験結果

3.1 モデルナノ粒子の可視化

ゴム中のナノ粒子は、単粒子、単粒子が集まってできた凝集体、凝集体が集まってできた凝集塊という大きく分けて3つの階層構造からなっていると考えられる。通常はすべての階層の構成要素にサイズ・形状の分散があるために、散乱情報から実空間の構造情報を可視化することはきわめて困難である。そこでサイズ分散が小さく ($< 10\%$) 形状が既知な球形シリカをスチレンブタジエンゴムに充填した試料について2D-USAXSを実施して、ナノ粒子凝集構造を可視化した。解析は地球シミュレーターを用いた二次元 Reverse Monte Carlo 法 (2D RMC) により実施した。³⁾ その結果、ゴム一軸延伸時のナノ粒子分布を可視化することに成功し、⁴⁾ 現在はその結果を基に物性シミュレーションが実施されている。

3.2 ゴム延伸下でのナノ粒子凝集構造解析

前項の解析手法は、通常のナノ粒子充填ゴムではサイズ・形状の分散が大きすぎて適用することができない。そこで各階層における凝集構造のサイズ・質量フラクタル次元などを反映した散乱式⁵⁾を用いて、1軸延伸時におけるこれらの構造パラメーター変化を解析した。試料としては、一般に用いられているサイズ分散の大きなシリカを充填したスチレンブタジエンゴムを用いた。延伸方向とそれに垂直な方向の散乱強度プロファイルを解析した結果、延伸下で凝集体には変化が見られなかったが、凝集塊は延伸とともに力学物性の変化と対応した段階的な変化を示し

た。初期段階においては弾性率の急激な減少に対応して、慣性半径から見積もられる凝集塊体積は減少している。したがってこの弾性率減少は凝集塊の破壊に起因していると考えられる。一方、延伸率が100%を超えると、延伸と平行な方向の凝集塊慣性半径の増大に対応して、弾性率の上昇が見られた。これらの知見から、大延伸時に逐次的に応力集中が起きて力学物性の変化が起こるモデルをたてることができた。⁶⁾

3.3 XPCSによるゴム中でのナノ粒子ダイナミクスの観察

試料としては前述のシリカを充填した未加硫スチレンブタジエンゴムを用いた。シリカーゴム界面を変性した試料を数種類用意し、温度を変えた際のダイナミクス観察を実施した。その結果、シリカーゴム界面状態によりダイナミクスの温度依存性が大きく異なることが明らかになった。詳細なダイナミクスの機構については現在検討中である。さらにゴム加硫過程のXPCS測定を実施し、ゴム分子ネットワークの形成に伴うシリカ粒子ダイナミクス変化を測定することに成功した。²⁾

4. おわりに

小角X線散乱法を長い試料-検出器間距離に適用した時間分割2D-USAXSと、コヒーレントX線に応用したXPCSを用いて、それぞれ延伸下でのナノ粒子凝集構造の変形とそれらのダイナミクスを観察することができた。一般にナノ粒子充填ゴムの構造は「汚い」構造であり、定量的な評価は難しいが、2D-USAXSとXPCSを用いることで、汚い構造の中から構造パラメーターとそのダイナミクスに関する情報を引き出すことに成功した。今後より定量的な解析を進めるとともに、これらのミクロな構造・ダイナミクスをマクロな力学物性と関連づけ、補強効果の機構に迫れればと考えている。

本研究は住友ゴム工業(株)の岸本浩通氏との共同研究である。また指導教官であり現在の上司でもある東大の雨宮慶幸教授にはさまざまな点でお世話になっている。実験の際には、八木直人、鈴木芳生、竹内晃久、上杉健太郎、井上勝晶、太田 昇の各博士に多大な協力をいただいている。2D RMC解析は防衛大の萩田克美博士によるものである。また東大院新領域雨宮研メンバーには実験・解析を進めてもらっている。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) Y. Shinohara *et al.*: *J. Appl. Cryst.* **40**, s397 (2007).
- 2) Y. Shinohara *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.* **46**, L300 (2007).
- 3) K. Hagita *et al.*: *J. Phys. : Condens. Matter* **19**, 330017 (2007).
- 4) K. Hagita *et al.*: *RheologicaActa* **47**, 537 (2008).
- 5) G. Beaucage: *J. Appl. Cryst.* **28**, 717 (1995).
- 6) H. Kishimoto *et al.*: *Rub. Chem. Tech.* **81**, 541 (2008).