理研ビームライン I (BL45XU) における X 線溶液散乱を用いた構造研究

理化学研究所 播磨研究所 藤澤哲郎

Tetsuro FUJISAWA: Structural Studies on Protein Solutions by using Solution X-ray Scattering Technique at RIKEN Structural Biology Beamline I (BL45XU)

RIKEN structural biology beamline I (BL45XU) is an undulator beamline with two branches. One is for protein crystallography (PX) and the other is for small-angle x-ray scattering (SAXS). PX and SAXS experiments can be done simultaneously [Yamamoto *et al.* (1995) *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1833-1835]. For SAXS branch the clean and stable optics were realized. The use of this beamline extends the various limits of small-angle scattering technique: measurements of dilute protein solutions, large protein complex and fast time-resolved experiments. These advantages will be fully utilized for high-pressure SAXS measurements.

1. はじめに

理研ビームライン I (BL45XU) は, SPRING-8 に設置された構造生物学研究を目的としたビームラインで, 日本で最初の結晶構造解析と小角散乱実験が同時に使用できる分岐型挿入光源ビームラインである.¹⁾ 小角散乱とは, 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からの回折の 3 種に大別される. 理研の研究としては, 筆者の専門である蛋白質溶液からの散乱と配向したゲルや筋肉ファイバが主なテーマとなる.

1.1 X 線溶液散乱とは

X 線溶液散乱の分解能がどのようになるか示したのが図 1 である. 乳酸脱水素酵素結晶構造解析の座標²⁾ 図 1 (a) を用いて散乱曲線を計算すると, 図 1 (b) となり, 散乱角の内側には回転半径や原点散乱強度, 外側にいくにしたがって形状の寄与が散乱に大きく関与する. 溶液散乱は位相の情報が失われているので, 散乱曲線からモデル計算等を行い構造を評価する. 蛋白質溶液からモデル計算するのに球面調和関数展開近似³⁾ がよく使われる. フィットする散乱角領域で分解能が上がる様子を説明したのが図 1 (c), (d) である. 散乱角の小さな領域では蛋白質は球状であるが, フィットする散乱角を広げるにより乳酸脱水素の 4 量体の特徴が現れてくる. さらに

散乱角の大きなところではリップルが見受けられるが, これはサブユニットの相関によるものである. これらのモデル計算は一般に不安定で, 建設する立場から言うといかに誤差の小さいデータを得ることが出来るかがサイエンスの結果として大きく反映されることになる.

1.2 X 線溶液散乱の構造生物学研究での役割

近年蛋白質結晶構造解析が急速に進展し, 高分解能の構造が誰にでも迅速に得られる中で, 構造生物学の中の小角散乱の役割としては大きく 2 つに分類できるであろう.⁴⁾ 一つは結晶化が難しいあるいは結晶構造解析ではできない研究. 第 2 は時分割測定である. 前者の代表例としては蛋白質折れ畳み問題解明のためのランダムコイル状態やモルテングロブリン状態での蛋白質での構造,⁵⁾ あるいは結晶化されにくい巨大蛋白質複合体⁶⁾ や脂質やミセル, 糖鎖を伴う蛋白質の構造. 後者としては蛋白質の折れ畳み反応⁷⁾ や酵素の基質結合などに伴う大きな構造変化. 溶液散乱ではないが筋肉の収縮反応^{8), 9)} や光反応に伴う膜蛋白質の構造変化¹⁰⁾ が挙げられる. 蛋白質の多くは一つのポリペプチド鎖からではなく複数のポリペプチド鎖からなり, 多くの生体内反応が蛋白質あるいはサブユニット間相互作用といった弱い結合によって制御されている. 高分解能の原子座標に基づく残基レベルでの議論はもちろん必要であるが, そのような弱い相互作用を物理化学的に研究するには生体により近い状態で測定することが大事であると筆者は考える.

図1 蛋白質X線溶液散乱の分解能. (a) 乳酸脱水素酵素の結晶構造 (6ldh²), (b) 結晶構造から計算された溶液散乱. $S = 2\sin\theta/\lambda$: 2 θ , 乱角 λ 波長. (c) $S < 0.006 \text{ \AA}^{-1}$ に相当する分解能で球面調和関数展開したもの. (d) $S < 0.0243 \text{ \AA}^{-1}$ に相当する分解能で球面調和関数展開したもの. (Resolution of solution X-ray scattering of protein.)

1.3 高圧下でのX線溶液散乱

筆者は特に高圧下でのX線溶液散乱に興味を持っている. 小さな蛋白質は生理条件下では5000ないし6000気圧にならないと変性しないが, 複数のサブユニットからなる蛋白質では2000気圧前後で個々のサブユニットの2次構造が変わらずに乖離会合を行う.¹¹⁾ 静水圧を用いる最大の利点は, 熱や変性剤によるものと違い, 内部エネルギーを変えずに自由エネルギーを変化させることができ, 微妙な実験条件の調整が簡便にできることである. 正しく折れ畳まらずに会合をおこした蛋白質が圧をかけることにより正しく折れ畳まり, 圧を解除した後も分散している例が報告されており, 工業的にも静水圧の利用が大きく着目されている.¹²⁾ しかしながら, 円2色偏光も測定できず, 結晶構造解析も困難で, NMRでは高分子量蛋白質が扱えない中, 構造生物学的な研究はなかなか進展していない. ル・シャトリエの法則から明らかなように, 圧力が変化すると体積が変化する. X線溶液散乱は元々大きさ(体積)の変化の検出に適しており, 極めて有効な測定手段となりうる. 筆者は立命館大学の加藤博士との共同研究により, 世界で始めて蛋白質溶液の定量的なX線散乱測定に成功した.¹³⁾ その経験に基づきビームラインの最適化設計を行った.

2. ビームライン

結晶解析ビームラインを含めてBL45XU全体の仕様に

についてはビームライン担当者の山本氏らが,¹⁾ また小角散乱実験ステーションについては筆者らがすでに報告を出しており,^{14), 15)} 詳しくはそちらを参照されたい. 本稿では書き落としている部分を中心に簡潔に述べたい.

2.1 光学系

高圧下でのX線溶液散乱を測定する上で重要な点は3つある. すなわち, 小さなビームサイズ, 短い波長そして寄生散乱の低減である. BL45XUでは, 小角散乱が使用する波長は通常1.0 Åで, 分岐を行うダイヤモンドモノクロメーターは7 keV ~ 14 keVまで連続的に波長を変えられることができるが, 実質上変更することは希である. 1 Åの波長を使用することにより高圧セルの窓材として使用するダイヤモンドの吸収を大幅に減らすことができ, 従来型高圧セルでは, 透過率が1.5 Åと比べ約7倍になる.¹³⁾ BL45XUの発光点でのビームサイズは0.394 × 0.0271 mm (水平×垂直), 発散は小さく19.5 μrad × 8.83 μrad (水平×垂直)である. この特徴を生かしてできるだけ寄生散乱を減らすような設計がなされている. 集光系はロジウムコートされた2枚の円筒平面型ミラーを40.5 mと41.7 mの位置にK-B型配置し, 58.2 mの位置にフォーカス点を置いている. ミラーの見込み角は4 mradなので, 12 keVでは82%の反射率が予想される. 4象限スリットは分光器の直後, ミラーの直後, サンプル前実験ハッチに2台設置されている. 小角散乱実験では頻繁にスリットを微調する. それぞれのスリットの下流には

真空中に強度モニターが設置され簡便に設定することができる。

2.2 実験ハッチ

試料位置は光源より 56.4 m ないしは 56.0 m で固定する。ミラーの焦点はカメラ長を変更するときにはいじらない。試料位置を固定にすることによって非常に試料周りの自由度が高くなっている。カメラ長の変更は検出器架台を移動させ真空バスを付け替えることにより行われる。カメラ長は、0.6, 1.0, 1.8, 2.2 m と 4 種類用意されている。現在の焦点サイズはおよそ半値幅で 0.4 mm (水平) × 0.2 mm (垂直) である。ガードスリットにおいては開口部が 0.8 mm (水平) × 0.4 mm (垂直) である。サイクルごとに若干変化するが、試料位置では 1 mm 角以内にはすべて収まっている。標準溶液散乱用セルは温度コントロール可能で、開口部 4 mmφ, 光路長 3 mm (容量約 0.05 ml) を用いている。ビームストップが入っている真空チェンバー内に可動式アームが設置されており、吸収を測定する場合にはビームストップ前にカプトン膜を置きそのピーク積分値により測定される。図 2 に高圧ストップドフロー装置を設置した時の実験ハッチ内の様子を示す。試料位置での光量は 100 mA 運転時で 10^{12} フォトンである。

図 2 BL45XU 小角散乱実験ステーション内部。通常の試料架台の代わりに高圧ストップドフローを設置している。(The inside of SAXS experimental station at BL45XU.)

2.3 BL45XU 小角散乱の SPring-8 内および世界的な位置付け

BL45XU と他の ESRF, APS の挿入光源小角散乱のビームラインとを比較した時に一番大きな差は光量であろう。ESRF の ID2 などと比較しても 1 桁低い¹⁶⁾。これは BL45XU の挿入光源が垂直偏光で、しかも SPring-8 標準型と比べ 1/3 の長さのみを小角が使用していることと、ミラーを 1 つではなく 2 つにしているからと考えられる。さらに大きな違いはカメラ長である。ESRF が 10 m 程度のカメラ長を持つのに対して、BL45XU は 2 m 少ししかなく、90 年代に建設された小角散乱のビームラインの中ではとりわけカメラ長が短い部類に入り、今後の課題となっている。光量の点から考えると、およそ第 2 世代のウイグラーを用いた小角散乱ビームライン I^{17), 18)} と同程度、ビームサイズでは第 3 世代のビームラインと言える。

SPring-8 内では、本ビームラインを含めて BL40B2,¹⁹⁾ BL40XU²⁰⁾ と、3 本のビームラインが共同利用の小角散乱実験に供されている。他の 2 本とも小角散乱専用ではなく、結晶構造解析やイメージングといった用途との相乗りである。それぞれの特徴を一言で述べると、BL40B2 が波長可変なビームライン、BL40XU は高光量ビームラインで BL45XU より 3 桁強いビームラインである。これから共同利用申請される方はそれぞれの特徴にあったビームラインを選んでいただきたい。

2.4 検出器²¹⁾

過去、1 次元位置判別型比例計数管 (PSPC) に代表されるガス型検出器以外の検出器が溶液散乱において定量的な仕事に使われることはほとんどなかった。しかし現在の標準的なガス検出器では 10^4 photons/s/mm² 程度の散乱光しか処理できず、第 3 世代からの高光量をカバーすることは難しい。我々は、東大雨宮氏らによって開発された X 線イメージンテンシファイアー + CCD 検出器²²⁾ (XR-II + CCD) を採用し、ビームライン立ち上げ以来その溶液散乱への応用に最も多くのビームタイムを割いてきた。XR-II + CCD は、X 線光子を光に変換し、さらに光電子の形で集光して冷却 CCD 上で計測するという原理の検出器である。この検出器の特徴は、 5×10^7 photons/s/mm² という高散乱強度においても検出可能で、しかも CCD を使用しているのでビデオレートではあるが時分割測定も可能である。しかし当初から、検出面の中心部から周辺部にかけて系統的に画像がひずみ、検出感度が変わることが報告されており、さまざまな補正ソフトも開発されてきた。^{23), 24)} 図 3 は等間隔格子状に穴を開けたマスクを XR-II + CCD の前に置き、イメージングプレートとの比較でずれを測定し、それを検出器の動径方向にプロットしたものである。²¹⁾ 像の歪み (図 3 (a)) および感度の不均一性 (図 3 (b)) は検出面の角度方向にあまりよらず、しかも中心部では両者とも非常に小さい事

図3 XR-II + CCD 検出器の歪みおよび感度不均一性. 検出器の前面にグリッドマスクをおき、イメージングプレートとの比較からXR-II + CCD 検出器の歪み(a)と感度不均一性(b)に対する補正係数を検出器中心から動径方向にプロットしたもの.²¹⁾ (Deviation and shading of XR-II + CCD detector.)

がわかる。我々はこれらの事実と補正用データ取得の実際上の問題点を考慮し、検出器の中心部だけを補正無しで取得し、それらの像が実際の解析結果にどのくらい影響し、従来のPSPCの結果と違うかを評価した。サンプルとしてポリスチレンラテックスに着目した。これは大きさ分布も狭く、その高周波構造をもつ散乱曲線が単純球でよく近似されることがわかっている。図4は、溶媒の散乱をひいたポリスチレンラテックスのXR-II + CCDとPSPCで測定された散乱曲線である。²¹⁾ 一見してわかることであるが、XR-II + CCD検出器は実質上ダイナミックレンジが2桁程度しかないことがわかる。中心部にX線がはいらないようにマスクをかけると、XR-II + CCDのデータはPSPCのデータと一致した。つまりダイナミックレンジを満たすような測定をしてやると正しい解析結果をだすことは可能である。図3から評価す

図4 XR-II + CCDとPSPCの比較. ラテックス溶液散乱をPSPC, XR-II + CCDで計測したもの.²¹⁾ (The comparison between XR-II + CCD and PSPC.)

ると、回転半径などは55ピクセル以内の中心領域を使用すれば1%以下の誤差となり補正の必要はない。また動径分布関数 $P(r)$ などもダイナミックレンジに気をつけていれば差異は観測されなかった。

3. ビームラインの評価

BL45XUではすべてが溶液散乱の実験ではない。^{10), 25) - 27)} 実際に蛋白質溶液散乱の実験を行っているのは、60%程度かとは思われるが、筆者の関与している溶液散乱におけるビームラインの特徴について述べたい。

3.1 蛋白質の放射線損傷

挿入光源光を用いたX線溶液散乱測定で最初に懸念されたのは、X線を照射されることによる蛋白質溶液の放射線損傷である。これは、すでに筑波のフォトンファクトリーの偏光電磁石ビームラインでも報告されていたし、²⁸⁾ 近年建設された第2世代のウイグラービームライン、第3世代の挿入光源のいずれでも放射線損傷が報告されている。^{16) - 18)} 具体的には、長時間X線を照射していると会合がおこったり、色のついている蛋白質では色素が落ちたりする現象である。一般に、放射線損傷はX線が照射されたことによる溶液中でのラジカル生成によるものとされるが、X線小角散乱で問題とされる放射線損傷の詳細はわかっていない。第2世代では、ラジカルを吸収するような吸収剤として、DTT (ジチオスレイトール) のような還元剤を低濃度入れることがよくなされていた。第2世代のウイグラービームラインでは、フローセルを作成し、常に蛋白質を流してX線が照射される位置に新鮮な蛋白質を送りつづけることがなされた。¹⁸⁾ しかし、現実的にはそれだけ蛋白質の量を増やさなくてはならず、対象となる試料の蛋白質が限定されることになる。ESRFでは、波長が8 keVではなく12 keVを使用しているにもかかわらずX線照射1秒以内に照射されたところに泡

が生成され、損傷を受けることが報告されている。¹⁶⁾ BL45XU では、リゾチウム溶液に X 線照射を行い、1 秒ごとに散乱曲線を記録し、回転半径の変化を調べたところ、15 秒たつと回転半径が明らかに増加し、泡の生成も確認された。通常の静的な測定では、露光時間 1 秒を目安にしている。しかしフェリチンなどのように放射線損傷に対して弱いものもあり、新規蛋白質を測定する場合は照射時間と回転半径の関係をなるべく調べるようにしている。

3.2 希薄溶液からの散乱測定

XR-II + CCD はガス検出器に比べ検出効率が高く、しかも強力な挿入光源とあまって非常に高い S/N 比のデータが得られる。分子量 18000 ダルトン程度の蛋白質でも、0.3 mg/ml 程度の濃度で回転半径を約 1 秒で正確に決定できる。これは筑波のフォトンファクトリー BL10C などでの濃度と比べ約 1/5 である。光散乱や平衡沈降法といった大きさを決める他の測定方法に比べて、低濃度で測定できるようになり、X 線溶液散乱の用途が大きく広がった。その 1 例として、磯貝氏らの人工蛋白質の設計評価がある。²⁹⁾ 設計評価を行う上で、人工蛋白質がどのようなサイズになっているのかを知るのには非常に大切である。この人工蛋白質は、ターゲットの立体構造（ミオグロビン）をとるように、全アミノ酸配列（153 残基）を理論的に設計したものである。一般に、人工蛋白質は天然の蛋白質に比べ、3 次構造がうまく折れ畳まれていないことが多く、しかも高濃度にすると沈殿したり会合したりする。我々は希薄溶液の散乱測定によってこの人工蛋白質の回転半径を精密に測定し、ヘムの結合に伴ってこのサイズが減少することを証明した。

別の例としては、理研・Bolze 氏、姫工大・内藤氏らのバイセルの仕事がある。³⁰⁾ バイセルとは、2 種類の脂質 DMPC と DHPC の水溶液中での混合物で、ディスク状の形状を形成するものと考えられている。バイセルは膜蛋白質、ペプチドを研究する際、高分解能 NMR では非常によく使用されるモデル膜系である。しかしながらバイセル自身の構造・物性についてはよく解明されていない。特に溶液 NMR で使用される低濃度バイセルに関しては、X 線溶液散乱測定を行うことが不可能で、形状に関する情報がなかった。X 線溶液散乱と ³¹P NMR を用いて、3 % から 16 % の濃度範囲では分散しているにもかかわらず、1 % ではバイセルが積層していることが初めてわかった。

近年、生化学精製あるいは解析評価が飛躍的に向上しており、蛋白質精製量は大幅に減少している。にもかかわらず、従来 X 線蛋白質溶液散乱は最もサンプル量の必要な方法論であった。サンプルの量的な改善は今後さらなる他の測定方法との交流・相関研究を促進していくと思われる。

3.3 小角散乱測定

BL45XU は、非常に寄生散乱を減らす設計になってお

り、小さな散乱角を測定するのに適している。ウイルスや巨大な蛋白質複合体はサイズが大きいので、構造情報が非常に散乱角の小さな部分に含まれることになる。既に第 2 世代の放射光施設の小角分解能は約 100 nm である。BL45XU は、カメラ長が 2.2 m しかないが、それでも最小小角分解能は 150 nm 程度あり、現在日本で唯一 1 Å の波長で 100 nm 以上を計測できるビームラインである。九州大学麻生氏らとの共同研究では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ多酵素複合体という、分子量 1.5 MDa の超分子複合体の溶液散乱を行っている。⁹⁾ この蛋白質は、ジヒドロリボアミド S-アセチルトランスフェラーゼ (E2)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (E1) + ジヒドロリボアミドデヒドロゲナーゼ (E3) の 3 種類の蛋白質からなり、3 種類の反応を多酵素複合体で行う。特に、E2 が巨大構造体のコアとなっているが、結晶構造解析により正 12 面体の形状をしていることが知られている。³¹⁾ E1, E3 は非常に弱い力で結合しており、その構造安定のメカニズムの研究に小角散乱を用いている。³²⁾ このように小角分解能の向上は、今まで得られなかったディメンジョンの情報をもたらすが、一方、今までビームストップの内側に散乱され見えなかった大きな会合体なども問題となり、より均一な試料を準備することが大きな複合体を扱う場合重要となる。

3.4 時分割測定

蛋白質がランダムコイル状態から折れ畳む反応や、基質結合に伴う大きな蛋白質構造変化などは、結晶下では行うことは難しく、X 線溶液散乱が直接的に“姿の変化”をみる唯一の手段となる。時分割測定で最もよく使用されるのは、ストップドフロー装置である。原理は 2 つのシリンジに、混合したい溶液を引き込み、そのシリンジのシャフトを動かすことにより 2 液を混合する。混合された溶液は観測部へと導かれ、X 線が照射される。SPRING-8 で使用しているストップドフロー装置は、観測部に直径 2 mm のキャピラリーを使用している。従来の X 線ストップドフロー装置の場合、ビームサイズが大きいため観測部が大きく、一度混合された液体が広がるために泡が発生しやすい等の問題があった。またキャピラリーを採用しているため、X 線と直角方向に分光や光刺激などができるようになっている。デットタイムはおおよそ数 msec 程度である。検出器は XR-II + CCD を使用している。この検出器の特性から、検出器の中心部を使用することが望ましく、その点、波長が短く光量もありカメラ長を短くしてもビームサイズが絞れているため、小角部が計測できる本ビームラインは時分割測定に適しているといえよう。XR-II + CCD は、36.36 msec/frame のビデオレートで像を連続的に取得できるが、取得する像のサイズを小さくし、分解能をおとせばさらに早いレートで像を取得できる。筆者は、磯貝氏らと共同でアポミオ

グロビンを使用して折れ畳み反応を計測した。³³⁾ Wrightらが1200回積算して計測した散乱よりはるかに良いS/Nで、最高7.84 msec/frame, 50回積算で散乱曲線を得ることができた。⁷⁾ また、アルドラーゼを用いた変性実験では、散乱角が実空間で150 Åから8 Åの範囲を同時にビデオレートで測定することができることを示した。特に、実空間で30 Åよりも高分解能の領域、すなわち中広角領域は、従来長時間露光でも測定が難しかった。回転半径や分子量に比例する原点散乱強度といった情報だけでなく、サブユニットの相関関数や α -ヘリックス由来の10 Å近傍ピーク変化の様子が、時間とともに違った位相で変化していく事がわかった。³⁴⁾

3.5 時分割測定の解析

現在の世界トップレベルでは、単に回転半径や積分強度の変化だけでなく、反応途中の中間体の散乱曲線を平均値である観測データから分離することが行われている。これらは、反応の途中で系に存在する各状態数の濃度を溶液散乱以外の方法、蛍光や円二色偏光法で測定し、それに基づいて各散乱曲線を計算している。³⁵⁾ BL45XUで得られるデータは非常にS/Nが良く、単に回転半径を計算できるだけでなく散乱曲線を解析できるレベルにある。そこで、散乱曲線から得られたデータのみで、系に存在する状態数や各散乱曲線を特異値分解法に基づき分離することに成功した。^{33), 34)} これは単に手間が減るというだけではない。例えば2次構造と3次構造の構造変化の反応定数が違う時には、途中で反応を止め、円二色偏光性から各状態の濃度を決めても、その濃度を散乱曲線の解析には使えない。なぜなら、与えられた時間での2次構造から見た濃度と3次構造から見た濃度が違うからである。したがって、従来の方法では各散乱曲線を求めることはできないが、筆者の方法ではそれが可能となる。今後は構造変化がより小さな系でどれだけできるかが課題である。

3.6 Ab initio shape determination への応用

3.6.1 ab initio shape determination とは

ab initio shape determinationとは、小角散乱曲線に基づいて蛋白質の形状を決めることである。蛋白質は、低分解能(～30 Å)で見たときに電子密度は一定で散乱曲線は形状のみの関数となる。昔から蛋白質を球充填モデルで表し散乱曲線に対して最適化することは行われてきたが、容易に局所最小値に捕らわれ、なかなか期待通りの結果は得られなかった。近年、非線形最小二乗法の劇的な進歩により、今新たに注目をあびている。遺伝アルゴリズム³⁷⁾、あるいは焼きなまし法(simulated annealing)³⁷⁾といったアルゴリズムを用いている。図5は、Svergun博士の作成した焼きなまし法によるプログラムで、リゾチウムの1次元散乱曲線からの3次元形状を計算した例である。蛋白質結晶構造の座標をリボンモデルで表し、計算

図5 焼きなまし法DAMMINによる球充填モデルの安定性。リゾチウムのPSPCによる同一実験データからDAMMIN³⁷⁾により複数回計算された球充填モデルと結晶座標をリボンモデルで重ね書きしたもの。右側は90度ずらした図。計算結果は安定していることがわかる。(The stability of simulated annealing method, DAMMIN.)

された球充填モデルと重ね書きしたものである。非常にリゾチウムの特徴を捉えていることが良くわかる。プログラムを何回実行しても解は安定しているように見える。同様の事が遺伝アルゴリズムを用いた計算でも確認され

図6 BL45XU のデータの焼きなまし法DAMMIN への応用. (a) アルドラーゼ時分割データから分離された native 状態アルドラーゼ散乱曲線³⁵⁾ に対する DAMMIN の出力 (点) と結晶座標 (リボン). (b) アミノ基転移酵素散乱曲線⁴²⁾ に対する DAMMIN の出力 (点) と結晶座標 (リボン). (The application of XR - II + CCD data of BL45XU on simulated annealing method, DAMMIN.)

ている. 何故そのような事が可能なのであろうか? シャノンのサンプリング定理に基づき散乱曲線の持つ情報量を考えてみよう.³⁸⁾ シャノンのサンプリング定理により定義される情報量, シャノン数は, 最大観測角 S を最大長の2倍で割ったものである. 例えば最大長 $80 \text{ \AA}$ の蛋白質を $30 \text{ \AA}$ 分解能すなわち $S < 0.03$ まで測定すれば, シャノン数で5程度となる. 与えられた分解能に対し, 球面調和関数展開近似より安定かつユニークに決定できるパラメーター数は, シャノン数の1.5倍程度であり, 経験的には15から20の独立パラメーターは散乱曲線から決定できる. したがって与えられた分解能に対する形状の持つ情報量はそれに相当すると考えられる. しかし *ab initio* shape determination のパラメーター数は多く, 不安定な解になるはずである. それでもなおかつユニークではないにせよ安定な解になるのは, 2つの要因があるのではないかと筆者は考える. 一つは超解像である. Harrisonらは, 物体の広がりがあるかじめわかっている時に, そのフーリエ変換である観測信号を計測系の遮断周波数より細かくサンプリングして, 行列の逆変換を行うことにより, 遮断周波数より帯域を広げて信号を回復することを示した.³⁹⁾ 実際, 我々が実験データを取るときサンプリングは, 明らかにシャノン数よりも大きい. 二つ目は決めようとする対象が蛋白質であるからである. 蛋白質の形状は連続的でしかも表面積を最小にするように表面が非常にスムーズである. 焼きなまし法においても, 単

に散乱曲線との二乗差の項だけでなく, 連続性とスムーズになるようにペナルティ項を入れている. 現在モデル計算でわかっている不安定な解になる形状は, 非常に平べったい円盤である.

3.6.2 BL45XU における *ab initio* shape determination のチェック

前項で述べた方法論が, BL45XU から得られたデータに対してどれくらい有効か, 焼きなまし法を使用して計算された球充填モデルを2例について図6に示す. サンプルとしては, 低分解能でも形状がわかりやすいオリゴマー蛋白質, アルドラーゼ (4量体)⁴⁰⁾ とアミノ基転移酵素 (2量体)⁴¹⁾ について行った. 実験データ以外に, 分子の対称性を拘束条件として計算した. 図6(a)では, 時分割実験データから分離された散乱曲線にもかかわらず, アルドラーゼのねじれたような形状が計算された. 図6(b)では, 外形はほぼ一致するものの細部では結晶構造と違っている. いずれの場合も, 計算された形状が蛋白質結晶座標の特徴とよく一致する事がわかる. 現在 BL45XU で扱っている蛋白質は限られているので, すべての場合に有効か判断はできないが, 今後データを蓄積しどのような場合に有効か評価する予定である.

4. 今後の展開

最初に書いたように, このビームラインの建設目標は静水圧下における X 線溶液散乱測定を最適化することで

ある。残念ながら高压測定はいまだBL45XUでは定常化していないが、現在2つの高压セルを開発している。ひとつは耐压5000気圧の高压ジャンプ装置である。従来の加藤・藤澤型高压セルは、測定に必要とされるサンプル量が多く(1.5 mg/ml～2 mg/ml)、しかもサンプルの交換が大変であった。¹³⁾ 従来とはまったく違う高压シールを導入することにより、窓材ダイヤモンドとほぼ同じ径の窓プラグが可能となり、必要な体積も0.1 mlとなった。現在、最終的な試験を繰り返し、定量性を確かめている。⁴²⁾ さらに我々は、高压下(<2000気圧)にて2液を混合し、その反応過程をX線溶液散乱で測定する高压ストッパフロー装置を開発中である(図2)。これらの装置は、開発するのに多大なビームタイムを必要とするので、専用ビームラインとしてはふさわしいテーマであるといえる。この数年我々が培ったビームラインでの散乱測定技術、時分割測定解析技術、散乱曲線解析技術とあいまって、BL45XUでしかできないサイエンスができる日が近づいていると言えよう。

謝 辞

BL45XU小角散乱プランチに建設協力いただいた方々、JASRIの井上勝晶博士、岩本裕之博士、八木直人博士、植木龍夫博士、大阪大学の猪子洋二博士、岡俊彦氏および結晶プランチを建設された理研の山本雅貴博士、熊坂崇博士らに深く感謝いたします。アミノ基転移酵素は大阪大学の石嶋潤氏の好意により使わせていただきました。焼きなまし法によるプログラムDAMMINはEMBL・HASY-LabのDmitri Svergun博士の好意により使用させていただきました。最後にBL45XU小角散乱プランチの高度化は、理研の石川哲也博士、前田雄一郎博士のご尽力をいただいております。

文 献

- 1) M. Yamamoto, T. Fujisawa, M. Nakasako, T. Tanaka, T. Uruga, H. Kimura, H. Yamaoka, Y. Inoue, H. Iwasaki, T. Ishikawa, H. Kitamura and T. Ueki: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1833 (1995).
- 2) C. Abad-Zapatero, J. P. Griffith, J. L. Sussman and M. G. Rossmann: *J. Mol. Biol.* **198**, 445 (1987).
- 3) D. I. Svergun, V. V. Volkov, M. B. Kozin and H. B. Stuhmann: *Acta. Cryst.* **A52**, 419 (1996).
- 4) 猪子洋二: 次世代大型X線光源研究会生体高分子Ⅱ(非結晶)サブグループ計画趣意書「SPRING-8によるX線小角散乱」.
- 5) M. Kataoka, J. Flanagan, F. Tokunaga and D. M. Engelman: *Synchrotron Radiation in Biosciences* **187** (1994).
- 6) Y. Aso, T. Fujisawa, Y. Hiromasa, K. Meno and K. Kobayashi: PFOTON FACTORY ACTIVITY REPORT, 255 (1996).
- 7) D. Elizer, P. A. Jennings, P. E. Wright, S. Doniach, K. O. Hodgson and H. Tsuruta: *Science* **270**, 487 (1995).
- 8) N. Yagi, K. Wakabayashi, H. Iwamoto, K. Horiuti, I. Kojima, T. C. Irving, Y. Takezawa, Y. Sugimoto, S. Iwamoto, T. Majima, Y. Amemiya and M. Ando: *J. Synchrotron Rad.* **3**, 305 (1996).
- 9) K. Wakabayashi, H. Tanaka, T. Kobayashi, Y. Amemiya, T. Hamanaka, S. Nishizawa, H. Sugi, T. Mitsui: *Biophys J* **49**, 581 (1986).
- 10) 岡 俊彦, 上久保裕生, 片岡幹雄: 放射光 **12**, 184 (1999).
- 11) T. Fujisawa, M. Kato and Y. Inoko: *Biochemistry* **38**, 6411 (1999).
- 12) R. J. St. John, J. F. Carpenter and T. W. Randolph: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13029 (1999).
- 13) M. Kato and T. Fujisawa: *J. Synchrotron Rad.* **5**, 1282 (1998).
- 14) 藤澤哲郎: 放射光 **12**, 194 (1999).
- 15) T. Fujisawa, K. Inoue, T. Oka, H. Iwamoto, T. Uruga, T. Kumasaka, Y. Inoko, N. Yagi, M. Yamamoto and T. Ueki: submitted to *J. Appl. Cryst* (2000).
- 16) T. Narayan, P. Boesecke and O. Diat: Xith International conference on small-angle scattering, Brookhaven (1999).
- 17) H. Amentisch, M. Rappolt, M. Kriechbaum, H. Milo, P. Laggner, S. Bernstorff: *J. Synchrotron Rad.* **5** 506 (1998).
- 18) H. Tsuruta, S. Brennan, Z. U. Rek, T. C. Irving, W. H. Tompkins and K. O. Hodgson: *J. Appl. Cryst.* **31**, 672 (1998).
- 19) 三浦圭子, 井上勝晶, 河本正秀, 森山英明: 理研シンポジウム(V), SPing-8 (2000).
- 20) 八木直人, 井上勝晶, 鈴木 拓: 第13回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 岡崎 (2000).
- 21) T. Fujisawa, Y. Inoko and N. Yagi: *J. synchrotron rad.* **6**, 1106 (1999).
- 22) Y. Amemiya, K. Ito, N. Yagi, Y. Asano, K. Wakabayashi, T. Ueki and T. Endo: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 2290 (1995).
- 23) A. P. Hammersley, S. O. Svensson and A. Thompson: *Nucl. Instr. Meth. A* **346**, 312 (1994).
- 24) 伊藤 隆: 博士号学位論文, 総合科学技術大学院 (1998).
- 25) T. Iwamoto, T. Suzuki and T. Fujisawa: *Eur. J. of physiology* **439**, (2000).
- 26) 鈴木 拓, 八木直人, 井上勝晶, 藤澤哲郎: 第13回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 岡崎 (2000).
- 27) 竹森 重, 山口真紀, 八木直人, 森本幸生: 第37回日本生物物理学会年会, 和光 (1999).
- 28) 小島正樹, 高橋健治, 田之倉優, 雨宮慶幸, 伊藤和輝, 木原裕: 第13回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 岡崎 (2000).
- 29) Y. Isogai, M. Ota, T. Fujisawa, H. Izuno, M. Mukai, H. Nakamura, T. Iizuka, K. Nishikawa: *Biochemistry* **38**, 7431 (1999).
- 30) J. Bolze, T. Fujisawa, A. Naito, T. Nagao, K. Norisada and H. Saito: 第37回日本生物物理学会年会, 和光 (2000).
- 31) T. Izard, A. Evarsson, M. D. Allen, A. H. Westphal, R. N. Perham, A. de Kok and W. G. J. Hol: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1240 (1999).
- 32) 目野浩二, 麻生陽一, 藤澤哲郎, 石黒正恒: 第43回日本農芸化学学会年会, 福岡 (1999).
- 33) 藤澤哲郎, 磯貝泰弘: 第37回生物物理学会年会, 和光 (1999).
- 34) 藤澤哲郎, 八木直人: 同上
- 35) D. J. Segel, A. Bachmann, J. Hofrichter, K. O. Hodgson, S. Doniach and T. Kiefhaber: *J. Mol. Biol.* **288**, 489 (1999).
- 36) P. Chacon, F. Moran, J. F. Diaz, E. Pantos and J. M. Andreu: *Biophys. J.* **74**, 2760 (1998).
- 37) D. I. Svergun: *Biophys. J.* **76**, 2879 (1999).
- 38) P. B. Moore: *J. Appl. Cryst.* **13**, 168 (1980).
- 39) J. H. Harris: *J. Opt. Soc. Am.* **54**, 931 (1964).
- 40) N. Blom and J. Sygusch: *Nat. Struct. Biol.* **4**, 36 (1997).

- 41) J. Ishijima, T. Nakai, S. Kawaguchi, K. Hirotsu and S. Kuramitsu: J.B.C., in press (2000).
42) 西川幸宏, 藤澤哲郎, 守時正人: 第 13 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 岡崎 (2000).

プロフィール

藤澤哲郎 Tetsuro FUJISAWA
理化学研究所 播磨研究所
Structural Biophysics Laboratory, RIKEN Harima
Insitute/Spring-8
〒 679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Mikazuki, Sayo, Hyogo 679-5148,
Japan
Tel. 0791-58-2815, Fax. 0791-58-2816
e-mail: fujisawa@sp8sun.spring8.or.jp
最終学歴: 大阪大学大学院基礎工学研究科博士課程
専門分野: X 線小角散乱, 生物物理学
現在のテーマ: 筋蛋白質を中心とする蛋白質構造物性
趣味: ビームタイム休止期間中のサイエンスができる時が最高の楽しみです.