X 線, 中性子小角散乱

——溶液中の生体高分子の構造と構造変化の研究法——

柊 弓 紘 Yuzuru HIRAGI

京都大学化学研究所

小角散乱とは、散乱光が主として 0.05 度から数度の微小な角度で観測されることから命名されたものである。この原理は、1915 年の P. Debye の非晶質の X 線散乱に関する論文に基づくのであるが、散乱強度の弱いことなどから、溶液中での実験が行なわれ出したのは 1940 年代に入ってからである。しかし、実験の難しさに加えて解析の困難もあり、その後の進展は遅々としたものであったが、初期においては Guinier⁽¹⁾、ひき続き主として Kratky, Luzatti の学派による忍耐強い努力の結果、溶液中での高分子、蛋白質、核酸、膜などの研究法の有力な手段の一つに育て上げられてきた。近年になって、研究用原子炉が建設されるに及んで、中性子散乱による研究も着々と成果が上がっている。

生体高分子の構造と構造変化の研究には、赤外線吸収、ラマン効果、NMR、紫外吸収、ORD、CD、X 線回折などの方法がある。これらの方法は、得られる情報の種類および測定する物質の状態が限定されるが、その範囲内においては精度の高いデータが得られる場合が多い。また、熱量測定などのように、高精度のデータが得られてもその解釈の難しい場合もある。これに比べて、小角散乱法から得られる情報は、局所的な情報に関しては上述の方法より精度の悪い場合も少なくないのは欠点であるが、1 種の測定法から種々の情報が得られ、総合的な解釈が可能であるという利点もある。特に、高次構造については電子顕微鏡や X 線回折法とは異なり、水溶液という、生体物質としては最も自然な状態で観測できると、蛋白質の四次構造変化や、蛋白質間、蛋白質-核酸、

リボ蛋白質などの相互作用をグローバルな構造と直接に関連させながら観察する有効な方法が他にないため、見過ごすことができない方法であろう。

1. X 線（中性子線）の散乱

X 線の散乱とは、電子が電磁波（X 線）によって強制振動させられて二次 X 線が生ずる現象であり、中性子の散乱は主として原子核の核力に基づくものである。現象論的に見る限り、どちらも同じ理論的取り扱いができる。ここでは、必要以上に正確、厳密な表現は避けて議論を進めることにする。主として X 線について述べ、中性子については特に区別する必要がある場合にのみ記することにする。

1) X 線の散乱と干渉

電磁波が電子にあたると、その電場成分によって電子は振動する。この振動によって入射波と同じ波長で放射されるのが、干渉性散乱 X 線である。この電子から r の距離での散乱強度 I_e は、入射 X 線の強度を P とすれば、散乱角の小さいところでは次式で表わすことができる。

$$I_e = 7.90 \times 10^{-26} P / r^2 \quad (1)$$

つぎに、電子が 2 個あった場合を考えよう。それぞれの電子からの散乱波は、重なり合って合成波を作る。これが波の干渉という現象である（図 1-a）。合成波は、電子の相対的な位置によって強め合う場合もあるし、弱められる場合もある。逆にいえば、合成波の強度をあちこちで観測して解析することにより、2 つの電子の相対

的な位置がわかる。これがX線回折や小角散乱の原理である。

図 1-b のように、電子 E_1 と E_2 によって 2θ の方向に散乱された X 線を比べると、 E_1 によって散乱された波は FE_1F' だけ遠回りするため、ズレを生ずる。散乱波と入射波のなす角の二等分線と直角方向を E_1S とする。2 電子間の距離 $E_1E_2=r$ とし、 E_1E_2 と E_1S のなす角度を α とすると、ズレの距離 $FE_1F'=\Delta$ は図より明らかに、 $\varphi=\frac{\pi}{2}-\alpha-\theta$ 、 $\phi=\frac{\pi}{2}+\alpha-\theta$ だから、

$$\begin{aligned}\Delta &= r \cos \varphi + r \cos \phi = r \{ \sin(\theta + \alpha) + \sin(\theta - \alpha) \} \\ &= d \cdot 2 \sin \theta\end{aligned}\quad (2)$$

(ただし $d=r \cos \alpha$)

である。X 線の波長を λ とすると、 Δ/λ はズレが何波長分かを表わす量となる。図 1-a のように、波動は 1 波長分を 2π の角周期で表わすから、 $\delta=2\pi\Delta/\lambda$ は、ズレを角度で表わしたものである。

$$S = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad \left(\text{または小角では } \frac{4\pi}{\lambda} \theta \right) \quad (3)$$

なる量を定義すると、 S は θ の正弦に比例する量だから、 E_1S の方向での散乱角の大きさを表わす量であり、実験における散乱光の観測位置と対応づけられる。したがって、 δ は、

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta = Sd \quad (4)$$

である。

E_1, E_2 によって散乱される X 線の振幅 A_1, A_2 は、 E_2 からの波が δ だけ遅れることを考えると、

$$A_1 = \sqrt{I_e} e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} \cdot t + \delta}; \quad A_2 = \sqrt{I_e} e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} \cdot t} \quad (5)$$

(ここで、 $i = \sqrt{-1}$; t は時間)

と表わされる。2 つの散乱波の合成振幅 A は、単純に加え合えればよいから、

$$A = A_1 + A_2 = \sqrt{I_e} e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} \cdot t} (1 + e^\delta) \quad (6)$$

波の強さ I は振幅とその複素共役の積 AA^* であるから、

$$\begin{aligned}I &\equiv AA^* = \sqrt{I_e} (e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} t - \delta} + e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} t}) \\ &\quad \times \sqrt{I_e} (e^{\frac{2\pi i}{\lambda} t + \delta} + e^{\frac{2\pi i}{\lambda} t}) \\ &= I_e (e^\delta + 1) \times (e^{-\delta} + 1) = 2 I_e (1 + \cos \delta)\end{aligned}\quad (7)$$

となる。

このことから、干渉では、“波のズレだけを問題にすればよい”ことがわかる。

電子数 N 個の多電子原子では、 A_1 から A_N までの足し算で合成振幅を表わせばよいようにみえるが、実際に

図 1

- (a) 2 つの波の合成。 δ は波の相対的なズレ (位相差)。
 (b) 2 電子による X 線の干渉。 E_1 による散乱波は、 E_2 より $\sim$ の分だけ遅れる。
 (c) X 線と中性子の原子散乱因子。

は原子内で電子が運動しているから、もう少し複雑になる。各原子についての合成振幅は計算されており、普通は原子を 1 個の散乱体と見なし、原子散乱因子 $f_{at.}$ と呼ぶ。 $f_{at.}$ は、図 1-c のように、 $S=0$ では原子番号 N (電子数) に等しく、 S の増加とともに減少する (中性子線では S に無関係に一定である)。

2) 分子、分散系による散乱

1 個の静止した分子からの散乱は、式 (6)、(7) を拡張して、分子を構成する M 個の原子による散乱を考えると、合成振幅 A_m と強度 I_m は、

$$A_m(S) = \sqrt{I_e} \sum_{j=1}^M f_j e^{-i\delta_j} \equiv \sqrt{I_e} \sum_{j=1}^M f_j e^{-iSd_j} \quad (8)$$

$$I_m(S) \equiv I_e A_m A_m^* = I_e \sum_{j=1}^M \sum_{k=1}^M f_j f_k \cos Sd_{jk} \quad (9)$$

となる。(9) 式の内容は、 NH_3 を例とした図 2-a によって理解できるであろう。

図 2

- (a) 静止したアンモニア (NH_3) 分子の模型図と、 α, d, S などの関係。
 (b) 電子密度が連続的に分布している場合の分子。
 (c) 分子間相互作用のある場合の干渉。原子 4 と 4', 1 と 3', 3 と 2'……などの干渉も考慮しなくてはならない。

ここまでは静止した分子を考えてきたが、液体では分子は運動しているから、 $\cos d_{jk}S$ は一定でなく、あらゆる方位の平均をとる必要がある。その結果、散乱強度は I_m ではなく、次式の J_m で与えられる。

$$J_m(S) = I_e \sum_j \sum_k f_j f_k \frac{\sin Sr_{jk}}{Sr_{jk}} \quad (10a)$$

ところで、実際には電子は原子の一点に集中しているわけではなく広がりを持っている。図 2-b のように、ある微小体積 dv_j での電子密度を $\rho(r_j)$ とすれば、電子の数は $\rho(r_j)dv_j$ となるから、 f_j をこれで置き換え、 Σ を積分にすれば、(10a) 式は、

$$J_m(S) I_e \int_v \int_v \rho(V_j) \rho(V_k) \frac{\sin Sr_{jk}}{Sr_{jk}} dv_j dv_k \quad (10b)$$

となる。なお、溶液では、 $\rho(r)$ は溶媒と溶質粒子 (分子) との電子密度の差になる。このため、中性子線は水素の散乱因子が重水素に比べて著しく大きいので、溶媒に重水を用いると ρ が大きくなり、X 線より測定上有利である。

今までは、同一分子内での散乱波の干渉のみを考えてきた。稀薄溶液はこの条件を満足し、溶液の散乱強度は分子 1 個の散乱強度 $\times$ 分子数としてよい。しかし、高濃度溶液になると分子どうしが接近するため、図 2-c のように分子間の干渉も考慮に入れる必要が生ずる。

散乱の基礎的な事柄に関しては、Guinier の著書⁽¹⁾、Porod の論文⁽²⁾、“X 線結晶学”⁽³⁾などが参考になるであろう。

2. 測定法

生体高分子の溶液の実験についてここでは詳しく述べる余裕はないが、概略次のような手順で行なう (図 3-a 参照)。まず、溶液の散乱の強度を測り、これより溶媒の散乱強度を差し引く。得られた散乱曲線は、散乱強度を強める目的で細長い光源を用いたものであり、変形 (smear) されている。これを、点光源による正しい散乱曲線に修正する操作 (desmear^(4,5)) を行なう。

大部分の場合がそうであるが、酵素や RNA などの分子 1 個の形や分子量を問題とするときには、分子間の干渉効果の影響を避けるため種々の濃度で測定を行ない、濃度 0 に外挿して 1 分子による散乱曲線 J_m を得る。 J_m と X 線に照射された分子数との積は実験より得た強度である。これを $J(S)$ とすると、 J は J_m に定数を乗じた

図 3

- (a) 線光源による散乱曲線 ($\tilde{J}$) と、点光源に desmear した散乱曲線。溶液の濃度 C が淡くなるにつれて、分子間干渉が小さくなり、 J/C は大きくなる。
 (b) ギニエプロット。直線の勾配から回転半径 R_g がわかる。
 (c) 回転楕円体の散乱曲線。軸比 $1:1:c$ (c は一番長い軸の長さ) を変えたときの变化。 $c=1$ は球を意味する。

ただだから、このほうが実際には便利であり、一般には J を用いる。

3. 解析法

溶液の小角散乱については、一応は解析法が確立しているが、何分にも複雑な現象であるため、未だ改良の余地はある。ここでは、従来の方法に依って、ごく一般的な方法の概要について述べる。興味のある方は、少し古い所もあるが、Kratky の総説⁽⁶⁾、Alexander⁽⁷⁾ の教科書、比較的最近のものとして Kratky, Pilz の総説⁽⁴⁾ およびこれらに出ている文献を参照されたい。

1) ギニエの近似と回転半径 R_g

Guinier は式 (10) の $\sin Sr/Sr$ の項を級数展開し、また、多少の物理的近似を用いることにより、

$$J(S) = J(0) \cdot \left(1 - \frac{R_g^2 S^2}{3} + \dots \right) \quad (11)$$

と書き換えられることを示した⁽¹⁾。ここで、 $J(0)$ は $S=0$ での散乱である。式 (11) はまた、指数関数の展開式となるので、 $J(S) = J(0) \exp(-R_g^2 S^2/3)$ と書ける。両辺の自然対数をとって、

$$\ln J(S) = \ln J(0) - \frac{R_g^2}{3} S^2 \quad (12)$$

とする。図 3-b のように、 $\ln J(S)$ を S^2 に対してプロットすると直線となる。この勾配から R_g が求まる。

R_g の意味は、分子の重心からの平均半径（正しくは慣性半径）で、回転半径と呼ばれる。 R_g は、分子の大きさや形を示す目安（分子量が同じなら、球が最少で、細長くなるほど大きい）である上に、変性や解離会合による R_g の変化によって構造変化を知る手懸りともなる。さらに、解析の容易さ、直線近似をするので実験値の変動を平滑化できる利点などのため、よく利用されている。

2) 分子の形（電子密度一定の分子）

生体高分子は分子の鎖がコンパクトに折り畳まれているため、電子密度の様な球、その他の形をした物体と見なせる場合が多い。そこで、球や回転楕円体、円柱などのモデル分子について、形状に応じて式 (10b) の積分を行えば、いろいろの散乱曲線を得られる。これと実測曲線とを比較すれば、分子の形を推定できる。図 3-c は回転楕円体の場合の例であり、個々の例については、たとえば Kratky と Pilz⁽⁹⁾ の文献を見られたい。

Stuhrmann⁽⁸⁾ は、球関数を用いることによって、このような単純な形だけでなく、軟式庭球を押し潰したようなものなら、任意の形のモデルで計算する方法を考案した。また、アロステリック酵素のように、四次構造をもつ物体の散乱曲線を計算する方法も考案されている⁽¹⁰⁾。電子計算機の発達によって、複雑な形の物体の計算ができるようになったため、測定に一層の高精度が要求されるようになってきている。

3) 動径電子密度分布

式(10b)の J の平方 $\sqrt{J}$ (説明を簡単にするため、位相問題は考慮しない)にフーリエ変換という数学的操作を行なうと、式(13)によって、

$$\rho(r) = \frac{1}{2\pi^2 r} \int_0^\infty S \sqrt{J(S)} \sin Sr dS \quad (13)$$

で表わされる動径電子密度分布が求められる。 $\rho(r)$ は、分子の中心より r 離れた所での電子密度の平均である。物体が中空であれば中心部の $\rho(r)$ は小さくなるから、この様子で内部構造が推定できる(図5参照)。

4) 分子量

光源の強さを P とすると、 $S=0$ での観測強度の絶対値 J_0 は、 PJ_m とX線の当たった粒子の数との積になる。 $\lim_{s \rightarrow 0} \sin Sr / Sr = 1$ だから、 J_0 は分子の総電子数の和の2乗に比例する。分子1g当り Z_1 モルの電子があるとすれば、分子の総電子数は M を分子量とすると $Z_1 M$ となる。このことから分子量の算出ができる。詳細は文献⁽⁹⁾に譲り、結果のみを記すと、

$$M = \frac{I_e J_0}{N \cdot P (Z_1 - \bar{v}_1 \rho_2)^2 \cdot d \cdot C} \quad (14)$$

ここに、 N はアボガドロ数、 $\bar{v}_1$ は溶質分子の偏比容、 ρ_2 は溶媒の電子密度、 d は試料の厚さ、 C は溶質の濃度である。溶液なので、 Z_1 の代りに $(Z_1 - \bar{v}_1 \rho_2)$ となっている。

5) 分子の体積

Porod⁽²⁾によって定義されたInvariantなる量、

$$Q = \int_0^\infty S^2 J(S) dS \quad (15)$$

を定義すると、分子の体積 V は次のように与えられる⁽⁹⁾。

$$V = \frac{2\pi^2 J_0}{Q} \quad (16)$$

その他にも、生体高分子の水和の程度を求める方法⁽⁶⁾や、変性した蛋白や核酸のような鎖状分子の直線性の目安となる持続長を算出することもできる⁽¹¹⁾が、未だ完全に信用できる理論とは言い難い。また、散乱強度の濃度依存性から、分子間ポテンシャルを求め、これより分子間相互作用の様子を知ることが可能である。

4. 小角散乱を生体高分子に応用した研究例

生体高分子の高次構造といっても、二次・三次構造の

ように分子鎖のfoldingに関するものから、四次構造、さらにウイルス、リボソーム、リボ蛋白質のような分子集合体まである。小角散乱は、どのような高次構造、構造変化の研究にも用いる可能性を有するから、その応用例も多岐にわたり、そのすべてを紹介することは無理である。ここでは、主として、小角散乱の長所を生かし、他の方法ではできない研究例、他の測定法と併用することで、より多くの知識の得られる例の一部を述べるに止める。さらに興味をもたれる方は、総説⁽⁸⁾、解説^(6,12)、最近の研究については *European Journal of Biochemistry*, *Journal of Molecular Biology* などの雑誌を参照されたい。

1) 二次、三次構造に関する研究^(15,16)

小角散乱の一つの利点は、精度は劣るが、結晶化しない物質あるいは未だ結晶化されていない物質の構造解析ができる点にある。

i) 合成ポリペプチド⁽¹³⁾、核酸⁽¹⁴⁾、糖蛋白質

ポリペプチドおよび核酸については、溶液中でのポリペプチドの α, β 、ランダムコイルの構造が同定できること、ヌクレオヒストン中のDNAがB型と推定されることのみ記しておく。

糖蛋白質のうち、分子量約13,000のヘパリンは、0.5 M NaCl 中で $R_g = 35.9 \text{ \AA}$ 、分子鎖の直線性の指標である持続長 $21.1 \text{ \AA}$ で、ガウス鎖の構造をもつ⁽¹⁵⁾。ヒアルロン酸⁽¹⁶⁾は0.05 M HNO_3 中で平均分子量27,000のもので、 $R_g = 80 \text{ \AA}$ 、持続長 $40 \text{ \AA}$ くらいである。分子量が大きくなると持続長は $58 \text{ \AA}$ くらいになり、分子が伸長してくるものと思われる。0.1 M HCl 中では分子量とともに第二ビリアル係数(分子間力の目安となる)も大きくなっている。

ii) 球状蛋白質の形

ミオグロビンやリゾチームのように三次構造の知られた蛋白は、X線回折との比較のためや、新しい理論や実験法の検証のための試料としてよく用いられている。構造未知の例としては、フィブリノーゼンの中性子散乱曲線を球関数の合成による新しい方法で解析した結果、このものは湾曲したバナナ形をしており、このモデルが粘度や沈降速度、拡散係数などの実験値とよく合うことがわかった⁽¹⁷⁾。

図 4

(a) 添加陽イオンと tRNA^{Phe} の R_g との関係.

(b) ミオグロビンの酸変性による R_g の変化とイオン強度との影響.

iii) 核酸の構造変化

tRNA^{Phe} , tRNA^{Ser} の熱変性⁽¹⁸⁾は、もちろん紫外吸収の変化で観測できるが、 R_g を温度に対してプロットすることによっても融解曲線が得られる。同時に、加熱によって R_g が約 $25 \text{ \AA}$ から数倍になることから、核酸が膨らむこと、 70°C ではランダムコイルであり、持続長が約 $30 \text{ \AA}$ であることもわかった。両者は 25°C でもよく似た構造をしており、 R_g ($24.4 \sim 25.1 \text{ \AA}$)、体積 ($41.5 \sim 43.4 \times 10^3 \text{ \AA}^3$)、分子量 ($26,000 \sim 27,000$) も同じくらいである。

ところで、核酸は高分子電解質であるから、溶液中に加える陽イオンによって構造が変わる。図 4-a から、添加陽イオンの原子量によって tRNA^{Phe} の R_g が大きくなってゆく様子がわかるであろう⁽¹⁹⁾。

iv) 蛋白質の変性

Kirste ら⁽²⁰⁾は、ミオグロビンの酸変性実験において、pH を下げていくにつれ、pH 4.6~4.1 の間で分子量は 1.5 倍になるが、 R_g はそれほど大きくなり、分子凝集が生じていることを見いだした。さらに pH を下げていくと、3.7 くらいから分子量は再び未変性蛋白の大きさ

まで低下し、 R_g のみが増加してゆき、変性が起きていることがわかる。pH 2 以下になると再び凝集が起こる。塩を加えてイオン強度 0.1 で同様の実験を行なうと、pH 4.1 くらいで分子量は 12 倍になり、変性はすでに pH 4.3 くらいから始まっている。塩濃度によって変性の様子が変わったことが、これで明らかになった (図 4-b)。

図 5 LDL の熱による相転移

低温相 (a) の規則構造が崩れて、内部が不規則構造になる (b) ことが、動径電子密度分布 $\rho(r)$ から推測される。

2) 分子集合体の構造と構造変化

古くから、植物ウイルス、バクテリオファージ、フェリチン、ヘモシアニンなどの研究が数多く行なわれ、現在も続けられているが、ここでは話題をもう少し限定する。

i) リボ蛋白質の構造

リボ蛋白質は、何分にも複雑なものであるから、電子顕微鏡による観察、ESR、NMR や熱測定などと組み合わせる必要がある。小角散乱の応用は未だ緒に着いたばかり

で、実験結果の解釈、解析に種々の異論があるため、現時点で一応妥当と思える結果を述べよう。

密度の違いで高密度 (HDL) と低密度 (LDL) リボ蛋白質に大別されるこの物質は、LDL が HDL のおよそ 10 倍の 200 数 10 万の分子量であり、どちらもほぼ球形をしているため、動径電子密度分布から内部構造が論じられてきた。このうち LDL は、中心から 25~30, 60~65, 105~115 Å に電子密度の高い層があり、外径は 240~280 Å である^(21,22)。内部は互に入り組んだ 2 層のコレステロールエステルから成り、最外層は蛋白とリン脂質の極性基とエステル化されていないコレステロールで構成される (図 5-a)。最外層リン脂質の炭水素鎖とコレステロールは、内部のコレステロールエステルと入り組んでいると考えられている。溶媒は中心から 55 Å のところまで浸透する。LDL は、20°C 以上でコレステロールエステルの協同的な可逆相転移が生ずることが知られている。Laggner ら⁽²³⁾は、4, 21, 37°C における電子密度分布関数を比較することによって、高温では内部のスメクティック液晶様の構造が崩れ、よりランダムな構造をとり、温度を下げていくと再び規則構造をとり、この間最外層にはほとんど変化がないことを示した (図 5)。このことは、最初に述べたモデルの妥当性を支持する有力な根拠になると考えられる。

ii) リボソームの構造

リボソームは、これまでのところ未だ結晶化されておらず、たとえ結晶化されても巨大な分子であるため、X 線結晶学的に構造を決定するには相当の時間を要するものと思われる。小角散乱が未だに有効な方法として用いられるのは、このためである。

図 6 中性子散乱より求めたリボリームの構造
RNA は内部にある。

Österberg らは、種々のリボソーム構成物の研究を行なった。5 S RNA⁽²⁴⁾ の散乱曲線は、Y 字形をした 2 重らせんモデルから計算した曲線と最もよく合い、 R_g は 36.1 Å で、変性すると 27 Å になる。このことは、変性すると伸展していたものが糸まり状に縮むためと思われる。この 5 S RNA に結合する L 18 蛋白⁽²⁵⁾は、長さ 113 Å、太さ 18 Å の細長い偏長回転楕円体で、同じく L 25⁽²⁵⁾ 蛋白は長さ 104 Å、太さ 17.7 Å の回転楕円体であった。16 S RNA と結合する 30 S 粒子の S 4⁽²⁶⁾は 3 軸が 90, 25, 4 Å の細長い楕円体である。L 7/L 12 蛋白⁽²⁷⁾は、リボソーム中に同じ分子が 4 個含まれるが、4 量体として結合するのか、2 個の 2 量体が存在するのかよくわからない。ただ、溶液中では、分子量 23,400 で単量体の 2 倍の分子量を有し、この 2 量体は軸長がそれぞれ 90, 16, 6 Å の楕円体である。なぜこれらの蛋白がそろって偏長な形をしているか不思議であるが、データの精度が良くないので、今のところ完全に信じるわけにはいかない。

Stuhrmann⁽²⁸⁾ らは、50 S 粒子の中性子散乱に contrast variation 法を用い、RNA (72.5 Å) と蛋白 (73.4 Å) の R_g を分離して求めた。全体の R_g は 78.0 Å であった。また、RNA が内部に、蛋白が外部にあることもわかった。球函数合成法によって得られた形は図 6 のようなものであり、電子顕微鏡で見られる像とかなりよく合っているから、溶液中での構造は試料の染色処理、乾燥によってもあまり変形されていないようである。級数のより高次の項まで用いればもっと細かな所まで見えるが、膨大な計算量となり、目下のところ、この程度が限界であろう。

図 7 免疫グロブリンの模式図

iii) 蛋白質の四次構造変化, 相互作用

四次構造をもった蛋白質は、脂肪酸合成酵素、グリコーゲンホスホリラーゼ、RNA ポリメラーゼ、ウサギ筋肉からのホスホフラクトキナーゼなど、数多くあり、オリゴメリックな構造をした物体の散乱曲線の計算法も考案されている。しかし、4次構造研究の面白さは、エフェクターの影響による構造変化にあるので、こうしたものの例について述べよう。

a) 抗体のハプテンによる構造変化

抗体そのものの構造が結晶状態と溶液とでは違うらしいことが最近言われたしている。たとえば免疫グロブリン Kol は、0.15 M の食塩中では F_{ab} の長さは 210 Å であるのに、結晶中では 146 Å しかない。 R_g の値や散乱曲線も結晶より得られた形と一致しない。種々の結果を総合すると、溶液中での構造は結晶中より伸展している。この差は、蝶番 (hinge) 部分の柔軟性によるものと思われる⁽²⁹⁾ (図 7)。

抗原と抗体の相互作用を見るためには、抗原のように大きな分子を抗体に結合させたのでは抗体自身の構造変化が見られなくなる。そこで、抗原にはならないが抗体と結合する低分子量の物質 (ハプテン) を結合させれば、抗体の分子量 (約 15 万) に比してハプテンの分子量は数百であるから、無視できて非常に好都合である。ジフテリア毒素とヒトの血清アルブミンに、ポリ-D-アラニンと結合させたものを抗原として作られたポリ-D-アラニン抗体に、 $(D-Ala)_4$ をハプテンとして結合させた場合、前者の抗体では結合部位の 90% がハプテンで占められると、体積は 10%, R_g が 7.7% 減少する。一方、後者の抗体の 62% を $(D-Ala)_4$ で飽和させたときは体

図 8 GPDH の NAD 飽和度に対する体積収縮率
最大収縮率を 1 としている。破線は飽和度に対して収縮率が比例する場合の直線。

積は 3.2%, R_g は 1.4% 減少した。この間、分子量や抗体の太さは不変であった⁽³⁰⁾。面白いことに、抗体の断片である F_{ab} や $(F_{ab}')_2$ では、このような変化が見られない⁽³³⁾。 p -azophenyl- β -lactoside をハプテンとした場合も、50% 飽和で R_g が 2.5%, 体積が 2% 小さくなる⁽³¹⁾。太さは不変であった。これらの結果から、抗体は抗原と結合すると、分子の大まかな形は変わらないが、何らかのコンフォメーション変化を起こして収縮するものと考えられる。

b) アロステリック効果による構造変化

Durchschlag ら⁽³²⁾は、グリセロールデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) に pH 8.5, 40°C で補酵素の NAD を加えていき、GPDH の体積がどう変化するかを調べた。NAD の飽和度を 23, 46, 72, 100% と変えていくと、GPDH は収縮していき、100% 飽和では 7% 収縮した。縦軸に収縮率、横軸に飽和度をプロットすると、その様子は図 8 のようになる。これからわかるように、収縮率は飽和度に比例していない。もし、Koshland の induced fit モデルに従うならば、体積変化は飽和度に比例するはずである。Monod-Wyman-Changeux 型のモデルなら、必ずしも直線なくてよいから、こちらの機構でアロステリック効果を解釈するほうが、少なくとも GPDH に関しては妥当である。

*

小角散乱法は、何分にも X 線回折法などと比べると

まだ発展途上の段階にあり、実験法や解析法も完全とはいえない面がある。生体高分子の研究への応用も、実験技術の向上にともない、ようやく有用性が認められる段階に達してきた。これから位置敏感型計数管が実用化されるにつれ、さらに短時間の構造変化の追跡も可能になる。

わが国では、研究用原子炉も、シンクロトン放射(SOR)による強力で良質なX線発生のためのフォトン・ファクトリーも諸外国、特に欧州に比べて大きく遅れている。目下進行中のこれらの計画が完成しても、グルノーブル(中性子)やハンブルクの DESY (SOR) に匹敵しうる研究の行なえるだけ充実した設備になるであろうか?

文 献

- 1) A. Guinier & G. Fournet: "Small-Angle Scattering of X-Rays", John Wiley & Sons, New York and Chapman & Hall, London, 1955.
- 2) G. Porod: *Kolloid-Z.*, **124**, 83 (1951).
- 3) 仁田 勇編: "X線結晶学(上),(下)", 丸善, 東京, 1961.
- 4) O. Kratky, G. Rorod & Z. Skala: *Acta Phys. Austriaca*, **13**, 76 (1960).
- 5) J. A. Lake: *Acta Cryst.*, **23**, 191 (1967).
- 6) O. Kratky: *Prog. Biophys. and Biophys. Chem.*, **13**, 105 (1963).
- 7) L. E. Alexander: "X-Ray Diffraction Methods in Polymer Science", Wiley (Interscience), New York, 1969 (桜田, 浜田, 梶, 訳: "高分子のX線回折(下)", 化学同人, 京都, 1973).
- 8) O. Kratky & I. Pilz: *Quart. Rev. Biophys.*, **5**, 481 (1972).
- 9) H. Stuhmann: *Acta Cryst.*, **A26**, 297 (1970).
- 10) O. Glatter: *Acta Phys. Austriaca*, **36**, 307 (1972).
- 11) O. Kratky & G. Porod: *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **68**, 1106 (1949).
- 12) I. Pilz: "Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Pt. C", ed. by S. J. Leach, Academic Press, New York and London, 1973.
- 13) A. I. Grigorev, L. A. Volkova & O. B. Ptitsyn: *FEBS Lett.*, **14**, 189 (1971).
- 14) S. Bram: *J. Mol. Biol.*, **58**, 277 (1971).
- 15) S. S. Stivala, M. Herbst, O. Kratky & I. Pilz: *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 795 (1968).
- 16) R. L. Cleland: *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 57 (1977).
- 17) G. Marguerie & H. Stuhmann: *J. Mol. Biol.*, **102**, 143 (1976).
- 18) I. Pilz, F. Maling, O. Kratky & F. Von der Haar: *Eur. J. Biochem.*, **75**, 35 (1977).
- 19) I. Pilz, O. Kratky, F. Von der Haar & F. Cramer: *Eur. J. Biochem.*, **18**, 436 (1971).
- 20) R. Kirste, G. Schulz & H. Stuhmann: *Z. f. Naturf.*, **24b**, 1385 (1969).
- 21) P. Laggner, K. Müller, O. Kratky, G. Kostner & A. Holasek: *J. Colloid Interface Sci.*, **55**, 102 (1976).
- 22) A. Tardieu, L. Mateu, C. Sardet, B. Weiss, V. Luzzati,

- L. Aggerbeck & A. M. Scanu: *J. Mol. Biol.*, **101**, 129 (1976).
- 23) P. Laggner, G. Degovics, K. Müller, O. Glatter, O. Kratky, G. Kostner & A. Holasek: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 771 (1977).
- 24) R. Österberg, B. Sjöberg & A. Garrett: *Eur. J. Biochem.*, **68**, 481 (1976).
- 25) R. Österberg, B. Sjöberg & A. Garrett: *FEBS Lett.*, **65**, 73 (1976).
- 26) R. Österberg, B. Sjöberg & A. Garrett: *FEBS Lett.*, **73**, 25 (1977).
- 27) R. Österberg, B. Sjöberg, A. Liljas & I. Pettersson: *FEBS Lett.*, **66**, 48 (1976).
- 28) H. Stuhmann, M. Koch, R. Parfait, J. Haas, K. Ibel & R. Crichton: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 2316 (1977).
- 29) I. Pilz, E. Schwarz & W. Palm: *Eur. J. Biochem.*, **75**, 195 (1977).
- 30) I. Pilz, O. Kratky, A. Licht & M. Sela: *Biochemistry*, **12**, 4998 (1973).
- 31) I. Pilz, O. Kratky & F. Karush: *Eur. J. Biochem.*, **41**, 91 (1974).
- 32) H. Durchschlag, G. Puchwein, O. Kratky, I. Schuster & K. Kirschner: *Eur. J. Biochem.*, **19**, 9 (1971).
- 33) I. Pilz, O. Kratky, A. Licht & M. Sela: *Biochemistry*, **14**, 1326 (1975).

Integrated Control of Weeds

(雑草の総合防除)

J.D.Fryer, S.Matsunaka 編 菊判・270頁 5000円

1975年10月、東京において第5回アジア太平洋雑草学会が開催され、同時に「雑草の総合防除」をテーマとしたシンポジウムも行なわれた。本書は、このシンポジウムで発表、討議された成果を各モノグラフの形で10編集録している。

【目次】序論/J.D.Fryer 農作物への雑草被害: 雑草競合による減少/H.Chisaka 米作における雑草の総合防除/K.Noda 畑作物の雑草防除のための除草剤の総合的利用/R.R.Romanowski 熱帯プランテーションにおける雑草の総合防除/A.K.Seth 牧草地における雑草の総合防除/L.J.Matthews 水域における雑草の総合防除/M.Soorjani 雑草の生物防除/L.A.Andres 除草剤と環境問題/P.C.Kearney 米作における雑草防除技術の経済的評価/S.K.De Datta 他 雑草の防除技術の総合化/W.B.Ennis, Jr. 総合討論

東京文京 東京大学出版会 総目録呈