

SPring-8 構造生物学用理研ビームライン1・ 小角散乱 (BL45XU)

藤澤 哲郎

理化学研究所・播磨研究所・構造生物物理研究室*

Small-angle X-ray Scattering Beamline at SPring-8, RIKEN Structural Beamline 1 (BL45XU)

Tetsuro FUJISAWA

Structural Biophysics Laboratory, RIKEN Harima Institute/SPring-8

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). The beam is split into the two branches by diamond monochromator so that PX and SAXS experiments can be done simultaneously [Yamamoto *et al.* (1995) *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1833–1835]. The SAXS branch was designed for studying the weak interaction of proteins or subunits of fibers or protein solution, especially using hydrostatic pressure. The clean and stable optics were realized by an undulator source with diamond monochromator and a K-B type focusing mirror system. The optics was optimized at the wavelength of 1.0 Å, rather than 1.5 Å, while the lower limit of recording angle is small ($d \approx 1400 \text{ \AA}^{-1}$). Collimated beam has a size of $0.6 \times 0.3 \text{ mm}$ (horizontal \times vertical) with a flux of 1×10^{12} photons at 100 mA. In order to cope with high flux of the beam, an X-ray image intensifier with a cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics) is used. The use of this detector to solution X-ray scattering has been systematically studied.

Key word: synchrotron radiation, small-angle X-ray scattering proteins in solution

1. はじめに

理研ビームライン1 (BL45XU) はSPring-8に設置された結晶構造解析と小角散乱の実験を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ーからの回折の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ーが主なテーマとなる。生物試料特に溶液を対象とした時の小角散乱解析手順を示したのがFig. 1である。小角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して構造を評価するが低分解能の構造情報しか得られない。近年高分解能NMRや結晶構造解析の急速な進歩により、高分解能な構造を決定するスピードが短くなっているなかで、生物学の中での小角

散乱の役割として二つに大別できるであろう²⁾。第1点は結晶化が難しいシステムでの研究。第2点は時間分解測定である。前者の代表例としてはランダムコイル状態から蛋白質が折れ畳む反応、すなわち蛋白質の折れ畳み問題³⁾や結晶化されにくい巨大蛋白質複合体⁴⁾。後者としては筋肉の収縮反応^{5,6)}や光反応に伴う膜蛋白質の構造変化⁷⁾が挙げられる。筆者は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間といった弱い結合によって制御されており、そのような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考えている。特に静水圧を使用した蛋白質間相互作用の研究に興味をもっている^{8,9)}。このように小角散乱といってもサイエンスにより、全く違った形の散乱、回折を扱うので違ったタイプのビームラインが必要とされる。第3世代放射光の小角散乱のビームラインとしては、high fluxを利用した高速時分割反応を目指す方向と、挿入光源の平行性を生かした

* 理化学研究所・播磨研究所・構造生物物理研究室 〒679-5143 兵庫県作用郡三日月町三原323-3
TEL 07915-8-2815 FAX 07915-8-2816 e-mail fujisawa@sp8sun.spring8.or.jp

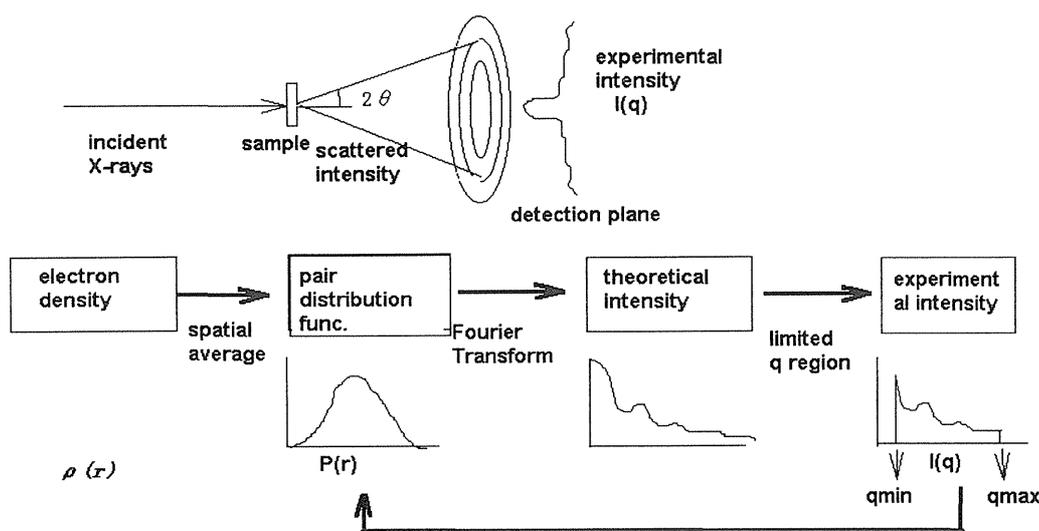


Figure 1. Principle of small-angle x-ray scattering.

This figure indicates the flow of small-angle x-ray scattering, especially solution system. In solution particle can take random orientation, its scattering becomes isotropic and a function of scattering angle 2θ . Pair distribution function is the distribution of the distances between two atoms inside the particle.

理想的な光学系により高分解能測定を目指す方向に大別され理研は後者を目指すビームライン設計になっている。

2. 光学系設計

理研ビームラインでは小角散乱で使用する波長は通常 1.0 \AA である。この波長を使用することにより高圧セルの窓材などの吸収を大幅に減らすことができる⁸⁾。分岐を行うダイヤモンドモノクロメーターは $7 \text{ KeV} \sim 14 \text{ KeV}$ まで連続的に波長を変えることができるが実質上、変更することは希である。BL45XU の発光点でのビームサイズは $0.394 \times 0.0271 \text{ mm}$ (水平 \times 垂直), 発散は $19.5 \mu\text{rad} \times 8.83 \mu\text{rad}$ (水平 \times 垂直) である。Hi- β セクションを使用しているので非常に発散の小さい光である。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た。Fig. 2 に BL45 の光学系の配置と寄生散乱の光学配置を示す。寄生散乱の主な要因は窓材, スリットからの散乱である。光量を最大にするためにできるだけビーム自体を切り込まずにスリットを設定した場合, Fig. 2 からわかるように寄生散乱はスリット 2 とスリット 3 の距離が離れていれば離れているほど良いことになる。Table 1 はビームサイズの設計値と実際の測定値である。水平方向のビームサイズからわかるように集光自体はうまくいっていると言える。そのわりには小角分解能が出ていない理由はビームの裾のせいである。挿入光源の場合輝度が高いので, その部分でもそこにスリットなり物があれば強烈的な寄生散乱を発生させる。Table 1 はガニエプロットにおける小角分解能を示すが, 実際の値が D_{max1} より D_{max2} に近いのはスリット 2 よりも, スリット 3 からの寄生散乱が寄与していることによると考えられる。それでも波長

1.0 \AA で小角分解能が $d=1200 \text{ \AA}$ はできていることがわかる。挿入光源は発散が小さいのでこれらの値はカメラ長を 10 m 程度に伸ばすだけで, サブミクロンまで達成できることが予想される。現在スリットのブレード等を変更して寄生散乱を減らすことを検討している。

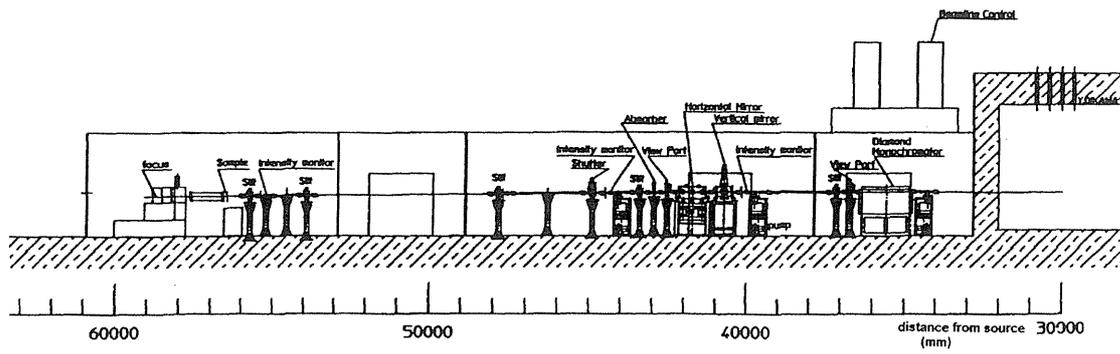
3. 実験ハッチレイアウト

サンプル位置は光源より 56.4 m ないしは 56.0 m で固定, focus 位置は 58.2 m である。カメラ長の変更は検出器架台をスライドさせ真空パスを付け替えることにより行われる (Fig. 3 参照)。カメラ長は $0.6, 1.0, 1.9, 2.2 \text{ m}$ と 4 種類用意されている。現在の focus サイズはおよそ半値幅で垂直方向が 0.2 mm 水平方向が 0.4 mm である。ガードスリットにおいては開口部が $0.4 \text{ mm} \times 0.8 \text{ mm}$ である。サイクルごとに若干変化するが, サンプル位置では 1 mm 角以内には全て収まっている。標準の溶液散乱用セルは温度コントロール可能で開口部 $4 \text{ mm}\phi$, 光路長 3 mm (容量約 0.05 ml) を用いている。

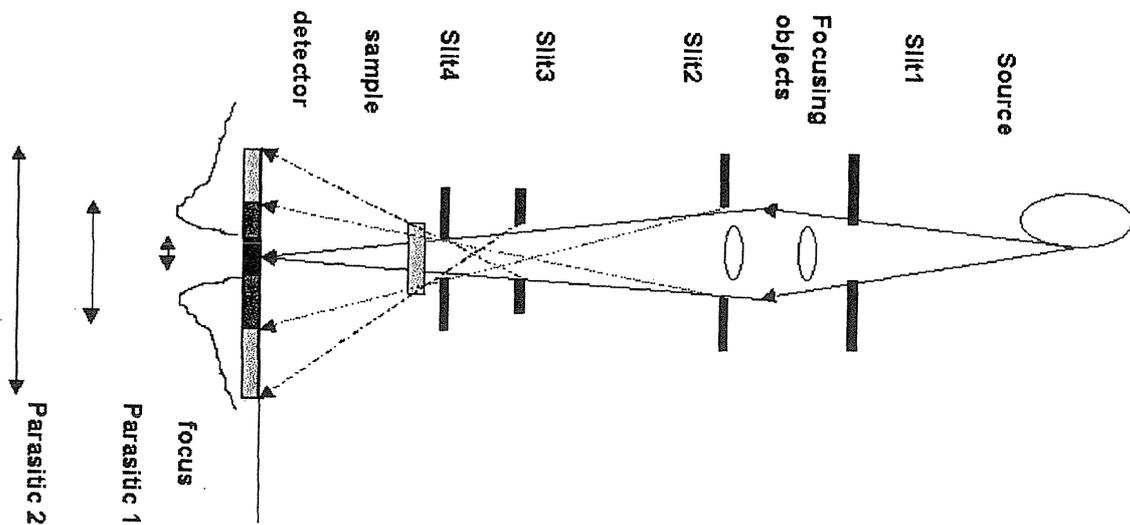
ビームストップが入っている真空チャンバー内に可動式アームが設置しており, 吸収を測定する場合にはビームストップ前にカプトン膜を置きそのピーク積分値により測定される。

4. 検出器

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用さ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 $10^4 \text{ photons/s/mm}^2$ 程度の散乱光しか処理できず, 第 3 世代からの高 flux をカバーすること



(a)



(b)

Figure 2. Layout of the BL45XU-SAXS and schematic of parasitic scattering (a) the layout of the SAXS branch of BL-45XU; (b) schematic of the origin of parasitic scattering.

Table 1 theoretical beam size at various position

	Horizontal 2.35σ	Vertical 2.35σ	Horizontal (Exp.) 2.35σ	Vertical (Exp.) 2.35σ
Mirror	1.90 mm	0.84 mm	1.01 mm	0.77 mm
focus	0.39 mm	0.02 mm	0.35 mm	0.15 mm
Sample	0.55 mm	0.12 mm	0.67 mm	0.53 mm
Slit 2 (after mirror)	1.74 mm	0.70 mm	1.09 mm	0.91 mm
Slit 3 (guard slit)	0.71 mm	0.20 mm	0.87 mm	0.59 mm
Parasitic region 1	0.26 mm	0.11 mm		No data
Parasitic region 2	2.37 mm	1.94 mm		
Dmax1 (1.8 m)	6927 \AA^{-1}	16422 \AA^{-1}	1400 \AA^{-1} (2.2 m), 1200 \AA^{-1} (1.8 m),	
Dmax2 (1.8 m)	756 \AA^{-1}	923 \AA^{-1}	580 \AA^{-1} (1.0 m), 340 \AA^{-1} (0.6 m)	

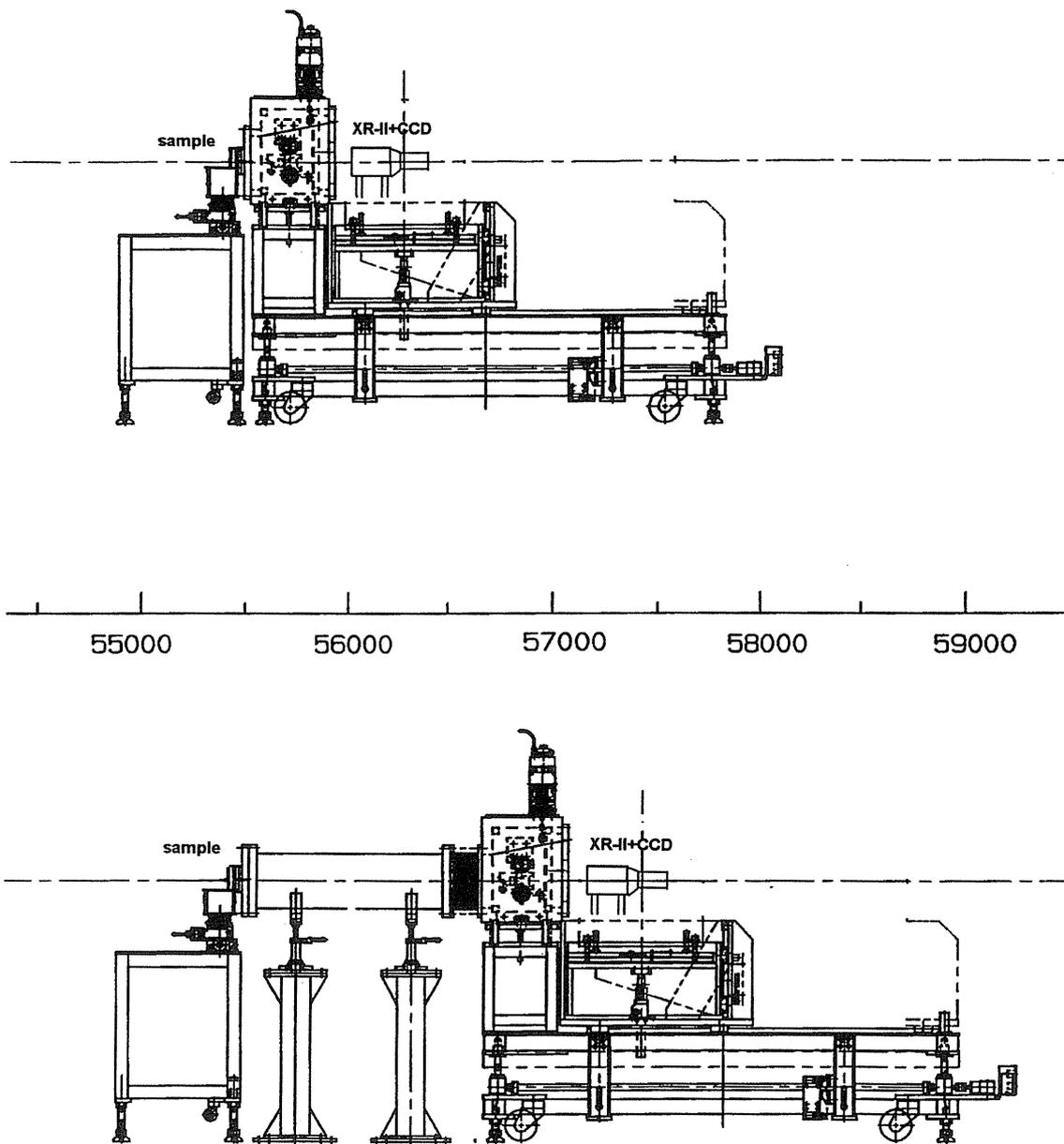


Figure 3. Layout of experimental hutches

(a) the camera set at 1.8 m camera; (b) the camera set at 0.6 m. The vacuum tube and chamber are made of plastic in order to reduce weight. A sliding arm is installed inside the vacuum chamber. The head of the arm holds Kapton film. By inserting the Kapton film absorption will be measured.

は難しい。多くの放射光施設では入射光を弱めたり、検出面に吸収材をおいたりして対処しているが^{10,11)}、いずれにせよ第3世代の放射光源で蛋白質の溶液散乱を測定することは皆無であり、検出器をどうするかが小角散乱ビームライン担当者の最大の関心事となっていた。理研においてはX線イメージンテンシファイアー+CCD検出器(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

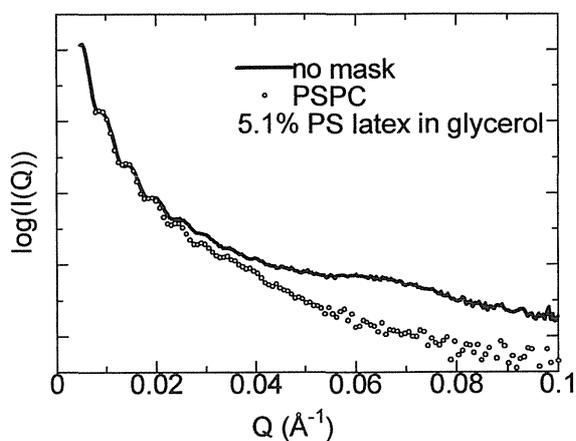
出器で東大雨宮らによって開発された。この検出器は 5×10^7 photons/s/mm²という高散乱強度においても検出可能である¹²⁾。しかし当初から検出面の中心部から周辺部にかけて系統的に画像がひずみ、検出感度が変わることが報告されており、様々な補正ソフトも開発されてきた^{13,14)}。また、それらは回折像を扱うもので、構造を持たない溶液散乱では最終的に検出器の特性がどのように解析結果に影響するか評価する必要があり、未だなされていなかった。我々は実際にこの検出器を用いた解析結果がどれぐらい実用に耐えうるかに重点をおいて評価を行った。サンプルとし

特に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時されることがわかっている。Fig. 4a 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。一見してわかることであるが一番散乱強度が強いところから2桁ほどさがったあたりからゴーストピークがでだしてきただけで中心部に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。またマスクをした散乱像でも最大強度より2桁下がったところに同じような現象が見られた¹⁵⁾。これらの事実よりこの検出器は実質上ダイナミックレンジが2桁程度しかなく、ソフトでそれを補正することは困難であることがわ

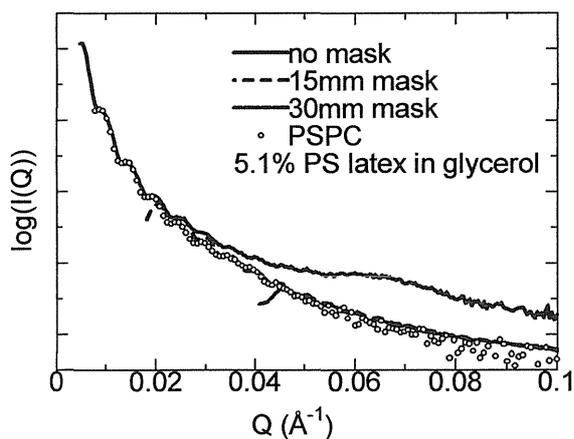
かる。しかしダイナミックレンジを満たすような測定をしてやると正しい解析結果をだすことは可能である (Fig. 4b)。格子状パターンのイメージングプレートとの比較でこの検出器のひずみを評価すると、回転半径などは55ピクセル以内の中心領域を使用すれば1%以下の誤差となり問題ない¹⁶⁾。また動径分布関数 $P(r)$ 関数などもダイナミックレンジに気をつけていけば差異は観測されなかった。そこで検出器の影響が非常に受けやすい溶液散乱の解析例をとおしてXR-II+CCD 使用について吟味してみる。

5. 測定応用例¹⁷⁾

ここで1次元の散乱曲線 $I(q)$ は2次元データを円周積分したものであり、次式に示すように得られたものである。



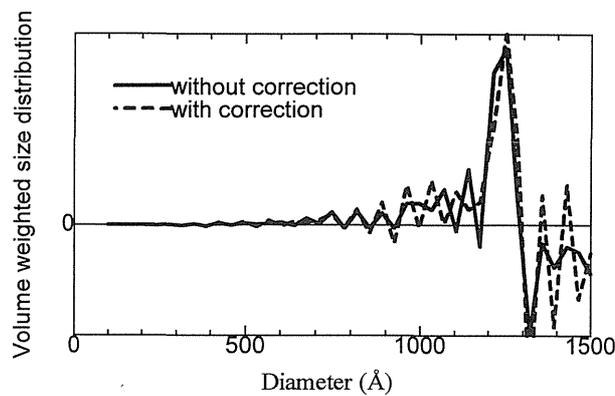
(a)



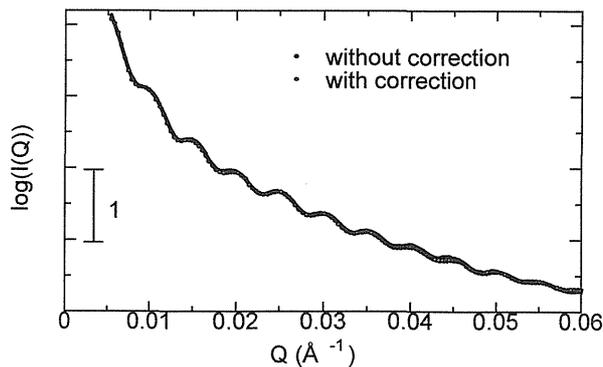
(b)

Figure 4. SAXS pattern from polystyrene latex.

The weight concentration of polystyrene latex was 5.1% dispersed in 52.1 wt% glycerol. (a) Collection time of PSPC and XR-II+CCD were 600 sec and 350 msec, respectively. (b) Center area was masked so as to cut incident x-ray. Collection time of 15 mm ϕ mask and 30 mm ϕ mask were 10 sec and 12 sec, respectively.



(a)



(b)

Figure 5. Size distribution obtained from a reconstituted SAXS profile with XR-II+CCD. (a) Size distributions calculated from SAXS profiles without correction for detector distortion (solid line) and with correction (broken line). Within this region, it is very difficult to see the difference between these two. The peaks of the size distributions are at 1250 Å with a half width of 43 Å and at 1250 Å with a half width of 48 Å, with and without detector correction. (b) The fitting of (a) in scattering intensity. Solid circles and open circles are data points with and without detector correction, respectively. The solid line and broken lines are fitted scattering intensity with and without detector correction, respectively.

$$I(q) = \{I(q)_{\text{sample}} - I(q)_{\text{dark-sample}}\} / A_{\text{sample}} - (1 - \nu C / 1000) \\ \times \{I(q)_{\text{buffer}} - I(q)_{\text{dark-buffer}}\} / A_{\text{buffer}}$$

ここで、 $q = 4\pi \sin^2 \theta / \lambda$ (2θ は散乱角、 λ は波長) $I(q)_{\text{sample}}$, $I(q)_{\text{buffer}}$, $I(q)_{\text{dark-sample}}$, $I(q)_{\text{dark-buffer}}$ は円周積分されたサンプル, buffer, dark image の散乱強度 ν は偏比容, C は溶質の濃度 (mg/ml), A_{samp} と A_{buffer} は入射強度によるスケール因子である。あえて補正はかけていない状態でどの程度散乱曲線が影響されるか評価してみた。以下に示す例はいずれも非常に対称性が高く散乱に構造もっているような系である。

5.1 ポリスチレンラテックス

ポリスチレンラテックスは1500 Å 以上の球状高分子で、サイズの分散が非常に小さい。特にセキスイ社製のポリスチレンラテックスはその散乱が球の理論散乱曲線と合致すると考えられている。XR-II+CCD で測定しても理論的に予想される $I(q) \propto q^{-4}$ (Porod 則) が実際の散乱でも確認された。

さらにポリスチレンラテックスのサイズ分布は以下の式を使って評価できる

$$I(q) = \int \Phi^2(qD) N(D) V^2(D) dD \\ \Phi(qD) = 3(qD)^{-3} \{ \sin(qD) - (qD) \cos(qD) \}$$

ここで $\Phi(qD)$ は球の構造因子, $N(D)$ は直径 D の体積重みを付けたサイズ分布関数である。このような式を解こうとすると、検出器のひずみ等に敏感に影響される。Fig. 5 は実験データをフィットすることにより得られたサイズ分布関数とフィット結果である。直径が1250 Å でサイズの半値幅が3.8%であった。この結果は光散乱や電子顕微鏡像で得られる結果と非常に一致を示した。

5.2 アポフェリチン

アポフェリチンは24分子の蛋白質が432 symmetry に配列し球殻構造を形作っている。生体内では鉄分子を球殻内部に取り込み貯蔵する役目をしていると考えられている。アポフェリチンは球対称な物質と考えられるのでその場合の動径方向の電子密度 $\rho(r)$ は

$$\rho(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty \pm |I(q)|^{1/2} \frac{\sin(qr)}{qr} q^2 dq$$

で求めることができるが、この場合各ピークの符号(位相)をどのように決めるか、0にならないところをどうするか、あるいは打ち切り誤差をどうするかといった問題が生じる。このような問題は理論的には 'box refinement methods' を使えば克服される¹⁸⁾。すなわち①任意の電子密度から出発し、フーリエ変換して位相をだす②その位相

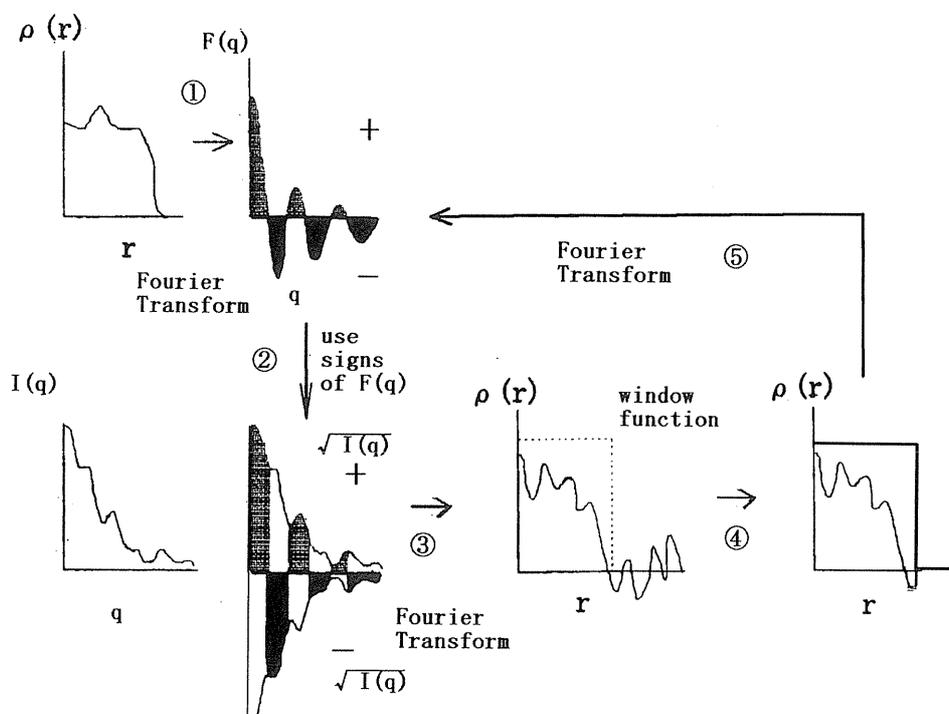


Figure 6. Box refinement procedure.

1. The phases are calculated by Fourier transformation of initial arbitrary electron density. 2. Signs of each peak of scattering intensity are assigned based on the phases. 3. Electron density is calculated. 4. Electron density over given radius is set to zero. 5. The phases are calculated from electron density given by procedure 4, then go back to the procedure 2.

を使って各ピークの符号を決める。③電子密度を計算する④ある大きさ以上の電子密度は0とする⑤フーリエ変換を行い位相をだす。②から⑤を繰り返すと解は正しい電子密度に収束することが証明されている (Fig. 6)。このような解析はピーク位置だけでなく、高さ形が影響されるので逆空間で観測される以上に実空間での差が大きくなる。XR-II+CCD で散乱像を計測すると PSPC に比べてピークの谷間の落ち込みが悪い。しかしながら、散乱から得られる $\rho(r)$ は結晶構造解析によって得られた原子座標から計算された $\rho(r)$ と非常によく一致することから、ダイナミックレンジと使用領域さえ気をつけていれば正しい結果をだすことがわかる (Fig. 7)。XR-II+CCD の注意事項は Table 2 にまとめを書いておいた。

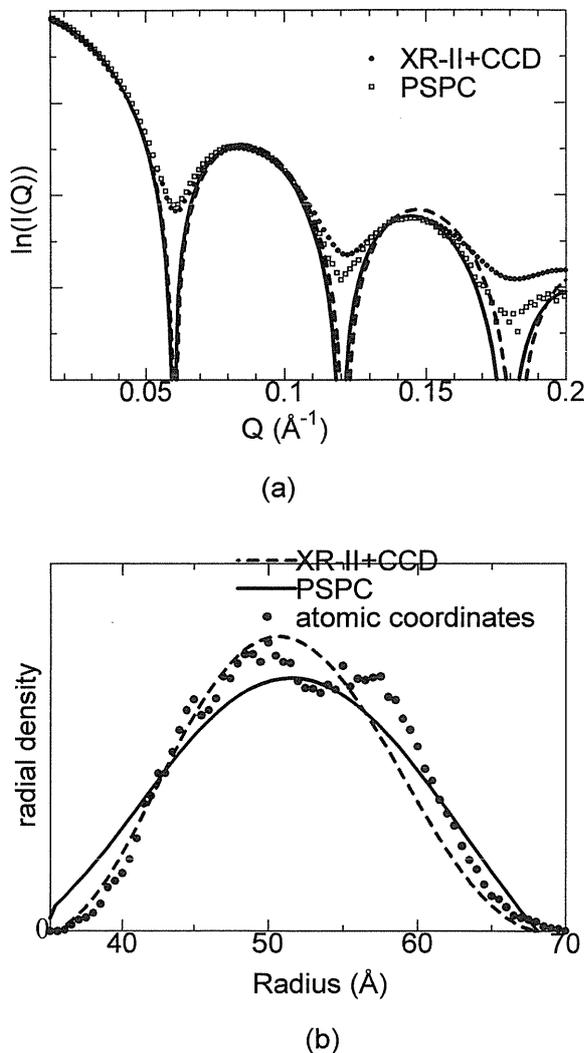


Figure 7. Calculation of radial density distribution from apoferritin. Fitting result of radial density distribution (a) and its corresponding result (b). Solid circles are SOXS from X-II+CCD, open squares are those from PSPC. The broken and solid lines are the fitting of XR-II+CCD and PSPC data in the range of $Q < 0.20 \text{ \AA}^{-1}$, respectively. (b) Corresponding result of fitting is shown. Symbols are the same as in (a).

Table 2 A Guide for the usage of XR-II+CCD detector in SAXS

- | | |
|----|--|
| A) | Set the time and aperture so that the maximum intensity becomes 60 or 70% of pixel depth. |
| B) | Record the dark image after every sample and buffer measurement. |
| C) | The net signal should be large enough to avoid digitization error. Parasitic scattering should therefore be minimized so as to maximize the net count in limited data collection time. |
| D) | Practical dynamic ranges for CCDfast and CCDslow are 40:1 and 100:1 respectively. The high intensity region should be masked. |
| E) | In the case of Guinier analysis, a shorter camera length is better; for example, $L(\text{mm}) < 40 R_g(\text{\AA})$, if there are no distortion and shading effects. |

6. BL45XU の今後の展開

Table 2 からわかるように XR-II+CCD は必ずしも溶液散乱に最適化された検出器ではなく、それを適切に用いるには煩雑な手続きも必要である。また、挿入光源を用いて輝度が向上しているために X 線照射によるダメージが顕著になっており、多くの蛋白質溶液では 30 秒以上の X 線照射は会合、沈殿等を伴っている。それでは一体 BL45XU ではどのようなメリットがあるのだろうか？

- ① 統計精度の向上に伴う測定時間測定サンプルの大幅な減少、時分割測定の可能性。
- ② 比較的短波長でも小角分解能がでる。
- ③ ビームサイズ減少による特殊セルホルダーの可能性などがあげられよう¹⁹⁾。特に①に関しては、筑波 PF-BL10C の 1/5 程度の稀薄溶液でもわずが 1 秒たらずで測定でき、蛋白質分子の全分子設計の評価に使用されている²⁰⁾。また、時分割の精度が圧倒的に向上し今まで見えなかった紫膜構造変化の中間体や蛋白質折れ畳の中間体といった時分割測定も報告されている^{7,21)}。③に関しても高圧セル、高圧ストップフローといった静水圧下における蛋白質の物性・構造に関する研究²¹⁾が行われつつある。また、本原稿は溶液散乱を中心に扱ったが、平成 11 年 3 月より筋蛋白質ゲル・ファイバーの小角散乱を扱う構造生物化学研究室・前田雄一郎主任のグループが理研に加わり、その方面の仕事が今後本ビームラインで大きな割合を占めていくことが期待される。

謝辞

BL45 小角ステーションの建設にあたり、実際に参加していただいた方々、井上勝晶博士を始め岡俊彦氏、岩本裕之博士、八木直人博士、猪子洋二博士に深く感謝いたします。また、本ビームラインは石川哲也博士をグループヘッドとする SPring-8 共同チームの多くの方々の協力により建設されております。最後に、理研構造生物学推進グループの主任の方々、井上頼直博士、飯塚哲太郎博士、特に、

植木龍夫博士がビームライン計画立案に深く関与されましたことを付け加えさせていただきます。

参考文献

- 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) 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」.
- 3) M. Kataoka, J. Flanagan, F. Tokunaga and D. M. Engelman: *Synchrotron Radiation in Biosciences*, 187 (1994).
- 4) Y. Aso, T. Fujisawa, Y. Hiromasa, K. Meno and K. Kobayashi: *PFOTON FACTORY ACTIVITY REPORT*, 255 (1996).
- 5) 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).
- 6) K. Wakabayashi, H. Tanaka, T. Kobayashi, Y. Amemiya, T. Hamanaka, S. Nishizawa, H. Sugi and T. Mitsui: *Biophys J* **49**, 581 (1986).
- 7) 岡 俊彦, 八木直人, 藤澤哲郎, 植木龍夫, 徳永史生：第36回日本生物物理学界年会 (1998).
- 8) M. Kato and T. Fujisawa: *J. Synchrotron Rad.* **5**, 1282 (1998).
- 9) T. Fujisawa, M. Kato and Y. Inoko: *Biochemistry* **38**, 6411 (1999).
- 10) H. Tsuruta, S. Brennan, Z. U. Rek, T. C. Irving, W. H. Tompkins and K. O. Hodgson: *J. Appl. Cryst.* **31**, 672 (1998).
- 11) H. Amenitsch, M. Rappolt, M. Kriechbaum, H. Milo, P. Lagner and S. Bernstorff: *J. Synchrotron Rad.* **5**, 506 (1998).
- 12) Y. Amemiya, K. Ito, N. Yagi, Y. Asano, K. Wakabayashi, T. Ueki and T. Endo: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 2290.
- 13) A. P. Hammersley, S. O. Svensson and A. Thompson: *Nucl. Instr. Meth. Section A* **346**, 312 (1994).
- 14) 伊藤 隆：博士号学位論文，総合科学技術大学院 (1998).
- 15) 藤澤哲郎, 猪子洋二, 八木直人：第12回日本放射光学会年会 (1999).
- 16) T. Fujisawa, N. Yagi, K. Inoue, T. Oka, H. Iwamoto and T. Ueki: *Spring-8 annual report 1997*, 238 (1998).
- 17) T. Fujisawa, Y. Inoko and N. Yagi: *J. Synchrotron Rad.* in preparation (1999).
- 18) D. I. Svergun, L. A. Feigin and B. M. Schedrin: *Acta Crystallogr. Sec. A* **40**, 137 (1984).
- 19) 藤澤哲郎：理研シンポジウム「構造生物学 (Ⅳ) —SPRING-8 と構造生物学研究—」 (1999).
- 20) Y. Isogai, M. Ota, T. Fujisawa, H. Izuno, M. Mukai, H. Nakamura, T. Iizuka and K. Nishikawa: *Biochemistry* **38**, 7431 (1999).
- 21) 藤澤哲郎：フォトンファクトリー研究会「高輝度光源を利用した X 線溶液散乱の展望：新酵素回折系の役割」報告 (1998).