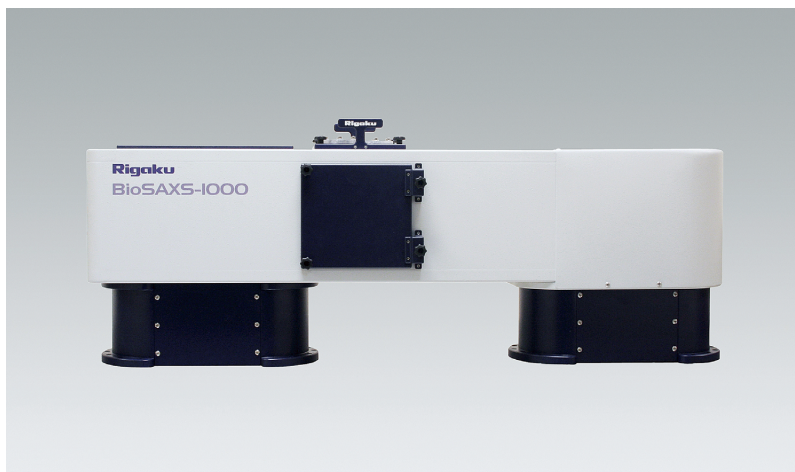


X 線小角散乱測定装置

BioSAXS-1000



1. はじめに

X 線小角散乱測定装置 BioSAXS-1000 は、既存の回転対陰極型 X 線発生装置を含む、様々な X 線源と組み合わせることができる、生体高分子用の小角散乱測定装置です。X 線小角散乱法（SAXS 法）は、未知構造の決定のみならず、既に構造がわかっている場合にも有用で、構造生物学研究を進める上で非常に役立ちます。生体高分子の構造を得る方法として、X 線結晶構造解析法、電子顕微鏡法、NMR 法等が、しばしば用いられます。

しかし、単結晶構造解析法では、単結晶を作成する必要があります。電子顕微鏡法では、二次元結晶を作成する必要があります。この 2 つの方法は、単結晶さえ得られれば、超分子複合体のように分子量が大きくても、詳細な分子構造を得ることができる利点がありますが、単結晶が得られないと、構造も得ることができません。また、得られた構造は静的な構造であり、溶液状態の動的な構造を得ることはできません。一方、NMR 法は、溶液状態のタンパク質の構造を得ることができる利点がありますが、安定同位体標識したサンプルを準備する必要がありますし、解析できる分子量は 40 kDa 程度が上限であり、超分子複合体の全体構造や、天然変性タンパク質の全体構造を得ることは、極めて困難です。

これに対し、X 線小角散乱法は、得られる分解能は

さほど高くはありませんが、生体高分子溶液に特別な手を加えることなく、そのままの状態での測定でき、溶液中での分子量や、分子の凝集状態に関する情報も得られるため、結晶化が困難な複合体の全体構造や活性状態の構造を推定する方法として利用されています。特に、タンパク質のフォールディングや天然変性タンパク質の天然変性領域のような、溶液中での動きの大きい領域を推定する研究で注目されています。BioSAXS-1000 は、タンパク質の構造研究を行う上で強力なツールとなります。

2. 特長

2.1. 2D クラツキー光学系

クラツキー光学系は、クラツキーブロックと呼ばれる特殊な光学素子により、X 線のコリメーションを行います。クラツキー光学系最大の利点は、必要な小角分解能に合わせて、ビームサイズおよびビームストッパーの位置を簡単に変更し、X 線強度が最大となる条件を容易に設定できることです。BioSAXS-1000 は、コンピュータからクラツキーブロックを制御できるため、クラツキー光学系の利点を最大限に活かすことが可能で、光学系や $q_{\min}$ の調節を容易に行うことができます。サンプルホルダーには、3 本のキャピラリーと、校正用のベヘン酸銀を取り付けることが可能です。ビームストッパーには PIN-ダイオードが組み込まれて

おり、装置の調整や透過係数の計算に利用します。検出器には PILATUS 100K/R を採用しています。PILATUS はハイブリッド型のピクセルディテクターで、フォトンカウンタであるため、特に弱い反射の測定に威力を発揮します。

2.2. ソフトウェア：SAXSLab

BioSAXS-1000 には、実験室系装置による迅速かつ正確な SAXS データの取得に必要なソフトウェア“SAXSLab”が備えられています。SAXSLab は、回折データの測定や測定されたデータの表示だけでなく、 q 値の校正や二次元データの一次元データへの変換 (q vs. I)、バックグラウンドの除去、ギニエプロットやクラツキープロット作成など、データ処理機能も持っています。得られた処理データは ATSAS やその他の SAXS 処理用ソフトウェアに合わせたフォーマットで出力することが可能です。

試料ホルダー、クラツキーブロックおよび、ビームストッパーに取り付けられたモーターの制御も可能であり、必要な $q_{\min}$ を得るための最適な条件を複雑な操作なしに設定することができます。

3. 測定例

タンパク質の小角散乱では、散乱強度に寄与するのはタンパク質の平均の電子密度です。つまり、タンパク質の電子密度とタンパク質外（緩衝液）の電子密度が異なり、タンパク質の密度がどのような大きさで、どのような形であるかが散乱現象に寄与します。また、タンパク質は緩衝液と比較して十分に電子密度が高いため、タンパク質溶液の散乱強度から緩衝液の散乱強度を差し引くことにより、タンパク質由来の散乱強度

を算出することができます。算出されたタンパク質の散乱強度を用いて、プログラムパッケージ ATSAS⁽¹⁾ (EMBL) のビーズモデリング法⁽²⁾により溶液構造決定を行います。以下に、BioSAXS-1000 の広範な測定能力を示す例として、短時間での測定、低分子量ペプチドホルモンの測定、巨大タンパク質複合体の測定、低濃度タンパク質溶液を用いた測定・溶液構造解析例を示します。

3.1. 短時間での測定・解析

図 1 に、露光時間 15 分のリゾチーム溶液 (14.8 mg/ml) の散乱強度曲線と溶液構造を示します。GASBOR (ATSAS) を用いた溶液構造解析の結果、結晶構造とよく一致したモデルが得られており、15 分という短時間で、精度のよい散乱測定ができることがわかります。

3.2. 低分子量ペプチドおよび巨大タンパク質複合体の測定・解析

表 1 に低分子量ペプチドおよび巨大タンパク質複合体の測定条件を示します。

溶液構造解析は、GASBOR を用いて行いました。図 2 に、それぞれの散乱曲線と溶液構造を示します。結晶構造との重ね合わせから、低分子量のペプチドから巨大複合体まで、多様なタンパク質の溶液構造解析が可能であることがわかります。

3.3. 低濃度タンパク質溶液の測定・解析

図 3 に、低濃度 (0.5 mg/ml) グルコースイソメラーゼ溶液の、散乱強度曲線と溶液構造を示します。露光時間は 60 分です。 $q=0.6 \text{ \AA}^{-1}$ までのデータを用いて、GASBOR により溶液構造解析を行いました。低濃度タンパク質溶液でも、 $q=0.6 \text{ \AA}^{-1}$ の散乱強度を用いた溶液構造解析が可能であることがわかります。

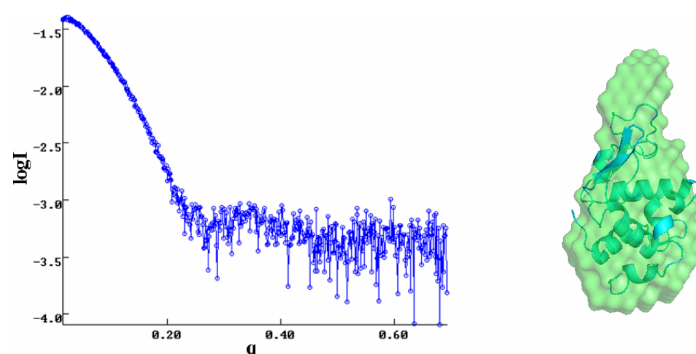


図 1. 露光時間 15 分での 14.8 mg/ml リゾチームの散乱強度曲線（左）と溶液構造（右）。

表 1. 小角散乱測定条件

試料名	分子量	タンパク質濃度	測定試料量	露光時間
インスリン	5.8 kDa	14.0 mg/ml	30 μ l	60 分
20S プロテアソーム	750 kDa	2.5 mg/ml	15 μ l	180 分

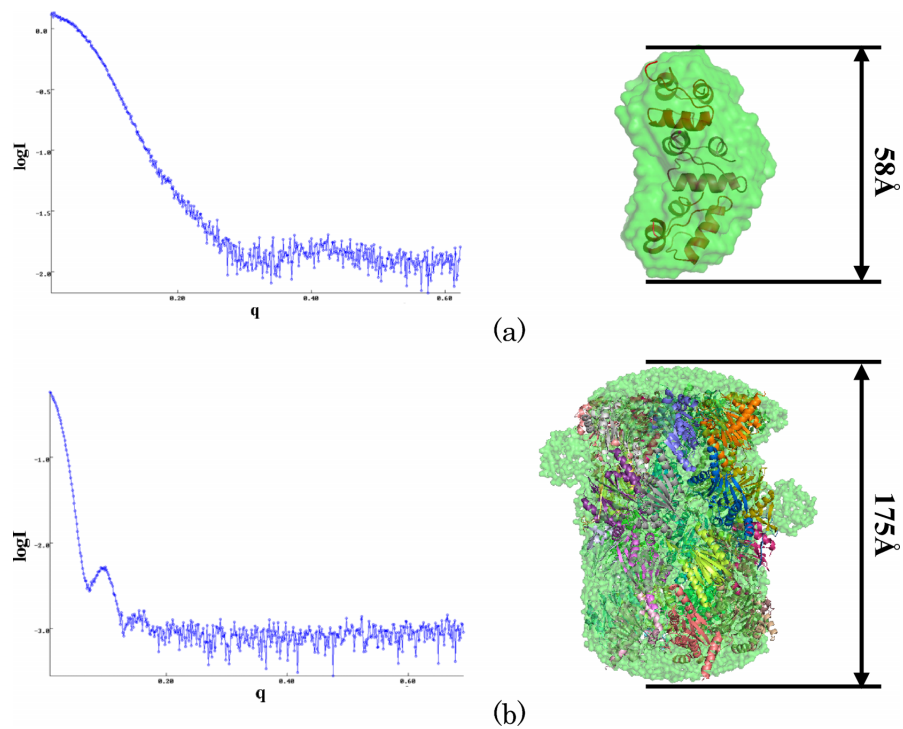


図 2. インスリン (a) と 20S プロテアソーム (b) の散乱強度曲線 (左) と溶液構造 (右).

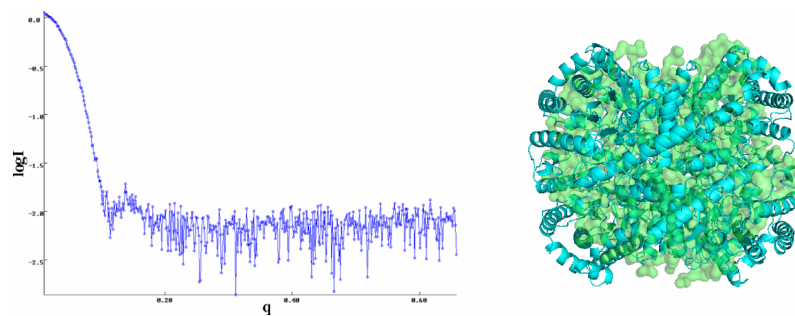


図 3. 0.5 mg/ml グルコースイソメラーゼの散乱強度曲線 (左) と溶液構造 (右).

参考文献

- (1) M. V. Petoukhov, P. V. Konarev, A. G. Kikhney and D. I. Svergun, **40** (2007), *J. Appl. Cryst.* s223–s228.
- (2) D. I. Svergun, M. V. Petoukhov and M. H. J. Koch, **80** (2001), *Biophys. J.* 2946–2953.