

中性子バイオ・ソフトマターワークショップ

中性子小角散乱の基礎

I. 基礎、分散系、バイオマター

杉山 正明(京都大学 原子実験所)





パルス中性子源(3GeV計画)

J-PARC: Japan Proton Accelerator Research Complex
MLF: Materials and Life Science Facility
JAEA: Japan Atomic Energy Agency
JRR-3: Japan Research Reactor No. 3 (1990 -)

定常炉(20MW)

目次

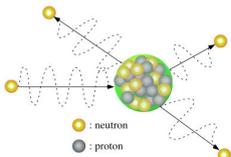
1. 中性子及び中性子散乱の特徴
2. 小角散乱とは
3. 散乱データの解析
 - 近似法によるサイズ・形状解析
 - 距離分布関数を用いた形状解析
 - 準濃厚系における問題
4. 最近の発展(タンパク質溶液散乱)

中性子および中性子散乱の特徴

中性子あれこれ

中性子とは? $m_n \sim 1g / N_{\text{Avogadro}}$

- 半径: 1.5×10^{-13} cm (水素原子の 10^{-5})
- 質量: 1.6749×10^{-27} kg (陽子にほぼ同じ)
- 電荷: 10^{-18} e (実質的に0)
- 平均寿命: 約15分 $n \rightarrow p + e^- + \bar{\nu}_e + 0.78 \text{ MeV}$
電子と反電子ニュートリノに崩壊
- 量子スピン数: 1/2



中性子の発生法:
原子炉(核分裂)もしくは加速器(核破砕)

中性子の種類

- 冷中性子: $E \leq 0.002$ eV
- 熱中性子: $0.002 \leq E \leq 0.5$ eV
- エピソード: $0.5 \leq E \leq 500$ eV
- 高速中性子: $500 \text{ eV} \leq E$

中性子散乱の歴史:
発見: Chadwick (1932)
回折現象の発見 (1936)
中性子散乱による高分子研究の始まり (1972)



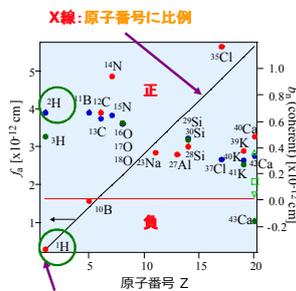
Chadwick, Nobel winner, 1935
Brockhouse & Shull, Nobel winner, 1994

中性子散乱の特徴

1. 質量: 物質波であり、同じ波長のX線と比べエネルギーが6桁以上小さい
⇒放射線損傷がない(少ない)
2. 電荷0: 物質の透過率が高い
⇒厚い試料(金属試料)や溶液中の試料の測定も可
⇒試料周りの自由度が大きい(1mm厚Aセルや石英セルなど問題ない)
3. 電荷0: 物質との相互作用が主として核力であり、原子散乱能が原子番号に依存しない

	波長 (nm)	エネルギー (eV)	相互作用	情報
X線	~0.1	~ 10^4	電子	電子密度分布
電子線	~0.005	100 ~ 50k	静電ポテンシャル	ポテンシャル分布
中性子線	0.1 ~ 1	0.1 ~ 0.001	核力	核の位置と運動

X線および中性子線に対する原子の散乱長



X線: 原子番号に比例

正 (positive scattering length)

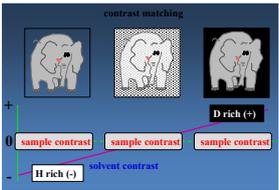
負 (negative scattering length)

散乱長が負の核種が存在!

中性子線: 核種によって大きく異なる!

コントラスト変調法(中性子の最大の利点)

軽水と重水では散乱長密度が異なる!
混ぜることで溶媒の散乱長密度を自由にコントロールできる



contrast matching

sample contrast, solvent contrast

H rich (-), D rich (+)

Guinier近似の例

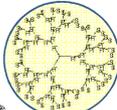
Multi-generation dendrimers

-ZONE 1-

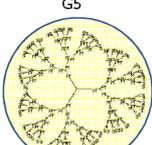
G3



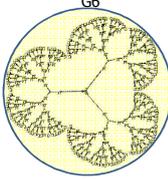
G4



G5



G6



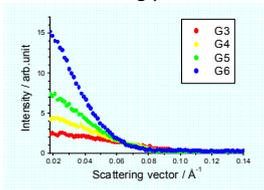
PT=Pt(PEt)₂
SI=Si(i-Pr)₃

How to determine size? → SANS

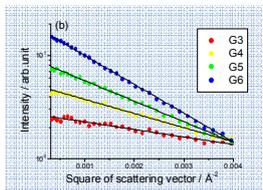
SANS of series of dendrimer

-ZONE 1-

Scattering profile



Guinier plot - log(I(q)) vs q² -



@ 1 wt% d-THF solution

$$I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{R^2}{3} q^2\right)$$

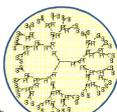
Size of dendrimer

-ZONE 1-

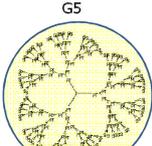
G3



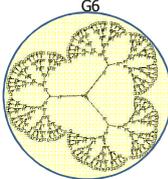
G4



G5



G6



PT=Pt(PEt)₂
SI=Si(i-Pr)₃

Rg: 22.5 ± 0.4	30.7 ± 0.2	37.0 ± 0.2	44.0 ± 0.2 Å
R: 29.0 ± 0.6	39.7 ± 0.3	47.8 ± 0.3	56.8 ± 0.2 Å
Rcal: 30	40	50	60 Å

形状(断面)Guinier近似

-ZONE 1-

Guinier領域より高角の散乱角では、散乱強度は形状に依存する。この領域では、近似式を用いて散乱体の形状に関するパラメータを求めることができる。

細長い棒: $I(q) \approx \frac{1}{q} \exp\left(-\frac{1}{4} R^2 q^2\right)$
Rは棒の断面の半径

横軸をqの2乗、縦軸をqxI(q)の対数としてplotする

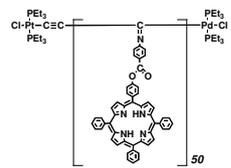
薄い円板: $I(q) \approx \frac{1}{q^2} \exp\left(-\frac{1}{12} L^2 q^2\right)$
Lは円盤の厚さ

横軸をqの2乗、縦軸をq²xI(q)の対数としてplotする

Guinier近似と断面Guinier近似の例

Polysiocyanide with porphyrin residue

-ZONE 1&2-



M_n = 10600
M_w/M_n = 1.08

解析Strategy

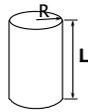
同じ測定範囲でもサイズに応じて、近似の領域が異なる

- N=50 (小さく、かつ、細長くないので) ⇒ Rg(Guinier)を求める
 $I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{R^2}{3} q^2\right)$
- N=200 (細長い円筒形) ⇒ R(断面Guinier)を求める
 $I(q) = \frac{I(0)}{q} \exp\left(-\frac{R^2}{4} q^2\right)$

$$R_g^2 = \frac{R^2}{2} + \frac{L^2}{12}$$

size and shape? → Model

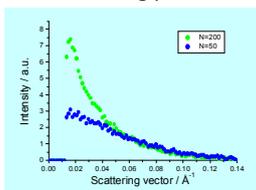
Helical coil (cylinder)

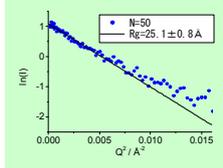


SANS of Polyisocyanide

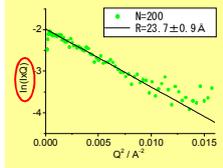
-ZONE 1-

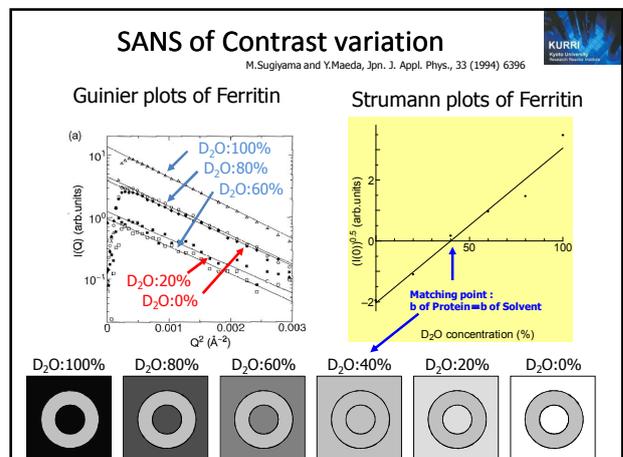
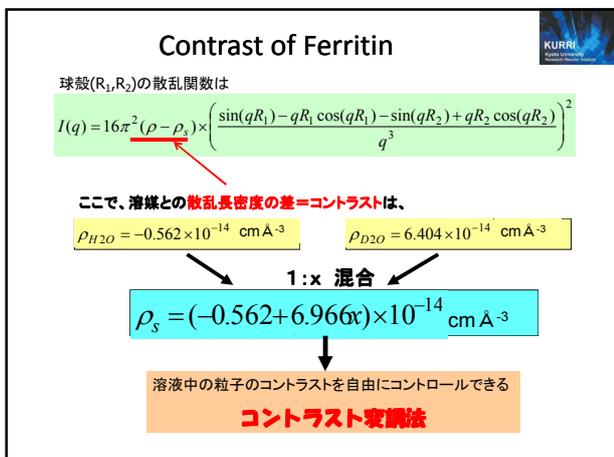
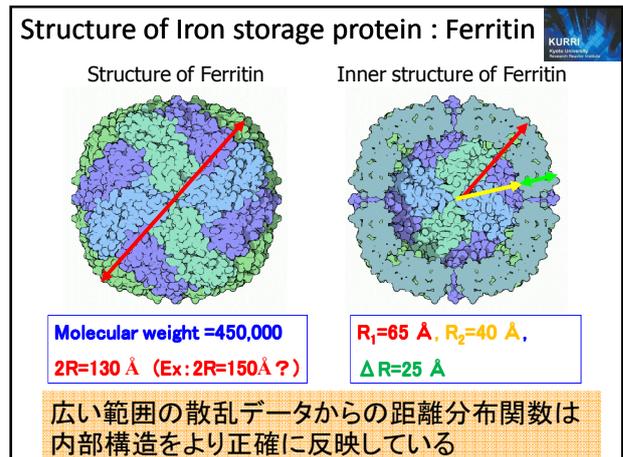
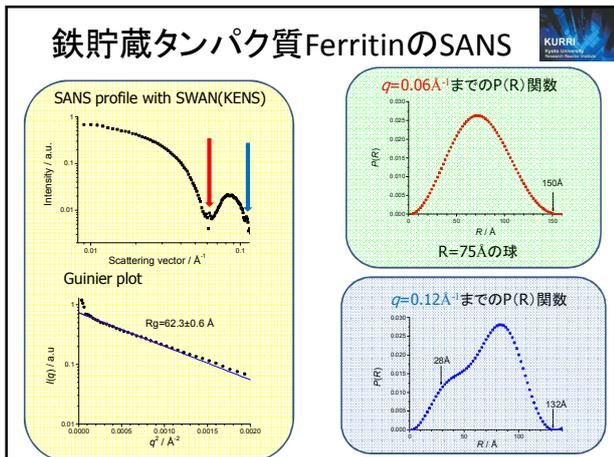
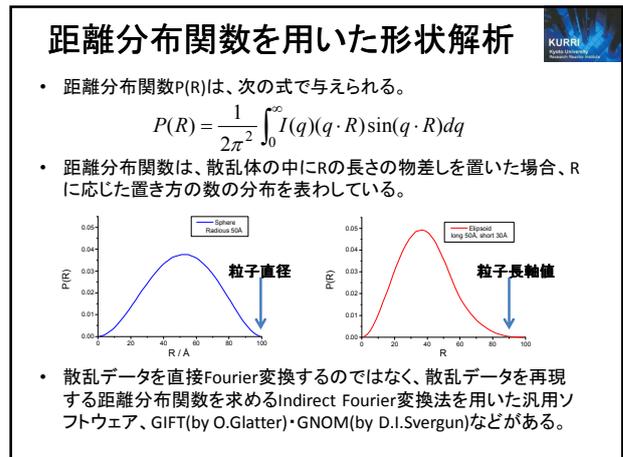
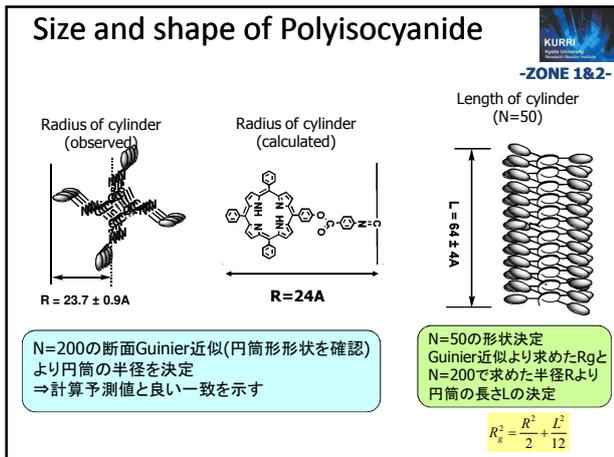
Scattering profile





@ 1 wt% d-THF solution





準濃厚系

• 溶質粒子の濃度が高くなると、散乱関数に対する構造因子の影響が無視できなくなる(散乱は、形状因子だけでは表せなくなる)。ここでは、その影響をPercus-Yevics近似を用いて評価する。

$$I(\vec{q}) = |F(\vec{q})|^2 \cdot S(\vec{q})$$

Φ : 溶質粒子の体積分率 ($\Phi = 0.02$ で $I(0)$ は15%減少)

Effect of structure factor on SANS

M.Sugiyama et al., *Biomacromolecules*, 2 (2001) 1071

Ovalbumin(卵白)5wt%重水水溶液

Guinier近似を用いて慣性半径・半径を求めると $R_g = 18.7\text{\AA}$ 、 $R = 24.1\text{\AA}$ となった

上記Rを基に、球の散乱関数を
 $I(q) = |F(q)|^2$
 $F(q) = 9V(\rho - \rho_s) \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3}$
 書き加えてみると、**全く一致しない!**

散乱関数に構造因子 $S(q)$ を取り入れ、
 $I(q) = |F(q)|^2 \times S(q)$
 として**Fitting曲線**を求めると
 $R = 29.6\text{\AA}$ 、 $\Phi = 0.05$

準濃厚系(> 1wt%)構造因子を考慮しないと19%サイズを小さく見積もってしまう

最近の発展(タンパク質の溶液散乱)

in situ, in vivoの溶液中での構造/構造変化の観測

- 従来の解析
- PDBデータを基にした散乱関数のSimulation
- 測定散乱曲線からの直接形状解析
 - 水溶液中での会合様態
 - 水溶液中での機能発現における構造変形

Structure of Proteasome

Rg calculation for several packing model

1. Monomer

Calculated
 $R_g = 41.5\text{\AA}$

2. DimerA

Calculated
 $R_g = 46.5\text{\AA}$

3. DimerB

Calculated
 $R_g = 45.5\text{\AA}$

Observed $R_g = 46.3\text{\AA}$

There are no distinguished difference of R_g between dimer A and dimer B.

We should examine the models with simulated SANS profiles.

SANS simulation of dimers A and B

DimerA

DimerB

Proteasome α -ring makes dimer (type A) in an aqueous solution without PAC1 and PAC2.

M.Sugiyama et al., *Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. A* 600 (2009) 272

現在も様々な解析・Simulation手法の開発が世界中で進められている。その中で汎用的なソフトウェアとしては、CRY SOL (CRYSON) が有名である。また、最近国内ではMD-simulationも取り入れた、MD-SAXSなどが横浜市大グループにより開発されている。

Contrast Variation method 2

粒子の散乱長密度 $\rho(r)$ を形を表す形状関数 $\rho_c(r)$ と内部構造を表す平均散乱長密度からの揺らぎの項 $\rho_f(r)$ に分離する

$$\rho(r) = (\bar{\rho} - \rho_s) \rho_c(r) + \rho_f(r)$$

このとき、散乱関数 $I(q)$ は、以下のように表される。

$$I(q) = (\bar{\rho} - \rho_s)^2 I_c(q) + I_f(q) + (\bar{\rho} - \rho_s) I_{cf}(q)$$

$$I_c(q) = \left| \int \rho_c(r) \exp(iqr) dr \right|^2 \quad I_f(q) = \left| \int \rho_f(r) \exp(iqr) dr \right|^2$$

ここで、 $I_{cf}(q)$ は、形状と揺らぎの干渉項である。

$(\bar{\rho} - \rho_s)$ の内、 ρ_s は、溶媒の重水・軽水比を変えることによって制御できる

最低3点の異なる重水・軽水比の溶媒で散乱関数 $I(q)$ を測定することで、 $I_c(q)$ 、 $I_f(q)$ 、 $I_{cf}(q)$ を分離して求めることができる。

Hen Egg White Lysozyme

平井光博, 放射光 Nov. 2006 Vol. 19 No. 6, 437-443

Simulated scattering functions of hen egg-white lysozyme (HEWL) depending on solvent contrast. The contrast was varied by D₂O/H₂O ratio in water solvent.

Separation of basic scattering functions of hen egg-white lysozyme (HEWL). I_c , I_f , and I_{cf} are defined by Eq. 2.

$I(q)$ において、高角領域 ($q > 0.4 \text{ \AA}^{-1}$) では、 $I_c(q)$ の寄与は小さく $I_f(q)$ 、 $I_{cf}(q)$ が主となる。

内部構造の解析のため、コントラスト変調法により $I_f(q)$ 、 $I_{cf}(q)$ を求めることが重要である。

結晶構造が分からないときはどうしますか？

結晶構造が不明な場合、散乱データを満足する散乱体の形状を求めるアルゴリズムが現在開発されている。これらのアルゴリズムは、主としてモンテカルロ法を用いて、散乱体の形状をランダムに変化させ、実験で得られた散乱データにより近い散乱関数を示す形状を求めて行く。以下、EMBLのDr.Svergunのグループにより開発が進められている汎用プログラムのDAMMINについて簡単に紹介する。

DAMMINでは、

1. 散乱データより、散乱体の最大長 D_{max} を求める
2. $1/2 D_{max}$ を半径とする球を仮定し、その球内に、十分小さな球 (Dummy Atomと呼ぶ) を充填する
3. Dummy Atomをランダムに動かし、全体の散乱関数を計算し、より散乱データに近いDummy Atomの分布を求めて行く。(その際に立体障害因子により、分裂などが起こらないように分布を制御する)

制限酵素 (*EcoO109I*) の解析例
a: 結晶構造解析, b: DAMMIN解析

H. Hashimoto et al., J. Biol. Chem., **280** (2005) 5605-5610

D. I. Svergun, Biophysical Journal, **76** (1998) 2879-2886

参考文献

Slide内で紹介した論文以外に、以下の論文・解説書が参考になると思います。

- O.Glatter and O.Kratky, Small Angle X-ray Scattering, Academic Press, London (1982)
- L.A.Feigin and D.I.Svergun, Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering, Plenum Press, New York (1987)
- 高分子の固体構造II, 共立出版 (1984): 第4章に小角X線散乱に関する詳しい解説がある
- 日本結晶学会誌, 小角散乱特集 (1)-(2) 41, 213-235, (1999), (3) 41, 269-282, (1999), (4) 41, 327-334, (1999), (5) 42, 129-138, (2000), (6) 42, 339-345 (2000)
- 日本中性子学会誌「波紋」、小角散乱特集 (1) 11, 61-64, (2001), (2)-(3) 12, 29-38, (2002), (4)-(5) 12, 149-160, (2002), (6)-(7) 12, 210-222, (8) 13, 67-71, (2003)
- バイオマターのSANSによる構造解析のReview, B.Jacrot, Rep. Prog. Phys. 39 (1976) 911-953
- Indirect Fourier変換による距離分関数の求め方は、A.Bergmann, G.Fritz and O.Glatter, J. Appl. Cryst. (2000), **33**, 1212
- GNOM, CRYSOLO(CRYSON)やDAMMINなどについては、Dr.SvergunのグループのHPを参照 <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/>
- Modelingの比較については、P.Zipper and H.Durchschlag, J. Appl. Cryst. 36 (2003), 509
- 最近の解析進展についてのReviewは、C.Neylon, Eur. Biophys. J. 37, 531-541, (2008) など