

## 実験技術

## 蛍光 XAFS の実験技術

その1 金属蛋白質の蛍光X線強度と  
測定装置の配置との関係

佐藤文俊<sup>\*†</sup>, 飯塚哲太郎<sup>\*</sup>, 城宜嗣<sup>\*</sup>,  
桑原裕司<sup>\*\*</sup>, 山口博隆<sup>\*\*\*</sup>, 大柳宏之<sup>\*\*\*</sup>

\*理化学研究所生体物理化学研究室

\*\*理化学研究所表面界面工学研究室

\*\*\*電子技術総合研究所電子基礎部

## 1. はじめに

Watson と Crick による DNA 二重らせんモデルの提唱, 並びに Kendrew や Perutz によるミオグロビン, ヘモグロビンの立体構造の解明を機に, 核酸や蛋白質, 酵素の機能をその分子構造に基づいて理解することは生化学者・生物物理学者にとって必須の研究課題となった。以来, NMR, ESR, 赤外及びラマン分光などの各種分子分光法がそれぞれの特徴を活かして, 生体物質の構造解析手段として適用され, 発展してきた。このような状況のもとで, 我々は Fe, Mn, Cu, Zn, Mg などの金属を活性中心に持つ種々の蛋白質や酵素が生体内で重要な生理作用を受け持つことに注目し, これら金属蛋白質・酵素の構造研究手段として, シンクロトロン放射光 (SR) を光源とする蛍光 X 線分光法 (蛍光 XAFS; fluorescence X-ray Absorption Fine Structure)<sup>1,2)</sup> を採用した<sup>3,4)</sup>。蛍光 XAFS とは蛍光 X 線吸収スペクトル中に現われる微細構造を解析することによって, 微量に含まれる成分原子の局所構造を調べる手法である。この方法を使えば, ①活性中心である金属原子のみを選んでその金属周りの立体構造を解析できること, ②金属蛋白質・酵素を溶液状態で測定でき

ること, さらに③X線透過型分光法に比べて約 1,000 倍も感度がよいことなどから, X線結晶構造解析が不得手とする分野で威力を発揮している<sup>3-10)</sup>。

しかしながら, これほど高感度の測定手段を以てしても, 解析に耐えうる S/N を持った金属蛋白質の XAFS スペクトルを得るためには測定に数時間も要するのが現状である。その理由は, 蛋白質や酵素などに含まれる金属原子は分子量数千~数万の分子の中に 1 個程度と極微量にしか存在しない上に, 試料が通常 10mM 以下の濃度の溶液なので, 注目する金属原子の濃度が極端に低い希薄系試料となるためである。また, このような X 線の長時間の照射による試料の放射線損傷の問題も無視することができない。S/N の良いスペクトルを短時間で得るには光源の強度を高める工夫も必要であるが, 試料から放出される蛍光 X 線の強度を高める工夫も必要である。ここでは金属蛋白質から放出される蛍光 X 線の収量を具体的に計算し, 測定装置の配置を工夫すれば高い強度の蛍光 X 線が得られることを示す。この計算結果は実験データを良く再現することができた。さらに, 金属の種類を変えると蛍光 X 線強度がどう変化するか, また検出器の多素子化により感度はどのくらい向

† 現所属; 九州工業大学情報工学部生物化学システム工学科

上するかという問題にも解答を与える。

## 2. 蛍光X線の収量 (計算)

具体的な計算を進めて行く上で選んだ試料は5 mMのミオグロビン (Mb) 水溶液である。Mbは筋組織に豊富に含まれているヘム蛋白質で、分子量は約17,000、1分子中に1個の鉄イオンを持っている。Mbの役目はその鉄に酸素分子を結合させて、代謝に使われるまで酸素分子を貯蔵することである。Mbは蛋白質・酵素一般の機能をより深く理解する上でしばしば参照される、生物学ではなじみの深い蛋白質の一つである。

図1に半導体検出器を使用したエネルギー分散型蛍光XAFSの模式図を描いた。単色化したSRリングからの放射光を試料に入射・吸収させると、二次遷移によって、試料から蛍光X線が四方に放出される。この蛍光X線も検出器に到達するまでに試料による吸収を受けて、その強度が弱まる。従って、MbとX線収量を計算するためには、それぞれ入射X線、蛍光X線のエネルギーでのMbのX線吸収係数 $\mu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]を求める必要がある<sup>1,2)</sup>。ここでは検出される蛍光X線の強度にのみ注目し、簡単のためMbの水分子を構成してる各原子間で、励起・放出された電子波の干渉効果を無視して $\mu$ を計算した。このとき、吸収係数を原子の密度 $\rho$  [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]で割った質量吸収係数 $\mu/\rho$  [ $\text{cm}^2/\text{g}$ ]が次のような加成性を満たすので、

$$\frac{\mu_T}{\rho_T} = \sum_i g_i \cdot \frac{\mu_i}{\rho_i} \quad (1)$$

これより試料全体の質量吸収係数 $\mu_T/\rho_T$ を計算することができる<sup>11)</sup>。ここで $g_i$ は構成原子の各質量分率である。5mMのMb水溶液ではMb、1分子 ( $\text{C}_{917}\text{H}_{1292}\text{FeN}_{214}\text{O}_{226}\text{S}_2$ ) 当たりに換算して平均11111個の $\text{H}_2\text{O}$ 分子が存在するので、これから $g_i$ を計算し、既存値である各原子の質量吸収係数 $\mu_i/\rho_i$ <sup>11b)</sup>から試料全体のX線吸収係数を算出すればよい。我々はFe K吸収端近傍のXAFSを想定して

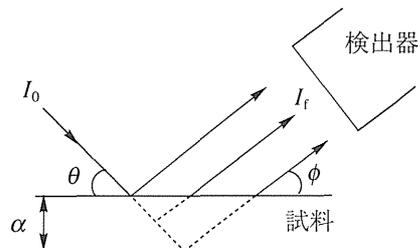


図1 蛍光X線検出の模式図。 $\theta$ 及び $\phi$ はそれぞれ入射X線 $I_0$ 並びに蛍光X線 $I_f$ が試料の表面となす角度を示し、 $\alpha$ は試料の厚みを示す。

いるので、入射X線のエネルギー $E$ をK吸収端直後に、蛍光X線のエネルギー $E_f$ を $K_\alpha$ のエネルギーにとって、各エネルギーでの試料全体のX線吸収係数を計算したところ $\mu_T(E) = 15.6\text{cm}^{-1}$ 、 $\mu_T(E_f) = 21.1\text{cm}^{-1}$ という値が得られた。ここで試料全体の密度 $\rho_T = 1.09\text{g}/\text{cm}^3$ とした。

次にこの試料のX線吸収係数 $\mu_T$ を使用して蛍光X線の収量 $I_f$ を計算する。 $I_f$ は入射X線強度 $I_0$ と注目している鉄の吸収係数 $\mu_{\text{Fe}}(E)$ に直接比例するのは明かであるが、先に述べたように試料の厚み $\alpha$ によるX線の吸収補正を行う必要がある<sup>1,2)</sup>。まず、入射X線を試料面に対して $\theta$ の角度で照射し、角度 $\phi$ で蛍光X線を検出すると仮定する(図1)。ただし $\theta$ 、 $\phi$ は特に同一平面上になくてもよい。入射X線及び蛍光X線の強度は紫外・可視光などと同様にLambertの法則に従って減衰するので、これらを試料の厚さ $\alpha$ に渡って評価すれば、試料全体の吸収補正項が得られる。このようにして得られた吸収補正項付きの蛍光X線収 $I_f$ は検出器の見込む立体角 $\Omega$ に対して、検出部位の直径が $\alpha/\sin\theta$ 以上のとき次式で与えられる、

$$\begin{aligned} dI_f(\theta, \phi) &= \mu_{\text{Fe}}(E) \kappa_{\text{Fe}} \int_0^\alpha (I_0 e^{-\mu_T(E)t}) e^{-\mu_T(E_f) \frac{\sin\theta}{\sin\phi} t} dt \cdot \frac{d\Omega}{4\pi} \\ &= \frac{I_0 \mu_{\text{Fe}}(E) \kappa_{\text{Fe}} \text{cosec}\theta}{\mu_T(E) \text{cosec}\theta + \mu_T(E_f) \text{cosec}\phi} \\ &\quad \times [1 - e^{-\mu_T(E) \text{cosec}\theta + \mu_T(E_f) \text{cosec}\phi} \alpha] \frac{d\Omega}{4\pi} \quad (2) \end{aligned}$$

ここで $\kappa_{\text{Fe}}$ は鉄の励起効率と検出効率を含んだ定数

で、銅の $K_{\alpha}$ を基準に規格化されている ( $\kappa_{Cu} = 1$ )<sup>12)</sup>。

我々が想定した試料では、その厚み $\alpha$ を0.6mm以上とすれば希薄系の近似が成り立ち、(2)式は

$$dI_t(\theta, \phi) = \frac{I_0 \mu_{Fe}(E) \kappa_{Fe} \text{cosec} \theta}{\mu_{\tau}(E) \text{cosec} \theta + \mu_{\tau}(E_t) \text{cosec} \phi} \frac{d\Omega}{4\pi} \quad (3)$$

となる。ちなみに、(3)式における角度依存項は

$$F(\theta, \phi) = \frac{\text{cosec} \theta}{\mu_{\tau}(E) \text{cosec} \theta + \mu_{\tau}(E_t) \text{cosec} \phi} = \left[ \mu_{\tau}(E) + \mu_{\tau}(E_t) \frac{\sin \theta}{\sin \phi} \right]^{-1} \quad (4)$$

であり、当然のことながらこれは吸収補正項そのものである。つまり、より高い蛍光X線シグナルを得ることはこの吸収補正項をなるべく大きくすることにほかならない。最も蛍光X線が強くなるのは $\sin \theta / \sin \phi \rightarrow 0$ の時であることは明らかである。この理想的な最高強度と、通常の蛍光XAFS測定方法<sup>1,2)</sup>すなわち $\theta$ 及び $\phi$ を $45^\circ$ に取ったときの強度とを(3)式において $\Omega/4\pi$ が小さいとして積分して比較してみると、

$$\frac{I_t(0^\circ, \phi)}{I_t(45^\circ, 45^\circ)} \approx 2.4$$

倍も強くなることになる。もちろん $\theta$ を $0^\circ$ にすることは不可能であるし、(2)式導入時の仮定にも反するので、より現実的な値として $\theta$ を $10^\circ$ にとると

$$\frac{I_t(10^\circ, 90^\circ)}{I_t(45^\circ, 45^\circ)} \approx 1.9$$

倍となる。つまり、この結果は試料を入射X線に対して少し傾けるだけで、Mbの蛍光X線強度は通常の測定 ( $\theta = 45^\circ$ ,  $\phi = 45^\circ$ ) で得られる強度に比べて約2倍になることを示唆している。

### 3. MbのFe蛍光XAFS強度の角度依存性 (実験との比較)

以上の結果を踏まえて、実際にMbのFe K吸収端におけるXAFSスペクトルの強度を $\theta$ 及び $\phi$ をかえて測定し、上記の計算を評価した。試料はpH7.0, 10mMリン酸緩衝液中の5 mMのMbで、温度80 Kにて測定した。蛍光X線シグナルは立体角 $\Omega/4\pi = 0.0156$ のSi半導体検出器でカウントし、測定条件をそれぞれ (a)  $\theta = 25^\circ$ ,  $\phi = 65^\circ$ , (b)  $\theta = 30^\circ$ ,  $\phi = 60^\circ$ , (c)  $\theta = 35^\circ$ ,  $\phi = 55^\circ$ , (d)  $\theta = 40^\circ$ ,  $\phi = 50^\circ$ , (e)  $\theta = 45^\circ$ ,  $\phi = 45^\circ$  に選んだ。その結果を図2に示す。(4)式で予想

されるように $\sin \theta / \sin \phi$ が小さくなるにつれて蛍光X線強度が強くなっており、それに従ってスペクトルのS/Nが良くなっている。例えば7.12~7.14keVの吸収端微細構造に注目すればその分解能が上がっていることが分かる。図2の挿入図に条件(e)でのXAFS強度を基準にした蛍光X線強度の $\theta$ ,  $\phi$ 依存性を描いたが、(4)式で得られた

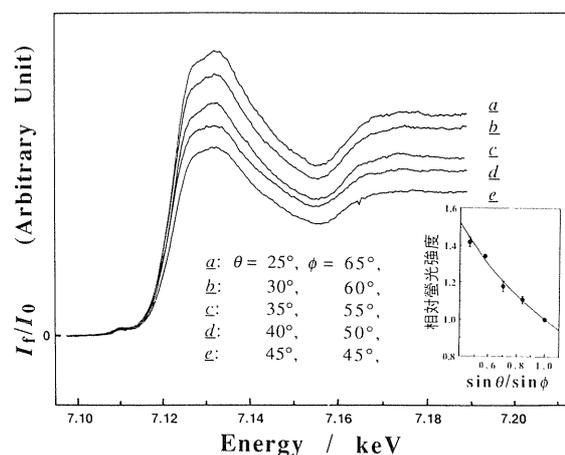


図2 Mbの蛍光XAFSスペクトル。試料面に対するX線の入射角( $\theta$ )並びに検出方向( $\phi$ )の角度とMbの蛍光X線との関係。pH7.0, 10mMリン酸緩衝液中の5mM MbのXAFSスペクトルをX線吸収端構造(XANES)領域において、80Kで測定した。 $\theta$ 及び $\phi$ は $\sin \theta / \sin \phi =$  (a) 0.47, (b) 0.58, (c) 0.70, (d) 0.84さらに(e) 1.00となるように選んだ。挿入図は $\sin \theta / \sin \phi$ とXAFS強度との関係を、 $\sin \theta / \sin \phi = 1.00$ での強度を基準に描いた。実線は(4)式で計算した理論曲線を示す。

理論曲線 (実線) と良く一致している。このことから、我々のMbの蛍光X線収量に対する評価は正しいと確信した。

これまで試料だけのX線吸収係数を計算してきたが、実際に蛍光X線強度に影響する因子はそれだけではない。例えば試料と検出器の間の空気や試料冷却装置の窓材料 (ポリイミド) などによるX線の吸収の影響は、X線のエネルギーが低いほど如実に現れる。つまり、これらの因子は測定対象とする原子の種類に大きく依存することになる。そこで、我々の系でもXAFS対象金属を変えて蛍光X線強度がどのように変化するか考察してみた。

4. 蛍光X線強度のXAFS対象金属依存性

先に述べたようにMbは鉄を活性中心に持っている。この鉄を原子番号25~30の金属 (Mn, [Fe], Co, Ni, Cu, Zn) に置換したMbを想定し、2節と同じ試料条件で、各々のX線吸収係数を求めた (表1)。これらの値を使用して各原子のK吸収端直後の蛍光X線収量を (3) 式で計算し、結果を図3にまとめた。ただし、各原子の $\kappa$ は文献12-14の値を使用した。この図は天然のMb (Feを持っている) における、 $\theta = 45^\circ$ ,  $\phi = 45^\circ$ での蛍光X線収量を基準にして、各金属Mbの蛍光X線収量を描いたものである。(4) 式で明らかのように、金属の種類に関係なく  $\sin \theta / \sin \phi \rightarrow 0$  になるにつれて蛍光X線強度が強くなっている。注目すべき点は、置換金属の原子番号が大きくなるにつれMbの蛍光X線強度が高くなっていることである。それは、一般に原子番号が大きな金属ほど吸収端におけるX線のエネルギーが高いため、波長が短くなって物質を透過しやすくなるからである (表1及び (3) 式)。従って、原子番号が大きな金属を持つ蛋白質ほど高強度のXAFSスペクトルが得られることになる。

XAFS対象金属の原子番号が大きいことは、もう一つのメリットをもたらす。やはり、X線のエ

表1 (1) 式で計算した、活性中心に様々な金属 (原子番号 = 25~30) を持つ5mM Mbの吸収係数  $\mu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]

Mb	$\mu_T (E)$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	$\mu_T (E_i)$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	$\mu_i (E)^{\ddagger}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]
Mn	19.91	26.76	0.131
Fe <sup>‡</sup>	15.59	21.07	0.116
Co	12.35	16.71	0.108
Ni	9.87	13.39	0.095
Cu	7.97	10.83	0.091
Zn	5.71	8.83	0.083

‡  $\mu_i(E)$ は活性中心である金属のX線吸収係数 ( $i = \text{Mn} \sim \text{Zn}$ )。  
#天然Mb。

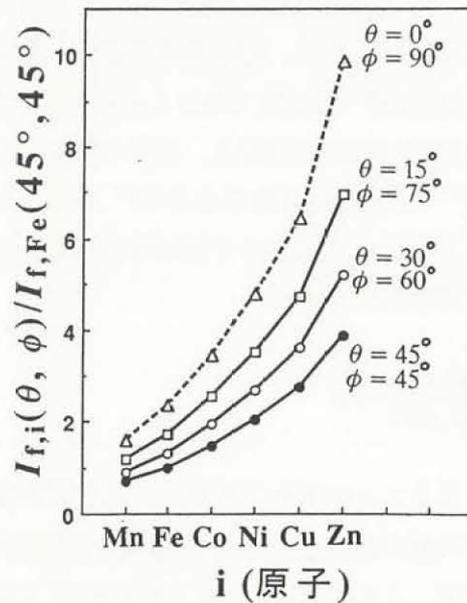


図3 様々な金属 (原子番号 = 25~30) を活性中心に持つMbの真空中での蛍光X線強度。蛍光X線強度は (3) 式で計算した。すべての蛍光X線強度は各原子のK吸収端直後と比較し、天然Mb (FeMb) の $\theta = 45^\circ$ ,  $\phi = 45^\circ$ での強度を基準に描いた。

ネルギーが高いことから、外的要因の影響を受けにくくなることである。入射X線並びに蛍光X線は空気によって散乱・吸収され、その影響は全体の蛍光X線収量の減衰項として働く。これはX線のエネルギーが低いと無視できなくなり、例えば

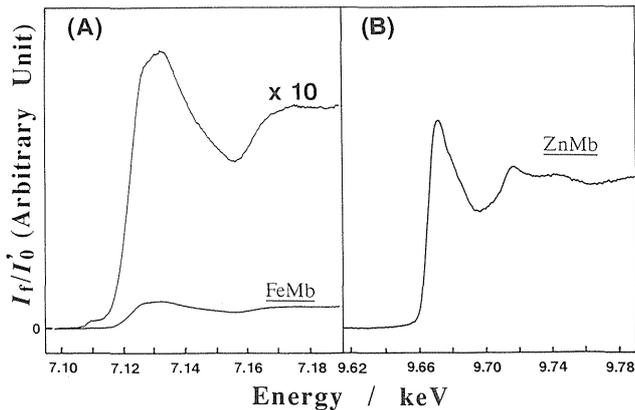


図4 (A) 天然Mb (FeMb) 及び (B) 鉄を亜鉛で置換したMb (ZnMb) のXANESスペクトル。測定は両者とも $\theta = 30^\circ$ ,  $\phi = 60^\circ$ , 温度80Kで行なった。FeMbとZnMbのスペクトルはそれぞれ5回及び2回積算した。異なる吸収端でのスペクトル強度を比較するため、入射X線強度 $I_0$ はイオンチェンバーによる吸収を考慮し、規格化した値を用いた<sup>16)</sup>。このとき、イオンチェンバー内部は1気圧の $N_2$ ガスで満たされており、その長さは14cmであるとして計算した。他の測定条件は図2のものと同じである。ZnMbの蛍光X線強度はFeMbのそれに比べて約7倍大きいことがわかる。

X線が空気中を通る全光路長を30cmとしてこの減衰項を計算したところ、Fe K吸収端付近のエネルギー (~7keV) ではZnのそれ (~10keV) と比べて1.8倍空気によって蛍光X線強度が低下することが明らかとなった。

そこで実際に蛍光X線強度が原子の吸収端の違いによってどの程度影響を受けるのかを鉄を亜鉛に置換したMb (ZnMb)<sup>15)</sup> で観測し、天然のMb (FeMb) と比較した。試料を両者ともpH7.0, 10mMリン酸緩衝液中の5 mMのMbに調整し、温度80 Kで測定した。このとき入射X線強度を測定するイオンチェンバーから試料→検出器に至るまでX線が空気中を通る全光路長を30cmに設定した。従って、空気によるX線の吸収を考慮に入れて、図3の試料のみの効果 (4.0倍) と掛け合わせれば結局7.2倍ほどZnMbの蛍光X線強度の方がFeMbのそれよりも高いと予想できる。図4にそのFeMbとZnMbの各K吸収端近傍におけるXAFSスペクトルを示した。ただし、入射X線強度 $I_0$ はイ

オンチェンバーそのものによる吸収を考慮し、規格化した値を使用した (図4説明参照)<sup>16)</sup>。ZnMbのXAFSスペクトルはFeMbの7倍強度が強く、理論からの予想と実験とはたいへん良く一致している。以上の結果は、CuやZnなどのXAFSスペクトルの測定は非常に有利であることと同時に、FeやMnなどの低エネルギー領域でのXAFSでは、試料のみならず外的因子によるX線の吸収効果のために大きく蛍光X線強度が低下することを示している。従って、低エネルギー領域でのXAFSスペクトルの測定にはイオンチェンバー・検出器一体型真空セル室を使用して、空気や装置の一部によるX線の吸収といった試料に依存しない要因をできるだけ低く押さえる工夫が大変有効となる。

## 5. 検出器の多素子化による蛍光強度の増加 ~まとめにかえて~

Mbを例として金属蛋白質の蛍光XAFSスペクトル強度とその測定装置の配置との関係について簡単に報告した。試料面に対して入射X線をなるべく小さい角度で照射し、放出される蛍光X線を試料面に対して垂直の方向から検出することによって、K吸収端後では通常の測定下に比べ約2倍の強度のシグナルが得られるはずである。さらにFeやMnを含む蛋白質の測定では、空気などによるX線の散乱・吸収に代表される外的要因を減らすことができれば結局4~5倍のシグナル強度が得られると結論した。その分、より良いS/Nを持ったスペクトルを得ることもできるし、あるいは測定時間を短くして試料のダメージを少なくすることもできる。

ところで最近、半導体検出器を多素子化しその立体角 $\Omega$ を稼ぐことによって、希薄原子の蛍光X線強度を上げる努力がなされている。しかし、蛍光X線の強度は (3) 式の角度依存性を持っているので、多素子化した数に比例して蛍光X線強度が大きくなるということはない。むしろ試料面に対

して小さい角度で蛍光X線シグナルを検出している素子(図1;  $\phi \rightarrow 0^\circ$ )では蛍光X線強度が非常に小さくなるため、欲しいシグナルがバックグラウンドノイズに埋もれてしまう可能性がある。したがって、多素子化の目的はただやみくもに立体角を稼ぐことに置くのではなく、むしろ $\phi \sim 90^\circ$ 付近での蛍光X線を効率良く測定することに重点を置くべきである。例えば、一つの検出器では計数率の限界のために検出器を試料に近付けられない場合、検出器を多素子化することによって高計数率化を図ることができる。

また、多素子化と平行して試料セルの形状に関する工夫も有効である。一般に入射X線は空間的に有限な広がりを持つため、試料から放出される蛍光X線もまた広い角度で分布することになる。そこで、(3)式を考慮して、試料セルに曲率を持たせ、その焦点上に検出器を配置させれば $\phi = 90^\circ$ の最も強度が高い蛍光X線を集光することができる。以上のような工夫は金属蛋白質XAFSの測定法の向上につながるだけではなく、次なる趨勢である時間分解XAFSへの糸口となるであろう。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたって、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の松下正教授ならびにスタッフの方々にご援助をいただきました。ここに記して、深く感謝の意を表します。また本研究は科技厅基礎研究特別研究員制度並びに放射光特別研究、振興調整費「新ビーム」の下で得られた研究成果であることを記します。

## 参考文献

- 1) J. Jaklevic, J.A. Kirby, M.P. Klein and A.S. Robertson: *Solid State Commun.*, **23**, 679 - 682(1977).
- 2) P.A. Lee, P.H. Citrin, P.Eisenberger and B. M.

- Kincaid: *Rev. Mod. Phys.*, **53**, 769 - 806(1981).
- 3) H. Oyanagi, T. Iizuka, T. Matsushita, S. Saigo, R. Makino, Y. Ishimura and T. Ishiguro: *J. Phys. Soc. Jpn.*, **56**, 3381 - 3388(1987).
- 4) Y. Shiro, F. Sato, T. Suzuki, T. Iisuka, T. Matsushita and H. Oyanagi: *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2921 - 2924(1990).
- 5) P. Eisenberger, R.G. Shulman, B.M. Kincaid. G.S. Brown, and S. Ogawa: *Nature*, **274**, 30 - 34(1978)
- 6) S. Pin, B. Alpert and A. Michalowicz: *FEBS Lett.*, **147**, 106 - 110(1982).
- 7) B. Chance, R. Fishetti and L. Powers: *Biochemistry*, **22**, 3820 - 3829(1983).
- 8) A. Bianconi, A. Congiu - Castellano, P.J.Durham, S.S. Hasnain and S. Phillips: *Nature*, **318**, 685 - 687(1985).
- 9) M. R. Chance, L.J. Parkhurst, L.S. Powers and B. Chance: *J. Biol. Chem.*, **261**, 5689 - 5692(1986).
- 10) A. Congiu - Castellano, A. Bianconi, M. Dell'Aricca, S. Della Longa, A. Giovannelli, E. Burattini and M. Castagnola: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 31 - 38(1987).
- 11) "International Tables for X-Ray Crystallography" Vol. III, Kynoch Press, Birmingham, England. 1962:
  - (a)B. Koch and C.H. MacGillavry: "X-ray Absorption," Sec. 3. 2. 1, p. 157 - 161.
  - (b)Table 3. 2. 2E, p. 175 - 192.
- 12) R.D. Giauque, F.S. Goulding, J.M. Jaklevic and R.H. Pehl: *Anal. Chem.*, **45**, 671 - 681(1973).
- 13) R.W. Fink, R.C. Jopson, H. Mark and C.D. Swift: *Rev. Mod. Phys.*, **38**, 513 - 540(1966).
- 14) J.S. Hansen, H.U. Freund and R.W. Fink: *Nuclear Phys.*, **A142**, 604 - 608(1970).
- 15) J. Feitelson and T.G. Spiro: *Inorg. Chem.*, **25**, 861 - 865(1983).
- 16) 大柳宏之, 松下正: 固体物理, **18**, 515 - 523(1983).