

■第14回日本放射光学会奨励賞受賞研究報告

生体分子の放射光円二色性分光研究

田中真人 (独立行政法人 産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門)

1. はじめに

キラリティを持つ物質の光吸収における左右円偏光の差は自然円二色性 (Natural circular dichroism: 以下略, CD) と呼ばれ, 紫外域ではタンパク質の二次構造解析などに広く利用されている。有機分子は可視から軟 X 線領域にかけて特徴的な光吸収を示す。しかしながら, 市販の CD 装置では可視紫外域においてしか測定ができず, 限定された波長範囲でのスペクトルによる構造解析が行われていた。この測定範囲を拡張することで, より高精度なタンパク質二次構造解析を行うために, 放射光と光弾性変調子とを組み合わせた真空紫外域 CD 測定ビームラインが世界各地 (日本では HiSOR¹⁾) に建設されてきた。この手法は円偏光の発生に透過型偏光素子を用いているために短波長限界 (実質的に 140 nm 程度) が存在する。

偏光素子が使用できないさらに短波長の真空紫外域や軟 X 線領域における CD 測定には偏光可変アンジュレータの利用が必須である。これら高エネルギー領域での計測から, より高精度なタンパク質の二次構造解析や従来では観測対象にならなかった糖・糖鎖などの σ 電子しかもたない物質の構造解析が期待され, また軟 X 線領域ではさらに金属タンパク質の金属元素など元素選択した CD 計測や顕微分光手法との組合せなどが可能である。しかしながら CD 強度は一般的に光吸収の 1% 以下と非常に微弱であるために, その観測は全く報告されてこなかった。

偏光可変アンジュレータによる CD 測定のパイオニアは ESRF の Goulon らである。彼等は主に結晶試料の硬 X 線領域における CD 測定に成功した²⁾。我々はそれを生体分子試料へ応用させてきた。軟 X 線領域では彼ら同様に直流法 (左右円偏光時の吸収の差を直接に計測する手法) を用いて生体分子の CD を世界で初めて観測した^{3,4)}。さらに真空紫外域ではアンジュレータからの偏光を変調させて CD を高感度計測する手法を確立し⁵⁻⁷⁾, これまた世界初の極紫外域にまで拡張した CD 測定を達成した^{8,9)}。本稿ではこれらに関する簡単な紹介を行う。

2. 真空紫外～極紫外域における生体分子の CD 測定

上記波長領域における CD 測定システムは産業技術総合研究所つくばセンターにある電子蓄積リング TERAS BL-5 にて開発してきた。このビームラインは挿入光源として小貫型の偏光可変アンジュレータ¹⁰⁾が利用できる。本アンジュレータは全長 32 cm (4 周期×周期長 8 cm) と非常にコンパクトであり, 最大 5 Hz で左右円偏光を変調発

振できる。また直線偏光時と円偏光時とでスペクトル強度に大きな変化がないという特長ももつ。

我々はこのアンジュレータを最大限に活用して CD を計測するシステムを構築してきた⁵⁻⁹⁾。Fig. 1 にその概要図を示す。光学系は主に前置鏡と 50 cm 瀬谷波岡型分光器で構成されており, 非常にシンプルなものにしている。これは反射による偏光度の劣化などを防ぐためである。

微弱な CD 信号を正確に検出するためにいくつかの工夫を凝らしている。試料前後に検出器 (サリチル酸ナトリウム+光電子増倍管) を置き, ロックインアンプを用いて双方の信号の差分のうちアンジュレータ変調周波数と同じ周波数成分だけを計測することで, アンジュレータや光学系由来の信号を出来る限り打ち消している。このとき双方の信号の直流成分が同じになるように, 光電子増倍管の印加電圧を制御している。

特に固体試料の CD 測定の際に最も注意すべき点は試料, 検出器, 分光器などの直線異方性 (直線二色性 (LD), 直線複屈折 (LB)) の影響である¹¹⁾。CD などの偏光測定では最終的に観測される信号の成分は各光学素子の Mueller 行列演算によって与えられ, 異方性のある光学素子の利用により信号成分が複雑化していく。本システムではこの信号成分をなるべく単純化するために工夫をしている。例えば入射光モニタにはサリチル酸ナトリウムを噴霧した光チョッパー (周波数 100 Hz 程度) を用いることで, 偏光を歪ませないようにしている。透過光モニタも等方性のサリチル酸ナトリウム膜で波長変換をすることで光電子増倍管の偏光特性を無視している。これらは等方性光学素子とみなせ, 行列演算を簡略化できる。

行列演算結果から, 検出される CD 信号成分 (CD_r) は以下の式で表わされる⁶⁾。

$$CD_r(\theta, \varphi) = G_{if} \left[CD + \frac{1}{2} (LD'LB - LDLB') \cos \varphi - (LD \sin 2\theta + LD' \cos 2\theta \cos \varphi) \tan \delta \right]$$

ここで θ , φ は試料の面内, 面外の回転角度, δ は光学系による直線偏光の位相差である。LD', LB' は 45° 傾いた LD, LB をそれぞれ表わしている。この式から試料に直線異方性が存在する場合, CD 成分に LD, LB 成分が重畳することがわかる。これらの成分は試料角度を変えて CD_r を測定することで, 打ち消すことができる (ただし直線異

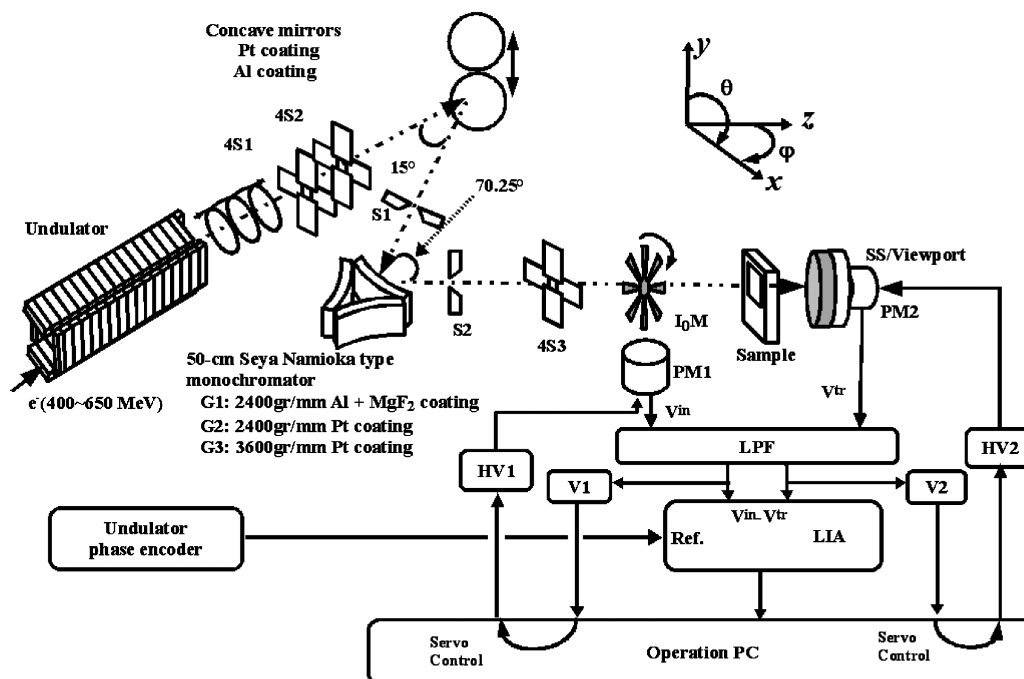


Fig. 1 Schematic drawing of the optical arrangement of the TERAS BL-5 beamline and system for CD measurement. I_0M : sodium salicylate (SS)-coated chopper wheel which is used for monitoring the incident light intensity; SS/Viewport: SS-coated viewport; PM1 and PM2: photomultipliers; V^{in} and V^{tr} : intensities of the incident and transmitted light; HV1 and HV2: power supplies; LPF: electrical low-pass filter; V1 and V2: digital voltmeters; and LIA: dual-phase lock-in amplifier.

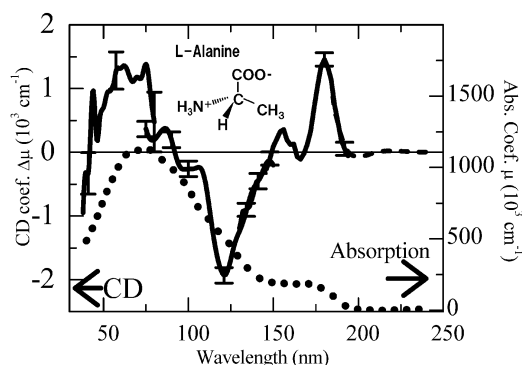


Fig. 2 Calibrated CD spectrum of L-alanine film measured at TERAS BL-5 (solid line), CD spectrum measured using calibrated CD spectrophotometer (JASCO J-720W) (broken line), and reported absorption spectrum (dotted line)¹³⁾.

方向が大きすぎる場合は不可能である)。また G_{IF} は主に円偏光度によって決まる校正係数であり、実際に偏光度測定から決定している¹²⁾。

上記システムを用いて世界初の極紫外領域にまで到達した生体分子の CD 測定に成功している^{8,9)}。その結果を吸収スペクトル¹³⁾とともに Fig. 2 に示す。試料として生体アミノ酸の一種であるアラニンの薄膜 (膜厚 50 nm 程度) を用いた。この薄膜は微結晶のランダム集合体⁸⁾であるために、直線異方性の寄与は無視できる。図中の実線で示した本システムでの結果は破線で示した市販 CD 計での結果を

よく再現しており、本装置の正確性を証明している。従来装置では最短でも波長 140 nm 付近までの CD 測定しか成されてこなかったが、それを一気に 40 nm にまで拡張することに成功した。検出感度は現状では 10^{-4} 程度である。波長約 180 nm 付近に見られる CD ピークは主に COO^- 基の π 電子に起因するが、それより短波長のピークには徐々に σ 電子の寄与が現れてくるのが理論計算から予測されている^{8,14)}。現在は他のアミノ酸や糖試料の測定を進めており、今後更にタンパク質などの生体高分子の計測へと発展させていく。

3. 軟 X 線領域における生体分子の CD 測定

軟 X 線領域における生体分子試料 (アミノ酸薄膜) の CD 測定は当初 SPring-8 BL23SU で、現在は BL25SU にて進めている。現時点では変調法ではなく直流法で CD を測定している。一般的に直流法は変調法よりも低感度であるが、SPring-8 の高輝度性やビームの安定度の高さなどにより、0.1% 程度の CD 信号を検出できている。BL23SU には APPLE-II 型アンジュレータが備えられており、磁石列の駆動により左右円偏光を 0.1 Hz 程度で切り替えて CD 計測を行った¹⁵⁾。BL25SU ではツインヘリカル型アンジュレータを用いてキッカー電磁石による 1 Hz の偏光切り替えを行っている。この場合、光源点が 2 つあることに起因する偽の CD 成分が出てくることに留意する必要がある¹⁶⁾。

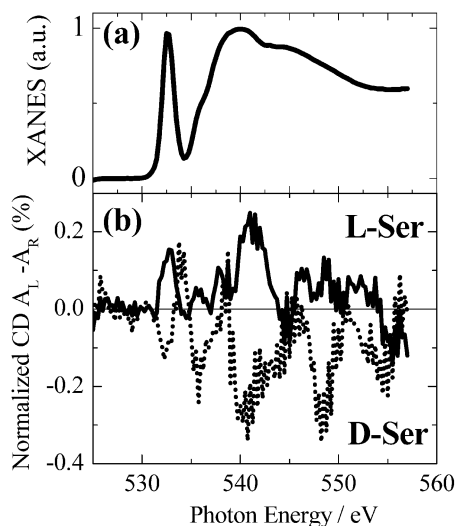


Fig. 3 (a) Normalized XANES spectrum of L-serine (Ser) film near the oxygen K-edge. (b) Normalized CD spectra of Ser films. Solid line: L-Ser. Dotted line: D-Ser.

初めて測定に成功した生体分子の CD の結果を **Fig. 3** に示す^{3,4)}。試料としてはセリン薄膜（膜厚300 nm 程度）を選択して、BL23SU にて酸素 K 殻領域での測定に成功した。ドレイン電流法にて吸収測定を行い、試料位置を変えながら多数回 CD を測定し、それらの平均を取った。位置を変えるのは軟 X 線による試料損傷の影響を出来る限り防ぐためである。540 eV 付近のピークは-OH 基の $1s \rightarrow \sigma^*$ 遷移に起因すると考えられる。同様にフェニルアラニン薄膜を用いて、窒素 K 殻領域の測定にも成功している^{3,4)}。また現在では BL25SU において、特に酸素 $1s \rightarrow \pi^*$ 領域に的を絞った CD 測定をアラニンなどの試料で進めている。この領域の XANES は殆どのアミノ酸が一つのピークしか示さない¹⁷⁾ のに対して、CD では例えば L-アラニンでは負の CD ピーク一つが、L-セリンでは正負ひとつずつのピークが観測されるなど各アミノ酸で異なるスペクトルを示している^{18,19)}。我々の測定に前後して多くの CD の理論計算結果が報告されており^{20,21)}、アラニンでは実験結果をよく再現している²¹⁾。今後は真空紫外同様により高感度な変調法の利用などやタンパク質などの測定を進めていきたい。

4. まとめと今後の展望

偏光可変アンジュレータを最大限に活用することで、世界で初めて真空紫外から軟 X 線領域における生体分子の CD 測定に成功することができた。CD 測定では光学系や試料の異方性などに起因する“偽”の信号の検出や、試料の光分解など多くの困難な点が多々あるが、それら一つずつ克服して何とか簡単な生体分子に関しては測定に成功してきた。今後は実際に重要な生体高分子の測定とその構造解析へと着手していきたく準備をしている。軟 X 線領

域での溶液試料の測定も検討している。

CD は X 線構造解析のように試料の結晶化が必要でなく、また NMR ほど多量のサンプル量は必要でなくかつ短時間で測定が可能であるといったメリットがある。(ただしこれらほど詳細な構造情報は得られない。) このメリットを活かして糖鎖や膜タンパク質など今まで構造解析が困難であった生体試料へ応用していきたい。

また最近では分子軌道計算による CD 理論予測が進んでいる。計算結果から分子構造と CD スペクトルの正確な対応づけができれば、非経験的に CD による構造解析が可能になる。CD による二次構造解析は今まで構造既知物質の実験結果を基にした経験的なものであったが、計算結果を基にした非経験的な構造解析が実用化できれば如何なる物質・状態での分子構造を明らかにできる。そのためにも今後さらに多くの実験データを蓄積させていき、理論予測精度の向上も促していくことが肝要である。

謝辞

受賞をうけた本研究の遂行に当りまして、実に多くの方々の御助力を頂きました。TERAS における CD 測定システム開発は産総研・渡辺一寿博士、山田亨博士との共同で行ったものです。TERAS の運転におきまして産総研電子加速器関係者の方々の御助力に感謝いたします。また偏光可変アンジュレータの基礎を構築されました小貫英雄博士に深く敬意を表します。本研究の多くは文部科学省原子力試験研究費、科研費などの支援を受けています。SPring-8 における軟 X 線 CD 測定実験の成功は日本原子力研究所・横谷明德博士、安居院あかね博士をはじめとする BL23SU スタッフの皆様、高輝度光科学センター・室隆桂之博士をはじめとする BL25SU スタッフの皆様、高輝度光科学センター・田中均博士をはじめとする加速器関連スタッフの皆様の多大な御尽力の下によるものです。また神戸大学・中川研究室の歴代学生の皆様、特に金子房恵博士（現、住友ゴム）、古結俊行氏、埴岡（児玉）洋子氏には徹夜での試料作製や CD 測定実験などまさに身を粉にした力添えを頂きました。最後になりましたが、本研究は神戸大学・中川和道教授との共同研究によるものであり、先生から頂いた数え切れない御指導、御激励に深謝いたします。

参考文献

- 1) N. Ojima, K. Sakai, T. Matsui, T. Fukazawa, H. Namatame, M. Taniguchi and K. Gekko: Chem. Lett. **30**, 22 (2001).
- 2) L. Alagna, T. Prosperi, S. Turchini, J. Goulon, A. Rogalev, C. Goulon-Ginet, C. R. Natoli, P. D. Peacock and B. Stewart: Phys. Rev. Lett. **80**, 4799 (1998). など
- 3) M. Tanaka, K. Nakagawa, A. Agui, K. Fujii and A. Yokoya: Physica Scripta **T115**, 873 (2005).
- 4) 中川和道, 田中真人, 安居院あかね: 放射光 **18**, 363 (2005).

- 5) T. Yamada, K. Yagi-Watanabe, M. Tanaka, F. Kaneko, T. Kitada, Y. Ohta and K. Nakagawa: *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 093103 (2005).
- 6) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, T. Yamada, F. Kaneko and K. Nakagawa: *Chirality* **18**, 196 (2006).
- 7) K. Yagi-Watanabe, M. Tanaka, F. Kaneko and K. Nakagawa: *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 123106 (2007).
- 8) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, F. Kaneko and K. Nakagawa: *J. Synchrotron Rad.* **16**, 455 (2009).
- 9) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, F. Kaneko and K. Nakagawa: *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*: *submitted*.
- 10) H. Onuki: *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res.* **A246**, 94 (1986).
- 11) Y. Shindo, M. Nishio and S. Maeda: *Biopolymers* **30**, 415 (1990).
- 12) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, F. Kaneko and K. Nakagawa: *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 083102 (2008).
- 13) M. Kamohara, Y. Izumi, M. Tanaka, K. Okamoto, M. Tanaka, F. Kaneko, Y. Kodama, T. Koketsu and K. Nakagawa: *Radiat. Phys. Chem.* **77**, 1153 (2008).
- 14) F. Kaneko, K. Yagi-Watanabe, M. Tanaka and K. Nakagawa: *J. Phys. Soc. Jpn.* **78**, 013001 (2009).
- 15) A. Agui, A. Yoshigoe, T. Nakatani, T. Matsushita, Y. Saitoh, A. Yokoya, H. Tanaka, Y. Miyahara, T. Shimada, M. Takeuchi, T. Bizen, S. Sasaki, M. Takao, H. Aoyagi, T. P. Kudo, K. Satoh, S. Wu, Y. Hiramatsu and H. Ohkuma: *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 3191 (2001).
- 16) T. Muro, T. Nakamura, T. Matsushita, T. Wakita, K. Fukumoto, H. Kimura, T. Hirono, T. Kinoshita, T. Hara, K. Shirasawa, M. Takeuchi and H. Kitamura: *AIP Conf. Proc.* **879**, 571 (2007).
- 17) Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze and M. Zhar-nikov: *J. Phys. Chem. A* **109**, 6998 (2005).
- 18) K. Nakagawa, T. Matsui, Y. Izumi, A. Agui, M. Tanaka and T. Muro: *Radiat. Phys. Chem.* **78**, 1198 (2009).
- 19) Y. Izumi, A. Imazu, A. Mimoto, M. Tanaka, K. Nakagawa, M. Tanaka, A. Agui and T. Muro: *J. Phys. Conf. Ser.* **190**, 012209 (2009).
- 20) O. Plashkevych, V. Carravetta, O. Vahtras and H. Ågren: *Chem. Phys.* **232**, 49 (1998). など
- 21) A. Jiemchooraj, U. Ekstrom and P. Norman: *J. Chem. Phys.* **127**, 165104 (2007).

● 著者紹介 ●



田中真人

独立行政法人 産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

E-mail: masahito-tanaka@aist.go.jp

専門：キラル光物性，磁気科学，偏光計測技術

【略歴】

2003年神戸大学大学院自然科学研究科博士（後期）課程修了，2004年早稲田大学大学院理工学研究科客員研究助手，2005年産業技術総合研究所研究員，現在に至る。