

技術報告

タンパク質の放射光溶液X線散乱測定におけるX線透過率の同時評価

渡邊 康[§], 猪子 洋二^{*}, 小林 克己^{**}

Real-time monitoring of the X-ray transmittance in the synchrotron radiation solution X-ray scattering measurement

Yasushi Watanabe[§], Yoji Inoko^{*}, Katsumi Kobayashi^{**}[§]National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642^{*}Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531^{**}Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801[§]連絡先 (Corresponding author)

Abstract

Simultaneous estimation of the X-ray transmittance in synchrotron radiation solution X-ray scattering measurements was investigated by using the micro-ion chamber. No clear change in the scattering patterns of bovine submaxillary mucin was observed below 1M sodium chloride. Moreover, the denatured egg white albumin, which was unfolded with 6M guanidine hydrochloride, was characterized by this method. The scattering pattern confirmed the random coil conformation of the protein. These data were obtained by the X-ray transmittance corrections. The real-time monitoring system of the X-ray transmittance will be useful for the elucidation of protein solution properties in food science.

タンパク質が関連する食品科学工学および産業において、タンパク質の分析技術の開発・改良は重要な課題の一つである。特に、温度や溶媒成分の変化によるタンパク質の溶液中の構造変化や分散性などの評価結果は、食品の品質向上や加工におけるタンパク質の有効利用に資する知見となる。低分解能ではあるが溶液中のタンパク質の構造情報が得られる方法がX線溶液散乱法である¹⁾。近年の放射光の発展により²⁾、比較的低濃度の試料で溶液X線散乱実験が可能となった。溶液X線散乱法の長所は、生理的な条件ばかりでなく種々の溶媒条件で測定が可能である点である。溶液X線散乱実験において、塩濃度を変化させたときのタンパク質の散乱測定をする場合に、真の散乱強度を得るためには試料溶液に対するX線の透過率を測定する必要がある。これまで、その透過率の測定は、散乱測定

とは別に評価していた。しかし、効率的に少量試料での高精度測定をするためには、散乱測定した試料を全く同じ条件で透過率も同時に評価できることが望ましい。そこで、本研究ではマイクロイオンチェンバーを利用することにより、試料のX線透過率を散乱測定と同時に評価する方法について検討した。

実験方法

散乱パターンの評価のための標準試料として、ウシ顎下腺ムチンと鶏卵白アルブミン (Sigma Chemicals, St.Louis, MO) を使用した。マイクロイオンチェンバーMIC-T20は、帝国電機製作所 (兵庫) から購入した (現在は林栄精器 (兵庫) が販売)。マイクロイオンチェンバーを使用するための取り付け台および試料台は

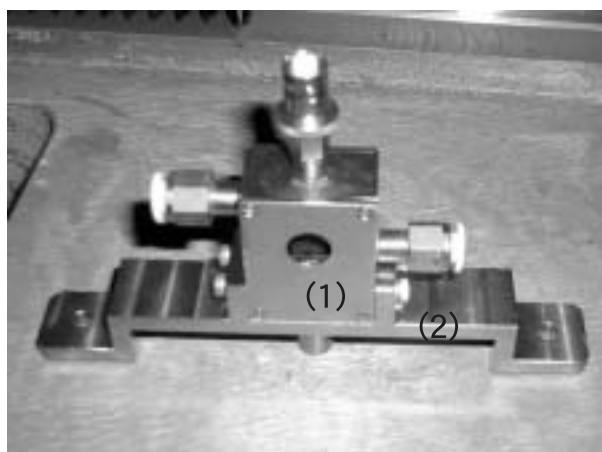


図1 マイクロイオンチェンバーとその固定台
(1) マイクロイオンチェンバー, (2) 固定台

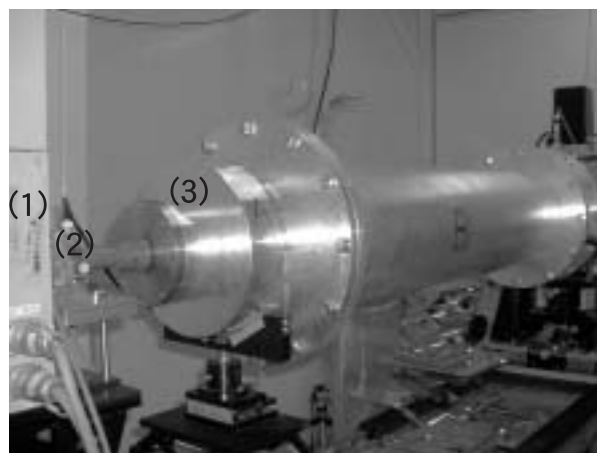


図2 散乱測定部の概観
(1) 試料前のスリット台, (2) 試料周辺部 (詳細は図3参照), (3) 散乱真空槽 (X線は図の左端から右奥の検出器の方に向かって照射される.)

自作した (図1と図3を参照). 放射光溶液X線散乱測定は, 高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームライン10Cに設置された小角溶液X線散乱測定装置 (酵素回折計) を使用した^{3)~5)}. 検出器は一次元位置敏感比例係数装置を用い, X線の波長は0.1488nmに調整し, 試料検出器間距離は900cmに設定した. 試料セルはステンレス製で, 厚み1mm, 縦3mm, 横15mmの穴の両面に石英板 (厚み20 μ m, 縦6mm, 横20mm) を窓材として貼った. 得られた散乱データは, 試料直前のイオンチェンバーの出力により入射X線強度の減衰補正をした. 鶏の腱から精製したコラーゲンを標準物質として, 検出器のチャンネルを散乱ベクトル $q (= (4 / \lambda) \sin \theta)$ (λ はX線波長, 2θ は散乱角)) に変換した.

実験結果および考察

X線透過率同時測定装置の実装

タンパク質の溶液X線散乱研究において, 塩や変性剤濃度を変えながらタンパク質溶液からの散乱を測定する場合が少なくない. このようなとき試料溶液のX線透過率が異なるので, 試料からの散乱・回折プロファイルと比較するためには, 試料による入射X線の吸収 (試料のX線透過率) を評価する必要がある. もしリアルタイムでモニターできれば, 散乱測定と同じ試料状態での解析が可能であるばかりでなく, 試料の量や測定時間において効率的な実験が可能となる利点がある. X線透過率を求めるには, 試料を透過したX線強度を間接的あるいは直接的に測定すれば良い. また,

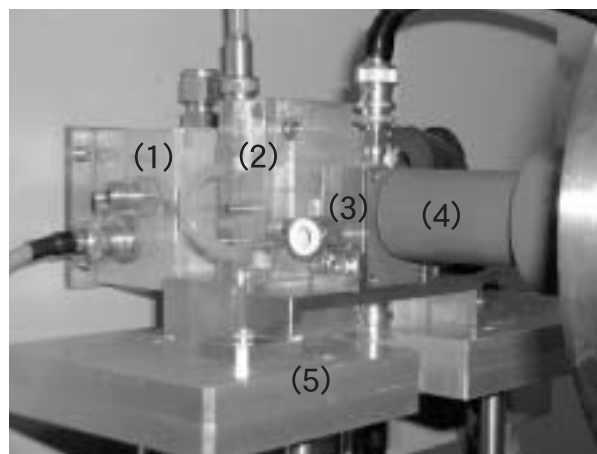


図3 試料周辺部の拡大
(1) 試料前スリット台に固定された入射光強度モニター用イオンチェンバー, (2) 試料セルホルダー (試料セルはこの中にセットする.), (3) マイクロイオンチェンバー, (4) 散乱真空槽の先端部, (5) マイクロイオンチェンバーを設置するための自作試料台 (マイクロイオンチェンバーの直下にコードを通すための切り込みを設けた.)

このための装置を放射光溶液X線散乱測定装置に組み込むに当たっては, 小角散乱領域のバックグランドを増やさないように注意する必要がある.

研究初期において, 入射X線のダイレクトビームのビームストッパーからの2次散乱 (後方散乱) をプロポーションナルカウンター (Ar封入) で間接的に計測する方法を検討した. しかし, シグナルの安定性に問題があり実用に難があった. その後, 硬X線ビーム強度モニターとして厚さ2cmの薄型イオンチェンバー (マ

マイクロイオンチェンバー)が市販されたため、試料のX線透過率のモニターへの利用を検討した。図1にはマイクロイオンチェンバーと固定台の一体写真を示した。固定台は高エネルギー加速器研究機構放射光施設のビームライン10Cの溶液X線散乱測定装置に設置するため自作した。測定時の設定位置は、図2に示した散乱真空槽の先端の手前である(図2の2の部分)。図3には、その試料周辺を拡大した。マイクロイオンチェンバー(図3の3)を試料セルホルダー(図3の2)直後に設置し、5 cm厚のイオンチェンバー(図3の1)を試料セルホルダー直前に設置する。両イオンチェンバーにより、試料前後のX線の強度の減少を測定することで試料のX線透過率を求める。マイクロイオンチェンバーは、窓(50 μm 厚のカプトン膜)を外し大気下で使用した。付加電圧は1.6 KVで、マイクロイオンチェンバーからの出力電流をデジタルマルチメーター、V/Fコンバーター、スケーラー、コンピューターの流れで処理し散乱データファイルに保存した。

X線透過率同時測定装置の利用例

図4には、0.1M MOPS緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を0から1Mまでの各濃度におけるイオンチェンバーとマイクロイオンチェンバーの出力および計算されたX線透過率をプロットした。本実験では、塩濃度の低い試料から順に測定したので、イオンチェンバーの出力は、放射光光源であるため徐々に減衰していることがわかる。そのX線が試料を通過した直後のマイクロイオンチェンバーの出力も入射ビームの減少とともに減少する。さらに、塩濃度の上昇につれて試料のX線透過率が低くなるので、マイクロイオンチェンバーの出力の減少割合はその分さらに減少する。つまり、

マイクロイオンチェンバーの減衰曲線の傾きはイオンチェンバーの減衰曲線の傾きより大きいことが図4からわかる。以下に、本測定システムを利用した実験データの例を示す。たとえば、ウシ顎下腺ムチン(唾液中で食品成分と相互作用をし、粘膜における非特異的防御バリアーとして働いているとも考えられている糖タンパク質)について、1Mまでの塩化ナトリウム溶液の散乱パターンを、X線透過率補正前と後で比較した結果を図5に示した。図5(A)に示した透過率補正前では、各塩濃度における散乱パターンのばらつきが顕著である。しかし、X線透過率補正をすると図5(B)に示したように、この塩濃度の範囲では大きな散乱パターンの差がないことが明らかである。さらに、図6には食品タンパク質である鶏卵白アルブミンの散乱パターンのKratkyプロット(散乱ベクトル $q = (4 / \lambda) \sin(\theta/2)$)

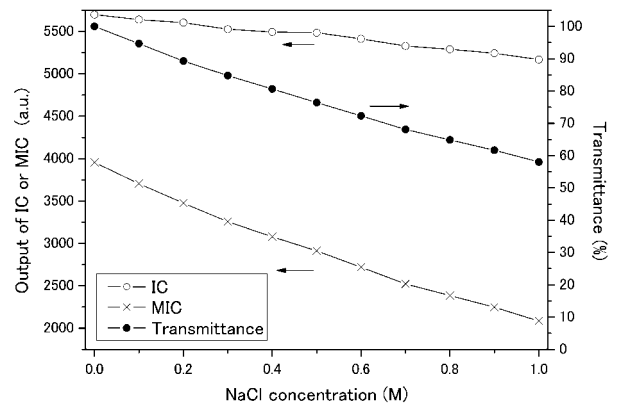


図4 塩化ナトリウムの各濃度におけるイオンチェンバー(IC, \circ)とマイクロイオンチェンバー(MIC, \times)の出力と透過率(\bullet)
溶媒(0.1M MOPS緩衝液, pH7.0)中の塩化ナトリウム濃度を0.1M間隔で1Mまで変化させた。

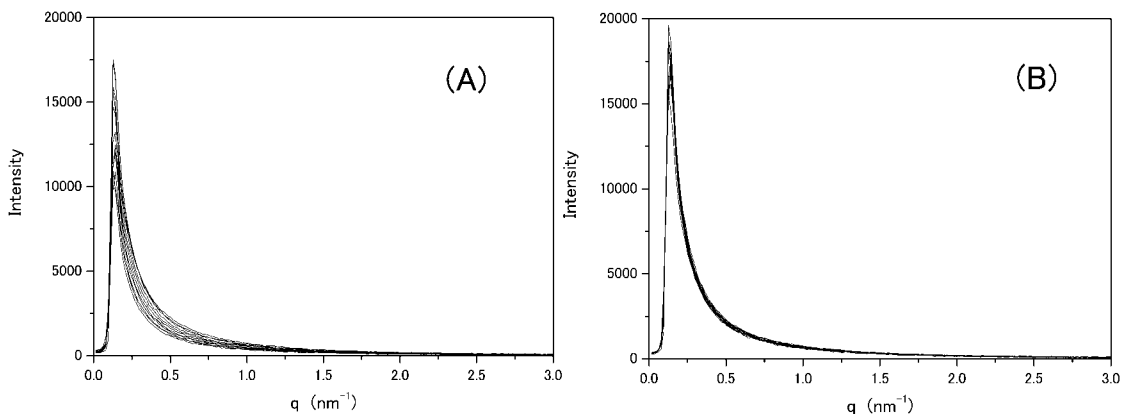


図5 塩化ナトリウムの濃度を変えたときの透過率補正前(A)と補正後(B)の散乱パターンの一例
試料は、1%のウシ顎下腺ムチンで、溶媒条件は図4と同じ。散乱パターンの各塩濃度表示は省略した。

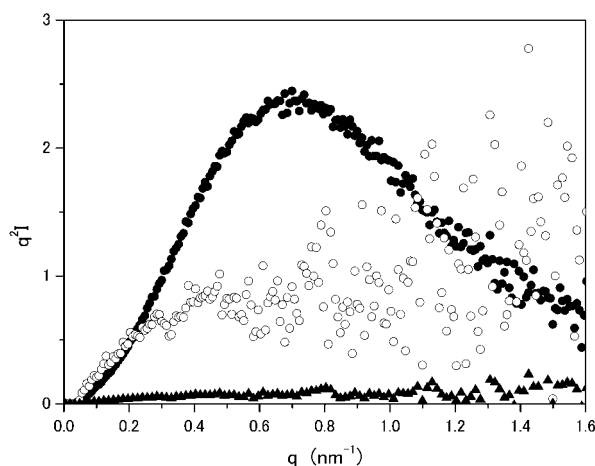


図6 鶏卵白アルブミンの散乱パターンの一例
濃度は0.8%, 溶媒は0.1M MOPS緩衝液, pH7.0.
データは, 上記緩衝液中(○)と6Mグアニジン
塩酸を添加した場合の透過率補正前(▲)と補
正後(□)を示した.

$\sin \frac{2\theta}{2}$ (θ は散乱角) に対する散乱強度 I に q^2 を乗した値) の一例を示した . Kratkyプロットをすることによって , 溶液中のタンパク質の分子構造の概観を知ることができる⁶⁾ . 天然状態でのこのタンパク質の散乱パターンは , 散乱ベクトル q が0.6付近で山をもち , このタンパク質が球状構造であることを示している . この溶媒に6Mグアニジン塩酸 (タンパク質変性剤) を添加すると , 天然条件でみられた球状構造を示す山は崩れて , ランダムコイルに典型的な小角領域 (図6では散乱ベクトル q が0.2以下) では右あがりでありそれ以上の高角領域ではほぼ一定値のパターンとなることがX線透過率補正後で明確になった . この例のように , タンパク質のグアニジン塩酸変性実験における散乱パターンの比較には , X線透過率補正が不可欠である . また , タンパク質の生理的な条件下でも , 塩濃度の異なる条件において各散乱パターンを比較するためにはX線透過率の補正が必要である . 従って , 試料のX線透過率の評価を散乱測定と同時にこなうシステムはタンパク質の係わる食品分野においてタンパク質の溶液物性研究に有用であることが期待できる .

要 約

放射光溶液X線散乱測定におけるマイクロイオンチェンバーの利用によるX線透過率の同時評価について

検討した . ウシ顎下腺ムチンの散乱パターンは塩化ナトリウム濃度が1M以下ではX線透過率補正をすることにより明らかな変化がみられないことがわかった . また , 6Mグアニジン塩酸により変性した鶏卵白アルブミンの散乱測定では , X線透過率の補正によりランダムコイル様のパターンを確認した . 本方法によるX線透過率のリアルタイム測定は , 食品分野においてタンパク質の溶液物性評価に利用され , 食品の質の改良・制御に役立つことが期待できる .

謝 辞

研究予算の一部は , 農林水産省・食品総合プロジェクト予算の援助を受けた . 放射光実験装置の評価実験の一部は , 著者達 (渡邊と猪子) が高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所の協力研究員として装置改良研究の一環として行った . 装置の管理運営は , 著者達と他の協力研究員のワーキンググループメンバーで行っている . また , 試料測定の一部は , 放射光共同利用実験課題 (番号01G379および03G139) として行った .

文 献

- 1) Pilz, I., Proteins, In "Small Angle X-ray Scattering", eds, Glatter, O., and Kratky, O., Academic Press, London, pp239-293 (1982).
- 2) 菊田惺志, 放射光光源, 「X線回折・散乱技術 (上)」, (東京大学出版会, 東京), pp176-200 (1997).
- 3) http://www.kek.jp/users_info/station_spec/bl10/bl10c.html
- 4) <http://www.nims.go.jp/xray/pf/kouso.html>
- 5) 猪子洋二, 酵素回折計ビームライン (BL10C) の現状と将来計画, 「高輝度光源を利用したX線溶液散乱の展望 新酵素回折計の役割」猪子洋二, 小林克己編, (高エネルギー加速器研究機構報告書, 茨城), pp 2-5 (1999).
- 6) Kratky, O., Natural high polymers in the dissolved and solid state, "Small Angle X-ray Scattering", eds, Glatter, O., and Kratky, O., Academic Press, London, pp361-386 (1982).