

SANS解析の展開を目指して

京都大学原子炉実験所

杉 山 正 明

中性子小角散乱の展開

- 強力な線源
- 測定装置の技術開発
- 解析手法の発展
- 適切なResearch Target



- J-PARC・原子炉ビーム利用の高効率化
- ビーム集光技術の開発
- 高角度までの測定技術の開発
- タンパク質重水素化試料作製技術の発展
- タンパク質高次構造解明
- 工学的材料の構造解明

中性子小角散乱の新展開の機は熟した！

解析法は、単純に慣性半径や相関長を求めるだけか？

- 様々な分野で独自に使われている手法の紹介
- 上記を参考にして、新たな手法の開発
- 特に、新たな分光器と関連して！

- 我々は散乱データをすべて利用しているのか？
- 中性子の利点はどこにあるか？
- 新たな解析手法の開発

1月18日(月)

あいさつ

福永俊晴(京大原子炉)

— Session I 座長:金谷利治(京大化研) —
SANS解析の展開を目指して

杉山正明(京大原子炉)

物質科学へのSANSの展開と大観(TAIKAN)

鈴木淳市(原子力機構 J-PARCセンター)

— Session II 座長:福永俊晴(京大原子炉) —
SANSの産業利用について—期待と課題—

笹川 薫(株)コベルコ科研 エレクトロニクス事業部)

SANS/SAXS利用による合金コントラストバリエーション解析

大沼正人(物材機構 量子ビームセンター)

高強度全散乱装置によるWide-Q測定

大友季哉(高工研 物構研)

1月19日(火)

— Session III 座長:川端祐司(京大原子炉) —
中性子スピン干渉を用いたSANS

日野正裕(京大原子炉)

原理から考え直す中性子小角散乱装置と解析法

古坂道弘(北大院工)

— Session IV 座長:高椋利幸(佐賀大理工) —

水/有機溶媒/塩混合系の長距離秩序構造に対するSANS解析

貞包浩一郎(京大院理)

中性子小角散乱におけるコントラスト変調法の可能性

小泉 智(原子力機構 先端研)

— Session V 座長:藤原 悟 (原子力機構 量子ビーム) —

コントラスト変調中性子小角散乱を用いたソフトマター多成分系の精密構造解析

遠藤 仁(東大物性研)

wide-q測定における蛋白質の構造解析の検討

高田慎一(原子力機構 J-PARCセンター)

糖脂質含有するモデル生体膜の構造解析(逆コントラスト変化法の応用)

平井光博(群馬大工)

— Session VI 座長:杉山正明(京大原子炉)—
討論

国内外でのSANS解析法の現状紹介

ハードマター解析法:物材機構 大場洋次郎

バイオマター解析法:原子力機構 高田慎一

SANS解析の方向性・開発ポイント 等



ミクロ構造解析からナノ構造解析へ

散乱・回折の基本式

$$I(\vec{q}) = \left| \sum_j b_j \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}_j) \right|^2$$

小角散乱化

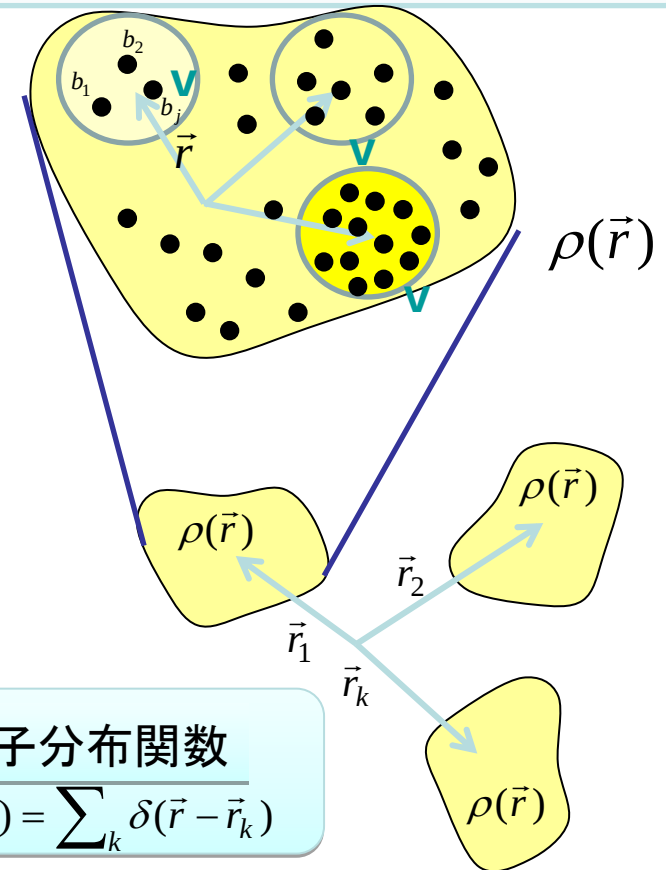
小角散乱強度の基本式

$$I(\vec{q}) = \left| \int \rho(\vec{r}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r} \right|^2$$

ナノ分子分布

$$\begin{aligned} I(\vec{q}) &= \left| \int P(\vec{r}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r} \right|^2 \\ &= \left| \int \rho(\vec{r}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r} \times \int s(\vec{r}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r} \right|^2 \\ &= |F(\vec{q})|^2 \cdot S(\vec{q}) \text{ 分子形状因子と構造因子の積} \end{aligned}$$

低分解能による粗視化: $\rho(\vec{r}_l) = \sum_j b_j / v$



分子分布関数

$$s(\vec{r}) = \sum_k \delta(\vec{r} - \vec{r}_k)$$

全系の散乱長密度分布関数

$$P(\vec{r}) = \int \rho(\vec{r}') s(\vec{r}' - \vec{r}) d\vec{r}'$$

1分子の密度分布 分子分布

SANS解析Target

1. ナノ粒子の希薄系・・・ $S(q)=N$ (N :粒子数) $\Rightarrow I(q)=N \times |F(q)|^2$

$F(q)$ を解析する $\Rightarrow$ 粒子の形状解析

例: ミセル・タンパク質など

N を解析する $\Rightarrow$ 粒子の分布解析

例: 金属材料中の析出物のサイズ分布解析

2. 微粒子の濃厚系・・・ $F(q)=b$ (b :散乱長) $\Rightarrow I(q)=b^2 \times S(q)$

$S(q)$ を解析する $\Rightarrow$ 粒子の分布ゆらぎ(密度揺らぎ)解析

例: Blockcopolymerなどの秩序構造(Bragg peak)

高分子電解質液体(B-E理論)・ゲル(Onuki 理論)

/Panyukov-Rabin の理論)

合金のSpinodal decomposition(相分離peak)

水+アルコール系・超臨界流体(OZ解析)

3. ナノ粒子の(準)濃厚系・・・ $F(q)$ と $S(q)$ との分離不可能

Percus-Yevics近似などを用いて $S(q)$ を求める。 ???

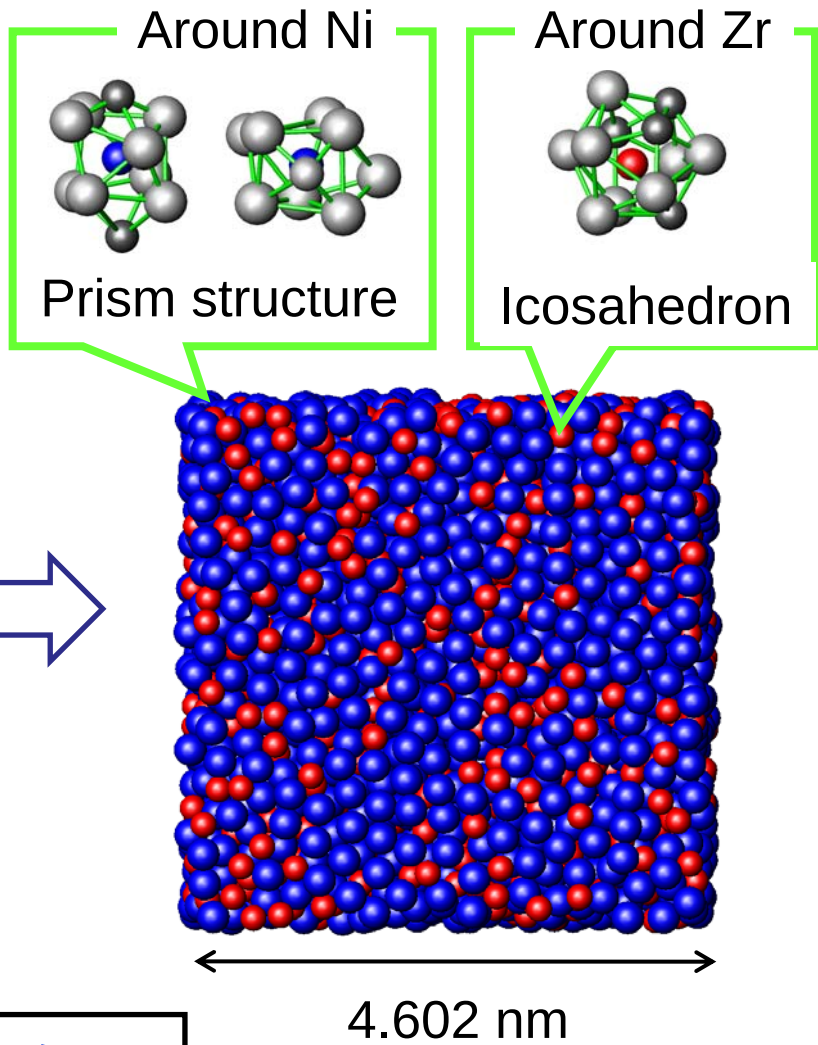
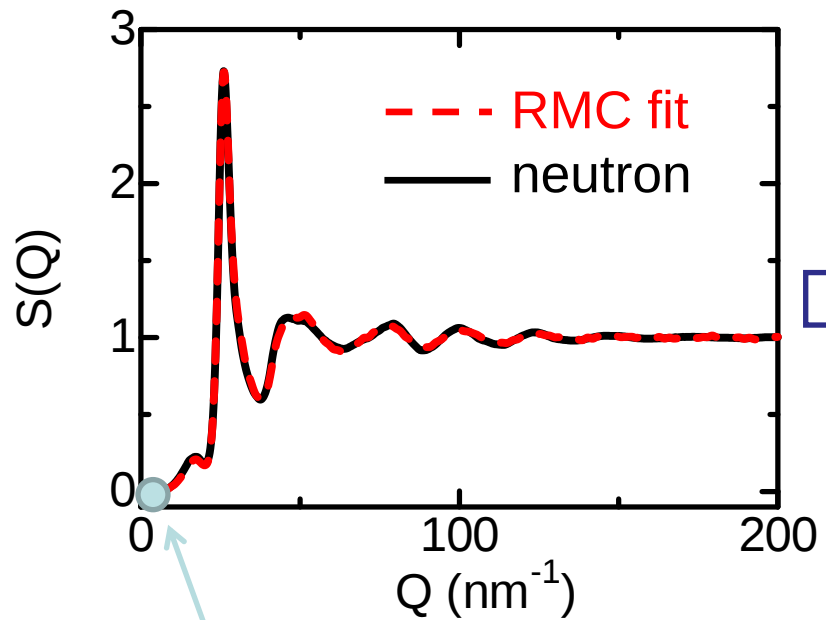
S(Q)解析

- ゆらぎ構造の可視化(実空間構造)
- 解析データ $\Rightarrow$ 構造モデル
- Reverse Monte Carlo アルゴリズム
- 試料: 超臨界CO₂

- 
- アルゴリズムの改良点
 - 構造パラメータの必要条件
 - 解の一意性
 - 今後

Standard RMC analysis for total scattering

NiZr Metal Glass



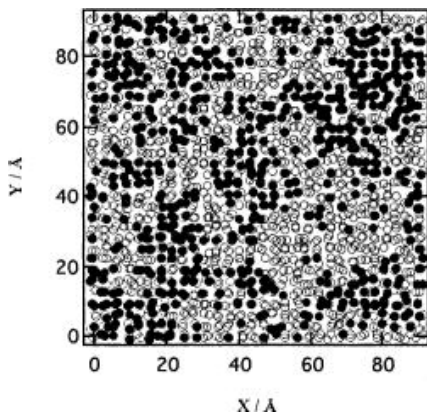
このQ領域の構造解析を行う

Application of RMC to SANS

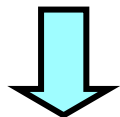
by Prof. Misawa

(Water+alcohol system)

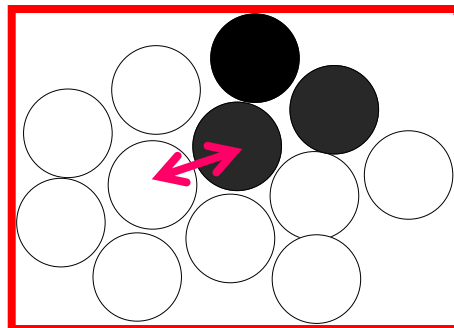
structure 1



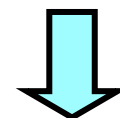
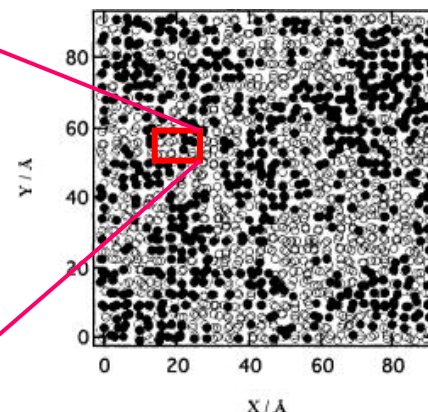
$$I_{cal\ 1}(q)$$



$$\chi_1 = \left[\frac{\sum_n \{(I_{cal\ 1}(q) - I_{exp}(q)) / I_{exp}(q)\}^2}{n} \right]^{1/2}$$



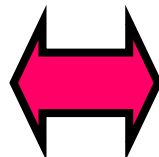
structure 2



$$I_{cal\ 2}(q)$$



$$\chi_2 = \left[\frac{\sum_n \{(I_{cal\ 2}(q) - I_{exp}(q)) / I_{exp}(q)\}^2}{n} \right]^{1/2}$$



- Coarse graining
- Particle Moving Method

改良と問題点

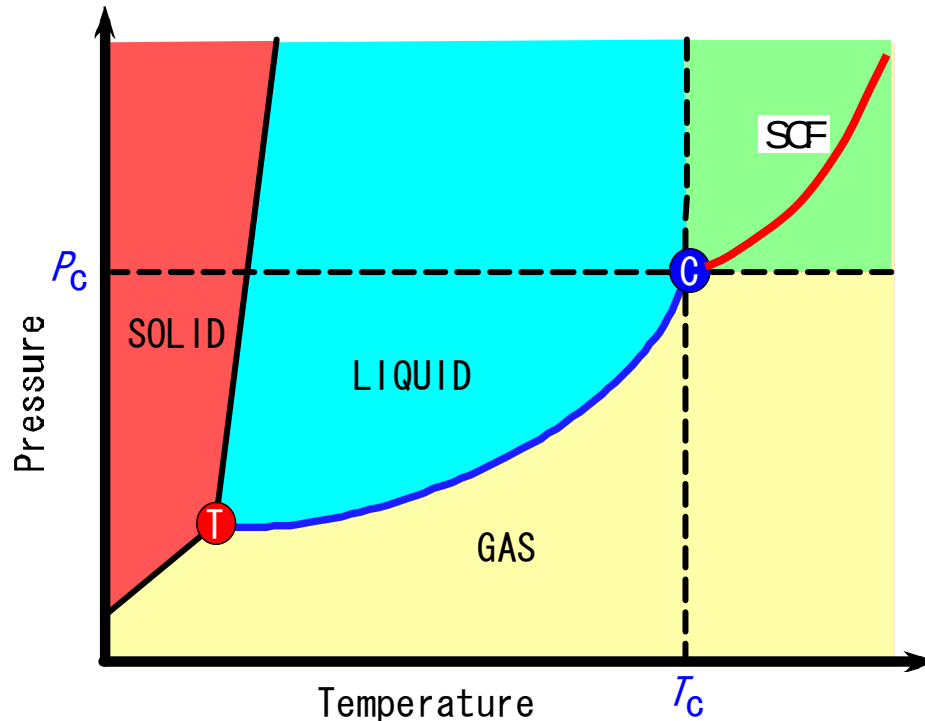
- 言語: Fortran $\Rightarrow$ C++
- 乱数: Mersenne Twisterに変更
- 散乱強度の評価法の変更: 小角領域の強度だけでなく中・高角の散乱強度を適切に評価するために散乱不変量($= \int Q^2 I(Q) dQ$)を用いて強度の規格化
- 格子配置: 自由位置配置(配置アルゴリズムを更新)

240Å, 24hr $\Rightarrow$ 600Å, 1,000,000 mols, 24-48hr by PC

- サイズ問題: システムサイズの影響をチェック
- 構造階層性の影響: 最接近距離の効果
- 解の一意性: 要検討

What's SuperCritical Fluid

Typical phase diagram
of pure material



State over critical pressure P_c and critical temperature T_c is defined as **SuperCritical Fluid(SCF)**

Features of SCF

- Diffusion constant close to Gas and Density close to liquid.
- By passing through SCF state, continuous transition between liquid and gas can be achieved.
- **Boundary, which divides SCF state into two phases, exists.**
- **Solubility drastically changes at the boundary**
- **Around critical points, large scale density fluctuation exists (Critical opalescence)**
- **Solubility increases by adding third molecule (Entertainer effect)**

SANS experiment of SCF-CO₂

- KUR-SCF cell**

Max Pressure :

20MPa

Max Temperature :

100°C

Neutron Transmission :

80%

- SWAN(KENS)**

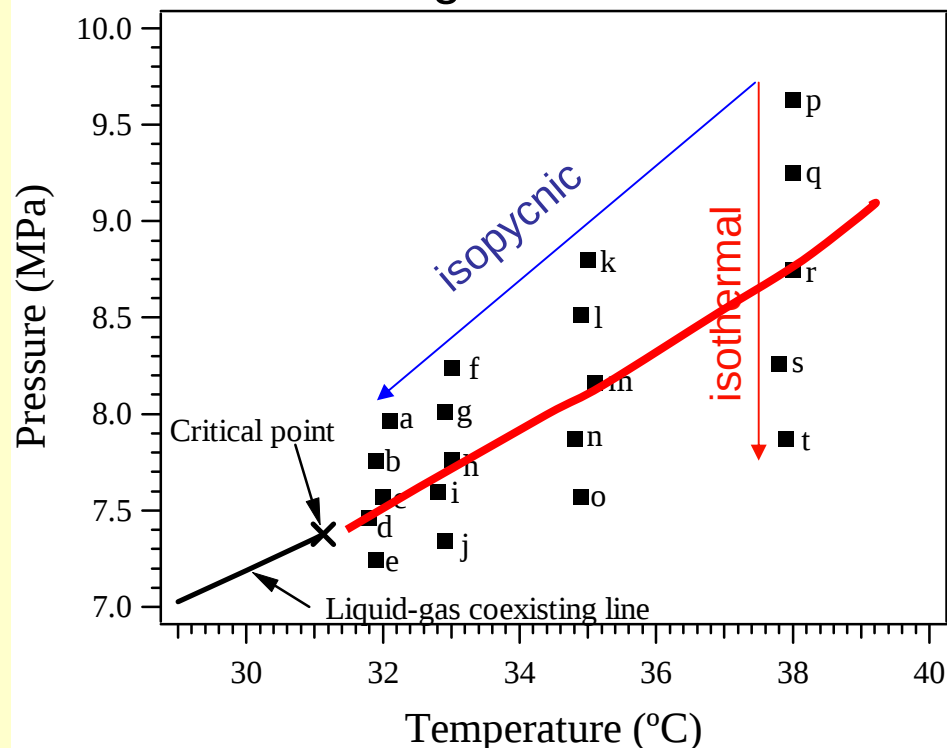
Q-range:

0.01–0.5 Å⁻¹

Measurement time :

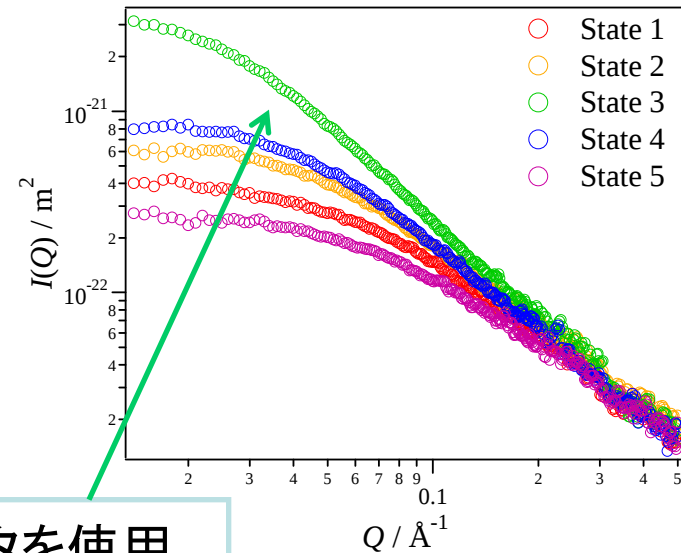
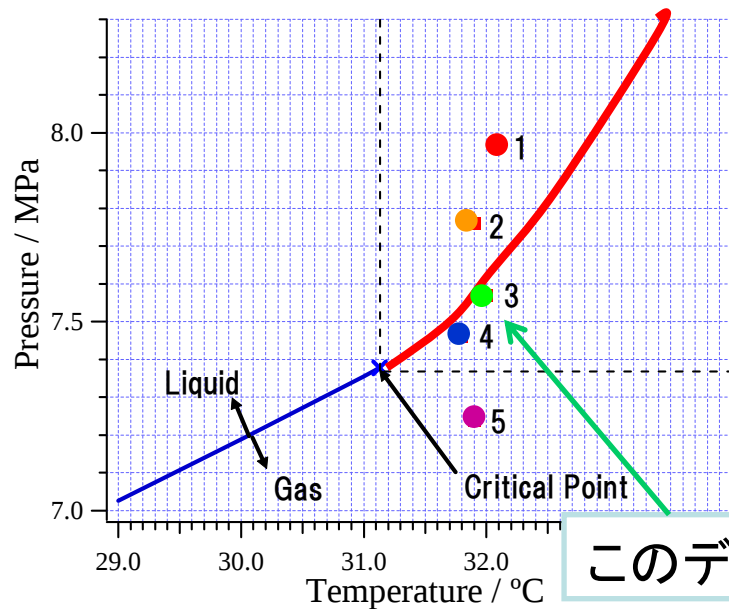
10–30 minutes

P-T Phase diagram



SANS measurements were performed at 5 isothermal lines 32,33,35,38°C
Critical Point of CO₂
P_c=7.38Pa, T_c=31.1°C

SANS result of SCF-CO₂



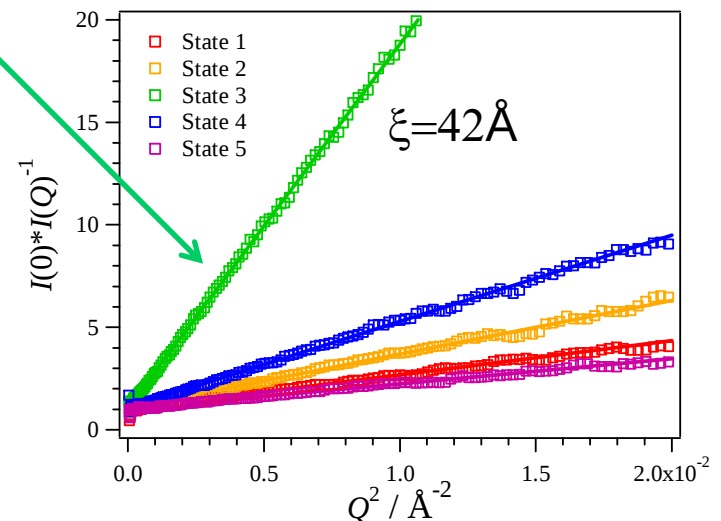
このデータを使用

- Ornstein-Zernike law

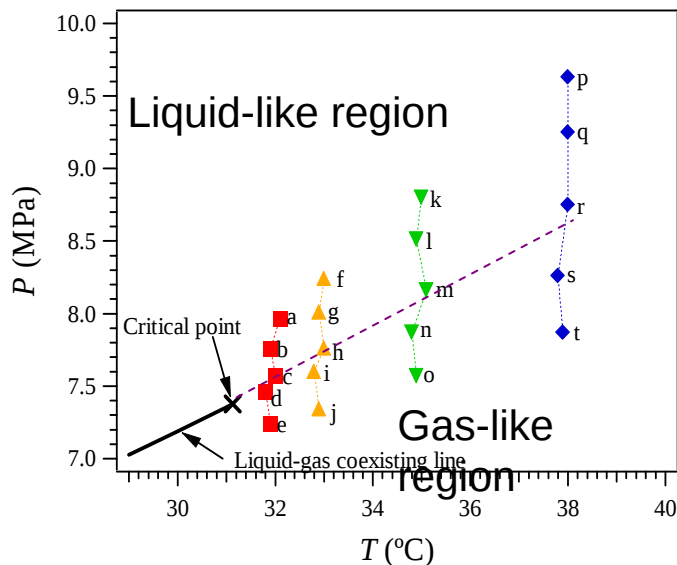
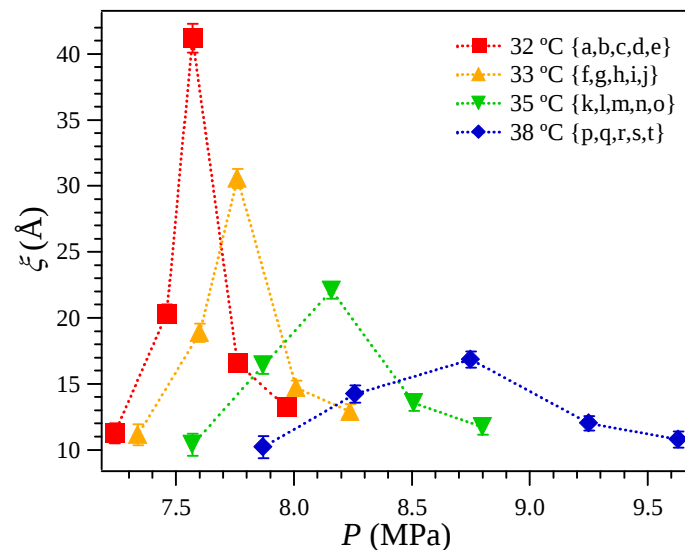
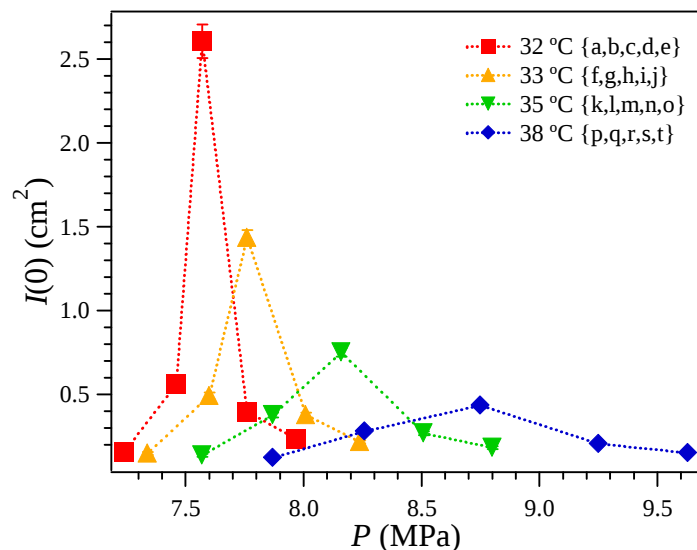
$$I(q) = \frac{I_0}{1 + \xi^2 q^2}$$

↓ 1/I vs q^2 plot (OZ plot)

$$\frac{I_0}{I(q)} = 1 + \xi^2 q^2$$

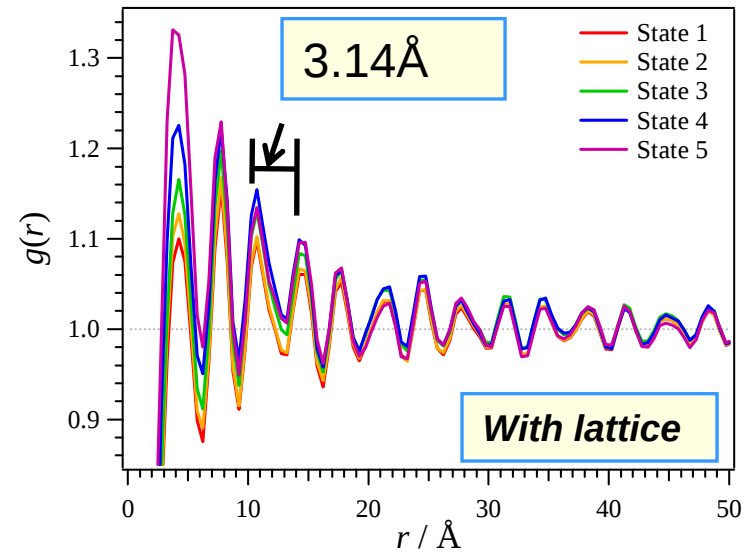
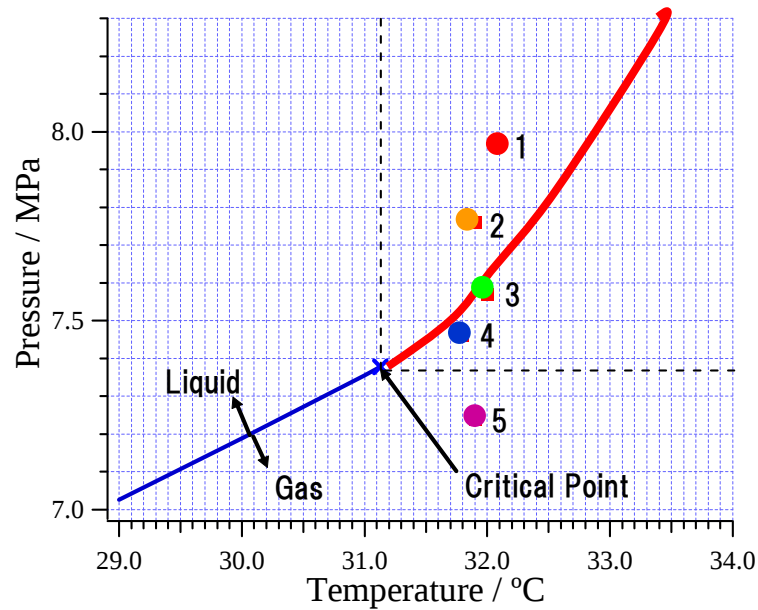


等温線上の密度ゆらぎの変化



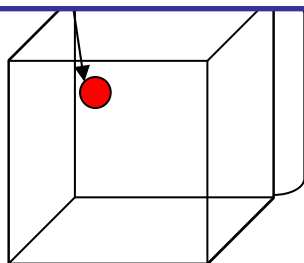
- $I(0)$ and ξ have maximum on isothermal line, and the trajectory of the maximum shows **ridge line**.**
- Only with OZ analysis, we cannot recognize structural difference between gas-like region and liquid-like one.**

Effect of lattice on $g(r)$



自由位置配置法

セル内粒子座標(x, y, z)



$$\frac{d_{\min}}{\sqrt{3}}$$

同じセルに
粒子を二つ
入れない

critical packing ratio

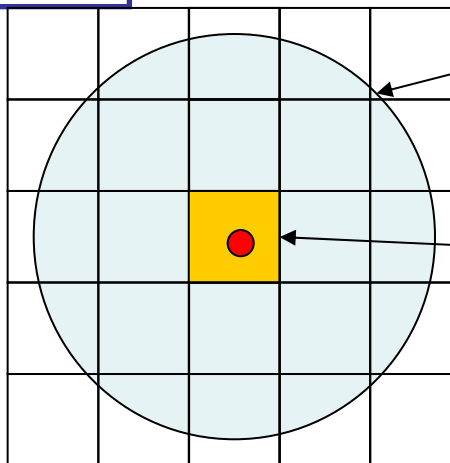
$$\frac{\pi}{6} \rho d_{\min}^3 = 0.13044$$

D. A. Young & B. J. Alder
(1971)

M. Misawa (1990)

In the case of CO_2 , $d_{\min} = 3.39 \text{ \AA}$

セルアドレス: i (1~総セル数)

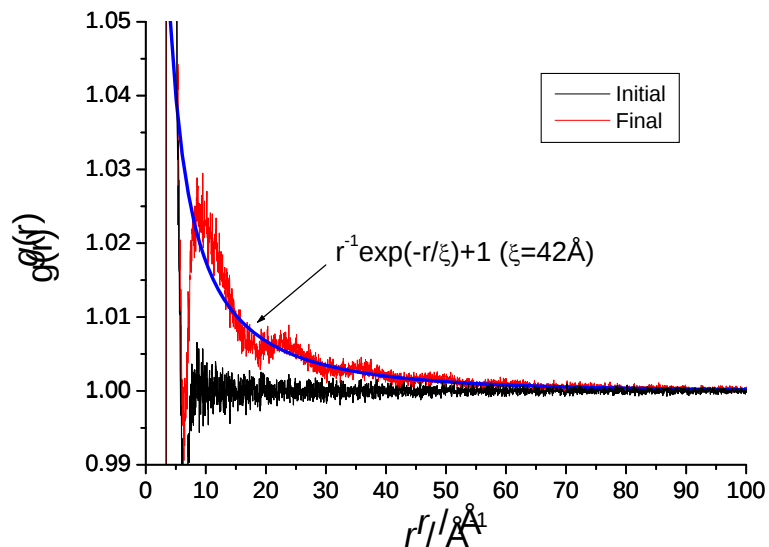


最近接距離を
満たさない範囲

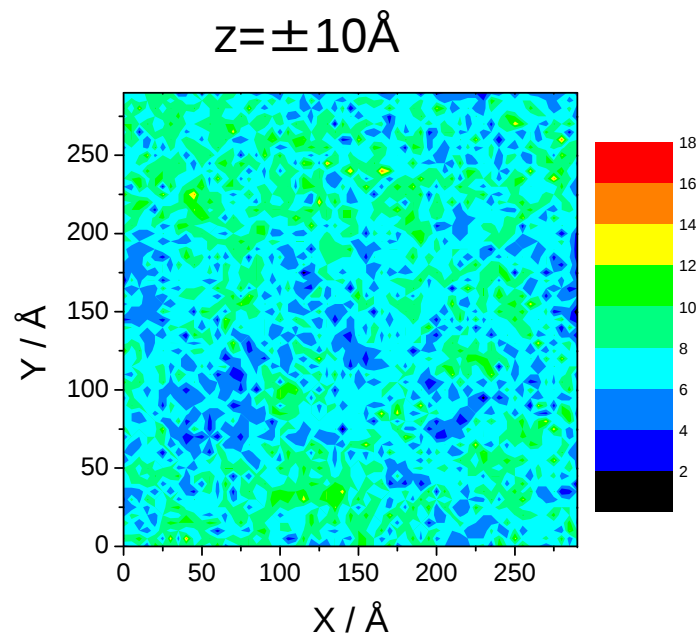
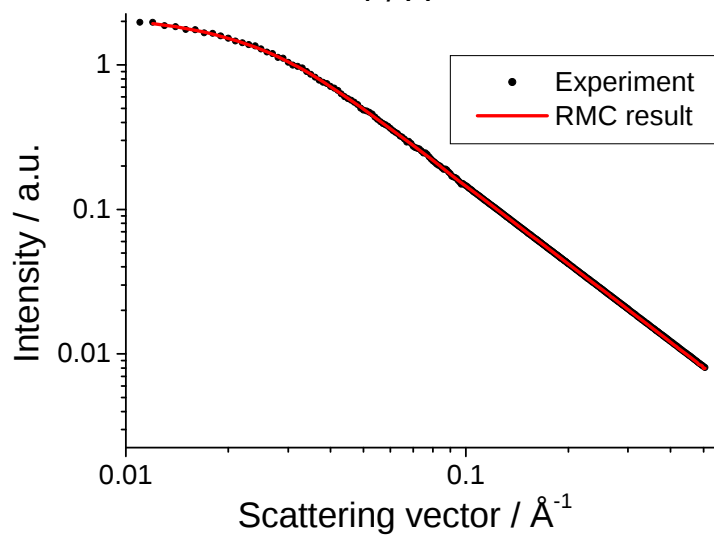
粒子を配置したセル

- ① 粒子の存在しないセル内の、ランダムな座標に粒子を配置する
 - ② 粒子を配置したセルの周囲24個のセルに粒子が存在しないか調べる
 - ③ 最外殻部のセルに粒子が存在した場合、粒子座標から距離を求める
- 以上の過程で最接近距離を満たさない粒子がなければ、正式に配置する

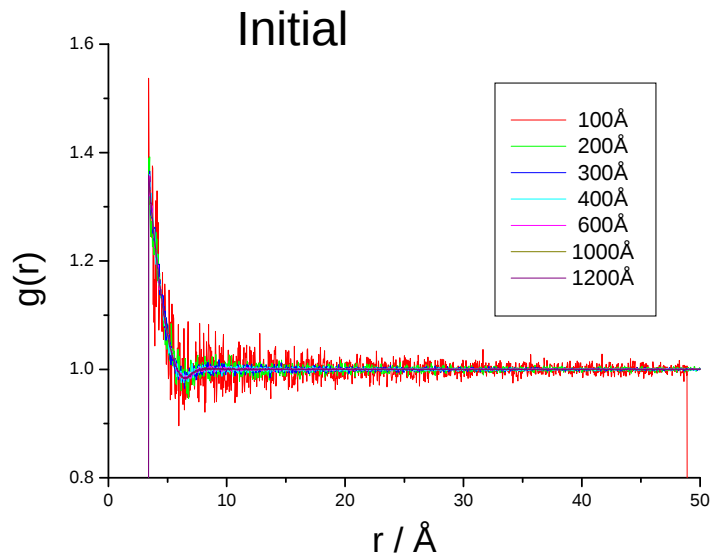
Fitting result



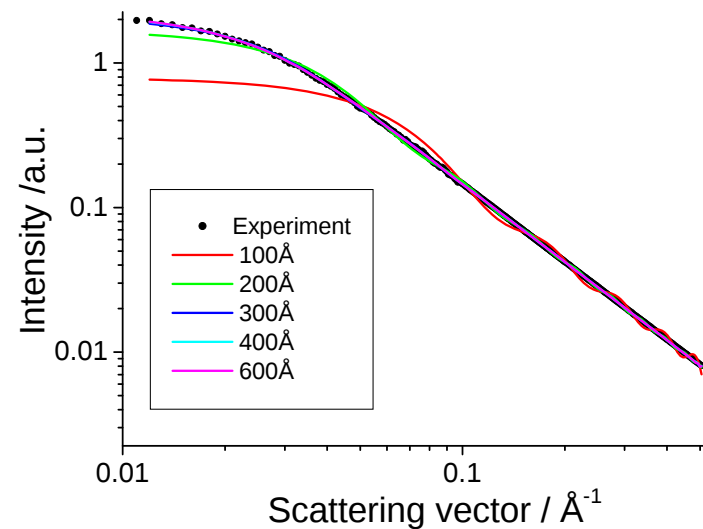
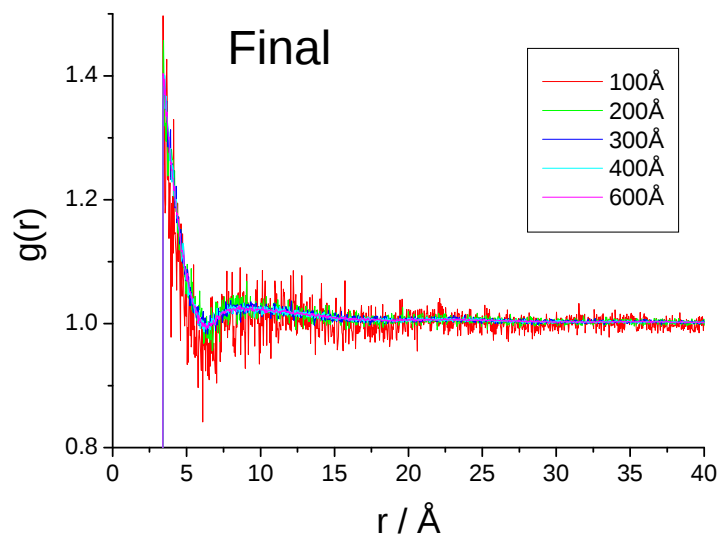
Cell=300x300x300
=600x600x600 $\text{\AA}^3$
Particle No=1,000,000



System Size

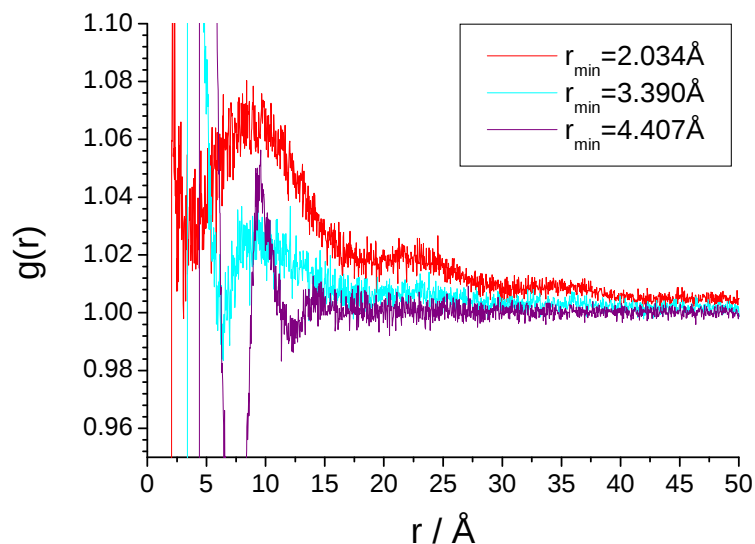
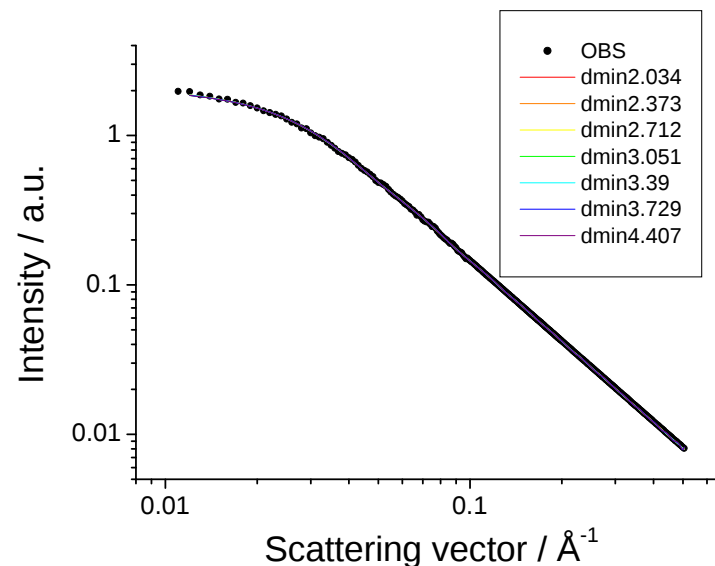
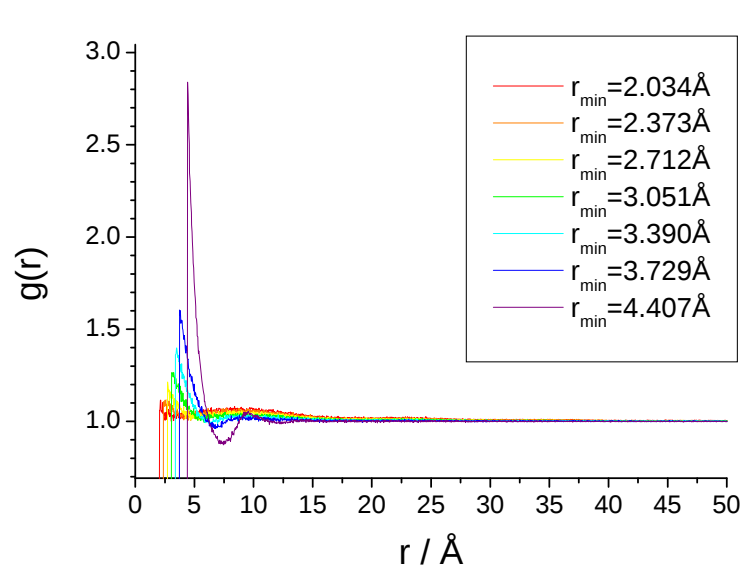


相関長の8倍程度のサイズのシステムが最低必要である



下部構造の影響

— 最接近距離 —

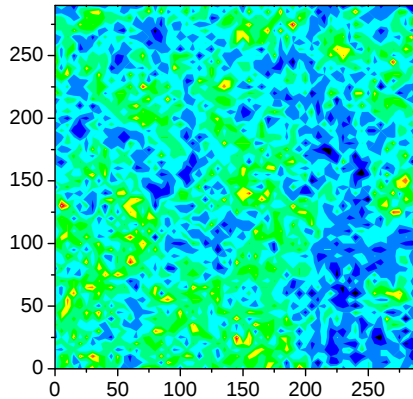


- Cut-off距離によらずRMCは、散乱データに合わせることができる
- $g(r)$ は異なる。

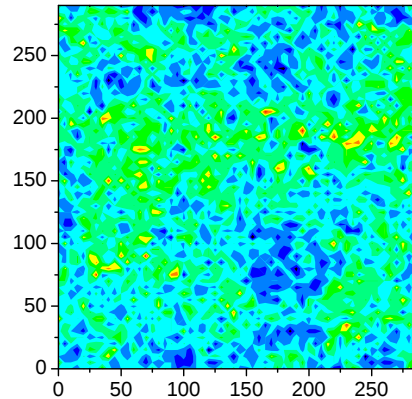
下部構造の影響

— 最接近距離 —

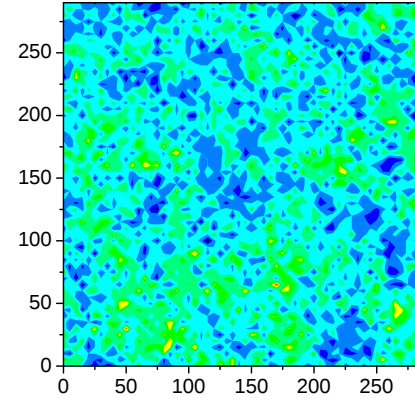
2.034Å



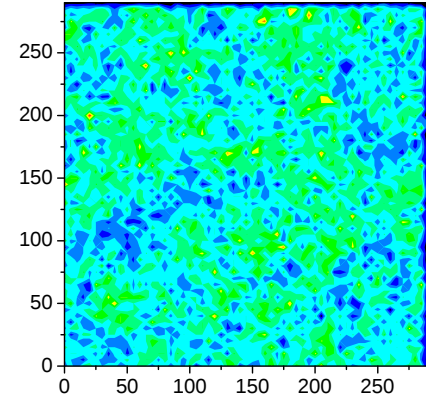
2.373Å



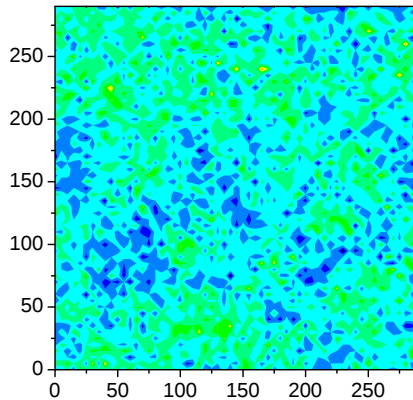
2.712Å



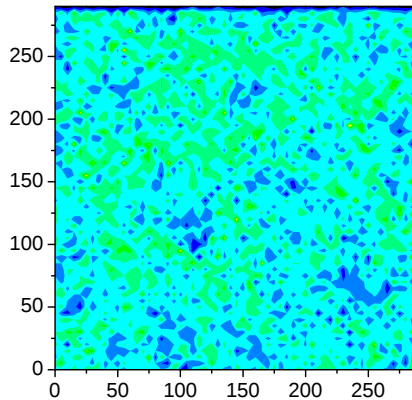
3.051Å



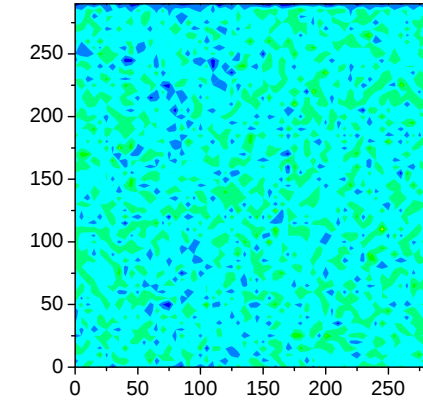
3.339Å



3.729Å



4.407Å



Cut-off距離に応じてゆらぎの振幅が異なる

上部ゆらぎ構造は下部構造に影響を受ける。

まとめと今後

—密度揺らぎ可視化—

- プログラムのrefinementにより、 $600\text{\AA}^3$, 1M粒子数なら24-48時間程度で、散乱強度を再現する分子配置を求めることが可能となった。
- 格子粒子配置から自由粒子配置に変更し、分子分布ゆらぎのモデリングに成功した
- 小角散乱のRMCでは、Systemサイズは、ゆらぎの8-10倍程度必要である。

- Cut-off距離によらず、SANS曲線を再現する構造モデルが存在する
- ただし、 $g(r)$ は r の小さい領域で異なる。
- **下部構造を再現する**、もしくは**下部構造に沿ったゆらぎ構造**をモデル化する方法が必要である。

- **広角領域の散乱データ(NOVA, TAIKAN)を用いたRMC**

⇒分子配向まで考慮する必要があるか？

- **全散乱等で求めた $g(r)$ から外れた場合は、Penaltyを与えるアルゴリズムの開発**

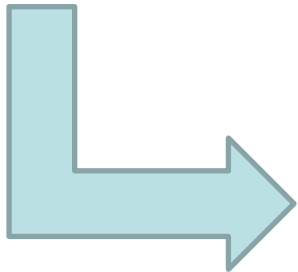
- SCF-CO₂+アルコール系への適用⇒大きさの違う分子の場合の自由配置アルゴリズムの開発
- 濃厚臨界系(水+アルコール)への応用

その他拘束の追加

コントラスト変調

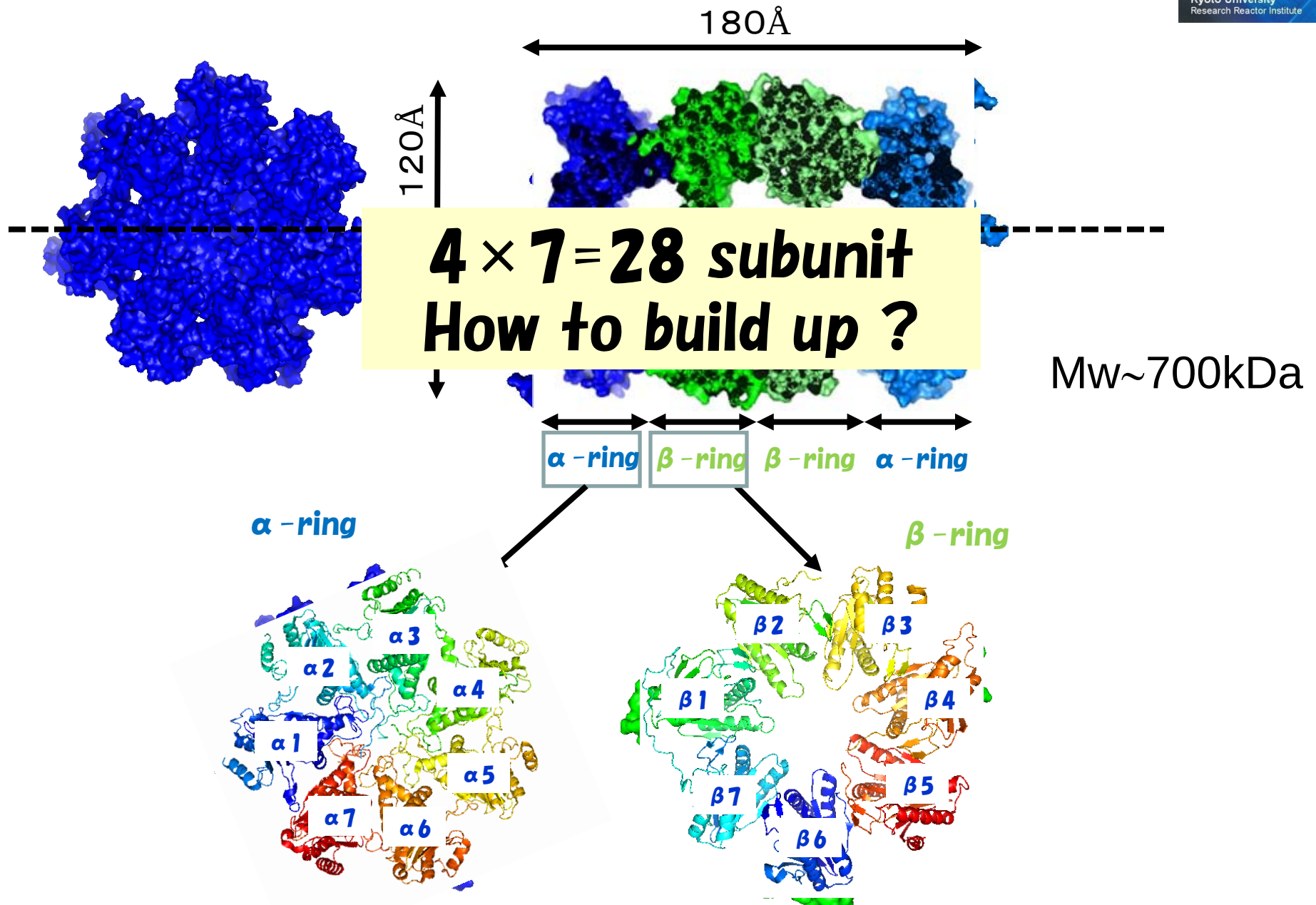
F(Q)解析→タンパク質高次構造

- 高次構造の再構成
- 構造モデル ⇒ 解析データ
- SANS Simulation（中性子散乱に対応）
- 試料：数Subunitからなる4次構造を持つタンパク質



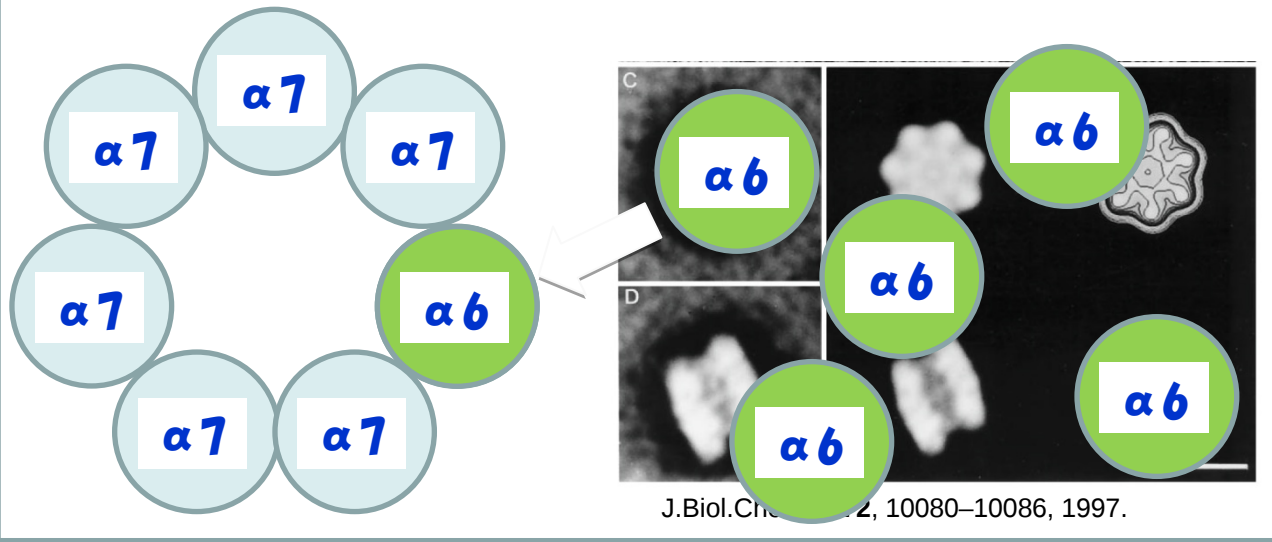
- 溶液中での構造変性への対応
- RMCを用いた構造解析への対応
- 結合水の考慮(特に小型タンパク質)
- 高角度散乱強度への対応

Structure of Proteasome

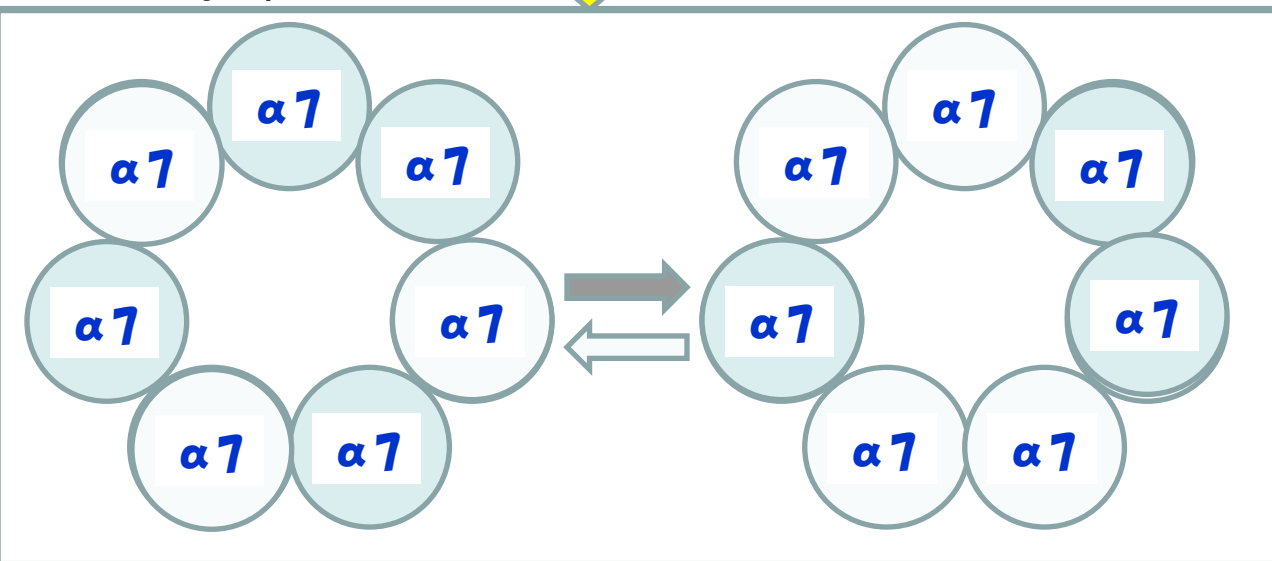


Proteasome $\alpha 7$ ring

$\alpha 7$ subunits make a homo-ring! $\Rightarrow$ **Correctly Speaking, a double ring**



My speculation



When $\alpha 6$ is added
to $\alpha 7$ -ring solution,



$\alpha 6$ subunit is introduced
into $\alpha 7$ -ring...

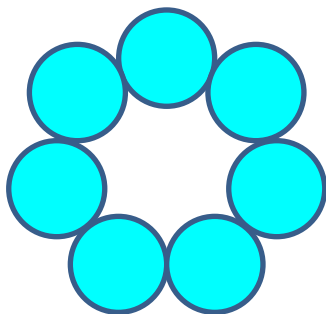


There could exist a
kinetics of subunit
exchange even in homo
 $\alpha 7$ -ring!

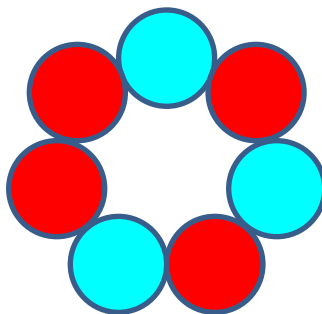


How to prove subunit exchange

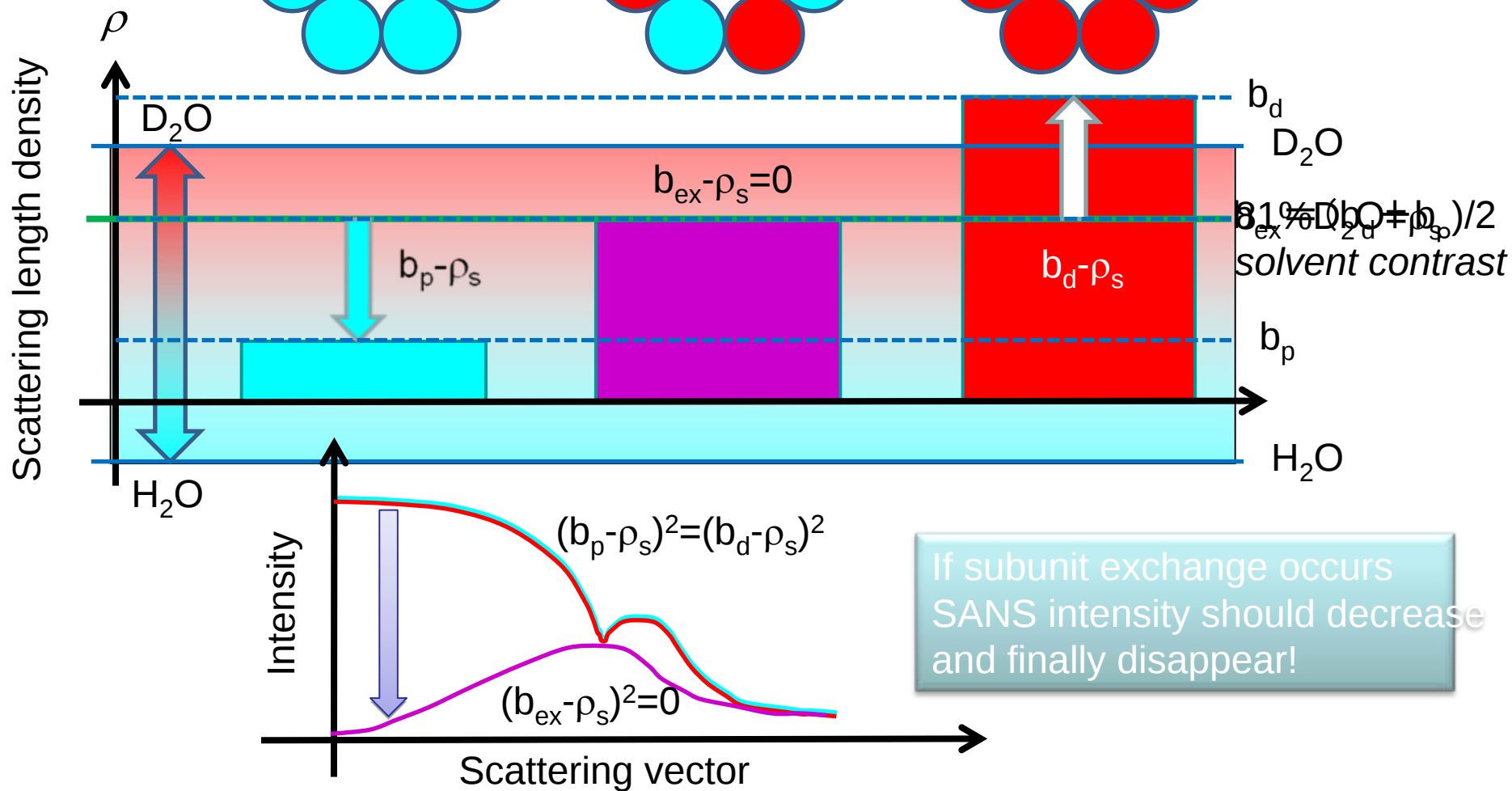
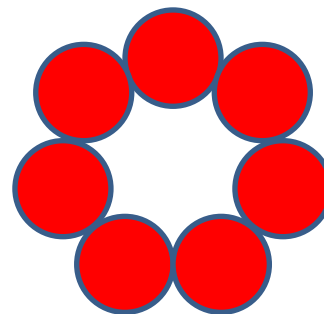
Protonated



Exchanged



Deuterated



Experiment

Sample:

protonated $\alpha 7$ subunit (bovine)
deuterated $\alpha 7$ subunit (bovine),
deuteration ratio >95%

Solvent:

81% D_2O

SANS cameras:

SANS-U (ISSP) and D22 (ILL)

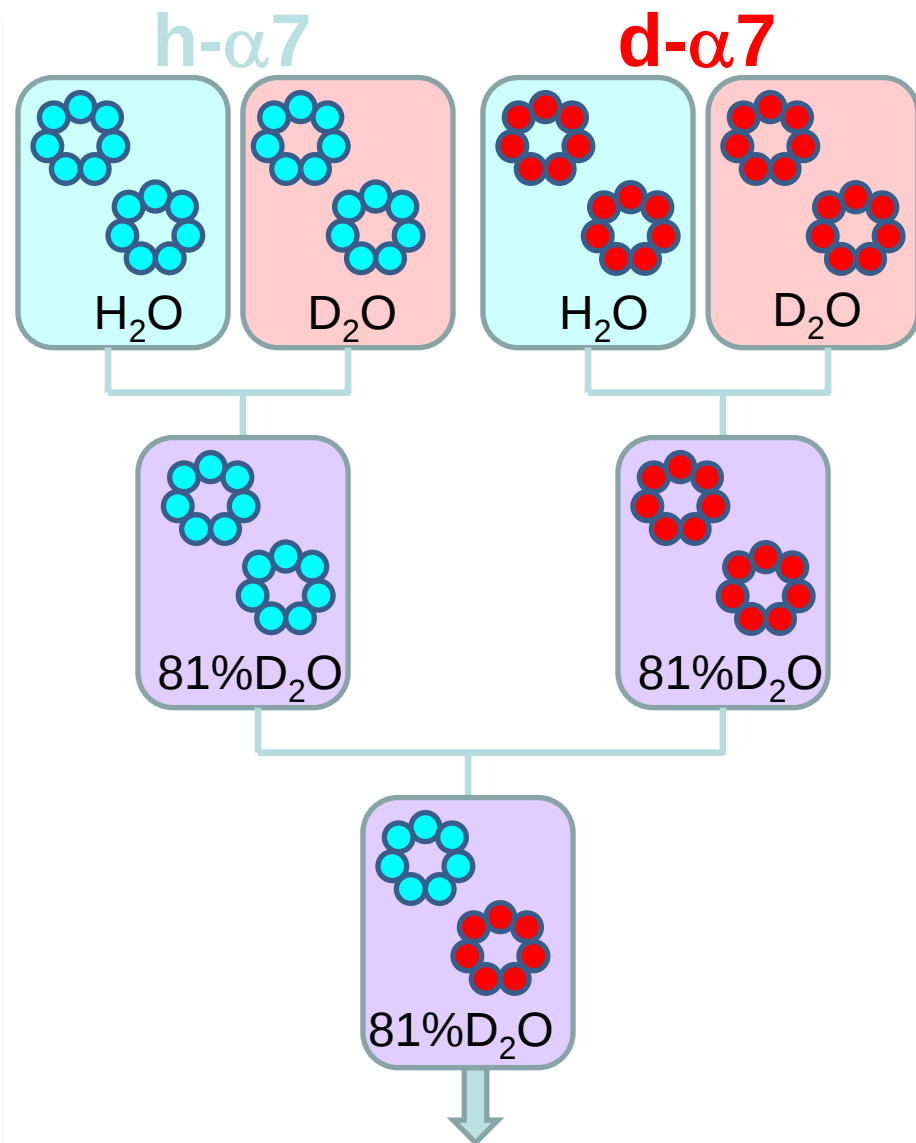
Q-range:

0.008-0.25 $\text{\AA}^{-1}$

Time slice: 15 minutes,

Total measuring time: 12 -14
hrs

Temperature: 25C

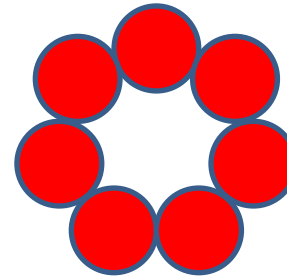
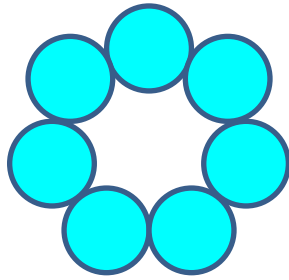


Time Resolved SANS

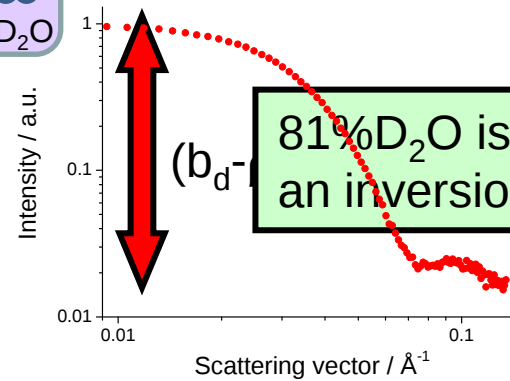
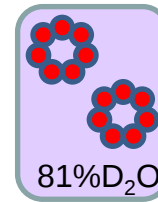
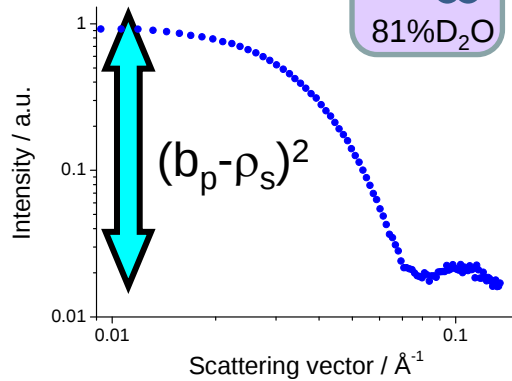
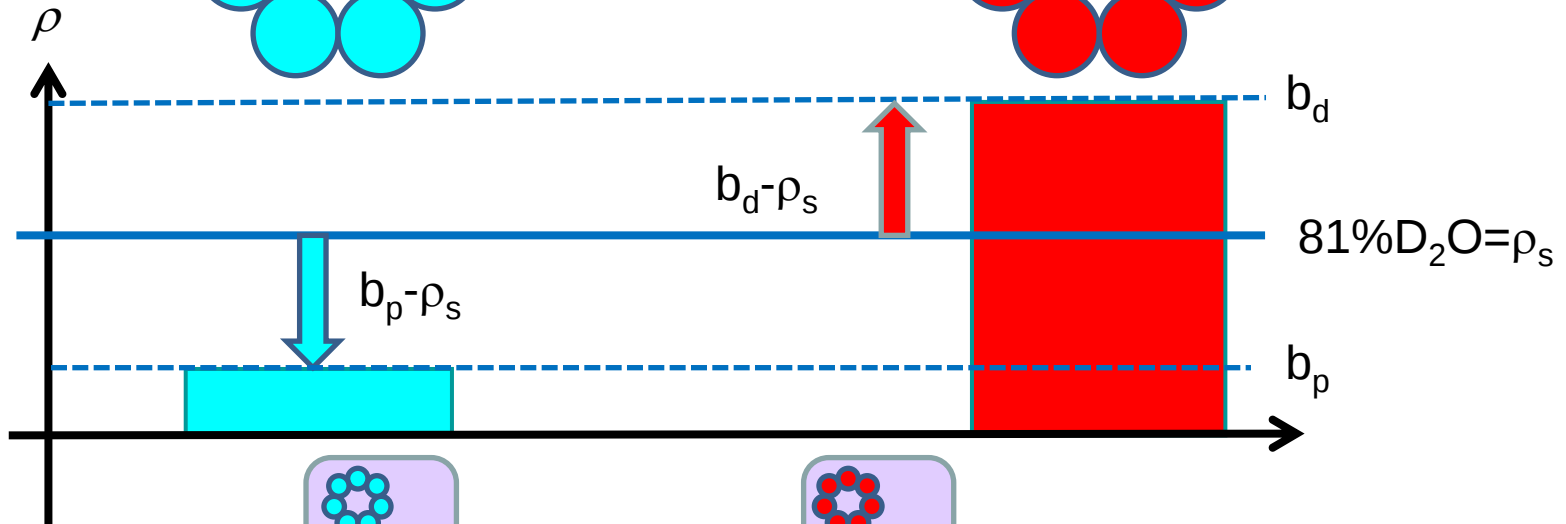
Contrast check

Protonated

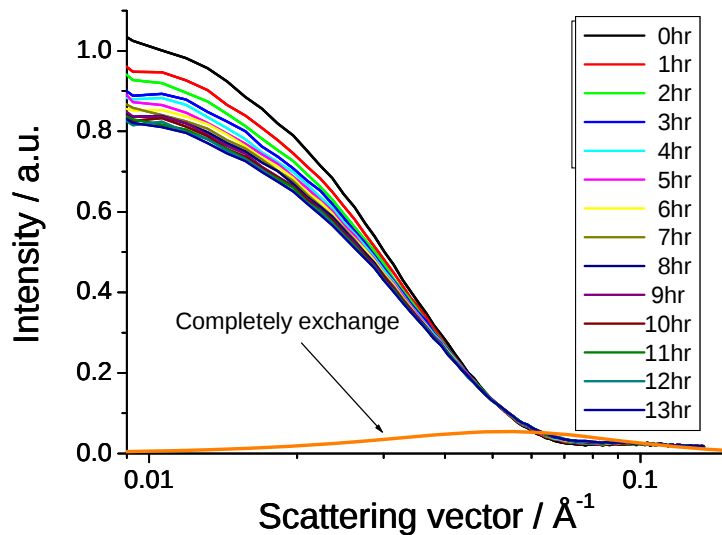
Deuterated



Scattering length density



Time-Resolved SANS Experiment

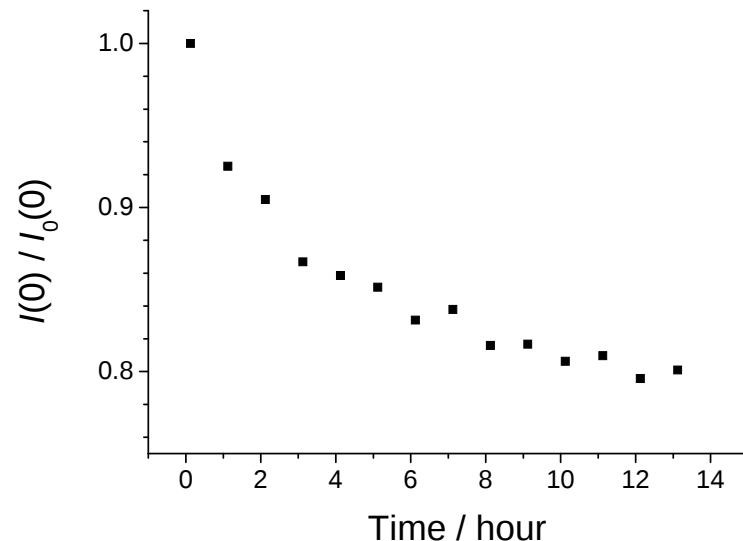


SANS intensity decreased!

BUT

The decrease stopped
before SANS intensity reaches 0!

Time evolution of $I(0)$

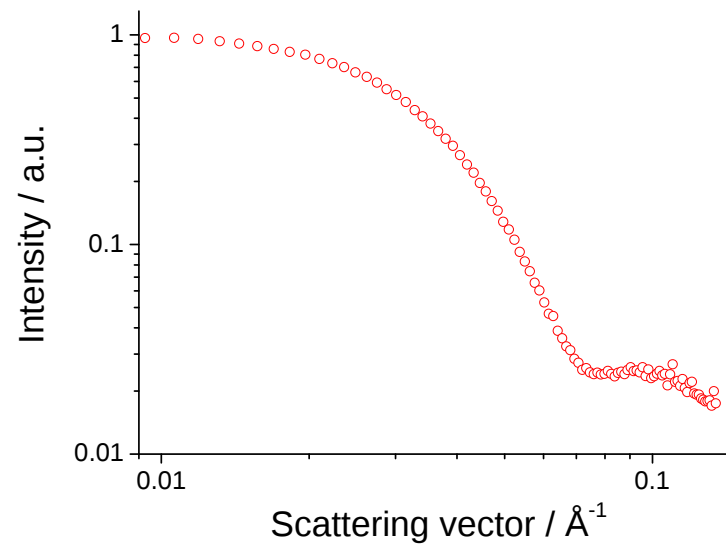
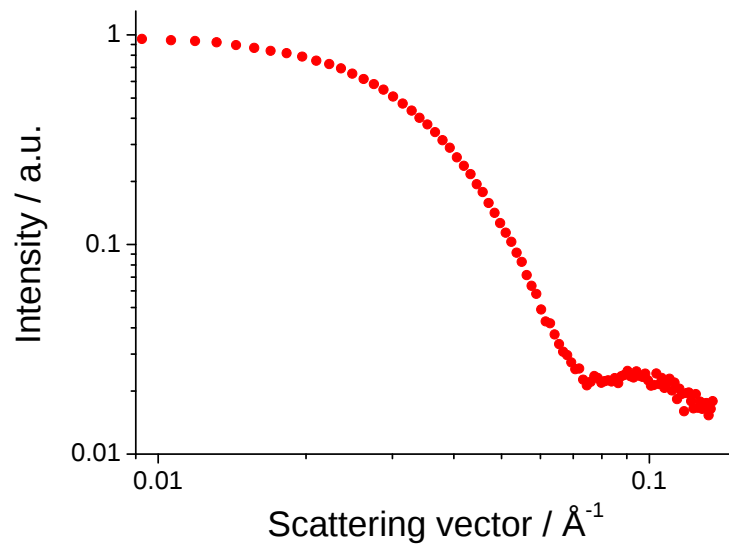
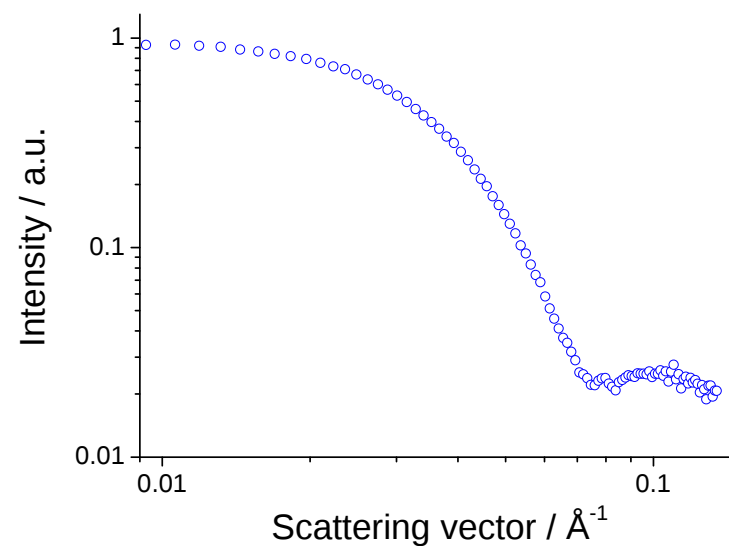
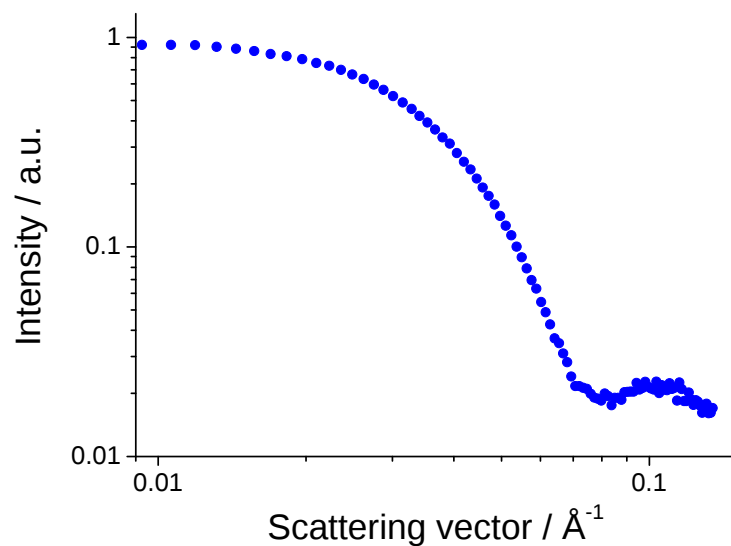


How to explain
this phenomenon?

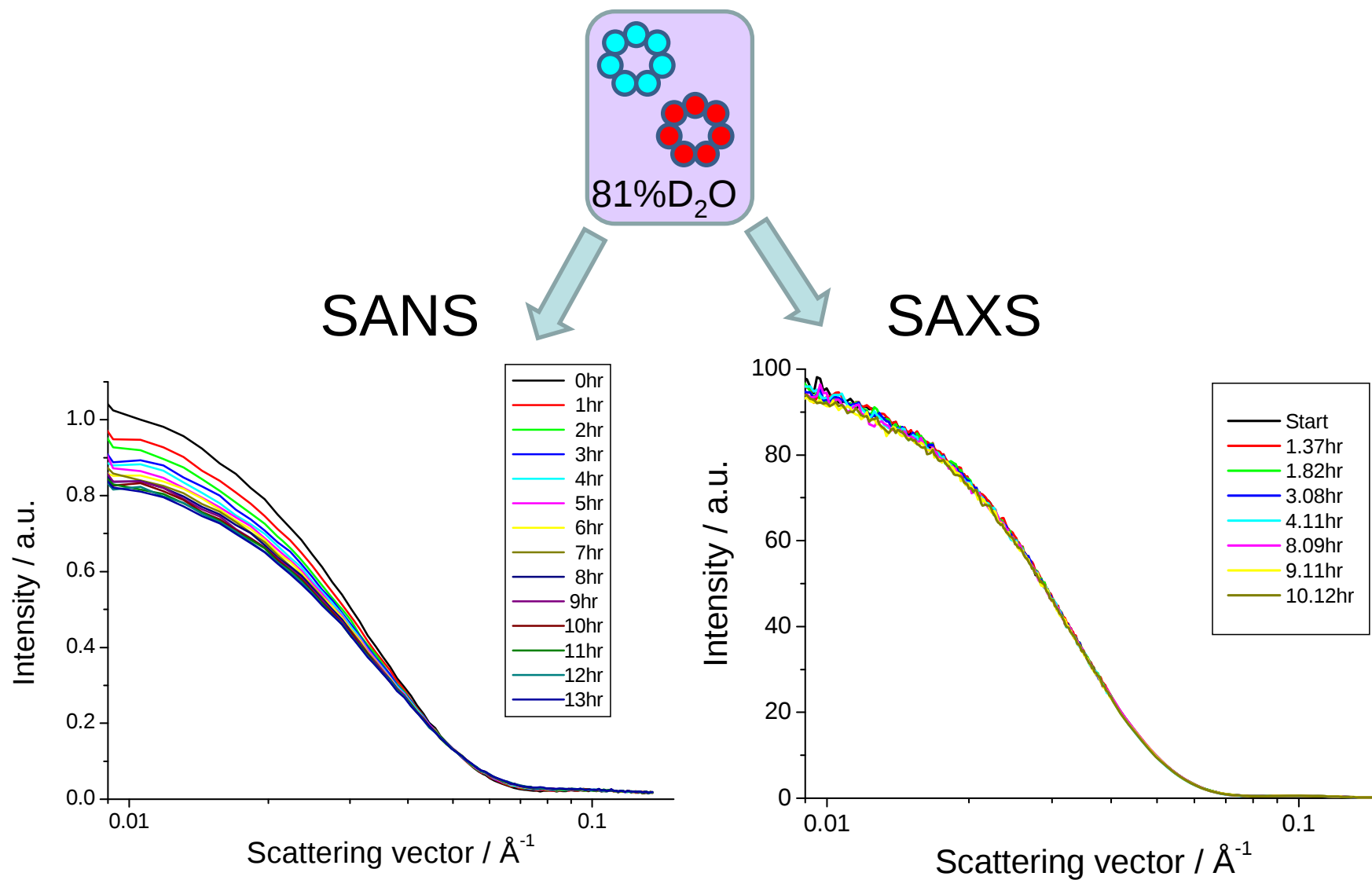
Stability of protein

just mixed D₂O and H₂O solution

14hrs after mixture



Comparison: SANS vs SAXS



SANS simulation method

0. 既存のPDB dataを用いて、各Subunit位置を設定し、高次構造を構築する。
(界面の接触エネルギー効果を取りいえるように改良中)



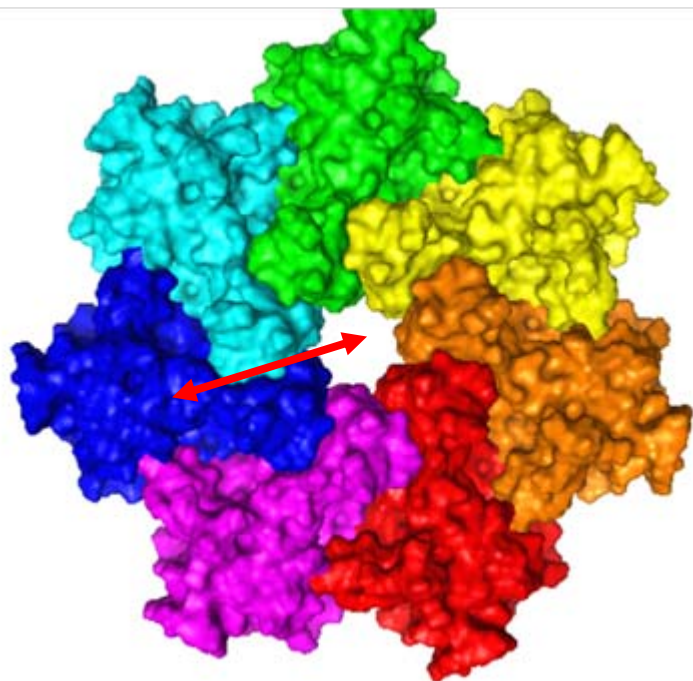
1. PDB data(原子分布) ← 水素原子
2. PDB data(原子分布) → アミノ酸残基分布
3. 各残基のコントラスト計算(体積はJacrotのデータを用いる)
 - 溶媒の重水濃度に応じて、可置換水素の散乱長を変更
 - 各サブユニットの重水素化度に応じて、非可置換水素の散乱長を変更
 - 各アミノ酸残基の総散乱長を求め、コントラストを計算する
4. 各アミノ酸残基の位置に対応するサイズ・コントラストの球を配置する。
5. 以下の式に応じて、中性子小角散乱強度を計算する。

$$I(q) = \sum_i |f_i(q)|^2 + 2 \sum_{i>j} f_i(q) f_j(q) \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}}$$

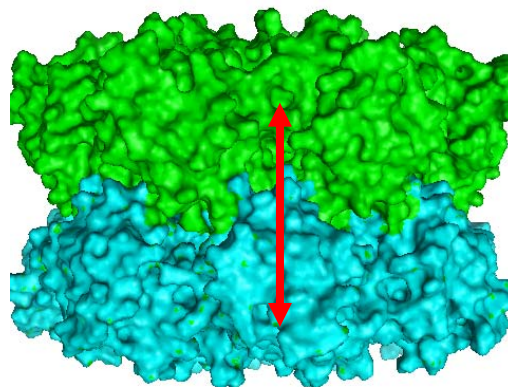
6. タンパク質の非干渉線散乱を加え、溶媒の非干渉性散乱を引く

4次構造の構築

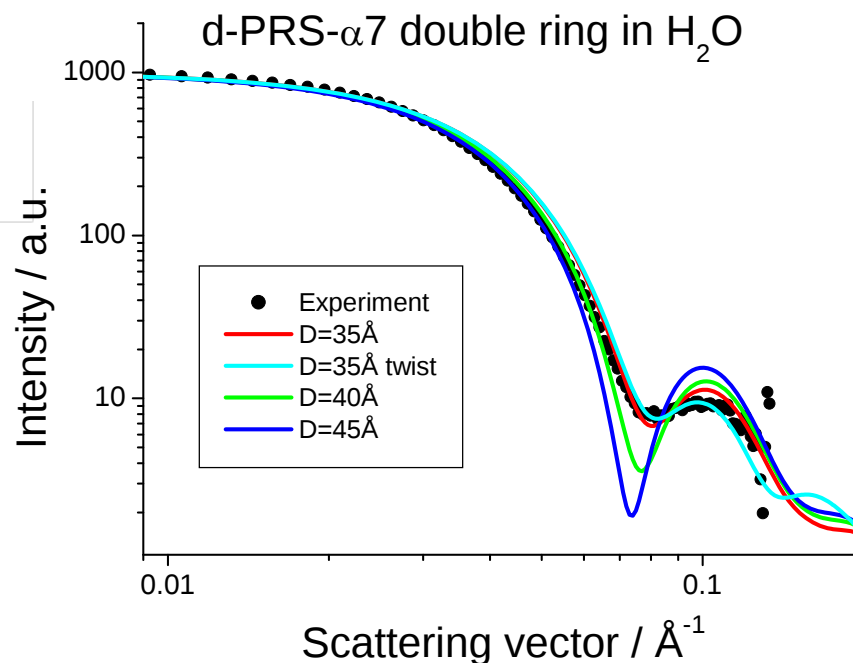
Proteasome α 7 subunit



7回回転対称体の構築
回転中心 + 回転半径



Double ring の構築
2つのringの距離 + 向き



Case 1 : Random Subunit Exchange

A subunit exchanges randomly



Not all $\alpha 7$ -ring becomes (d7h7)-ring
but system reaches an equilibrium state

•Simulation

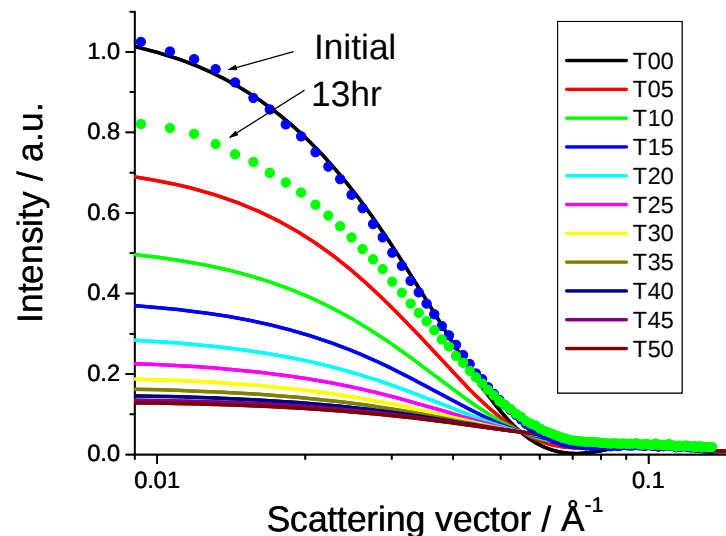
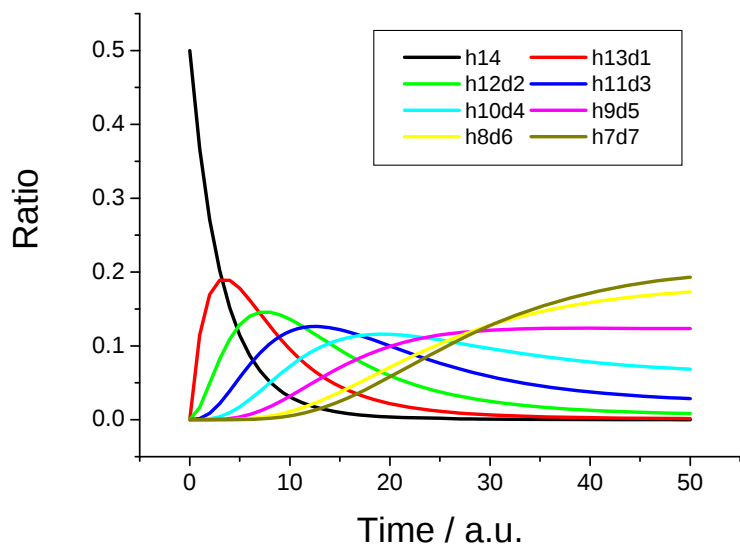
1.Molecular number : $2^{29}=536870912$

2.Initial condition :

$[AlIH(h14)]:[AlID(d14)] = 2^{28} : 2^8$

3.Exchange method :

Exchange random molecular
@ random subunit position



Random exchange model
has been excluded!

Case 2 : Ring Exchange

$\alpha 7$ subunits makes a **double** ring.



There is not a subunit exchange, but a **ring-ring exchange** exists.

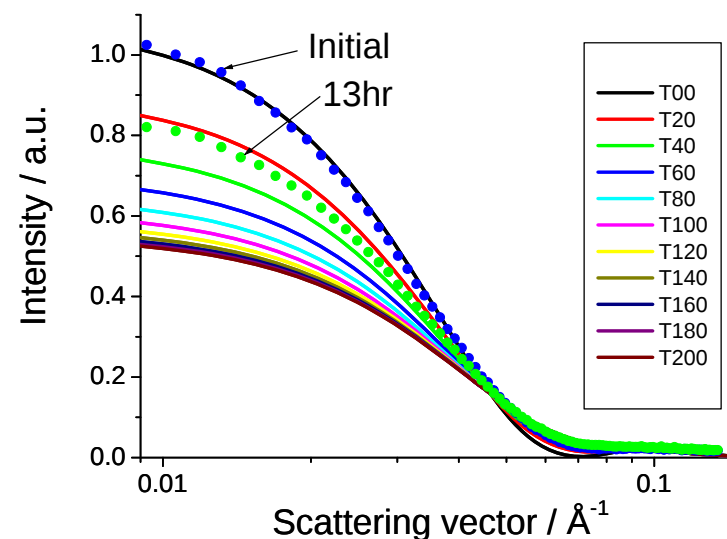
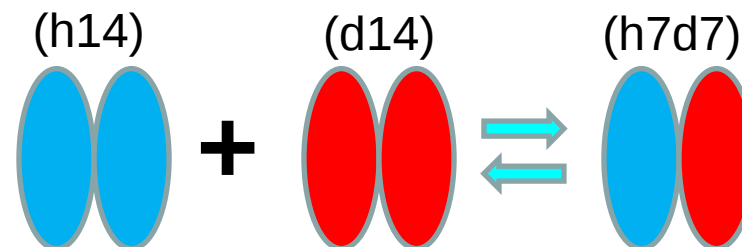
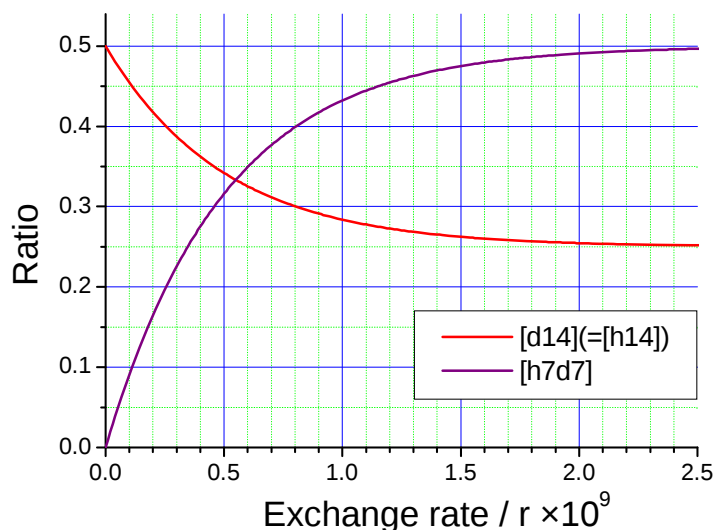
• Calculation

1. Initial and final condition :

$[h14]:[d14]:[h7d7] = 0.5 : 0.5 : 0$

$\Rightarrow [h14]:[d14]:[h7d7] = 0.25 : 0.25 : 0.5$

2. Exchange method : Random



Ring exchange model
has been excluded!

How to explain stop of intensity decrease?

$\alpha 7$ ring introduces $\alpha 6$ subunit.



Only one subunit can be exchanged per ring.
Totally two subunits exchange in a double ring

• Simulation

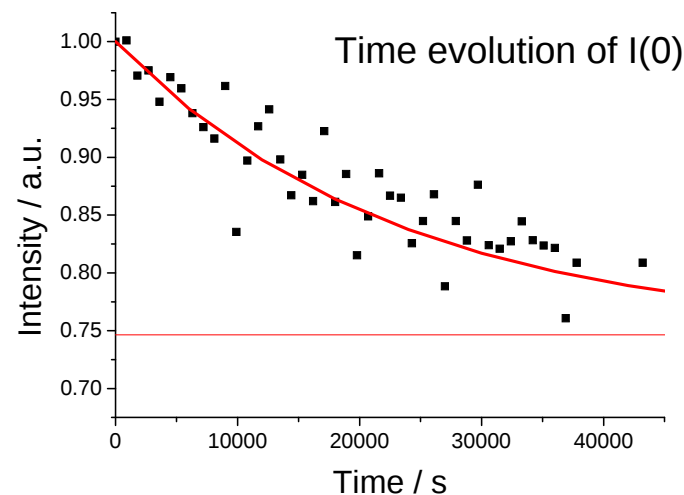
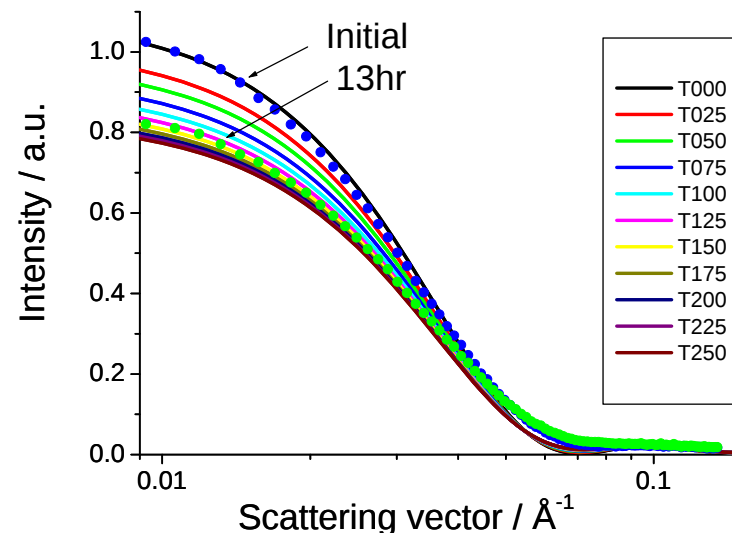
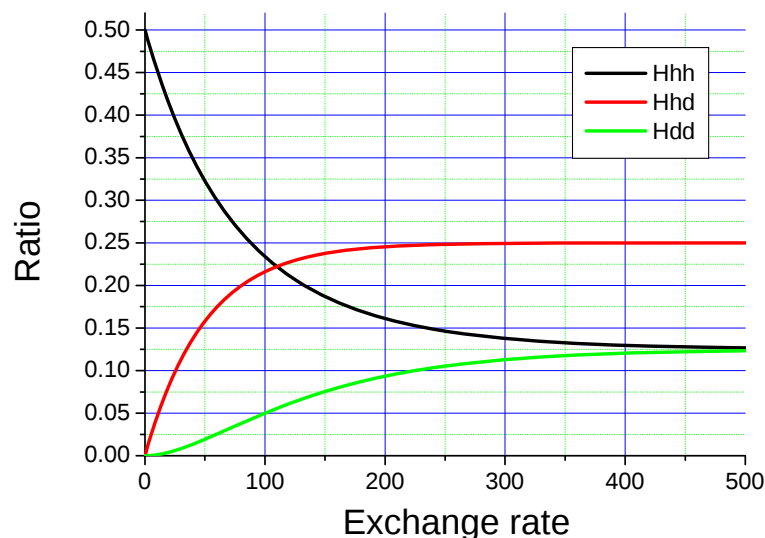
1. Initial and final condition :

[Hhh]:[Hhd]:[Hdd]:[Dhh]:[Dhd]:[Ddd]=

0.5 : 0.0 : 0.0 : 0.0 : 0.0 : 0.5

$\Rightarrow$ 0.125: 0.25:0.125:0.125: 0.25 :0.125

2. Exchange method : Random



Two exchange model well explains the experimental result!

まとめ

- 散乱関数Simulationは、実験データをかなり良く再現する。
- ただし、溶液中での構造変調を100%再現できていない
- Proteasome $\alpha 7$ -ringの構造は、動的な平衡状態にあり、Subunit交換機構が存在する
- 交換は、全てのsubunitで起こるのではなく、各リングの1つのsubunitでのみ起こる。
- 交換はランダムに進行し、静的な構造測定では、Proteasome $\alpha 7$ -ringには変化が見られない。
- タンパク質周囲の結合水の影響の考慮
- 高次構造パラメータ(構造変調)の自動的な決定法の開発

今後

ゆらぎの構造解析

- 解の一意性をどのようにして担保するか？
- MDとの連携は？
- 構造パラメータをどのように取り入れるか？
- 多成分系への拡張法
- 中性子の利点を如何にして生かすか？
- 高角までの散乱データを如何にして生かすか？

タンパク質の構造解析

- 散乱関数Simulationは、如何にして溶液中での構造変性を再現するか？
- 結合水の効果はどれくらいか？どのようにして取り入れるか？
- 散乱データから構造をモデルなしで導出できないか？
- 中性子の利点を如何にして生かすか？
- 高角までの散乱データを如何にして生かすか？