

第2回 中性子小角散乱解析法研究会要旨集

平成23年2月23日(水) 13:00 — 24日(金) 16:00
京都大学原子炉実験所 事務棟大会議室

主催：中性子小角散乱解析法研究会

共催：中性子産業利用推進協議会・J-PARC/MLF 利用者懇談会

第2回 中性子小角散乱解析法研究会

日時：平成23年2月23日(水) 13:00 — 2月24日(木) 16:00

場所：京都大学原子炉実験所・事務棟大会議室

プログラム

2月23日(水)

13:00 - 13:05 : あいさつ 福永俊晴 (京大原子炉)

13:05 - 13:15 : 研究会について 杉山正明 (京大原子炉)

—Session I— 座長：大沼正人 (物材機構)

13:15 - 13:45 : SANS と SAXS を併用した鉄鋼中の微細組織の定量評価
大場洋次郎 (物材機構)

13:45 - 14:25 : 中性子小角散乱法による Nd-Fe-B 焼結磁石の内部平均構造の研究
武田全康 (原子力機構)

14:25 - 15:05 : 金属ガラスの組織形成過程への ASWAXS の適用
奥田浩司 (京大院工)

15:05 - 15:20 : コーヒーブレイク

—Session II— 座長：遠藤 仁 (原子力機構)

15:20 - 16:00 : 小角中性子散乱装置 SANS-U の現状とサイエンスのトピックス
柴山充弘 (東大物性研)

16:00 - 16:40 : 動き出す TAIKAN
鈴木淳市 (原子力機構)

16:40 - 16:50 : コーヒーブレイク

—Session III (特別講演)— 座長：平井光博 (群大院工)

16:50 - 18:00 : タンパク質の動的構造解析
— MD-SAXS から X-FEL を用いた1分子解析へ —
佐藤 衛、苮口友隆 (横浜市大生命)

18:30 - 20:00 : 懇親会(すし半 「佳羅守」)

2月24日(木)

—Session IV— 座長：鈴木淳市(原子力機構)

9:00 - 9:40 : mf-SANS の夜明け

古坂道弘(北大院工)

9:40 - 10:20 : SPring-8 BL45XU 小角散乱実験ステーションの現状

山本雅貴(理研 SPring-8 センター)

10:20 - 10:35 : コーヒーブレイク

—Session V— 座長：林 眞琴(茨城県企画部)

10:35 - 11:15 : 中性子小角散乱の鋼中微細介在物解析への適用と問題点

谷山 明(住友金属)

11:15 - 11:55 : SPring-8 を活用した USAXS 法の現状とゴム構造解析

岸本浩通(SRI:住友ゴム)

11:55 - 13:30 : ランチブレイク

—Session VI— 座長：杉山正明(京大原子炉)

13:30 - 14:10 : SANS・SAXS によるソフトマター研究

松岡秀樹(京大院工)

14:10 - 14:50 : 中性子散乱による酵素のドメイン運動の観察

井上倫太郎(京大化研)

14:50 - 15:30 : 中性子散乱による蛋白質複合体の構造・ダイナミクス解析

藤原 悟(原子力機構)

15:30 - 15:45 : Closing remarks

平井光博(群大院工)

SANS と SAXS を併用した鉄鋼中の微細組織の定量評価

物質・材料研究機構 量子ビームセンター 大場洋次郎、大沼正人

インドや中国、ブラジル等における鉄鋼業の発達に伴って鉄鋼業界における競争は年々激しさを増しており、最先端の鉄鋼材料には高付加価値・高機能化が求められている。同時に、環境・エネルギー問題を背景に、省資源化と高機能化の両立は必須の課題となっている。これらの要求を満たすためには、鉄鋼中の微細組織が重要な役割を果たす。例えば、ナノサイズの析出物粒子を分散させて強度を向上させる析出強化は高強度鋼の開発に欠かせない技術である。また一方で、切削加工に用いられる快削鋼では μm サイズの介在物粒子によって高い被削性が実現されている。しかしながら、析出物の効果的形成には高価な合金元素が必要であり、微細組織は熱処理・鍛造等の製造条件に非常に敏感である等多くの問題が残されており、高い機能性を発揮させるためには微細組織のさらに精密な制御が求められる。したがって次世代鉄鋼材料開発では、定量的な評価に基づいて微細組織の形成メカニズムを詳細に明らかにし、最適な製造条件を決定することが増々重要となる。

これまで鉄鋼中の微細組織の分析には主に光学顕微鏡や電子顕微鏡等が用いられてきた。顕微鏡では実空間での観察が可能であり、直感的に分かりやすく、高い空間分解能による詳細な解析が可能である。一方、小角散乱法は顕微鏡と比較して観察領域が大きいいため、統計的に精度の高い情報が得られるという特徴があり、鉄鋼中の微細組織評価にも有効である。特に、上記の通り鉄鋼中微細組織の定量的評価の比重が増してきており、小角散乱法の有効性は今後増大することが見込まれる。また、SANS と SAXS を併用した合金コントラスト変調 (ACV) 法を適用すると、従来の小角散乱法から分かる粒子形状やサイズ等に加えて組成の解析が可能となり、鉄鋼材料開発に有益であることが明らかになってきた[1]。そこで本講演では、小角散乱法と ACV 法を用いて析出強化鋼と快削鋼を解析した結果を報告する。析出強化鋼の例では、数 nm の析出物粒子の形状とサイズ、数密度等を定量的に見積もると共に、析出物の組成が熱処理温度に依存して変化することを見出した。快削鋼では、数 μm の介在物粒子の形状やアスペクト比、配向性等を評価できることが分かった。これらの値は鉄鋼材料の機械的特性に大きく影響する因子であり、小角散乱法を用いることで比較的容易に精度の高い値が得られる。今後は、大観や mf-SANS 等の新たな SANS 装置の稼働によりマシンタイムが増加し、測定・解析技術がさらに発展することが期待される。

本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) からの助成事業により実施する「鉄鋼材料の革新的高強度・高機能化基盤研究開発研究体」の研究成果であることを記し、謝辞を表す。

[1]M. Ohnuma, *et. al.*, *Acta Mater.* **57** (2009) 5571-5581.

中性子小角散乱法による Nd-Fe-B 焼結磁石の内部平均構造の研究

原子力機構¹⁾, J-PARC センター²⁾, 東北大³⁾, 山形大⁴⁾, インターメタリックス⁵⁾

武田全康^{1,2,3)}, 鈴木淳市^{1,2)}, 山口大輔¹⁾, 秋屋 貴博³⁾, 加藤 宏朗^{3,4)}, 宇根康裕⁵⁾, 佐川 真人^{3,5)}

Nd-Fe-B 焼結磁石は、実用化されている永久磁石の中で最も強力なものであり、ハイブリッド自動車を始めとする省エネ機器で広範囲に使われている。しかし、現状では、高温での使用において、希少金属である Dy の添加が必要不可欠である。そこで、Dy の使用量を著しく下げた、さらには Dy フリーの Nd-Fe-B 焼結磁石の開発が、その原料供給の不安定さから急務となっている。我々は、保磁力機構の鍵を握る、主相の結晶粒の大きさと保磁力、また、界面ナノ構造と保磁力との間の定量的な相関を明らかにすることを目的として、中性子小角散乱法による研究を開始した。

中性子小角散乱の測定は、研究用原子炉 JRR-3 に設置されている中性子小角散乱装置 SANS-J-II で行った。従来の方法と、新しく導入したヘリウムジェットミル法によって得られた、異なる結晶粒径の原料粉について、焼結温度を変化させることで、保磁力の値を変えた数種類の試料を測定に用いた。保磁力は、下図に示すように結晶粒径と焼結温度によって大きく変化し、それに伴って、中性子小角散乱パターンも敏感に変化することがわかった。また 2次元検出器上の小角散乱パターンは異方的であることから、主相を構成する結晶粒も異方的な構造を持ち、焼結温度によってその異方性の度合いが変化することもわかった。現在、その実験で得られた 2次元の中性子小角散乱パターンを解析し実空間像を構築するためのソフトウェアを開発中である。発表では、実験の詳細と簡単なモデルによる現状での解析結果、そして、新たに開発中のソフトウェアの概要について報告をする。

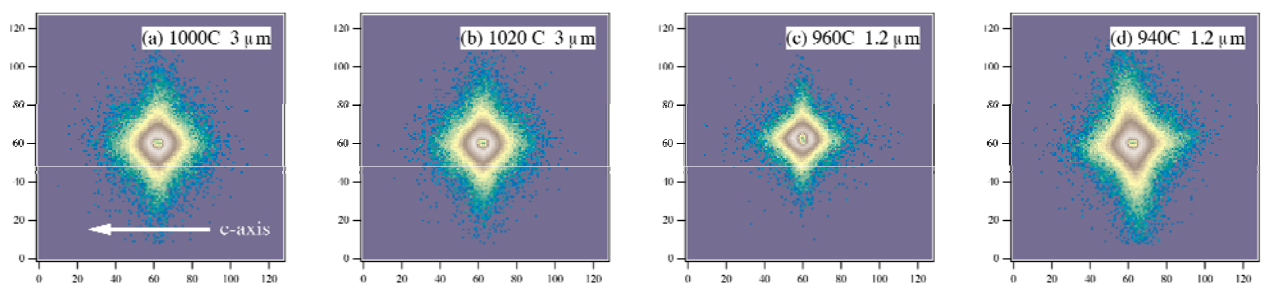


図 中性子小角散乱パターンの、焼結粒径及び焼結温度依存性。

本研究は、NEDO の委託事業である『革新的部材産業創出プログラム』希少金属代替材料開発プロジェクト『希土類磁石向けディスプレイ用希土類使用量低減技術開発』として行われているものである。

金属ガラスの組織形成過程への ASWAXS の適用

京都大学大学院工学研究科 奥田浩司

はじめに：金属系のアモルファス材料としてはきわめて高い安定性をもつ Zr 基、Pd 基の金属ガラスのガラスとしての安定性の起源となる構造特性は何か、という問題は金属ガラスの基本的な問題として興味もたれており、短距離的には

金属ガラスのような非平衡材料の場合、製造プロセスなどに起因するマクロな不均一性と析出、晶出のような相転移過程によるミクロからメゾの不均一構造、ガラスの緩和や構造揺らぎと言ったナノから原子スケールの不均一構造のように、階層の異なる不均一構造が重畳する。マクロな不均一性としては凝固歪などの歪効果と、不均質核生成による結晶子の混入などが考えられ、放射光においては高エネルギー X 線を利用することによってある

程度の評価が可能となる。図 1 はいくつかの金属材料についての X 線と中性子の透過能を示しているが、X 線でも波長を 0.1 Å 程度にすることにより、mm から cm 程度の試料を透過することが可能である。

SPrin8 の直径 40 μm の高エネルギー X 線を使うことにより、例えば一辺 2 mm の Zr 基金属ガラス梁の曲げ変形時の歪がマクロにどのように分布するかを求めることが可能である (SP8, 2010B 期課題。報告書は来期公開予定)。一方、最も小さい原子スケールにおいては福永、大友、小原らによりガラス状態中の原子配列が中性子、高エネルギー X 線回折により調べられている。その中間領域であるナノメゾ領域での不均一構造はガラスの特性理解の上で重要であり、本報告ではその不均一構造解析を異常

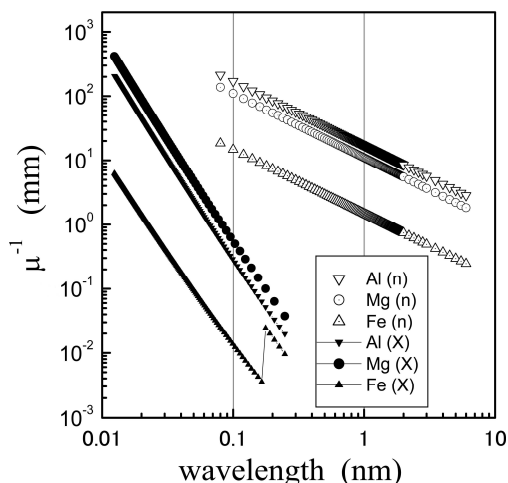


図 1 中性子、X 線の透過能

分散効果を利用した異常小角中角散乱法 (ASWAXS 法) によって試みた結果について報告する。

方法：本報告では小角散乱法によって得られる多元ガラス中の小角散乱の起源と、ガラス中の不均一構造との連続性という観点から興味もたれる金属ガラスからのナノ準結晶形成過程を扱う。材料としては Zr 基の合金として ZrCuAl 系の安定な金属ガラスと、同じ Zr 基ではあるがガラスがより不安定で、熱処理によりナノスケールの準結晶が形成される合金を対象とした。異常小角散乱測定は SPring8 の BL40B2 で行った。BG の低下のため、上流の shaping スリット以下、試料室、検出器までを真空でつないだ。

本実験での小中角散乱 (SWAXS) は小角領域と中角領域を別個の検出器で見えるものではなく、小角領域 (0.1nm⁻¹ 程度) から中角領域 (10nm⁻¹ 程度) までを同時シームレスに測定している。そのメリットは小角散乱と中角領域で検出される Bragg が同じ感度で、厳密

に同じ領域の照射によって検出されていることが保障されていることである。これはガラスのような非平衡材料では散乱の起源が結晶子であるか否かを判定する上で重要なポイントである。X線の波長はZrおよびCuの吸収端で変化させた。

結果と考察：ここではZr基で電子顕微鏡観察の報告で同じようにナノ準結晶を析出するとされている2つの合金であるZrPtとZrCuPtの結果を例にして説明する。

図2はZrPt2元系の小角散乱強度の時間による変化を示している。[1] 才田らの電子顕微鏡観察では20面体的な回折パターンを与えるナノ準結晶であり、組成は母相ガラスと有意な差はないとされていた。

一方で図に示すように、十分なBG低減を行った測定では明確なクラスターによる散乱が観察される。

そのコントラストの原因を知ることは、貴金属添加による20面体構造安定化、結晶核といった概念が当てはまるか、あるいは通常のN&G的現象か、という疑問へのアプローチともなる。

ZrPt系についてBarthia-Thorntonの表式に基づき原子数密度揺らぎと組成揺らぎの寄与を異常分散によるコントラスト変化の測定結果と計算を比較したところ、密度揺らぎと組成揺らぎが一定の比でコントラスト形成に寄与していると考えられる

説明できることが明らかとなった。これは非平衡な過剰体積のような体積揺らぎではなく、異なる相としてほぼ決まった体積(密度)

と組成の変化を考えると説明がつき、ガラス中の組成変化を伴わない逐次的な20面体構造の完全化というイメージではないことが示唆される。一方、この図の中角領域に目を向けると、長時間熱処理によって準安定相が形成するまでの(準結晶+ガラス)組織の領域では中角領域にはBraggピークは認められない。

一方、ZrCuPt3元合金においては図3にプロファイルの例を示すが、かなり異なる特徴が認められる[2]。それは1.ZrPtと比べ、

2.小角散乱とほぼ同じサイズ

を示唆する準結晶のBraggピークが明確に認められる。3.ZrPtと比べ、より成長が速く、

また2元系では準安定相へ変態してしまうサイズを超えてナノ準結晶が成長し続ける。な

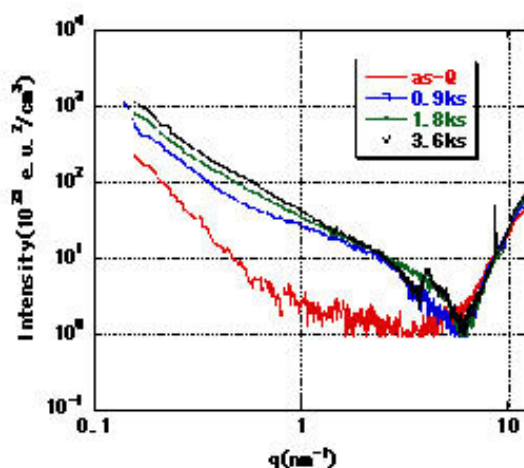


図2 ZrPt合金リボンの熱処理材の小中角散乱プロファイル

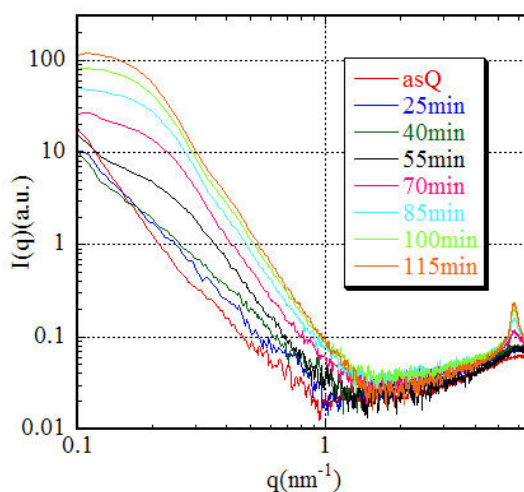


図3 ZrCuPt合金のIn-situSWAXS

どである。これらの特徴も N&G 的な変化を示唆しているが、合わせて比較的低い体積率にもかかわらず、サイズ分布が相対的に狭いと言う特徴が認められた。これは 3 元系の特徴としての溶質再分配にともなうキネティックな現象であると考えられ、現在 Cu 吸収端で観察された特徴的な散乱プロファイルを手がかりに解析を進めている。

今後の展開について：これまで金属ガラスの不均質構造については力学的な特性評価などからの報告がされてきている。一方、小角散乱で認められる平均ナノ構造の変化においては密度と組成が弱くカップリングした不均質構造の存在が示唆されているものの、その構造特性などについては不明な点が多い。現在、ナノ準結晶形成のキネティクスを手がかりとして相変態のキネティクスという観点からの解析を進めているが、今後ナノ構造センシティブな分光的手法との融合をめざした手法実現のため、要素技術の検討を進めたいと考えている。

なお、ZrCuPt,ZrPt リボン材料は東北大学際高等センターの才田淳治准教授、ZrCuAl バルク材料は同金研金属ガラスセンターの横山嘉彦准教授との共同研究によるものである。

[1] H.Okuda et al J.Appl.Cryst. 41 (2008)675

[2] H.Okuda et al., J. Phys. Conf. Ser. 247(2010)012037.

小角中性子散乱装置 SANS-U の現状とサイエンスのトピックス
 - 粒子分散系高分子溶液および紐状ミセルの Rheo-SANS -

東大物性研 柴山 充弘

【はじめに】日本原子力研究開発機構(JAEA)研究用原子炉 JRR-3 のガイドホールに設置された、東大物性研所有の小角散乱装置 SANS-U は年間 30-40 件の研究課題を受け入れ、活発な研究成果を出している装置の一つである⁽¹⁾。平成 20 年度から文科省原子力イニシアティブプログラムの支援を得て SANS-U の高度化を行った。その結果、従来に比して散乱強度を約 3 倍に、最小散乱ベクトルを一桁小さくすることに成功し、ますます多くのユーザーに利用していただく環境が整備されてきた。この研究会は「小角中性子散乱解析法研究会」であるので、最近の解析法についてのトピックスを中心とした話題提供を行う。

【SANS-U の高度化】

Fig.1 は SANS-U の高度化によって導入した集光系と高分解能検出器によって得られたポリスチレン(PS)ラテックスの散乱実験結果である。従来の Pinhole-SANS に比較して、Focusing-SANS では小角到達限界が一桁向上し、 $R = 3000\text{\AA}$ の球の形状因子もはっきりと見て取れることが分かる⁽²⁾。

以下では、様々な解析法を駆使して行った界面活性剤系の構造解析の結果について紹介する。

【界面活性剤水溶液の静的 SANS】

界面活性剤からなる紐状ミセルは、Fig.2 に示すように、塩の添加により自在に鎖長が変わるだけでなく、紐の切断、再結合が可能なファントム鎖であるため、レオロジー的にも特徴ある挙動を示すため数多くの研究がなされてきている⁽³⁻⁵⁾。我々は流動場での中性子小角散乱 Rheo-SANS により、カチオン性界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)と *p*-トルエンスルホン酸ナトリウム(NapTS)の水溶液からなる紐状ミセルの構造を(1)界面活性剤濃度、塩濃度の関数として紐状ミセルの構造を系統的に調べ、(2)せん断場における構造とレオロジー挙動の関係を詳細に調査した⁽⁶⁾。

CTAB だけでは球状ミセルを形成するが、NapTS などの有機塩を添加すると、球状ミセルから紐状ミセルへと構造変化する。NapTS の添加量を多くすると、紐が長くなり、高分子鎖のような振る舞いをすることが知られている。本研究では、NapTS 濃度(C_s)

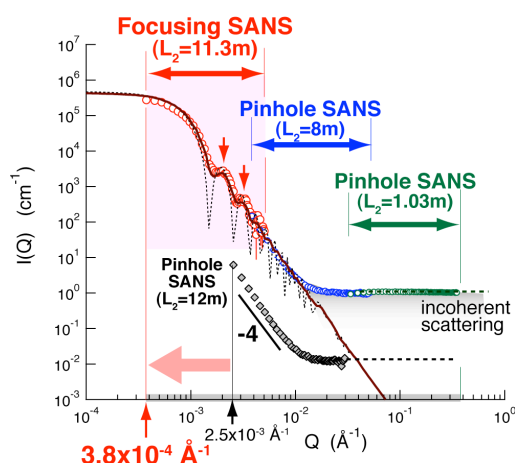


Fig. 1 Comparison of Focusing-SANS vs Pinhole-SANS with PS latex ($R = 3000\text{\AA}$).

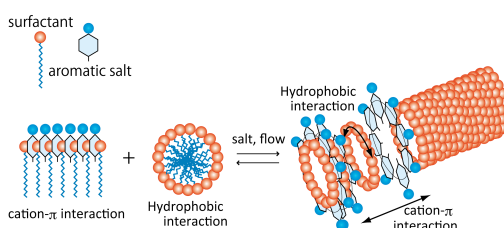


Fig. 2 Model of sphere to rodlike micelle transition.

と CTAB 濃度(C_D)の比(C_S/C_D)を一定にしつつ、CTAB 濃度(C_D)を変化させた時のミセル構造を詳細に調べた。一般に粒子分散系からの散乱関数は

$$I(q) = (\Delta\rho)^2 nV^2 P(q)S(q) \quad (1)$$

で与えられる。ここで、 $\Delta\rho$ はコントラスト、 n は単位体積中の粒子数、 V は粒子1個の体積、 $P(q)$ 、 $S(q)$ はそれぞれ、形状因子、構造因子である。濃度が低い時は、CTAB/NapTS ミセルは孤立球もしくは孤立した棒からの散乱関数で記述でき、それぞれ、

$$P_{\text{sph}}(q) = \left[3 \frac{\sin(Rq) - (Rq)\cos(Rq)}{(Rq)^3} \right]^2 \quad (2)$$

$$P_{\text{rod}}(q; \alpha) = \left[\frac{2J_1(qR\sin\alpha)}{qR\sin\alpha} \frac{\sin(q(L/2)\cos\alpha)}{q(L/2)\cos\alpha} \right]^2 \quad (3)$$

を用いて解析した。ここで、 R は球もしくは棒の半径、 L は棒の長さである。なお、棒については、数値積分で配向平均を取って

$$P_{\text{rod}}^{\text{random}}(q) = \int_0^{\pi/2} \sin\alpha d\alpha P_{\text{rod}}(q; \alpha) / \int_0^{\pi/2} \sin\alpha d\alpha \quad (4)$$

実測散乱強度関数をカーブフィットした。しかし、濃度が高くなると粒子間干渉効果が無視出来なくなる。球状粒子系では、よく知られた Percus-Yevick 関数⁽⁷⁾がある。また、荷電球状粒子系に対しては Hayter-Penfold 理論⁽⁸⁾が知られている。一方、荷電棒状粒子系には、reference interaction site model (PRISM)理論^(9,10)が提案されており、その構造因子は、

$$S(q) = \frac{1}{1 + \nu c(q)P_{\text{INR}}(q, L-2R)} \quad (5)$$

である。ここで、 ν 、 $c(q)$ は棒の形状に依存したパラメーター、 $P_{\text{INR}}(q, L-2R)$ は太さが無視出来

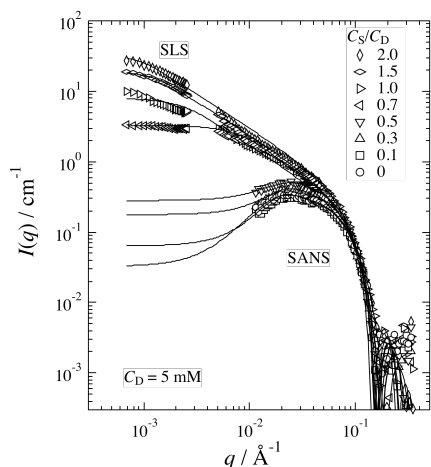


Fig. 3 SANS intensity curves of aqueous (D_2O) CTAB/NapTS solutions at $C_D = 5$ mM and various concentration ratios, C_S/C_D .

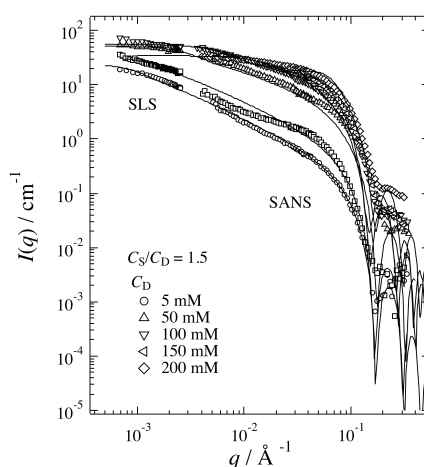


Fig. 4 C_D dependence of SLS and SANS intensity curves, $I(q)$, for aqueous CTAB/NapTS solutions at $C_S/C_D = 1.5$.

る棒の形状因子であり、

$$P_{\text{INR}}(q) = \frac{2}{qL} \int_0^{qL} \frac{\sin t}{t} dt - 4 \sin^2\left(\frac{qL}{2}\right) / (qL)^2 \quad (6)$$

与えられる関数である。Fig. 3に CTAB/NapTS 重水溶液(5mM)の SANS 結果を示す。SLS は静的散乱結果、実線はフィッティング結果である。 C_S/C_D が 0.5 と 0.7mM の間で球から棒への転移が起こっている。Fig. 4 は C_S/C_D を一定(= 1.5)に保ち C_D を変化させたときの SANS 結果である。 C_D の増加とともに散乱関数の q 依存性がなくなっていくが、これは粒子間干渉によるもので、構造因子の q 依存性が濃度とともに大きくなっていくことに対応している。

Fig. 3 のフィッティングに用いた構造変数の C_S/C_D 依存性を Fig. 5 に示す。 $C_S/C_D=0.7$ 付近から棒の長さ L が急激に増大している。その一方で、球（もしくは棒）の半径 R は殆ど変わらない。Debye 長 l_D が減少傾向にあるのは、静電遮蔽効果が大きくなっていくことに対応している。Fig. 5 と対照的に、Fig. 6 では L が C_D の増加につれて減少しているフィッティング結果となっている。しかし、これは実際には L が減少するのではなく、紐状ミセルが絡み合い、お互いの空間相関が遮蔽された結果と考えられる。

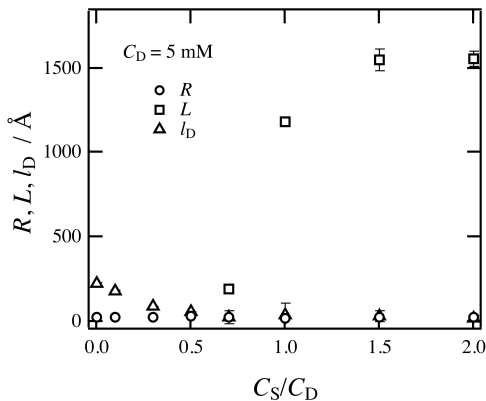


Fig. 5 C_S/C_D dependence of the radius, R , the length, L , and the Debye length, l_D , of the formed rodlike micelles for CTAB/NapTS solutions at $C_D = 5$ mM.

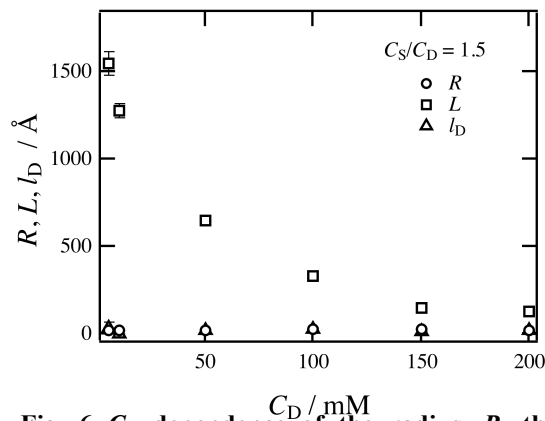


Fig. 6 C_D dependence of the radius, R , the length, L , and the Debye length, l_D , for CTAB/NapTS solutions at $C_S/C_D = 1.5$.

事実、このような高濃度において非常に長い紐状ミセルが存在することが電子顕微鏡観察で確認されている⁽⁴⁾。 L の変化に比べると、 R と l_D は殆ど変化していない。このように、PRISM)理論を用いることで、荷電系棒状分子集合体の散乱関数を用いることで、CTAB の紐状ミセルの構造解析を定量的に行う事ができた。

【界面活性剤水溶液の Rheo-SANS】

静的 SANS の実験で得た知見を踏まえ、Rheo-SANS 実験を行った。Fig. 7 は $C_D = 5$ mM、 $C_S/C_D = 0.7$ の場合の Rheo-SANS 結果である。 r 、 t はそれぞれ radial および tangential 方向での SANS パターンを示す。せん断速度 $\dot{\gamma}$ の増大につ

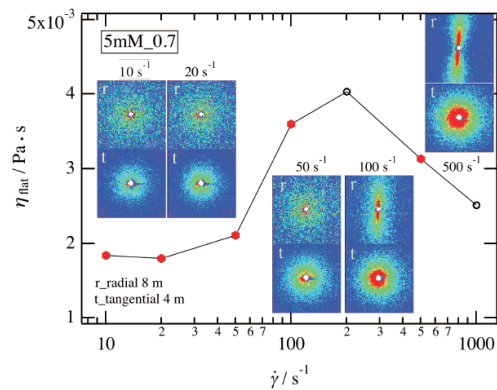


Fig. 7 Rheo-SANS for CTAB/NapTS ($C_D = 5$ mM, $C_S/C_D = 0.7$).

れて粘度が一旦、上昇したのち低下する様子がわかる。そして、この増粘挙動は等方系から配向系への構造転移を伴っていることがわかる。詳しい解析の結果、半径 $R \approx 23 \text{ \AA}$ の球、もしくは短い棒状ミセルが、せん断によりアスペクト比の大きい紐を経て、無限長紐へと転移し、増粘現象が見られることがわかった⁽⁵⁾。

Fig. 8 は $C_D = 5 \text{ mM}$ and $C_S/C_D = 0.7$ の CTAB/NapTS 溶液の種々のせん断速度における SANS 結果である。左が半径(r)方向入射、右が接線(t)方向入射での SANS 強度のセクター平均を取ったものである。静置状態($\dot{\gamma} = 0 \text{ s}^{-1}$)からせん断速度を増していくと、r 方向において異方性が現れ、流動(flow)方向では散乱強度が減り、渦(vorticity)方向では散乱強度が増大していく。また、t 方向入射の結果は、r 方向入射での渦方向散乱と同一であることから、流動場において散乱体は流動方向に主軸を持つ楕円対称であることが確かめられた。図の実線は、楕円対称分布をした棒の散乱関数でフィットしたときの結果であり、このフィッティングにより棒の構造パラメーターのみならず、配向係数などを評価することが出来た。

【謝辞】

SANS-U の高度化は平成 20 年度原子力基礎基盤戦略研究イニシアティブ「原子炉型中性子小角散乱分光器群の先鋭的高度化に関する研究」(平成 20-22 年度)(代表 物性研 柴山充弘)によって行われた。また実験は JAEA 研究用原子炉 JRR-3 にて行われた。

【参考文献】

- (1) SANS-U Home Page, <http://www.issp.u-tokyo.ac.jp/labs/neutron/inst/sans-u/index.html>
- (2) Iwase, H.; Endo, H.; Shibayama, M., *J. Appl. Cryst.*, revised.
- (3) Shikata, T.; Sakaiguchi, Y.; Uragami, H.; Tamura, A.; Hirata, H., *J. Colloid Interface Sci.* 1987, 119, 291-293.
- (4) Shikata, T.; Hirata, H.; Kotaka, T., *Langmuir* 1988, 4, 354-359.
- (5) Berret, J. F. In *Molecular Gels - Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks*, G., W. R.; Terech, P., Eds. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2006.
- (6) Takeda, M.; Kusano, T.; Matsunaga, T.; Endo, H.; Shibayama, M. *Langmuir*, in press.
- (7) Percus, J. K.; Yevick, G. J., *Phys. Rev.*, 1958, 110, 1.
- (8) Hayter, J. B.; Penfold, J., *Mol. Phys.* 1981, 42, 109-118.
- (9) Schweizer, K. S.; Curro, J. G., *Adv. Polym. Sci.* 1994, 116, 319-377.
- (10) NIST SANS & USANS Analysis with IGOR Pro.

http://www.ncnr.nist.gov/programs/sans/data/red_anal.html

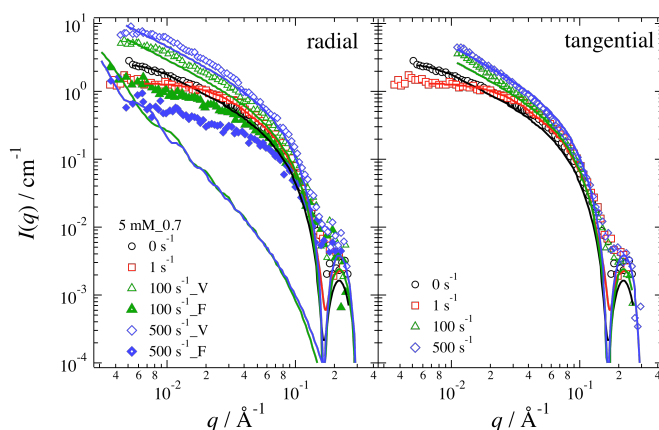


Fig. 8 SANS intensity functions of (a) sector average of radial configuration and (b) circular average of tangential configuration for aqueous CTAB/NapTS solutions at $C_D = 5 \text{ mM}$ and $C_S/C_D = 0.7$.

動き出す TAIKAN

鈴木淳市, 高田慎一, 篠原武尚, 奥隆之, 吉良弘, 中谷健, 稲村泰弘, 伊藤崇芳,
鈴谷賢太郎, 相澤一也, 新井正敏, 大友季哉^A, 杉山正明^B
原子力機構, 高エネ機構^A, 京大炉^B

物質科学、材料科学、生命科学等の幅広い分野でのサブナノからミクロンスケールの構造解析を、散乱ベクトルサイズ q =約 $5 \times 10^{-4} \sim 10 \text{ \AA}^{-1}$ において高精度・高効率に実現し、科学の発展に寄与することを目的にJ-PARC/MLFに大強度型中性子小中角散乱装置“大観 (TAIKAN)”の建設を進めている。

現在、2011年3月(来月)の初ビーム受け入れを目指して装置の建設・整備を進めている。図1に”大観”の基本構成を示すが、これまでにビームライン遮蔽、ビーム輸送系(コリメータ、スーパーミラー導管)、ビーム制御系(低速ディスクチョッパー(3台)、XYスリット(5台))、試料環境(試料ステージ、4軸ゴニオメータ(水平移動、鉛直移動、水平軸周り回転、鉛直軸周り回転)、真空防護壁、小角バンク検出器系(1次元³Heガス検出器(外径:8mmφ、ガス圧:0.6MPa、本数:608)(図2))、データ集積・解析系の機器の設置を完了した。研究会では、ソフトウェアの整備状況も含め、稼働間近の”大観”の状況、今後の予定について紹介する。

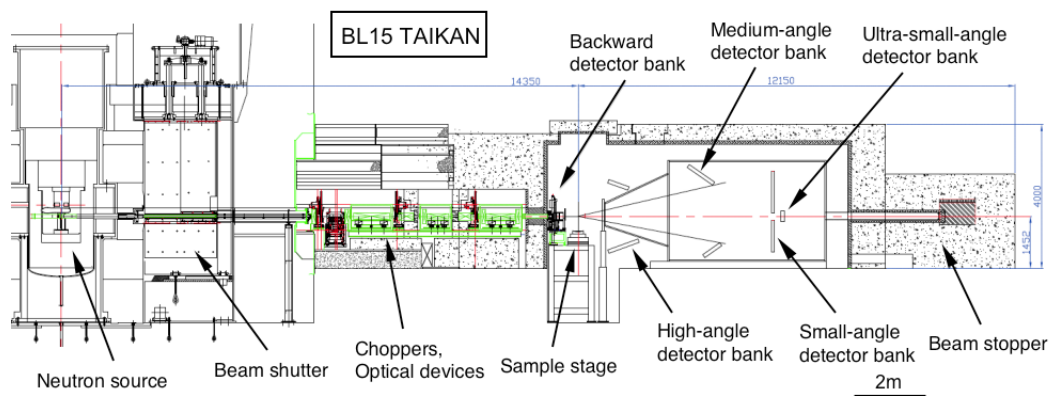


図 1. ”大観 (TAIKAN)” 立面図

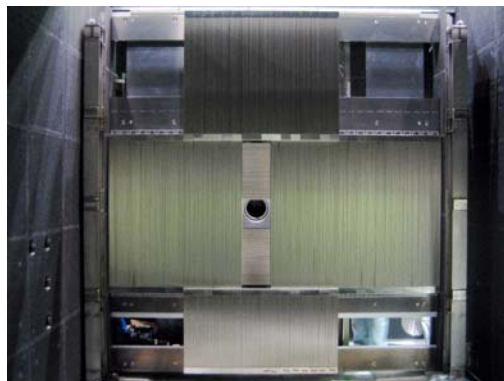


図 2. 小角バンクの検出器 (2011年2月現在)

タンパク質の動的構造解析：MD-SAXS 法から X-FEL を利用した 1 分子解析へ

荳口友隆、小田 隆、佐藤 衛

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科

タンパク質結晶学の進展によりタンパク質の機能が原子レベルで詳細に理解できるようになった。同時に、生理的条件下ではタンパク質は結晶構造からイメージされるような静的で硬いものではなく、軟らかく揺らいでおり、この軟らかさと揺らぎがタンパク質の機能発現に重要であることがわかってきた。さらに、近年、単独ではポリペプチド鎖が大きく揺らいだ変性状態として存在するが、ターゲット分子と相互作用するとターゲット分子に依存した特定の立体構造が誘起される天然変性タンパク質（Intrinsically Disordered Protein, IDP）が発見され、タンパク質の構造・機能研究の新しいターゲットとして注目されるようになってきた (<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/IDP/index.html>)。このようなIDPや長大なID領域をドメイン間にもつマルチドメインタンパク質の構造解析は、従来のX線結晶構造解析や電子顕微鏡などの既存の手法だけでは困難で、新しい手法や方法論の開発が不可欠である。このようなことから、私たちはX線小角散乱(SAXS)と分子動学的シミュレーション(MD)を融合させることにより、マルチドメインタンパク質や複数のサブユニットから構成されるタンパク質複合体の揺らぎを原子レベルで解析できる手法(MD-SAXS法)を新たに開発し、タンパク質の構造と機能と揺らぎとの関連を研究してきた。

SAXSは、任意の溶媒条件下におけるタンパク質の分子形態やその変化を解析する手法として古くから用いられてきたが、近年になり溶液散乱パターンから直接構造モデルを構築できる手法が開発され(1)、低分解能ではあるがタンパク質複合体やマルチドメインタンパク質のような複雑な形態の溶液構造解析が可能となった。一方、MD法はニュートン運動方程式にしたがって原子の動きをシミュレーションする方法で、タンパク質の溶液中における動きを原子レベルで観察することができる。原子の動きを実験的に追跡することは困難なためにMDシミュレーションはタンパク質機能の理解に必要な不可欠な研究手段となっている。

このように、SAXSとMDシミュレーションはそれぞれ溶液中での静的および動的な構造情報が得られる研究手法として注目されるようになったが、両手法を組み合わせることでさらに重要な知見を得ることが期待される。しかしながら、膨大なMDシミュレーションの結果から溶液散乱パターンを正確かつ高速に計算することが困難なために、これまで両手法を組み合わせで行った研究例はほとんどない。そこで、私たちはMDシミュレーションから得られる多数の原子構造から溶媒和分子(水和分子)の散乱を厳密に考慮して溶液散乱パターンを高速に計算する方法を開発することによって、MDシミュレーションとSAXSを融合させ、タンパク質の揺らぎを原子レベルで解析する手法(MD-SAXS法)を開発してきた。

SAXS法による構造解析の概要を図1に示す。SAXS実験は、タンパク質溶液をX線の光路上に置き、後方の検出器でその散乱パターンを測定することで行われる(図1a)。収集されたSAXSデータからは、溶液中におけるタンパク質の大きさ(分子量)や形状などの構造情報が得られる。これらの構造情報は原子レベルの詳細な構造情報が得られるX線結晶構造解析に比

べると圧倒的に少ないが、任意の溶媒、温度、圧力条件下でタンパク質の分子形態が観察でき、より機能に密着した構造情報が得られる。

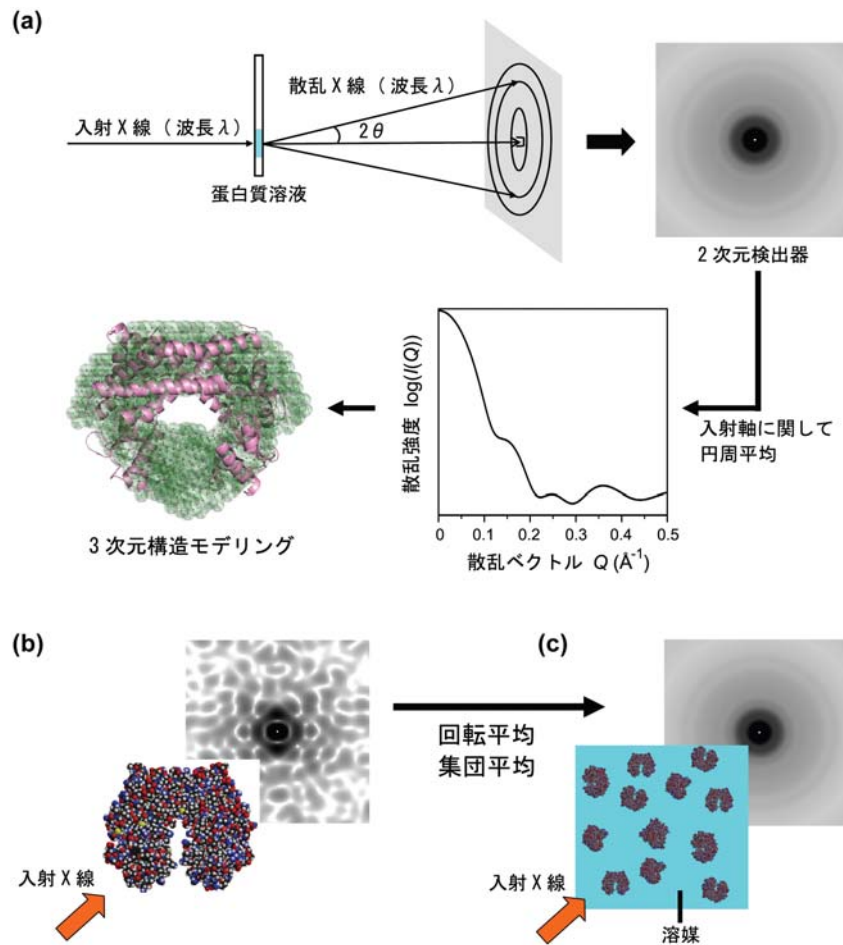


図 1. X線小角散乱 (SAXS) 法による構造解析の概要

タンパク質溶液からのX線散乱ではまず静止したタンパク質1分子からの散乱 (図 1 b) を考えると、X線溶液散乱で測定される散乱角領域では、散乱強度は次式で表すことができる。

$$I(\mathbf{Q}) = \int d^3\mathbf{r}' \int d^3\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}') \rho(\mathbf{r}) e^{-i\mathbf{Q}\cdot(\mathbf{r}-\mathbf{r}')} \quad (1)$$

ここで、 \mathbf{Q} は $Q = |\mathbf{Q}| = 4\pi\sin\theta/\lambda$ (2θ : 散乱角、 λ : 波長) で定義される散乱ベクトル、 \mathbf{r} と $\rho(\mathbf{r})$ はそれぞれタンパク質分子内部の座標とその位置での電子密度である。式 (1) からわかることは、観測される散乱パターンは散乱方向に依存し (図 1 b)、そのデータからはタンパク質分子内部の2点間のベクトル分布つまり3次元の立体構造情報が得られることである。

実際の溶液散乱では、X線が照射されるサンプル体積中には多数のタンパク質分子 ($\sim 10^{15}$ 個) が含まれ、かつそれらが溶液中においてランダムな方向に向いている (図 1 c)。そこで、溶質が単分散で溶質分子間で散乱X線が相互干渉しない希薄溶液を考えると、このような溶液からの散乱は1分子からの散乱とみなせるので、実際に溶液散乱で観測される散乱強度 $I(Q)$ は、

静止したタンパク質 1 分子からの散乱強度 (1) 式を回転平均および集団平均して表わされる (2) 式)。

$$I(Q) = \left\langle \left\langle I(\mathbf{Q}) \right\rangle_{\text{回転平均}} \right\rangle_{\text{集団平均}} \quad (2)$$

しかし、この回転平均の操作によって観測される溶液散乱パターンは入射 X 線に対して等方的になり (散乱の方向依存性がなくなる) (図 1c)、散乱データから得られる情報はタンパク質分子内の 2 点間の距離分布という 1 次元の構造情報になる。一般に 1 次元の構造情報から立体構造という 3 次元の情報を導出することは不可能である。したがって、これまでの SAXS による構造解析では、タンパク質分子の形状を球・楕円体・円柱などの単純な形状モデルで表し、こうしたモデルから理論的に計算される散乱パターンが実測の散乱パターンに一致するようにモデルを試行錯誤で修正する方法が取られてきた。その後、1999 年に Svergun によって溶液散乱パターンから直接構造モデルを構築することができる手法が開発され、静的で硬いタンパク質に限られるが、溶液散乱パターンから結晶構造解析による原子構造と整合性のある低分解能 3 次元構造モデルが構築できることが示された (1)。Svergun が開発した手法では、得られた 3 次元構造モデルを評価する関数として実測の散乱パターンとモデルから理論的に計算される散乱パターンの一致度を表す項に加えて、一般的な球状タンパク質内部の原子の充填性や表面を再現しているかどうかを評価する関数項を導入し、数百から数千程度のダミー原子を溶液散乱パターンに合うように 3 次元的に最密充填させていく方法が取られている。この方法によって X 線溶液散乱の 1 次元データからでも低分解能ではあるが整合性ある 3 次元構造情報が導出されることが示され、X 線溶液散乱が電子顕微鏡による単粒子解析とともにタンパク質の低分解能構造解析の主要な研究手段として利用されるようになった。しかしながら、今回対象とする生理的条件下で軟らかく揺らいで溶液中で様々なコンフォメーションをとっているタンパク質分子からの散乱強度は、回転平均の操作に加えてそれぞれのコンフォメーションをとっているタンパク質分子からの散乱を加算 (集団平均) したものとなる ((2) 式)。したがって、そのようなタンパク質溶液からの散乱強度データの中にはタンパク質の揺らぎの情報が含まれているものの、その情報はこの加算 (集団平均) によって隠されてしまう。

一方、原子の動きを計算する MD では溶液中におけるタンパク質分子の揺らぎを原子レベルで再現することができる。したがって、MD で得られた構造の揺らぎの情報から溶液散乱パターンを理論的に計算し、その結果を実験で得られた溶液散乱データで検証することによって、溶液中におけるタンパク質分子の揺らぎの情報が原子レベルで得られることが期待される。これが MD-SAXS 法である。しかし、MD の結果から理論的に X 線溶液散乱パターンを計算する場合、タンパク質分子表面の溶媒和分子 (水分子) からの散乱を正確に評価することが困難なことや溶液散乱パターンの計算には時間がかかることがネックとなる。そこで、私たちは、まずタンパク質分子表面に存在する溶媒和分子からの散乱を考慮して高速かつ厳密に溶液散乱パターンを計算する方法を開発した。

一般にタンパク質の分子表面には溶媒分子がバルク領域とは異なる不均一な溶媒密度で分布する溶媒和層が存在するので、溶液散乱パターンを計算するときにはこの溶媒和層からの散乱を正確に考慮する必要がある。溶媒分子をあらわに扱う MD シミュレーションではタンパク

質分子表面の溶媒和層を原子レベルで再現することが可能で、溶媒和層からの散乱を正確に取り扱うことができる。しかし、MD シミュレーションから得られる原子構造から溶液散乱パターンを理論的に計算する際に厄介なことは、タンパク質溶液の大部分を占めるバルク領域から溶媒の散乱を除去することである。そこで、私たちは溶液散乱を計算する領域をタンパク質とその溶媒和層の全てと一部のバルク領域を含むように設定し、タンパク質溶液と純溶媒の MD シミュレーションをそれぞれ行い、溶液散乱の実験手順と同じようにタンパク質溶液の散乱データから純溶媒の散乱データを差し引くことで溶液散乱パターンを正確に計算する新しい手法を開発した (図 2)。詳細は文献 (2) を参照されたいが、この手法では図 2 の球内にある全ての原子対の間の距離を求める必要があるが、その計算は非常に時間がかかるので、式(1)の指数関数部分を多重極展開で近似し、原子間距離ではなく原子の原点からの距離で散乱強度を計算できるように改良した。この計算方法により、例えば約 5 万個の原子の系に対して 2 時間かかっていた溶液散乱パターンの計算を数秒で行えるようになり、溶媒和層からの散乱を厳密に考慮した溶液散乱パターンが非常に短時間で計算できるようになった。これまでの研究で MD シミュレーションから溶液散乱パターンを計算した最長のシミュレーションは 0.5 ns であるが、この長さではタンパク質分子の構造の揺らぎを観察することができない。一般的に構造の揺らぎを観察するためには 100 ns 以上のシミュレーションが必要であり、私たちが開発した計算方法によって世界で初めて構造揺らぎの効果を溶液散乱パターンの評価に取り入れられるようになった。

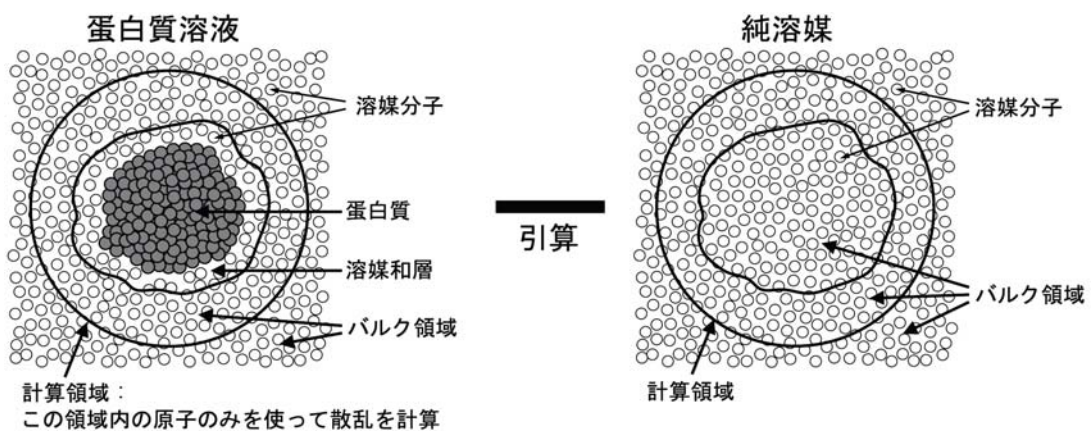


図 2. MD シミュレーションから得られる原子構造から溶液散乱パターンを計算する方法

MD-SAXS 法の概要を図 3 に示す。MD-SAXS 法は、まず動的な挙動をしている全長のマルチドメインタンパク質の初期の原子構造の構築から始まる。結晶化が困難あるいは不可能な動的挙動をしているマルチドメインタンパク質 (全長) もそれぞれのドメイン単独では結晶化が可能で、X線結晶構造解析により原子構造が得られる (PDB に登録されていればその原子座標を利用)。そこで、初期の全長構造はそれぞれのドメインの原子構造を連結させることで構築できる。次に、この初期の全長構造で長時間 (少なくとも動的な挙動をしているタンパク質の構造変化が平衡状態になるまで。一般的に 100 ns 以上) の MD シミュレーションを行い、得られたすべてのスナップショットの構造について前述の溶媒和層からの散乱を厳密に取り扱っ

た計算法（図2）で溶液散乱を理論的に計算する。そして、こうして計算された各スナップショットの溶液散乱データを加算平均し ($I(Q)_{MD-SAXS}$)、実際に溶液散乱実験で得られたデータ ($I(Q)_{EX}$) と比較することで、MD で計算されたそれぞれのスナップショットの構造が対象とするマルチドメインタンパク質（全長）の動的構造かどうかを判定する。

$I(Q)_{MD-SAXS}$ と $I(Q)_{EX}$ が一致しないときは、MD-SAXS 法で最初に行ったマルチドメインタンパク質の初期構造を変化させて再度同じような計算を行い、この操作を $I(Q)_{MD-SAXS}$ と $I(Q)_{EX}$ とが一致するまで繰り返す。 $I(Q)_{MD-SAXS}$ と $I(Q)_{EX}$ とが一致すれば、それぞれのスナップショットの構造が対象とする全長のマルチドメインタンパク質の動的構造として MD の結果が実験で検証され、動的な挙動をしている全長マルチドメインタンパク質の原子レベルの動的構造解析が完了する。

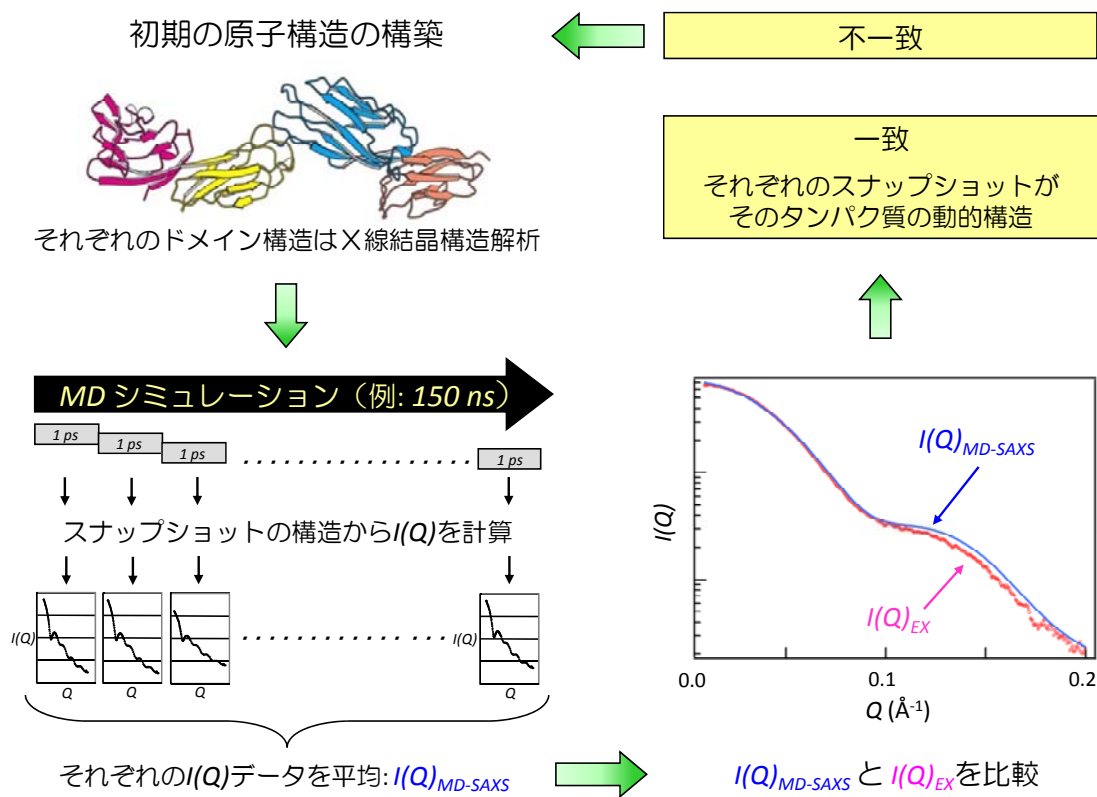


図3. MD-SAXS 法の概要

しかし、この手法をそのまま長大な ID 領域含むマルチドメインタンパク質に適用しようとすると、動的な挙動を呈する変性状態の初期構造数が莫大で、通常の MD では構造のサンプリングがきわめて困難となる。そこで、私たちは物理的に妥当な構造モデルを効率的に構築する方法を開発し、それを MD-SAXS 法に組み込むことでこの問題の解決を目指している (Extended MD-SAXS 法)。Extended MD-SAXS 法では、まず、図4に示すような方法で、長大な ID 領域をもつマルチドメインタンパク質の構造集団モデルを作成する。次に、それぞれの構造集団モデルに対して MD-SAXS 強度を理論的に計算し、実測の SAXS 強度に合致するように構造集団モデルの頻度

を精密化する(図5)。こうして精密化された構造集団がドメイン間に長大な ID 領域をもつマルチドメインタンパク質の動的構造を表していると考えられ、今後、この方法の妥当性を評価実際にドメイン間に長大な ID 領域をもつマルチドメインタンパク質を用いて、本手法の有効性を評価していく予定である。

なお、本講演では、ここでは述べなかったが、タンパク質の動的構造研究に革新的なブレイクスルーをもたらすであろうと期待されている X-FEL を利用した 1 分子解析についても紹介したい。

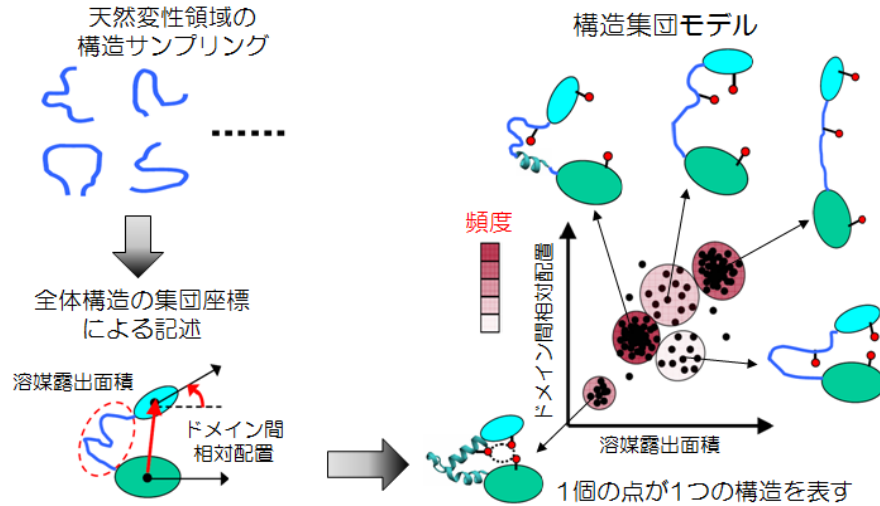


図 4. Extended MD-SAXS 法(その1)

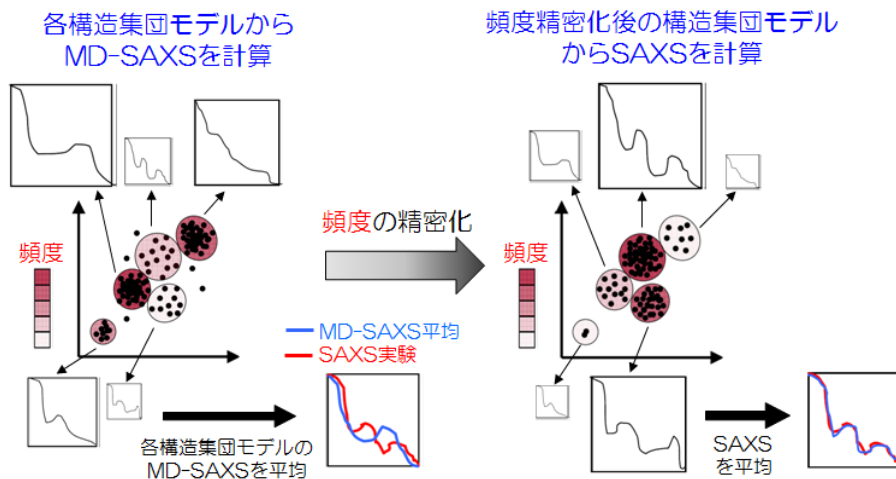


図 5. Extended MD-SAXS 法(その2)

文献

- 1) Svergun : *Biophys. J.* **76**, 2879-2886 (1999).
- 2) Oroguchi *et al.*: *Biophys. J.* **96**, 2808-2822 (2009).

mf-SANS の夜明け

-小型集束型中性子小角散乱装置-

北海道大学大学院工学研究院
古坂道弘

中性子散乱技術は非常に強力な重要な手段であるにもかかわらず、一般に広く利用出来る中性子施設は大強度陽子加速器研究施設 (J-PARC) の物質生命科学研究施設、日本原子力研究開発機構の三号炉の二ヶ所に限られているため、利用出来る機会が限られてしまっている。X線の分野では、実験室 X線発生装置がいたる所にあり、その利用者は非常に多い。更に、放射光施設に行くことで非常に強力な実験装置を使うこともできる。このため、X線の分野では非常に多くの研究者がそれを利用出来る環境が整っている。

我々は中性子に関しても X線の状況に匹敵するまでには行かないまでもそれに近い状況をつくるために幾つかの開発を行って来ている。その一つは、1本のビームラインに多数の実験装置を設置できるような小型の実験装置を開発する事であり、もう一つは、小型加速器を使った小型の中性子源を開発し、世界中の主だった大学、研究所、企業にそれを設置できるようにすることである。

最初の物に関しては、回転楕円体の一部を切り取ったような中性子集束ミラーによる小型の中性子小角散乱装置 (mfSANS) を開発してきている。原子炉では速度弁別器を使ってしまうと、一つのビームラインに1台の装置しか設置できなくなるため、大強度の (準) モノクロメータを開発し、複数台の小型装置を設置できるようにするのが目標である。波長分布が数%あるような、準単色化装置ともいべきものを開発中である。残念ながら現在は強度が目標としているものの数十分の1しか取り出せていないが、少なくともパイロリティックグラファイトに匹敵するような $R=0.7\text{m}$ と非常に強く湾曲した Si 完全結晶の準モノクロメータの開発に成功した。さらに、ビーム発散角を広げ、塑性変形させた Ge の単結晶と組み合わせることで目標に近づける努力をしている。更に、最終的には J-PARC にも同様の装置を複数台設置することを目標に開発を進めている。

mfSANS 本体に関しては集束ミラーがほぼ予定の性能を出し、広角側に設置した 48本のチューブ形的位置敏感型 He-3 ガス検出器 (LPSD) と相まって、非常に広い Q 領域の測定ができるようになってきている。この装置を用い、Glassy carbon、silver behenate などの標準試料の測定を行い、かなり良い性能が出ていることが明らかになった。また、比較的 Q の大きな、 0.1\AA^{-1} から 1\AA^{-1} 程度の領域の測定が出来るようになり、ナノ構造を持つ鉄鋼材料の測定ができるようになってきた。

中性子検出器として、現在は ZnS シンチレータを位置敏感型の 2次元光電子増倍管 (RPMT) に直付した物を使用しているが、これでは冷中性子領域で約 20%の検出効率しか無い。また、計数率も 40kpps 程度しか無い。そこでマイクロストリップガスカウンター (MSGC) を製作中である。現在のところ位置分解能は約 2mm であるが、将来的には 1mm を切る事ができる。検出効率はシンチレータに比較し 3倍程度には上がる予定である。また、100kpps を超えるビームの測定も可能になる。現在は He-3 ガスの入手が困難であるが何とかしてこれを使用したいと考えている。

小型加速器中性子源に関しては北海道大学と高エネルギー加速器研究機構の加速器グループとの共同研究が始まっている。小型線源としては陽子線ベースのものに比較し、電子線ベースの物のほうが優れているのではないかと考え始めている。1-3kW 程度のビームであれば、中性子発生効率は電子ビームのほうが高く、また、短パルスにすることが可能である。また、電子加速器は非常に枯れた技術であり保守も含め、その安定度は非常に高い。現在の標準的な技術で、2m 程度の加速管で 40-60MeV、数 kW の電子ビームを出すことは容易である。電子加速器ベースの線源の欠点としては γ 線バックグラウンドが高く、遮蔽が多く必要になることであるが、北海道大学の電子加速器では問題なく中性子散乱を行うことが可能になっている。このような小型線源のプロトタイプを開発を行い、世界標準として確立し、世界の多くの場所に設置されることを目標にしている。

更に、小型線源として 1MW 級の原子炉は発展途上国も含め様々な国に既に存在する。中性子光学素子をうまく利用することでこのような線源でも中性子小角散乱を行うことは十分に可能である。京都大学原子炉実験施設の KUR は現在 1MW で運転され、冷中性子源も運転を停止している。このような原子炉でも、集束ミラーなどの光学素子をうまく利用すれば十分に実用的な中性子小角散乱装置をデザインすることは可能である。これに関しても一つの標準として、このようなケースに適合する中性子小角散乱装置を開発するための第一歩として概念設計を行っている。

SPring-8 BL45XU 小角散乱実験ステーションの現状

理研 SPring-8 センター 山本 雅貴、引間 孝明

理研構造生物学ビームライン I (BL45XU) は垂直アンジュレーター2基を光源とした、小角散乱実験(SAXS)ステーションと中広角散乱実験(SWAXS)ステーションの2つの実験ステーションをもつブランチビームラインである(図1)。2つの実験ステーションは光源のセッティングが干渉しない限り、それぞれ独立に同時利用することができる。

SAXSステーションの利用エネルギー領域は6.7-14keVであり、通常は13.8keV(波長0.9Å)にて利用研究を進めている。試料位置でのフォトンフラックスは 5×10^{11} photons/sec (@13.8keV)であり、一般的なタンパク質溶液の場合、数十ミリ秒から数秒の露光で散乱測定が可能である。検出器はX線イメージンテンシファイヤーとCCDを組み合わせた高感度CCD型X線検出器と、イメージングプレートを用いたリガクR-AXIS IV++を実験条件に応じて切り替えて使用する。カメラ長は450mmから3500mmまで変更可能である。エネルギー、検出器、カメラ長の組み合わせの変更により $0.003-1.7 \text{ \AA}^{-1}$ のqレンジでの測定が可能である。また、広角同時測定用に試料直下に設置可能なフラットパネル検出器も備えている。試料周りは様々な装置を設置できる定盤と精密ステージがあり、常設の溶液セルやストップドフローセルのほか、実験毎に開発装置を簡便に設置できる。溶液、薄膜や気体からの散乱測定や数十ミリ秒~数時間の時分割測定など多種多様な課題研究が進められている。現在、溶液散乱測定のスループットを向上させるサンプルチェンジャーの開発や、小角分解能の向上を目指して新型スリットの導入、極希薄溶液などの高感度・精密測定、高速時分割測定に向けてフォトンカウント型2次元検出器の導入も進めている。

本ビームラインは理研専用ビームラインであり、SAXSステーションのビームタイムの80%は理研内の研究課題(ビームライン調整・高度化を含む)、20%をSPring-8一般共用研究課題に割り当てている。研究分野別には、2010年度前期実績で56%が構造生物学、34%が材料科学に利用され、残り10%がビームライン調整・高度化に利用されている。

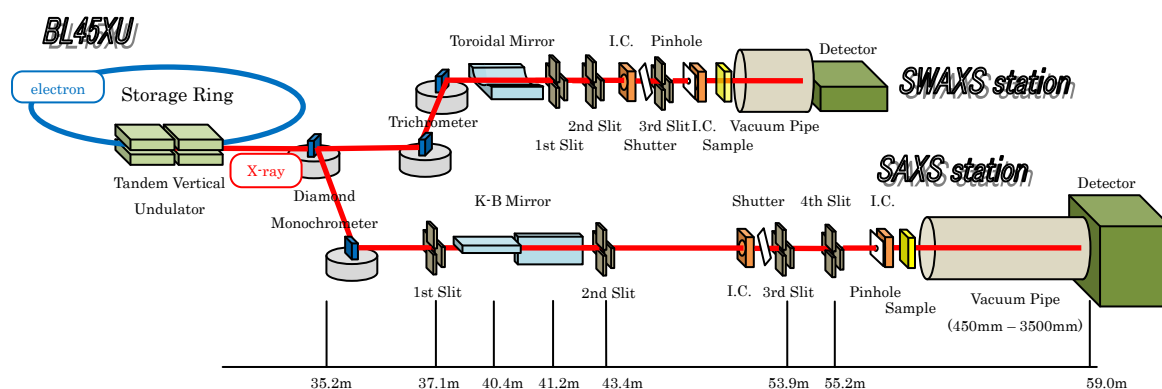


図1. BL45XUの光学系配置図

SPring-8 を活用した USAXS 法の現状とゴム構造解析

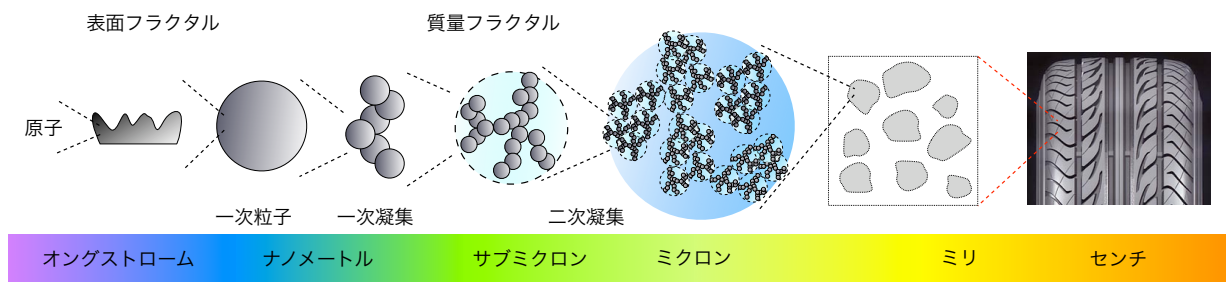
住友ゴム工業株式会社

岸本 浩通

1. はじめに

近年、環境に対する関心の高まりから車の燃費性能の向上が強く求められている。平成 19 年に開かれた洞爺湖サミットにおいて IEA（国際エネルギー機関）のレポートにある通り、タイヤが車の燃費に与える影響は約 20% と大きな割合を占めており、タイヤ転がり抵抗の低減が求められている。国内においては、平成 20 年に国交省・経産省により「タイヤ等普及促進協議会」が発足し、昨年度から各社タイヤの燃費性能とグリップ性能を同一基準で評価する「ラベリング制度」がスタートし、益々タイヤに対する関心が高まっている状況にある。

タイヤは「止まる（グリップ）」「良く転がる（燃費）」「曲がる」という基本性能が必要とされる。このような性質は、ゴム中に分散されたカーボンやシリカなどのフィラー（ナノ粒子）によって形成された階層的な凝集構造と密接に関係していると考えられている。しかし、グリップ（安全性）させるためにはゴムにひずみが印加された際のエネルギーロスが大きくなる必要があり、逆に燃費性能を向上させるにはエネルギーロスを小さくしなければならないという相反性能を高次元で両立する必要がある。その為、フィラーによって形成される階層構造を理解し制御することが非常に重要なテーマとなっている。

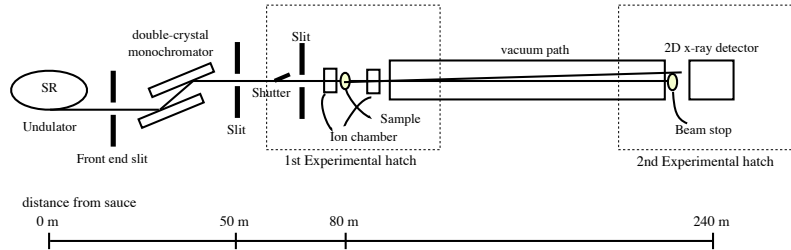
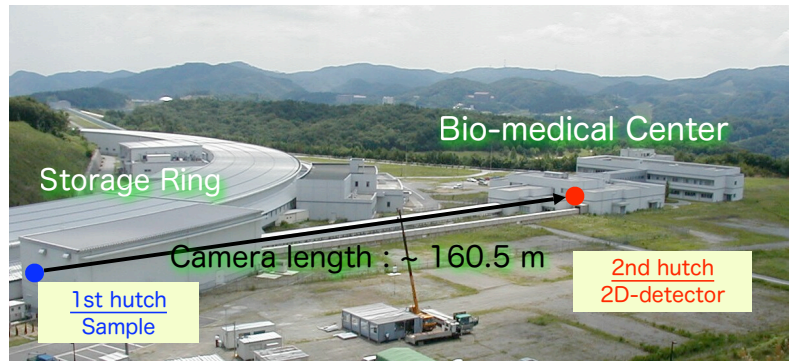


本講演では、東京大学 雨宮教授等と共同で SPring-8 BL20XU 中尺ビームラインを用い、2005 年より長期課題（3 年）の採択を受け開発してきた時分割二次元極小角 X 線散乱法（2D-USAXS）の現状と、ゴム中のフィラーの階層構造を解析した事例について紹介する。また、X 線散乱データからフィラーの構造モデルを構築するために、防衛大学校 荒井教授・萩田講師と共同で、地球シミュレータを活用した二次元リバースモンテカルロ法を開発した。その内容について簡単に紹介する。

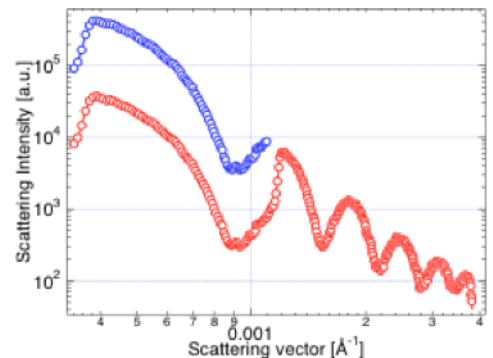
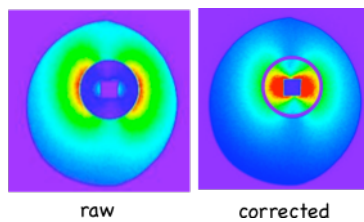
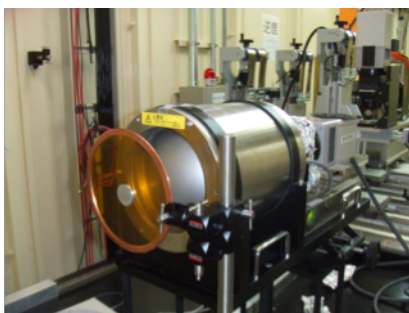
2. SPring-8 BL20XU: 2D-USAXS の現状

BL20XU は、挿入光源であるアンジュレータを有し、輝度が高くビームの平行性が非常に高いという特徴を持っている。また、蓄積リング棟内に第一ハッチが設置され、第一ハッチから約 160m 下流の医学利用棟内に第二ハッチが設置されている。そこで我々は、第一ハッチに試料を設置し、第二ハッチに

二次元検出器を設置することでカメラ長 160m の時分割 2D-USAXS 法の開発を行った。本ビームラインで USAXS 法を開発する上での課題として大きく 2 つの問題があった。一つ目は、各ハッチの位置は固定されているため、光源-試料間距離に比べ試料-検出器間距離が非常に長い。そのため集光光学系などが単純に設置することが困難であった。その為、試料から 160m 先の検出器にとどくまでに X 線ビームが横に広がるという課題があった。そこで、



光学系の最下流にピンホールを設置し検出器面上でのビームの広がりを検討した。ピンホールが小さ過ぎると Fraunhofer 回折により逆にビームが広がるため、ピンホールサイズを最適化し検出器面上でのビームの広がりを押さえる工夫し改善をおこなった。二つ目は、二次元検出器のダイナミックレンジの問題である。我々は、ゴムに外場を印加した際の瞬間の構造情報を調査するという目的から、二次元検出器として XR-II-CCD (X 線イメージンシファイヤー+CCD 検出器) を選択した。しかし、この検出器は IP に比べダイナミックレンジが 1 桁程度少ないため、ゴム中のフィラーのように散乱曲線の傾きが大きい材料を測定する上では不利になる。そこで、検出器の直前にアッテネータを挿入し、X 線散乱の中心部分のみの強度を下げることで見かけのダイナミックレンジを向上させることに成功した。

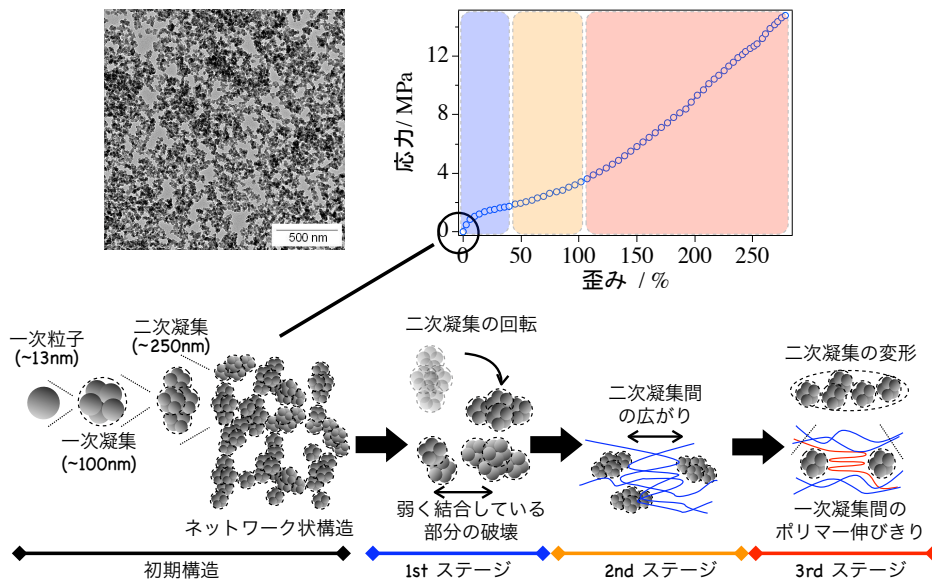
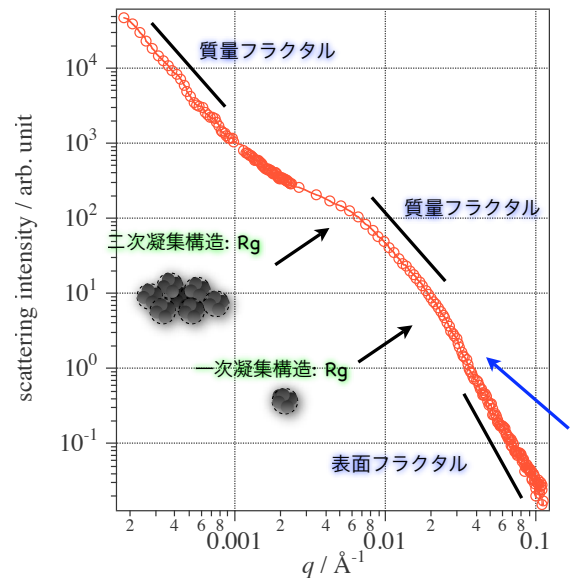


さらに、様々な改良を加え、既存の SAXS 測定ビームラインデータと合わせることで、約 $5\mu\text{m} > d > 6\text{\AA}$ の幅広いスケールレンジにおける構造解析を可能とした。

SPRING-8 では現在この他に、BL19B2 ビームライン、産学連携 FSBL (BL03XU) にてミクロンオーダーまでの USAXS 測定が可能となっている。

3. 2D-USAXS を用いたゴムの構造解析事例

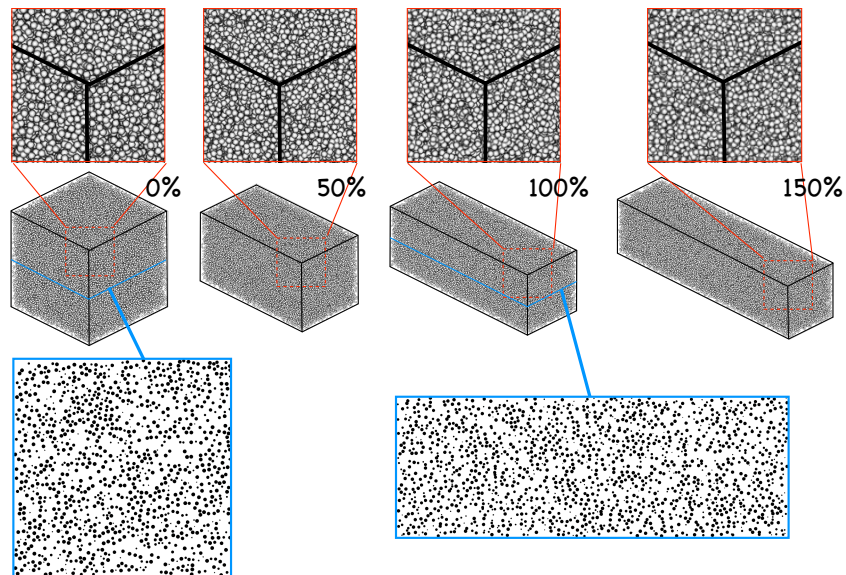
先に述べたように、タイヤ用ゴム材料の性能を向上させるための知見を得るために、2D-USAXS 法を用いてゴム延伸過程におけるフィラー凝集構造変化の観察を行った。300% ($\lambda=2$) 延伸させた時の 1 次元化プロファイルを図に示す。フィラーの凝集構造は階層性を有し、各階層からの散乱が重なったものとなっている。そこで我々は、G. Beaucage 等が提案したギニエと指数則が交互につながったモデルである Unified Approach 法を用いて各ひずみにおけるフィラー凝集構造の変化について解析を行った¹。試料は、シリカを体積分率 20% 配合したイオウ加硫ゴムを用いた。その結果、下図に示すように各ひずみ領域で異なる階層のフィラー凝集構造の変化が密接に関係し物性を発現させていることが分かった²。



4. その他の解析アプローチ

前述では、逆空間情報を解析することで、ゴム中のフィラー凝集構造に関する統計的な情報を得ることができた。しかし、更に一歩踏み込んでメカニズムを明らかにするためには、シミュレーションの応用が必要となる。しかし、シミュレーションを行うには実空間におけるフィラー構造配置が必要となる。そこで、我々は RMC 法に着目し二次元散乱パターンの解析応用を検討した。2D-RMC 法を開発する上での課題として、二次元パターンの全方位（少なくとも 1 象限）を解析する必要があるため膨大な計算規模となる。その為、2005 年当時に世界最速スパコンであった地球シミュレータを用いて開発を進めた。RMC 法は散乱強度データをそのまま用いるのではなく、構造因子 $S(q)$ を用いる必要がある。ゴム材料に実使用されるフィラーは粒度分布を有しているため、単純に構造因子を求めることが困難であっ

た。我々は、まず粒度分布が均一な真球状シリカをゴム中に分散させた試料を用い、延伸過程におけるフィラー構造の可視化を行った。その結果、下図に示すようにフィラー構造配置を求めることが可能となり、シミュレーションに応用することで詳細な物性発現メカニズムを考察することが可能となった^{3,4}。



Reference

- 1 G. Beaucage, *J. Appl. Crystallogr.* 28, 717 (1995).
- 2 H. Kishimoto, et al., *Rubber Chemistry & Technology*, 81, 541-551 (2008).
- 3 K. Hagita, et. al., *J. Phys.: Condens. Matter*, 19, 330017 (2007).
- 4 K. Hagita, et. al., *Rheol Acta* (2008) 47: 537

SANS・SAXSによるソフトマター研究

京都大学・工学研究科・高分子化学専攻 松岡 秀樹

matsuoka@star.polym.kyoto-u.ac.jp

我々は古くは高分子電解質やコロイド、そして最近では両親媒性高分子の研究に対し、X線および中性子小角散乱(SAXS, SANS)を活用してきた。一例は下記の通りである。

- (1) 高分子電解質溶液の溶液構造[1]
- (2) 超小角散乱によるコロイド結晶の構造解析と形成機構解明[2]
- (3) コントラスト変化法によるイオン性ミセル周りのイオン雰囲気の詳細観察[3]
- (4) 中性子スピネコー(NSE)と SANS による高分子ミセルまわりのコロナのナノ構造とダイナミクス[4]
- (5) 界面不活性という不思議な性質を示すイオン性両親媒性高分子のミセル形成挙動とナノ構造およびその転移挙動[5]

本講演では、近年力を入れている5のテーマの進展状況を紹介します。小角散乱とその解析法の議論に話題を提供したい。

我々は、非イオン性の両親媒性高分子、すなわち中性の水溶性高分子と疎水性の高分子のジブロック共重合体を合成し、そのミセル構造を SAXS, SANS により解析することにより、低分子界面活性剤ミセルのモルフォロジーをよく説明する臨界充填パラメータ(親水部と疎水部の長さや体積の比)にて、高分子ミセルに対しても、その形状や大きさがよく説明されることを確認してきた。その発展型として、10数年前より、水溶性の親水部をイオン性すなわち高分子電解質とするブロックポリマーの研究へと移行した。もともと高分子電解質の研究をしていたから、という極めて単純な発想であったが、苦難の末合成に成功したイオン性両親媒性ジブロックコポリマーの「特性」は全く予期していない不思議なものであった。『ミセル』は界面活性物質(すなわち surfactant (=surface active agent)) が臨界ミセル濃度(cmc)以上で形成する会合体であるが、界面化学の『常識』であった。しかし我々のポリ

マーは、「界面不活性」であり、すなわち溶液の表面張力が低下せず、泡立ちもしない、にも関わらず、水溶液中にはミセルが存在する、という常識破りのものであった。この特性の発現には、親水部がイオン性高分子であり、また疎水部も高分子鎖であることが「鍵」であることが分かってきている。この従来の枠組みには相容れない新規な物質といえる「イオン性両親媒性高分子」であるが、そのミセル形成挙動とミセルのナノ構造、そして外部要因によるナノ構造転移を光散乱法や小角散乱法で追跡している。[5]

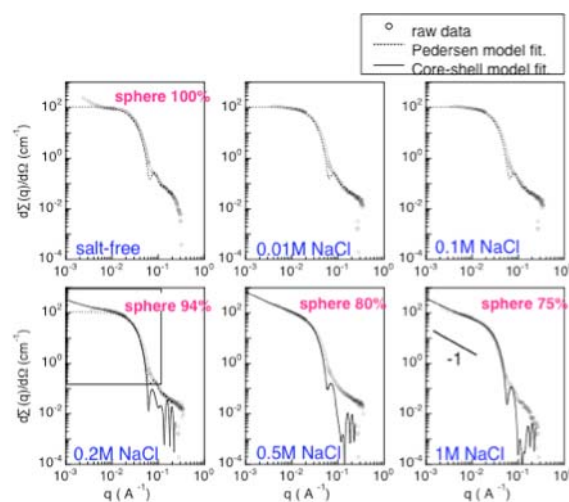


Figure 1 ポリ水素化イソプレン-b-ポリスチレンスルホン酸ナトリウム重水溶液の SANS 局線とその添加塩濃度依存性

図1は、水素化ポリイソプレンを疎水ブロック、アニオン性のポリスチレンスルホン酸ナトリウムを親水鎖とするジブロックコポリマーミセルの SANS 曲線の添加塩濃度依存性である。添加塩濃度が低い場合には、ミセルは球状であることが明らかであり、少々塩の添加で SANS 曲線はほとんど変化しておらず、塩に対して耐性があり、極めて安定であることが分かる。塩(NaCl)の濃度が 0.2M を越えると SANS 曲線に変化が現れ、小角部分の両対数での傾きが -1 に近づいている。これは棒状ミセルの形成を示唆する。実

際, 球状ミセルと棒状ミセルの混合モデルでフィッティングをし, コア半径, シェル (コロナ) の厚さ, そして球と棒の割合を見積もると, 図2のようになる. いずれのパラメータも塩濃度 0.2M まで変化せず, この濃度を我々は「臨海塩濃度 (critical salt concentration, csc)」と呼んでいる. これを越えると, シェル厚が減少を始め, それと同時に, 棒状ミセルが形成され, 塩濃度増加とともにその割合が増加していることが分かる. この挙動は臨界充填パラメータの概念で説明でき, 極めて理解しやすいものであるが, csc が 0.2M という高い濃度になっていることは注目に値する. csc 自体は, バルクのイオン濃度とコロナ内のイオン濃度の大小関係が逆転する塩濃度と解釈できるが, 会合数から計算したコロナ内のイオン濃度は 2M 程度と極めて高く, これはイオン性高分子鎖上の「有効な」イオンは, 0.2M 分と約 1 割であり, 残りの 9 割は, 対イオン固定により「無効」となっていることを意味する. コロナ内はイオン性高分子鎖の「密生系」であり, 球面上の高分子電解質ブラシとも言える. このような特殊条件下では, 「非常に高い対イオン固定」という特異現象が起きていることが分かる.

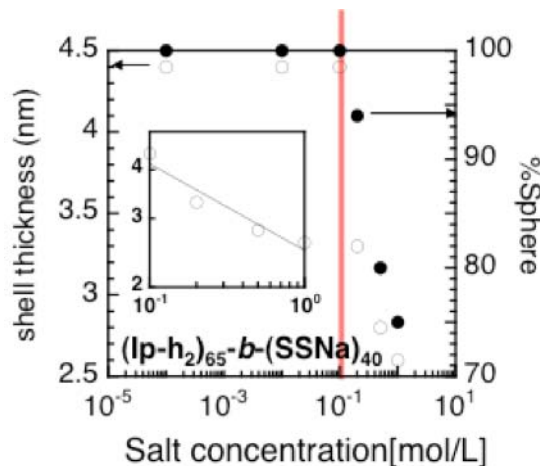


Figure 2 SANS 曲線のフィッティングにより得られた高分子ミセルのシェル厚 (左) と球状ミセルの割合 (右) の添加塩濃度依存性

なお, これら高分子ミセルの SANS データの解析には, 主としてコア-シェルモデルによるフィッティングを用いている. コア内はもちろん, シェル内の密度も一定という, 単純化したモデルである. 現実には, シェル内の密度は中心から離れるほど減少していくはずであり, 実際, 親水鎖の blob scattering が寄与する広角部分はフィッ

トできていない. これを含めて全体をフィットするには, Pedersen のモデルがあり, 実際, よく実験データを再現する. しかしながら, このモデルは, コロナを形成する鎖をガウス鎖と仮定する, コアとコロナの界面に現実ではあり得ないような大きな粗さを導入し, 見かけ上のフィットを得ている, などの, それなりの単純化がある. 実際, 得られるコア半径, シェル厚さなどは, core-shell モデルでも Pedersen モデルでもほぼ同じ (図3) であり, 我々のように, ミセル構造の大きな構造転移を追跡する分には, core-shell モデルで十分と考えている. しかしながら, 元の構造を仮定せずミセルの構造を正確に与える解析法は将来的に必要であり, シェル内の高分子鎖のコンフォメーションや対イオンや添加塩イオンのシェル内での分布 (恐らく均一ではないだろうと考えている) の評価という新しい情報を得ることが可能になるかもしれない. 当日は, 温度応答性の界面不活性高分子ミセルに関する SANS データや, ミセル構造に与える有機溶媒の添加効果など最新のデータについても紹介する予定である.

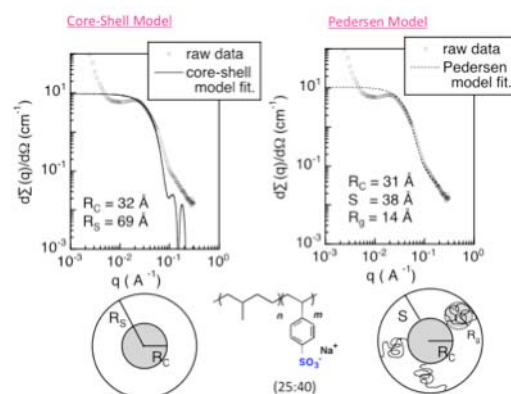


Figure 3 SANS 曲線の core-shell モデルフィッティング (左) と Pedersen Model fit.

References

- [1] H.Matsuoka, H.Tanaka, T.Hashimoto and N.Ise, *Phys. Rev. B*, **36**, 1754-1765 (1987).
- [2] T.Harada, H.Matsuoka, H.Yamaoka, *Langmuir*, **15**(2), 573-577 (1999).
- [3] K.Sumaru, H.Matsuoka, H.Yamaoka, G.D.Wignall, *Phy.Rev.E*, **53**, 1744-1752 (1996).
- [4] H.Matsuoka, Y.Yamamoto, M.Nakano, H.Endo, H.Yamaoka, R.Zorn, M.Monkenbusch, D. Richter, H.Seto, Y.Kawabata, M.Nagao, *Langmuir*, **16**(24) 9177-9185 (2000).
- [5] P.Kaewsaiha, K.Matsumoto, H.Matsuoka, *Langmuir*, **23**(18), 9162-9169 (2007).

中性子散乱による酵素のドメイン運動の観察

¹井上倫太郎, ²R. Biehl, ³T. Rosenkranz, ³J. Fitter, ²M. Monkenbusch, ⁴A Radulescu,
⁵B. Farago, ²D. Richter

¹京大化研, ²IFF, Forschungszentrum Jülich, ³ISB-2, Forschungszentrum Jülich,
⁴JCNS, Forschungszentrum Jülich, ⁵ILL

二つ或いはそれ以上のドメインを有するマルチドメインタンパク質のドメイン運動、例えばヘキソキナーゼの locking motion [1], アルコール分解酵素の cleft 付近の運動 [2], アデニル酸キナーゼの lid opening motion [3] などが挙げられるが、このようなドメイン運動は決して無為に動いているわけではなく、特定の原子群を高効率で転移させる或いは転移反応の特異性を挙げるなどのタンパク質自身の機能と密接に関連している。そのため、マルチドメインタンパク質のドメイン運動を直接観察し詳細にその動きを解析することで、内在している生物学的な機能のメカニズム解明に繋がると考えられ、実験及び理論の両観点から研究が進められてきた。

ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) は解糖系の 6 番目のサイクルに含まれる酵素であり、生体のエネルギーの通貨とも称されるアデノシン三リン酸 (ATP) を最初に生体内で合成する反応に深く関与している。X 線結晶構造解析によると PGK は Fig. 1 に示すようにヒンジで繋がった二つの大きなドメインにより形成されると報告されている [4]。基質である ATP, 3-ホスホグリセリン酸 (3PG) の binding site はそれぞれ C 末端, N 末端に存在するため PGK のドメインが離れたいわゆる open configuration では両基質の binding site は 11Å 程度も離れており、そのような状況では ATP の加水分解のみが優先的に起こり ATP 合成反応を阻害してしまう。適切な酵素反応が進行するためには基質により酵素の configuration 変化が起きているのではないかと Banks らにより予想された [5]。アイデアとしては二つのドメインが言わばちょうつがいのように動けば (hinge-bending motion)、各々のドメインの活性部位が十分に近づき反応が進行できるというものである。基質による configuration の変化或いは hinge bending motion の考えを実験的に立証するため Berstein ら [6] は 馬由来の PGK (open configuration) と Mg-ADP と 3PG 基質を bind した *Trypanosoma brucei* 由来の PGK との結晶構造の比較を行った結果、基質を bind した PGK ternary complex のドメイン間距離が短くなっていることから hinge-bending motion による構造変化の可能性を示唆した。しかしながら同種の生物由来の PGK を用いた PGK の open configuration 及び基質を bind した closed configuration の構造変化を X 線結晶構造解析により比較した報告例は無いため、実際にどの程度基質による構造変化が起きたかを議論するには限界がある。

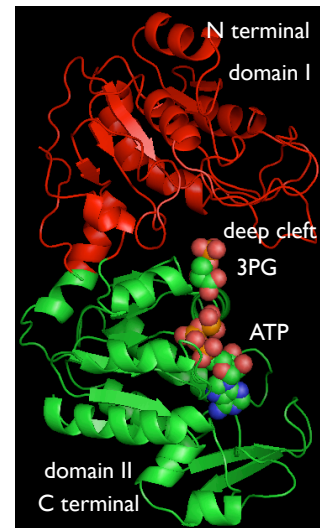


Fig.1 Schematic view of the ternary complex of yeast PGK.

X 線結晶構造解析と比較して、溶液状態ではより生体に近い環境で同種由来の PGK を用いて、基質による構造変化を調べられる利点がある。実際にこれまで溶液状態における PGK の構造に関する研究は SANS [7], SAXS [8], fluorescence resonance energy transfer (FRET) [9] 等により研究されており、基質による回転二乗半径 (R_g) の低下やドメイン間距離が短くなるなどの hinge bending motion に関連した基質による構造変化の様子が報告されているが、より詳細な構造解析は未だ手つかずの状態にある。そこで、本発表では SANS 及び NSE 組み合わせで、溶液状態におけるホスホグリセリン酸キナーゼのドメイン運動の直接観察及び基質による構造変化を調べた。

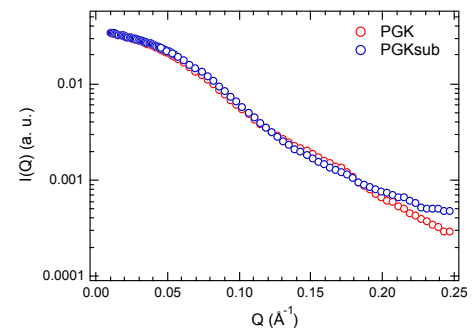


Fig.2 SANS scattering intensity $I(Q)$ for PGK and PGK at the concentration of 0.5%.

Fig.2 に基質無しの PGK (PGK) 及び基質を加えた PGK (PGKsub) から得られた SANS の結果を示す。既に報告されているように [7, 8] 基質を bind することで R_g が 23.7Å (PGK) から 22.5Å (PGKsub) に減少したことに加えて、散乱プロファイルにも変化が確認された。特に Fig. 3 に示すように kratky plot を行うと基質の有無による散乱プロファイルの差が明確に確認出来る。最初のアプローチとして X 線構造解析から決定された構造 (PDB:3pgk) を用いて、どの程度結晶構造から溶液状態の散乱プロファイルが変化しているかを調べた。Fig. 3 の黒の実線が結晶構造解析から予測される構造であるが、PGK,

PGKsubのいずれの構造もうまく表現できず更に R_g に関してもずれが見られた。この結果から溶液状態のPGKは結晶構造よりもよりcompactであり、更にhinge bending motionがアンサンブル平均された静的構造に影響を与えたと考えられる。結晶構造がもはや溶液中でのPGKの構造を記述できないことから、実際どのような構造を取り得るか考え直す必要がある。そこで、我々は結晶構造を元にしてその構造をelastic network model [10] から計算されたnormal mode (NM) により変形させ、どの程度動かせば実測データを再現できるか試みた。なお、我々は特に並進及び回転の寄与を除いた低周波数normal mode (NM) であるNM 7, 8, 9を用いた。その結果を実線で示すがPGKの場合はNM 9による影響が一番強く受け、NM 7-9による平均の原子の変位はそれぞれ-1.4Å, 0.3Å, 2.2Åであった。一方PGKsubの場合はNM 8の影響が一番強くNM 7-9の平均の原子の変位はそれぞれ-0.6Å, -3.4Å, 0.3Åであった。この結果はSANSで観測される平均的な構造に対してもdynamicsの寄与を加えることでうまく表現できる可能性を示している。当日はSANSの結果に加えてNSEによるdynamicsによるhinge-bending motionの直接観察の結果も加えて報告する。

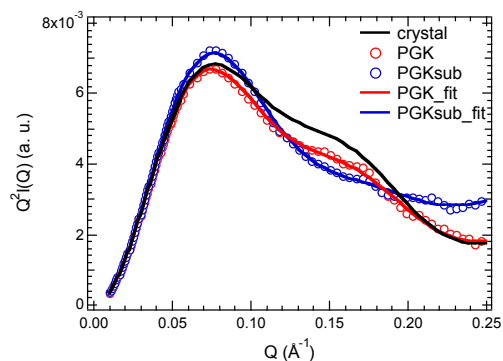


Fig.3 Q dependence of $Q^2 I(Q)$ for PGK and PGKsub. The red and blue curves were calculated by adding normal mode to the original crystal structure and black curve corresponded to the calculation from crystal structure.

References

- [1] Bennett WS, Steitz TA (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4848-4852.
- [2] Henzler-Wildman KA, Thai V, Lei M, Ott M, Wolf-Watz M, Fenn T, Pozharski E, Wilson MA, Petsko GA, Karplus M, Hübner CG, Kern D (2007) *Nature* 450: 838-844.
- [3] Biehl R, et al. (2008) *Phys. Rev. Lett.* 101: 138102-1-138102-4.
- [4] Bryant TN, Watson HC, Wendell PL (1974) *Nature* 247: 14-17.
- [5] Banks RD, et al. (1979) *Nature* 279: 773-777.
- [6] Bernstein BE, Michels PAM, Hol WGJ (1997) *Nature* 385: 275-278.
- [7] Henderson SJ, Serpersu EH, Gerhardt BS, Bunick GJ (1994) *Biophys. Chem.* 53: 95-104.
- [8] Sinev MA, Razgulyaev OI, Vas, Timchenko AA, Ptitsyn OB (1989) *Eur. J. Biochem.* 180: 61-66.
- [9] Haran G, Haas E, Szpikowska, Mas MT (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11764-11768.
- [10] Suhre K, Sanejouand YH (2004) *Nucleic Acids Research* 32: W610-W614.

中性子散乱による蛋白質複合体の構造・ダイナミクス解析

日本原子力研究開発機構
量子ビーム応用研究部門
藤原 悟

中性子小角散乱・回折においては、溶媒中の D_2O の割合を変化させる”コントラスト変調”測定により、ユニークな構造情報の抽出が可能である。溶媒の散乱長密度を様々な生体分子の散乱長密度に一致させることができるので、コントラスト変調測定により、特定の成分を“消す”ことができるのである。このようなコントラスト変調測定は、核酸-蛋白質複合体やリポ蛋白質など散乱長密度の異なる成分を持つ多成分系の研究に威力を発揮してきた。

蛋白質の散乱長密度は、種類によらずほぼ同様のため、蛋白質複合体の成分は区別できないが、蛋白質中のHをDに置換する蛋白質重水素化により、散乱長密度の大きく異なった蛋白質の調製が可能である。選択的重水素化と、溶媒の散乱長密度を通常の成分と一致させるコントラストマッチングを組み合わせた中性子小角散乱測定により蛋白質複合体の特性成分の構造情報を抽出することが出来る。

我々は、筋肉の細いフィラメント中でのトロポニン(Tn)C の構造解析にこの方法を適用した。細いフィラメントは、アクチン、トロポミオシン、及び TnC を含む 3 成分から成る Tn が規則構造をとる。TnC は細いフィラメントの Ca^{2+} による筋収縮調節機構において重要な役割を果たしている。本講演では、まず、この TnC の構造解析研究を例として紹介し、蛋白質重水素化とコントラストマッチングを組み合わせた中性子小角散乱の有用性を示したい。

コントラスト変調測定は、溶媒を一定密度の連続体で近似できる低分解能測定であれば、繊維回折や結晶解析にも同様に適用可能である。実際、我々は、細いフィラメントの配向試料の中性子繊維回折測定や筋肉のコントラスト変調法を用いた中性子繊維回折測定から、X 線回折からは決して得られない情報の抽出が可能であることを示してきた。これらの繊維回折法による研究例の紹介を通して、コントラスト変調法のユニークさを示したい。さらに、我々は、中性子繊維回折測定から静的な構造の乱れと動的な構造の揺らぎを分離できる可能性を示唆する結果を得ている。これは、コントラスト変調法を用いた中性子小角散乱・回折により構造情報のみならずダイナミクスの情報が抽出できる可能性を示唆している。この新たな可能性を含めた中性子小角散乱・回折の有用性を議論したい。