

BL6B における Zn の MAD データ測定

中嶋 義隆¹、鹿島 亜季子¹、加藤 良平¹、杉尾 成俊¹、坂部 貴和子²、坂部 知平²

1. 三菱化学株式会社 科学技術研究センター 2. 国際科学振興財団 研究開発部

【緒言】

近年、タンパク質の結晶構造解析に multiple-wavelength anomalous dispersion (MAD) 法を利用した例が増加している。BL6B は波長可変のモノクロメータが設置されていたが、精度が十分でないという理由で、これまで波長固定 (1.0 Å) で利用されてきた。今回、BL6B に R-AXIS VI⁺⁺ が設置されるのと時期を同じくして、ユーザーによる波長変更が可能との通知があった。そこで、R-AXIS VI⁺⁺ の検証実験の一環として、MAD データ測定の可能性について、Zn を含むインシュリン結晶を用いて検討したので報告する。

【実験及び結果】

(1) ZnCl₂ の XAFS 測定

Zn の吸収端の波長は 1.2836 Å であるので、 $\lambda=1.284$ Å でビームアラインメントを行った。まず、0.7 mm φ のガラスキャピラリーに 100 mM ZnCl₂ を封入し、これを用いて Zn の XAFS 測定を行った (図 1a)。0.5 mm φ のコリメーターを用いて、波長 1.281-1.284 Å の範囲で、30 ステップ (0.001 Å) 同様に波長 1.280-1.283 Å の範囲で測定した。続いて 0.2 mm φ のコリメーターに変更し、波長 1.280-1.283 Å の範囲、30 ステップで測定した。これら 3 データにおける peak の波長は 1.2813 Å であり、全く同じであった。

次に、波長を大きく変更した時の再現性、すなわち精度がどの程度であるか調べるため、peak の波長 ($\lambda=1.283$ Å) から remote の波長 ($\lambda=1.180$ Å) へ大きく波長を変更した後、Zn の XAFS 測定を行った。peak と remote の波長を往復 (peak → remote → peak → remote → peak) した後、波長 1.280-1.283 Å の範囲、30 ステップの同条件で 2 回、XAFS 測定を行った。この時 peak の波長は、 $\lambda=1.2811$ Å および $\lambda=1.2810$ Å であった。この結果、波長変更の前後で peak の波長は 0.002-0.003 Å ずれていた。これは、波長変更の時に動く の精度が 0.02° 程度であるために生じた誤差であると考えられる。波長 1.2811 Å の時、 $\theta=11.79^\circ$ であるので、波長に対しておよそ 0.002 Å の誤差を生じると見積られる。これは、今回の測定結果と一致する。

(2) インシュリン結晶の XAFS 測定

ガラスキャピラリーに封入されたインシュリンの結晶 ($R3$, $a=82.8$ Å, $c=34.2$ Å) を用いて、同条件 (波長 1.280-1.283 Å の範囲, 30 ステップ) で XAFS 測定を行った (図 1b)。その結果、peak の波長は $\lambda=1.2811$ Å であった。これは先に ZnCl₂ を用いて測定した peak と同一波長であった。また吸収端 (edge) は、XAFS の形状から $\lambda=1.2816$ Å と決定した。

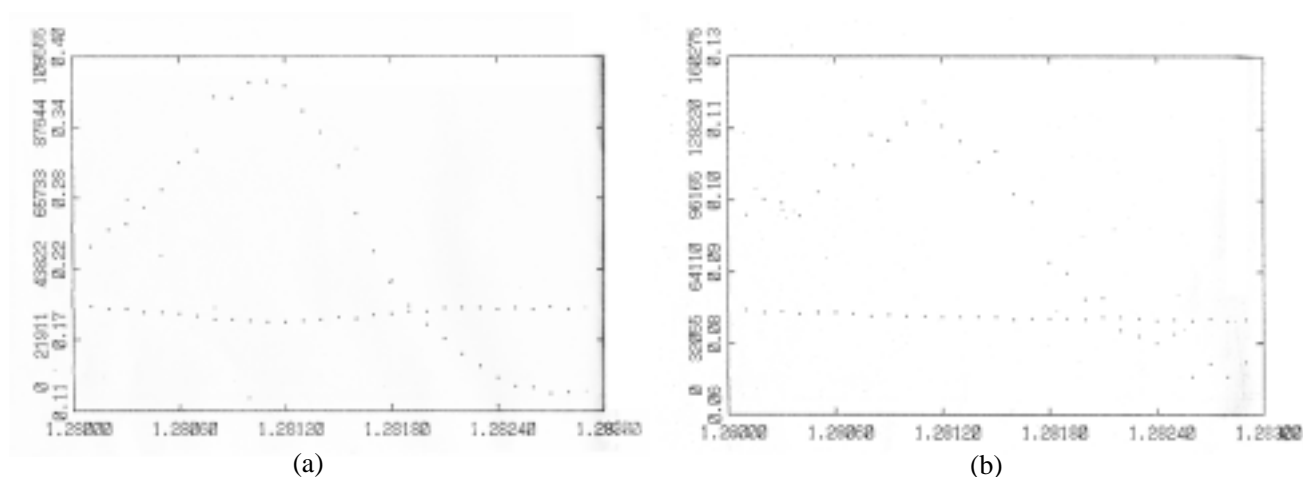


図1 ZnのXAFSデータ

(a) 100mM ZnCl₂、peakの波長は1.2811 Å (b) インシュリン結晶、peakの波長は1.2811 Å
図中に示す矢印の位置がpeakの波長。

表1 回折強度統計

	edge	peak	remote
space group	R3		
cell constant			
<i>a</i> (Å)	82.83	82.89	82.81
<i>c</i> (Å)	34.28	34.28	34.31
wavelength(Å)	1.2811	1.2816	1.1800
temperature	room temperature		
resolution range (Å)	50-2.2 (2.28-2.20)	50-2.2 (2.28-2.20)	50-2.2 (2.28-2.20)
number of reflections			
measurement	29,524	29,566	34,621
unique	4,409	4,398	4,439
completeness (%)	98.9 (91.7)	98.7 (90.7)	99.7 (99.1)
mean I/σ(I)	51.8 (33.9)	51.8 (33.1)	53.0 (41.1)
<i>R</i> _{merge}	0.056 (0.062)	0.058 (0.060)	0.053 (0.053)

(3) インシュリン結晶の回折強度測定

インシュリン結晶の回折強度測定は、先に決定した3波長(peak : 1.2811 Å, edge : 1.2816 Å, remote : 1.1800 Å)において、Rigaku R-Axis IV⁺⁺を用い、室温、距離 250 mm、振動角 5.0°、露光時間 5 min/frame の条件で行い、それぞれ 36 フレームのデータを収集した。プログラム DENZO、SCALEPACK を用いて回折データの処理を行った結果、20.0-2.20 Å 分解能で peak、edge、remote

のそれぞれ、4409、4398、4439 (completeness 98.9 %、98.7 %、99.7 %)の独立な反射が得られ、 R_{merge} はそれぞれ 5.6%、5.8%、5.3%であった (表 1)。

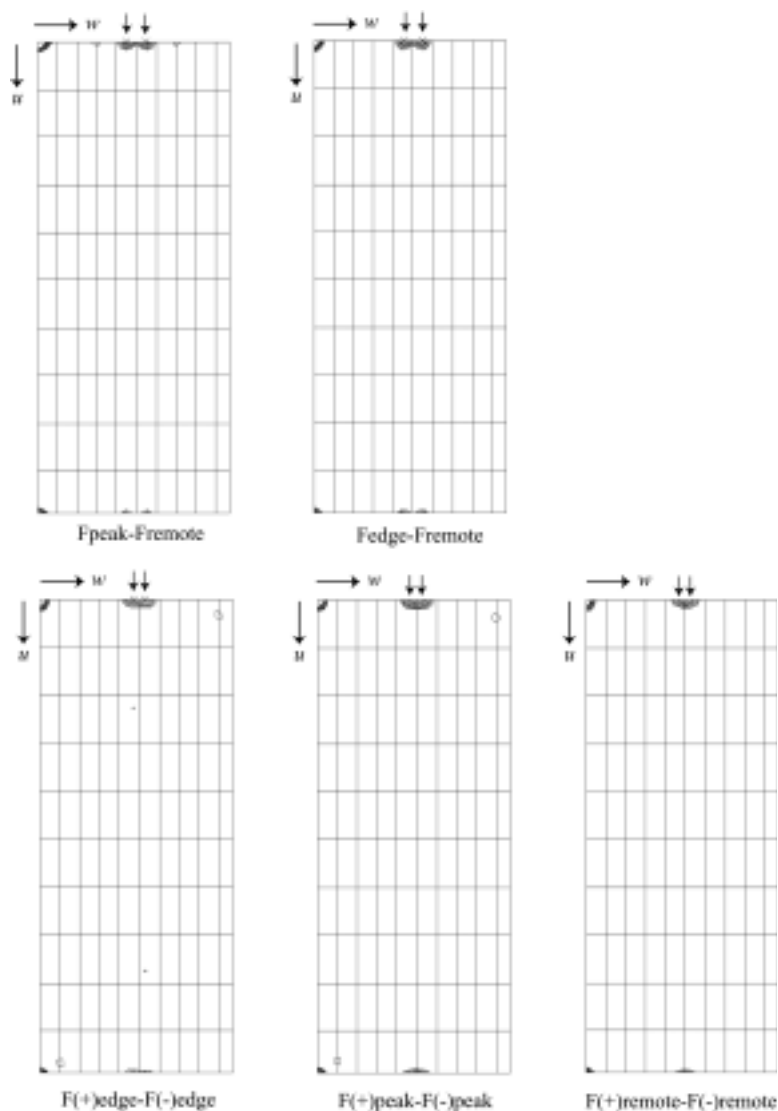


図 2 10.0-2.40 Å 分解能で計算した $v=0$ における Patterson マップ
矢印：2つの Zn のクロスベクトルに由来するピーク。

CCP4 の *fft* を用いて、10.0-2.40 Å 分解能の範囲で、 $F_{\text{edge}}-F_{\text{remote}}$ 、 $F_{\text{peak}}-F_{\text{remote}}$ の差 Patterson マップと、 $F(+)\text{remote}-F(-)\text{remote}$ 、 $F(+)\text{peak}-F(-)\text{peak}$ 、 $F(+)\text{edge}-F(-)\text{edge}$ の異常分散差 Patterson マップの 5 つの差 Patterson マップを計算した (図 2)。今回測定したインシュリンの結晶は、空間群 $R3$ 、 $a=b=82.8$ Å、 $c=34.2$ Å の格子定数を持ち、非対称単位にインシュリン分子と Zn がそれぞれ 2 個存在する。2 つの Zn は fractional coordinate で (0.000, 0.000, -0.219) および (0.000, 0.000, 0.239) に位置する。即ち、結晶学的 3 回軸上の特殊位置に存在するため、これらを一般反射の位相計算に用いることができ

ない。従って、ここでは2つのZnのクロスベクトル(0.000, 0.000, 0.458)に対応する、差 Patterson マップ上のピークについて考察する。それぞれの差 Patterson マップをみると、 $F_{\text{edge}}-F_{\text{remote}}$ 、 $F_{\text{peak}}-F_{\text{remote}}$ 、 $F_{(+)\text{edge}}-F_{(-)\text{edge}}$ の差 Patterson マップに、このベクトルに由来するピークが観測される。一方、 $F_{(+)\text{peak}}-F_{(-)\text{peak}}$ 、 $F_{(+)\text{remote}}-F_{(-)\text{remote}}$ の差 Patterson マップには、(0.00, 0.00, 0.50)に高いピークが見られるが、これも(0.000, 0.000, 0.458)と対称となる(0.000, 0.000, 0.542)の2つが分離されず、合成されたピークであると考えられる。

構造因子への重原子の寄与は、edge では異常分散シグナルの実数項(f')が極小となる波長である。Zn の場合、異常分散シグナルの虚数項(f'')の値も、peak ($f''=3.89$)や高エネルギーremote($f''=3.34$)と比較して小さい($f''=0.48$)。したがって、 $F_{(+)\text{edge}}-F_{(-)\text{edge}}$ の差 Patterson マップにおける重原子の異常分散によるピークの高さは、相対的に小さくなるはずである。しかしながら、今回測定したデータによる edge の異常分散差 Patterson マップにおいて、2つのZnのクロスベクトルによる高いピークが観測された。今回測定した3波長のデータを用いて、*SOLVE*によるスケーリングを行った。スケーリング後に精密化された f' と f'' をみると、それぞれ $f'=-7.40$ $f''=2.01$ (edge) $f'=-7.68$ $f''=2.41$ (peak) $f'=-3.53$ 、 $f''=1.61$ (remote)であった。ここで問題となるのは、edge と peak である。 f' が極小となる edge の f' は-7.40 と peak の-7.68 と比較して大きかった。また異常分散シグナルの虚数項 f'' の値も edge の2.01 に対して、peak では2.41 と近い値であった。つまり、今回 edge として測定したデータは、edge ではなく peak に近い波長で測定していたと考えられる。2つのZnのクロスベクトルによる高いピークが、 $F_{(+)\text{edge}}-F_{(-)\text{edge}}$ の異常分散差 Patterson マップに観測されたのは、このような理由であろう。

今回の実験において edge のデータを正確に測定できなかったものの、peak と remote のデータ間には構造因子への重原子の寄与に差が観測された。従って、peak と remote のデータ測定は問題なく行われたと考えられる。

【問題点】

100 mM ZnCl_2 を用いた XAFS 測定実験から、装置の誤差の影響は 1.2180 Å から 1.2183 Å の 0.0003 Å の波長変更では小さいと考えることができる。edge を正確に測定できなかったのは、XAFS データから正確な変極点を決定できなかったためと考えられる。結晶の XAFS では低エネルギー側で tailing がみられた。edge の波長を正確に決定するには、十分広い波長範囲を測定するなど、測定条件の検討をする余地がある。

今回の実験を行うにあたり、Zn の吸収端の波長に近い 1.284 Å の波長でビームアライメントを行った。そのため 1.2813 Å から 1.1800 Å へと大きく波長を変更するとビームの強度は減少する。実際、イオンチャンバーを設置して、rear Ic を測定すると電流値は、0.084 nA から 0.064 nA へと減少した。この時ビームアライメントメニューから 2 を rear Ic が最大になるように微調整すれば、1.1800 Å の波長における rear Ic の値は 1.21813 Å での値と同程度まで回復した。今回のように、peak と edge の測定後、remote を測定するため波長を大きく変更する場合には、2 の微調整は必須と考えるべきであろう。

今回の実験は最低限の実験ができる環境をその場しのぎで構築して行った。今後、当ビームラインで MAD 法に適した測定を円滑に実施していくためには、蛍光X線測定専用の検出器や入射

光強度測定・ビームアライメント専用のイオンチャンバーの調達・取付方法・配線等のハードウェアに関する検討と共に、波高分析条件の設定、元素毎の XAFS 測定範囲の選択など、ユーザーの利便性を向上させるためのソフトウェアに関する整備も必要となろう。

【結論】

今回、試験的に BL6B でインシュリン結晶の Zn による MAD データ測定を試みた。remote への波長変更時に 2 の調整が必要ではあるが、MAD データ測定自体は可能であった。edge の波長を正確に決定することができなかったが、元素ごとに最適な波長範囲を示した XAFS 測定のためのプロトコルが確立されれば解決できる問題と考えられた。また、XAFS 測定やビームアライメントのための検出装置や波高分析条件が適切に整備されれば、BL6B で容易に MAD データ測定が可能となろう。