

偏光アンジュレータを用いた 生体分子の円二色性分光

産業技術総合研究所

田中 真人*

Circular dichroism (CD) in the vacuum ultraviolet region has been utilized as a strong tool for obtaining structural information on biomolecules such as proteins. The extension of the CD-measurable region to the shorter wavelength region has resulted in the significant increase in the information related to the structure of chiral molecules. A CD measurement system in the vacuum and extreme ultraviolet regions has been developed at the BL-5 beamline at TERAS, Japan, by using a polarizing undulator as a polarized light source. Using this CD system, the CD spectrum has been measured down to 40 nm for the first time.

Keywords: Circular dichroism, synchrotron radiation, vacuum ultraviolet, amino acid, chirality

1 はじめに

ライフサイエンス分野における重要なツールの一つとして、自然円二色性 (Circular Dichroism; CD) 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。CD はキラリ物質の光吸収での左右円偏光の差であり、透過型の偏光素子を用いて赤外から紫外域での CD 分光計が広く市販されている。また放射光を光源とした真空紫外域での CD 計測ビームラインも世界各地 (日本では HiSOR BL15 など) に開発され、特にタンパク質の構造解析手法として広く共同利用に付されている¹⁾。

しかしながらこのような従来手法では偏光素子の透過限界のために、放射光を用いても最短計測波長が 140 nm

程度に制限されている。これをさらに短波長の真空紫外から極紫外域 (波長 140 ~ 40 nm 程度) に拡張することは、CD による構造解析の大きな進歩を促す。例えばタンパク質二次構造解析では測定領域の短波長域への拡張によって、解析精度が向上することが知られている。これを真空紫外域のみならず極紫外域まで拡張することで、より高精度なタンパク質構造解析が可能になる。また糖・糖鎖などの σ 結合しか有しない物質は、その CD が真空紫外域以降にしか発現しない。そのため従来装置では殆ど CD 計測ができず、タンパク質のように構造と CD とを正確に関連付けられてはこなかった。極紫外域への拡張によって糖・糖鎖でもタンパク質のような構造解析が可能になると期待されている。

そこで筆者らは偏光素子でなく偏光アンジュレータを偏光光源とすることで最短波長 40 nm までの CD 計測を可能にする新規装置を開発してきた²⁻⁴⁾。これはアンジュレータのみで偏光を変調させることで CD を高感度検出する産総研独自の装置であり、これをライフサイエンス分野における最先端研究手段として提供することを目的としている。

キラリティに由来する CD はその強度が非常に微弱であり、その計測は困難を極めた。筆者らは多くの要素技術の開発から計測感度の向上を進めていき、近年ようやく世界初の極紫外域 (最短波長 40 nm まで) での CD 計測を達成した^{5,6)}。また従来では観測できなかった σ 結合部位の分子構造変化に伴う CD スペクトルの変化⁷⁾ や糖鎖の構成要素である糖の構造異性体の同定が可能であることなどを明らかにした。本稿では本装置の詳細や生体分子への応用例などの本研究の現状と将来展開に関する紹介を行う。

2 アンジュレータを用いた CD 計測システムの開発

偏光アンジュレータを光源とした真空紫外 ~ 極紫外領域に対応した CD 計測システムは産総研つくばセンターの電子蓄積リング TERAS の BL-5 において開発を進めてきた²⁻⁴⁾。その概要図を図 1 に示す。本ビームライン

Natural circular dichroism spectroscopy for biomolecules using polarizing undulator
Masahito TANAKA* (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))
〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央第 2,
TEL: 029-861-5199, FAX: 029-861-5657,
E-mail: masahito-tanaka@aist.go.jp

では全長 32 cm (周期長 8 cm × 4 周期) と非常に小型の直交磁場型 (小貫型) 偏光アンジュレータが挿入光源として利用できる⁸⁾。このアンジュレータは磁石列を機械的に駆動させることで、左右円偏光を通常 2Hz で変調発振することができる。

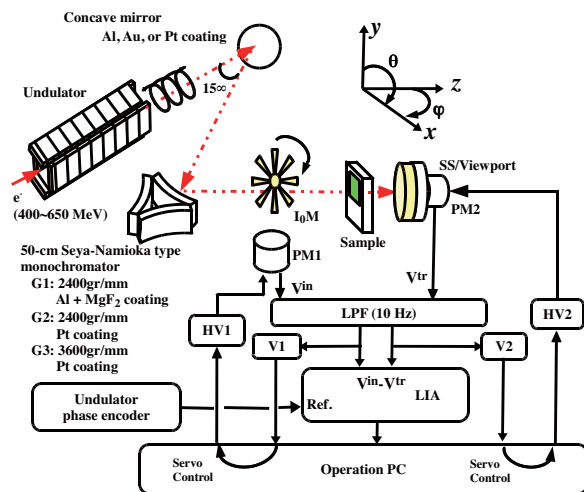


図 1 構築した真空紫外円二色性システムの概要図。I₀M: 入射光強度モニター, SS/Viewport: サリチル酸ナトリウムを噴霧した窓, PM1, PM2: 光電子増倍管, Vⁱⁿ, V^{tr}: 試料入射光および透過光強度, HV1, HV2: 高圧電源, LPF: ローパスフィルタ, V1, V2: 電圧計, LIA: ロックインアンプ。

CD 信号は一般的に微弱であるため、その計測には注意が必要である。例えば有機分子試料などでは試料を透過した左右円偏光強度の差が一般的に 1% 以下と非常に小さく、これを正確に計測する必要がある。またそれ以外にも、円偏光度の波長変化の計測、直線異方性の影響の排除などの解決すべき課題が山積している。それらを解決すべく様々な要素技術を開発し、現在波長 40 ~ 250 nm の領域において、最大感度 0.01% 程度の CD 計測が可能システムを構築してきた。以下にそれら要素技術の一部を簡単に説明する。

(1) 光源・光学系由来の偽の CD 信号の除去^{2,4)}

本システムでは光源部で円偏光を発生させているため、光源・光学系に起因する偽の CD 信号がどうしても計測されてしまう。まず光学系による偏光度の劣化を最小限にするために、前置鏡と瀬谷波岡型分光器のみという非常にシンプルなビームラインを整備した。さらに試料前後において光強度を計測し、ロックインアンプを用いてその差分信号のうちアンジュレータ変調周波数と同

じ周波数成分の信号強度のみを検出するシステムを構築した。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する手法 (サーボ法) を採用している。これによって光源・光学系由来の信号を大幅に除去することができた。

さらに偏光度を劣化させずに試料入射前の光強度を検出するために、真空中で回転 (約 15 Hz) する光チョッパー (図 1, I₀M) を開発した。このチョッパーには真空紫外光のシンチレータであるサリチル酸ナトリウムを噴霧してあり、その発光を光電子増倍管で検出している。この採用も光学系由来の信号の減少に有効であった。

偏光アンジュレータの変調周波数の安定性も計測感度に大きく影響する。そのためにアンジュレータ磁石列の駆動系としてスコッチ・ヨーク機構を用いたものを開発した⁶⁾。これにより安定化した変調信号をロックインアンプの参照信号として用いることで、光源由来の偽の CD 信号が大きく減少した。

これらの要素技術開発などから、当初 1% にも及ばなかった計測感度を現状 0.01% にまで改善できた。この感度レベルになってはじめて、キラリティ由来の CD スペクトルを有効に計測できるようになった。

(2) 真空紫外 ~ 極紫外領域に対応した偏光度計測手法の開発^{9,10)}

当然ながら CD 強度は円偏光度に比例するため、円偏光度の決定は正確な CD スペクトル測定に必須である。特に本システムではアンジュレータからの円偏光度の波長分布とその光学系による変化が起きるために、様々な実験条件 (放射光リングの電子エネルギー (E), アンジュレータギャップ, グレーティング種類, 前置鏡のコート材質) での円偏光度の波長変化を知る必要がある。

そこで反射型の偏光解析装置⁹⁾とそれによる CD キャリブレーション方法¹⁰⁾を開発し、これを用いた各実験条件による CD 校正係数を実験的に決定した (図 2)⁵⁾。ここで CD 校正係数は円偏光度とほぼ一致する。

この値を用いて計測した CD スペクトルをキャリブレーションすることで、未だ計測例の無い波長領域においても CD スペクトルを正確に測定することができる。図 2 では短波長域で円偏光度の減少が見られている。この減少は主に分光器の影響であり、例えば直入射型の分光器の採用によって改善できると考えられる。

(3) 直線異方性の影響を排除した CD 計測手法³⁾

溶液試料は溶媒の強い吸収により短波長域での CD 計測は困難であるため、薄膜などの固体試料形態が極紫外 ~ 真空紫外域の CD 計測には有効である。しかしながら固体試料に直線異方性が存在する場合 (結晶など配向している場合), 計測した CD スペクトルは直線異方性に

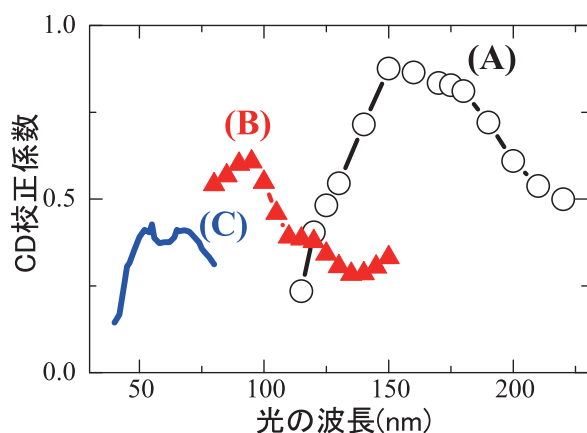


図2 様々な実験条件での CD 校正係数．ここで実験条件は，(A) $E = 400$ MeV, Al mirror, (B) $E = 500$ MeV, Au mirror, (C) $E = 650$ MeV, Pt mirror, 回折格子は (A) は grating G1, それ以外は grating G3, アンジュレータギャップは全て 60 mm である．

由来する偽の CD 信号を含むことが知られている．

そこで光学系の Mueller 行列演算から，本システムで計測される CD 信号成分における直線異方性の寄与を検討した．その結果，試料を面内（図 1, θ 方向），面外（ φ 方向）に回転させて CD を計測することで，直線異方性の寄与を排除する手法を開発した³⁾．さらに光強度検出にサリチル酸ナトリウムを用いることで，光電子増倍管のみの場合に問題となる検出器の直線異方性による CD スペクトルの歪みを無くすことが出来た．

またロックインアンプにおいて参照周波数の 2 倍の信号成分を検出することで，直線偏光に対する二色性（線二色性）も計測できることが知られている．本システムは二台のロックインアンプを用いた CD と線二色性の同時計測が可能であり，試料の配向性も評価できる．

3 生体分子の真空紫外領域での CD 計測例

上述の CD 計測システムを活用して，アミノ酸などの基本的な生体分子の CD 計測を進めてきた．図 3 に世界で初めて極紫外領域にまで拡張して CD スペクトルを計測した結果を示す^{5,6)}．試料として最も単純なアミノ酸であるアラニンの薄膜（膜厚 20 ~ 30 nm）を用い，L-アラニンと D-アラニンの CD スペクトルの差分を図に示した．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．図 3 では，波長 120 nm

付近に負，70 nm 付近に正の CD ピークが見られている．これらの帰属はまだ正確には為されていないが，様々な σ 結合に由来するものと考えられる⁵⁾．また図 3 で黒線で示した市販 CD 計での結果と本システムでの結果（赤線）は非常に良い一致を示しており，偏光度計測手法を含めた本システムの正確性を証明している．

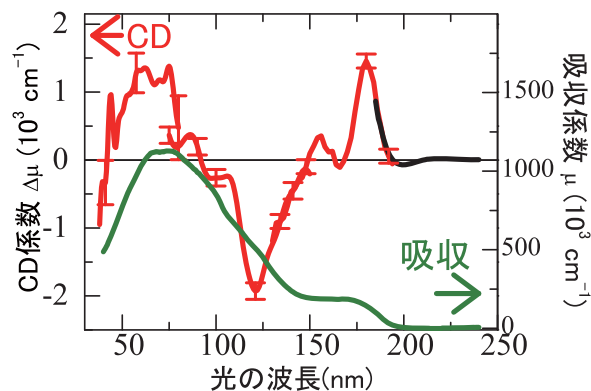


図3 世界初の極紫外領域にまで拡張した CD スペクトルの結果^{5,6)}（試料：L-アラニン薄膜），黒線：市販の CD 計での測定結果，赤線：TERAS での測定結果，緑線：吸収スペクトル¹¹⁾

またアラニン以外にも真空紫外域において様々なアミノ酸や糖試料の計測を行っている．その一例として側鎖にアルキル基のみをもつ脂肪族アミノ酸薄膜の CD スペクトルの変化を示す（図 4）⁷⁾．図 4 でアラニン，ノルロイシンなど赤線で示したアミノ酸はその側鎖のアルキル基が直鎖状であり，青線で示したロイシン，イソロイシンは分岐鎖状である．このアルキル基の形状によって，真空紫外域での CD スペクトルは明確な変化を示す．例えば分岐鎖アミノ酸では波長 170 nm 付近に負の CD ピークが見られるが，直鎖アミノ酸では見られていない．理論計算などからこの領域では側鎖由来の電子遷移が寄与してくることが判っている．これらの側鎖は σ 結合しか有しておらず，この結果は従来 π 電子励起しか観測してこなかった CD 計測において， σ 電子の寄与を系統的に明らかにした点において重要なものである．

吸収スペクトルではこれらのアミノ酸間での違いは殆ど観測されていない．しかしながら CD スペクトルはこれらの分子構造の違いを明確に反映しているために，分子構造変化を観測する手法として非常に有用であることが分かる．高度な分子軌道計算などから，これらピークの帰属が為されることで極紫外～真空紫外域 CD のより詳細な理解が深まる．それにより CD と分子構造を対応

付けていくことで、CD による分子構造解析手法の実用化を進めていく予定である。

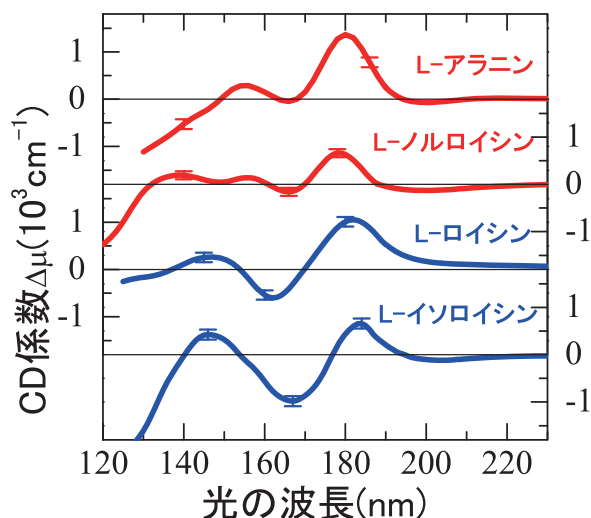


図4 様々な脂肪酸アミノ酸薄膜(L体)の真空紫外 CD スペクトルの変化⁷⁾

4 まとめと将来展開

偏光アンジュレータを用いることで従来の CD 装置では到達不可能であった極紫外域においても CD スペクトルを計測するシステムを開発し、実際に世界初の波長 40 nm にまで拡張した生体分子の CD スペクトルを計測することに成功した。今回紹介した CD 結果はアミノ酸に限定したが、現在糖試料や結晶化困難なタンパク質試料などの重要性の高い試料への応用をバイオ研究者らと共同で進めている。

また分子軌道法による真空紫外 CD の理論予測も行っている。CD の理論予測結果から分子構造による CD スペクトルの正確な再現ができれば、CD による非経験的な構造解析が可能になる。この計算と実験を基にした非経験的な構造解析により糖鎖をはじめとする様々な物質の分子構造・立体構造を明らかにできると期待される。

現在アンジュレータが必須な波長領域ではアンジュレータのみ、それ以外の透過型の偏光素子が利用できる波長領域では透過型の偏光素子を選択できる CD 計測システムに改良している。これにより計測感度の向上や実験時間の短縮などが可能になり、より多くの試料の計測が可能になる。今後このシステムを活用して、さらに多くの CD 実験データを蓄積させるとともに、理論予測精度の向上も促していくことが肝要である。

今後の更なる展開として特に試料周りの高機能化を

進めていく予定である。例えば医薬品開発での真空紫外 CD による薬品のスクリーニングを可能にするための迅速な計測・試料交換機構、動的な分子構造変化を追跡できる時分割システム、液体クロマトグラフィーとの連結システム、糖鎖などの希少な生体分子試料の計測に十分な感度の CD システムなどがニーズとして挙がっており、これらの開発などからより高性能な分子構造解析ツールとして確立させていく。さらに今まで培ってきた計測技術を基にした放射光を用いない小型真空紫外 CD 装置の開発とその普及などを目指している。

5 謝辞

本研究は産総研 渡辺一寿博士、山田亨博士、神戸大学 中川和道教授らとの共同で進められてきました。また TERAS の運転に関して産総研電子加速器関係者の方々の御助力に深謝します。本研究の多くは文科省原子力試験研究費、科研費などの支援を受けて行われました。

参考文献

- 1) “Modern technique for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy”, eds. B. A. Wallace, R. W. Janes, IOS Press, Netherlands (2009).
- 2) T. Yamada, K. Yagi-Watanabe, M. Tanaka, F. Kaneko, T. Kitada, Y. Ohta, K. Nakagawa, Rev. Sci. Instrum. 76, 093103 (2005).
- 3) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, T. Yamada, F. Kaneko, K. Nakagawa, Chirality 18, 196 (2006).
- 4) K. Yagi-Watanabe, M. Tanaka, F. Kaneko, K. Nakagawa, Rev. Sci. Instrum. 78, 123106 (2007).
- 5) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, F. Kaneko, K. Nakagawa, J. Synchrotron Radiat. 16, 455 (2009).
- 6) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, F. Kaneko, K. Nakagawa, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 181, 177 (2010).
- 7) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, F. Kaneko, K. Nakagawa, J. Phys. Chem. A 114, 11928 (2010).
- 8) H. Onuki, Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. A 246, 94 (1986).
- 9) K. Yagi-Watanabe, M. Tanaka, T. Yamada, F. Kaneko, K. Nakagawa, M. Yuri, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A 553, 620 (2005).
- 10) M. Tanaka, K. Yagi-Watanabe, F. Kaneko, K. Nakagawa, Rev. Sci. Instrum. 79, 083102 (2008).
- 11) M. Kamohara, Y. Izumi, M. Tanaka, K. Okamoto, M.

Tanaka, F. Kaneko, Y. Kodama, T. Koketsu, K. Nakagawa, *Rad. Phys. Chem.* 77, 1153 (2008).