

# タンパク質溶液小角X線散乱

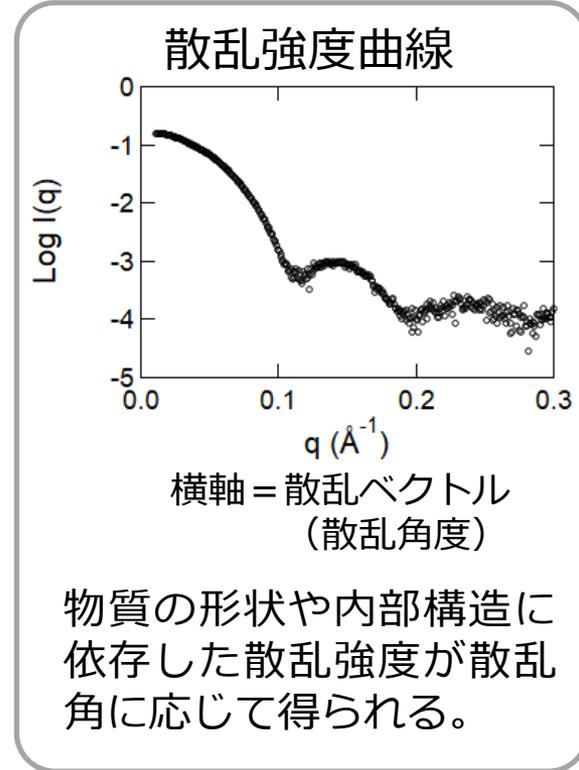
清水 伸隆

理化学研究所・放射光科学研究センター・  
生物系ビームライン基盤グループ

# タンパク質溶液試料の小角散乱

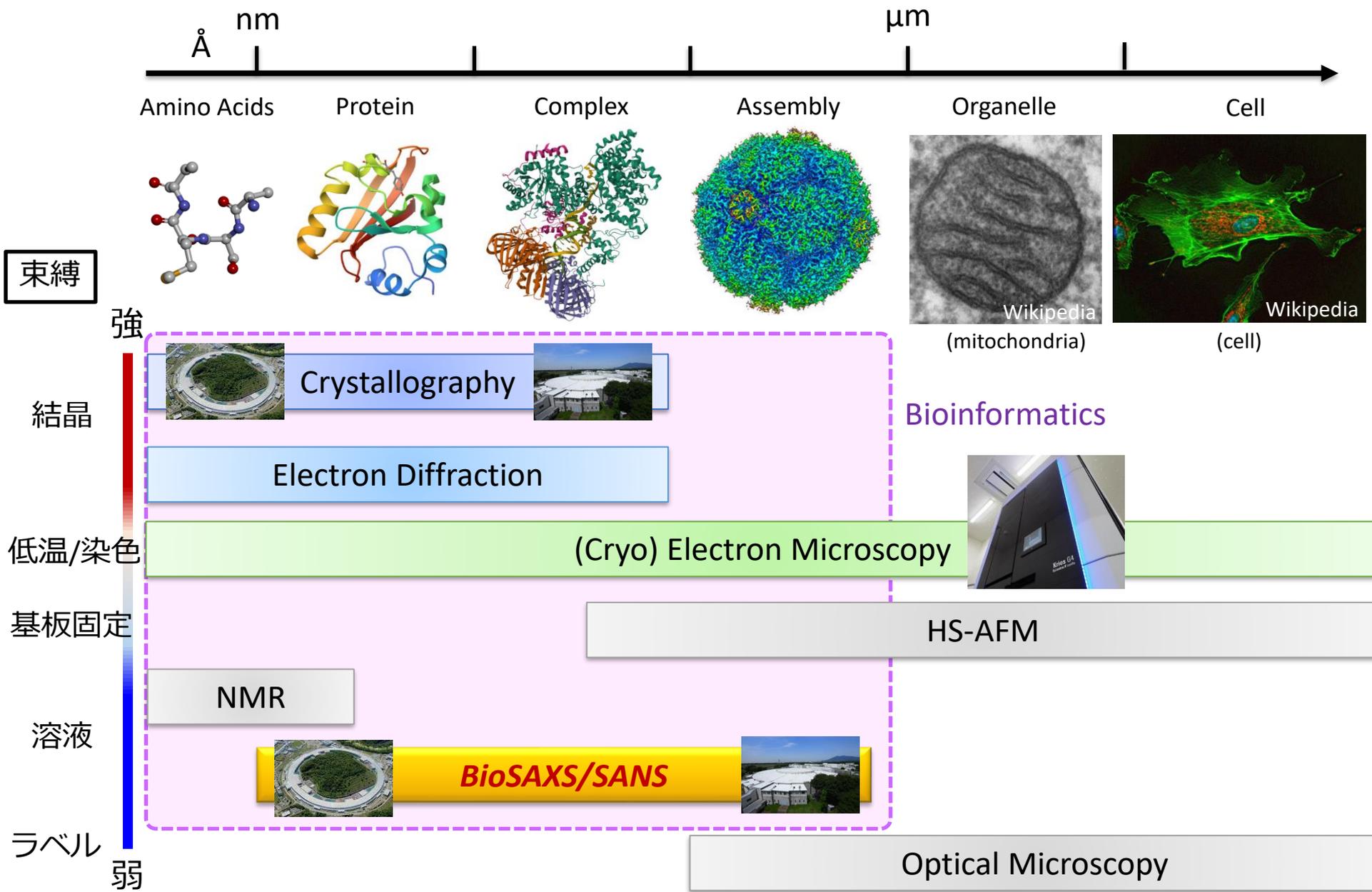
## ●小角散乱 (SAS=Small-Angle Scattering)

- X線や中性子を試料物質に照射して得られた散乱強度 (散乱強度曲線) を計測し、物質内部の構造解析を行う手法。
- X線 = SAXS、中性子 = SANS
- 試料対象は主に非結晶状態にあるもの。生体高分子を含むソフトマテリアルからハードマテリアルまで多岐にわたる。
- 散乱角 $2\theta$  :  $0.01 \sim 30^\circ \Leftrightarrow$  空間分解能 :  $3 \sim 3,000 \text{ \AA}$



「小角散乱」のうち、溶液試料を対象とする場合は「溶液散乱」ともいいますが、近年、**タンパク質などの溶液試料を対象としたSAXSを、特に、BioSAXS (Biological SAXS) と呼びます。**

# 構造解析法と空間スケール



# 相関構造解析 (Integrative Structural Biology) : 4

タンパク質の物理化学的解析・立体構造解析・分子間相互作用解析からの情報の統合

## • 物理化学的解析

- (Navie, HDX)MS
- 活性測定
- 分光学的解析 (紫外・可視、赤外、蛍光、ラマン、etc...)
- DSC
- 超遠心分析
- 円二色性 (CD)
- SPR, ITC, FRET
- DLS
- SEC-MALS/RI
- :

## • 立体構造解析

- 結晶構造解析
- CryoEM単粒子
- NMR

## • イメージング

- 高速AFM
- 超解像顕微鏡
- SEM/TEM

## • BioSAS

## • 構造予測

- Alphafold3

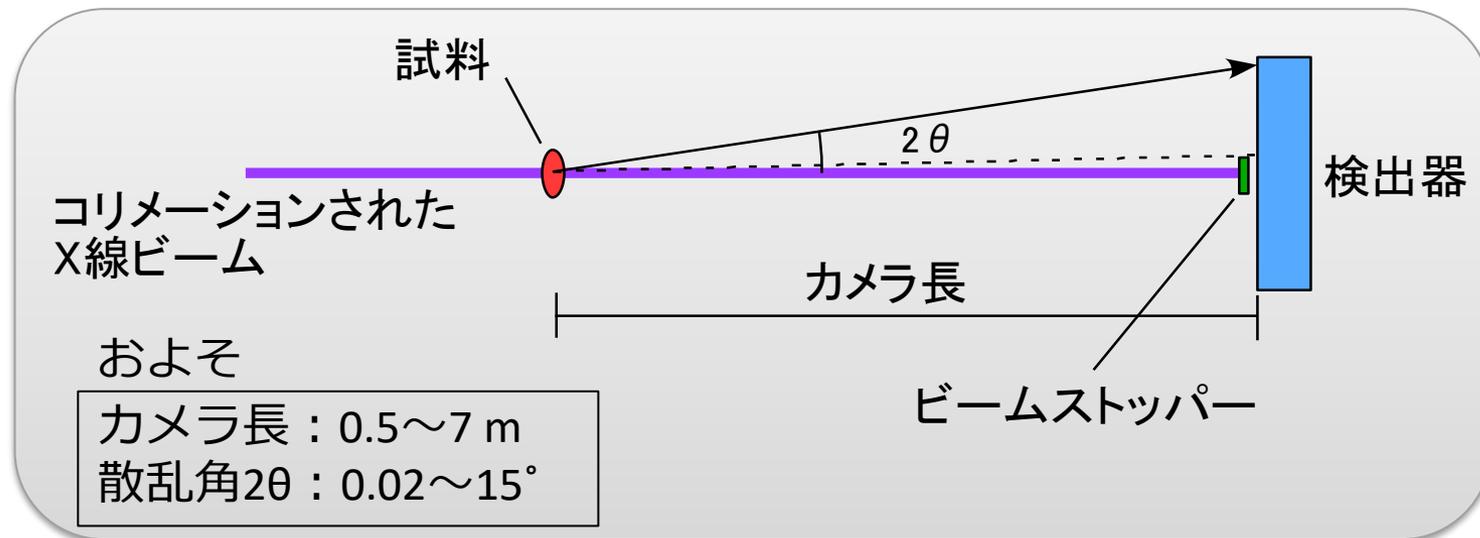
## • 情報科学的解析

- MD (分子動力学計算)
- NMA (基準振動解析)

BioSASは溶液試料の測定解析を行うため、溶液中の解析で得られた物性・機能の情報を構造・ダイナミクスに繋ぐ役割を担っている。

# SAXS測定の基本概念

5



散乱ベクトル :  $q = 4\pi \sin\theta / \lambda$  ( $\text{\AA}^{-1}$ )  
ブラッグの条件 :  $2d \sin\theta = \lambda$

(小角) 分解能 :  $d = 2\pi / q$  ( $\text{\AA}$ )

数 $\text{\AA}$ ~3000 $\text{\AA}$ の空間スケール  
(0.数nm~300nm)

- 「小角分解能を上げる」 = 「より大きな空間スケールを計測する」ためには、 $q$ を小さくすれば良い。すなわち、**散乱角 $2\theta$ を小さくするか、波長を長くすれば良い。**
  - $2\theta$ を小さくするためには、カメラ長を伸ばす and/or ビームストッパーのサイズが小さくすれば良いが、x線ビームの性能に依存する。
  - 波長変更できる光源の利用。

- **カメラ長（試料と検出器との距離）を長く取れる配置で真空中にできる装置**

- 遠くなれば遠くなるほど、より小さな角度領域を計測でき、また角度分解能にも優れる。
- 真空パスで散乱強度の減衰を防ぐ。

- 強集光した高発散ビームでは無く、**高平行（コリメート）で低発散のX線ビーム**

- 基本的に検出器面に集光されている
- ダイレクトビームストッパーは検出器直前に設置。

- **波長可変の光源**

- **高い性能を持つ2次元イメージ検出器**

- 大面積、広いダイナミックレンジ、低ノイズ、データの直線性に優れる、そして高速読出し可能な検出器

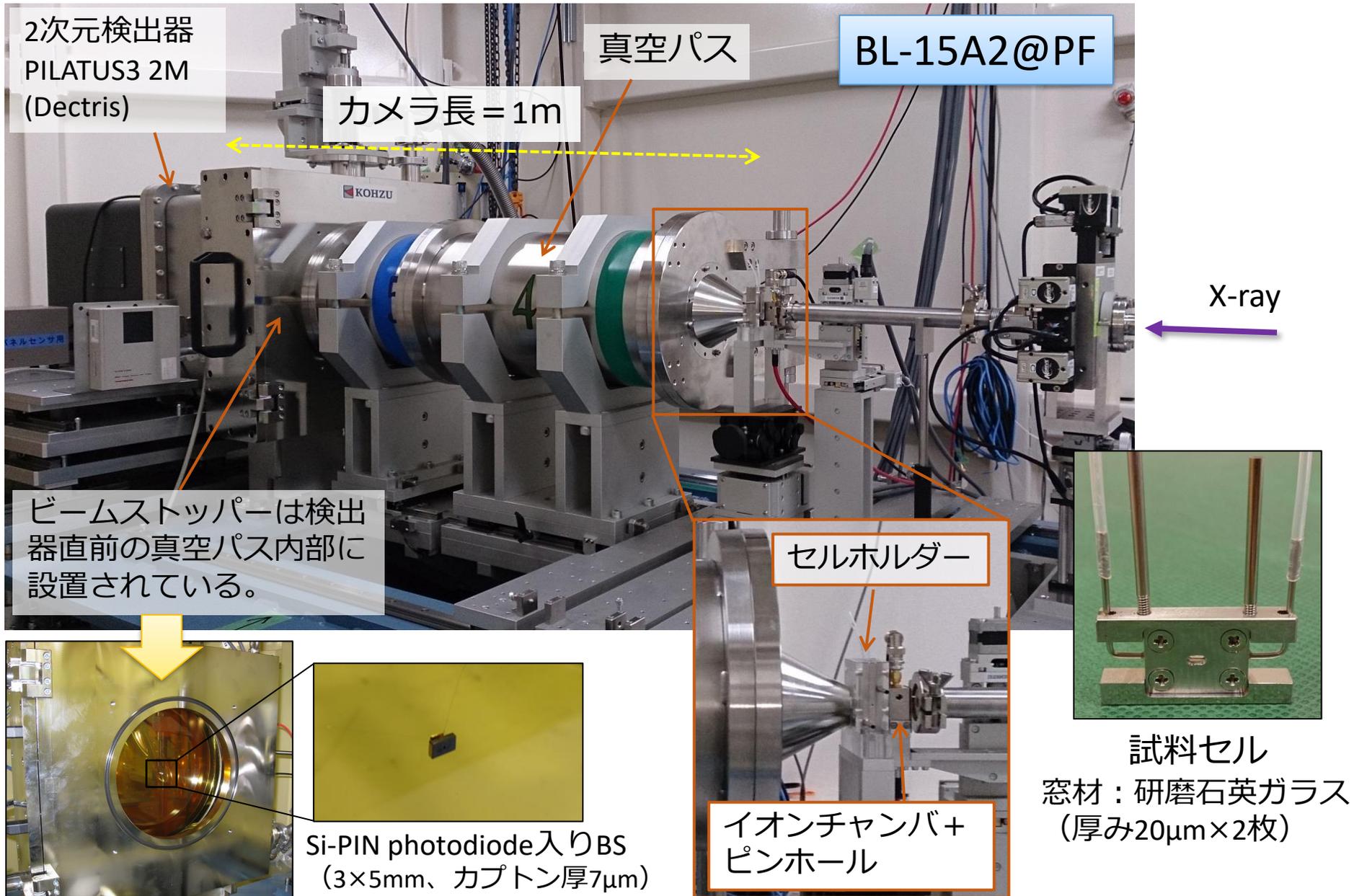
- **多様な試料環境を構築**

- 小角散乱法の特徴とも言える「ありのままの計測」を可能とする。

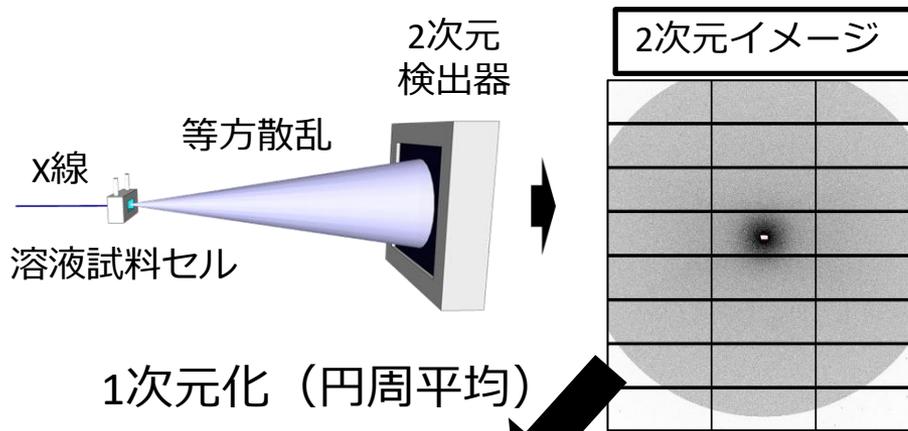


放射光

# 小角散乱ビームライン ~溶液散乱~

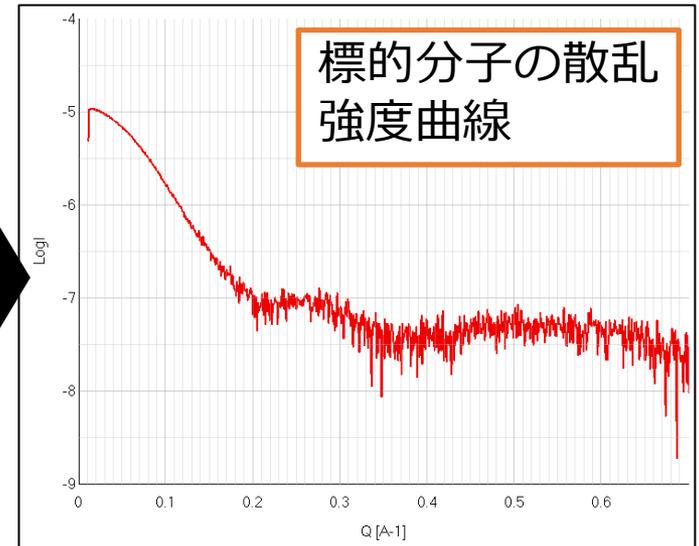
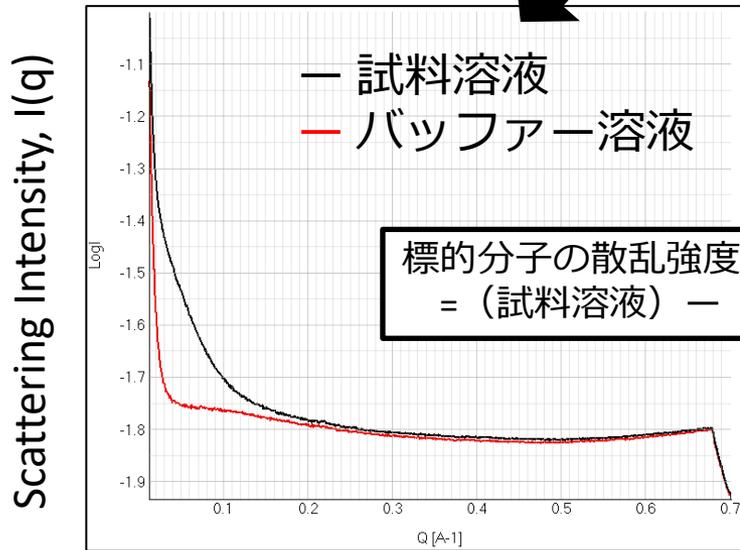


# BioSAXS実験概要



溶液中の分子は自由に回転しているため、回転平均された散乱強度が等方的に観測される

1次元化 (円周平均)



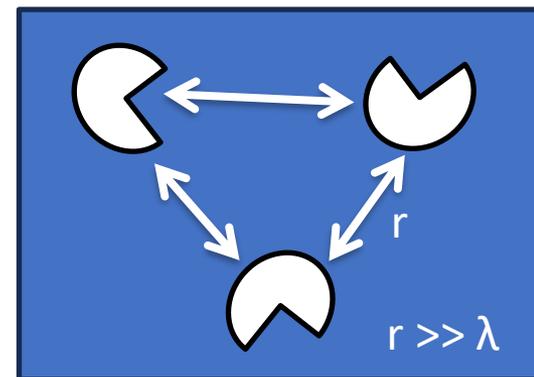
Scattering vector,  $q (=4\pi\sin\theta/\lambda, \text{Å}^{-1})$

(X線が照射された範囲での) 溶液中における分子の平均情報が得られる。

標的分子が溶液中で単分散 (均一孤立系) であることが基本。

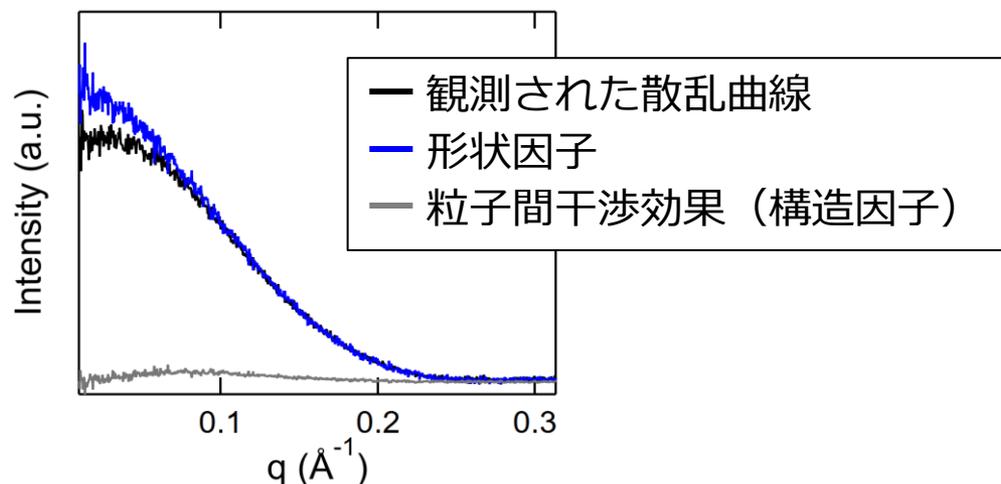
# 形状因子と構造因子(粒子間干渉効果)

- 形状因子：散乱粒子の形状（や形態）に依存する因子
  - 散乱粒子が全て同一形状・サイズ（すなわち単分散）であり、かつ粒子が互いに離れている（希薄な溶液）場合、観測された散乱曲線は一つの散乱粒子の形状因子を表わしている。
  - 一方で、散乱粒子の形状・サイズが異なる場合（多分散）、散乱曲線は全分子の平均の形状因子を表わしている。



希薄溶液

- 構造因子：粒子間干渉効果（濃度の効果）
  - 散乱粒子が密集し（濃度の増大）、粒子間距離と粒子内の距離が同じオーダーになると、観測された散乱曲線には近隣の粒子からの寄与（粒子間干渉効果）も含まれている。
  - そのような場合、散乱曲線は形状因子と構造因子の積で表わされる。

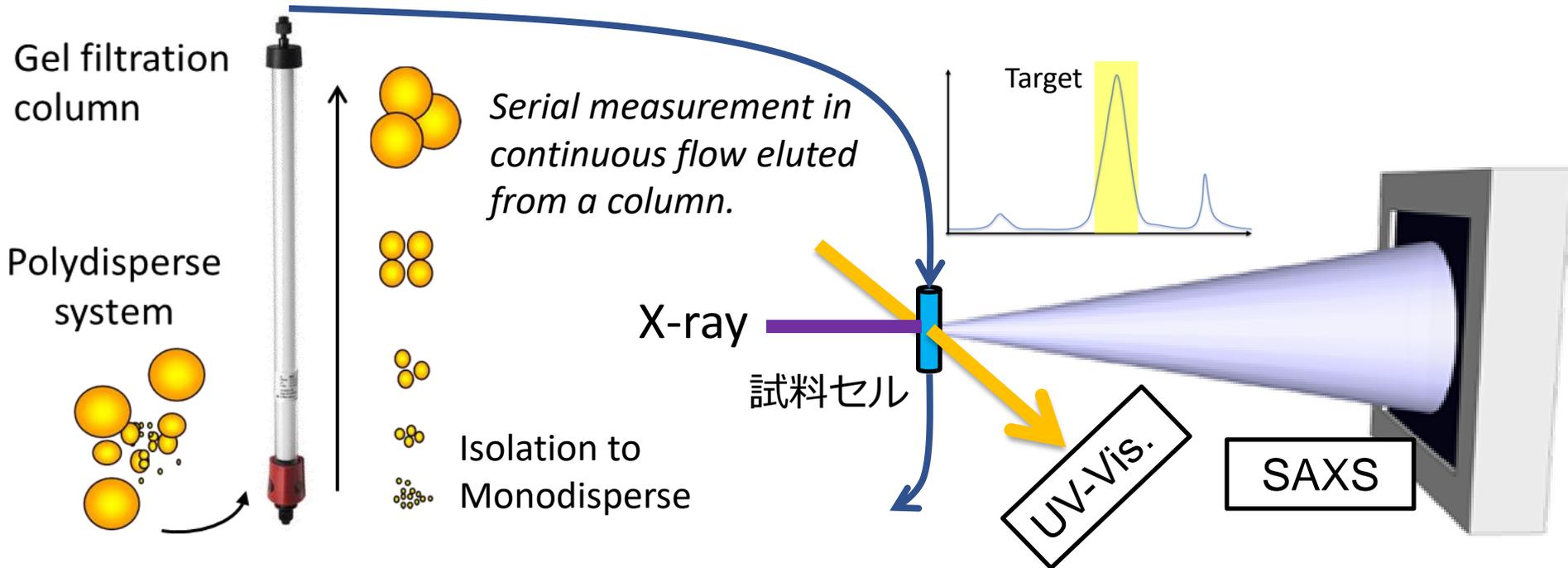


- 粒子間干渉効果は低角（低  $q$ ）領域で観測される。
- 左図の様に強度が下降する場合は、粒子間に反発的な相互作用が働いている。
- 逆に強度が上昇する場合は、凝集に似た引力的な相互作用が働いている。

# BioSAXSにおける最新の標準測定法：SEC-SAXS 10

- 不安定なタンパク質複合体や天然変性領域等の自由度の高い構造を持つタンパク質では、しばしば試料が多分散のため解析が困難に。

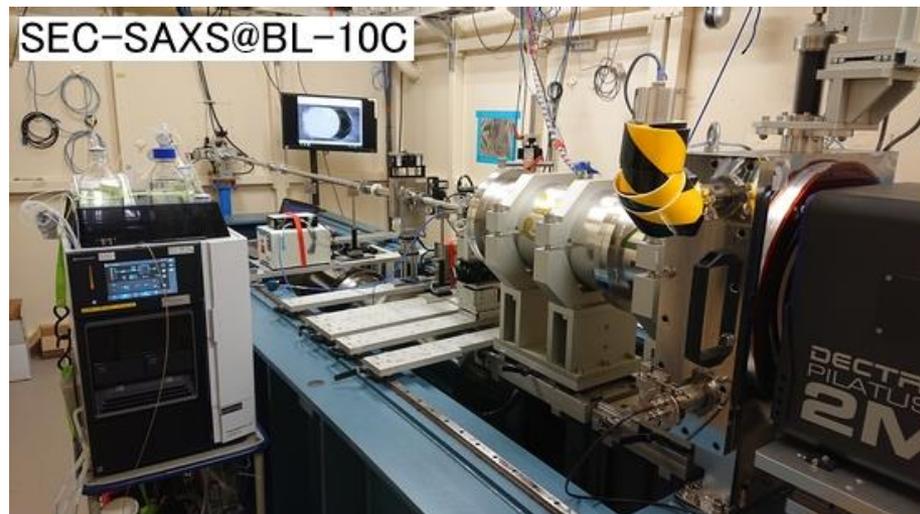
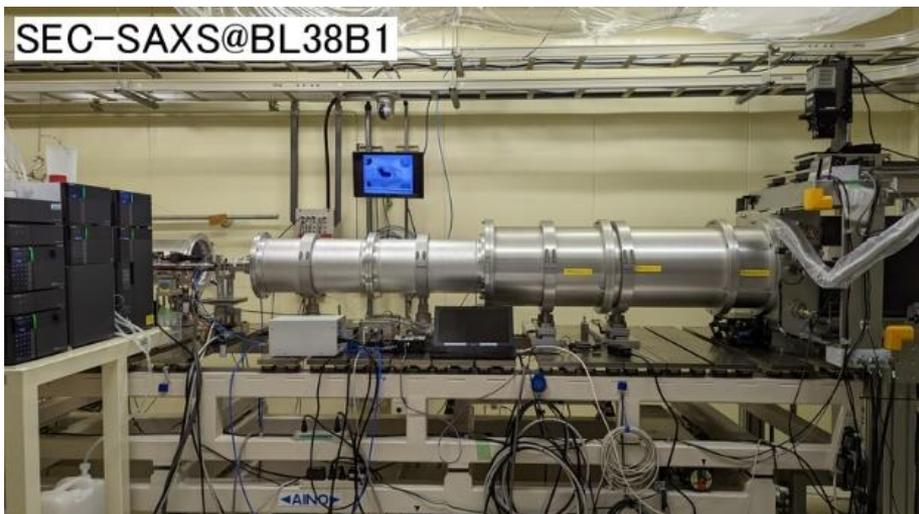
## Size-Exclusion Chromatography + SAXS/紫外可視分光 同時測定システム



標的分子を単離しながら計測 = 単分散度の改善

↓  
標的分子由来の情報精度の向上 = 解析成功率の向上

※放射線損傷対策  
としても効果的！



## 相補解析

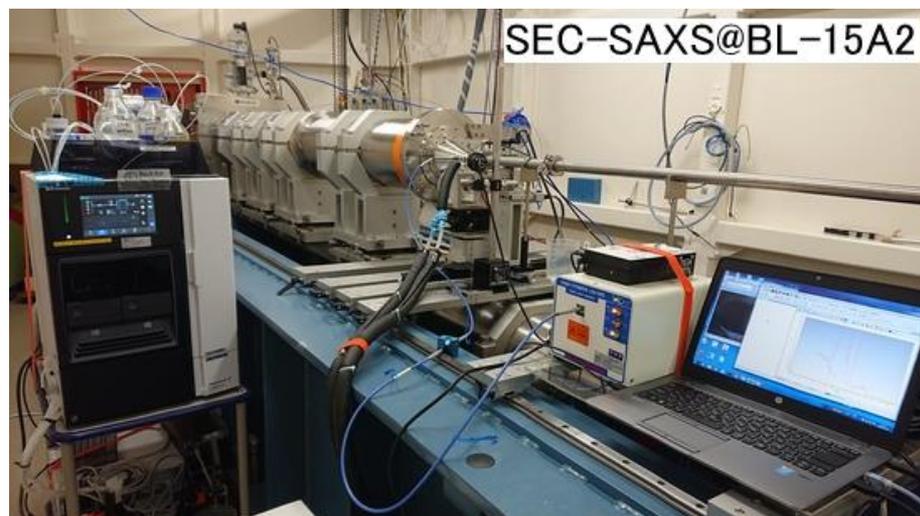
## SEC-MALS/RIシステム

絶対分子量を解析できるため、SAXSで標的とする散乱体の分子量を別の手法でも評価する。



@SPring-8 D34室  
1260 Infinity (Agilent)  
DAWN 8+ (Wyatt)  
Optilab T-rEX (Waters)

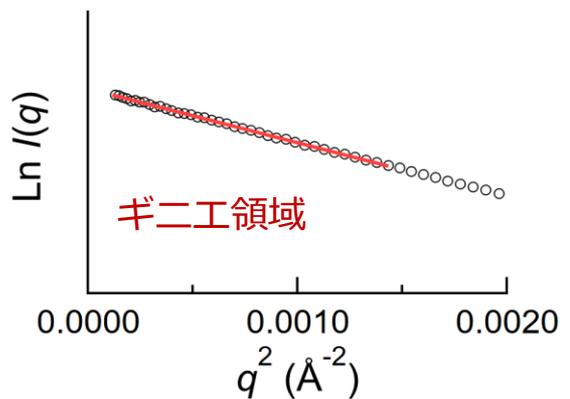
@PF 生理試料準備室  
Alliance HPLC (Waters)  
DAWN (Wyatt)  
Optilab (Waters)



● 溶液中の標的分子の性状・構造状態の理解

① サイズと分子量：  
慣性半径： $R_g$ 、原点(前方)  
散乱強度： $I(0)$

⇒ Guinier Analysis (Plot)



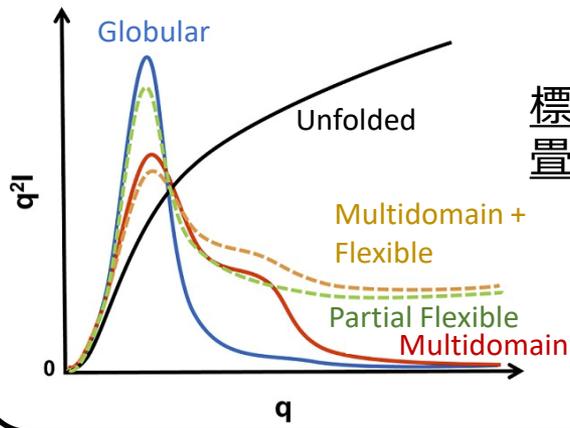
$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{R_g^2}{3} q^2$$

$$(q \times R_g < 1.3)$$

※溶液条件に依存した変化も容易に解析可能。

② 折り畳み状態の評価

⇒ Kratky Plot



標的分子のコンパクトさ・折り畳み度合いの定性的評価

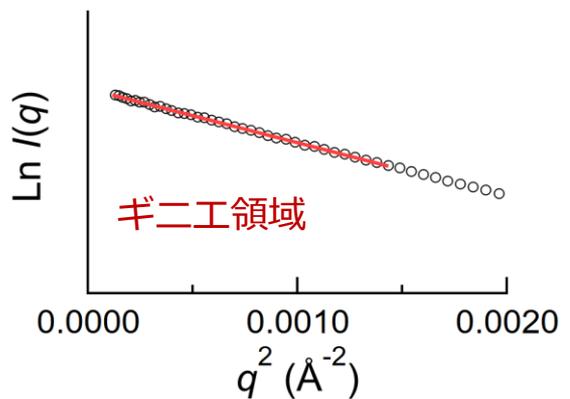
※リガンド等の相互作用分子の添加前後の変化を解析可能

<https://www-ssrl.slac.stanford.edu/~saxs/analysis/assessment.htm>

● 溶液中の標的分子の性状・構造状態の理解

① サイズと分子量：  
 慣性半径： $R_g$ 、原点(前方)  
 散乱強度： $I(0)$

⇒ Guinier Analysis (Plot)

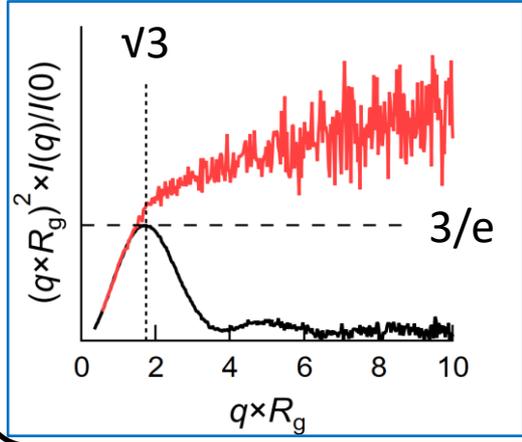


$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{R_g^2}{3} q^2$$

$(q \times R_g < 1.3)$

※溶液条件に依存した変化も容易に解析可能。

② 折り畳み状態の評価



⇒ Dimensionless or Normalized Kratky Plot

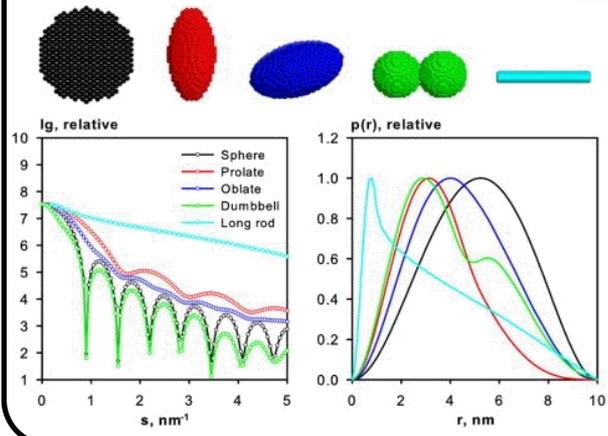
標的分子のコンパクトさ・折り畳み度合いの定性的評価

※リガンド等の相互作用分子の添加前後の変化を解析可能

<https://www-ssrl.slac.stanford.edu/~saxs/analysis/assessment.htm>

③ 形状とサイズの評価

⇒ 距離分布関数  $P(r)$



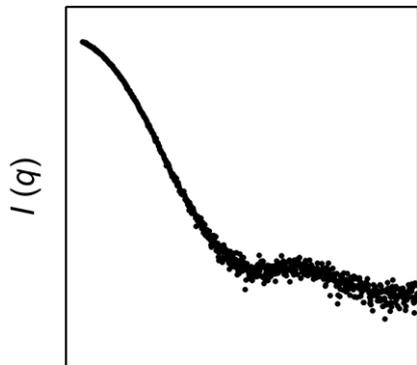
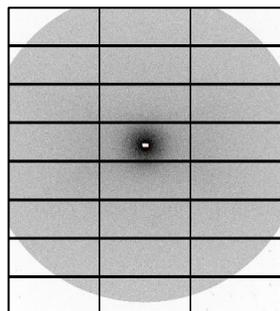
分子の形状、最大長  $D_{max}$  を推定

$R_g$  と  $I(0)$  :  $P(r)$  と Guinier 解析の間で Cross Validation

➡ Go to *Ab initio* modeling

Mertens et al. (2010) *J. Struct. Biol.* **172**, 128-141.

散乱強度 :  $I(q)$



$$q (=4\pi \sin\theta/\lambda)$$

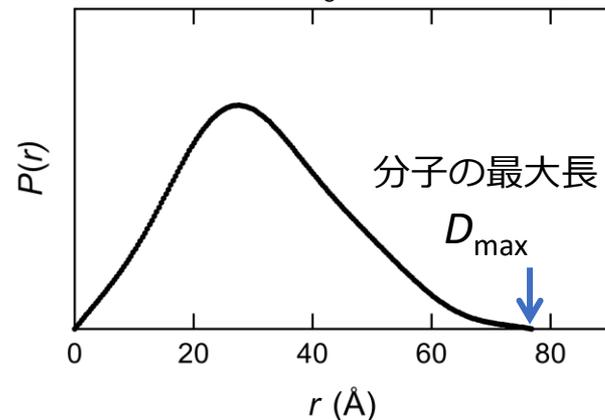
Indirect Fourier Transform (IFT)

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr$$



距離分布関数 :

$$P(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq$$



【位相問題】

$$I(q) = A(q) \cdot A^*(q) = |A(q)|^2$$

DENSS ?



散乱振幅 :

$$A(q) = \int_V \Delta\rho(r) e^{iqr} dV$$

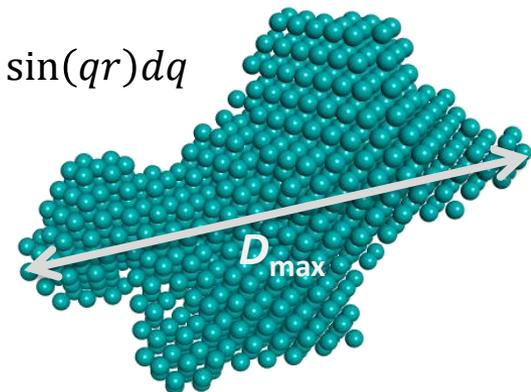


電子密度 :

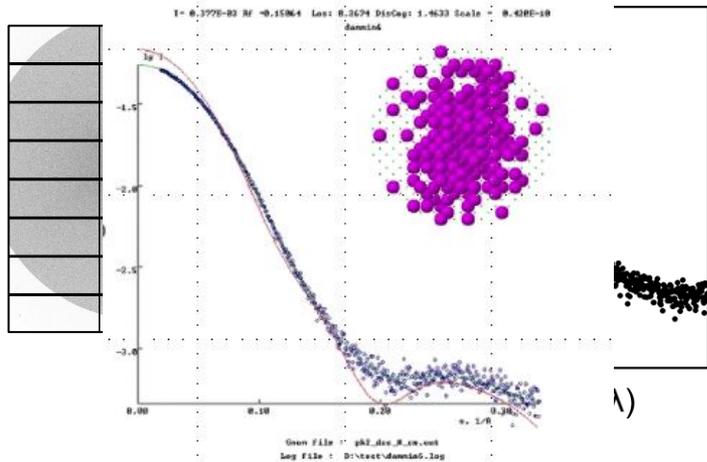
$$\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho$$

$$= \frac{1}{2\pi r} \int_0^\infty q A(q) \sin(qr) dq$$

分子形状

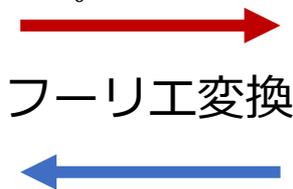


散乱強度 :  $I(q)$



Indirect Fourier Transform (IFT)

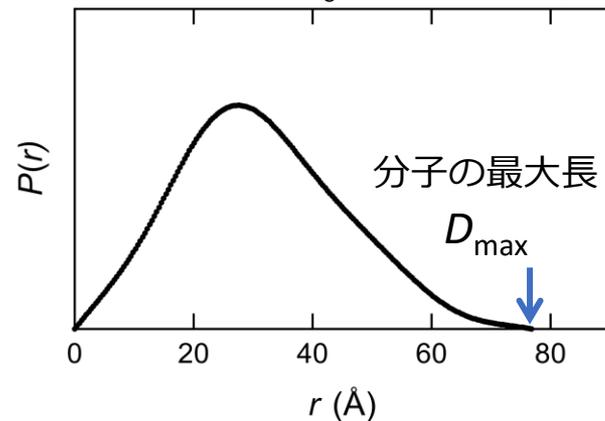
$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr$$



フーリエ変換

距離分布関数 :

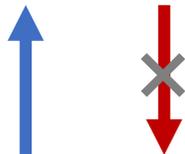
$$P(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq$$



【位相問題】

$$I(q) = A(q) \cdot A^*(q) = |A(q)|^2$$

DENSS ?



散乱振幅 :

$$A(q) = \int_V \Delta\rho(r) e^{iqr} dV$$



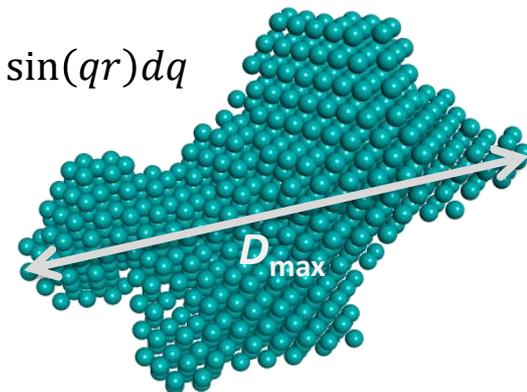
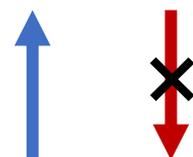
フーリエ変換

電子密度 :

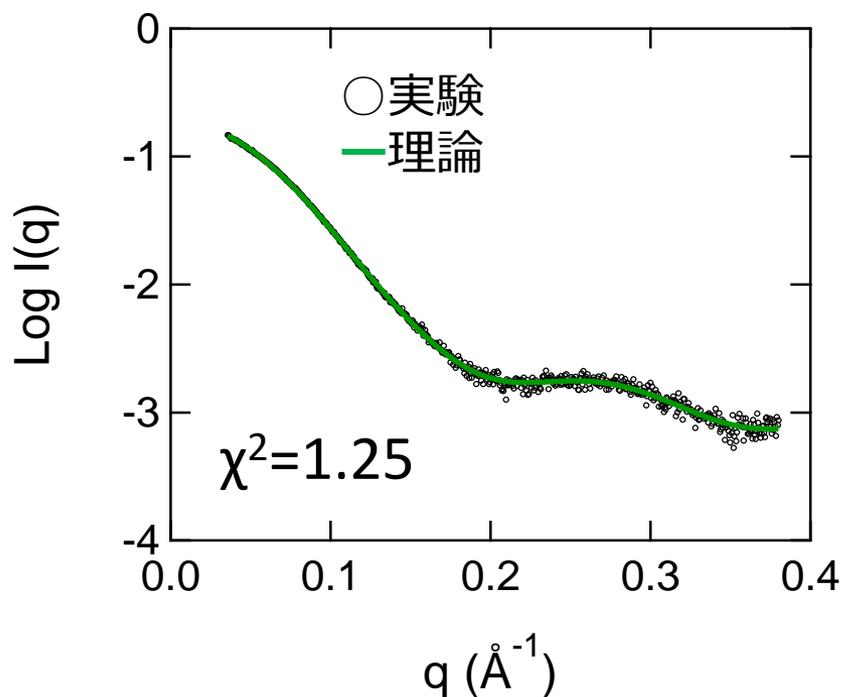
$$\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho$$

$$= \frac{1}{2\pi r} \int_0^\infty q A(q) \sin(qr) dq$$

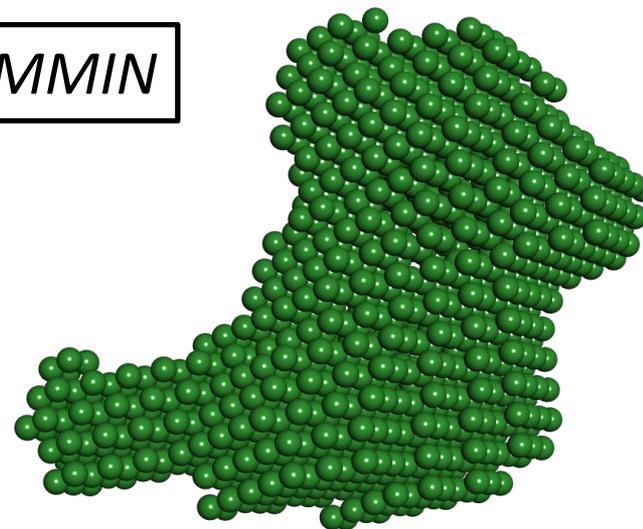
分子形状



タンパク質の外形形状を、ビーズモデル (Dummy Atomモデル) で構築する。



DAMMIN



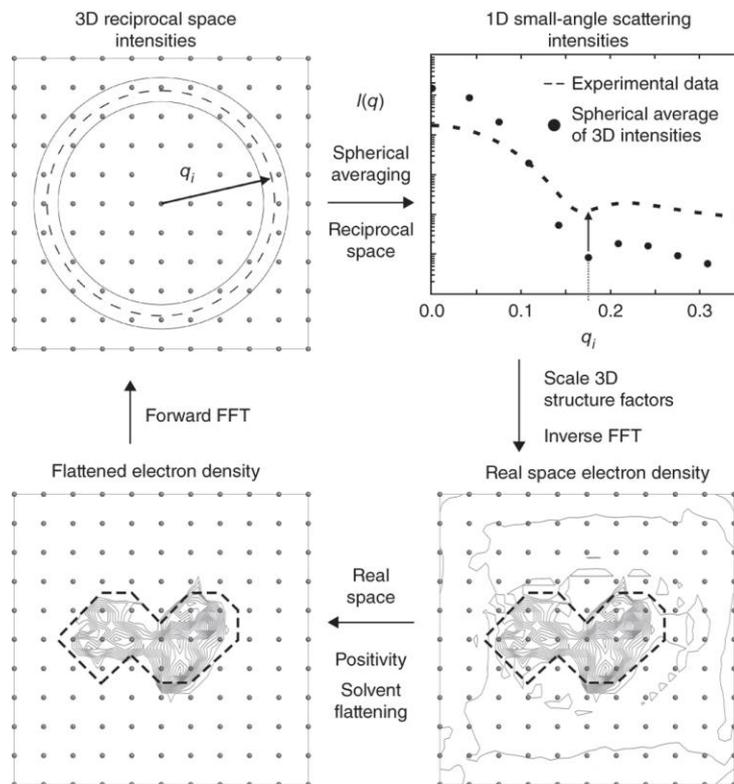
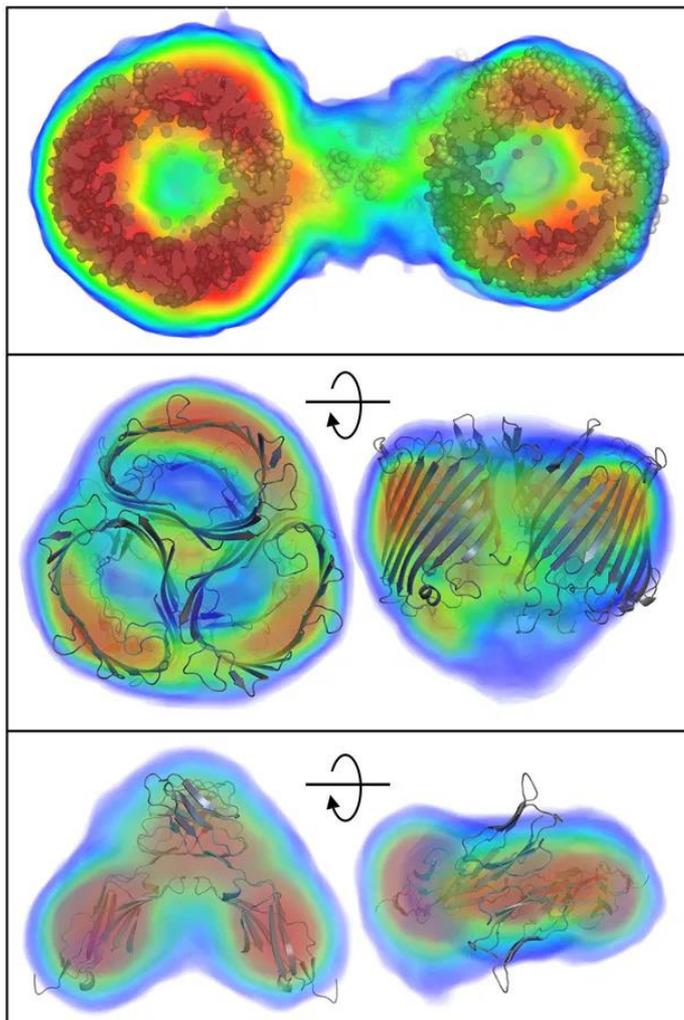
球のサイズと数は分子の最大長に合わせて自動調整される。基本的に球は空間を占有するために使われているので、分解能とは無関係。

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[ \frac{I_{exp}(q_j) - cI_{calc}(q_j)}{\sigma(q_j)} \right]^2$$

散乱曲線から直接的に概形を計算するのではなく、**実験曲線と一致度の高い理論散乱曲線を示す構造を導出**する。一致度は $\chi^2$ 値によって評価される。

# 1D-BioSAXSデータから3D電子密度を計算するソフトウェア *DENSS* (DENsity from Solution Scattering)

Grant, T. D. *Nat. Methods* **15**, 191-193 (2018).



(CXDI, etc...)  
Iterative phase  
retrieval

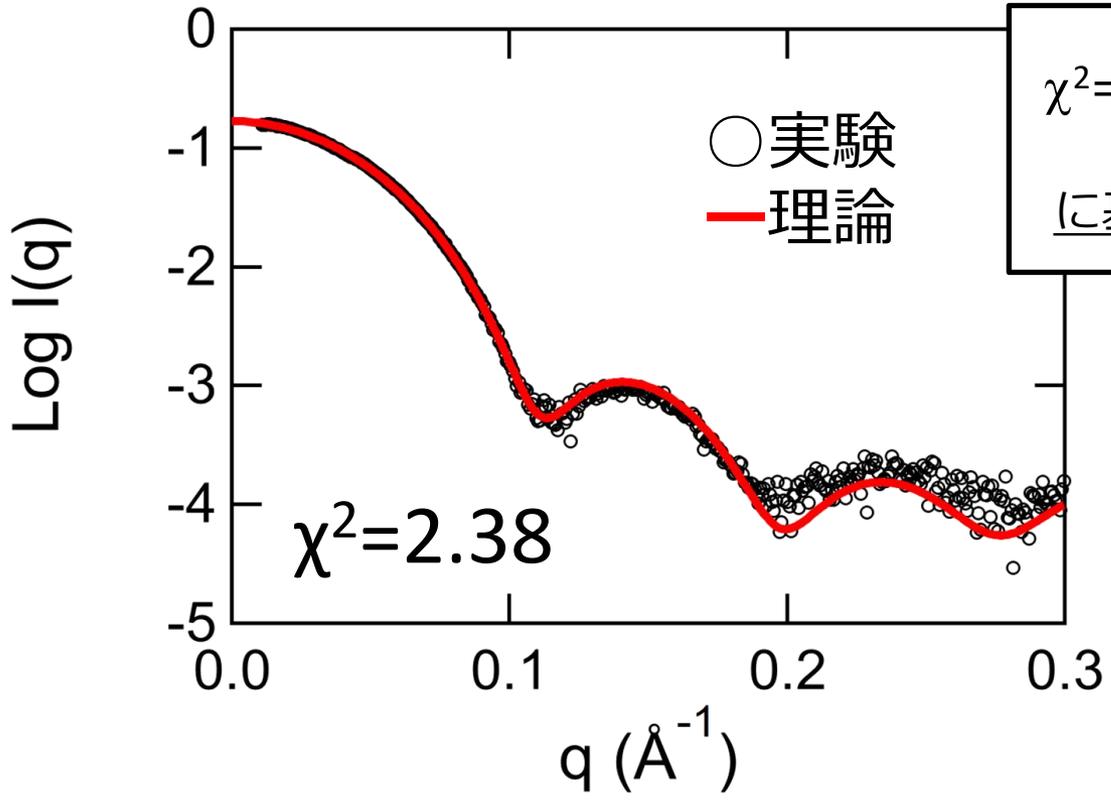


(BioSAXS)  
Iterative  
structure factor  
retrieval

コヒーレント回折イメージング、天文学、トモグラフィなど分野では、反復位相回復アルゴリズムによって、3D強度情報（振幅）のみを使用して実空間像（電子密度）を再構成するが、**DENSS**では、**反復構造因子検索アルゴリズム**によって、SAXS強度データ、つまり1D平均強度のみから3D電子密度マップを再構成する。

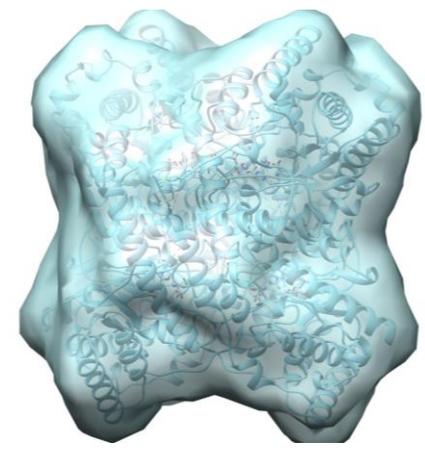
PDB座標から理論散乱強度を計算

CRY SOL / FoXS, etc...



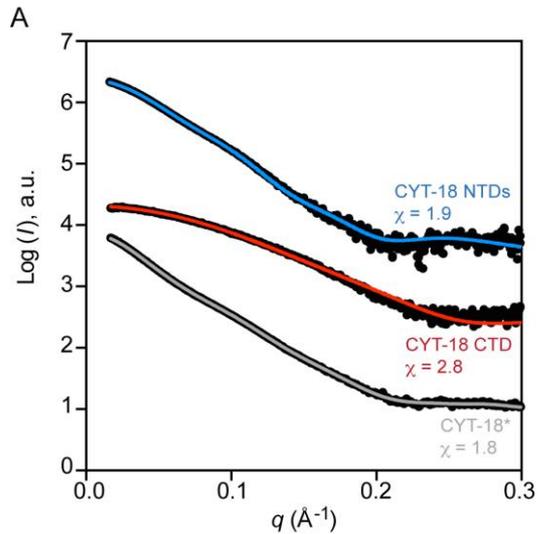
$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[ \frac{I_{exp}(q_j) - I_{calc}(q_j)}{\sigma(q_j)} \right]^2$$

に基づいて両者の差を評価

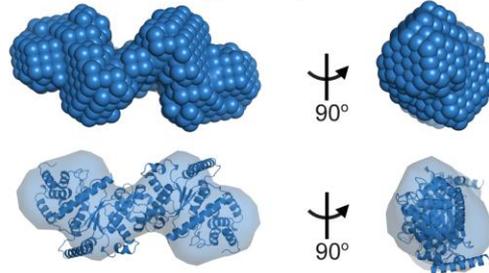


実験曲線（溶液中の状態）と理論曲線（既存の高分解能構造）を比較可能。一致度は $\chi^2$ 値で評価。

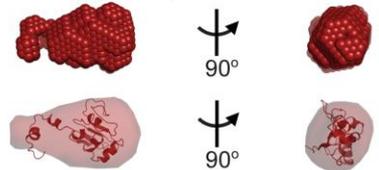
# PDB座標（結晶・NMR・電顕・AlphaFold）を利用して溶液中における複合体構造をモデリング



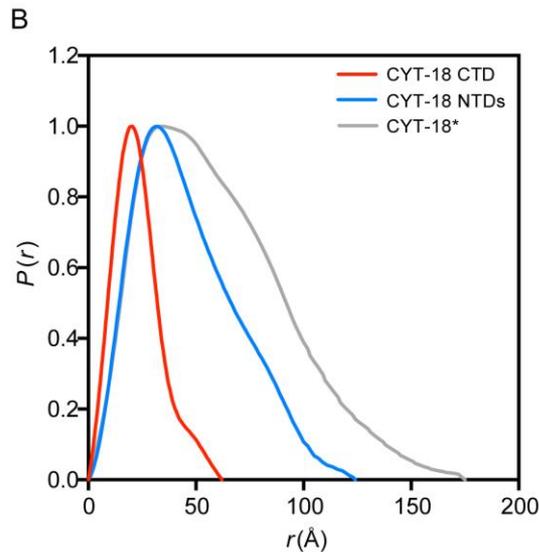
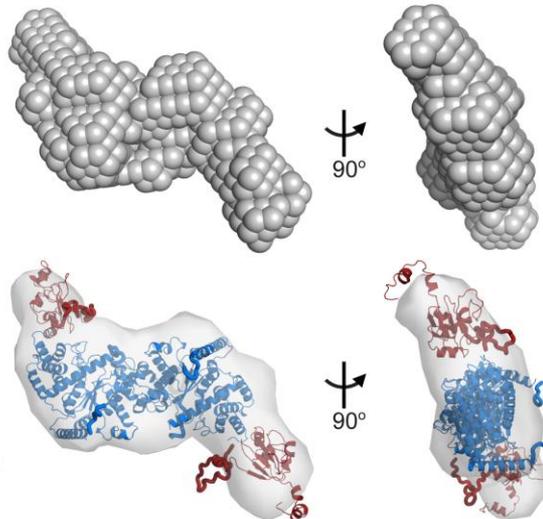
C CYT-18 NTDs ( $\chi = 1.8$ )



D CYT-18 CTD ( $\chi = 1.7$ )



E CYT-18\* ( $\chi = 1.5$ )



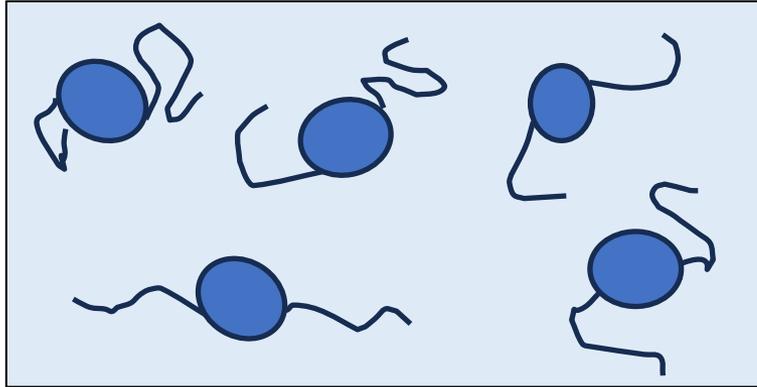
Lamech *et al.* (2014) *PLoS Biol.*, **12**, e1002028.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002028.g002>

**CORAL** (2010)

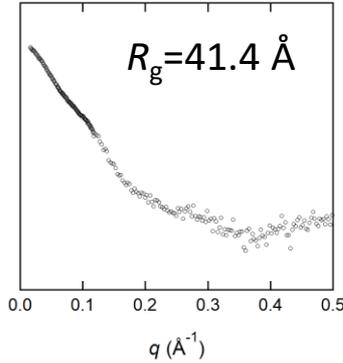
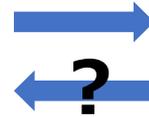
PDB座標で欠損している領域の構造を dummy residue のランダムループとして表現し、その構造を *Ab initio* modeling で予測しながら、Rigid body refinement によってモデル全体を SAXS プロファイルに最適化することで、溶液中の構造状態を推定する。

# 溶液中における構造アンサンブルの同定

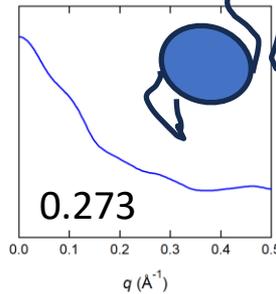
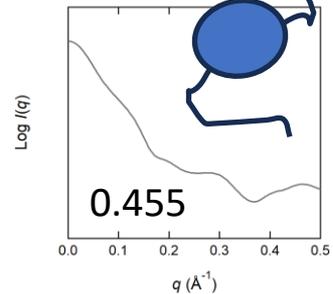
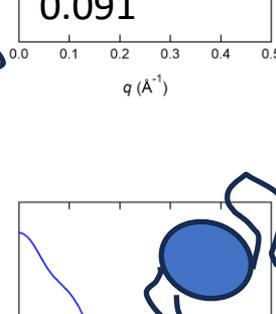
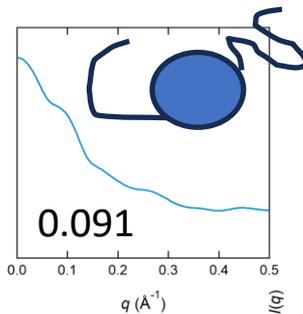
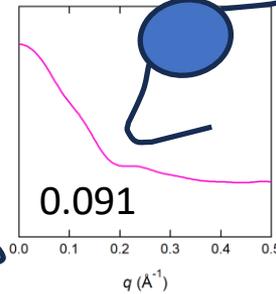
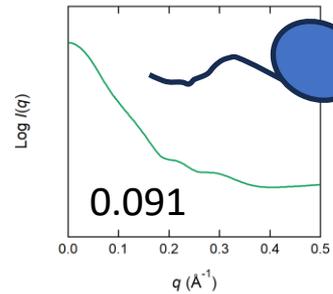


溶液中の分子に構造揺らぎがある場合

SAXS測定



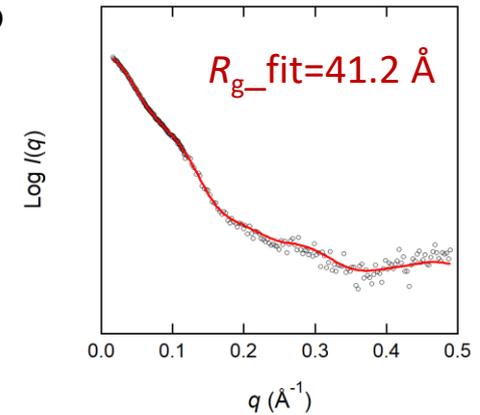
揺らぎの平均状態を表す SAXS曲線



アンサンブル構成成分の最適化・精密化



ソフトウェア  
EOM, Multi-FoXS,  
EROS, BSS-SAXS,...



「分子の構造揺らぎ」 = 「複数のモデル構造の混成系」と見なし、実験プロファイルを再現可能なアンサンブルを推定



EMBL, DESY  
BioSAS group  
Beamline P12@PETRA-III

Home > ATSAS software

Group members

ATSAS software

- Download
- CHROMIXS
- CORAL
- CRYSOL
- CRYSOL
- DAMAVER
- DAMMIF
- DAMMIN
- DATTools
- EOM
- GASBOR
- GNOM
- MONSA
- OLIGOMER
- PRIMUS
- SASFLOW
- SASREF
- SREFLEX

All manuals

Web services

Facilities

Courses

Contact us

## Data analysis software ATSAS 3.2.1

A program suite for small-angle scattering data analysis from biological macromolecules

### Experimental data processing

- [PRIMUS](#) - GUI for manipulations and primary analysis of experimental 1D SAS data
- [CHROMIXS](#) - GUI for visualisation and processing of SEC-SAXS data
- [GNOM](#) - indirect transform program that evaluates the pair distance distribution function  $p(r)$
- [Command-line data manipulation and analysis tools](#) - AUTORG, DATGNOM, DATOP, etc.

### Ab initio modelling

- [DAMMIN](#) - *ab initio* shape determination using a "dummy atom" model
- [DAMMIF](#) - rapid shape determination
- [GASBOR](#) - reconstruction of a protein structure by a chain-like ensemble of dummy residues
- [MONSA](#) - shape determination using a multiphase dummy atom model

### Rigid body modelling

- [SASREF](#) - modelling of multisubunit complexes
- [CORAL](#) - modelling of multidomain protein complexes against multiple data sets
- [BUNCH](#) - modelling of multidomain proteins against multiple data sets
- [GLOBYSYM](#) - rigid body modelling of symmetric oligomers

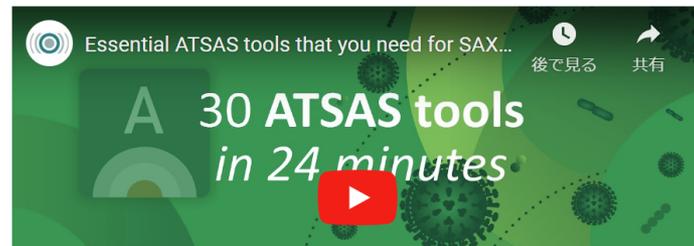
### Mixtures and flexible systems

- [OLIGOMER](#) - volume fractions of mixtures with known scattering intensities from the components
- [MIXTURE](#) - modelling of multicomponent systems
- [EOM](#) - Ensemble Optimization Method for flexible and disordered proteins
- [SREFLEX](#) - flexible normal mode analysis (NMA) refinement of high-resolution protein models
- [NMATOR](#) - generate RNA/DNA/protein conformations using NMA in dihedral/torsion angle space

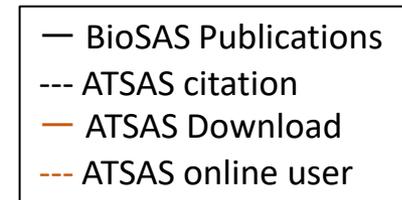
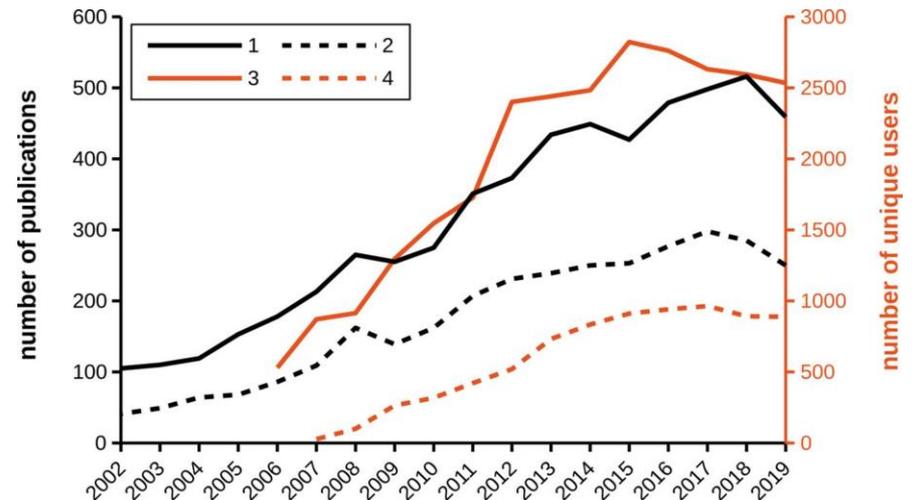
### Model evaluation and manipulation

- [CRYSOL](#) - compute solution X-ray scattering patterns from atomic structures, compare/fit to experimental data
- [CRYSOL](#) - compute/fit neutron scattering patterns
- [CIFSUP](#) - superimpose one atomic or bead model onto another
- [DAMAVER](#) - align *ab initio* models, select the most typical one
- [SASpy](#) - PyMOL plugin, a point-and-click interface for CRYSOL, SUPALM, SASREF, SREFLEX

Manuals



- BioSAS解析のための統合パッケージ
  - 様々なソフトウェアを利用可能
  - SAS解析のデファクトスタンダード
  - アカデミックフリー



- ① 解析対象のタンパク質分子・複合体の溶液中における性状・外形構造解析（高分解能構造解析実現に向けた試料の評価）。
- ② 溶液中におけるリガンド結合や溶液条件の変化に伴う構造変化の追跡（時分割測定含む）。
- ③ 特定環境（結晶・クライオ）で解析された原子モデル構造と生理条件下（溶液）で解析された溶液構造の比較。
- ④ 情報科学的アプローチを活用して、結晶・クライオ電顕・NMRで解析された原子構造モデルとSAXSからの構造情報に基づく4次構造解析。
- ⑤ 天然変性タンパク質やドメインにそのような領域を含むマルチドメインタンパク質の溶液中における構造状態（動的構造・構造アンサンブル）の推定。
- ⑥ 広い空間スケールの構造情報～物理化学量・機能に関する情報を繋ぐ。



タンパク質間相互作用・生体システムの理解に挑む

BioSAXS初心者に向けた測定解析支援を行っています！



長尾聡  
(JASRI)



関口博史  
(JASRI)



増永啓康  
(JASRI)



清水伸隆  
(理研)

<https://www.binds.jp/>

のワンストップ窓口より、コンサルティング申請をお願いします。

「A1-11 タンパク質X線溶液散乱法による解析支援」

御自身の御研究へのBioSAXSの活用に関して、ご興味をお持ちの方は、是非コンサルティング申請からお申し込み下さい。



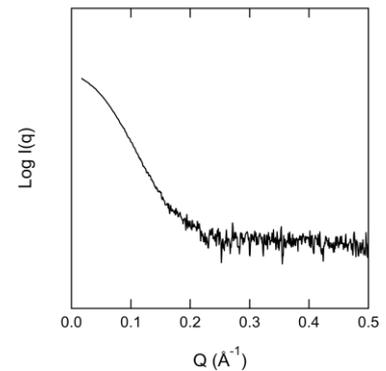
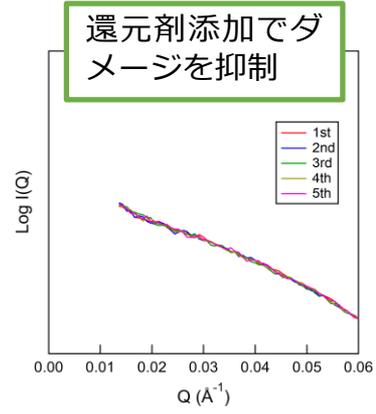
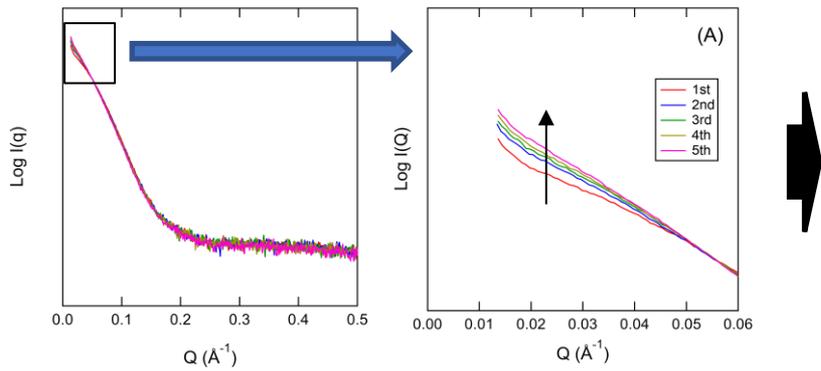
Bernadó, P., Shimizu, N. *et al.* (2018) *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1862**, 253-274.

波長1.5Å、露光5秒で5枚測定したら...

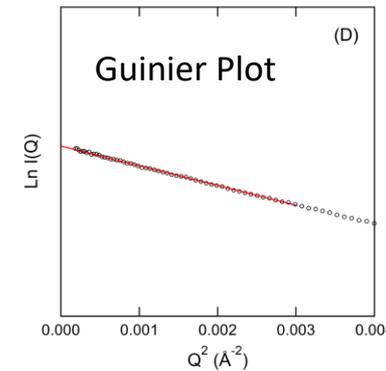
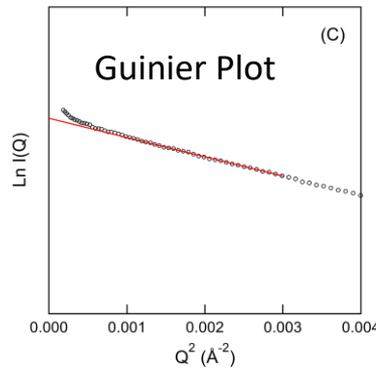
50mM HEPES, pH7.5, 150mM NaCl

+5mM DTT

+5% Glycerol



- ◆ 放射線損傷の効果で試料タンパク質が凝集（アグリゲーション）した。
- ◆ 測定が進むにつれて、すなわち入射X線量が増加するとさらに変化量が増大している。



Guinier Plotを確認すると、ダメージによる影響は抑制できたが、そもそも多分散な状況があると判明。

Glycerol添加で凝集が解消。

- ① 試料調整～実験～解析まで、とても丁寧に記述された教科書。入門書として最適。

Biological Small Angle Scattering: Techniques, Strategies and Tips

B. Chaudhuri, I. G. Muñoz, S. Qian and V. S. Urban (editors)

Advances in Experimental Medicine and Biology 1009, Springer Nature Singapore (2017).

- ② Publication guideline for SAS data。2012に発行。2017, 2023年に改訂版を発行。
- Publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution. Jacques et al. (2012) *Acta Cryst.* **D68**, 620-626. <https://doi.org/10.1107/S0907444912012073>
  - 2017 publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution: an update. Trehella et al. (2017) *Acta Cryst.* **D73**, 710-728.  
<https://doi.org/10.1107/S2059798317011597>
  - 2023 update of template tables for reporting biomolecular structural modelling of small-angle scattering data. Trehella et al. (2023) *Acta Cryst.* **D79**, 122-132. <https://doi.org/10.1107/S2059798322012141>
- ③ BIOSASのTutorialページ (BIOISIS.net) 。ただし、本家のページは閉鎖されてしまったので、このサイトを日本語に訳された岐阜大学の藤澤先生のページ。

[https://www1.gifu-u.ac.jp/~fujilab/bio\\_html/index.html](https://www1.gifu-u.ac.jp/~fujilab/bio_html/index.html)

- ④ 米国の放射光施設APSのJ. B. Hopkins博士が開発したBioSAXSデータの解析ソフトウェアBioXTAS RAWのTutorialサイト。RAWをベースにSAXSに関するTutorialも公開されている。

<https://bioxtas-raw.readthedocs.io/en/latest/index.html>

- ⑤ さらに勉強したい方へ

- Small Angle X-ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules  
D. I. Svergun, M. H. J. Koch, P. A. Timmins and R. P. May  
IUCr Texts on Crystallography 19, Oxford University Press (2013).
- Small Angle X-ray Scattering. O. Glatter and O. Kratky (editors) – Academic Press (1982).  
絶版になりましたが、Glatter先生が許可を得てPDFをフリーで公開しています。  
<https://web.archive.org/web/20130904140057/http://physchem.kfunigraz.ac.at/sm/>
- Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering. L. A. Feigin and D.I. Svergun.  
Springer New York (1987)  
2013年に軽装の復刻版が発売されました。