

単結晶 X 線解析装置による RNA 構成分子の構造解析

化学物質の構造はその化合物性質と密接な関係にあることから、「構造を知ることには化合物そのものを知ること」と言っても過言ではなく、そのため構造解析はサイエンスを行う上で、最も基本的、且つ重要な研究課題の一つである。ここでは、X 線回折測定に必要な一連の操作を示すとともに、RNA の構成分子であるリボヌクレオチド (cytidine) を用いて測定用単結晶のサンプリングや、測定済みデータを用いた三次元構造解析を行う。

1. 装置について

単結晶 X 線回折装置 (Rigaku AFC-7R 図 1) で得られる情報を以下の通りである。

- ・分子の三次元立体構造 (分子内の結合距離, 角度などの情報)
- ・分子内, 或いは分子間の相互作用の有無 (水素結合等)
- ・結晶内の分子の並び方 (分子パッキングやネットワーク構造)

2. 操作・測定手順について

1) 単結晶のサンプリング

以下の条件を満たす単結晶を実態顕微鏡 (倍率 20 倍程度) で探し出し, ガラスファイバー (外径が約 0.1 mm で長さが 14 mm 程度のもの) 上に接着する。(図 2 参照)

- ・きれいな単結晶であること (ひび割れや微結晶が付着していないこと !)
- ・結晶が適当な大きさ (0.2 ~ 0.5 mm 角) であること
- ・結晶の外形は縦, 横, 高さの三方向ともに同じくらいの長さのもの

結晶をガラスファイバーに接着するときは, スライドガラスの端に結晶をのせ, その先端の三分の一くらいをガラス板の外に出しておくことよい。ここではマニキュアを接着剤として使用する。



図 1. 単結晶 X 線回折装置

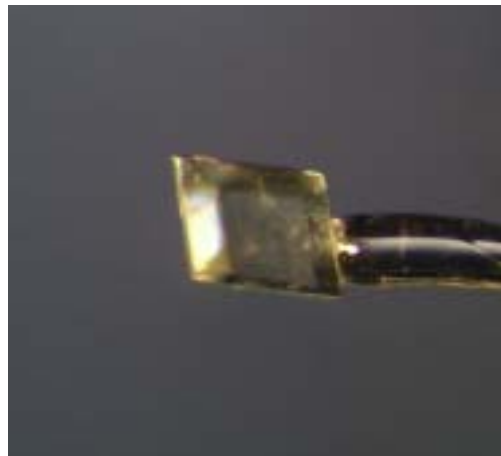


図 2. 結晶試料の顕微鏡写真

2) X 線回折装置の準備

1 で用意した試料をサンプルホルダーに取り付け, 回折装置のゴニオメータにセットする。続いて回折計の光軸中心と単結晶の重心が一致するように, ゴニオメータヘッドを動かして調整を行う。結晶の大きさに合ったコリメータ (0.3 mm か 0.5 mm) を選び, X 線

ビームの幅を決める。冷却水，装置の電源，パソコンの起動等の準備ができていれば，安全確認後，X線を発生させる（50 kV，15 mAまで徐々に上げる。ただし，ここではX線の発生は行わない）。

3) X線回折強度測定

測定用パソコンにより，測定ソフトWinAFC（Rigaku）を起動し，ディレクトリ作成，マスターファイルのコピー後，測定条件（化合物名，結晶の色，大きさ，分子式，X線の出力等）を入力し，測定を開始する。なお，通常の測定は「自動測定モード」で行う。また，最初のピークサーチで回折ピークの幅が広がったり，ピークが2つに割れていたりする場合は，結晶が測定に適していないので，測定を中止して結晶を取り替える。

4) 測定データの出力と移動

X線回折装置による強度測定が終了したら，texray.inf というファイルを作成する。その後，解析に必要なファイル（afc7r.dat, afc7r.psi, texray.inf）をフロッピーディスクにコピーする。さらに，解析用パソコンにサンプル名と同じ名前のフォルダ（cytidine）を作成し，ここに先の3つのデータをコピーする。

3. 構造解析について

解析ソフトCrystalStructure（Rigaku）を用いてWindowsパソコン上で構造解析を行う。以下に解析手順を示す。

1) CrystalStructure の起動

CrystalStructureのアイコンをダブルクリックして，ソフトを起動する。その後，ファイルメニューからOpen projectを選び，解析データのフォルダ"cytidine"を指定する。ウィンドウが開いたら，画面左のフォローチャート"Evaluate Data", "Solve", "Model", "Refine" and "Report")の順に従って解析を行う。

2) 初期データ処理

データのフォーマット変換と空間群の決定を自動的に行う。

- "Evaluate Data"をクリックし，新しいウインドウのOKをクリックする。
- データ処理が終了すると，さらに新しいウインドウが開き，このOKをクリックするとSummary（格子定数等の結晶学的データ）が表示される。

3) 直接法による原子位置の決定と割り当て

- "Solve"をクリックし，メニューからSIR92或いはSIR88を選び，新たに開いたメニューの中からDefaultを選択する。（ここではSIR88を選ぶ）
- プログラムが終了すると，画面に解がモデルとして図示される。なお，画面にマウスポインタを移動し，ドラッグするとモデルが回転する。

4) 分子構造の確定と非水素原子（水素以外の原子）の番号付け

- "Model"をクリックし，メニューからNameを選択すると，Name itemが開く。
- Name item ウィンドウの中から番号を付けたい元素のラジオボタンをクリックして選択

し、モデルの原子を優先順位の高いものから順に選択する。

ここで、全ての非水素原子位置が決定されなかった場合は、以下の作業を行う。

- "Refine"をクリックし、Fourierを選択し、そのメニューからFourierを選択し、フーリエ合成によるピークの検出を行うことで、残りの原子を導き出す。

5) 最小二乗法による非水素原子の構造精密化

5.1 原子座標と等方性温度因子の精密化

- "Refine"をクリックし、Least squaresを選択すると、Least squares refinement menuが表示される。
- Default画面で以下のようにセットし、OKボタンをクリックする。
Mode: Refine, Number of cycles: 5, Weights: Unitを選択 Refine on Fのみにチェック
- 精密化が終了すると、結果 (Refinement results) が表示される。
このとき R1, R が15くらいの値であれば構造は正しいと思われる。
- Refinement resultsのsum of squares of ratiosとMaximum shift/error が0になるまで最小二乗法を繰り返す。

5.2 原子座標と異方性温度因子の精密化

- "Model" Refine attributes をクリックし、refinement menu を表示させる。
- All non-hydrogen のボタンをクリックし、xyz及びanisoをチェックしてからOKボタンをクリックする。(異方性温度因子への変更)
- 5.1と同様にRefinement resultsのsum of squares of ratiosとMaximum shift / error がともに0になるまで最小二乗法を繰り返す。

6) 水素原子の位置決定 (差フーリエ合成の実行と理論位置の算出)

X線による水素の原子散乱因子 (X線を散乱させる能力) は小さいため、X線回折では水素に関する情報は得られにくい。よって、水素の原子位置は差フーリエによって得られたピークから、あるいは原子位置を計算で求めて位置を決定する。精密化にはriding model (座標シフト量は親原子に準じ、温度因子はその1.2倍する) を適用する。

6.1 差フーリエ合成の実行

- "Refine"のFourier Fourierをクリックし、Fourier menuを開く
- Fourer type: Difference を選択し、OKボタンをクリックする。
- 現れたピークから Model Nameで正しい位置に水素原子を割り当てる。

6.2 水素原子位置の算出

- "Model" Add hydrogens をクリックし、menu を表示させる。
- 発生させる水素のタイプをチェックした後、モデルの親原子を順番にクリックする。

6.3 精密化するパラメータの設定 (riding model の設定)

- "Model" Refine attributes をクリックし、refinement menu を表示させる。
- All hydrogen のボタンをクリックし、riding をチェックしてからOKボタンをクリックする。なお、Add hydrogens で求めた水素原子は最初からriding になっている。

7) 最小二乗法による全原子の構造精密化

- 5.1と同様に、Refinement resultsのsum of squares of ratiosとMaximum shift/error がともに0

になるまで最小二乗法を繰り返す。

- 前の設定条件で構造が収束したら，Least squares refinement menu の Default画面を表示し，Weights を sigma に変更して収束するまで最小二乗法を繰り返す。
- Least squares refinement menu の Default画面を表示し，Refine on F^2 に変更して収束するまで最小二乗法を繰り返す。
- Refinement results の Goodness of fit が 1 に近い値で収束していれば構造解析終了。

8) 報告書の作成 (原子座標，結合距離，結合角度等の表を作る)

- "Report" をクリックし，Table を選択し，Table menu を表示させる。
OK ボタンをクリックすると，自動的に表が作成される。(画面に表示されない)
- Utilities プルダウンの Hydrpgen bond table をクリックする。水素結合がある場合には，画面に表が表示される。
- Report をクリックし，Structure report menu を表示させる。OK ボタンをクリックすると表が作成され，さらにOKをクリックするとレポートが自動的に画面に表示される。

9) CIF (Crystallographic Information File) の作成

CIF とは結晶構造データをコンピュータで読み書きしやすいように開発されたデータファイル形式で，このファイルはインターネット上でも公開されている。

- CIF をクリックし，Write CIF menu を表示させる。OK ボタンをクリックすると，ファイルが作成され，自動的に画面に表示される。

4. 分子構造図，並びにパッキング図の作成について

解析が無事終了すると三次元的な分子構造図 (ORTEP: 原子の熱振動を楕円体で図示するもの，図3) や結晶の分子パッキング図 (図4) が得られる。なお，図3のORTEPはCIFをもとにグラフィックソフト"ortep3 for windows" を用いて作成した。

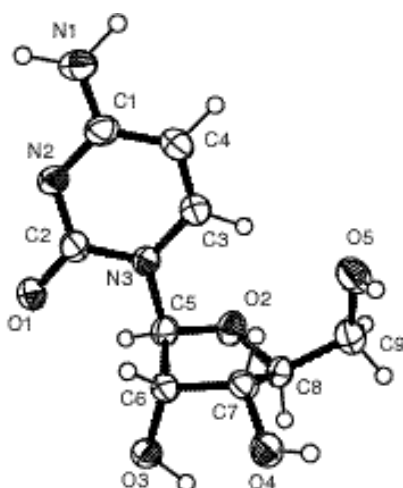


図3. cytidine の ORTEP

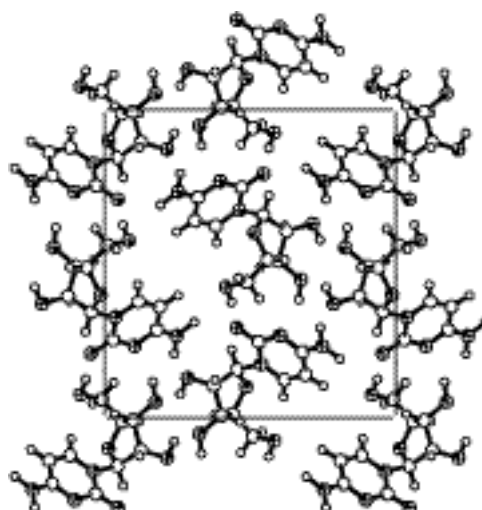


図4. cytidine のパッキング図

参考文献

- CrystalStructure インストールマニュアル (No. MJ13241A02) Rigaku
- 化学者のための基礎講座12 X線構造解析 大場 茂・矢野重信 編著 朝倉書店