

生命科学 タンパク質結晶構造解析法

光合成水分解反応の機構

光合成における水分解・酸素発生反応は、光のエネルギーを生物が利用可能な化学エネルギーに変換し、大気中に酸素を供給し、それによって地球上酸素呼吸生物の生存を可能にする意味で極めて重要なものです。この反応は、光化学系IIという膜タンパク質複合体によって行われています。シアノバクテリア由来光化学系IIは17個の膜貫通タンパク質と3つの膜表面タンパク質により構成され、分子量350 kDaの単量体が二量体を形成して機能しています。この二量体の結晶構造をSPring-8の放射光を利用して1.9 Å分解能で解析した結果（図1左）、各サブユニットの構造や電子伝達に関わる成分の配置・構造が明らかになっただけでなく、そこに含まれる水分解・酸素発生反応触媒の構造が明らかになりました。この触媒は、 Mn_4CaO_5 の組成を持ち、「歪んだ椅子」の形をしており、 Mn_3CaO_4 がキュバン型の座部を形成し、4つ目のMnイオンがオキシ酸素を通してキュバンの外に繋がっていました（図1右）。キュバンの歪みを作り出している原因の一つは、5つの酸素原子のうち、O5と呼ばれる酸素原子とその周りのMnイオンとの結合距離が長いからです。このことは、O5が特殊な位置にあり、反応の過程で切り出され、酸素分子を形成するための基質酸素の一つを提供している可能性を示唆しています。実際に、閃光照射により水分解反応の中間状態（ S_2 , S_3 状態）を作り、X線自由電子レーザーSACLAを用いてポンプ-プローブ実験を行った結果、 S_2 状態では新たな水分子の挿入は見られなかったが、 S_3 状態では新たな水分子（O6）がO5の近傍に挿入され、O5とO6の間で酸素-酸素結合が形成され、分子状酸素を放出することが示されました（図2）。

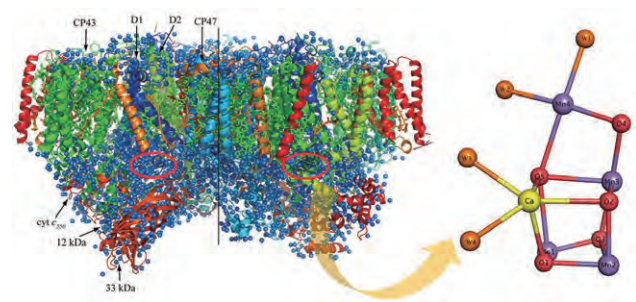


図1. 光化学系II二量体の全体構造（左）と Mn_4CaO_5 クラスターの構造（右）

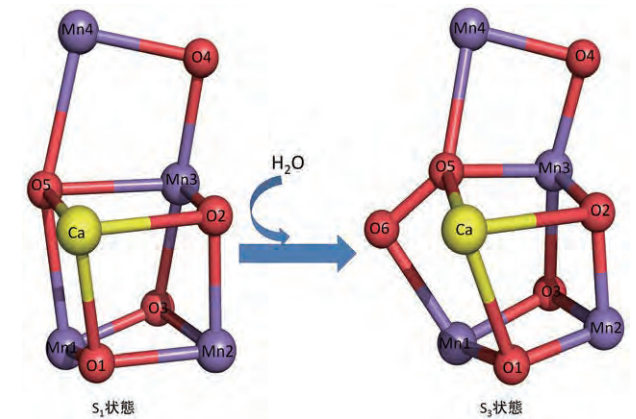


図2. 光化学系IIの水分解反応における Mn_4CaO_5 クラスターの構造変化。暗黒で安定な S_2 状態と2閃光照射により形成された S_3 状態の構造を示した。

BL41XU, BL45XU, SACLA

岡山大学 沈 建仁

生命科学 位相差CT

位相差CTによる水晶体内のタンパク質密度計測

脊椎動物の眼球は、角膜、水晶体、網膜などから成りますが、これらは骨などに比べると密度が低く、軟組織と呼ばれます。軟組織はX線をあまり吸収しないので、X線の吸収を利用したレントゲン写真のようなイメージング法ではコントラストがつかず、ほとんど見えません。しかしX線の位相変化を用いた位相差X線CT法を用いると、各組織を明瞭に可視化することができます（図1）。特に水晶体では形状と内部のタンパク質（クリスタリン）密度分布を高精度で計測できるため、これに基づいて光の屈折率分布を求め、水晶体のレンズとしての動きを正しく計算することができます。SPring-8では回折格子を用いることにより位相差X線CTを簡便に行える装置を、BL20B2に設けています。

この手法を利用して水晶体に関して多くの知見が得られています。例えばヒトの水晶体では加齢によって屈折率の最大値や分布はあまり変わらず水晶体の形が変化すること（図2）、ゼブラフィッシュの水晶体ではアクアポリンという細胞膜をよぎる水の輸送に係わるタンパク質が正常な屈折率分布の形成に重要であること、などが示されています。また、白内障モデルマウスの水晶体の密度分布が正常な水晶体とは異なっていることがわかり、近年白内障による水晶体の白濁を解消する化合物として注目されているオキシステロールが、この異常な密度分布を正常に戻すことが明らかになりました。このように位相差X線CTの高空間分解能と高密度分解能は、生体組織の詳細な構造と機能の研究に役立っています。

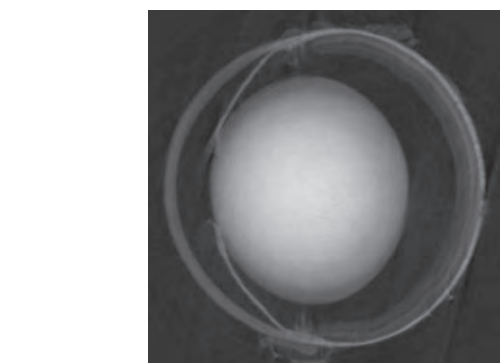


図1. 位相差X線CTで撮影されたマウス眼球の断面

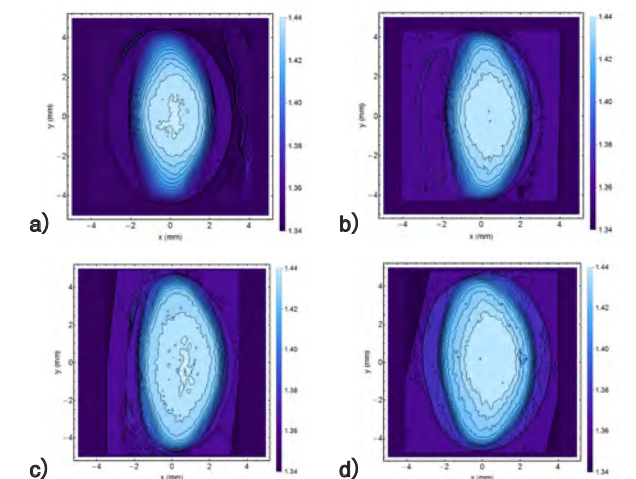


図2. ヒト水晶体断面における屈折率の等高線図
a) 35歳、b) 48歳、c) 68歳、d) 86歳

BL20B2

Barbara Pierscionek Anglia Ruskin University, UK

生命科学 小角X線散乱 (SAXS)

がん細胞指向性タンパク質ナノカプセルによる新規ドラッグデリバリーシステム

小角X線散乱測定 (SAXS) は、サブミクロンからナノメートルの構造情報を得るのに有効な手法です。試料の形状や環境についての制限が少なく、大気中で測定できるという特長があります。ドラッグデリバリーシステム (DDS) は、難水溶性薬剤や分解されやすい薬剤などを微粒子 (ナノカプセル) に内包することにより、可溶化したり保護した状態で血管などを通じて標的細胞まで輸送し、標的細胞内で薬剤を放出するシステムですが、SAXSはこのDDSナノカプセルの溶液中での構造研究に適しています。本研究では、ナノカプセルとして生体内輸送タンパク質であるlipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) を利用したDDSの開発を目指しています。7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) は高い抗腫瘍活性を有するにも関わらず難水溶性であるために、実臨床では直接使用されません。そこで、L-PGDSに内包することで可溶化を試み、薬剤内包におけるL-PGDSの構造変化をBL40B2のSAXS測定で明らかにしました。SAXS測定により得られた散乱曲線から、L-PGDSの全体構造が球状であること、L-PGDSは溶液中でも凝集せず単分散であることがわかりました（図1）。また、散乱曲線の小角領域に対してギニエプロット解析を行い慣性半径 (R_g) を求めたところ、SN-38の内包によってL-PGDSの R_g が減少することが判明しました（図2）。これによりL-PGDSは非常に柔軟なタンパク質であり、SN-38を内包することでコンパクトになることが明らかになりました。

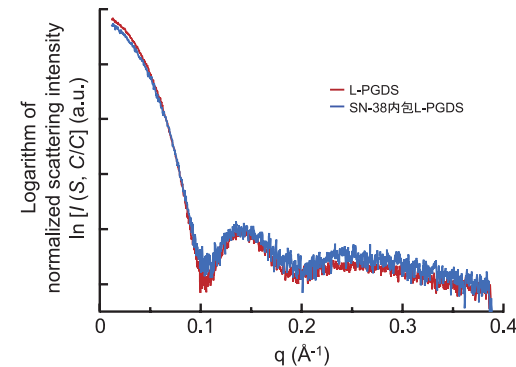


図1. L-PGDSとSN-38内包L-PGDSの散乱曲線

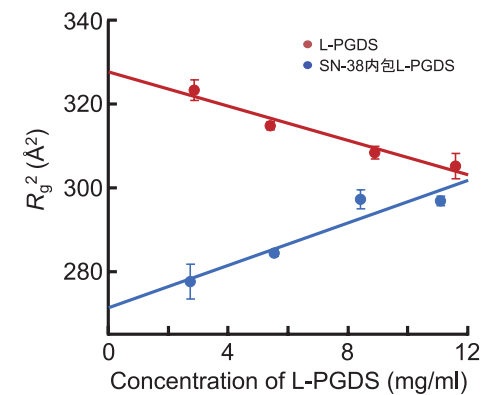


図2. ギニエプロット解析により得られた R_g^2 のL-PGDS濃度依存性

BL40B2

大阪公立大学 中辻 匡俊、乾 隆

生命科学 蛍光X線 (XRF)

SPring-8の強力なナノビームにより極微量な抗癌剤のがん組織内分布を可視化

第三世代白金錯体系抗悪性腫瘍薬であるオキサリプラチン (L-OHP) は、大腸癌治療にて広く使用されています。一方で、進行再発大腸癌に対する治療効果は50%程度であり、L-OHPの使用によって好中球が減少したり、末梢神経に障害が生じるなどの副作用もあります。そのため、有効性と安全性の高い化学療法を実現するために、治療効果を予測・診断する手法の確立が望まれています。そこで、放射光蛍光X線 (SR-XRF) 分析をヒトのがん組織に応用し、L-OHPに含まれる白金および生体内必須金属の分布を定量・可視化し、化学療法の治療効果や臨床病理学的因子との関係を検討しました。

L-OHPを用いた化学療法後に手術をおこなって摘出した直腸癌30例のSR-XRF分析では、がん組織における白金の濃度は2.85~11.44 ppm (検出下限濃度1.848 ppm) でした。がん組織上皮では化学療法による治療効果が顕著な部位で白金の集積濃度が有意に高く、一方、がん組織間質では治療効果の乏しい症例ほど集積濃度が高いことが明らかとなりました。さらに、多変量解析によりがん組織間質における白金集積が治療効果に対する独立した予測因子であること、主成分分析により銅輸送体が薬剤抵抗性に寄与していることが示唆されました。

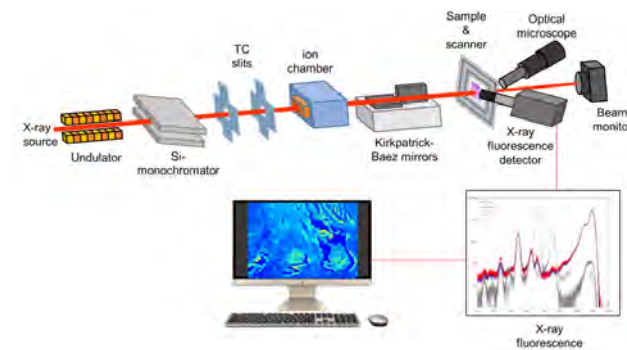


図1. 蛍光X線分析装置の概略図

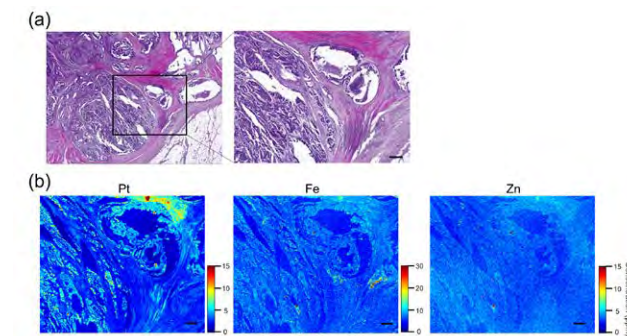


図2. (a) 直腸癌の代表的病理組織像（右は左の拡大図）
(b) 同部位における白金、鉄、亜鉛の蛍光X線分析像

BL37XU

九州大学 西堀 麻衣子、藤田 逸、木庭 遼

論文: R. Koba et al.: *Int. J. Cancer*, 146 (9), 2498-2509 (2020)