

溶液広角散乱測定の高度化によるタンパク質構造データベースの構築 Construction of data base of protein structures in solutions using high-performance wide-angle solution scattering

平井 光博^a, 小内 輝明^a, 岩佐 達郎^b, 満 都拉^b, 井上 勝晶^c
Mitsuhiro Hirai^a, Teruaki Onai^b, Tatsuro Iwasa^b, Katsuaki Inoue^b

^a群馬大学工学研究科, ^b室蘭工大工学部, ^c高輝度光科学研究センター
^aGunma Univ., ^bMuroran Inst. Tsch., ^cJASRI

「水」環境における生体高分子系, 特にタンパク質系の X 線散乱測定は, 機能状態における構造を理解する上で極めて有用な情報をもたらす。さらに, 第 3 世代の放射光光源の利用によって, 超分子構造からヘリックスやシートなどの 2 次構造領域までの測定と解析が可能になった。新たに改造された BL40B2 光学系を用いると, 300 nm から 0.3 nm までの構造変化の検出が可能となった。変性過程におけるタンパク質系の超広角散乱測定を行った。

X-ray scattering measurements of biological polymer systems, especially protein systems in the "water" environment, serve us extremely useful information of their functional states. Furthermore, by the use of the third generation synchrotron radiation source we are able to measure and analyze from the super-structures (quaternary and third structures) to the secondary ones (helix, sheet and so on). Because the BL40B2 optical system has been remodeled newly, it is now possible to detect structural changes from 300 nm to 0.3 nm easily. We performed the super wide-angle scattering measurement of protein denaturation processes.

キーワード: タンパク質, 階層構造, 広角散乱

背景と研究目的:

生体の機能は, 多様な構成成分の超分子・複合体形成とそれらの相互作用を通じて, 「水」環境を反応場として発現する。放射光 X 線広角散乱法は, 様々な生体材料・システムの水溶液中における広い空間・時間領域にわたる *in situ* 構造解析に適した強力な手法であるため, 水溶液中におけるタンパク質を中心とした生体高分子複合系の構造解析法の確立は, 機能発現の機構の解明に貢献できる。特に, タンパク質分子の構造は, 分子集合体全体 (四次構造), 各分子の外形 (三次構造), 分子内のドメイン構造とその相関, ペプチド鎖と側鎖のパッキング, ドメイン内の α ヘリックスや β シートなどの二次構造という複雑な階層性を持っている。既に我々は, SPring-8 の BL40B2 を用いた高い統計精度の X 線広角散乱データから, タンパク質の構造の特徴に依存した全階層構造の解析が可能であり, また, folding/unfolding 転移における分子内部の構造変化や揺らぎの階層構造依存性と構造相関を議論できることを一部示している (参考文献: 1-3)。

また, 2007 年後期からは, 散乱槽・検出器系が大幅に改良されたため, 最短 55cm から最長 4m まで短時間でカメラ長の変更が可能となり, 超広角散乱測定が容易になった。加えて, イメ

ージングプレート検出器も更新されたため, 一試料当りの読み取り時間が従来の半分程度になった。今回の実験では, 可能な限り広角領域の散乱データを測定することを試みた。さらに, 測定中の放射線ダメージをさけるための多連装溶液フローセル, 回転攪拌セルを新たに設計・製作した。今回の申請課題実施にあたっては, 従来 BL40B2 で行っていた広角散乱測定法を拡張し, 溶液中での構造・機能の情報を抽出する手法の開発・確立に焦点を絞って行った。

実験:

測定には大幅に改良された BL40B2 光学系と検出器を使用した。測定条件は, 4 mカメラ長では X 線波長 0.1 nm 或は 0.15 nm, 55cmカメラ長では X 線波長 0.075nm を使用した。露光時間は 10 秒から 30 秒。測定にはタンパク質 8 種類 (リゾチーム, ミオグロビン, アポミオグロビン, ヘモグロビン, キモトリプシン, コンカナバリン, ウレアーゼ, リポカリン, アミロイド β) の他に, 糖脂質混合リポソームを用いた。濃度は 2.5 wt% - 0.1 wt%, 溶媒 pH は 4 - 7.4 である。タンパク質の熱アンフォールディング・リフォールディング測定実験での温度範囲は 15 °C から 85 °C であった。

結果及び考察：

Fig.1 にヘモグロビンの超広角散乱データを示す。二つの異なる光学条件（カメラ長 4 m, X線波長 0.1 nm; カメラ長 55 cm, X線波長 0.075 nm）でのデータを接続している。小角散乱データ補正には排除体積のみを, 高角散乱データ補正には水分子間の相関ピークによる規格化と排除体積を考慮している（詳細は既出の報告を参照）。二回の異なる光学条件での測定データを恣意的な補正無しに容易に接続できる。挿入図はミオグロビンの広角散乱データを示す。 $q \sim 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ 近傍の肩は, ヘモグロビンの四次構造に由来する。 $q = \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$ より高各側のパターン（二次構造領域）はミオグロビン（挿入図）と殆ど同じである。 $q = \sim 0.2 - 0.6 \text{ \AA}^{-1}$ の領域ではヘモグロビンとミオグロビンに相違が見られる。この領域は構造ドメイン間の相関, ドメイン内構造を反映している領域である。即ち, ヘモグロビンを構成する主要なヘリックスのパッキングが, より顕著に現れている。この様に, 二次構造から四次構造までの全領域の構造の特徴が高い統計精度で得られた。溶媒条件, 温度に依存した構造転移過程の測定を行った（一部は2007年生物物理学会にて公表）。

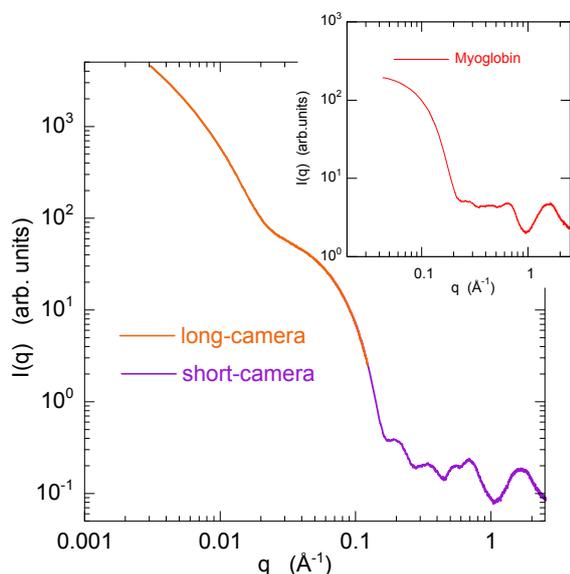


Fig. 1. ヘモグロビンの超広角散乱曲線。カメラ長 4m, X線波長 0.1nm (long-camera); カメラ長 55cm, X線波長 0.075nm (short-camera)。空間分解能で 250 nm から 0.25 nm に相当。濃度 2.5 wt%, pH7, 10 mM Hepes buffer。挿入図はミオグロビンの広角散乱曲線（溶媒条件はヘモグロビンと同じ）。

Fig.2 にラフトモデル膜であるガングリオシド／コレステロール／リン脂質混合系の単膜ベシクル（リポソーム, 直径 50 nm）の超広角散乱

データを示す。小角領域 ($\sim 0.008 \text{ \AA}^{-1}$) の肩は, リポソームの形状因子（中空球状構造）に由来する。 $q \sim 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ 近傍のこぶとそれより高角側のリップルは, リポソーム膜を構成する脂質分子 2 重膜の構造による。 $q \sim 1.4 \text{ \AA}^{-1}$ のピークは, 脂質分子のアルキル鎖のパッキングを示している。

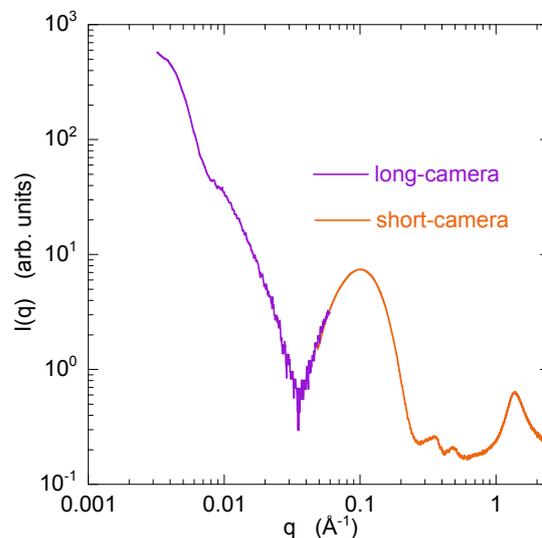


Fig. 2. 脂質混合単膜ベシクル（リポソーム, 直径 50 nm）の超広角散乱曲線。溶媒条件及び光学系の条件は Fig.1 と同じ。試料はガングリオシド(GM1)/コレステロール/リン脂質(DOPC) = 0.1/0.1/1 [M/M], 1 wt% DOPC。

今後の課題：

今回, 新たに自作した多連装溶液フローセル, 回転攪拌セルの動作チェック, 放射線ダメージの評価などを行う時間が殆ど取れなかった。どの程度測定効率化とダメージ回避に効果があるのか今後検討課題として残っている。タンパク質の溶液散乱データベースは, 今後のタンパク質の機能の解明や, 創薬設計などに有用な情報を提供できる。さらに効率的な測定と解析の自動化・標準化など推進する必要がある。また, データベースの構築のためには, 個人レベルの実験では取り扱う試料の数や種類, 測定時間などが制限されるため, 多くのユーザーからの試料提供をお願いする必要がある。

参考文献

M. Hirai et al., J. Syn. Rad. **9**, (2002) 202; Biochemistry **43**, (2004) 9036; 平井光博, 放射光 **19**, (2006), 437.

論文発表状況・特許状況

平井光博, 第 30 回日本生物物理学会予稿集, s177.
(論文は現在準備中)