

WAXS と SANS を利用した糖溶液における タンパク質の構造,水和,安定性の研究

Study of Structure, Hydration and Stability of Proteins in Sugar Solution by WAXS and SANS

味戸聡志¹, 平井光博¹, 清水伸隆², 五十嵐教之², 太田昇³, 岩瀬裕希⁴

1 群馬大・院理工, 2 KEK-MLF, 3 JASRI, 4 CROSS

【研究の背景と目的】

種々の生物の細胞内では, 外部からストレスを受けると適合溶質 (compatible solute) の含蓄が生じる[1]。適合溶質とは高濃度でも細胞毒性を示さない有機化合物の総称であり, 糖類やプロリンといったアミノ酸の一部が実際に生物で利用されている。この適合溶質の一つである非還元性二糖の trehalose は, 一部の生物が行う乾眠 (cryptobiosis: 乾燥した無代謝状態) に強く関与することから盛んに研究されている[2]。

先行研究によって, trehalose がタンパク質のフォールディング促進や凝集の抑制, 酵素活性を保持することが明らかにされているが[3], タンパク質に対する直接的な作用についての知見は乏しい。そこで, タンパク質に対する糖の効果を WAXS と SANS によって直接観察しようと試みた。加えて, 熱変性や化学変性に対する糖の抑制効果の検討も行った。

【実験方法】

モデルタンパク質として myoglobin を用い, タンパク質-糖溶液の放射光 X 線広角散乱 (SR-WAXS) と中性子小角散乱 (SANS) を測定した。SANS は逆コントラストで測定を行った。また, 糖によるコントラスト変化を無視するために d-glucose と h-glucose を混合して重水と散乱長密度を一致させた。水和シェル密度の推定には CRYSON を使用した[4]。WAXS 測定では糖に trehalose, sucrose, glucose, fructose を用いた。

【結果】

SANS 測定により, glucose 30%w/w 溶液中でもタンパク質の水和シェルが保存されることが判明した。WAXS 測定により, 糖濃度 30%w/w 以下ではタンパク質水和シェルからの糖分子の排除が生じ, 高濃度では水和シェルへの浸透が部分的に起こることが判明した。また, 排除傾向は単に比べて二糖である trehalose と sucrose で強いことが分かった。タンパク質の熱変性に対しては, α 転移と多量体化の観測から変性自体よりも凝集を強く抑制することが判明した。変性剤による化学変性に対しても抑制効果を示し, sucrose に比べて trehalose でその効果が大きいことが示唆された。

[1] Paul H. Yancey. *The Journal of Experimental Biology* **208**, 2819–2830 (2005).

[2] Steffen Hengherr, et al. *FEBS Journal* **275**, 281–288 (2008).

[3] Nishant Kumar Jain, Ipsita Roy. *PROTEIN SCIENCE* **18**(1), 24–36 (2009).

[4] D. I. Svergun, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(5), 2267–2272 (1997).

混雑環境下における α -クリスタリンのダイナミクス Dynamics of α -crystallin under crowding environment

酒巻裕介、井上倫太郎、守島健、佐藤信浩、杉山正明
京都大学原子炉実験所

生体内では、タンパク質、核酸、多糖等の構成成分が非常に高濃度に存在する高濃度環境(混雑環境)を構築している。このような混雑環境下においては排除体積効果・タンパク質同士の非特異的な相互作用などの寄与が無視できないため、希薄環境(～数 mg/mL 以下のタンパク質濃度)とは異なる構造及びダイナミクスを示すと考えられる。

水晶体はレンズとして機能するため 100～200mg/mL という高いタンパク質濃度を維持している器官であるが、水とクリスタリンと呼ばれるタンパク質によってのみ構成される非常に単純な系である。そのため、混雑環境下における蛋白質の挙動を研究する上でのモデル系として最適と考えられる。興味深いことに水晶体は上述したように非常に高いタンパク質濃度を維持しているにも関わらず、少なくとも半世紀以上はその透明性を保持している。その水晶体の透明性の維持に関与しているのが、クリスタリンの主要構成成分である α -クリスタリンのシャペロン機能である。これまで α -クリスタリンのシャペロン機能解明のために構造機能相関を調べる研究がなされたが、結晶構造が得られていないため未だ明確な結論は得られていない。我々は α -クリスタリンが明確な4次構造を持たない原因として、 α -クリスタリン分子同士のサブユニット交換によると仮定した。その考えを実験的に立証するため、重水素ラベリングを用いた中性子小角溶液散乱と無変性質量分析法の組み合わせにより α -クリスタリンのサブユニット交換の有無を希薄環境下(～1mg/mL)で調べたところ α -クリスタリン分子同士のサブユニット交換の存在が確認された。更に、そのサブユニット交換が α -クリスタリンの機能に関連している可能性を提案した [1]。しかしながら上述したようにタンパク質の生体環境下での構造及びダイナミクスを正確に理解するためには、混雑環境下におけるタンパク質の構造及びダイナミクスを調べる必要があるが、一つの手法のみを用いて取り組むには限界がある。

そこで本研究では重水素ラベリングを用いた中性子小角溶液散乱、X線小角溶液散乱、動的光散乱、分析超遠心等の様々な手法を統合的に組み合わせにより濃厚環境下における α -crystallinのダイナミクス及びその機能との相関の解明に取り組んだ。

[1] R. Inoue et al., *Sci. Rep.* 6, 29208 (2016).

SWAXS 法による糖溶液中における生体脂質リポソームの構造特性および熱安定性の研究

Study of structural properties and thermal stability of lipid liposomes in sugar solution by SWAXS method

高橋孝輔¹、平井光博¹、清水信隆²、太田昇³

¹、群馬大院・理工、²、KEK-MLF、³、JASRI

[研究の背景と目的]

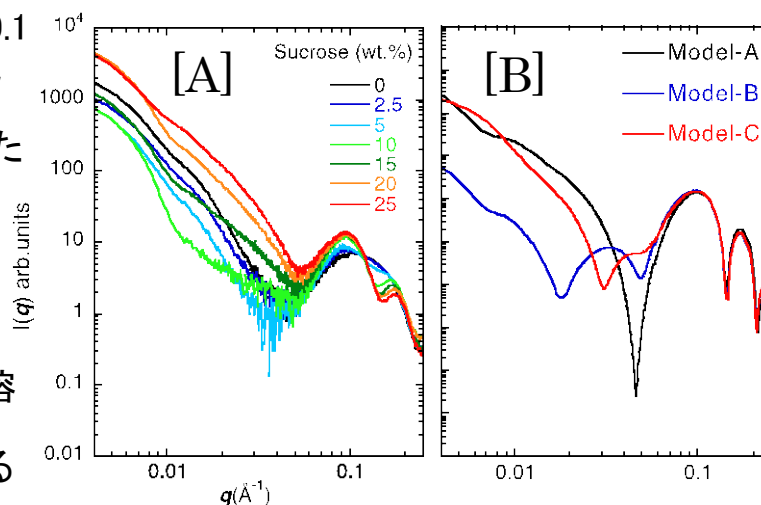
脂質二重層が単一膜小胞構造をとったものはリポソームと呼ばれ、古くから生体膜のモデルとして幅広く研究されてきた。特に近年では DDS(Drug Delivery System)として製剤の分野で様々な応用・研究がなされている。一方、糖分子は生体膜やタンパク質などの凍結・乾燥破壊に対する保護作用があることが報告されており、製薬企業でも DDS リポソームの保存溶媒として糖を用いるケースもある。しかし、実際の多くの応用・研究にも関わらず、糖による保護機能に関するナノスケールレベルでの解析や構造学的知見は乏しい。我々は、以前より小角、広角 X 線散乱実験を用いることで、分子混雑下におけるリポソームの構造特性や構造熱安定性などが解析可能であることを既に報告している¹⁾²⁾。そこで今回は、それら解析方法に従い、リン脂質の種類および脂質組成、さらに緩衝液に用いる糖の種類と濃度を変化させ調製したリポソームについて、構造特性および熱安定性について検討した。

[実験方法]

測定には、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory BL10C 分光器ならびに高輝度光科学研究センター SPring-8 BL40B2 分光器を用い、小角・高角 X 線散乱(SWAXS)実験を行なった。リポソームの調製方法としては、リン脂質(PC)、コレステロール(Chol)をモル分率 PC / Chol = 1/0.1 で混合した。リン脂質(PC)には DPPC および DOPC を用い、緩衝液には、10mM HEPES buffer (pH=7.0)を用いた。この脂質懸濁液は高出力超音波破碎法によって単一膜小胞(SUV)を調製した。糖溶媒は Sucrose(二糖)、Glucose(単糖)を用い、SUV・糖混合溶液がそれぞれ 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 (wt.%)となるように混合した。

[結果]

右図[A]は DPPC/Chol=1/0.1 の SUV に Sucrose 溶液を混合した散乱曲線 $I(q)$ である。また[B]は多分散性を考慮したダブルレイヤード・ベシクルを想定した Model 散乱曲線 $I(q)$ である。[A]および[B]両者とも $q=0.18\text{\AA}^{-1}$ 近傍のピークが一致しており、この結果から SUV に Sucrose 10wt.% 溶液が添加されるとダブルレイヤード・ベシクルが生成されることが分かった。



[文献]

- 1) M. Hirai et al., J. Phys. Chem. B 2015, 119, 3398–3406.
- 2) M. Hirai et al., J. Synchrotron Rad. (2013). 20, 869–874.

ポリエチレングリコールがタンパク質の構造安定性に与える影響

The influence of polyethylene glycol on structural stability of proteins

前澤 侑吾¹・平井 光博¹
1:群馬大・院理工

【緒言】

分子混雑環境(crowding 環境)は、溶液中のタンパク質の平衡状態を変化させると考えられているが、タンパク質の構造安定性の研究の多くが希薄溶液で行われているため、依然として曖昧なままである。一方、polyethylene glycol(PEG)は、生体物質との特異的な相互作用がないため、潤滑剤・医薬製剤・化粧品などに幅広く利用されると同時に、タンパク質の結晶化や細胞融合なども使用されている。そこで、all- α タンパク質の myoglobin と α + β タンパク質の lysozyme を用いて、PEG による crowding 環境がそれらのタンパク質の構造安定性に対して及ぼす影響を放射 X 線溶液散乱法および熱測定により検討した。実験結果を 2 つの異なるモデル(選択的水和と選択的溶媒和(水和シェルの PEG 分子による置換))に基づいて議論する。

【実験方法】

ウマ骨格筋 myoglobin と卵白 lysozyme をタンパク質試料として用い、crowding 環境にするため PEG(分子量 200, 400, 600, 1000)を用いた。pH7.0 の 10mM HEPES 緩衝溶液を緩衝液(buffer)とした。タンパク質溶液と、PEG 溶液を 1:3 混合し最終的にタンパク質濃度がそれぞれ 2.0%, PEG 濃度がそれぞれ 5wt%, 10wt%, 15wt%, 20wt%, 25wt%, 30wt% になるように調製し、これらを測定サンプルとした。また 30%PEG を混合したタンパク質溶液について昇温測定と DSC 測定を行った。

【結果・考察】

myoglobin に関しては、低 PEG 濃度では、 R_g (回転半径)値および最大直径の減少が観察され、高 PEG 濃度では、タンパク質の R_g および最大直径の増加が観察された。 R_g 値の減少はタンパク質周囲からの PEG 分子のタンパク質周辺からの選択的排除と水和シェル密度の低下を示唆し、 R_g 値の増加は排除効果のためにタンパク質間の相互作用が支配的になることを示唆している。また PEG の存在下では、熱転移温度(全構造及びヘリックス - シート転移について)が低下し、myoglobin 構造は PEG によって不安定化される。PEG の myoglobin と lysozyme に対する影響の差異については現在、解析中である。

X線小角散乱法による コラーゲンプロリン *trans*-4-水酸化酵素の構造解析 Small angle X-ray scattering analysis of collagen prolyl *trans*-4-hydroxylase

宗田善久¹、庄村康人¹

¹ 茨城大学 大学院理工学研究科

コラーゲンプロリン水酸化酵素(C-P4H)はコラーゲン前駆体ペプチド中のプロリンの水酸化を触媒する $\alpha_2\beta_2$ ヘテロ 4 量体酵素であり、その反応機構の解明は新規人口コラーゲンの開発に繋がるのが期待されるが、そのためには同酵素の立体構造情報が不可欠である。これまでに、 α サブユニットの一部と β サブユニット単体の結晶構造は報告されているが、活性部位周辺や複合体全体の立体構造は明らかにされていない。また、ヒト由来 $\alpha_2\beta_2$ ヘテロ 4 量体の大腸菌を用いた共発現系の構築は先行研究で報告されているが、純度と収率が低いために結晶化には至っていない。そこで我々は、精製標品の会合状態および結晶化に繋げる有力な情報を得るために、X線小角散乱(SAXS)法による溶液構造の解析を行った。

標的タンパク質の産生には小胞体局在タンパク質発現系用大腸菌を使用した。LB培地を用いて、空気を供給しながら培養を行い、 α および β サブユニットを Anhydrotetracycline および IPTG でそれぞれ発現誘導した。超音波による菌体破碎後の上清を *Strep*-Tactin アフィニティーカラム、陰イオン交換カラム、およびゲルろ過カラムによって精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーでは2つのピークが見られ、それぞれの画分について SAXS 測定を行った。その結果、後半ピークの画分は X 線に対して非常に感受性が高く、照射後すみやかに凝集の傾向が確認された。また、前半ピークの画分は複数の成分を含むことが Kratky プロットにより示唆され、これは後半ピークの成分が平衡移動により生成したためと考えられる。一方、動径分布関数より算出された分子量はアミノ酸配列から得られた C-P4H の計算分子量と良好な一致を示した。また、*ab initio* モデリングの結果と既に報告されている α サブユニット 2 量体化ドメインの構造モデルの結果を比較することによって、 $\alpha_2\beta_2$ ヘテロ 4 量体中での α サブユニットおよび β サブユニットのおおまかな位置を推定することができた。

精巣器官培養法を用いた精子形成に対する不均一放射線照射場影響に関する検討

Application of an ex vivo organ culture method to investigate impacts on spermatogenesis following exposure to intensity- and distribution-modulated radiation fields

福永久典¹、神長輝一²、宇佐美德子³、小川毅彦⁴、Kevin Prise¹、横谷明德²

1 QUB-CCRCB、2 QST-東海、3 KEK-PF、4 横市大院-生命医科学

背景: 低線量の放射線あるいは低線量率の放射線による被ばく影響の特徴は「その不均一な線量分布」にある。高線量域においては照射範囲内の全細胞を放射線トラックが複数回通過する(ヒットする)と確率的にみなされるが、低線量域では放射線がヒットする細胞は全体の一部に留まることになる。すなわち、照射範囲内において「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」という状況が生じる。このような不均一な線量強度分布が生じる低線量域では、高線量域のように線量依存的に生物学的影響を推定することが出来ず、放射線による被ばく影響の評価を困難にしてきた。

目的: 本研究では、放射光 X 線マイクロビームを用いて「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」状況を人為的に作り出し、不均一放射線照射場が精子形成に与える生物学的影響について検討する。

方法: 2011 年に我々の共同研究グループによって精子幹細胞から生殖能のある精子の形成までの誘導を可能とする器官培養法が開発された(Sato et al. *Nature* 2011;471:504-7)。この系を応用して、器官培養上の精巣組織(*ex vivo*)に対して放射光 X 線マイクロビームを用いた精密かつ局所的な照射を行うことによって、これまで実現不可能だった精子形成に対する不均一放射線照射場影響をリアルタイムで顕微鏡下に観察した。

結果: まず、精巣組織全体に均一に X 線を照射して精子形成を検討し、線量依存的に精子形成が一次的あるいは永久的に阻害されるのが確認された。これらは臨床的に一時的な不妊、永久不妊に相当するものと考えられた。さらに、マイクロビーム照射範囲を操作し、精巣体積約 50%に当たるように 5Gy を照射した場合(すなわち 2.5Gy 換算相当)と、2.5Gy を全体に照射した場合で、精子形成阻害の程度に明らかな違いが認められるのが確認できた。

考察: 「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」という不均一放射線照射場条件では、同じ照射線量であっても精巣組織内の空間的な照射分布条件の差異によって精子形成に対する放射線影響が変わることが示された。今後、我々が開発した実験方法を用いることによって、低線量あるいは特殊な放射線環境下での精子幹細胞の生物学的変化をより詳細に検証できるようになるものと期待される。

μSR の生命科学への展開へ向けて —タンパク質におけるミュオン停止位置の解析—

菅原洋子¹、藤田貴久¹、柳原功¹、山村滋典¹、A. D. Pant²、幸田章宏²、
下村浩一郎²、髭本亘^{3,4}、石田勝彦⁵、楠木正巳⁶、三輪(有賀)寛子⁷、
F. L. Pratt⁸、藤牧拓郎⁶、白木一郎⁶、鳥養映子^{3,6}、永嶺謙忠²

1 北里大院理、2 IMSS KEK、3 ASRC JAEA、4 東工大、5 理研、6 山梨大、
7 北大触媒研、8 ISIS

ミュオン科学の生命現象解明への展開を目指して、シトクロム c など電子伝達に係るタンパク質を中心にμSR 解析を進めている。μSR データの理解のためには、ミュオンがタンパク質のどの部位に停止したかを明らかにすることが必要不可欠である。

タンパク質はすべてのタンパク質に共通なペプチド結合部位(主鎖)と、アミノ酸の種類に依存して構造の異なる側鎖から構成されている(図1)。主鎖からの情報の抽出を目的として、側鎖が H のグリシン($\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COO}^-$)(Gly)と、そのオリゴマーでペプチド結合をもつグリシルグリシン(Glygly)についてμSR 測定を行った。緩和スペクトルには明確な差異が認められた(図2)。第一原理計算の結果[1]を参照し、アミノ酸の末端のカルボキシル基($-\text{COO}^-$)に停止したミュオン(Gly)と、ペプチド結合($-\text{CONH}-$)に停止したミュオン(Glygly)の振る舞いの差異を反映していると理解される。また、シトクロム c、ポリグリシンにおいて

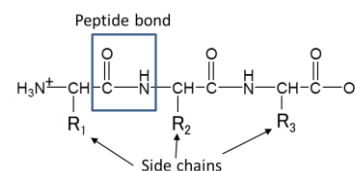


図1 タンパク質の構造

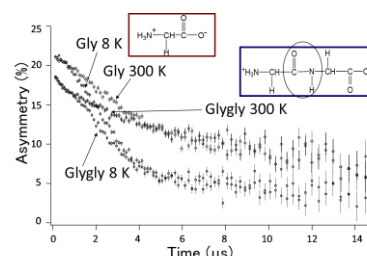


図2 グリシン、グリシルグリシンのμSR スペクトル(ZF)

て縦磁場 20G 近傍で緩和の極大が観測されているが、これに対応するピークが Glygly でのみ観測され(図3)、ペプチド結合に由来する現象であることを明らかにすることができた。今後、このピークが ^{14}N の四極子モーメントに由来する準位交差共鳴か、また、この現象にタンパク質の 2 次構造依存性がみられるか等を明らかにしていくとともに、芳香族アミノ酸側鎖に注目した解析へと展開させていくことを予定している。

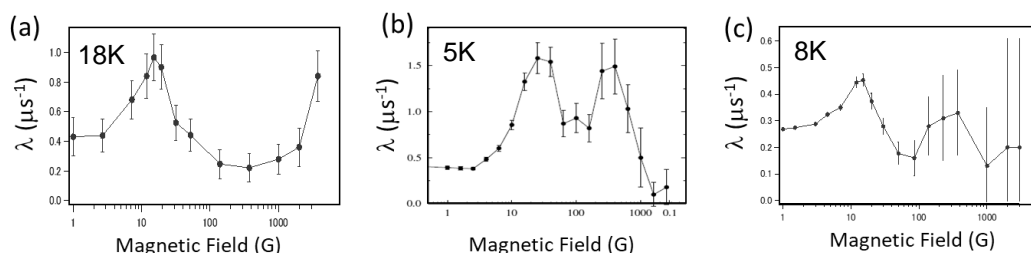


図3 シトクロム c(a)、ポリグリシン(b)、グリシルグリシン(c)の緩和パラメータ(λ)の縦磁場依存性

[1] A. D. Pant et al., JPS Conference Proceedings (in press).

微小管脱重合反応を推進する 遷移段階 KIF2-チューブリン複合体の溶液解析

Catalytic Mechanism of Microtubule Depolymerization via KIF2-Tubulin Transitional Conformation

小川 覚之¹、西條 慎也²、清水 伸隆²、蔣 緒光¹、廣川 信隆¹

1 東京大学・大学院医学系研究科・細胞生物学解剖学
／分子構造動態病態学講座、2 KEK-放射光

細胞の骨格である微小管は KIF2 というモータータンパク質により解体(脱重合)、その長さが制御されている。少ない数の KIF2 が ATP を使って巨大な微小管を、先端から順番に効率良く解体することは知られていたが、それを可能にするメカニズムはこれまで不明であった。

そこで我々は KIF2 による微小管の脱重合がどのような秩序立った機構により駆動されているのか明らかにするため、脱重合反応の溶液中解析を行なった。我々はサイズ排除クロマトグラフィーの改良に加え、分子量を正確に求めるために多種測定法によるクロスチェックを行ない、さらに効果的に X 線小角散乱解析および X 線結晶解析を組み合わせることにより、KIF2 により微小管脱重合反応が推進される際の遷移段階の複合体の溶液構造を明らかにした。

その結果、ATP を加水分解する過程で、KIF2 分子1つがチューブリン2量体2セットを相手に大きな複合体を形成してまとめて解体することが分かった。つまり KIF2 は少ない分子数で ATP を効率良く利用し微小管を解体する「省エネルギーモーター」であった。微小管の脱重合は神経の伸び縮みや細胞の分裂など生命現象の要となる反応であり、その仕組みを明らかにしたことは神経変性疾患や癌の病態解明の重要な基盤となる。

角層細胞間脂質モデルに及ぼすセラミド化学構造の影響

Effect of chemical structure of ceramides in intercellular lipid model of stratum corneum

小幡蒼子¹、表萌々¹、新井裕子¹、木下祥尚²、清水伸隆³、高橋 浩⁴
1 星薬大、2 九州大、3 KEK-PF、4 群馬大

【目的】皮膚は生体を脱水や遺物侵入から保護しているが、その物理的保護作用の中心をなすのは「角層」の細胞間脂質が形成するラメラ構造である。角層は、ケラチンを主とした角層細胞と細胞間脂質で構成され、細胞間脂質は約 13 nm の長周期ラメラと約 6 nm の短周期ラメラが六方晶あるいは直方晶の充填構造をとる。これまでの多くの研究から、皮膚のバリア機能の低下が規則的な脂質配列の乱れに対応する可能性が示されてきた。細胞間脂質の微細構造変化や、適用される製剤成分との相互作用を詳細に調べることは、皮膚のバリア機能の制御が必要な経皮吸収型製剤や化粧料の開発において重要である。細胞間脂質は、数百種類にのぼるセラミド、コレステロールおよびその関連化合物や遊離脂肪酸など多数の構成成分を含んでおり、種々の測定において角層自体を使用する実験は結果的に測定データが不明瞭となり正確な評価が難しい。そこで、セラミド[NDS] (CER[NDS])、セラミド[NP] (CER[NP])を中心に代表的な細胞間脂質を含む脂質モデルを調製し、その特性を調べた。【方法】脂質モデルの調製 : CER[NDS]、CER[NP]、コレステロール(CHOL)、パルミチン酸(PA)をクロロホルム : メタノール混液に溶解した。有機溶媒を留去し、精製水を加え水和させ、凍結乾燥を行った。示差走査熱量(DSC)測定 : 得られた脂質モデルをアルミパンに充填し、熱挙動を調べた。放射光 X 線回折 : 脂質モデルをガラスキャピラリーに充填し、温度走査小角・広角同時測定を行った。【結果・考察】CER[NDS]あるいは CER[NP]、CHOL、PA の等モル混合物では、相転移は比較的高温で生じる傾向が認められたが、CER[NDS]および CER[NP]を共融混合物として配合した脂質モデルでは、角層内で生じる相転移に類似した温度で相転移が得られた。また、CER[NP]モデルでは、赤外吸収スペクトルのうち水酸基に由来する吸収が大きかった。CER[NDS]および CER[NP]を共融混合物として配合したモデルでは、実際の細胞間脂質の熱特性と類似した挙動が得られ、脂質モデルとしての有用性が示唆された。細胞間脂質の主要成分のなかから、代表的な成分に絞り込み脂質モデルを調製することにより、角層内部で生じる変化の一部を明瞭に観察することが可能となり、種々の測定で得られるデータを正確に解析することができた。角層内ではきわめて多数の脂質が複雑に相互作用しており、結果的に測定で得られる信号は不明瞭であるが、外部刺激から生体を保護する強固なバリア機能を形成すると考えられる。

食品巨大糖タンパク質プロテオグリカンの溶存状態

Solution properties of a glycoprotein proteoglycan

渡邊 康・(国研)農研機構

タンパク質や多糖などの生体高分子の関連する多様な分野において、それらの溶液中の構造特性解析は重要である。そのなかでも、食品に関連する粘性糖タンパク質は高分子量で大量(60-90 wt%)の糖鎖が結合しているため、その結晶化や NMR 解析は難しく溶存状態の知見は十分でない。軟骨プロテオグリカンは細胞間マトリックスの主要構成成分であり、イオン成分の膜透過性を調整するなど生理的に重要な機能や構造体構成成分としての物理的な機能を果たしている。本研究では、高分子量糖タンパク質の溶液中の構造物性評価における溶液散乱測定の有効性の検証を進行中である。本年は食品関連糖タンパク質であるサケ軟骨プロテオグリカンの溶液物性についての評価結果について報告する。

水溶液中の分子量はレーザー光散乱測定により評価した。水溶液中の分子鎖構造は、放射光小角X線散乱測定により評価した。溶液X線散乱測定装置は、高エネ機構 PFBL10C(検出器:一次元位置敏感比例係数装置、X線波長:0.1488 nm、試料検出器間距離:1.98 m)を使用した。得られた散乱データは試料直前のイオンチェンバーの出力により入射X線強度の補正をした。

光散乱測定の結果として、サケ軟骨プロテオグリカンは生理的な条件では、重量平均分子量は約40万で、ゲル濾過クロマトグラフィー分離により、分子量は約100万から数万の分布がある予備的結果を得た。水溶液中のサケ軟骨試料の主要成分の分子鎖構造は、排除体積を持ったほどけた構造であり、高分子鎖の堅さの指標である持続長は約9 nmと評価された。今後、さらに測定条件を精査することによりサケ軟骨プロテオグリカンの溶液中の分子特性解析を深める予定である。

KEK-PF 共同利用クライオ電子顕微鏡の 準備状況

Current Status Toward User-Operation of Cryo-EM in the KEK-PF

湯本史明 1、田辺幹雄 1、安達成彦 1、川崎政人 1、千田俊哉 1
1 KEK 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター

放射光 X 線を利用した生体高分子の立体構造解析は、欠かせない技術として生命科学の発展や創薬プロセスに貢献してきた。その一方で、近年の電子直接検出器や位相板、画像解析技術等の向上により、クライオ電子顕微鏡を用いたタンパク質(および、その複合体)の単粒子解析技術においても近原子分解能の解析が可能になってきた。現在世界各地の大学あるいは研究所では、結晶化の難しいタンパク質複合体等の構造解析を推進するため、急速に最新鋭の電子顕微鏡装置の導入が進められている。特に、Diamond Light Source(イギリス)、ESRF(フランス)をはじめ、放射光施設においても、X 線結晶構造解析や X 線小角散乱解析(SAXS)と合わせた複数の技術を用いて解析を行う相関構造解析をリードしていくため、クライオ電子顕微鏡解析の環境を整える動きが活発になってきている。日本においても、日本医療研究開発機構(AMED)による創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業(BINDS)などを通じて、最高峰のクライオ電子顕微鏡装置の導入が進められている。この中で、KEK-PF においては共同利用のための電子顕微鏡施設の設定とクライオ電子顕微鏡装置(Talos Arctica(Thermo Fisher Scientific))の導入が現在進行中である。

本発表では、クライオ電子顕微鏡の共同利用に向けた仕組み作りと、クライオ電子顕微鏡室の設立及び電子顕微鏡装置の導入作業の進捗状況を報告する。将来的には構造生物学研究センターの構造生物実験準備棟の施設を利用して、サンプルの最終調製を行うことや、各ユーザーが適切な手法で調製してきたサンプルを持ち込み、専門家と共に計測を行うことができる施設にしていきたいと考えている。また、それらのサンプルを用いて、大規模自動結晶化・観察装置を使った結晶化条件のスクリーニング、X 線結晶構造解析、SAXS、クライオ電子顕微鏡のデータ測定を並行して行うことで相関構造解析を可能とする環境を構築していきたい。

LRH-1-DNA-Coactivator 複合体の相関構造解析

Hybrid methods on LRH-1-DNA-Coactivator Complex

○湯本史明・KEK-PF、サブリン エリーナ・UCSF、清水伸隆・KEK-PF、
フレッテリック ロバート・UCSF、千田俊哉・KEK-PF
1 KEK-PF、2 UCSF

Liver Receptor Homolog-1(LRH-1)は、核内受容体であり、転写因子として様々な遺伝子の発現制御を行っている。ヒトLRH-1は初期発生をはじめ、肝臓、小腸、膵臓、卵巣など様々な臓器の発生過程に関わり、ステロイド合成やコレステロールの恒常性の維持に関与している。一方、LRH-1は癌細胞の異常増殖にも関わることで知られ、創薬ターゲットタンパク質としても認識されている。実際に、米国ではLRH-1をターゲットにした薬剤候補化合物スクリーニングが行われ、いくつかの報告がある。LRH-1タンパク質のドメイン構造としては、N末端ドメイン(NTD)、Zinc Finger と Ftz-F1 ヘリックスから構成されるDNA結合ドメイン(DBD)、天然変性領域を含むヒンジ領域(hinge)、そしてリガンド結合ドメイン(LBD)から構成されている。これまでにDNAを結合したDBD、リガンドを結合したLBD、LBDとコアクティベーター由来ペプチド、LBDと β カテニンアルマジロ領域の複合体、LBDとDAX-1 LBDとの複合体の立体構造解析が行われてきた。このようにLBDを中心として、LBDとコアクティベーターやコリプレッサーとの相互作用、活性化あるいは抑制の分子機構については多くの成果が報告されているものの、LRH-1全長タンパク質としてそれぞれのドメインがどのように協調的に機能するかについては不明のままである。

そこで、我々はLRH-1全長タンパク質の構造解析を試みている。ヒトLRH-1全長分子について大腸菌を用いた大量調製系を確立し、Cyp7A、inhibin α Dax-1といったLRH-1が発現制御を行う遺伝子のプロモーターに由来するDNA 2重鎖との複合体として、安定に調製できることを確認している。また、この複合体中のLRH-1はCoactivatorに由来するペプチド断片を結合することから3成分複合体としての調製も可能である。これまで、結晶化条件のスクリーニングを行ってきたが、結晶化には至っていない。また並行してX線溶液散乱解析を行い、さらにネガティブ染色したサンプルについて電子顕微鏡を用いた解析を試みている。本発表ではX線と電子顕微鏡を併用した、LRH-1による遺伝子発現制御の分子機構の解明に向けた取り組みについて報告する。

ヒトモデル消化液中での胆汁酸混合ミセルの形態変化におけるコレステロールの影響

Effect of cholesterol on morphology of bile salt based mixed micelles in human model digestive juices

相澤秀樹¹、小竹(奈良)英一²、市川創作³

1 摂南大薬、2 農研機構食品総合研究部門、3 筑波大生環系

医薬品もしくはサプリメントに含まれる脂溶性有効成分は、腸内で胆汁酸混合ミセルに可溶化され、腸で吸収される。したがって胆汁酸混合ミセルは、脂溶性有効成分の可溶化と吸収に大きな役割を果たしており、胆汁酸混合ミセルの組成、構造、腸への脂溶性有効成分の吸収性との関係を明らかにすることは、脂溶性有効成分の体内吸収を制御する技術開発に有用な基礎的知見となる。これまで我々は、ヒトの十二指腸における胆汁酸混合ミセルの組成にもとづいて、胆汁酸、モノオレイン、およびオレイン酸、1-パルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン(MPPC)、あるいは1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)のどちらか一方を任意の割合で混合した胆汁酸混合ミセルの構造を明らかにした結果、MPPCあるいはPOPCの割合によらず混合ミセルは円柱状で形状が変化することなく大きさが変化することがわかった^[1-2]。本研究では、本来の胆汁酸混合ミセルの成分の一つであり血液成分の一つであるコレステロールを、これら組成の異なる混合ミセルに添加し、フォトンファクトリー BL-6A および 10C に設置されている小角 X 線装置を用いて測定し散乱曲線を得た。その散乱曲線に幾何学構造モデルに基づく理論散乱曲線をあわせることで、これら組成の異なる混合ミセルの大きさと形状を求めた。その結果、コレステロールの有無にかかわらず、また MPPC あるいは POPC の割合によらず混合ミセルは円柱状で形状が変化することなくその大きさが変化することがわかった。コレステロールは、ミセルの変化過程には影響を与えなかったが、ミセルの大きさに若干の影響を与えた。この結果は、昨年発表した緑黄色野菜に多く含まれる脂溶性食品成分 β -カロテンが胆汁酸混合ミセル内部からヒト腸管モデルである Caco-2 細胞へ吸収量を測定した際の胆汁酸混合ミセルの構造変化を検討した結果^[3]と同じだったことから、コレステロールは、ミセルの構造変化に影響をあたえないことが推察された。

[1] Hernell, O., Stagger, J. E., Carey, M.E., *Biochemistry*, **29**, 2041-2056 (1990).

[2] H. Aizawa, S. Ichikawa, A. Nagao, 第3回物構研サイエンスフェスタ, 2015年3月

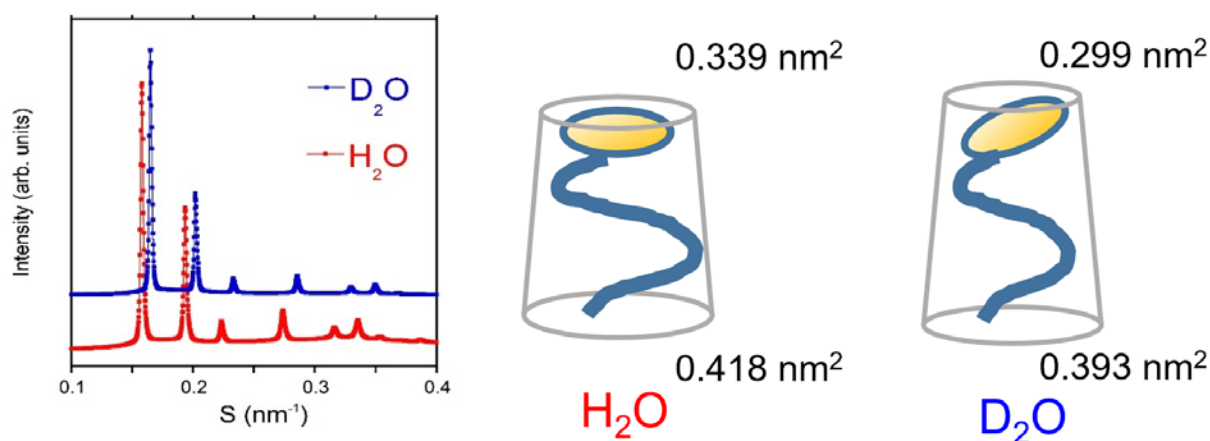
[3] H. Aizawa, E. Kotake-Nara, S. Ichikawa, 2016年度量子ビームサイエンスフェスタサイエンスフェスタ, 2017年3月

脂質立方相の構造パラメータに対する 重水置換効果の再検討

Reexamination of water isotope effect on structural parameters of lipidic cubic phase

高橋 浩, 定直高太郎
群馬大院理工

重水と軽水では僅かであるが、融点、沸点等の物理的性質に差がある。また、他の分子との相互作用においても差が存在する。これが原因となって、細胞増殖速度の低下、日周期リズムの遅れなど、様々な生理機能において重水置換効果が生じる。しかし、詳細な分子機構は、ほとんどわかっていない。その解明を目指し、様々な生体分子に対する重水の置換効果が研究されてきている。我々も X 線回折測定により、様々な生体脂質分子集合系で研究を行い、重水による格子定数の減少効果を見出し^[1]、過去のフェスタにおいても、その結果を報告してきた。我々が調べた範囲では、最も大きく格子定数が変化した系は、モノオレイン・水系が形作る両相連続立方相であった。本研究では、このモノオレイン水系の空間群 $Pn3m$ の立方相に対する重水置換による構造変化をより詳細に調べた。解析は、簡単な構造モデルを構築し、そのモデルから計算される X 線回折強度と観察強度を比較することで行った。重水置換によっても膜構造中のモノオレイの有効分子体積は変化しないと仮定し、上記の構造モデルと合わせて検討した結果、下図に模式的に示したように、構造パラメータの1種である界面面積が重水置換によって減少することを見出した^[2]。この結果は、水素結合エネルギーの違いから、定性的には理解できることを示すと伴に、立方相から逆へキサゴナル相への転移に対する重水置換効果についても報告する。



1. H. Takahashi, K. Jojiki, *Chem. Lett.* **41** (2012) 1101–1103.
2. H. Takahashi, K. Jojiki, *Chem. Phys. Lipid* **208** (2017) 52–57.

PF-AR NW12A でのオフライン顕微分光装置の開発と
その利用について
**The Development of Offline Spectroscopic System
at PF-AR NW12A**

引田理英^{1,2}、山田悠介^{1,2}、松垣直宏^{1,2}、平木雅彦^{2,3}、千田俊哉^{1,2}

¹高エネ機構 物構研 フォトンファクトリー

²総研大 高エネルギー加速器研究科

³高エネ機構 共通 機械工学センター

現在の構造生物学研究においては、X線結晶構造解析法だけではなく、クライオ電子顕微鏡や分光法等の様々な手法を多角的に利用した研究が展開されるようになってきている。そこで KEK-PF のタンパク質結晶構造解析用ビームラインの AR-NW12A では、これまで行っていたタンパク質の X 線回折実験と併せて、レーザー光や白色光を光源としたタンパク質溶液及び結晶の分光測定が可能な装置の開発を行っている。本装置は X 線回折実験と分光実験の同時測定を可能としたオンライン顕微分光装置と、オフラインでも分光測定が可能なオフライン顕微分光装置の開発を行っている。

オフライン顕微分光装置は、AR-NW12A のコントロールキャビンに建設されたレーザーブース内に設置しており、結晶照射点での白色光の集光径は 100 μm になっている。またゴニオメータ、クライオヘッドも使用可能になっており、室温測定、低温測定どちらでも選択可能となっている。本ポスターでは、本装置の概要及び今後の利用について報告する。また、開発中のオンライン顕微分光装置について、その進捗を報告する。

本顕微分光装置の開発は主に、PDIS(創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業)および BINDS(創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム)からの支援を受けて行われた。

中性子散乱による蛋白質のドメイン運動の研究 Investigation on domain motion of protein by neutron scattering

¹杉山正明・¹井上倫太郎・²小田 隆・³荳口友隆・²佐藤 衛
¹京都大学原子炉実験所・²横浜市立大学・³慶応義塾大学

蛋白質の機能発現とその構造揺らぎ、特に内部のドメイン運動は密接にかかわっていると考えられており、溶液中の蛋白質の内部運動の解明が重要視されている。この蛋白質内部の運動は空間スケールで 10-100Å、時間スケールで 10-1000nsec と予測され、計算機を用いた研究が主として行われてきた。これはこの時空間の運動を実験的にとらえることが非常に困難であることに由来する。この困難さを克服し、実験的にこの時間・空間スケールの運動を捉えるアプローチの一つが MD-SAXS 法である。MD-SAXS 法では実測の SAXS データの結晶構造からずれを内部運動の揺らぎによる起因するとし、MD 計算により SAXS データのずれを再現する内部運動を求めている。

MD-SAXS 法は運動の時間的・集団的平均値である SAXS データを取り扱っており、その意味において「直接」内部運動を見ていないという欠点がある。(例えば運動の時間情報は欠落してる) そこで我々は中性子スピンエコー法を用いて上述の時間・空間スケールでの溶液中の蛋白質の中間散乱関数 $I(Q,t)$ を測定し、内部運動の解析を行った。中性子スピンエコー法で得られる中間散乱関数は3つの運動(併進拡散・回転拡散・内部運動)を含んでいる。まず、動的散乱により併進拡散を評価することで、中性子スピンエコー法で得られる中間散乱関数よりこの成分を除去した。次に長時間 MD 計算 (-1000nsec) を行い回転拡散・内部運動を見積り、更に主成分解析を行って、内部運動に含まれている運動と実際の測定された中間散乱関数との関係を明らかにした。

実験・解析の詳細は当日のポスターで紹介する。