

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2007 ～ 2009
課題番号：	19770139
研究課題名（和文）	異常分散・X線小角散乱を利用した無配向生体高分子の2原子間距離計測
研究課題名（英文）	Studies on metal-containing bio-macromolecules by using anomalous solution x-ray scattering techniques
研究代表者	
	秋山 修志 (AKIYAMA SHUJI)
	名古屋大学・大学院理学研究科・講師
	研究者番号：50391842

研究成果の概要（和文）：

金属原子を内包した生体高分子を将来的な研究対象の一つとして見据え、鉄原子の吸収端近傍での定量的な散乱計測、および差散乱導出について基礎的な技術調査を行った。異なる波長で記録された散乱データを定量的に強度補正するための技術として、複数の等価な観測ポートを有した測定セルを開発し、また、標準タンパク質を単分散状態で再現性良く調製する実験手順を確立した。

研究成果の概要（英文）： Anomalous x-ray solution scattering has been expected to serve as one of the powerful techniques to evaluate distributions of anomalous atoms within bio-macromolecules under physiological solution conditions. In order to apply this method to iron-containing proteins, a survey of optimal measurement conditions near K-edge of iron atom was conducted by using standard protein samples.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：溶液散乱, X線, 小角散乱, 異常分散, 分子量

1. 研究開始当初の背景

構造生物学のみならず生物学の広い分野の研究者にとって、生体高分子（蛋白質や核酸）の分子内／分子間距離を溶液中で計測する技術は極めて重要であり、NMRやFRETなどが頻繁に利用されている。

NMRで観測されるNOE信号は核間距離の6乗に反比例し、プロトンであれば5～6Åまでの距離情報を高感度で検出する。しかし、そのためにはNMR信号の帰属が必須であり、最新の無細胞発現系を利用した特異的アミノ酸標識法を用いても分子量4万程度と

いう限界がある。

FRETは異なる2種類の蛍光色素を蛋白質に修飾し、励起された片方の蛍光色素（ドナー）から他方の蛍光色素（アクセプター）への励起エネルギー移動効率を計測する。NMRのように試料の分子量による制限を受けないが、色素を修飾することができるのは蛋白質表面の特定アミノ酸に限られる。また、色素の蛍光強度が周辺の化学環境に大きく依存するため、計測できる距離の絶対的な精度は必ずしも高くない。

2. 研究の目的

本課題で提案する「異常分散・X線小角散乱を利用した距離計測」の特徴は、試料の種類や分子量による制約の低い距離計測手段の一つであり、共鳴原子散乱信号から絶対的な距離情報が引き出せる点にある。しかし、その信号は非共鳴成分に比して極めて小さく、定量的な強度測定技術、再現性の高い試料調製技術の整備が必要となる。研究期間は3年を計画しており、その間は基盤技術の整備に努め、提案した手法が現実的に実現可能であるかどうか見極めをつける。

3. 研究の方法

(1)鉄吸収端近傍での定量的散乱計測

人体には重さにして約4グラムの鉄が存在し、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、フェリチン等のタンパク質によって細胞内の鉄濃度は恒常的に保たれている。種々のタンパク質分子は鉄原子をヘムや鉄硫黄クラスターといった形で取り込むことにより、酸素運搬、酸化還元反応、電子移動といった高度な機能を獲得している。このように鉄原子を含んだタンパク質分子を将来的な研究対象の一つとして見据え、鉄原子の吸収端近傍で定量的な散乱計測、および差散乱導出を行うための技術調査を行った。

(2)多連セルの開発

異常分散を含めた小角散乱測定をより簡便に行うため、「多連セル」と「散乱計測用マイクロセルの自動洗浄装置」の開発を行った。

(3)単分散・標準タンパク質試料の調製

異常分散小角散乱を検出する際、試料からの散乱を異なる波長で記録し、それら間で定量的に加減算を行う。従って、個々の散乱強度は入射ビーム強度や検出感度について厳密に規格化されている必要があり、単分散状態に調製された標準タンパク質試料を用いた強度補正が必要不可欠となる。単分散・標準タンパク質試料を再現性良く調製するための技術的検討を行った。

4. 研究成果

(1)鉄吸収端近傍での定量的散乱計測

理研構造生物学ビームライン I (BL45XU)にて、カメラ長：2,250 mm、試料温度：15 度、検出器：イメージンテンシファイア+CCDという条件で実験を行った。散乱計測の定量性を判断するための基準として、鉄原子を含まないウシ血清アルブミンの散乱曲線を13.8 keVの入射ビームを用いて記録した。図1に示されるように、タンパク質濃度：2.7 mg/ml、光路長：3.0 mm、露光時間：0.5 sの条件でS/N比の高い小角散乱データが得られた。

一方、7.11 keV近傍では試料による自己吸収の効果が極めて著しく、最初に行った予備計測で定量的な散乱データを取得することはできなかった。そこで、7 keV近傍での散乱測定に最も適したセル光路長の検証を行った。より短い光路長について予備的な検証を行ったところ、図1のように1.5~0.5 mmの領域で良好な結果を得た。この結果は、最適光路長に関する一般則におおむね合致するもので、光路長1 mm前後が最適であると判断された。

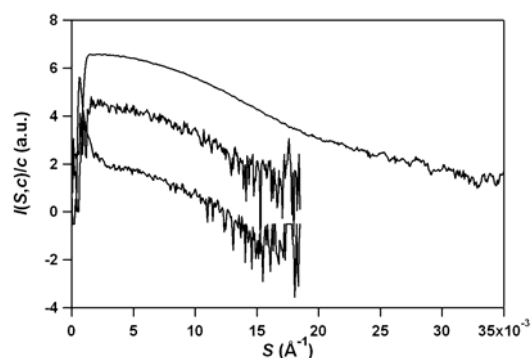


図1 ウシ血清アルブミンのX線小角散乱曲線。最適な条件を調べるため、異なる観測波長・光路長で測定を行い評価した。グラフ上部より、L = 3.0 mm at 13.8 keV, L = 1.5 mm at 7.11 keV, L = 0.55 mm at 7.11 keV。L = 3.0 mm at 7.11 keVでは自己吸収効果が著しく、定量的な散乱計測は不可能であった。

(2)多連セルの開発

多連セルを作成する上で問題となる点は、異なる観測ポートで光路長、窓材の歪、窓材の平行性などを厳密に同一にせねばならない点である。各観測ポートを独立に設計して窓材を個別に調整するのが最もシンプルな方法であるが、どうしても観測ポートごとに微妙な差が生じてしまう。その解決策として、全観測ポートを一枚の窓材で一様にシールする方法を考案し、その試作機を作成した(図2)。このような方法を採用することで、観測ポートごとの個性をより小さく、そして

セル全体をより安価に作成することができ
る。また、これらの工夫によっても除ききれ
ない観測ポートごとの差は、次項に記す単分
散・標準タンパク質試料を用いて更生する計
画である。



図2 定量的な散乱計測を行うための多連
セル。図中のセルには8個の独立したほぼ等
価な観測ポートが設置されている。

(3) 単分散・標準タンパク質試料の調製

X線小角散乱測定から原点散乱強度 ($I(0)$)
と呼ばれる量が見積もられるが、これを試料
濃度 c (g/l) について規格化した値 ($I(0)/c$)
は重量平均分子量に比例するという性質を
持つ。ゲルろ過クロマトグラフィーにおける
溶出位置などと異なり、 $I(0)/c$ は対象分子の
形状因子に依存しない分子量推定を可能と
する。

散乱強度 (もしくは分子量) の標準試料と
して利用するためには、標準タンパク質を単
分散状態で再現性良く調製し、かつその濃度
を精度よく定量する必要がある。変性や凝集
を起こした標準タンパク質は、それが全体の
わずか数パーセント程度の割合であったと
しても、 $I(0)/c$ の見積もりに無視できない影
響を及ぼす。また、標準タンパク質が単分散
状態で調製されていても、試料濃度 c の見積
もりが不十分な場合、それに応じた誤差が
 $I(0)/c$ に伝搬されてしまう。このように、
 $I(0)/c$ は散乱強度推定を可能とする魅力的
な量であるが、その恩恵に与るには慎重な試
料調製と実験手法が要求される。

汎用性の高い標準タンパク質をリストア
ップし、それらの流体力学的諸性質を動的
光散乱や分析超遠心で詳しく検証すること
で、極めて単分散に近い状態で調製する手
法を確立した (図3)。単分散状態が保障さ
れた標準タンパク質について、並進拡散係
数と沈降定数から流体力学的な分子量 (MM_H)
を見積り、同時に、X線小角散乱測定から
 $I(0)/c$ を決定した。 MM_H は $I(0)/c$ と比例
関係にあり、平均して 8% 以内の精度で
分子量推定が可能

であることが示された。 $I(0)/c$ による分子
量推定の限界や標準タンパク質の品質管理
について議論を取りまとめ、その内容を専
門誌に発表した。

確立された単分散・標準タンパク質試料
の調製法は、今後、異常分散信号を異なる
波長で記録し、それらの中で定量的に加減
算を行う際の標準試料として大いに役立つ
ものと期待される。

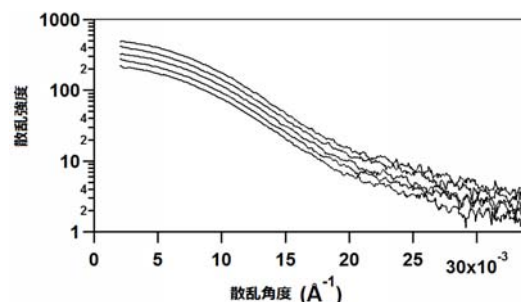


図3 単分散状態で調製されたウシ血清ア
ルブミンのX線小角散乱曲線。図中、調製後
16時間、28時間、39時間、56時間、59時
間の散乱曲線が下より上の順で示されてい
る。溶媒条件や温度を適切に管理すること
で、少なくとも2日、最大1週間程度の保
存が可能である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

① Akiyama S., “Quality control of protein standards for molecular mass determinations by small-angle X-ray scattering”, *J. Appl. Cryst.*, **43**, 237-243 (2010), 査読あり。

② 秋山 修志, “X線小角散乱でナノ空間を照らし出す”, *現代化学*, **468**, 54-58 (2010), 査読なし (解説記事)。

③ Inaba K., Suzuki M., Maegawa K., Akiyama S., Ito K. and Akiyama Y., “A Pair of Circularly Permutated PDZ Domains Control RseP, the S2P Family Intramembrane Protease of Escherichia coli”, *J. Biol. Chem.*, **283**, 35042-35052 (2008), 査読あり。

④ Akiyama S., Nohara A., Ito K. and Maéda Y., “Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome”, *Mol. Cell*, **29**, 703-716 (2008), 査読あり。

⑤ 秋山 修志, “リアルタイム X 線小角散乱で観察した藍藻時計タンパク質の離合集散ダイナミクス”, *放射光*, **21**, 305-312 (2008), 査読あり (解説記事)。

⑥ 秋山 修志, “リアルタイムX線小角散乱でみた藍藻時計タンパク質の離合集散ダイナミクス”, *生物物理*, **49**, 135-136 (2008), 査読あり (解説記事) .

⑦ Akiyama S., Nohara A., Ito K. and Maeda Y., “ Real-Time Small-Angle X-Ray Scattering Observation of Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Periodosome”, *SPRING-8 Research Frontiers*, 24-25 (2008), 査読あり (解説記事) .

[学会発表] (計 2 件)

① 秋山 修志, “Reproducible Preparations of Molecular Mass Standards for Small-angle Solution Scattering”, 生物物理学会中部支部講演会, 2010 年 3 月, 岡崎.

② Akiyama S., “Reproducible Preparations of Molecular Mass Standards for Small-angle Solution Scattering”, XIV International Conference on Small-Angle Scattering, Sep. 2009, Oxford, UK.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 修志 (AKIYAMA SHUJI)

名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号 : 50391842