

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20550153

研究課題名（和文） 放射光真空紫外円二色性による生体分子の高次元構造解析

研究課題名（英文） STRUCTUE ANALYSIS OF BIOMOLECULES BY SYNCHROTRON RADIATION  
VACUUM-ULTRAVIOLET CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY

研究代表者

大前 英司 (OHMAE EIJI)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：30284152

研究成果の概要（和文）：

放射光真空紫外円二色性（VUVCD）分散計を用い、（1）アミノ酸配列レベルでのタンパク質の二次構造予測法の確立、（2）ジスルフィド結合欠損リゾチームの網羅的二次構造解析、（3）糖類・多糖類の VUVCD スペクトルの実験的・理論的解析、（4）酸性糖タンパク質（AGP）の二次構造解析、（5）タンパク質のアミロイド線維構造の解析など、これまでの円二色性分散計では不可能だった生体分子の高次元構造解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular dichroism (VUVCD) spectroscopy was applied for the detailed structural analysis of biomolecules which was difficult by a conventional CD spectroscopy as follows: (1) prediction of amino acid sequence of protein secondary structures; comprehensive secondary-structure analysis of disulfide variants of lysozyme; (3) experimental and theoretical analyses of VUVCD spectra of mono- and polysaccharides; (4) secondary structure analysis of acid-glycoprotein; and (5) structural analysis of amyloid fibrils.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物物理化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：放射光，真空紫外円二色性，タンパク質，二次構造解析，ニューラルネットワーク法，糖類

## 1. 研究開始当初の背景

円偏光二色性（CD）は不斉炭素をもつ光

学活性物質の立体構造を敏感に反映し、生体分子の重要な構造解析法となっている。しか

し、これまでの通常光源を用いた市販の装置では、短波長側は水中で 190 nm 程度までしかスペクトル測定ができず、高エネルギー遷移に基づく構造解析が不可能だった。放射光を用いた真空紫外円二色性 (VUVCD) 分散計ではより短波長領域まで測定が可能であり、情報量が一段と増えるため詳細な構造解析が可能となる。このような VUVCD 装置の開発は 1980 年代初頭から米国 (BNL) で始まり、近年、英国 (SRS, Diamond)、ドイツ (BESSY)、デンマーク (ASTRID)、中国 (BRSF)、フランス (SOLEIL)、オーストラリアなど多くの国々の放射光施設が競って開発を進めている。広島大学放射光科学研究センターでもビームライン 15 を使い、全光学系を真空下に保つことにより、水中で 140 nm~320 nm の波長領域において、-30~70°C の温度範囲で VUVCD スペクトルが測定できる装置の開発に成功し、生体分子の精密な構造解析が可能になった。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の VUVCD 分散計を用いて、主としてタンパク質・糖類・核酸などの生体分子の VUVCD スペクトルを水溶液中で測定し、時間依存密度汎関数法、ニューラルネットワーク法、および各種分光学的解析法を用いて VUVCD スペクトルの帰属を行い、生体分子の高次元構造解析法を確立する。具体的には以下の 3 点について研究を展開し、これまで未開拓であった VUVCD 分光法の、構造生物学および生体関連分野への応用基盤を固めることを目的とする。

- (1) 天然および非天然タンパク質の高精度二次構造解析。
- (2) 糖類・多糖類の VUVCD データベースの構築とコンフォメーション解析。
- (3) 核酸 (塩基・ヌクレオシド・ヌクレオチド) の VUVCD データベースの構築と構造解析。

## 3. 研究の方法

- (1) 天然タンパク質の高精度二次構造解析  
申請者らはすでに 31 種のタンパク質の 160 nm までの VUVCD スペクトルから、各二次構造の成分スペクトルを得て、 $\alpha$ -ヘリッ

クスや  $\beta$ -ストランドの含有率と本数を精度よく予測できることを示した。しかし、CD スペクトルとその二次構造解析プログラム (SELCON3, CONTIN, CDSSTR) からは、二次構造の部位を予測することはできない。そこで本研究では、アミノ酸配列情報から二次構造を予測できるニューラルネットワーク法 (NN 法) を、VUVCD スペクトルから求めた二次構造の含有率と本数の結果に回帰させることで、二次構造の部位も高精度で予測できる新規の構造解析ソフト (VUVCD-NN 法) を開発する。

- (2) タンパク質の VUVCD スペクトルに及ぼす exciton coupling の寄与の同定

タンパク質内部の不斉環境に固定された芳香族残基は、それらの側鎖間の相互作用 (exciton coupling) により遠紫外領域の CD スペクトルに大きく影響を及ぼす。特にトリプトファン (Trp) 残基間の exciton coupling の寄与は大きく、CD スペクトルによる二次構造解析に大きな障害となっている。このような典型的なタンパク質である大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素の 5 つの Trp を他のアミノ酸に置換した変異体の VUVCD スペクトルを測定し、上記で開発した二次構造解析ソフトを用いて X 線構造から予測したスペクトルと比較し、その差から exciton coupling に寄与している Trp 残基を同定するとともに、その影響がどれくらいの真空紫外領域まで及んでいるかを明らかにする。

- (3) 非天然タンパク質の二次構造解析

タンパク質の変性状態や変性中間体の VUVCD スペクトルに、上記で開発した二次構造解析ソフト (VUVCD-NN 法) を適用し、これまで推測の域を出なかった非天然構造の解析法を開拓する。

卵白リゾチームの 4 本のジスルフィド結合を順次欠損した 9 種の変異体の VUVCD スペクトルを測定し、上記で開発した二次構造解析ソフト (VUVCD-NN 法) を用いて、 $\alpha$ -ヘリックスと  $\beta$ -ストランドの保存状態を解析し、立体構造保持における各ジスルフィド結合の役割を明らかにする。また、酸性糖タンパク質の膜との相互作用で誘起される二次構造やアミロイド線維の構造変化を VUVCD-NN 法により明らかにする。

#### (4) 糖類・多糖類のVUVCDデータベースの構築とコンフォメーション解析

糖類の多くは200 nm以下の真空紫外領域（高エネルギー遷移）にしか吸収を持たないため、VUVCDはこれらの構造解析に対して極めて有効である。申請者らはすでにいくつかの単糖類や少糖類のVUVCDスペクトルを160 nmまで測定し、C1位のOH基の $\alpha$ および $\beta$ 配位、他の炭素部位でのOH基の配向（axial, equatorial）、CH<sub>2</sub>OH基の配向（trans, gauche）、グリコシド結合（ $\alpha$ -1,4,  $\beta$ -1,3）の種類などのVUVCDに及ぼす影響を明らかにしている（*Carbohydr. Res.* 2004）。これらの成分スペクトルの遷移モーメントを、糖類のX線構造をもとに水和水の寄与も含めた時間依存密度汎関数法により計算し、VUVCDスペクトルの理論的帰属を行う。

各種中性多糖（デキストラン、アミロースなど）の160 nmまでのVUVCDデータベースを構築し、水溶液中でこれら多糖類が取り得るコンフォメーションを、単糖類やオリゴ糖のVUVCDスペクトルとの比較やデコンボリューション解析により明らかにする。また、硫酸基やカルボキシル基などをもつ電解質多糖（グリコサミノグリカン類など）のVUVCDスペクトルや、カラゲナン等のゾル-ゲル転移によるスペクトル変化を測定し、これら発色団の位置や配位、コンフォメーションのVUVCDへの影響を明らかにする。

これらの糖類の解析結果をもとに、糖タンパク質のVUVCDスペクトルにおける糖鎖の寄与を分離して評価する方法を検討し、X線構造解析やNMRでは解析困難な糖タンパク質の二次構造解析法を開発する。

#### (5) 核酸（塩基・ヌクレオシド・ヌクレオチド）のVUVCDデータベースの構築と構造解析

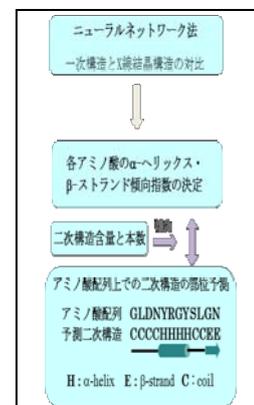
核酸の構成成分である5種の塩基、およびそれらのヌクレオシドやヌクレオチドのVUVCDスペクトルを160 nmまで測定し、VUVCDデータベースを作成する。塩基やリボースの構造の違いやリン酸基のVUVCDへの影響を明らかにするとともに、デコンボリューション解析から塩基と糖鎖の寄与を同定する。これらの解析結果に基づいて、時間依存密度汎関数法によりスペクトルの理論的な帰属を行う。更に、ポリヌクレオチドやDNA、RNAのVUVCDスペクトルのデータベースを構築し、高次構造との

関係を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) アミノ酸配列レベルでのタンパク質の二次構造予測

VUVCD法により $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -ストランドの含有率と本数を90%近い精度で予測できるため、これらの二次構造データを二次構造のアミノ酸配列情報を解析できるニューラルネットワーク（NN）法に組み込むことにより、二次構造部位



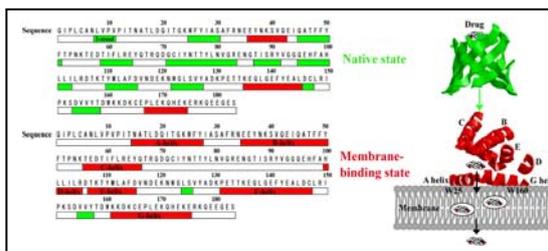
を高精度で予測できる新規構造解析ソフト（VUVCD-NN法）を開発した（*Proteins* 2008）。

### (2) ジスルフィド結合欠損リゾチームの網羅的二次構造解析

4本のジスルフィド結合を順次欠損した卵白リゾチームの13種の変異体のVUVCDスペクトルを170 nmまで測定し、上記で開発したVUVCD-NN法を用いて、 $\alpha$ -ヘリックスと $\beta$ -ストランドの保存状態を解析し、立体構造保持における各ジスルフィド結合の役割を明らかにするとともに、アミロイド形成に関わる $\beta$ -ストランドの部位を予測した（*Proteins* 2009）。

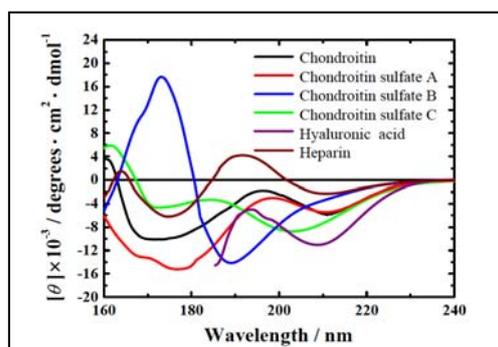
### (3) $\alpha_1$ -Acid glycoprotein (AGP)の二次構造解析

AGPはリン脂質と混合することにより、 $\alpha$ -ヘリックスは14%（3本）から50%（8本）に、 $\beta$ -ストランドは38%（8本）から5.6%（2本）へと変化し、脂質との相互作用により $\beta \rightarrow \alpha$ の大きな二次構造変化が誘起されることがわかった（下図）。VUVCD-NN法により二次構造部位を予測した結果、これらの構造変化は主としてリガンド結合部位で起こっており、タンパク質-生体膜相互作用による薬剤の細胞内輸送の機構について重要な知見が得られた（*Biochemistry* 2009）。この研究は、国内外で高く評価されており、中国新聞（2009.10.3）、日経産業新聞（2009.10.9）、科学新聞（2009.10.16）でトピックスとして紹介された。



#### (4) 多糖類 (グリコサミノグリカン) のVUVCDスペクトル解析

コンドロイチン, コンドロイチン硫酸 (A, B, C), ヒアルロン酸、ヘパリンおよびそれらの構成糖のVUVCDスペクトルを160 nmまで測定し (下図), COOH, SO<sub>3</sub>H, OH, CH<sub>2</sub>OH, NHC(=O)CH<sub>3</sub>基などの寄与を解析した (*Biosci. Biotech. Biochem.* 2009)。この論文は、日本農芸化学会欧文誌B B Bの論文賞を受賞した。



#### (5) $\beta_2$ -microglobulin のアミロイドフィブリルの構造解析

赤外・ラマンスペクトルとVUVCDスペクトルを併用することにより,  $\beta_2$ -microglobulinのアミロイドフィブリルのlong straight型とworm-like型の2つの構造の違いが, カルボキシル基の解離状態に起因することを明らかにした (*Biochemistry* 2010)。この論文は同誌のハイライト論文に選定された。

#### (6) アミノ酸・ヒドロキシ酸のVUVCDスペクトルの実験的・理論的研究

乳酸とアラニンのVUVCDスペクトルを時間依存密度汎関数法により計算し, 水中での実測スペクトルと比較した。それぞれ9個と4個の水和水を考慮することにより実測スペクトルを再現することができ, アミノ酸とヒドロキシ酸のVUVCDスペクトルに及ぼす側鎖の影響は, 水和ネットワークの違いで説明できることを示した。 (*Chirality* 印刷中)。

(7) 生体膜上でのアミロイド形成機構の解析  
アミロイド $\beta$ ペプチド(1-40残基)のVUVCDスペクトルを種々の濃度比のガングリオシドミセル存在下で測定した結果, ミセル上でのペプチド濃度が高いほど分子間相互作用 ( $\alpha \rightarrow \beta$ 構造転移) が促進されることが分かった。NMRの結果と比較し, C末端側の疎水性2残基が,  $\alpha \rightarrow \beta$ 転移に関わっていることが示唆された (*Int. J. Alzheimer's Disease* 印刷中)。

#### (8) 糖類のVUVCDスペクトルの実験的・理論的研究

メチルグルコースのVUVCDスペクトルを時間依存密度汎関数法により計算し, 水中の実測スペクトルと比較して, C1位の $\alpha$ および $\beta$ アノマー配位, CH<sub>2</sub>OH基の回転異性 (GG, TG, GT), 水和の影響などを明らかにした (論文作成中)。

#### (9) タンパク質のVUVCDスペクトルに及ぼす exciton couplingの影響

大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素の種々のTrp変異体についてVUVCDスペクトルを測定し, 野生型と比較した。Trp残基のexciton couplingの影響は真空紫外領域にまで及んでおり, VUVCDによるタンパク質の二次構造解析において無視できないことが分かった (論文作成中)。

これらの成果は, VUVCD分光法が従来のCD分散計では不可能であった高エネルギー遷移に基づいた生体分子の高次元構造解析に極めて有効であることを示している。X線結晶解析やNMRで解析できない生体分子は数多く存在しており, 本分光法は, 構造生物学における新たな構造解析法として今後の発展が期待できる。なお, 当初計画していた核酸関連の研究や糖類のいくつかの実験は期間内に実施できなかったが, 今後の課題として継続して研究の予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

(1) B.A. Wallace, K. Gekko, S. V. Hoffmann, Y. Lin, J. C. Sutherland, Y. Tao, F. Wien, and R. W. Janes: Synchrotron radiation circular

dichroism (SRCD) spectroscopy – An emerging method in structural biology for examining protein conformations and protein interactions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, in press. 2011 (査読有)

(2) M. Yagi-Utsumi, K. Matsuo, K. Yanagisawa, K. Gekko, and K. Kato : Spectroscopic characterization of inter-molecular interaction of amyloid beta promoted on GM1 micelles. *Int. J. Alzheimer's Disease*, in press. 2011 (査読有)

(3) T. Fukuyama, K. Matsuo, and K. Gekko: Experimental and theoretical studies of vacuum-ultraviolet electronic circular dichroism of hydroxyl acids in aqueous solution. *Chirality*, in press. 2011 (査読有)

(4) H. Hiramatsu, M. Lu, K. Matsuo, K. Gekko, Y. Goto, and T. Kitagawa: Differences in the molecular structure of  $\beta_2$ -microglobulin between two morphologically different amyloid fibrils. *Biochemistry* **49**, 742-751 (2010). (査読有) (同誌のハイライト論文に選定)

(5) 松尾光一, 月向邦彦, 生天目博文, 谷口雅樹: 放射光円二色性分光法による蛋白質の溶液構造解析と医薬分野への応用。バイオインダストリー **27**, 63-70 (2010). (査読無)

(6) K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, and K. Gekko: Membrane-induced conformational change of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein characterized by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry* **48**, 9103-9111 (2009). (査読有) (広大プレスリリース, 3新聞に掲載)

(7) K. Matsuo, H. Watanabe, S. Tate, H. Tachibana, and K. Gekko: Comprehensive secondary-structure analysis of disulfide variants of lysozyme by synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular dichroism. *Proteins*, **77**, 191-201 (2009). (査読有)

(8) K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, and K. Gekko: Vacuum-ultraviolet circular dichroism analysis of glycosaminoglycans by synchrotron-radiation spectroscopy. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 557-561 (2009). (査読有) (日本農芸化学会論文賞)

(9) 月向邦彦, 松尾光一: 真空紫外円二色性による生体分子の高次元構造解析。化学と生物 **47**, 86-88 (2009). (査読無)

(10) K. Matsuo, H. Watanabe, and K. Gekko:

Improved sequence-based prediction of protein secondary structures by combining vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy with neural network. *Proteins*, **73**, 104-112 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 32 件)

(1) 大前 英司, 松尾光一, 月向邦彦: 蛋白質の真空紫外円二色性に及ぼす Trp 側鎖の Exciton 効果。日本農芸化学会大会 2011 (2011年3月26日, 京都)

(2) 松尾 光一, 平松弘嗣, 月向邦彦, 生天目博文, 谷口雅樹, Robert W. Woody:  $\beta_2$ -Microglobulin アミロイド線維フラグメントの真空紫外円二色性スペクトルの理論解析。第24回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (2011年1月9日, 筑波)

(3) K. Gekko: Advanced protein-structure analysis by SRCD spectroscopy. (招待講演) International Circular Dichroism and Bioinformatics Conference (and EU/UK Annual CD Meeting). (3 Dec 2010, Warwick University, UK)

(4) 月向邦彦: 放射光円二色性分光法による生体分子構造解析の新展開 (招待講演)。田中豊一記念シンポジウム 2010 (2010年11月19日, 京都)

(5) K. Matsuo, H. Hiramatsu, K. Gekko, R. W. Woody: Structural analysis of core fragment of  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibrils by vacuum-ultraviolet CD spectroscopy. 第48回日本生物物理学会年会 (2010年9月20日, 仙台)

(6) K. Matsuo, K. Gekko, H. Namatame, and M. Taniguchi: Solution-structure analysis of saccharides by synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. The 37th International Conference on Vacuum Ultraviolet and X-Ray Physics. (13 Jul 2010, Vancouver, Canada)

(7) 松尾光一, 生天目博文, 谷口雅樹, 月向邦彦: 放射光真空紫外円二色性分光による水中における糖類の構造解析。第23回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (2010年1月8日, 姫路)

(8) K. Matsuo, H. Hiramatsu, K. Gekko, and R. W. Woody: Theoretical analysis of vacuum-ultraviolet CD spectrum of amyloid fibril formed by  $\beta_2$ -microglobulin fragment. 第

47 回日本生物物理学会年会 (2009 年 10 月 8 日, 徳島)

(9) 月向邦彦, 松尾光一: 放射光真空紫外円二色性分光法による糖類の構造解析. 第 59 回日本応用糖質化学会 (2009 年 9 月 9 日, 高山)

(10) K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko: Membrane-induced conformational change of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein characterized by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. The 12th International Conference on Circular Dichroism (3 Sep 2009, Brescia, Italy)

(11) K. Gekko, K. Matsuo: Recent progress of VUVCD spectroscopy at HiSOR. The 2nd International Workshop on Synchrotron Radiation Circular Dichroism (4 Apr 2009, Beijing, China).

(12) 松尾光一, 月向邦彦: 時間依存密度汎関数法による糖類の真空紫外円二色性の研究. 日本化学会第 89 春季年会 (2009 年 3 月 27 日, 船橋)

(13) 松尾光一, 櫻田芳恵, 生天目博文, 谷口雅樹, 月向邦彦: 真空紫外円二色性分光法を用いたアルコール変性タンパク質の二次構造解析. 第 22 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (2009 年 1 月 12 日, 東京)

(14) 松尾光一, 月向邦彦, 橘秀樹: 真空紫外円二色性とニューラルネットワーク法によるタンパク質コンフォメーション変化の二次構造部位解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会合同大会 (2008 年 12 月 12 日, 神戸)

(15) K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko: Secondary-structure analysis of proteins interacting with membrane by a vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. 第 46 回日本生物物理学会年会 (2008 年 12 月 3 日, 福岡)

(16) K. Matsuo, H. Watanabe, and K. Gekko: Improved sequence-based prediction of protein secondary structures by combining vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy with neural network. The 22th Annual Symposium of The Protein Society (22 Jul 2008, San Diego, USA)

[図書] (計 1 件)

K. Gekko: Carbohydrate Circular Dichroism..

Encyclopedia of Biophysics, Springer, 2011, in press.

[その他]

新聞掲載

(1) 「薬物運ぶたんぱく質: お届け先でくるくる放出」(日経産業新聞 2009 年 10 月 16 日)

(2) 「新手法でたんぱく質の構造解析 薬物を輸送する仕組み 広島大の研究グループが解明」(科学新聞 2009 年 10 月 9 日)

(3) 「たんぱく質構造分析範囲を拡大 広島大 新薬開発に応用」(中国新聞 2009 年 10 月 3 日)

## 6. 研究組織

申請時の研究代表者は月向邦彦であったが, 広島大学で平成 22 年度に採択された科学技術振興調整費事業の特任教授に就任したため, 平成 22 年 9 月 13 日付で研究代表者を研究分担者であった大前英司に変更した。

### (1) 研究代表者

2008 年度~2011 年 9 月 12 日

月向 邦彦 (GEKKO KUNIHICO)  
広島大学・理学研究科・特任教授  
研究者番号: 10023467

2011 年 9 月 13 日~23 年 3 月 31 日

大前 英司 (OHMAE EIJI)  
広島大学・理学研究科・助教  
研究者番号: 30284152

### (2) 研究分担者

2008 年度~2011 年 9 月 12 日

大前 英司 (OHMAE EIJI)  
広島大学・理学研究科・助教  
研究者番号: 30284152

### (3) 連携研究者

( )

### (4) 研究協力者

松尾 光一 (MATSUO KOICHI)  
広島大学・放射光科学研究センター・  
特任助教  
研究者番号: 40403620

海外研究協力者

ROBERT W. WOODY  
米国コロラド州立大学・教授