

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550111

研究課題名(和文) 生体高分子の分子構造解析のための溶液X線散乱クロマトグラフィー法の評価・開発研究

研究課題名(英文) An assessment study on the chromatography combined with small-angle X-ray scattering technique for characterization of biological macromolecules

研究代表者

渡邊 康 (WATANABE, Yasushi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所食品バイオテクノロジー研究領域・上席研究員

研究者番号：30353957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：溶媒や処理条件に依存した生体高分子の多様な構造体を、分離と同時に構造評価する手法の開発が望まれている。本研究では、生体高分子をクロマトグラフィーで分離しオンライン接続した溶液X線散乱測定装置により、溶出分子のサイズ、分子量および分子構造を同時計測する溶液X線散乱クロマトグラフィー法について、生体高分子の分離直後の溶液構造物性評価における有効性の提示に焦点を絞り、食品加工や食品開発など生体高分子関連分野への普及展開を見据えた基盤研究を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, to present the appropriate application of the size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering technique, we will evaluate this measurement system by characterization of biological macromolecules, such as a large glycoprotein proteoglycan. This method will be useful for the estimation of the size (the radius of gyration value), zero-angle scattering intensity (molecular weight) and structural properties (conformations or persistence lengths) of separated biological macromolecules with dimensions of 1-10 nm in solution. The present results show that the combination of the small-angle X-ray and light scattering methods will be a powerful tool for characterization of large biopolymers in solution. Since the potential of this technique depends on the performance of the X-ray scattering instrument, further development of the measurement system will be important for future food and biological sciences.

研究分野：食品タンパク質溶液学

キーワード：分離分析 食品関連生体高分子 分離直後の溶液構造物性評価

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体高分子の溶液中の構造に関する情報は、生命現象の理解や創薬あるいは農作物・食品中の機能性高分子物質の探索などに有用で、基礎生命・物質科学、医・薬学など様々な分野での活用が期待できる。生体高分子には、結晶化や NMR 解析の困難な超巨大分子や会合体が少なくなく、これらの溶液中の構造解析には溶液 X 線散乱 (小角 X 線散乱) 法が有効である。2011 年末での PubMed による溶液 X 線散乱をキーワードにした検索フィット論文数が多数あり、近年、溶液 X 線散乱に関する研究論文が指数関数的に増大している。

(2) タンパク質は溶媒条件や処理条件により多様な形状や分子集合状態であることから、それらを分離と同時に構造評価する方法の開発が食品バイオテクノロジーをはじめタンパク質の係わる多様な分野において望まれていた。そこで、申請者らは、タンパク質をクロマトグラフィーで分離し、オンライン接続した放射光溶液 X 線散乱測定装置により、溶出分子のサイズ、分子量および分子構造を同時計測する新規な分析法である溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法 (図 1) のオープンゲル濾過カラム仕様の構築から開始し、HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーとの組み合わせによる水溶性タンパク質や多糖の溶液中のサイズ・分子量・分子鎖形態の同時評価を試み、本手法の基礎研究を先行している (Watanabe et al. J. Chromatogr. A, 2009; Anal. Bioanal. Chem., 2011)。

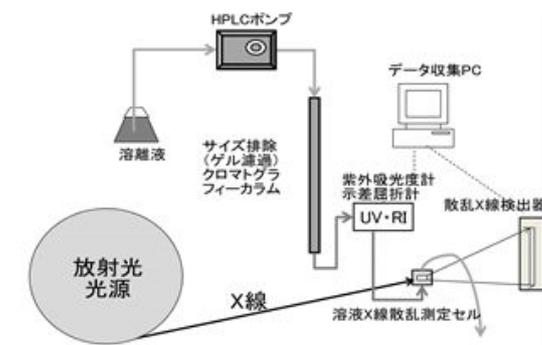


図 1

(3) 分離手段と溶液 X 線散乱の組み合わせの研究は、クロマトグラフィー溶出液の溶液 X 線散乱測定によるタンパク質のサイズのみの評価について、および、フィールドフローフラクショネーションとの組み合わせによるナノ磁性体粒子の解析について報告されている。しかしながら、単発的あるいは生体系でない報告にとどまり、生体高分子の分子構造解析に関する基礎研究に未開拓なことが残されており、ゲル濾過以外のクロマトグラフィーモードでの評価や自動測定に関して、創薬や食品加工などの生体高分子関連製

造現場への普及展開に必要な基盤技術開発研究も検討することが残されている。

2. 研究の目的

タンパク質をクロマトグラフィーで分離し、オンライン接続した放射光溶液 X 線散乱測定装置により、溶出分子のサイズ、分子量および分子構造を同時計測する溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法 (図 1) について、本研究では、結晶化および NMR 解析の成功していない対象について、分離直後の分子構造解析に焦点を絞った有効性の実証、および未開拓のゲル濾過以外のクロマトグラフィーモードと自動連続測定についての技術開発検討から普及展開を考慮した基盤研究を行う。具体的には以下の点を明らかにする。

溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法について、未開拓対象の分子構造解析に焦点を絞り、結晶化および NMR 解析の成功していない巨大糖タンパク質プロテオグリカンやムチンの超分子体 (分子量約 200 万~1000 万) のクロマトグラフィー直後の分子構造を明らかにする。また、アルブミンタンパク質の結晶化および NMR 解析の困難な熱変性・可溶性会合体のクロマトグラフィー直後の分子構造特性を明らかにする。さらに、オリゴマー生体膜タンパク質 OmpF の可溶化状態について、本手法の適用の可能性を検討する。一方、未開拓のゲル濾過モード以外のイオン交換クロマトグラフィーでの評価研究および自動連続計測技術の開発の可能性を評価する。

3. 研究の方法

本研究における放射光溶液 X 線散乱測定装置は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設の協力ビームラインを利用する。生体高分子をクロマトグラフィーで分離し、オンライン接続した放射光溶液 X 線散乱測定装置により、溶出分子のサイズ、分子量および分子構造を同時計測する分析法である「溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法」の高度化を主題とする。本研究では、未開拓の本手法の有効性の検証、および他領域への普及に役立つ基盤技術開発を行う。

具体的には、結晶化および NMR 解析の成功していない生体高分子である、巨大糖タンパク質・プロテオグリカンとムチン、およびアルブミンの可溶性熱処理会合体、などについて本手法の利用による分離直後の分子構造解析の可能性の検討を行う。さらに、本手法において未開拓のイオン交換クロマトモードの導入試験を行い、本手法の創薬、食品加工など生体高分子関係分野での利用展開に役立つ知見を得る。

4. 研究成果

(1) 本研究では、結晶化および NMR 解析の成功していない生体高分子やその集合体などについて、溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法による分離直後の分子構造解析に焦点

をしぼり、本手法の有効性を明らかにした。

まず、プロテオグリカンの溶存分子構造解析を溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法による解析を行った。鮫軟骨・糖タンパク質・プロテオグリカンの光散乱測定により、その重量平均分子量は約 400 万で、クロマト主ピークの分子量は約 200 万である。本研究では溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法により、結晶化および NMR 解析の成功していない鮫軟骨プロテオグリカンの天然条件における分離直後の分子構造を明らかにした。その結果、排除体積を持ったほどけた構造で、クロマトグラフィーの溶出直後の散乱曲線（図 2）の解析により、つまり、散乱ベクトル q の絶対値に対する散乱ベクトルの 2 乗の値と散乱強度 I の積 $q^2 I$ のプロット（図 3）の屈曲点から高分子鎖の堅さの指標である持続長を評価すると、その値が 13-16 nm であることを明らかにした。高分子量プロテオグリカんに免疫賦活機能が示唆されているので、本解析はその生理機能解明に重要な意味があると考えている。今後、同種の試料について、溶液中の分子鎖構造と機能との関連の解明も重要な課題であり、今後の新たな展開が期待できる。また、本研究の成果は、光散乱法と溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法の相補的な活用例としても今後の研究展開に有用な知見を与えるものである。

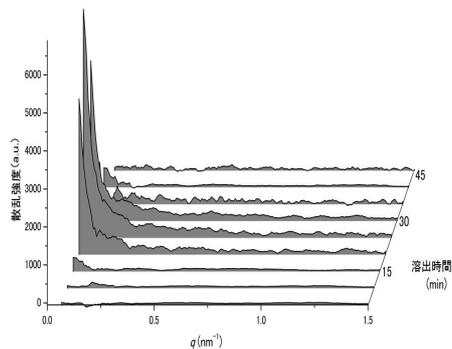


図 2

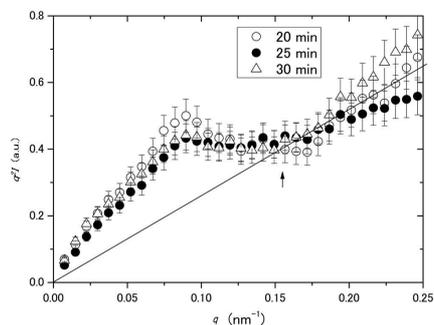


図 3

(2) 溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法によりウシ顎下腺ムチンの超分子会合体の形状およびタンパク質変性作用のある界面活性剤・ドデシル硫酸ナトリウム共存下での分子構造を評価し、超分子会合体およびドデシル硫酸ナトリウム存在下の構造が異なることを示唆する結果を得たので、溶液構造物性評価における本手法の有効性が提示できたと考えている。また、本条件でのムチンへのドデシル硫酸ナトリウムの結合量は単純タンパク質より少なく、ムチンのゲル電気泳動法の適用は慎重に検討する必要があることが示唆される。

(3) さらに、分子量数万のアレルゲン性タンパク質であるウシ血清アルブミンの熱処理条件で混在するモノマーと可溶性高分子量会合体のクロマトグラフィー分離条件における溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法による可溶性会合体の分子構造変化を明らかにするため、ウシ血清アルブミンの熱変性可溶性分子の溶液 X 線散乱データを評価した。その結果、熱変性可溶性分子は、生理的条件下での天然状態単量体とは異なる構造特性を示すことを明らかにした（図 4）。本結果は、食品タンパク質の熱処理加工時のゲル化の初期過程の解析と関連するので、今後のこの分野での散乱手法の有効利用が期待できる。

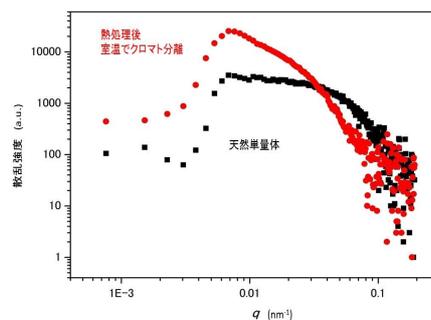


図 4

(4) 一方、遺伝子産物の約 30%といわれる生体膜タンパク質の分離分析法の開発は、生命科学や医学などで発展が急がれる分野である。本研究では、大腸菌外膜に低分子の通過孔を形成する内在性生体膜タンパク質 OmpF について、界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウムによる可溶化条件下で溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法の適用を検討したものの、現時点では良好な散乱データの取得に至っていない。しかしながら、近年の放射光溶液散乱測定システムの高度化により、分子量だけでなく分子構造の違いから溶出成分を識別可能な事を明らかにできる事が期待できる。

(5)本研究では、溶液X線散乱クロマトグラフィー法の高度化の視点から、イオン交換クロマトグラフィーモードの同手法への適用について評価した。具体的には、試料として水溶性食品タンパク質である卵白リゾチームを使用し、イオン交換クロマトグラフィーの溶出分子のサイズと分子量を評価することが可能かを検討した。その結果、サイズ評価のための溶液散乱データの取得は十分に可能であることを見いだしたが、その詳細を精査する必要があることがわかった。つまり、散乱角度ゼロ外挿強度値の評価からの分子量計算における溶出試料濃度の定量性などを再検討する必要があることがわかった。本研究成果は、本手法におけるクロマトグラフィーモードを拡張できる結果として今後の展開が期待できる先駆的な試みと考えられる。

(6)さらに、連続測定システムの構築の可能性の有無を検討した。これまで主として使用していた放射光散乱測定装置の測定システムの変更にとまらぬ、より高性能な散乱検出器の利用が可能となることになり、これまで使用してきた一次元検出器で見いだしてきた知見から、新測定システムに適應した自動測定システムの開発が新たな重要な展開であることが明らかとなった。これまでの成果から、溶液X線散乱クロマトグラフィー法の分離直後の分子構造解析における有効性を示すことができ、本手法の他分野への技術普及が十分に期待できる。

<引用文献>

Y.Watanabe and Y.Inoko, Further application of size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics for characterization of biological macromolecules, Anal. Bioanal. Chem., 399, 1449-1453, 2011

Y.Watanabe and Y.Inoko, Size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics, J. Chromatogr A, 1216, 7461-7465, 2009

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

渡邊 康、巨大糖タンパク質プロテオグリカンの小角X線散乱測定による特性解析、食品総合研究所研究報告、査読有、79巻、2015、41-45

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/nfri/report/057278.html

Yasushi Watanabe, Yoji Inoko, Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by size-exclusion chromatography combined with light and X-ray scattering methods, Journal of Chromatography A, 査読有,1303, 2013, 100-104
DOI:10.1016/j.chroma.2013.06.048

[学会発表](計9件)

渡邊 康、食品関連巨大糖タンパク質の溶液散乱測定、第87回日本生化学会大会、2014年10月17日、国立京都国際会館(京都府京都市)

渡邊 康、高分子量糖タンパク質の溶液散乱法による特性解析、第14回日本蛋白質科学会年会、2014年6月25日、ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

渡邊 康、巨大糖タンパク質の小角散乱測定、第31回PFシンポジウム、2014年3月18日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

渡邊 康、糖蛋白質プロテオグリカンの溶液散乱測定、第27回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム、2014年1月11日、広島国際会議場(広島県広島市)

渡邊 康、溶液散乱クロマトグラフィー法による巨大タンパク質の特性解明、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

渡邊 康、猪子洋二、巨大糖タンパク質プロテオグリカンの溶液中の分散状態、第30回PFシンポジウム、2013年3月14日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

渡邊 康、粘性タンパク質ムチンの変性剤存在下の構造特性解析、第30回PFシンポジウム、2013年3月14日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

渡邊 康、高分子量糖タンパク質の放射光溶液X線散乱測定、第26回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム、2013年1月12日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

渡邊 康、高分子量糖タンパク質の溶存状態の評価、第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月20日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 康(WATANABE Yasushi)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域・上席研究員
研究者番号：30353957