様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：８２１１８
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：２４６５７０７８

研究課題名（和文）蛋白質による脂質膜変形の時分割X線小角散乱

研究課題名（英文）Time-resolved small-angle X-ray scattering of GUV deformed by F-BAR domain

研究代表者
清水　伸隆（Nobutaka, Shimizu）

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：２０４５０９３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円、（間接経費）　　930,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内のオルガネラ膜を変形し構造を維持する蛋白質は様々に存在するが、それらの相互作用を理解することは、オルガネラの構造と機能を理解するために重要である。そこで、放射光施設フォトンファクトリーのX線小角散乱ビームラインにストップトフロー装置を導入し、膜変形を行うBARドメイン蛋白質によるGiant unilamellar vesicle（GUV）の膜構造変化を時分割測定でリアルタイムに計測した。その結果、非常に初期的な解析結果ではあるが、BARドメイン蛋白質により反応後～210秒までの時間スケールで、125Å程度の空間スケールにおいてGUVの膜構造が変化していると示唆された。

研究成果の概要（英文）：Some proteins transform an intracellular organelle and maintain structure. It is important to study those interactions in order to understand the structure and the function of the organelle. Then, a stopped-flow was installed in the small-angle X-ray scattering beamline at the Japanese synchrotron facility, Photon Factory, and the structural change of Giant unilamellar vesicle (GUV) interacted by the BAR domain protein was measured by time-resolve method. As a result, although it was very preliminary analysis, it was suggested the structure of GUV was changed with BAR domain in the space scale of around 125 angstrom within 210 seconds.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：生体膜変形　時分割X線小角散乱　ストップトフロー

１．研究開始当初の背景

細胞内のオルガネラはそれぞれ特徴的な形の膜で区切られている。オルガネラ膜を変形し構造を維持する蛋白質群には様々な例が知られており、膜に結合し曲率を変える蛋白質、細胞骨格蛋白質、膜貫通蛋白質などが挙げられる。これらの膜と蛋白質の相互作用を理解することは、オルガネラの構造と機能を理解する上で本質的に重要である。Giant unilamellar vesicle（GUV）は 1986 年にその作成法が報告された巨大リポソームであり、GUV を利用した *in vitro* 系を利用して多くの重要な発見が相次いでいる。GUV は蛋白質による膜構造制御の分子基盤を *in vitro* で解析できる画期的なシステムであるが、これまでの研究はほとんど蛍光顕微鏡、電子顕微鏡による観察で行われているため、局所的な情報に限られており、系全体をリアルタイムで定量的に解析した例は無い。

２．研究の目的

X 線小角散乱法は、X 線結晶構造解析のような原子分解能での解析を行うことは困難だが、数 Å～数 1000Å 程度の空間スケールの構造情報を解析することが可能である。また、溶液中のダイナミクスや相互作用を直接計測することも可能である。そこで本研究では、高エネ機構の放射光施設フォトンファクトリーの小角散乱ビームラインにストップトフロー装置を導入し、膜変形を行う BAR ドメイン蛋白質による GUV の構造変化を、ストップトフロー装置を用いた時分割 X 線小角散乱測定を行い、蛋白質による脂質膜構造変化をリアルタイム計測することを目指した。

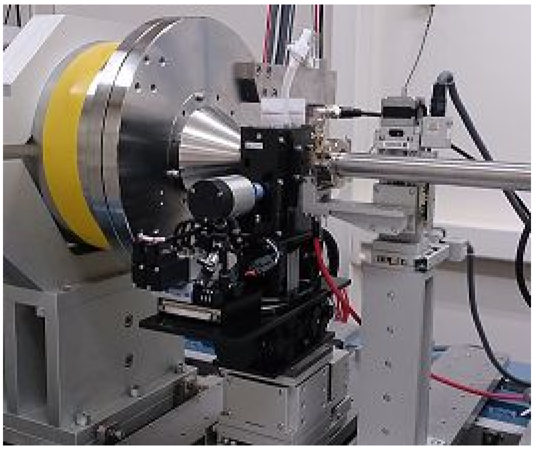
３．研究の方法

X 線小角散乱解析を実現させるためには、ストップトフロー装置の導入を含めたビームライン測定システムの高度化と、試料調整･試料溶液条件の最適化を平行して行う。ビームラインにはストップトフロー装置を導入し、現在の計測系と連動して動作できるようにプログラムを開発する。試料調整に関しては、まず、溶液中の GUV のサイズを均一化させる必要がある。また、BAR ドメイン蛋白質単体に関しても、溶液中で単分散となるような溶液条件を確立しなければならない。その上でまず各単体の X 線小角散乱測定を行った後、GUV に BAR ドメイン蛋白質を添加し反応させた状態、さらにはストップトフロー装置で両者を高速攪拌した後の散乱強度変化を計測する。

４．研究成果

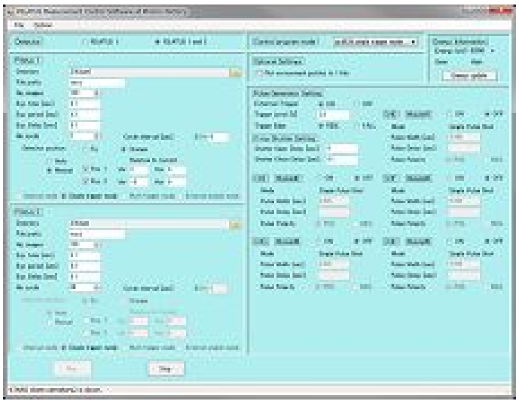
（１）ストップトフロー装置の導入

2 つの溶液を 10 ミリ秒以下のデットタイムで高速攪拌可能なストップトフロー装置（USP-SFM-CD10、（株）ユニソク）を小角散乱ビームラインに導入した（図 1）。フォトンファクトリーには現在 2 本の小角散乱ビームライン BL-6A，10C が存在するが、どちらでも利用する事が可能である。



（図 1）ビームラインに設置されたストップトフロー装置

検出器は BL-6A ではハイブリッドピクセル検出器 PILATUS 300K（Dectris）、BL-10C では同じく PILATUS3 300KW（Dectris）を使用するが、検出器、X 線シャッター、ストップトフローを同期して動作させるためにデジタルパルス発生器を導入した。さらに、パルス発生器を PC から通信制御し、測定 GUI にてユーザーが入力した条件にて、自動制御可能な様に制御システムを新たに開発し（図 2）、10 ミリ秒からの時間スケールを自動計測可能なシステムを構築した。また、ストップトフロー装置に関しても、パルス発生器を用いて複数サイクルの測定を全自動で指定回数繰り返すことができるように、動作トリガー信号の受信仕様を改変した。



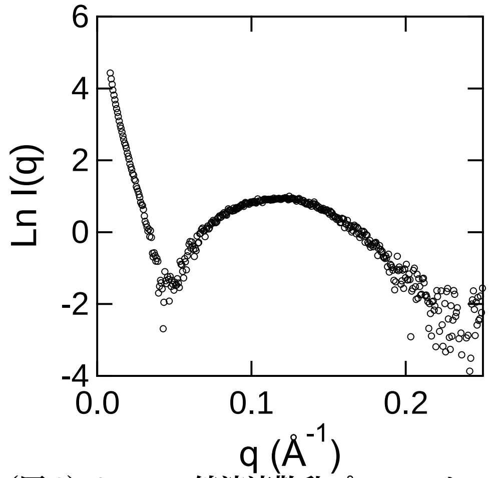
（図 2）パルス発生器による測定制御を行うために新たに開発された測定 GUI

（２）試料の調整・測定条件の検討

①GUV 単体の X 線小角散乱測定

X 線小角散乱実験に適した GUV の調整条件を検討し、測定を行った。比較的均一サイズに処理された GUV を濃縮し散乱データを得た

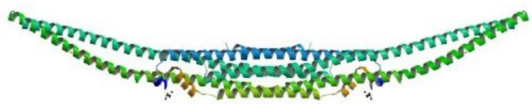
が、～3mg/ml まで濃縮することで十分な S/N を持つ散乱強度が得られることが分かった。散乱ベクトル Q で 0.125Å^{-1} 付近、すなわち空間スケール 50Å 付近になだらかなピークが観測されている（図 3）。



（図 3）GUV の X 線溶液散乱プロファイル

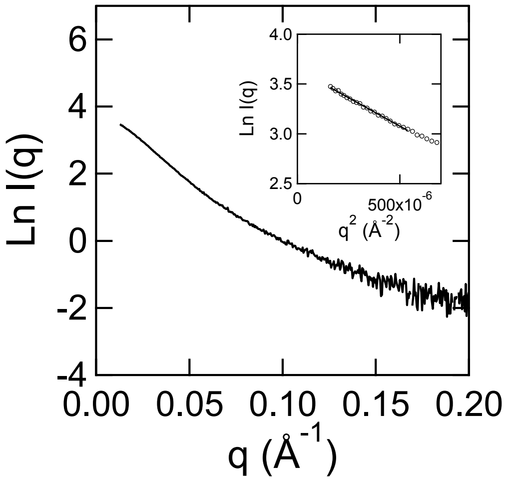
②BAR ドメイン含有タンパク質の試料調整と X 線小角散乱測定

当初、BAR ドメイン含有タンパク質として Arfaptin を利用する計画だったが、精製と試料調整に問題があり、Arfaptin 単体の X 線溶液散乱測定では溶液中のタンパク質分子の凝集が観測された。これを取り除くために、精製条件の見直し、溶液条件の精査を繰り返し実施したが解消する事ができなかった。そこで当初方針を変更し、Arfaptin を諦め別の BAR ドメイン含有タンパク質 FBP17 と CIP4 の F-BAR ドメイン（図 4）のベクターを作成し、クローニングして発現系を構築した。



（図 4）FBP17 の F-BAR ドメイン（PDB ID:2EFL)。単体の分子量は約 36kDa だが、2 量体を形成している。

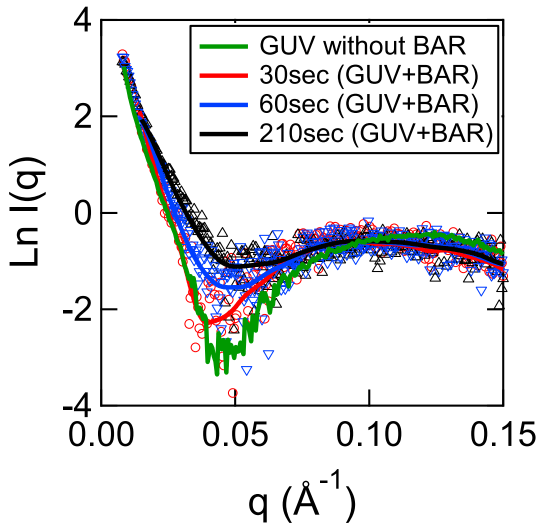
精製された両タンパク質のうち FBP17 の F-BAR ドメインを GUV に添加したところ、蛍光顕微鏡視野下で GUV のチューブ化が確認された。最終的に、両タンパク質の X 線溶液散乱測定を実施したところ、凝集の無い散乱プロファイルを得る事に成功した（図 5）。ギニエプロットより得られた慣性半径は 55.9（± 0.2）Å であった。一方で、図 4 に示した PDB 座標（2 量体）より計算した理論散乱曲線では、慣性半径は 53.2 Å であった。完全に一致はしていないが、そもそも BAR ドメインは図 4 のような構造状態にあるため、溶液中の分子形状は結晶構造よりも緩んだ状態にあると推測された。



（図 5）FBP17 の F-BAR ドメインの X 線溶液散乱プロファイル。挿入図は、ギニエプロット。

（3）BAR ドメイン蛋白質に添加に伴う GUV の変化

GUV と BAR ドメイン含有タンパク質を攪拌し、3 分後に X 線溶液散乱測定を行った。GUV の構造変化のみを抽出するために、この攪拌溶液の散乱強度から BAR ドメイン蛋白質単体で測定した散乱強度を差し引いた。その結果、Q～0.05Å^{-1} 付近の散乱プロファイルの変化が観測された。そこで、ストップトフロー装置を用いて両者を高速攪拌してからの時間分割測定を行った（図 6）。



（図 6）BAR ドメイン蛋白質添加後の GUV の散乱強度の変化。BAR ドメイン存在下の 3 つのデータは、スムージングによって得られたデータをラインで表示し重ねている。

図 6 では、BAR ドメイン蛋白質非存在下と BAR ドメイン蛋白質添加後 30、60、210 秒後の散乱強度を比較している。放射光ビームライン

での測定は限られたビームタイムのため、十分なS/N比を持つデータは現状得られていない。従って、散乱強度データとその散乱強度をスムージングしたデータを重ねて表示している。BARドメイン蛋白質添加に伴い Q～0.05 Å^{-1}付近の散乱プロファイル形状が時間と共に変化している様子が観測された。また、このような構造変化は、210秒程度で完了し、その後の散乱強度に変化は見られなかった。従って、BARドメイン蛋白質により125 Å程度の空間スケールでGUVの膜構造が変化していると示唆された。将来的には、十分な S/N 比を持つデータを取得し、観測された変化が膜構造のどのような構造変化を表しているのか議論したい。

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４件）
①Hirai, M., Kimura, R., Takeuchi, K., Hagiwara, Y., Kawai-Hirai, R., Ohta, N., Igarashi, N. and Shimizu, N.
Structure of liposome encapsulating proteins characterized by X-ray scattering and shell-modeling.
J. Synchrotron Rad., 20, 869-874 (2013)、査読有。

②Shimizu, N., Mori, T., Igarashi, N., Ohta, H., Nagatani, Y., Kosuge, T. and Ito, K.
Refurbishing of Small-Angle X-ray Scattering Beamline, BL-6A at the Photon Factory.
J. Phys.: Conf. Ser., 425, 202008 (2013) 、査読有。

③Igarashi, N., Shimizu, N., Koyama, A., Mori, T., Ohta, H., Niwa, Y., Nitani, H., Abe, H., Nomura, M., Shioya, T., Tsuchiya, K. and Ito, K.
New high-brilliance beamline BL-15A of the Photon Factory.
J. Phys.: Conf. Ser., 425 072016 (2013) 、査読有。

④Gai, Z., Kitagawa, Y., Tanaka, Y., Shimizu, N., Komoda, K., Tanaka, I. and Yao M.
The binding mechanism of eIF2β with its partner proteins, eIF5 and eIF2βε.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 423, 515-519 (2012) 、査読有。

〔学会発表〕（計８件）
①五十嵐教之、小山篤、森丈晴、上條亜衣、西條慎也、大田浩正、仁谷浩明、丹羽尉博、阿部 仁、清水伸隆
PF BL-15A：高輝度 XAFS/XRF/SAXS ビームライン。
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、広島国際会議場、2014年1月11日、ポスター。

②Nobutaka Shimizu
Refurbishment of SAXS beamlines at Photon Factory.
第 51 回日本生物物理学会年会、国立京都国際会館、2013年10月28日、口頭(企画講演)。

③ Shimizu, N., Mori, T., Ohta, H., Nagatani, Y., Saijyo, S., Kamijyo, A., Kosuge, T. and Igarashi, N.
Improvement and Upgrade Plan of Small-Angle X-ray Scattering Beamlines at Photon Factory.
11th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation、Hamburg、Germany、2013年9月9日、ポスター。

④Igarashi, N., Koyama, A., Mori, T., Ohta, H., Kamijo, A., Saijyo, S., Niwa, Y., Nitani, H., Abe, H. and Shimizu, N.
BL-15A: Semi-microbeam XAFS/XRF and High-brilliance SAXS beamline at Photon Factory.
11th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation、Hamburg、Germany、2013年9月9日、ポスター。

⑤清水伸隆、五十嵐教之、森丈晴、大田浩正、永谷康子、小菅隆、伊藤健二
Photon Factoryの小角散乱ビームラインの現状。
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、名古屋大学、2013 年 1 月 13日、口頭。

⑥Shimizu, N., Mori, T., Igarashi, N., Ohta, H., Nagatani, Y., Kosuge, T. and Ito, K.
Current Status of Small Angle X-ray Scattering Beamlines at Photon Factory.
15th International Small-Angle Scattering conference (SAS2012)、Sydney、Australia、2012年11月20日、ポスター。

⑦Shimizu, N., Mori, T., Igarashi, N., Ohta, H., Nagatani, Y., Kosuge, T. and Ito, K.
Current Status of Small Angle X-ray Scattering Beamlines at Photon Factory.
第50回日本生物物理学会年会、名古屋大学、2012年9月24日、ポスター。

⑧Shimizu, N., Mori, T., Igarashi, N., Ohta, H., Nagatani, Y., Kosuge, T. and Ito, K.

Development of Small-Angle X-ray Scattering Beamline, BL-6A at the Photon Factory.
11th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2012)、Lyon, France、2012年7月11日、ポスター。

６．研究組織
(1)研究代表者
清水 伸隆（SHIMIZU NOBUTAKA）
大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所・准教授
研究者番号：20450934

(2)研究分担者
川崎 政人（MASATO KAWASAKI）
大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所・准教授
研究者番号： 00342600

五十嵐 教之（IGARASHI NORIYUKI）
大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所・准教授
研究者番号： 80300672