

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440063

研究課題名(和文) 広帯域共鳴X線溶液散乱法の開発によるタンパク質・生体膜の機能構造の解明

研究課題名(英文) Study of functional structure of protein and biomembrane by the development of resonant X-ray solution scattering in wide-energy range

研究代表者

平井 光博 (Hirai, Mitsuhiro)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：00189820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：X線異常分散(共鳴X線散乱)を利用すると、溶液中でのタンパク質や生体膜、特に多くの生体反応過程において重要な役割を果たしている金属原子を内包した金属タンパク質の機能構造に関して新たな検討を行うことができる。一方、最近の第3世代放射光光源を用いたタンパク質や生体膜の広角X線散乱法の進展により、0.2 nmから250nmの範囲の全層構造領域、すなわちタンパク質の2次構造から4次構造、生体脂質のアルキル鎖のパッキングから凝集体の全体構造までの観測が可能となっている。本研究の主眼は、共鳴X線散乱法と広角X線散乱法を用いて、生体分子の内部構造を観測する新たな手法の開発とその応用である。

研究成果の概要(英文)：The use of anomalous dispersion of X-ray (resonant X-ray scattering) is expected to serve us a new insight on functional structures of proteins and membrane in solutions, especially of metalloproteins proteins containing metal atoms or clusters that are involved in a wide range of important biological processes. On the other hand, the recent development of the wide-angle X-ray scattering technique of proteins and membrane using third-generation synchrotron sources shows us that the X-ray solution scattering enables to observe a whole hierarchical structure ranging from ~0.2 nm to ~250 nm, namely, from the secondary structure to the quaternary one of proteins or from the alkylchain packing to the whole structure of lipid aggregate.

The aim of this study was the development of the new method for studying the internal structure of biological material in-situ by the combination of resonant and wide-angle scattering of X-ray.

研究分野：生物物理学

キーワード：X線散乱 タンパク質 生体膜 共鳴散乱

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体反応の分子機構の解明には、溶液中の機能状態でのタンパク質や生体膜の構造情報を得ることが重要である。一方、放射光 X 線溶液散乱法は、様々な環境条件下に於ける“その場”観測が可能のため、多くの研究に利用されているが、分子外形などの低分解能の評価に用いられることが多く、局所構造の解析には殆ど用いられていない。また、X 線共鳴(異常)散乱を利用すると、特定の元素の散乱能を大きく変化させることが可能であるが、タンパク質の結晶構造解析に利用されているのみで、溶液散乱では実現していない。本研究は、金属タンパク質中の金属原子や、多くのタンパク質や生体膜に内在する硫黄やリンの原子の位置情報を選択的に抽出可能な新たな共鳴(異常) X 線溶液散乱法の確立を目指す。

2. 研究の目的

X 線異常分散(共鳴 X 線散乱)を利用すると、溶液中でのタンパク質や生体膜、特に多くの生体反応過程において重要な役割を果たしている金属原子を内包した金属タンパク質の機能構造に関して新たな検討を行うことができると期待されている。一方、最近の第3世代放射光光源を用いたタンパク質や生体膜の広角 X 線散乱法の進展により、0.2 nm から 250nm の範囲の全層構造領域、すなわちタンパク質の2次構造から4次構造、生体脂質のアルキル鎖のパッキングから凝集体の全体構造までの観測が可能となっている。本研究の主眼は、共鳴 X 線散乱法と広角 X 線散乱法を用いて、生体分子の内部構造を観測する新たな手法の開発とその応用であった。

3. 研究の方法

硬 X 線共鳴散乱実験には、Fe を含有するヘムタンパク質(ミオグロビン)および s-s 結合を Hg に置換した水銀ラベルリゾチームを、軟 X 線共鳴散乱実験には、リン脂質

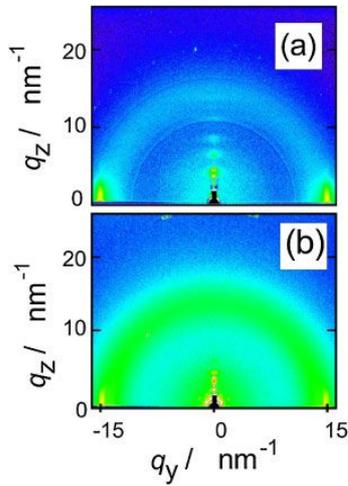
膜を使用した。また、タンパク質・脂質膜複合体として、ミオグロビン内包リポソームを作成し、実験に使用した。用いた X 線吸収端は、Fe と P は K 吸収端、Hg は L 吸収端を利用した。

4. 研究成果

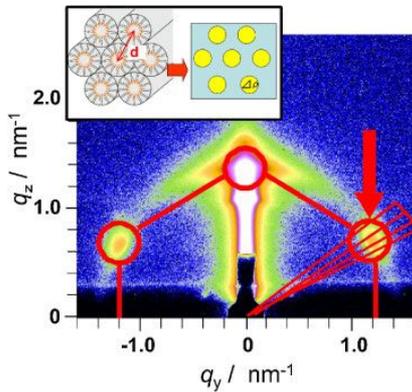
吸収端近傍の入射 X 線のエネルギー変化に伴う溶質分子からの散乱強度変化が小さいため、統計精度、試料調整、解析法を含めたさらなる追試と検討が必要であるが、原理的な可能性に関しては確認できた。基盤上に積層配向させた脂質膜の P 吸収端を用いた斜入射広角 X 線散乱測定には成功し、共鳴コントラスト変化法による解析が可能であることを報告した(Jpn. J. Appl. Physics, 53, 2014) (下記, 図 1, 2)。また、ミオグロビンを内包した脂質リポソームの測定を実施し、タンパク質と脂質膜の複合体である内包リポソームの測定とその解析法に関しては確立できた(J. Phys. Chem. B, 119, 2015) (下記図 5)。タンパク質の場合、内部に複数の重原子を内包した Hg ラベルリゾチームの場合、吸収端近傍の共鳴散乱コントラスト変化による散乱パターンの変化は通常の溶液濃度(1% w/v)でも十分測定可能であることが確認できた(学会&研究会報告)(下記図 3, 4)、これを用いた熱安定性に関しては、ラベルによる安定性の低下が著しく、差分解析は困難であることが判明した。ミオグロビンに関しては Fe の含有率が低いため、十分な統計精度を得る必要が有るため、濃度条件等を考慮して追試実験を計画している。

[図 1] 斜入射広角 X 線散乱 :

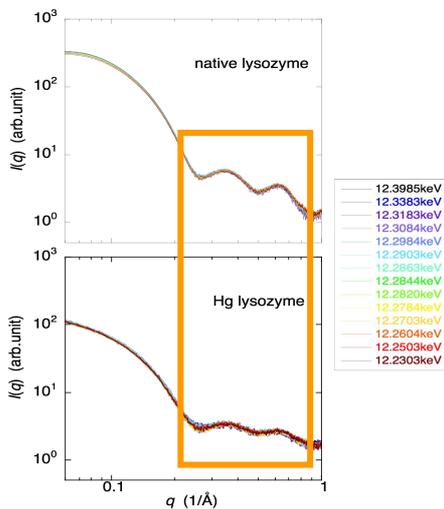
DPPC(a)及び PC(b). X-ray energy=12.4 keV
(Jpn. J. Appl. Physics, 53, 2014)



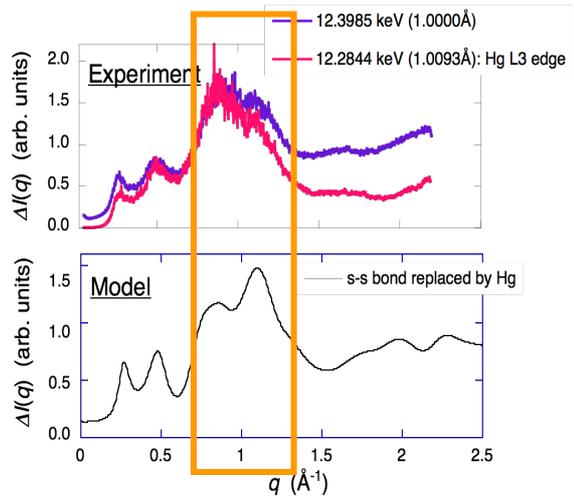
[図 2] 斜入射広角 X 線散乱：脂質膜(PC) のリン吸収端を用いた軟 X 線共鳴コントラスト.X-ray energy=2.145 keV (Jpn. J. Appl. Physics,53, 2014)



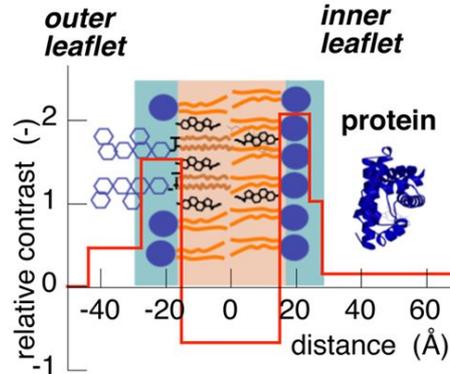
[図 3] 共鳴広角 X 線散乱：エネルギー依存性，native リゾチームと Hg ラベルリゾチームの比較



[図 4] 共鳴広角 X 線散乱：差解析による Hg 原子位置情報の抽出



[図 5] 広角 X 線散乱：細胞モデルとしてのミオグロビン内包リポソームの構造決定 (J. Phys. Chem. B,119, 2015)。共鳴 X 線コントラストによる膜とタンパク質の構造分離を行う予定。



今後の研究の推進方策

硬・軟 X 線共鳴散乱の利用に関して、本研究では原理的に測定可能であることは確認できたが、実用化には、厳密な透過率測定（吸収端効果）や放射線ダメージの回避が重要であり、さらなる実験条件の検討が必要であることが明らかとなった。また、今回、金属タンパク質を内包した細胞モデルリポソームの構造解析法が確立できたため、脂質リン原子とタンパク内金属原子の両方の吸収端を利用した、二重共鳴 X 線散乱法利用の可能性が拓かれた。今後、上記

課題を解決して，共鳴 X 線散乱法の有効性を実証する予定である。

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 5 件)

1) M. Hirai, S. Sato, R. Kimura, Y. Hagiwara, R. Kawai-Hirai, N. Ohta, N. Igarashi, and N. Shimizu

Effect of Protein-Encapsulation on Thermal Structural Stability of Liposome Composed of Glycosphingolipid/ Cholesterol/Phospholipid
J. Phys. Chem. B, **119**, 3398 - 3406 (2015).

2) H. Okuda, T. Yamamoto, K. Takeshita, M. Hirai, K. Senoo, H. Ogawa, and Y. Kitajima.

Normalization of grazing-incidence small angle scattering of phospholipid alloy systems at the K absorption edge of phosphorous: A standard sample approach.

Jpn. J. Appl. Phys., **53**, 05FH02-1-05FH02-5, DOI 10.7567/JJAP.53.05FH02 (2014).

3) M. Sugiyama, H. Yagi, T. Yamaguchi, K. Kumoi, M. Hirai, Y. Oba, N. Sato, L. Porcar, A. Martele and K. Kato

Conformational characterization of a protein complex involving intrinsically disordered protein by small-angle neutron scattering using the inverse contrast matching method: a case study of interaction between a-synuclein and PbaB tetramer as a model chaperone.

J. Appl. Cryst., **47**, 430-435, DOI 10.1107/S1600576713033475 (2014).

4) M. Hirai, R. Kimura, K. Takeuchi, Y. Hagiwara, R. Kawai-Hirai, N. Ohta, N. Igarashi and N. Shimizu

Structure of liposome encapsulating proteins characterized by X-ray scattering and shell-modeling.

J. Synchrotron Rad. **20**, 869–874 (2013).

5) M. Hirai, R. Kimura, K. Takeuchi, K. Kasahara, N. Ohta, B. Farago, A. Stadler, G. Zaccai.

Change of Dynamics of Raft-Model Membrane Induced by Amyloid-b Protein Binding

Eur. Phys. J. E. **36**, 74 DOI 10.1140/epje/i2013-13074-3 (2013).

[学会発表] (計 1 5 件)

1) 平井光博，味戸聡，高橋孝輔，佐藤笙喜
「分子混雑環境におけるタンパク質構造の熱安定性と水和」

PF 研究会「徹底討論！小角散乱の魅力～基礎・応用・産業利用」，高エネルギー加速器研究機構，2016.03.30. - 2016.03.31.

2) 味戸聡志，平井光博

「Crowding 環境下におけるタンパク質の熱安定性」

2015 年度 量子ビームサイエンスフェスタ，つくば国際会議場，2016.03.15. - 2016.03.16.

3) 高橋孝輔，平井光博

「DDS モデルとしてのタンパク質内包リボソームの研究」

2015 年度 量子ビームサイエンスフェスタ，つくば国際会議場，2016.03.15. - 2016.03.16.

4) 平井光博

「分子混雑環境下のタンパク質の構造，水和，熱安定性」，日本中性子科学会第 15 回年会，和光市民文化センター，2015.12.10. - 2015.12.12.

5) 平井光博 (招待公演)

「アミロイドタンパク質と相互作用における混合質膜の構造特性」, 低温研研究集会
「生物の低温適応の分子機構」, 北海道大学, 2015.11.21. - 2015.11.22.

6) M. Hirai, S. Sato, M. Sugiyama, N. Ohta, N. Shimizu, N. Igarashi, A. Martel, and L. Porcar

Crowding effect on protein structure stability clarified by X-ray and neutron scattering.

16TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON SMALLANGLE SCATTERING, Berlin, 2015.09.13 - 2015.09.18.

7) S. Sato, M. Hirai, N. Ohta, N. Shimizu, and N. Igarashi

Interaction of amyloid beta protein with raft-model liposome

16TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON SMALLANGLE SCATTERING, Berlin, 2015.09.13 - 2015.09.18.

8) 平井光博

「生体膜とアミロイド beta タンパク質との相互作用に於ける分子混雑の効果」
第3回物構研サイエンスフェスタ, つくば国際会議場, 2015年3月17日

11) 平井光博

「Crowding 環境におけるタンパク質の構造、水和、熱安定性」
第3回 Neutrons in Biology 研究会, 日本原子力研究開発機構・原子力科学研究所
2015年3月30日~31日

10) 平井光博

「分子 crowding 環境下に於けるタンパク質の構造転移と水和」

低温研研究集会「生物の低温適応の分子機構(2)」, 2014/12/26-27, 北海道大学

11) M. Hirai, S. Sato, M. Sugiyama, N. Ohta, L. Porcar, A. Martel, G. Zaccai
「Crowding 環境下でのタンパク質構造の熱安定性」

第52回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014/9/25-27

12) S. Sato, M. Hirai, N. Ohta

「時分割広角 X 線散乱によるラフトモデルリポソームとアミロイドベータタンパク質との相互作用に関する研究」

第52回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014/9/25-27

13) K. Takeuchi, M. Hirai

「放射光広角散乱法によるタンパク質熱転移に対する crowding 効果の研究」

第51回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館, 2013/10/28-30

14) Y. Kimura, M. Hirai

「タンパク質内包リポソームの浸透圧下における構造」

第51回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館, 2013/10/28-30

15) M. Hirai, R. Kimura, K. Takeuchi, M. Ohta, B. Farago, S. Stadler, G. Zaccai

「アミロイド β タンパク質の結合に伴うラフトモデル膜のダイナミクスの変化」

第51回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館, 2013/10/28-30

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井光博 (Hirai Mitsuhiro)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：00189820

(2) 研究分担者：無し

()

研究者番号：

(3) 連携研究者：無し

()

研究者番号：