

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02042

研究課題名(和文) 中性子散乱を用いた再構成細胞系での生体高分子の構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of Analysis Method for Recombinant Biomacromolecular System utilizing Neutron Scattering

研究代表者

杉山 正明 (Sugiyama, Masaaki)

京都大学・複合原子力科学研究所・教授

研究者番号：10253395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体高分子は、高濃度の多分散系 = 混雑系という環境下で機能している。そこで、中性子散乱法とタンパク質重水素化を組み合わせることで結晶や希薄溶液ではなくこの混雑環境下での生体高分子の静的・動的構造測定・解析手法の開発を行った。混雑系として水晶体中に注目し、構成タンパク質である B-クリスタリンの75%重水素化法の確立を行い、中性子溶液散乱ではこの重水素化率のタンパク質は散乱的に不可視化されることを確認した。そこで、高濃度の75%重水素化 B-クリスタリン溶液に希薄濃度の軽水素化 B-クリスタリンを混合した系を調製し、高濃度中での軽水素化 B-クリスタリンの選択的測定、静的・動的構造の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Biomacromolecule is functionalized in a polydispersed and high density system, namely a crowding system. Therefore, this study has developed a method to observe and analyze a structure and dynamics of a biomacromolecule in the crowding system. For this purpose, B-crystallin which is eye lens protein is taken as a sample. A method to prepare 75% deuterated B-crystallin was established and then it was confirmed that this protein is scatteringly invisible in 100% D2O solution. Based on the result, using the mixture of high concentration of 75% deuterated B-crystallin with low concentration of not-deuterated B-crystallin, which is one of crowding systems, it has been succeeded to observe not-deuterated B-crystallin selectively with small-angle neutron scattering.

研究分野：ナノ構造物理学

キーワード：蛋白質重水素化 クラウディング 中性子小角散乱 コントラスト同調 クリスタリン

1. 研究開始当初の背景

構造生物学は分子論的に生命現象を理解するために、タンパク質をはじめとする生体高分子の構造の解明を行い、多くの成果を挙げた。その構造は主としてX線結晶構造解析法を用いることから分かるように、結晶中の構造である。一方、生命現象の基本単位は細胞であり、そこは結晶とは異なる生体高分子の高濃度溶液と言う環境下である。そのため各々の生体高分子は周囲の生体高分子との相互作用や水分子から熱擾乱に応じて構造変位もしくはそれに誘発される生体高分子同士の解離会合を起こしている。このような高濃度環境により誘導される構造変位が生体高分子の機能発現に深く関わっていると考えられている(例えば、“How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes?” A.P.Minton, J. Cell. Sci., 119 (2006) 2863)。したがって、今後より深く生命現象を理解するためには、上記の構造変位つまり「細胞中もしくはそれに近い高濃度の下での生体高分子の構造解明」が重要であると考えられており、高濃度溶液下でも個々の生体高分子の構造を解明する手法の開発が待たれている。

溶液中の構造解析の手法としてはNMRが挙げられるが、NMRでは高分子量(>20kDa)の生体高分子の構造解析は困難である。したがって、分解能は劣るものの溶液中での高分子量の生体高分子の構造解析がX線を用いた小角散乱法(溶液散乱法)が注目されてきた。通常のX線溶液散乱法は試料の希薄溶液で行う。そこで、高濃度条件を実現するために、crowderと呼ばれるタンパク質などに比べて低分子量の分子を添加する。小角散乱領域では、低分子量の分子からの散乱強度は角度依存がなく一定であり、単純な背景散乱として扱う事が出来るという利点がある。しかし、実際の細胞はタンパク質自身による高濃度系であるので、crowderにはタンパク質もしくはそれに等しい分子量の高分子を使う事が望ましい。溶液散乱法で高濃度高分子を混合すると、その分子からの散乱が支配的になってしまい、対象とするタンパク質からの散乱を測定することが困難となる。そこで、タンパク質自身の高濃度系を構築することも考えられるが、この場合、散乱ではタンパク質同士の干渉による影響が無視できなくなり、高濃度系での一つのタンパク質の構造変化を捉える事が困難となる。したがって、高濃度系の中でのターゲットタンパク質のみの構造を選択的に測定する手法が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究では上述の要請に答えるために中性子散乱に注目した。中性子散乱では同位体効果があり、特に、軽水素と重水素の間で顕著である。本研究の目的はこの特長を生かして高濃度下での生体高分子の構造測定を可

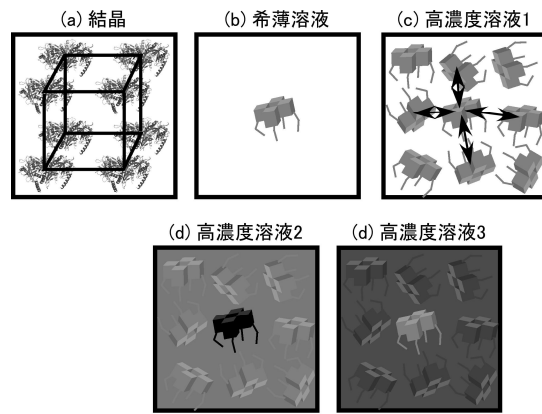


図1. 本研究での測定対象系の模式図。

能とする手法を開発する事とする。更に実際に水晶体に手法を適用し、含有タンパク質の構造と相互作用の解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では主として水晶体をターゲットし、その構成タンパク質であるクリスタリンの高濃度溶液中での中性子散乱による構造測定手法の開発とその静的・動的構造の研究を行う。以下の手続きに沿って研究を進める。

- (1) 測定系は細胞状態を再構成するために結晶(図1(a))ではなく水溶液系とする(図1(b))。ただし、水晶体を模倣することを考え、高濃度溶液中での構造測定を目指す。しかし、図1(c)に示したように高濃度系では互いの分子からの干渉効果を無視できず、単一の分子の構造を測定することが困難である。
- (2) 上記問題解決として中性子小角散乱(Small-Angle Neutron Scattering: SANS)法を採用する。本研究では、中性子散乱の特長である水素において顕著である同位体効果を利用して、タンパク質中の軽水素を重水素の置換・培養することで、図2に示すように散乱長密度の異なるタンパク質の調製を行う。
- (3) 中性子「溶液」散乱では、溶媒中の軽水/重水比率を制御することで溶媒自身の散乱長密度を制御することが可能である(コントラスト変調法)。図2に示すように、通常の(非重水素化)タンパク質(h-タンパク質)は40%重水溶媒と散乱長密度が一致する。したがって、40%重水中のh-タンパク質は散乱的には観測されない(=不可視化される)。したがって、この溶液に少量の100%重水素化タンパク質(100d-タンパク質)を添加すると、100d-タンパク質の希薄溶液と同等になり、このタンパク質の単一の構造を選択的に観測することが出来る(コントラスト同調法、図1(d))。
- (4) 上記手法では溶媒中に60%の軽水を含むために、軽水素からの非干渉性散乱(=バックグラウンドとなる)が強く、短時間で統計精度が求められる測定を行う場合に問題がある。そこで、本研究では75%重水

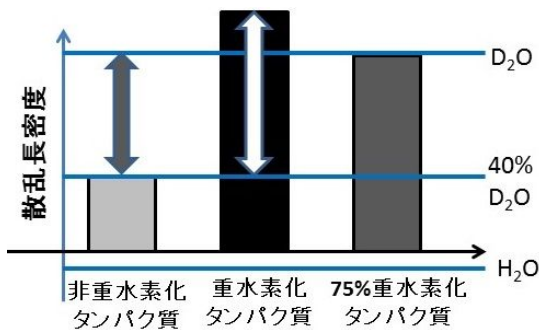


図2. 重水素化率及び軽水/重水比率に応じたタンパク質と溶媒の散乱長密度。

素化タンパク質(75d-タンパク質)の調製を試みた。図2に示すように75d-タンパク質、非干渉性散乱が少ない100%重水溶媒と散乱長密度が一致する。したがって、高濃度75d-タンパク質重水溶液に少量のh-タンパク質を添加すると、h-タンパク質の希薄溶液と同等になり、このタンパク質の単一の構造を低バックグラウンド環境で選択的に観測することができる(逆転コントラスト同調法、図1(e))。本研究ではこの手法の確立を目指した。

加えて、研究室クラスのX線小角散乱分光器とサイズ排除クロマトグラフィーを組み合わせたシステム(Lab-SEC-SAXSシステム)を世界で初めて構築し、多分散系でも個々のタンパク質の溶液構造の分離測定を可能とすることも試みた。更に、分析超遠心法、動的散乱法も協奏的に用いて、上述の高濃度下での逆転コントラスト同調SANS法とLab-SEC-SAXSシステムを、水晶体内タンパク質クリスタリンの静的・動的構造のみならず多くのタンパク質の構造研究に発展させた。

4. 研究成果

図3に本研究で調整した1mg/mLの75d-Bクリスタリンの100%、40%、0%重水溶媒中での中性子散乱曲線を示す。図に示されているようにこの重水素化率のタンパク質が100%重水溶媒中では散乱が観測されない=調製した75d-Bクリスタリンは計算通り不可視化されている事が確認できる。

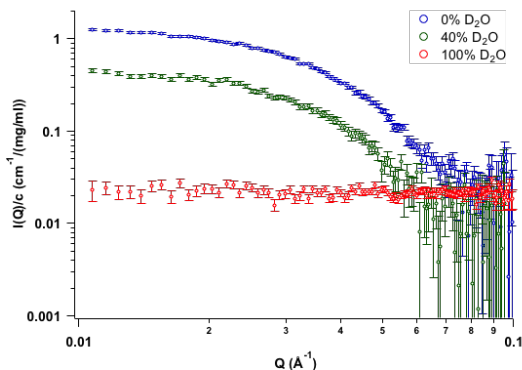


図3. 75d-Bクリスタリンの100%、40%、0%重水溶媒中でのSANS曲線。

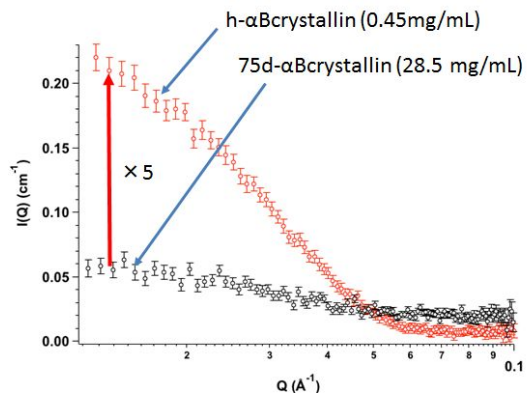


図4. 高濃度(28.5mg/mL)の75d-BクリスタリンのSANS曲線と希薄濃度(0.45mg/mL)のh-BクリスタリンのSANS曲線の比較。

次に、高濃度(28.5mg/mL)の75d-BクリスタリンのSANS曲線と希薄濃度(0.45mg/mL)のh-BクリスタリンのSANS曲線の比較を図4に示す。28.5mg/mLの75d-BクリスタリンのSANS曲線はほぼフラットである。SANS測定において重要となる小角領域の散乱強度において、h-Bクリスタリンは濃度が1/60であるにもかかわらず散乱強度は5倍あり、両者の混合溶液中でも選択的にh-Bクリスタリン散乱を測定することが可能であることを示している。

次に、実際に高濃度(28.5mg/mL)の75d-Bクリスタリンと希薄濃度(0.45mg/mL)のh-Bクリスタリンの混合系での後者の静的・動的構造研究の成果を示す。

図5は混合系の時分割SANS曲線を示して

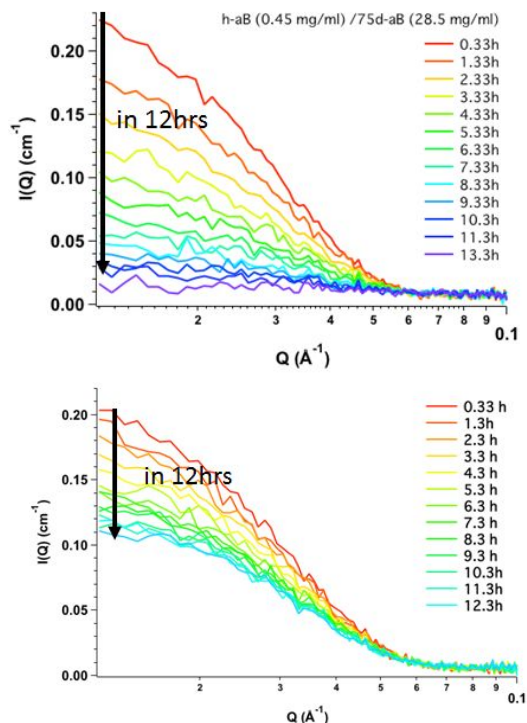


図5. 混合系の時分割SANS曲線。(上) h-aB (0.45 mg/mL) + 75d-aB (28.5mg/mL) (下) h-aB (0.45mg/mL) + 75daB (0.45 mg/mL)

いる。上図より 75d- B クリスタリン高濃度溶液中でも希薄成分の h- B クリスタリンが粒子間干渉も無く観測されていることが分かる。また、興味深い事に時間経過とともに散乱強度が減少し、12 時間で散乱がほぼ消滅していることが観測された。この事は、B クリスタリンが平均 26 量体である会合体である事を考えると、h- B クリスタリン会合体中の単量体がサブユニット交換を通して、75d- B クリスタリン会合体中に拡散していたと解釈できる。実際、12 時間後の残存散乱強度は初期値のほぼ 1/26 となり分散した単量体の散乱強度と一致する。比較として同じ実験を希薄条件下で行った結果が図 5 下図である。同様にサブユニット交換により散乱強度の減少が観測され、平衡状態に達するのに高濃度系と同じく 12 時間ほどであった。(こちらの系では、h 体と 75d 体の単量体の数が同数であるため、平衡状態での散乱強度は初期状態の半分となる)この「交換速度が濃度に依存しない」という現象については現在モデルを構築して解析中である。

【今後について】本研究では中性子的に不可視化した高濃度系に成功し、単一タンパク質の選択的測定に成功した。今後はより 100mg/mL を越える高濃度の構築が目標である。そのためには図 4 で示されている 75d- B クリスタリンの SANS 曲線の小角領域でのわずかな上昇も問題となる。この点を解決するためにはより精密な重水素化率の制御及び重水素化率の精密な測定手法の確立が重要になる。更に、高濃度溶液系での凝集を制御する必要があり、高純度の試料調製技術の確立と確認のために SEC-SAXS、分析超遠心法、動的光散乱法、無変性質量分析法などと協奏的な測定・解析法の確立が重要となると考えている。

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 14 件)

1. Y. Nagata, T. Nishikawa, M. Sugimoto, S. Sato, M. Sugiyama, L. Porcar, A. Martel, R. Inoue, and N. Sato, "Elucidating the Solvent Effect on the Switch of the Helicity of Poly(quinoxaline-2,3-diyl)s: A Conformational Analysis by Small-Angle Neutron Scattering", *Journal of American Chemical Society*, 140 (2018) 2722–2726.
2. M. Yagi-Utsumi, A. Sikdar, T. Kozai, R. Inoue, M. Sugiyama, T. Uchihashi, H. Yagi, T. Satoh, and K. Kato, "Conversion of functionally undefined homopentameric protein PbaA into a proteasome activator by mutational modification of its C-terminal segment conformation", *Protein Engineering, Design, and Selection*, 31 (2018) 29-36.
3. P. Bernadó, N. Shimizu, G. Zaccai, H. Kamikubo, and M. Sugiyama, "Solution scattering approaches to dynamical ordering in biomolecular systems", *BBA General Subjects*, 1862 (2018) 253-274.
4. R. Urade, N. Sato, and M. Sugiyama, "Gliadins from wheat grain: an overview, from primary structure to nanostructures of aggregates", *Biophysical Reviews*, (2017) /doi.org/10.1007/s12551-017-0367-2.
5. E. Hibino, R. Inoue, M. Sugiyama, J. Kuwahara, K. Matsuzaki and M. Hoshino, "Identification of heteromolecular binding sites in transcription factors Sp1 and TAF4 using high-resolution NMR spectroscopy", *Protein Science*, 26 (2017) 2280-2290.
6. J. Trehwella, A. P. Duff, D. Durand, F. Gabel, J. M. Guss, W. A. Hendrickson, G. L. Hura, D. A. Jacques, N. M. Kriby, A. H. Kwan, J. Perez, L. Pollack, T. M. Ryan, A. Sali, D. Schneidman-Duhovny, T. Schwede, D. I. Svergun, M. Sugiyama, J. A. Tainer, P. Vachette, J. Westbrook, and A. E. Whitten, "2017 Publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution: an update", *Acta Crystallographica*, D73 (2017) 710-728.
7. R. Yogo, S. Yanaka, H. Yagi, A. Martel, L. Porcar, Y. Ueki, R. Inoue, N. Sato, M. Sugiyama, and K. Kato, "Characterization of conformational deformation-coupled interaction between immunoglobulin G1 Fc glycoprotein and a low-affinity Fcγ receptor by deuteration-assisted small-angle neutron scattering", *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12 (2017) 1-4.
8. D. Kato, A. Osakabe, Y. Arimura, Y. Mizukami, N. Horikoshi, K. Saikusa, S. Akashi, Y. Nishimura, S.-Y. Park, J. Nogami, K. Maehara, Y. Ohkawa, A. Matsumoto, H. Kono, R. Inoue, M. Sugiyama, and H. Kurumizaka, "Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome", *Science*, 356 (2017) 205-208.
9. M. Sugiyama, H. Yagi, K. Ishii, L. Porcar, A. Martel, K. Oyama, M. Noda, Y. Yunoki, R. Murakami, R. Inoue, N. Sato, Y. Oba, K. Terauchi, S. Uchiyama, and K. Kato, "Structural characterization of the circadian clock protein complex composed of KaiB and KaiC by inverse contrast-matching small-angle neutron scattering", *Scientific Reports*, 6 (2016) 35567.
10. E. Hibino, R. Inoue, M. Sugiyama, J. Kuwahara, K. Matsuzaki, and M. Hoshino, "Interaction between intrinsically disordered regions in transcription factors Sp1 and TAF4", *Protein Science*, 25 (2016)

2006-2017.

11. R. Inoue, T. Takata, N. Fujii, K. Ishii, S. Uchiyama, N. Sato, Y. Oba, K. Wood, K. Kato, N. Fujii, and M. Sugiyama, "New insight into the dynamical system of α B-crystallin oligomers", Scientific Reports, 6 (2016) 29208.
12. E. Chatani, R. Inoue, H. Imamura, M. Sugiyama, Mi. Kato, M. Yamamoto, K. Nishida, and T. Kanaya, "Early aggregation preceding the nucleation of insulin amyloid fibrils as monitored by small angle X-ray scattering", Scientific Reports, 5 (2015) 15485.
13. N. Sato, A. Matsumiya, Y. Higashino, S. Funaki, Y. Kitao, Y. Oba, R. Inoue, F. Arisaka, M. Sugiyama, and R. Urade, "Molecular assembly of wheat gliadins into nanostructures: A small-angle X-ray scattering study of gliadins in distilled water over a wide concentration range", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63 (2015) 8715-8721.
14. Y. Takemoto, T. Yamamoto, N. Ikuma, Y. Uchida, K. Suzuki, S. Shimono, H. Takahashi, N. Sato, Y. Oba, R. Inoue, M. Sugiyama, H. Tsue, T. Kato, J. Yamauchi, and R. Tamura, "Preparation, characterization and magnetic behavior of a spin-labelled physical hydrogel containing a chiral cyclic nitroxide radical unit fixed inside the gelator molecule", Soft Matter, 11 (2015) 5563-5570.

[学会発表](計 14 件)

1. M. Sugiyama, "Subunit Kinetics in α -Crystallins", International Conference on the Lens 2015 (招待講演)(国際学会), 2015年12月06日~2015年12月11日, Hawaii, USA
2. R. Inoue, "Dynamic Quaternary Structure of Alpha-Crystallin", The 7th Japan-Taiwan Joint Meeting on Neutron and X-ray Scattering (招待講演)(国際学会), 2016年03月10日~2016年03月13日, Kumatori, Osaka, Reseach Reactor Institute, Kyoto University
3. R. Inoue, T. Takata, N. Fujii, N. Sato, Y. Oba, S. Takata, N. Fujii and M. Sugiyama, "KINETICS OF SUBUNITS IN α -CRYSTALLIN AS STUDIED BY SMALL-ANGLE NEUTRON SCATTERING", 16th Conference on Small Angle Scattering (国際学会), 2015年09月14日~2015年09月18日, Berlin, Germany
4. 杉山正明, "中性子小角散乱だから見える溶液中のタンパク質の構造", 第15回日本蛋白質科学会年会(招待講演), 2015年06月24日~2015年06月26日, 徳島, あわぎんホール(徳島市)
5. M. Sugiyama, "Subunit Kinetics in α -Crystallins", The 9th Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences (招待講演)(国際学会), 2016年11月14日~2016年11月16日, Gyeongju, Korea
6. 井上倫太郎, 杉山正明, "クリスタリンのサブユニット動態の観察", 第16回日本中性子科学会年会, 2016年12月01日~2016年12月02日, 名古屋大学 豊田講堂
7. 佐藤信治, 杉山正明, "小麦タンパク質グリアジン凝集構造の小角散乱解析", 第16回日本中性子科学会年会, 2016年12月01日~2016年12月02日, 名古屋大学 豊田講堂
8. M. Sugiyama, "Neutron Scattering for Bio-molecular Systems", Grand Challenges in Small-angle Scattering (招待講演)(国際学会), 2017年03月19日~2017年03月21日, Okazaki, Japan
9. M. Sugiyama, R. Inoue, K. Morishima, Y. Sakamaki, N. Fujii, K. Ishii, S. Uchiyama, "Integrative approach to protein structure and dynamics", The 8th The 8th Taiwan-Japan Joint Meeting on Neutron and X-ray Scattering (招待講演)(国際学会), 2018年3月15日~2018年3月17日, Taipei, Taiwan
10. 杉山正明, "統合構造生物学における中性子溶液散乱法", 第17回日本中性子科学会年会, 2017年12月02日~2017年12月03日, 福岡大学, 福岡
11. 杉山正明, 井上倫太郎, 小田 隆, 佐藤衛, 苅口友隆, "中性子散乱による蛋白質のドメイン運動の研究", 2017年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2018年3月02日~2018年3月04日, 水戸
12. M. Sugiyama, "Study on intra- and inter-protein dynamics by neutron solution scattering", The 17th KIAS Conference on Protein Structure and Function (招待講演)(国際学会), 2017年9月21日~2017年9月23日, Souel, Korea
13. 杉山正明, "溶液中中性子散乱", 中性子生物構造研究会(招待講演), 2017年9月11日~2017年9月11日, 東京
14. M. Sugiyama, "Investigation on domain motion of protein by neutron scattering", Frontier Bioorganization Forum :Dynamical ordering and integrated functions of biomolecular system (招待講演)(国際学会), 2017年4月24日~2017年4月27日, Taipei, Taiwan

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 正明 (SUGIYAMA MASA AKI)
京都大学・原子炉実験所・教授
研究者番号: 10253395

(2)研究分担者

井上 倫太郎 (INOUE RINTARO)
京都大学・原子炉実験所・准教授
研究者番号：80563840

藤井 紀子 (FUJII NORIKO)
京都大学・原子炉実験所・教授
研究者番号：90199290

加藤 晃一 (KATO KOICHI)
名古屋市立大学・薬学研究科・教授
研究者番号：20211849

矢木 宏和 (YAGI HIROKAZU)
名古屋市立大学・薬学研究科・講師
研究者番号：70565423

(3)連携研究者

高田 慎一 (TAKATA SHIN-ICHI)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・
J-PARC センター・研究員
研究者番号：70435600