

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年～2008 年
 課題番号：19540427
 研究課題名（和文）
 タンパク質における高次会合体形成機構の解明
 研究課題名（英文）
 Study on Mechanism of Formation of High-Order Structure of Protein
 研究代表者 杉山 正明 (SUGIYAMA MASAOKI)
 京都大学原子炉実験所・准教授
 研究者番号 10253395

研究成果の概要：

タンパク質の高次（4 次）構造の形成・変性を、中性子小角散乱法を用いて、水晶体内タンパク質 クリスタリンの外的ストレスによる変性過程（サブユニットによる耐性の相違の解明）、タンパク質分解酵素プロテアソームのサブユニットの 1 つの 7 の単独会合体の形成過程（2 重リングの形成の解明）より明らかにした。加えて、高次構造解明のために中性子小角散乱データからより詳細な構造情報を得るための手法の開発も行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：異常凝集、クリスタリン、プロテアソーム、中性子小角散乱

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能と構造が深く結び付いていることは、多くの研究によって明らかにされている事実である。そのため、タンパク質の機能を研究する上で、その構造を理解することが重要であることは言うまでもない。タンパク質が、アミノ酸残基の配列（ポリペプチド鎖の 1 次元構造）を意味する「1 次構造」、ポリペプチド鎖が部分的にパッキングしたヘリックスや シートなどの「2 次構造」、これらの 2 次構造体を部品として組み上げられる立体構造である「3 次構造」と言うように階層的な構造をとっていることは良く知

られている。そして、いわゆる「フォールディング問題」と呼ばれる「ポリペプチド鎖が多くの経路がある中、瞬時に熱力学的安定な 3 次構造をとることを可能とするメカニズムの解明」や「1 次構造から 3 次構造を予測すること」などが、これまで研究対象として注目されてきた。しかし、多くのタンパク質は 1 本のポリペプチド鎖から出来ているのではなく、むしろ、ポリペプチド鎖がフォールディングした 3 次構造体を構成要素（サブユニット）とし、更にいくつかのサブユニットが会合した 4 次構造体を形成していることが多い。したがって、この 4 次構造の形成・変性がタンパク質の機能発現・喪失に最終的に関連し

ていると言える。しかしながら、この4次構造の形成・変性の研究は、一般の結晶構造解析で扱うには、サイズが大きく、かつ現象が溶液中で進行するために、結晶中に構造形成過程を凍結することが困難である。そのため、重要であるが多くの研究がなされていない。

2. 研究の目的

上記背景で述べたように、これまであまり行われてこなかった4次構造の形成・喪失過程・機構に本研究は注目した。そこで、水溶液中のナノスケールを持つ粒子の構造を観測することが可能な小角散乱法を用いて、以下のタンパク質の構造形成・変性過程の測定を行い、これらのタンパク質の機能発現・喪失の機構を理解することを目的とした。

(1) 20-30 のサブユニットの会合体である水晶体中タンパク質 クリスタリンを試料として、このタンパク質に外的ストレスを加えて、その構造変性過程の解明を行う。

(2) 7つのサブユニットの会合体であるプロテアソームの7リングの会合形状の解析を行う。(プロテアソームは、タンパク質を分解するタンパク質であり、タンパク質の代謝系・免疫系において非常に重要な役割を担っている)

(3) 上記測定は、水溶液中のナノ粒子の構造観測が可能な小角散乱を用いて行う。しかし、これまでの小角散乱の解析法では、詳細な構造を得ることが困難である。そこで、リバースモンテカルロ法を小角散乱解析に用いた解析法の開発および Protein Data Bank(PDB)に登録されている構造データをもとにタンパク質会合体の小角散乱関数をシミュレートする手法等の解析手法の開発を行う。

3. 研究の方法

クリスタリンの外的ストレスによる構造変性過程の解明

水晶体内タンパク質 クリスタリンは、自身および他のタンパク質の構造修復を行うシャペロンであり、正常状態で、2種類のサブユニット(Aクリスタリン・Bクリスタリン：分子量はともに20KDa)が20-30程度会合した巨大複合タンパク質である。また、外的ストレス(低温・UV被曝・X線/γ線被曝)により、機能を喪失し、光学的サイズにまで達する異常に大きな会合体(異常凝集体)が形成され、この異常凝集体の蓄積が、白内障の原因となると考えられている。(このようなタンパク質の異常凝集体形成による疾病は、BSE やアルツハイマー病などが知られている。)

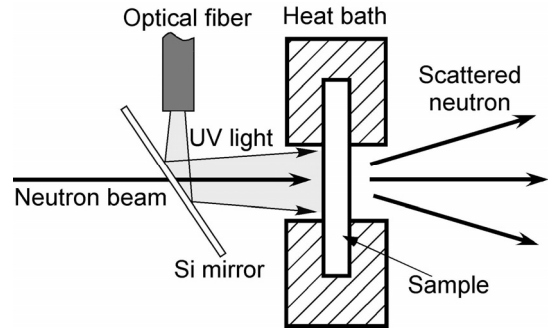


図1. 同時 UV 照射・SANS 測定システム。

試料は、Aクリスタリン単独会合体・Bクリスタリン単独会合体・A+Bクリスタリン複合会合体を調製した。

外的ストレスと構造変性の関連を明らかにするために、低温化(37C-15C)とUV被曝による構造変性を中性子小角散乱法により観測した。特にUV被曝に関しては、図1に示す試料へのUV照射と中性子小角散乱測定が同時可能なセルを開発した。

中性子小角散乱測定は、日本原子力開発機構の研究用原子炉(JRR-3)に設置されている東京大学物性研究所の中性子小角散乱装置(SANS-U)を用いて行った。

プロテアソームの7リングの高次構造の測定

プロテアソームは、図2に示す各々7種類(合計14種類)のサブユニットから成る7リングが、α-ringの順に会合した28量体(7×4量体)である。この28個にも及びサブユニットが所定の位置に配置され組み上げられていくには、精緻な形成機構の存在が不可欠であると考えられるが、その機構は解明されていない。本研究では、14種類のサブユニットの内の1つである7サブユニットが単独溶液で会合体を形成することに注目し、その構造観測を中性子小角散乱により行った。

散乱測定は、米国のアルゴンヌ国立研究所の中性子散乱研究施設(IPNS)に設置されている高角度まで測定可能な中性子小角散乱装置(LQD)を用いて行い、下記で開発したシミュレーションソフトを用いて解析を行っ

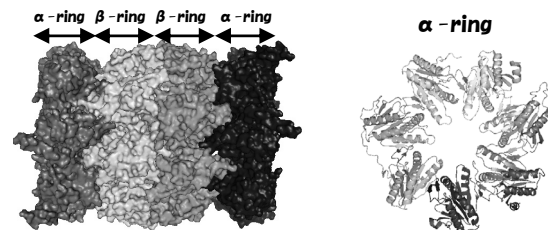


図2. プロテアソームおよび7リングの構造。

た。

新たな中性子小角散乱解析法の開発

Protein Data Bank(PDB)に登録されている構造データをもとにタンパク質会合体の小角散乱関数をシミュレートするソフトウェアの開発を行う。具体的には、タンパク質内部を 3Å の立方体に分割し、それぞれの立方体のコントラストを計算することから、小角散乱関数を求める手法と、アミノ酸残基を対応する体積を持つ球に近似し、その球の集合体の散乱関数を求める手法を開発した。更に、散乱データから直接構造を求める手法として、リバースモンテカルロ法を用いたデータ解析法の開発を行った。

4. 研究成果

クリスタリンの外的ストレスによる構造変性過程の解明

外的ストレスによるクリスタリンの構造変性過程の測定では、構造変性過程を明らかにしたのみならず、非常に興味深い成果が得られた。

A クリスタリンおよび B クリスタリンの単独会合体形状の低温化による構造変化を中性子小角散乱により測定した。散乱データより求めた距離分布関数 $P(R)$ を図 3 に示す。

図からわかるように、A クリスタリンは、低温化により、異常凝集は起こしていないが、形状が細長く変形していることがわかる。この変形(変性)が、A クリスタリンのシャペロン活性と関係していると考えられる。一方、B クリスタリンは、A クリスタリンに見られたような形状の変形は観測されていない。したがって、低温化という外的ストレスに対しては、構造的には B クリスタリンがより高い耐性を持っていると言える。

次に A クリスタリンおよび B クリスタリンの単独会合体の UV 照射による構造変化を中性子小角散乱により求めた。

図 4 からわかるように、UV 照射 10 時間

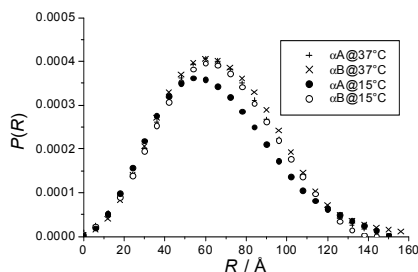


図 3. A / B クリスタリンの小角散乱の実空間フーリエ変換により求めた距離分布関数の温度依存性。

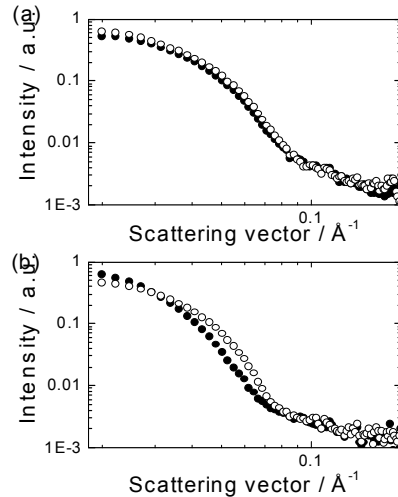


図 4. A クリスタリン(a)および B クリスタリン(b)の単独会合体の UV 照射による中性子小角散乱曲線の変化。白丸が照射前、黒丸が 10 時間照射後の散乱曲線を示す。

後のデータでは、B クリスタリンの散乱曲線の小角領域において、散乱強度の増加が観測された。このことは、B クリスタリン会合体のサイズの増加(異常凝集)を示している。一方、A クリスタリンの散乱曲線にはそのような変化は見られず、UV 被爆に対して、被爆前の構造を保っていることが言える。したがって、UV 被爆に対しては、低温化の場合と異なり、A クリスタリンの方が高い耐性を持っていることが判明した。

上記の結果は、「クリスタリンがその構成要素に、なぜほぼアミノ酸残基の配列(1 次構造)が等しい 2 つのサブユニット(A / B クリスタリン)を必要とするか?」という疑問に対して、1 つの示唆を与える。つまり、本研究から得られる推察は「クリスタリンは、様々な外的ストレスに対して耐性を持つサブユニットを構成要素に持つことにより、そ

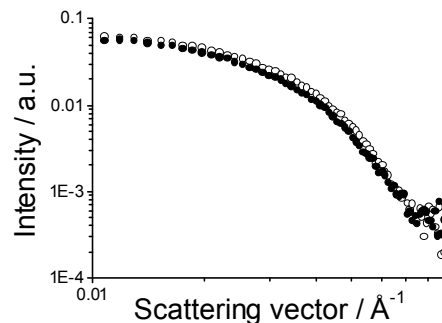


図 5. A + B クリスタリン複合系の UV 照射による中性子小角散乱曲線の変化。白丸が照射前、黒丸が 10 時間照射後の散乱曲線を示す。

これらの外的ストレスに対する耐性を獲得している」である。このことは、Bクリスタリンは、生体内の多くの場所で発現しているが、Aクリスタリンは、UV被爆の可能性のある水晶体内でしか発現していない事実をうまく説明する。更に、上記の仮説を確かめるために、A+Bクリスタリン複合系のUV照射による構造変化の測定を行った。

図5からわかるように、A+Bクリスタリン複合系のUV照射による散乱曲線の変化はほとんど観測されず、この複合系がUV照射に対して耐性を持っていることが判明した。この測定結果は、我々の仮説を強く支持している。

また、Bクリスタリン小角散乱曲線のUV照射時の経時変化を測定し、異常凝集過程の解明を行った。

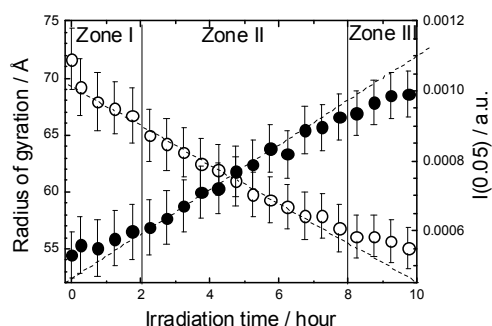


図6. 慣性半径()と中間散乱角($Q=0.05 \text{ \AA}^{-1}$)での散乱強度()の経時変化。

図6に、慣性半径と中間散乱角($Q=0.05 \text{ \AA}^{-1}$)での散乱強度の経時変化を示す。慣性半径は、UV照射の最初の2時間(Zone I)ではほとんど変化していないが、中間散乱角での散乱強度は継続的に変化している。これは、異常凝集は起きてはいないが、タンパク質の形状変化(変性)は起きていることを示している。その後、UV照射開始2時間後から8時間後まで(Zone II)は、慣性半径が継続的に増加している。この時間帯では、変性したタンパク質の異常凝集が進行していると考えられる。更に8時間を経過する(Zone III)と、慣性半径の増加と中間散乱角での散乱強度の減少が緩やかになる。この時の慣性半径は70Å程度であり、UV照射前の55Åと比べると散乱体の体積がほぼ2倍になったことを示している。つまり、この時までには2つのBクリスタリンが1つに会合したと考えられる。したがって、UV照射による異常凝集は、タンパク質がサブユニットレベルに分解されて進行するのではなく、変性した会合体がそれぞれ更に凝集してより大きな会合体を形成することにより進行していくと考えられる。

プロテアソームの7リングの高次構造の測定および新たな中性子小角散乱解析法の開発

プロテアソームの7サブユニットが形成する会合体の構造測定を行った。小角散乱から得られた慣性半径は、46.3Åであった。一方、PDBデータを基に計算した7リングの慣性半径は41.5Åとなり、実験結果を説明することができない。そこで、可能なモデルとして図7に示す7リングが2つ会合したDimerモデルを考案した。(Dimer AとDimer Bは会合面が反転している。) Dimer A、Dimer Bの慣性半径は、46.5 Åと45.5 Åとなり、ともに測定値に近い。慣性半径からでは、両者を区別することができない。そこで、PDBのデータから散乱曲線をシミュレートするプログラムを開発し、Dimer AとDimer Bの散乱曲線を求め、測定結果との比較を行った。

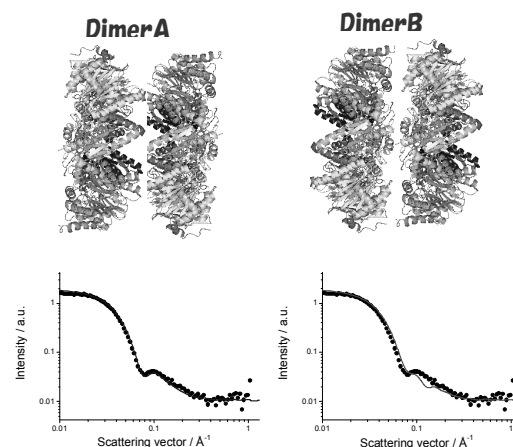


図7. 2つのDimerモデルと小角散乱Profile。

図7からわかるように、Dimer Aがよく散乱曲線を再現していることがわかる。以上より、7リングは、Dimer Aの形状を水溶液中で取っていると考える。

新たな中性子小角散乱解析法の開発

新たな中性子小角散乱法の開発のために超臨界CO₂を揺らぎ構造の散乱データからの可視化を行った。リバースモンテカル口法を用いたプログラムの作成を行い、構造の可視化に成功した。今後は、揺らぎ構造だけでなくこの手法を溶液中の溶質の構造解析に応用する予定である。

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.Sugiyama, K.Hamada, K.Kato, E.Kurimoto, K.Okamoto, Y.Morimoto,

- S.Ikeda, S.Naito, M.Furusaka, K.Itoh, K.Mori and T.Fukunaga: SANS Simulation of Aggregated Protein in Aqueous Solution, Nuclear Inst. And Methods in Physic Research A, , 600, 272-274 (2009) 査読有
- (2) M.Sugiyama, N.Fujii, Y.Morimoto, S.Kurabayashi, M.Vigild, T.Sato, T.Nakazawa, K.Itoh, K.Mori and T.Fukunaga: Structural evolution of human recombinant α B-crystallin under UV irradiation., Biomacromolecules., 9, 431-434 (2008) 査読有
- (3) 杉山正明, 藤井紀子, 森本幸生, 福永俊晴: 中性子小角散乱で見るタンパク質の異常凝集、日本中性子科学会誌「波紋」, 2008年10月, 第18巻, 第4号 191-196. 査読有
- (4) T.Sato, M.Sugiyama, K.Hamada, K.Itoh, K.Mori, T.Fukunaga, M.Misawa, T.Ohtomo and S.Takata: Structural difference between liquidlike and gaslike phases in supercritical fluid, Physical Review E, vol.78, 051503, (2008). 査読有
- (5) T.Sato, M.Sugiyama, M.Misawa, K.Hamada, K.Itoh, K.Mori and T.Fukunaga: Structural investigation on supercritical carbon dioxide and its mixture with alcohol, Journal of Molecular Liquids, vol.147, 102-106, (2009) 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 杉山正明、タンパク質及び合成高分子の Packing 様態の中性子小角散乱による観測、第3回海外中性子実験研究協力事業研究会および学術創成研究「パルス中性子源を活用した量子機能発現機構に関する融合研究」第8回研究会、2009年4月、つくば
- (2) M.Sugiyama, Y.Morimoto, K.Hamada, K.Itoh, K.Mori, T.Fukunaga, SANS Simulation of Protein in Aqueous Solution, IPS08, 2008年3月、水戸
- (3) 杉山正明、中性子小角散乱法による水溶液中でのタンパク質の会合様態の研究、第2回海外中性子実験研究事業研究会、2008年2月、つくば
- (4) 杉山正明, X線・中性子小角散乱で見るタンパク質の会合様態、放射光と中性子の相補的利用セミナー、2008年2月、神戸
- (5) 杉山正明、中性子小角散乱解析法の展開、中性子デバイスと小角散乱・反射率研究会、2008年1月、札幌
- (6) M.Sugiyama, Simulation of SANS intensity

- of protein in an aqueous solution based on crystallographic data, 2007年12月、台湾
- (7) 杉山正明、中性子小角散乱による可視化、中性子科学会年会、2007年11月、福岡
- (8) M.Sugiyama, Y.Morimoto, K.Itoh, K.Mori, T.Fukunaga, K.Hamada, H.Sahashi, E.Sakata and K.Kato, SANS study of Proteasome Activator 28 in an aqueous solution. Neutron in Biology, 2007.7.10. Oxford (UK)
- (9) M.Sugiyama, N.Fujii, Y.Morimoto, K.Itoh, K.Mori, T.Fukunaga, In situ SANS Observation of Abnormal Aggregation of A- and B-crystallins Under Environmental Stresses, 2007,6, European Conference of Neutron Scattering, Lund (Sweden).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(研究協力者)

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