

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06579

研究課題名（和文）分子混雑環境下におけるクリスタリンの構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of crystallin under crowding environment

研究代表者

井上 倫太郎（Inoue, Rintaro）

京都大学・複合原子力科学研究所・准教授

研究者番号：80563840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質重水素化技術と小角中性子散乱の組み合わせにより混雑環境下におけるクリスタリンのサブユニット交換を調べた。重水素化技術の高度化により、中性子散乱において高濃度不可視化部分重水素化クリスタリンの調整に成功した。本技術を活かすことで、混雑環境下でのクリスタリンのサブユニット交換の実測に世界で初めて成功した。非常に興味深いことに混雑環境下では希薄或いは準混雑環境と比較して交換速度の低下が観測された。詳細なモデリングにより混雑環境下では、モノマーの遊離が阻害されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのタンパク質研究は、単成分及び希薄濃度の所謂理想系で進められてきた。しかしながら、生体内は混雑環境であり理想系では無視できる排除体積効果や他の生体高分子との相互作用が顕著となる。そのため、生体内でのタンパク質の構造・ダイナミクスを理解するためには混雑環境を模倣した系での研究が望まれる。今回の研究において、中性子散乱と重水素化の技術により混雑環境下でのタンパク質の情報を引き出すことに成功した。この技術を更に発展させることで、より生体内を模倣した環境の再現が可能になり真のタンパク質の構造・ダイナミクスが明らかにできると強く期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this work, we have studied the subunit exchange of alpha-crystallin under crowding environment through the complementary use of protein deuteration technique and small-angle neutron scattering. Making use of development of protein deuteration technique, we succeeded to prepare concentrated scatteringly invisible partially deuterated alpha-crystallin. With this prepared protein, we for the first time succeeded to track the subunit exchange of alpha-crystallin under crowding environment. Contrary to our expectation, it was revealed that the exchange rate under crowding environment was slower than those under dilute or semi-concentrated ones. Through the detailed numerical calculation, a dissociation of monomer from the alpha-crystallin oligomer was suppressed under crowding environment.

研究分野：生物物理

キーワード：中性子散乱 重水素化 クリスタリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでタンパク質の溶液中の構造・ダイナミクス解析は主に数 mg/mL 以下の所謂希薄濃度下での研究が進められてきた。しかしながら、実際の細胞内においてはタンパク質濃度が 100 mg/mL を超えるような混雑環境である。そのような濃厚溶液中においては、上述した希薄環境下では本質的に無視できるような排除体積効果及び他の生体高分子との相互作用が顕著になる。その結果、希薄環境下で得られてきた目的タンパク質の構造・ダイナミクスとは異なることが予測され、実際に NMR や小角 X 線散乱などにより特異な構造・ダイナミクスが報告されつつある。一方、混雑環境下での目的タンパク質の構造・ダイナミクスの統一的理解には未だ十分な研究成果の蓄積されていないため至っていない。そこで、混雑環境を再現する新たな実験手法の確立とその環境下における目的タンパク質の構造・ダイナミクスを本研究課題で調べることを試みた。

2. 研究の目的

混雑環境を再現するためには、タンパク質のみならず核酸や多糖などの様々な生体高分子を溶液中に共存させることが必要不可欠である。しかしながら、それらを高純度且つ大量に調整することは実験上きわめて困難である。我々は特に生体内での混雑環境を維持している系である水晶体に着目した。水晶体はレンズとして機能するためにタンパク質濃度を 100 mg/mL 以上に保持している。興味深いことに水晶体はクリスタリンと呼ばれるタンパク質と水分のみで構成され、他の構成生体高分子がほぼ存在しない非常に単純な系である。言い換えれば、クリスタリンの濃厚溶液を調整するのみで混雑環境を再現することが可能である。そこで、我々は水晶体を模倣した混雑環境をクリスタリンの濃厚溶液の調整により、クリスタリンの構造及びダイナミクスを調べることを本研究課題の目的とした。クリスタリンは、主に α -クリスタリン、 β -クリスタリン、 γ -クリスタリンの三種類により構成されるが、その中でも α -クリスタリンは重量比率で 50% 近くにも達する。過去の研究より、 α -クリスタリンは非常にダイナミックな挙動を示し、我々の研究グループにおいても α -クリスタリンには構成するサブユニット間でのサブユニット交換が存在することが希薄濃度において存在することを報告してきた。しかしながら、混雑環境下において実際にサブユニット交換が存在するのか或いは存在したとしても希薄濃度下でのサブユニット交換とどのように異なるかに関しては未だ報告例がない。そこで、特に混雑環境下における α -クリスタリンのサブユニット交換に特に着目した。

3. 研究の方法

本研究を進めるにあたり、1. 混雑環境を構築する高濃度タンパク質溶液の調整、2. 混雑環境下でのサブユニット交換を追跡する手法開発の二つの要素を充足する必要がある。1. に関してはただ単純に高濃度タンパク質溶液を調整するのみでは、図 1(a) に示すように他の粒子との相関(粒子間干渉)が顕著となる。このような干渉存在下では実測散乱データに影響がみられる、特にサブユニット交換追跡に使用する前方散乱強度($I(0)$)を正しく評価することが極めて困難となり、結果的に 2. も満たすことが出来なくなる。そこで、混雑環境下であっても粒子間干渉の影響が無いような改良高濃度溶液を実験的に構築することが必要不可欠である(図 1(b) 参照、図中の赤丸のみが観測できる)。中性子散乱の大きな特徴として溶質と溶媒の散乱長密度(SLD)を一致させることで、溶質としての存在があるにも関わらず”散乱的に不可視化”することが可能となる。図 2 に軽水素化タンパク質及び 75% 重水素化タンパク質の SLD を示すが、それぞれ 40%, 100% 重水中で散乱的に不可視化できる。100% 重水は、40% 重水と比較して溶媒由来の非干渉性散乱によるバックグラウンドが一桁程度も低いので高 S/N の実験が実現可能となる。そこで、図 1(b) に示した改良高濃度タンパク質溶液を作成するには、100% 重水中で混雑環境を構成する高濃度(>100 mg/mL)の 75% 重水素化タンパク質溶液を調整しその系に粒子間干渉が無視できるような濃度の軽水素化タンパク質の添加が必要である。つまり、本研究では、高濃度(>100 mg/mL)の 75% 重水素化 α -クリスタリンと数 mg/mL 程度の濃度の軽水素化 α -クリスタリンの調整が要される。この改良高濃度タンパク質溶液を調整した後に、小角中性子散乱により混雑環境下におけるサブユニット交換の追跡が可能となる。大量の 75% 重水素化 α -クリスタリンを調整後、重水素化率を MALDI 質量分析により評

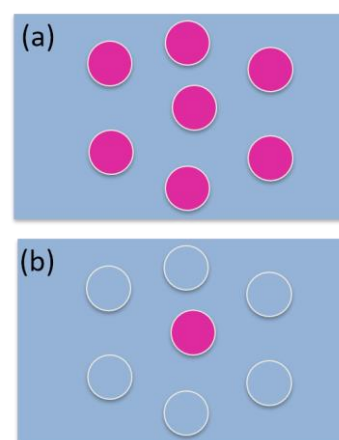


図 1(a) 通常の高濃度タンパク質溶液。(b) 改良高濃度タンパク質溶液。

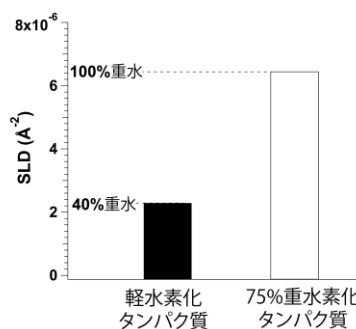


図 2 軽水素化及び 75% 重水素化タンパク質の散乱長密度。

価した。SANS 測定にはオーストラリア原子力科学技術機構 (ANSTO) に設置されている小角散乱装置 (Quokka) を用いた。

4. 研究成果

(1) 75%重水素化 α -クリスタリンの重水素化率検定及び 100%重水中での SANS プロファイル。

上述したように溶質と溶媒の散乱長密度をそろえることが散乱的に不可視化できるが、僅かな重水素化率のずれが混雑環境を構築する場合は大きな余剰散乱となる。そこで、SANS 測定前に調整した 75%重水素化 α -クリスタリンの重水素化率を調べた。図 3 に軽水素化及び 75%重水素化 α -クリスタリンの質量分析より得られたスペクトルを示す。重水素化による質量増大によるスペクトルのシフトが確認され、軽水素化 α -クリスタリンと比較することで重水素化率は 71.7%と見積もられた。アミノ酸配列からの予測される 100%重水の SLD と一致する厳密な重水素化率は 73.2%であり僅かに予測とのずれが確認された。この重水素化率からのずれが SANS プロファイルに現れるかを確かめるために、この 71.7%重水素化 α -クリスタリンを 110 mg/mL まで濃縮した濃厚 71.7%重水素化 α -クリスタリン溶液及び粒子間干渉の影響が十分に無視できる 0.45 mg/mL 軽水素化 α -クリスタリンの 37°Cにおける SANS プロファイルを図 4 に示す。濃厚 71.7%重水素化 α -クリスタリン溶液から特に小角側での立ち上がりが観測されるものの、非常に興味深いことに小角側の散乱強度は 0.45 mg/mL の軽水素化 α -クリスタリンの方が強いことが確認された。このことは、今回調整した濃厚 71.7%重水素化 α -クリスタリン溶液は実験的に散乱的に不可視化された混雑環境構築成分として利用可能であることを示している。なお、75%重水素化タンパク質の調整、重水素化率の決定などの今回の研究課題で得られた知見は別論文として纏めた[1]。また、更なる散乱的に不可視化可能な濃厚 α -クリスタリン溶液の作成にはより厳密な重水素化率の調整が必要である。

(2) 混雑環境下における α -クリスタリンサブユニット交換の観測

濃厚 71.7%重水素化 α -クリスタリン溶液がほぼ散乱的に不可視化可能な混雑環境を構築成分として利用できることが確認できたので、混雑環境下における α -クリスタリンのサブユニット交換に注目した。最初に、110 mg/mL 71.7%重水素化 α -クリスタリンと 1.8mg/mL の軽水素化 α -クリスタリンを 100%重水中で 37°Cにて混合後、時分割 SANS 測定を開始した。特に、サブユニット交換の追跡のために $I(0)$ に注目するが、サブユニット交換が進行すれば軽水素化、重水素化サブユニットが混ざり合ったヘテロオリゴマーが時間経過と共に形成される。その結果、タンパク質の SLD と溶媒の SLD との差分が減少し最終的に $I(0)$ が時間経過と共に減少する。図 5 に SANS プロファイルの時間発展をしめすが、明確に時間経過に伴い散乱強度の低下が確認された。このことは、混雑環境において α -クリスタリンのサブユニット交換が存在することを示す世界初の結果である。この得られた SANS プロファイルに対して Guinier 解析を行うことで $I(0)$ の時間発展を評価した。図 6 に 110 mg/mL 71.7%重水素化 α -クリスタリンと 1.8mg/mL の軽水素化 α -クリスタリンからなる混雑系及び 28.5mg/mL 71.7%重水素化 α -クリスタリンと 0.45mg/mL の軽水素化 α -クリスタリンからなる準混雑系[2]から得られた 37°Cでの $I(0)$ の時間発展を示す。混雑系の方が $I(0)$ の時間発展が遅くなっていることが見て取れる。そこで、単一の指数関数によりそれぞれの系にお

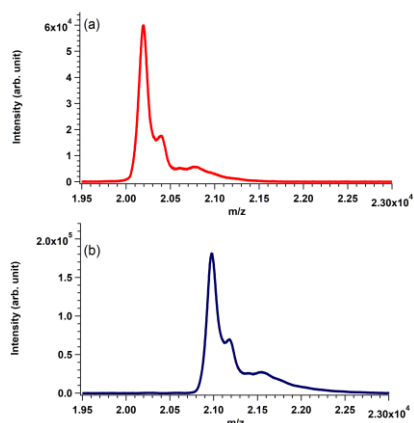


図 3 (a)軽水素化、(b)75%重水素化タンパク質の質量分析から得られたスペクトル。

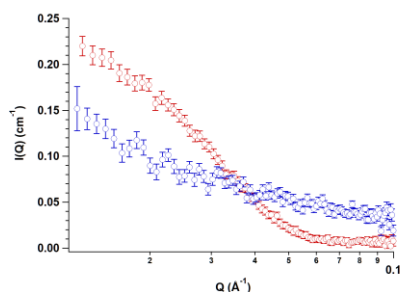


図 4 0.45 mg/mL 軽水素化、110 mg/mL%71.7%重水素化タンパク質の SANS プロファイル。

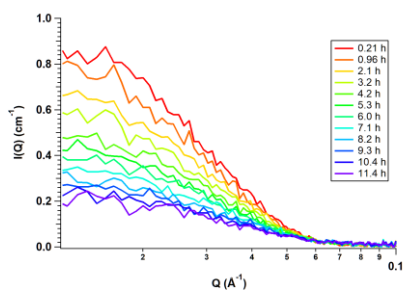


図 5 110 mg/mL 71.7%重水素化 α -クリスタリンと 1.8mg/mL 軽水素化 α -クリスタリン混合後の SANS プロファイルの時間発展。

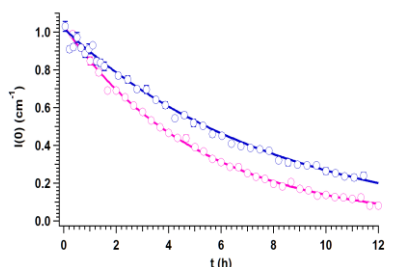


図 6 混雑系(青丸)及び準混雑系(ピンク丸)の $I(0)$ の時間発展。実線は単一指数関数による fit の結果。

る交換の時定数を算出した。その結果、混雑系、準混雑系の交換の時定数はそれぞれ $0.13 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, $0.20 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ と見積もられ、やはり混雑系の方が交換速度の低下を確認することができた。なお、両系において構成するすべてのサブユニットは交換可能であることが明らかとなった。

(3) 混雑環境下におけるサブユニット交換のモデリング

希薄環境下[3]におけるサブユニット交換は図7に示すように α -クリスタリンのオリゴマーからモノマーが遊離・再会合が素過程とした monomer association/dissociation model により再現することができた。そこで、混雑及び準混雑系におけるサブユニット交換も同モデルにより解析を行った。図8に同モデルによる解析結果を示すが、両系共に $I(0)$ の時間発展を再現することができた。特筆すべき点は、混雑系においてモノマーのオリゴマーからの脱離速度が準混雑系と比較して1.6倍程度低下することが確認された。 α -クリスタリンのこのサブユニット交換が機能の相関していることを示唆する報告例[4]もあるので、この混雑系においては寧ろシャペロン活性が低下する可能性が示唆される。本結果をより深く理解するために、生化学的な実験による検証を進めている。

<引用文献>

- [1] A. Okuda et al., Biophys. Physicobiol. 18, 16 (2021).
- [2] R. Inoue et al., Sci. Rep. 11, 2555 (2021).
- [3] R. Inoue et al., Sci. Rep. 6, 29208 (2016).
- [4] I. Raju et al., Plos One, 7, e31421 (2012).

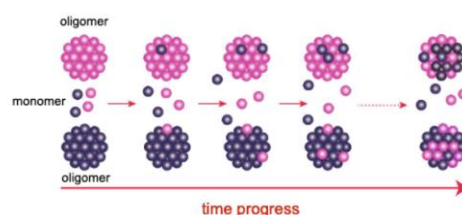


図7 monomer association/dissociation model の概略図。

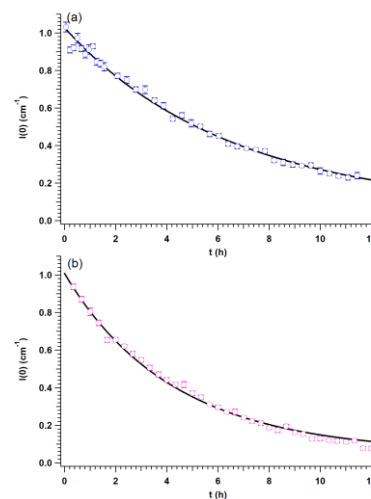


図8 混雑系(青丸)及び準混雑系(ピンク丸)の monomer association/dissociation model による解析結果(黒実線)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yunoki Yasuhiro, Matsumoto Atsushi, Morishima Ken, Martel Anne, Porcar Lionel, Sato Nobuhiro, Yogo Rina, Tominaga Taiki, Inoue Rintaro, Yagi-Utsumi Maho, Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Urade Reiko, Terauchi Kazuki, Kono Hidetoshi, Yagi Hirokazu, Kato Koichi, Sugiyama Masaaki	4. 巻 5
2. 論文標題 Overall structure of fully assembled cyanobacterial KaiABC circadian clock complex by an integrated experimental-computational approach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03143-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 N. Hitoki et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25560-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Hiroshi, Saio Tomohide, Nagao Michihiro, Inoue Rintaro, Sugiyama Masaaki, Ajito Satoshi, Tominaga Taiki, Kawakita Yukinobu	4. 巻 120
2. 論文標題 Conformational dynamics of a multidomain protein by neutron scattering and computational analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 3341 ~ 3354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2021.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Sugiyama Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Solution structure of multi-domain protein ER-60 studied by aggregation-free SAXS and coarse-grained-MD simulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85219-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Rintaro, Sakamaki Yusuke, Takata Takumi, Wood Kathleen, Morishima Ken, Sato Nobuhiro, Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Urade Reiko, Fujii Noriko, Sugiyama Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Elucidation of the mechanism of subunit exchange in B crystallin oligomers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82250-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okuda Aya, Inoue Rintaro, Morishima Ken, Saio Tomohide, Yunoki Yasuhiro, Yagi-Utsumi Maho, Yagi Hirokazu, Shimizu Masahiro, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Kato Koichi, Sugiyama Masaaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Deuteration Aiming for Neutron Scattering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 16 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v18.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Rintaro, Oda Takashi, Nakagawa Hiroshi, Tominaga Taiki, Saio Tomohide, Kawakita Yukinobu, Shimizu Masahiro, Okuda Aya, Morishima Ken, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Sato Mamoru, Sugiyama Masaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Dynamics of proteins with different molecular structures under solution condition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78311-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Noriko, Takata Takumi, Kim Ingu, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Magami Kousuke, Matsubara Toshiya, Sugiyama Masaaki, Koide Tamaki	4. 巻 1868
2. 論文標題 Asp isomerization increases aggregation of -crystallin and decreases its chaperone activity in human lens of various ages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140446 ~ 140446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2020.140446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Inoue, Rintaro; Sakamaki, Yusuke; Takata, Takumi; Morishima, Ken; Wood, Kathleen; Sato, Nobuhiro; Okuda, Aya; Shimizu, Masahiro; Urade, Reiko; Fujii, Noriko; Sugiyama, Masaaki
2. 発表標題 Subunit dynamics in alpha-crystallin through deuteration-assisted small-angle neutron scattering
3. 学会等名 IUCr 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Inoue and M. Sugiyama
2. 発表標題 Subunit dynamics of α -crystallin studied by inverse-contrast small-angle neutron scattering
3. 学会等名 第21回日本中性子科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上倫太郎
2. 発表標題 コントラスト変調小角中性子散乱によるタンパク質複合体の解離会合現象の可視化
3. 学会等名 CBI学会2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 倫太郎, 杉山 正明
2. 発表標題 準弾性中性子散乱による溶液中におけるタンパク質の内部運動解析にむけて
3. 学会等名 日本中性子科学会第20回年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.rri.kyoto-u.ac.jp/PSIab/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉山 正明 (Sugiyama Masaaki) (10253395)	京都大学・複合原子力科学研究所・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	ansto		