

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19570148
 研究課題名（和文）放射光X線溶液広角散乱のハイスループット化による蛋白質の階層構造解析法の確立
 研究課題名（英文）Establishment of hierarchical structure analysis of proteins in solutions by high-throughput of wide-angle X-rays scattering using synchrotron radiation source
 研究代表者
 平井 光博（HIRAI MITSUHIRO）
 群馬大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：00189820

研究成果の概要（和文）：第3世代の放射光源を用いたX線広角散乱法は、溶液中でのタンパク質などの階層構造や機能発現の *in situ* 観測をする鍵となる。溶液X線広角散乱法の確立を目的とした本研究の実施によって、放射線ダメージを回避しながら高い統計精度の散乱データを得ることが可能となり、タンパク質の水和シェルと構造転移の関係、タンパク質のアミロイド転移における核形成・成長の全過程の観測、アミロイド転移にともなうタンパク質のダイナミクスの変化を明らかにした。その結果は、11報の学術論文、5件の国際会議および18件の国内学会・研究会（招待講演7件）にて発表した。

研究成果の概要（英文）：The wide-angle X-ray scattering using the third generation synchrotron radiation source is a promising and powerful method elucidating *in-situ* hierarchical structures of proteins at those functional states. By the execution of this study aimed for the establishment of the solution X-ray wide-angle scattering, we can get scattering data with high statistics precision while avoiding radiation damage, and we clarified the relation between hydration shell and structural transition of a protein, the all processes of nucleation / growth in the amyloid metastasis, the change of dynamics of a protein induced by the amyloid transition (α -to-cross- β). We published the above results of this project in 11 full articles in academic journals and in 23 papers at overseas international conferences and at domestic academic society meetings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質、生体膜、階層構造、フォールディング、アミロイド形成、X線広角散乱、放射光

1. 研究開始当初の背景

溶液中での X 線小角散乱の重要性は、第 2 世代の放射光源（日本では高エネルギー加速器研究機構 PF, 1982 年稼働）の利用が開始された当初から認識され、タンパク質を始め様々な生体高分子系の研究に利用され、数多くの成果に結実した。しかし、ビームの性質（輝度、平行性、波長など）や測定器系の性格から、国内外を問わずタンパク質系の多くの研究において、分子の外形を表す回転半径や距離分布関数などの低分解能の構造評価に留まっている。我々は中角領域に反映される 1 - 3 nm のタンパク質のドメイン間の相関構造に着目して研究を行い、示差熱測定との対応からタンパク質の熱構造転移の多状態性と階層性が密接に関連していることを示したが (*J. Phys. Chem. B* 102, 1308, 1998; *Biophys. J.* 76, 2192, 1999; *J. Phys. Chem. B* 103, 549, 1999; *J. Phys. Chem. Solids* 60, 1379, 1999 など)、内部の構造階層性と転移との関係の詳細を議論するに足る広い空間領域の高い統計精度の X 線散乱データを得ることは困難であった。

第 3 世代の放射光源 SPring-8 の建設とその利用によって状況は一変し、申請者らはタンパク質広角溶液散乱 (0.2 - 30 nm) の有効性とその解析法を世界に先駆けて示し (*J. Synchrotron Rad.* 9, 202, 2002), 総説雑誌 (Koch et al., *Quarterly Rev. Biophys.* 36, 147, 2003) など直ちに引用され、*SPring-8 Research Frontiers 2004* にも掲載された。研究代表者の報告を契機として、現在、欧州 (ESRF, 1994 年稼働)、米国 (APS, 1996 年稼働) などにおいても、タンパク質溶液散乱においては広角領域まで拡張する測定の重要性が認識されて研究の急速な展開が図られているが (Makowski et al., *J. Synchrotron Rad.* 10, 398, 2003; Sokolova et al., *J. Appl. Cryst.* 36, 865, 2003; Fischetti et al., *Chem. Biol.* 11, 1431, 2004), この目的に特化したハード・ソフトともに世界的にまだ開発段階にある。それに対して本研究では、第 3 世代放射光 X 線広角散乱測定・解析技術を確立して 2 次構造から 4 次構造に至る全空間領域を一括して観測して、時空階層性に依存した構造転移機構の全貌を明らかにする点に特色と独創性がある。また、広空間領域・高統計精度の溶液 X 線散乱 (高分解能 X 線溶液散乱) 測定法の確立は、本研究主題に留まらず、基盤技術とし

て溶液中でのタンパク質とリガンドとの相互作用の特異性、未知の非結晶化タンパク質構造予測、医療、創薬、バイオプロセス工学などの応用生命科学研究に展開されると同時に、他の応用分野にも広く波及することが期待される。

2. 研究の目的

生体系の機能は、タンパク質、核酸、脂質などの各構成要素の物理化学的性質と、それらが複雑に絡み合った超分子・複合系の相互作用や連鎖反応機構を通じて発現する。これらの超分子・複合系では弱い相互作用 (水素結合、疎水結合、van der Waals 力など) によって構造を形成するために構造や運動は時空階層性を有し、外部環境の変動や刺激による相互作用の変化が容易に階層構造の揺らぎや機能を変化させ得る。このような変化を理解するためには、溶液中での広い空間・時間領域にわたる構造情報と階層間の構造相関 (協同性) の解析が重要な手掛かりを与える。放射光 X 線散乱法は、サブナノメートルからマイクロメートルに及ぶ空間スケールの構造評価の手段として、様々な生体材料・生体システムの多様な条件下での *in situ* 構造解析に適した強力な手法と位置づけられる。特に、広い散乱角 (q) 領域の X 線散乱 (X 線広角散乱) を高精度で測定することが生体高分子複合系の階層構造と機能発現の関係を解明する鍵となる。

本研究の主たるターゲットであるタンパク質には 2 次構造、ドメイン構造、3 次・4 次構造などの構造階層性が存在しており、研究代表者の平井は第 3 世代の放射光源を利用して広い空間領域で高い統計精度の X 線散乱を観測することで、タンパク質の構造の特徴 (構造分類など) に依存した全階層構造の解析が可能であり (前記の論文)、また、フォールディング/アンフォールディング転移における分子内部の構造変化や揺らぎの階層構造依存性と構造相関を詳細に議論できることを世界に先駆けて実証した (*Biochemistry* 43, 9036, 2004, *放射光*, 19, No.6, 2006, *in press*)。特に、現在、タンパク質結晶構造解析法の進展によって膨大な数の結晶構造が明らかとなっているため、より生理的環境に近い溶液中でのタンパク

質からの高統計精度の X 線広角散乱データを、結晶構造を基に解析することで機能状態での構造変化を知ることが可能であり、また、結晶構造の明らかな多くのタンパク質の溶液 X 線広角散乱を測定してデータベース化することにより、結晶化を経ずに溶液散乱パターンから直接タンパク分子の 2 次構造や 3 次構造を推定することを Makowski ら (*J. Synchrotron Rad.* **10**, 398, 2003) は提案している。将来的には、タンパク質とリガンドとの特異的・非特異的結合などを溶液中で検出し、創薬開発に用いることも可能になると期待できる (Fischetti et al., *Chem. Biol.* **11**, 1431, 2004)。

このような溶液中での X 線広角散乱の有効性は、第 3 世代の放射光源（日本では高輝度光科学研究センター SPring-8, 1998 年稼働）の出現によって初めて明らかになったが、世界的に見ても上記の目的のために特化された測定周辺機器や解析法（ソフトウェア）などは不十分である。早急にそれらを開発・整備して、時空階層性を通じた生体系の機能の発現や制御の機構を解明することを目的として本研究は実施された。

3. 研究の方法

下記の項目に関して、第 3 世代放射光源である高輝度光科学研究センター SPring-8 の BL40B2 に設置されている小角散乱装置を用いて、X 線広角散乱研究を推進する。

1) 溶液の放射光 X 線広角散乱測定のハイスループット化のため、温度調節機能をもった溶液振動（オシレーション）型試料交換器システムを設計・製作し、溶液の放射光 X 線広角散乱測定の格段の迅速化と放射線損傷の回避を図った。

2) タンパク質の階層構造と構造転移、階層間の転移の同時性と協同性の評価

タンパク質の構造転移に関しては、X 線小角散乱をはじめ CD, FT-IR, NMR, 質量分析, 示差熱など様々な手法を用いて、多様な溶媒・温度条件下での研究があるが、本研究では、主に温度・溶媒条件をパラメーターとした研究を進めた。第 3 世代放射光 X 線広角散乱によって、PDB 登録座標から計算される全階層構造の理論散乱曲線と比較できる程度の統計精度で散乱データが得られているが、構造転移の広角散乱測定を行い、各階層構造別の変化と階層構造間の転移の同時性や協同性の

解析、転移階層構造地図の作成など行った。

3) アミロイド転移・核形成・線維成長の全過程の解明

アミロイド形成の各過程 ($\alpha \rightarrow \beta$ 転移とクロス β 構造の出現 [アミロイド核形成], クロス β 構造のスタッキング [アミロイド核重合と成長], 超分子線維形成に至る過程) は極めて広い構造空間領域で起きる。アミロイド形成の全過程を X 線広角散乱により高統計精度で観測して、2 次構造から 4 次構造に至る広い空間領域でアミロイド形成の観測を行った。

4. 研究成果

●溶液の放射光 X 線広角散乱測定の格段の迅速化と放射線損傷の回避に関して：

低速回転型試料交換器および溶液振動（オシレーション）型試料交換器を開発し、その放射線損傷回避効果を検討。必要試料量が 20 μ l 程度である多連装回転型試料交換器の方が有効であることが判明した。

●タンパク質の階層構造と構造転移に関して：

上記交換機を用いて X 線広角散乱測定を行い、得られた高精度の広い空間領域のタンパク質の構造情報を用いて、タンパク質の原子座標に基づいてタンパク質の理論溶液散乱関数を計算可能なプログラム CRY SOL により、実験データに対してフィッティングを行い、熱構造転移におけるタンパク質の水和構造の変化について検討を行った。X 線広角散乱測定および理論溶液散乱曲線の計算により、HEWL の熱構造転移（アンフォールディング・リフォールディング）過程の初期段階に起きるタンパク質の水和構造の変化について下記のことを明らかにした。(1) タンパク質の熱転移、すなわち、熱によるアンフォールディングの初期段階及びフォールディングの終段階は、native 状態での水和シェルの崩壊・再形成と強い相関がある。(2) 熱変性に伴い、全体的な構造（三次構造）が崩れる初期の段階で水和シェルの崩壊がおきる。

●アミロイド転移・核形成・線維成長の全過程の解析に関して：

タンパク質のアミロイド線維の形成過程や安定性、形成速度における溶媒条件及び温度条件などの関連性が多く議論されているが、詳細な構造学的知見は乏しい。上記交換機を用いて X 線広角散乱測定を行い、広角領域に

至る高分解能溶液散乱法を用いて、apomyoglobin のアミロイド形成過程について詳細な解析を行うことで、アミロイド線維の核生成過程におけるタンパク質分子の分子内構造の変化 (α - β 転移による cross- β 構造が形成と β -シートのスタッキング構造の形成) について検討を行った。その結果、以下のことが明らかにした。(1)アミロイド核の生成条件下では、Apomyoglobin はコンパクトな構造を保っており、アミロイド核の生成において、変性状態やアンフォールド状態は適切ではなく、コンパクトな構造を保った状態が適切であると考えられる。(2)Cross- β 構造及びスタッキング構造は -53°C で同時に形成され、そのアミロイド形成反応は、重合核依存性重合モデルに当てはまる傾向が示唆される。アミロイド形成過程では、偏長楕円状の二量体が形成され、その後四量体を經由して、プロトフィラメント形成に至る過程が見られる。

●その他の成果:

上記 apomyoglobin のアミロイド形成過程の研究で得られた成果を基礎に、中性子非弾性散乱実験を行い、 α - β 転移による cross- β 構造が形成が及ぼすタンパク質の内部構造の揺らぎの変化 (ダイナミックスの変化) を検討した結果、ダイナミックスの著しい変化が、 α - β 転移温度近傍で観察されること、20 と 360K の間の広い温度範囲の観測から、200K 近傍から 50ps スケールの動的転移が起きることなどが明らかとなった。

また、作成した低速回転型試料交換器を用いて脂質混合リポソームの浸透圧による構造転移 (二重構造形成) などを明らかにした。

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 11 件)

① E. Fabiani, A. M. Stadler, D. Madern, M. M. Koza, M. Tehei, M. Hirai, and G. Zaccai.

Dynamics of apomyoglobin in the alpha-to-beta transition and of partially unfolded aggregated protein

Eur. Biophys. J., 2009, **38**, 237-244. 査読有り

② T. Onai, and M. Hirai.

Effect of alcohols on glycosphingolipid aggregates

Trans. Material Res. Soc. Jpn., 2008, **33**,

567-572. 査読有り

③ M. Hirai

Structural transition of protein observed wide-angle scattering: Study of protein folding under osmotic pressure

KEK Proceeding 2008, 8, 87-90. 査読無し

④ M. Hirai.

Feasibility of complementary use of neutron and X-ray scattering techniques in research of lipid mixtures

J. Phys. : Conference Series, 2007, **83**, 012003. 査読有り

⑤ T. Onai and M. Hirai.

Effect of osmotic pressure on ganglioside-cholesterol-DOPC lipid mixture

J. Phys. : Conference Series, 2007, **83**, 012016. 査読有り

⑥ T. Hayakawa, A. Makino, S. Michaud, M. Lagarde, A. Douteau, K. Ito, M. Hirai, and T. Kobayashi,

Membrane properties of dipalmitoyl bis (monoacylglycerol) phosphate

MEMBRANE, 2007, **32**, 221-228. 査読有り

⑦ M. Hirai and T. Onai.

Functional properties of glycosphingolipid aggregates and mixtures with cholesterol and phospholipid

Trans. Material Res. Soc. Jpn., 2007, **32**, 287-292. 査読有り

⑧ R. Kawai-Hirai and M. Hirai.

Effect of cations on the structure of sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate water-in-oil microemulsion

J. Appl. Cryst., 2007, **40**, s274-s278.

査読有り

⑨ M. Hirai, T. Onai, M. Koizumi, H. Hirai, K. Kasahara, N. Suzuki, K. Yuyama and K. Inoue.

Permeability of water through a raft model membrane clarified by time-resolved SANS and SAXS

J. Appl. Cryst. 2007, **40**, s159-s164. 査読有り

M. Koizumi, H. Hirai, T. Onai, K. Inoue and ⑩ M. Hirai.

Collapse of the hydration shell of a protein prior to thermal unfolding

J. Appl. Cryst. 2007, **40**, s175-s178. 査読有り

T. Onai, M. Koizumi, H. Lu, K. Inoue and ⑪ M. Hirai.

Initial process of amyloid formation of apomyoglobin and effect of glycosphingolipid GM1

J. Appl. Cryst. 2007, **40**, s184-s189. 査読有り

[学会発表] (計 23 件)

- ① 萩原慶彦, 小内輝明, 平井光博
タンパク質内包リポソームの構造特性とその制約空間におけるタンパク質の構造安定性
第 27 回 PF シンポジウム、2010/03/09-10、つくば国際会議場エポカル
- ② 萩原慶彦, 平井光博
Structural Characterization of Liposome Occluding Proteins Under Different Preparation Conditions
日本生物物理学会第 47 回年会、2009/10/30-11/01、アスティとくしま
- ③ 小内輝明, 平井光博
Wide-angle X-ray scattering study of pH dependence on the structure of the vesicle containing glycosphingolipid under osmotic pressure
日本生物物理学会第 47 回年会、2009/10/30-11/01、アスティとくしま
- ④ M. Hirai, T. Onai, C. Gou, and K. Inoue.
Protein Folding and Unfolding under Osmotic Pressure
XIV International Conference on Small-Angle Scattering, 2009/09/13-18, Oxford, UK
- ⑤ Y. Hagiwara, and M. Hirai
Interaction of Cholera Toxin B-subunits with raft-model vesicles containing glycosphingolipids studied by using SAXS and WAXS
XIV International Conference on Small-Angle Scattering, 2009/09/13-18, Oxford, UK
- ⑥ T. Onai, and M. Hirai
Effect of PVP on the structure of large uni-lamellar vesicles containing glycosphingolipid clarified by using WAXS
XIV International Conference on Small-Angle Scattering, 2009/09/13-18, Oxford, UK
- ⑦ 小内輝明, 平井光博
タンパク質内包リポソームの構造特性とその制約空間におけるタンパク質の構造安定性
第 26 回 PF シンポジウム、2010/03/09-10、つくば国際会議場エポカル
- ⑧ 平井光博, 小内輝明
ラフトモデル膜のダイナミクス, アミロイド蛋白質の効果
日本中性子科学会第 8 回年会、2008/12/1-12/2、名古屋大学
- ⑨ 平井光博, 小内輝明
Slow dynamics of raft model membrane composed of glycosphingolipid
日本生物物理学会第 46 回年会、

2008/12/3-12/5、福岡国際会議場

⑩ 小内輝明, 平井光博

A wide-angle X-ray scattering study of influence of PVP on the structure of large unilamellar vesicles containing glycosphingolipid

日本生物物理学会第 46 回年会、2008/12/3-12/5、福岡国際会議場

⑪ 平井光博

放射光 X 線広角散乱によるタンパク質の階層構造と構造転移の研究

第 12 回 SPring-8 シンポジウム

2008/10/30-11/1, 東京国際交流館

⑫ 平井光博

タンパク質の構造転移と広角散乱: 浸透圧下における折畳みの研究

PF 研究会「ナノ構造解析・センシングにおける小角散乱の利用高度化の将来展望」, 2008/09/18, 高エネルギー加速器研究機構

⑬ 小内輝明, 平井光博

浸透圧下における糖脂質を含むリポソームの構造研究

PF 研究会「ナノ構造解析・センシングにおける小角散乱の利用高度化の将来展望」, 2008/09/18, 高エネルギー加速器研究機構

⑭ M. Hirai

Protein folding under osmotic pressure
IUCr2008 Satellite Meeting on X-ray and Neutron Techniques for Nano-Structural Research, 2008/08/21-08/23, 高輝度光科学研究センター

⑮ 平井光博

放射光 X 線広角散乱法によるタンパク質の階層構造とフォールディングの研究

日本生物物理学会北海道支部講演会、2007/08/06, 室蘭工業大学

⑯ M. Hirai

Prospect of the Study of Protein Hierarchical Structures in Solutions using Wide-Angle Scattering

Workshop on Nanostructural Analysis with wide-q data, 2008/01/27, JAEA, 東海

⑰ 中川隆司, 柳茂, 平井光博, 野中孝, 木原裕, 小島正樹

Correlation between wide-angle X-ray scattering profile and helical structure

日本生物物理学会第 45 回年会、2007/12/21-12/23、パシフィコ横浜

⑱ 平井光博, 陳剛, 小内輝明, 井上勝晶

Interaction of ganglioside-contained lipid mixture with denatured protein clarified by SAXS and WAXS

日本生物物理学会第 45 回年会、2007/12/21-12/23、パシフィコ横浜

⑲ 小内輝明, 平井光博

Effect of PVP on the structure of ganglioside/cholesterol/dioleoylphospha

tidylcholine mixtures

日本生物物理学会第45回年会、
2007/12/21-12/23、パシフィコ横浜

20 陳剛, 小内輝明, 井上勝晶, 平井光博

Effect of osmotic pressure on
unfolding-refolding of globular proteins
clarified by wide-angle X-ray scattering

日本生物物理学会第45回年会、
2007/12/21-12/23、パシフィコ横浜

21 平井光博

Functions of Raft Model Membrane Clarified
by X-ray and Neutron Scattering Methods
第18回日本MRS学術シンポジウム
2007/12/07-12/09, 日本大学

22 平井光博

埋もれた界面の機能について

埋もれた界面のX線・中性子解析に関するワ
ークショップ 2007, 2007/07/22-07/24, 東北
大学金属材料研究所

23 小内輝明, 平井光博

ラフトモデル膜の水の透過のX線・中性子散
乱法による研究

埋もれた界面のX線・中性子解析に関するワ
ークショップ 2007, 2007/07/22-07/24, 東北
大学金属材料研究所

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 光博 (HIRAI MITSUHIRO)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00189820

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：