

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570106

研究課題名（和文） 放射光高圧ジャンプ小角散乱法を用いた細胞骨格タンパク質重合ダイナミクスの研究

研究課題名（英文） Oligomerization dynamics on cytoskeletal proteins using synchrotron high-pressure jump small-angle scattering technique.

研究代表者

藤澤 哲郎 (FUJISAWA TETSURO)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：10231565

研究成果の概要（和文）：

本プロジェクトは、我々が開発した微小体積、放射光高圧小角散乱システムを高度化し細胞骨格タンパク質のフィラメントの安定性を評価した。高圧ジャンプという緩和法により、アクチン類似タンパク質 ParM、FtsZ、Alfa、MreB のプロトフィラメント及び繊維束に関して安定性を研究した。その結果、MreB、Alfa、ParM に関しては共著で原著論文3報報告し、さらに、その応用発展としてリゾチウムアミロイドの研究も行った。

研究成果の概要（英文）：

We improved our own designed synchrotron high-pressure jump small-angle scattering system, by which stabilities on various cytoskeletal fibrous proteins were explored. Actin homologue proteins, ParM, FtsZ, Alfa, MreB were studied, and the result were published in three papers. We also applied the high-pressure system to lysozyme amyloid filament.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：フォールディング、小角散乱、高圧、タンパク質、ダイナミクス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞骨格繊維タンパク質フィラメントに対する動的な構造解析法の必要性

真核生物における、アクチン、チューブリン、原核生物における FtsZ、ParM などでは複数のプロトフィラメント高次構造を

形成し、細胞分裂、細胞構造、細胞内輸送の多岐に渡って重要な働きを示す。これらのタンパク質に共通な事は高分解能のX線結晶構造が各単量体、マイクロチューブルでは高分解能モデルがすでに分かっているにも関わらず、複数のプロトフィラメント構造体の

ダイナミクスを調整する力、相互作用がよく分かっていない事にある。従来の研究は光学顕微鏡かあるいは構造情報が得られない蛍光強度変化を用いてこれらのフィラメント構造体を研究してきたが、より詳しい構造情報が必要とされていた。

(2) 高静水圧力 X 線小角散乱法の高度化

高静水圧力と X 線小角散乱を用いて蛋白質おれたたみの研究が進んでいる。申請者は最も早くこの重要性に気づき高圧小角散乱システムの開発を行ってきたが、圧力擾動の再現性が悪かったので改善する必要があった。

2. 研究の目的

(1) 高圧ジャンプ装置に遊び体積の小さい圧力計を導入し高度化を行う。それにより、従来は再現性を出すのが困難であった高圧ジャンプ測定を定常的に行う。

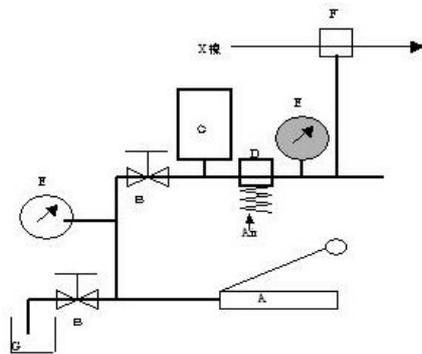
(2) アクチン類似タンパク質の安定性、物性研究を行う。具体的には非常に安定なフィラメントアクチン、中間的性質を示す FtsZ、不安定なフィラメント ParM のヌクレオチドの違いによる安定性の評価を行う。

(3) 高圧ジャンプ法による緩和過程を X 線小角散乱法で測定し、そのデータを解析することにより、活性化体積及び中間体の同定と構造解析を行う。

3. 研究の方法

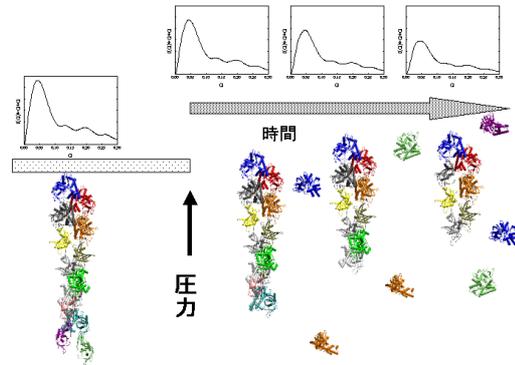
(1) 高圧ジャンプ装置の高度化

下図は、高度化する以前の高圧 X 線ジャンプ装置の圧力回路図である。高圧ジャンプ測定にはポンプ側（透明ゲージ E）とハッチ内観測セル近傍（灰色ゲージ E）の 2 つの圧力ゲージが必要で高圧ジャンプの圧力ジャンプ幅は 2 つのゲージの圧力値によって決まる。灰色圧力ゲージはストレインゲージであるが透明な部分の方は遊び体積の大きいブルドン管ゲージを使用していた。それを、ストレインゲージにする事によりより正確な圧力ジャンプ測定が可能となり実験の再現性が大幅に向上した。



A: 高圧ポンプ B: 二方弁 C: 圧力ため容器 D: 圧空脱膜弁 E: ゲージ F: X線観測セル G: ドレイン

(2) 高圧ジャンプ X 線小角散乱測定による時系列データの解析。

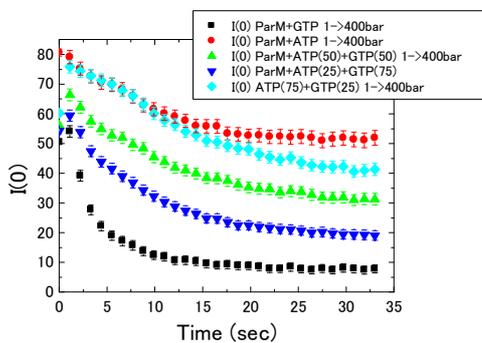
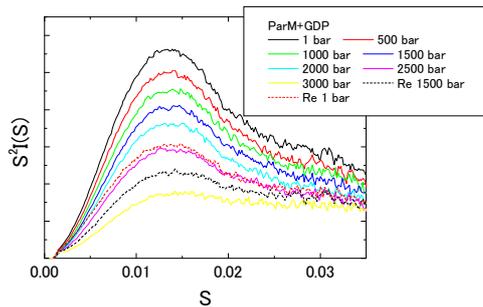
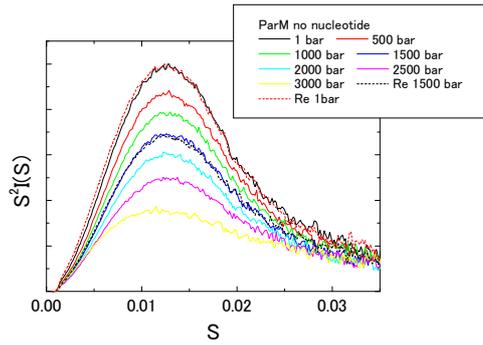


圧力を急激に上げること、一般にかい離した状態の方がモル体積は減少するので繊維はかい離する。それに伴い上図のように散乱曲線が変化するのでそのデータを解析する。

4. 研究成果

(1) 細胞骨格繊維タンパク質 ParM プロトフィラメント安定性に対するヌクレオチドの寄与の解明

ParM は原核生物のアクチン相同タンパク質でプラスミド分離に関わっている。ParM フィラメントは、高圧小角散乱測定の結果からアクチンのように ATP ではなく GTP によって重合、かい離が制御されていることが分かった。



上の図は、ParMのプロトフィラメントに圧力を加え安定性をみたものである。

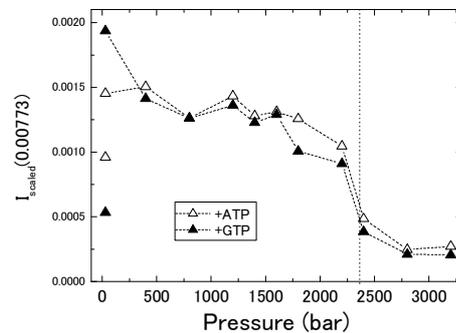
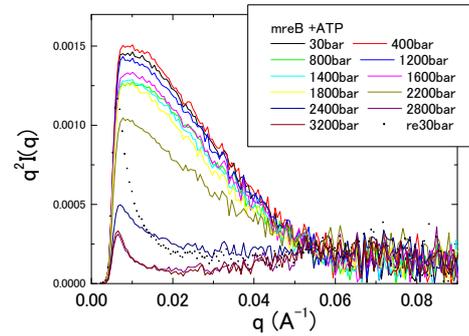
上図は、1bar から 400bar へ圧力をジャンプさせたときのかい離の様子を原点散乱強度変化によってモニターしたものである。GTP 結合により ParM が不安定化されていることがはっきりと分かる。

(2) 細胞骨格アクチン相同繊維タンパク質の繊維束の安定性の系統的解明

① 超高温熱菌 *Thermotoga martima* 由来 MreB

MreB は細胞内周縁にケーブル状の構造体を形成し細胞の形を保持している。試験管内では、ATP、GTP 存在下で広範囲の pH、イオ

ン強度で繊維束（繊維シート）を形成する。次の図は ATP 存在下で形成された繊維束が圧力



によりどのようにかい離していくか小角散乱曲線で見えたものである。

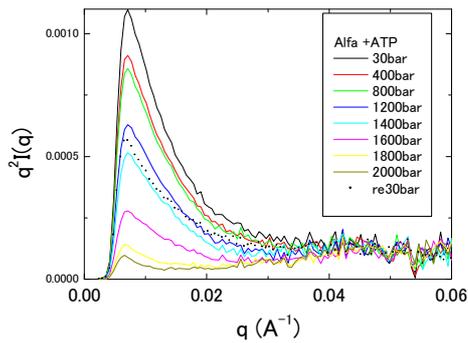
さらに、散乱ピーク強度値を圧力に対してプロットしたものが下図である。

ヌクレオチドの違いにより繊維束の安定性はほとんど変わらないことがこの図より分かる。この耐圧性から MreB 繊維シートは、アクチンのプロトフィラメントの安定性とほとんど差がないことが判明した。

② 枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来 AlfA

AlfA は DNA 分離タンパク質でアクチン、バクテリアアクチン相同タンパク質 ParM 及び MreB と関連している。光散乱測定から ATP 存在下での重合速度がアクチンの 50 倍程度であることが知られている。小角散乱測定からこのタンパク質は ATP 存在下、GTP 存在下いずれにおいても繊維束を形成するが両者の形状の違いはほとんどない。

これらの繊維束の安定性を高圧小角散乱測定を行った結果が以下に続く 2 つの図である。AlfA は圧力が上昇するに伴いかい離が進み、おおよそ 140Ma で繊維束がかい離していくことがわかった。散乱曲線の散乱強度の変化を圧力でプロットすると繊維束の安定性に関してヌクレオチドの種類は関係しないことが分かる。



### (3) 研究成果のまとめと今後の展望

圧力軸を用いた生体分子計測は繊維タンパク質の安定性を評価する際、温度と違い各モノマーへの構造安定性への寄与が小さいので分子間相互作用を調べるには有効な手法である。しかしながら、過去、顕微鏡像で見るか光散乱で間接的に観察することが一般的であった。高圧小角散乱測定はフランスなどを中心として行われているが、主に平衡状態で観測されている。しかし、平衡状態測定のみでは再会合などの副次過程により、細胞骨格繊維タンパク質のダイナミクスを調べるには不十分である。本プロジェクトは、微小体積高圧小角散乱測定により時分割測定ができるようになった点が大きな成果といえる。

ただ、今回取り扱った系の多くがプロトフィラメントではなく繊維束であり、分解能的にはX線散乱より大きな次元の対象物であった。それ故、小角散乱の構造解析手段としての能力を十分発揮できなかった点がある。また、高圧小角散乱装置自体のメンテナンス性が悪く、データ量が十分集められなかったため、今後は装置の改良も継続して行う必要があると考える。

### 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 8 件)

- ①藤澤哲郎、高静水圧下における X 線小角散乱解析、化学と生物、査読無 48、2010、188-194
- ②藤澤哲郎、タンパク質の小角散乱法による低分解能構造解析、生化学、査読無 82、2010、122-126
- ③Popp D, Narita A, Fujisawa T, Maéda Y, Robinson RC. (他 3 名、4 番目)、Filament structure, organization, and dynamics in

MreB sheets., J. Biol. Chem., 査読有、285、2010、15858-15865

- ④Popp D, Narita A, Fujisawa T, Robinson RC. (他 6 名、7 番目)、Polymeric structures and dynamic properties of the bacterial actin Alfa., J. Mol. Biol., 査読有、397、2010、1031-1041
- ⑤Hossain T, Teshiba S, Fujisawa T, Banno Y, Aso Y. (他 4 名、4 番目)、Structural properties of silkworm small heat-shock proteins:sHSP19.9 and sHSP20.8., Biosci.Biotechnol.Biochem. , 査読有、74、2010、1556-1563
- ⑥分子生物学における X 線・中性子小角散乱法のほかの構造解析手法との相補性、日本結晶学会誌、藤澤哲郎、査読無、51、2009、91-93
- ⑦Kono R, Fujisawa T, Akasaka K, Tachibana H, Amyloid fibrillation rate differs greatly among single-disulfide variants of hen lysozyme, J. Biol. Macromol. 査読有、9、2009、23-30
- ⑧Popp, D., Narita, A., Fujisawa, T., Onishi, H., Maeda, Y., (他 4 名、4 番目)、Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability, EMBO J., 査読有、27、2008、570-579

[学会発表] (計 4 件)

- ①藤澤哲郎、石黒亮、松尾博史、David Popp、アクチン相同骨格タンパク質フィラメント MreB、Alfa の高圧 X 線小角散乱による研究、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日、東北大学
- ②石黒亮、松尾博史、橘秀樹、藤澤哲郎、高静水圧電気泳動法によるリゾチーム変異体アミロイド原線維のかい離平衡の研究、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日、東北大学
- ③小野内優理、藤澤哲郎、石黒亮、亀山啓一、中性子小角散乱法による大腸菌外膜蛋白質 OmpA 界面活性剤複合体の構造解析、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日、東北大学
- ④Fujisawa, T., Matsuo, H., Iwasa, M., Erickson, H. P., Kamimura, S., Maeda, Y., Popp, D., 高圧ジャンプ X 線小角散乱法を用いた細胞骨格フィラメントの安定性とヌクレオチドキャップの研究、2008 年 12 月 4 日

[図書] (計 1 件)

- ①藤澤哲郎、日本分光学会編 講談社、生体系、ソフトマターの分光 査読無、「X線・放射光の分光」2009、pp. 85-107

[その他]

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~fujilab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤澤 哲郎 (FUJISAWA TETSURO)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：10231565

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：