

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23740323

 研究課題名（和文） 中性子散乱法を基軸とした水溶液中タンパク質の  
メゾスコピックダイナミクス研究

 研究課題名（英文） Study on Mesoscopic Dynamics of Proteins in Aqueous Solution  
by Means of Neutron Scattering

研究代表者

遠藤 仁 (ENDO HITOSHI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号：40447313

研究成果の概要（和文）：本研究では、中性子小角散乱及び中性子スピンエコー法を基軸とし、溶液中のタンパク質一分子の構造とダイナミクスの統計情報を定量的に評価した。モデルとして水溶性で残基数 149 の小球状タンパク質である黄色ブドウ球菌由来の核酸分解酵素 Staphylococcal nuclease (SNase) を生合成で大量に生成し、中性子小角散乱測定を大強度陽子加速器施設 J-PARC の BL15「大観」で、中性子スピンエコー測定をフランスのラウエ・ランジュバン研究所(ILL)の IN15 分光器を用いてそれぞれ行った。得られた散乱データを詳細に解析することで、SNase の溶液中の構造とダイナミクスを評価した。

研究成果の概要（英文）：Structure and dynamics of a protein in aqueous solution were investigated by small-angle neutron scattering (SANS) and neutron spin echo (NSE) technique. Staphylococcal nuclease (SNase) was used as a model protein, and the SANS experiments were performed with BL15 “Taikan” diffractometer at MLF, J-PARC; and the NSE measurements were done by using IN15 spectrometer at ILL in France. The obtained scattering data were quantitatively analyzed, which led to the evaluation of the structure and dynamics of SNase in aqua.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・ソフトマターの物理

キーワード：タンパク質構造・タンパク質ダイナミクス・Staphylococcal Nuclease・中性子散乱・中性子スピンエコー・中性子小角散乱

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生命体における主要構成要素であり、かつその生命活動の大部分を担っている。タンパク質の一次構造は二十種類の L- $\alpha$ -アミノ酸の鎖状の連なりであり、その高次構造は多種多様となり、その発現機能も様々である。タンパク質の機能はその立体構造が重要であり、例えばタンパク質の X 線結晶構造解析法による 3 次元構造の同定はタンパク質研究の主要な位置を占めている。しかし

近年の研究では、タンパク質は熱揺動により大きく揺らいでおり、タンパク質の機能発現にはその構造的な柔らかさが重要な役割を果たしているということが分かって来た。タンパク質の構造とダイナミクスは、メゾスコピックな時空間スケール（※空間において 1～100 ナノメートル程度、時間において 1～100 ナノ秒程度のスケールと定義する）においては  $\alpha$ ヘリックス・ $\beta$ シート・ループ領域に代表されるドメインの 3 次元配置とその

揺らぎに還元され、このスケールの動的性質が機能発現と密接に関連すると思われているが、実験的な検証が殆どなされていなかった。

## 2. 研究の目的

中性子は質量を持つため、同じ波長の X 線と比較するとエネルギーは  $10^{-6}$  程度と非常に小さい。従って中性子非弾性散乱法のエネルギー分解能は X 線を用いた場合と比べて格段に優れている。更に、中性子はスピン量子  $1/2$  のフェルミオンであり、磁場と相互作用することでスピン歳差運動を行う。この磁場中での中性子スピンの歳差運動を利用する事で、物質による散乱前後の中性子の微小な速度変化を歳差回転角の差、すなわち偏極度の差として評価する方法が中性子スピンエコー法である。新たにスピンという自由度を採用している為、ビーム強度を損なう事無く高エネルギー分解能を達成可能である。実際、この手法を用いる事で非弾性散乱法において現時点で最高のエネルギー分解能を誇る。本研究においては、この中性子スピンエコー (Neutron Spin Echo; NSE) 法に中性子小角散乱 (Small-Angle Neutron Scattering; SANS) 法を組み合わせ、これまで測定が困難であったメゾスコピックな時空間スケールにおけるタンパク質ドメインのダイナミクスを定量的に測定し、タンパク質の機能発現とダイナミクスの相関を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

タンパク質のモデルとして、アミノ酸残基数 149 (16.8kDa) の水溶性小粒状タンパク質である Staphylococcal Nuclease (SNase) を用いた。SNase は、遺伝子組換えを行ったプラスミドを発現ベクターとして大腸菌に導入することで生合成し、大量の精製体 (全部で 1 g 程) を準備した。図 1 に Protein Data Bank から引用した X 線結晶構造解析による SNase の構造を示す。

SANS 測定は、大強度陽子加速器施設 J-PARC の物質・生命科学研究所の Beam-Line 15 に設置されている小角散乱回折装置「大観」を用いて行った。試料として、SNase 重水溶液を用いた。

NSE 測定は、フランスの Laue-Langevin 研究所に設置されている IN15 分光器を用いて

行った。試料は、SANS 測定と同様、SNase 重水溶液を用いた。

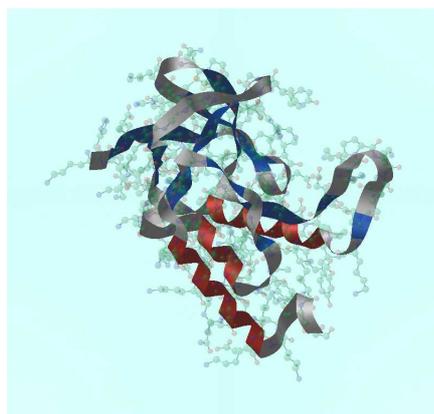


図 1 Protein Data Bank から引用した SNase の結晶構造 (ID: 1STN).

## 4. 研究成果

図 2 に SANS 測定によって得られた SNase 重水溶液 (濃度 5wt%・NaCl 濃度 0.1N) の散乱プロファイルを示す。溶媒からの散乱は除去した。散乱強度は、標準試料を用いる事で絶対強度に換算した。横軸は散乱ベクトルの大きさ  $Q$  で、 $0.02 < Q[\text{\AA}^{-1}] < 2$  の領域で明瞭なシグナルが得られた。

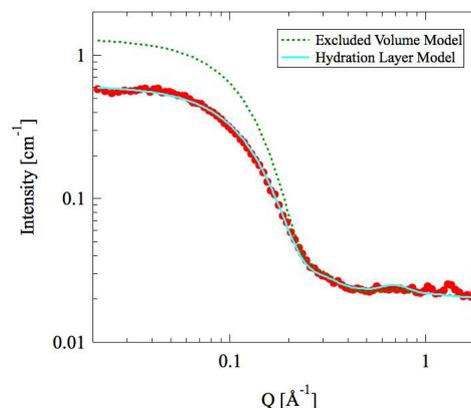


図 2 SNase 重水溶液 (濃度 5wt%・NaCl 濃度 0.1N) からの散乱プロファイル。

図 2 における破線は、結晶構造解析によって得られた SNase 一分子の立体構造 (3 次構造) に基づいて計算したプロファイルである。 $Q$  の小さい領域で実験値と一致しない事が判明した。次に、タンパク質各原子の周りに水和層を考慮して散乱プロファイルを計算した場合、図中の実線に示す通り、実測値と良好に一致させる事が出来た。以上の結果から、絶対強度を評価する事で、タンパク質周囲の

水和層の存在が明らかとなった。

次に、図3にNSE測定によって得られたSNaseの中間相関関数(片対数表示)を示す。試料は5wt%重水溶液を用いた。測定した空間領域は $0.03 < Q[\text{\AA}^{-1}] < 0.24$ であり、最大フーリエ時間は260ナノ秒であった。

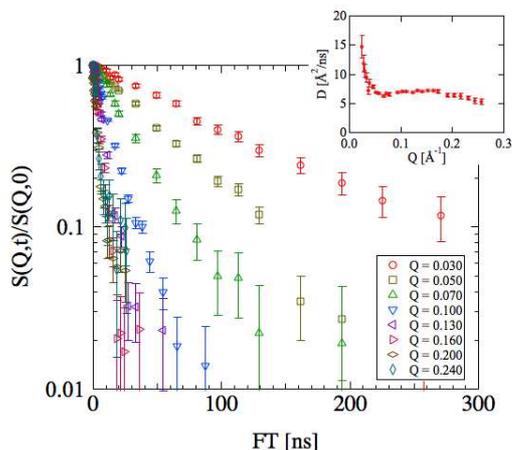


図3 NSEによって測定したSNaseの中間相関関数. 右上図: キュムラント解析によって評価した拡散係数の $Q$ 依存性.

観測した中間相関関数の片対数表示は、良好な直線性を示すことから、キュムラント解析によって、拡散係数を高精度で決定可能である。図3中右上に、評価した拡散係数 $D$ の $Q$ 依存性を示す。並進拡散のみの場合、 $D$ は $Q$ に依らず一定となるが、明らかにそうはならず、回転拡散および内部振動の影響が大きい事が判明した。

図4に拡散係数の $Q$ 依存及び構造因子で補正を加えた結果、並びに計算機シミュレーションで評価した並進拡散と回転拡散の値を示す。 $Q$ が小さい領域では、粒子間反発により並進拡散が影響を受けるが、構造因子 $S(Q)$ で割る事である程度の補正が可能である。実際、補正した値と計算機シミュレーションの値は、 $Q$ が小さい範囲では良好に一致する。しかしながら、 $0.05 < Q[\text{\AA}^{-1}] < 0.2$ の領域において、NSEによって得られた拡散係数は、計算機シミュレーションの結果と比較して過剰な値を示す。この効果は内部振動に由来する事が予想され、現在、基準振動解析等の手法を用いて定量的な解析を進めている。

以上の結果から、中性子小角散乱及び中性子スピンエコー法を用いて、タンパク質一分子の水溶液中における動態の統計平均を定

量的に評価することが出来た。本研究により、タンパク質の水和構造及びダイナミクスに関して、本手法を用いる事で詳細な知見が得られる事が確認できた。

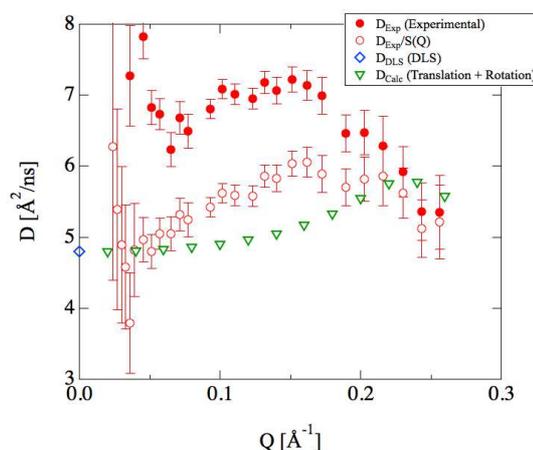


図4 キュムラント解析によって評価した拡散係数の $Q$ 依存性(●). 構造因子で補正した値(○). 結晶構造から評価した回転拡散と並進拡散(▽). 動的な散乱によって評価した拡散係数(◇).

現在のタンパク質研究はX線による結晶構造解析が主流であり、本研究の様なタンパク質の溶液中での分子論的動態研究は未だ研究例も少ないが、今後は溶液中や生体内に近い環境でのタンパク質動態解析が重要になると予想される。本研究で開発した手法を今後発展させる事で、ポスト・タンパク質構造解析研究を先導することが期待できる。

## 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4件)

(1) Hitoshi Endo, Dynamics of Polystyrene in a Theta Solvent Investigated by Neutron Spin Echo, Journal of the Physical Society of Japan Supplement, 査読有, accepted.

(2) Tsuyoshi Yamaguchi, Ken-ichi Mikawa, Shinobu Kodai, Kenta Fujii, Hitoshi Endo, Mitsuhiro Shibayama, Hiroshi Hamano, and Yasuhiro Umebayashi, Relationship between mesoscale dynamics and shear relaxation of ionic liquids with long alkyl chain, Journal of Chemical Physics, 査読有, Vol. 137, 2012, pp. 10451 (7 pages).

(3) 遠藤 仁、杉山 正明、井上 倫太郎、中  
中性子生物(3)中性子小角散乱：応用編、日本  
中性子科学会誌「波紋」、査読有、Vol. 22、  
**2012、pp. 258-267.**

(4) 遠藤 仁、中性子スピネコー法を用い  
たソフトマターのダイナミクス研究、高分子、  
査読無、Vol. 60、**2011、pp. 193-194.**

〔学会発表〕(計 4 件)

① 遠藤 仁、富永 大輝、高田 慎一、松本 淳、  
岩瀬 裕希、上久保 裕生、片岡 幹雄；中性  
子小角中角散乱で観測した水溶液中の  
Staphylococcal Nuclease の構造、日本物理  
学会第 68 回年次大会、2103 年 3 月 26 日-29  
日、広島県東広島市。

② 遠藤 仁、富永 大輝、高田 慎一、松本 淳、  
岩瀬 裕希、上久保 裕生、片岡 幹雄；中性  
子散乱で観測した Staphylococcal Nuclease  
の動的静的構造因子、日本中性子科学会第 12  
回年会、2012 年 12 月 10 日-11 日、京都府京  
都市。

③ Hitoshi Endo and Atsushi Takano;  
Dynamic Structure Factor for Random Block  
Copolymer Investigated by Neutron Spin  
Echo Technique, 10th International  
Conference on Quasielastic Neutron  
Scattering, 2012 年 09 月 30 日-10 月 04 日,  
Nikko, Japan.

④ 遠藤 仁、松本 淳、上久保 裕生、片岡 幹  
雄；水溶液中の Staphylococcal Nuclease の  
構造とダイナミクス、日本物理学会第 68 回  
年次大会、2012 年 3 月 27 日、兵庫県西宮市。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 仁 (ENDO HITOSHI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・

量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号：4 0 4 4 7 3 1 3