

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310068

研究課題名(和文)中性子散乱を用いたタンパク質の高次構造における動態解析法の開発

研究課題名(英文)Development of analysis method for dynamic state in high order structure of protein utilizing neutron scattering

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：溶媒コントラスト法及び重水素化ラベリング法に対応したSANSの測定・解析法を開発しタンパク質の動態構造解析を行った。まず、PDBデータから散乱関数のSimulation及びモンテカルロ法を用いた動態解析コードの開発を行った。更に開発コードを用いて B2-クリスタリン・Proteasomeの制御因子であるPA28の水溶液中での動態解析が可能であることを確認した。また、低バックグラウンドの重水中でのマッチングアウトが可能な75%重水素化タンパク質の開発も行った。

研究成果の概要(英文)：New methodology for small-angle neutron scattering corresponding to solvent contrast variation and deuteration labeling techniques has been developed and then structural investigation of protein state in an aqueous solution was performed. At first, the simulation codes were made to calculate a scattering function from PDB data considering about two techniques and a code was also made to analyze dynamical state of protein with domains with Monte Carlo algorithm. It was confirmed to be available to analyze the static and dynamical states by using them. with real protein systems: B2-Crystallin and proteasome activator 28. In addition, it was succeeded to prepare for 75% deuteration protein which can be matched out in 100% D2O solution.

研究分野：ナノ構造物理学

キーワード：中性子小角散乱 コントラスト変調 重水素化

1. 研究開始当初の背景

タンパク質はアミノ酸配列(1次構造)に応じて特異的な3次元立体構造をとるが、機能発現においてはその3次元構造が変位することが重要であると考えられるようになって来た。加えて、真核生物では「天然変性タンパク質」と呼ばれる固定化された3次元構造を持たないタンパク質に注目が集まっている。

これらのタンパク質の機能発現時における構造変位は水溶液中で起こるために結晶構造に加え、水溶液中での構造を観測する手法が重要となっていた。そのため、水溶液中での構造解析が可能な小角散乱法が注目を集めていた。

小角散乱法でのプローブは主としてX線と中性子である。X線を用いた小角散乱法(SAXS)では、線源が高輝度である事を利用して、少量の試料かつ短時間で「タンパク質の外形」を測定することができる。一方、中性子を用いた小角散乱(SANS)における最大の特徴は、同位体効果であり、特に軽水素と重水素間での散乱能の違いは顕著である(軽水素の散乱能は負であるに対して重水素のそれは正)。そこで、異なる散乱能をもつ領域から構成される生体物質(例えば、核酸とタンパク質の複合体)を試料とする場合を考えてみる。この時、溶媒(=水)の軽水・重水比率を変化させるとその散乱能を変化させることができ、溶質中の部分構造を解析する事が可能となる(「溶媒コントラスト変調法」)また、注目するタンパク質の領域を重水素化することで人為的に散乱能の違いを与えれば(「重水素化ラベリング法」)、上記手法と合わせてその部分構造が解析できる事が可能であり、精力的に測定・解析開発された。

しかしながら、手法が開発された1980年代ではデータの解析の結果得られる構造情報は慣性半径などであり、また、重水素化手法も重水素化などを精密に制御できなかった。そのため、溶液中での揺らぎ構造や解離会合様態などの解析という点からは不満足であった。そこで、より詳細な構造変位(タンパク質中の特定ドメインの配置)やその動的揺らぎの解明を可能にする測定・解析手法の開発が待たれていた。更にSANSはマシンタイムの不足(=分光器数が少ない)や重水素化試料調製法の未整備もあり、これまで生物構造解析には余り積極的には用いられて来なかった。しかし、(本研究申請時点では)国内ではJRR-3に加えJ-PARCが立ち上がり、マシンタイムの問題は解消に向かっていると考えられる状況にあった(実際は、JRR-3は大震災の影響により本稿執筆時点(2015年6月)は稼働していない)。そこで、マシンタイムの問題が解決に向かう中、新たな視点や手法を取り入れた測定(含む試料調製法)・解析法が開発が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究は、SAXSにおけるデータ解析技術

やNMRでの重水化技術の進歩を踏まえて、

- A. 計算機によるモデリングを生かした解析手法
- B. 中性子による同位体識別、特に生物において重要な水素の精密な重水素置換によるラベリング法

の開発を行う。その上で、現在の技術を生かしたこれらの新規中性子小角散乱法を進展させ、「中性子生物学」に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

実際の生物試料を用いて3つの開発・実証研究を進めた。

- I. タンパク質の溶液中での様態解析のためのSimulationコードを開発し、実際の系に適用する。
- II. 重水素化ラベリング法をタンパク質の動態解析に適用する
- III. 精密重水化法を用いた新たな測定法を開発する。

まずIについて報告する。これまで慣性半径によるGuinier解析を超える解析を行う場合、アミノ酸をボールとみなしてPDBに記載されている位置情報より散乱関数を求め、測定結果と比較して構造解析を行ってきた。この場合、タンパク質周りの結合水の影響を評価する事が困難であるため、空間を適切なサイズのメッシュに分解し、各メッシュに存在する原子に応じて散乱能を与えて散乱関数を計算するコードを開発した。そして、このコードを「任意のドメイン」の「任意の重水素化度」における「任意の重水比率の溶媒」でのSANSプロファイルを求められるように発展させた。更に、動的な揺らぎが存在する場合、SANSプロファイルはそのトラジェクトリの平均になるので個々の配置の頻度分布を求めるコードをモンテカルロアルゴリズムにより開発した。

IIは、例としてProteasomeの制御因子であるPA28を試料として結晶構造解析では観測できないループ領域の配置をIで開発したコードを用いて解析を行い、ループ領域の溶液中での様態を明らかにすることを行った。

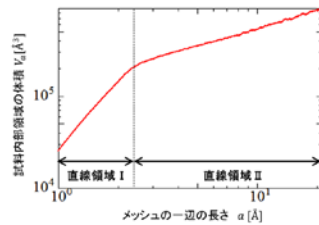
IIIでは、非干渉性散乱が少ない低バックグラウンド下で散乱的にラベリング領域を消去する(マッチアウト)手法の開発を行った。具体的にはタンパク質の重水素化率制御する手法を確立し、重水素化度を100%でなく75%に抑えたタンパク質を調製した。この重水素化度のタンパク質は重水溶液中でマッチアウトすることができる。この技術の確立と検証を行った。

4. 研究成果

Iについて述べる。空間分割法(メッシュ法)による散乱関数の計算における問題点は分割サイズの設定である。サイズを小さくし

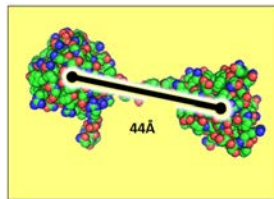
すぎるとタンパク質内部に原子が存在しないメッシュが発生してしまい、これらはアルゴリズム上溶媒が存在するとして計算してしまうので正確な散乱関数を求める事が出来ない。一方、必要以上にメッシュサイズを大きくとってしまうと、タンパク質が(表面からはみ出して)実際に占有している空間より大きな空間を占有している事となり、やはり正確に散乱関数を正確に計算できない。

メッシュのサイズ a を変えながら、計算上のタンパク質の体積を求めてみると、右図に示すように、3 乗に



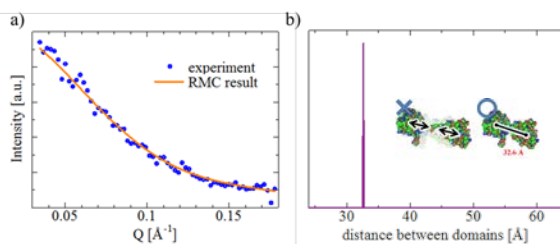
比例する領域と 2 乗に比例する領域のクロスオーバー点があるタンパク質でもほぼ同じメッシュサイズで現れる。この値を用いて計算した体積は別に与えられている体積と一致する。種々のタンパク質において上記のクロスオーバー点を比較検討した結果、PDB データに水素原子の位置情報が含まれているときの、適切なメッシュの一辺の長さを 2.7Å と決定した。

次に水晶体内タンパク質 βB_2 -クリスタリンを用いて水溶液中での動態解析を行った。このタンパク質は 2

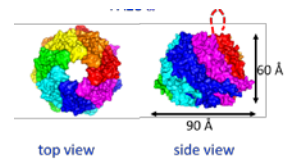


つのドメインからなり、上図に示すように結晶中ではドメイン間距離は 44Å である。しかしながら水溶液中では 2 つのドメイン間をつなぐ領域は不定であり、この距離は揺らいでいることが予測される。したがって、SANS 測定では異なるドメイン間の距離を持つ配置の平均構造が観測されていると考えた。この場合、測定される散乱曲線は各々の距離に応じた構造からの散乱関数の加重平均であるので、MC 法を用いて距離分布を求めるアルゴリズムの開発を行った。

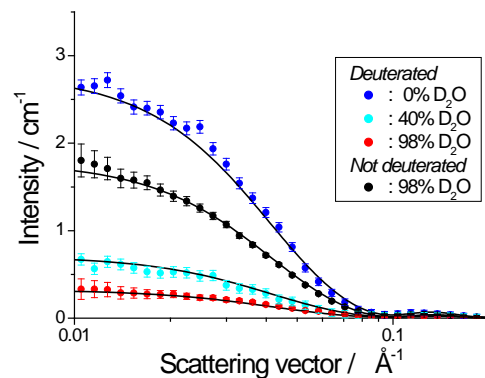
このコードを用いて行った βB_2 -クリスタリンの溶液中構造の結果を下図に示す。(a) の ● が測定データで実線が解析結果得られた散乱曲線であり、(b) がドメイン間の距離分布の解析結果である。 βB_2 -クリスタリンは予想に反してドメイン間距離が 32.6Å で固定されていることが判明した。この距離はちょうど 2 つのドメインが接触する距離であった。(学会発表 : 1, 2)



II について報告する。Proteasome の制御因子である PA28 は右図に示すように α 及び β の 2

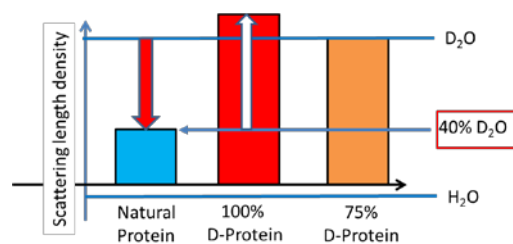


種類のサブユニットが 7 つ会合したヘテロオリゴマーである。(図は結晶化に成功した α サブユニットのみからなるホモオリゴマーを参照として用いている) また、 α サブユニットには Proteasome へのタンパク質の取入れを制御していると考えられるループ領域(図中の点線)が存在すると考えられているが、その容態は不明である。研究では、 α サブユニットのみを重水素化した試料を調製し、0% 重水 (=100% 軽水)、40% 重水、90% 重水溶媒中で、この部分重水素化 PA28 を測定し、I で開発したコードを用いて解析を行った。その結果、「PA28 中の α/β サブユニットの比率は 3 : 4」「PA28 の 30% は dimer を形成している」「ループ領域はバルブのように PA28 上部の開口部を塞ぐ形で存在している」とすると、全ての測定散乱曲線を矛盾なく説明できる事が判明した(下図参照 : が測定データで実線が解析結果得られた散乱曲線)(発表論文 3, 4)

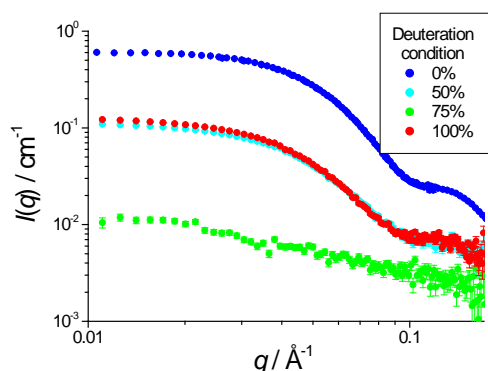


III について報告する。これまでの SANS による重水素化ラベリング法では軽水素化 + 重水素化サブユニットからなるヘテロオリゴマーを 40% 重水溶媒中で測定する。この場合、軽水素化サブユニットは 40% 重水溶媒と散乱長密度が一致するので散乱的に消去され、重水素化サブユニットのみを観測することができる。しかしながら、溶媒には 60% の軽水が含まれるため、その非干渉散乱は高いバックグラウンドの原因となり、詳細な構造解析の妨げとなる。この問題を解決する手法として、75% 重水素化タンパク質を用いた逆転コントラストマッチング法を考案した。

下図に示すように重水素化度を 75% に制御



したタンパク質の散乱長密度は 199%重水と一致する。したがって、このタンパク質(またはサブユニット)と軽水素化タンパク質(またはサブユニット)で複合体を形成させ、非干渉性散乱が極めて小さい 100%重水中で SANS 測定を行えば、75%重水素化領域を散乱的に消去し、軽水素化領域のみを測定することが可能である。この場合の問題点は、このように重水素化度を制御したタンパク質を調製する手法が隔離していない事である。そこで、本研究では 75%重水素化タンパク質の調製と重水中での散乱の消去の確認を行った。



上図が 0%, 50%, 75%, 100%重水素化を目指して調製したタンパク質の散乱曲線である。これから分かるように 75%重水素化を目指したタンパク質の散乱は他に比べて著しく弱く、ほぼ散乱が消去されたことが分かる。したがって、タンパク質の重水素化度を制御することに成功したと言える。(発表論文 3, 7)

本研究では、開発した手法を上記の測定以外にも適用して種々の成果を得ていることも付記する。(発表論文 1, 2, 5, 6, 6. 9. 10)

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 10 件)

1. M. Sugiyama, H. Yagi, T. Yamaguchi, K. Kumoi, M. Hirai, Y. Oba, N. Sato, L. Porcar, A. Martel, and K. Kato, "Conformational characterization of a protein complex involving intrinsically disordered protein by small-angle neutron scattering using the inverse contrast matching method: a case study of interaction between α -synuclein and PbaB tetramer as a model chaperone", *Journal of Applied Crystallography*, **47**, (2014) 430-435. doi:10.1107/S1600576713033475 (査読有)
2. M. Sugiyama, Y. Arimura, K. Shirayama, R. Fujita, Y. Oba, N. Sato, R. Inoue, T. Oda, M. Sato, R. K. Heenan; H. Kurumizaka, "Distinct features of the histone core structure in nucleosomes containing the histone H2A.B variant", *Biophysical Journal*, **106**, (2014) 2206-2213. doi:10.1016/j.bpj.2014.04.007 (査読有)
3. N. Rahman, N. Sato, M. Sugiyama, Y. Hidaka, H. Okabe, and K. Hara, "Selective Hg(II) adsorption from aqueous solutions of Hg(II) and Pb(II) by hydrolyzed acrylamide-grafted PET films", *Journal of Environmental Science and Health Part A*, **49** (2014) 798-806. doi:10.1080/10934529.2014.882209 (査読有)
4. N. Rahman, N. Sato, M. Sugiyama, Y. Hidaka, H. Okabe, and K. Hara, "The effect of hot DMSO treatment on the γ -ray-induced grafting of acrylamide onto PET films", *Polymer Journal*, **46** (2014) 412-421. doi:10.1038/pj.2014.12 (査読有)
5. M. Sugiyama, H. Sahashi, E. Kurimoto, S. Takata, H. Yagi, K. Kanai, E. Sakata, Y. Minami, K. Tanaka, and K. Kato, "Spatial arrangement and functional role of α -subunits of proteasome activator PA28 in hetero-oligomer", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **432**, (2013) 141-145, doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.071 (査読有)
6. M. Hirai, R. Kimura, K. Takeuchi, M. Sugiyama, K. Kasahara, N. Ohta, B. Farago, A. Stadler, and G. Zaccai, "Change of dynamics of raft-model membrane induced by amyloid- β protein binding", *The European Physical Journal E*, **36**, (2013) 74. doi:10.1140/epje/i2013-13074-3 (査読有)
7. Y. Arimura, H. Kimura, T. Oda, K. Sato, A. Osakabe, H. Tachiwana, Y. Sato, Y. Kinugasa, T. Ikura, M. Sugiyama, M. Sato, and H. Kurumizaka, "Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin", *Scientific Reports*, **3**, (2013) 3510. doi:10.1038/srep03510 (査読有)
8. N. Sato, M. Ueda, T. Matsuyama, and M. Sugiyama, "Radiation Synthesis of Binary Hydrogels with Thermoresponsive Pores", *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, **37** (2012)

- 127-130. doi: 10.14723/tmrsj.37.127 (査読有)
9. N. Fujii, N. Fujii, and M. Sugiyama, "Abnormal protein aggregation due to the presence of D-aspartyl residues in cataractous lenses", *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 37, (2012) 131-134. doi: 10.14723/tmrsj.37.131 (査読有)
 10. 遠藤仁, 杉山正明, 井上倫太郎. 「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」, 2012年, 第22巻, 第3号, 258-267. <http://ci.nii.ac.jp/naid/4001941340> (査読有)

[学会発表] (計9件)

1. 杉山正明, “中性子小角散乱の基礎と応用”, 日本化学会第95回春季年会(招待講演), 2015/3/29, 船橋市(日本大学理工学部船橋キャンパス)
2. 杉山正明, “中性子の中性子による中性子のための生物溶液散乱”, 第6回MLFシンポジウム(招待講演), 2015/3/18, 筑波市(つくば国際会議場)
3. 杉山正明, “コントラスト変調及び重水素化で見るタンパク質の溶液中での静的・動的構造”, 第37回溶液化学シンポジウム(招待講演), 2014/11/13, 佐賀市佐賀県立男女共同参画センター・佐賀県立生涯学習センター)
4. M. Sugiyama, “SANS investigation on Subunit Exchange in Protein Complexes”, *Neutron in Biology and Biotechnology*, 2014/2/20, Grenoble (仏国).
5. M. Sugiyama, “Kinetics in Protein Complexes Revealed by Deuteration-Assisted Small-Angle Neutron Scattering”, *International Conference on Neutron Scattering 2013*, 2013/7/10, Edinburgh (英国).
6. M. Sugiyama, “Small-angle neutron scattering for investigation of subunit kinetics of protein complex in solution”, *International Symposium on Diffraction Structural Biology 2013*(招待講演), 2013/5/29, Nagoya (名古屋市中小企業振興会館).
7. M. Sugiyama, “SANS investigation of protein structure in solution”, 台日中性子・X線散乱研究会(招待講演), 2013/2/26, Ibaraki (KEK 東海キャンパス).
8. M. Sugiyama, “Application of small-angle NEUTRON scattering to structural study of protein complex - perspective on combination of deuteration and contrast variation method -”, 第2回国際シンポジウム「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」(招待講演), 2013/1/24, Yokohama (理化学研究所 横浜研究所交流棟ホール).

9. Y. Ueki, M. Sugiyama, “Structural Investigation of b-Crystallin in an Aqueous Solution by Small Angle Neutron Scattering Simulation”, 15th International Small Angle Scattering Conference, 2012/11/20, Sydney (オーストラリア).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

加藤 晃一 (KATO KOICHI)
名古屋市立大学・薬学研究科・教授
研究者番号: 20211849

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

井上 倫太郎 (INOUE RINTARO)
京都大学・原子炉実験所・准教授
研究者番号: 80563840

佐藤 信浩 (SATO NOBUHIRO)
京都大学・原子炉実験所・助教
研究者番号: 10303918

大場 洋次郎 (OBA YOJIRO)
京都大学・原子炉実験所・助教
研究者番号: 60566793

(3) 連携研究者

鈴木 淳市 (SUZUKI JUN-ICHI)
一般財団法人総合科学研究機構・東海事業センター・研究員
研究者番号: 40354899