



展 TENBO 望

理工学部会 企画 *

中性子小角散乱による溶液中のタンパク質の構造解析



杉山 正明

Sugiyama Masaaki

(京都大学原子炉実験所)

1 はじめに

タンパク質をはじめとする生体分子は生命活動を維持するためのナノマシンでもあるが、このマシンの動作機構を理解するためには構造解析が重要である。そのため単結晶 X 線回折法による生体分子の構造解析が 1990 年代以降急速に発展し、その成果はタンパク質データベース (Protein Data Bank) に集積されている¹⁾。

このような状況の中、結晶ではない“溶液中”での構造も知りたいという要求も高まってきた。これは、溶液中での解離会合によって機能を発現するタンパク質や元々定型形状を持たず会合の際に相手によって構造を変化させるタンパク質 (天然変性タンパク質)²⁾ など“溶液中での動態”が機能との関連において重要な事例が多く見つかってきていることに起因している。

溶液中での構造解析手法としては核磁気共鳴 (NMR) が知られているが、解析可能な分子量の上限は 20~30 kDa とされており、それ以上の分子量のタンパク質会合体には現時点では困

難である。一方、結晶構造解析法と同じく量子ビームを用いた散乱法である“小角散乱法”は、試料に結晶を必要とせず、溶液中での粒子構造を (無制限ではないが) 分子量の上限を持たずに解析可能な手法として注目を浴びている。

2 小角散乱法とは

小角散乱法は図 1 に示すように数 Å の波長を持つ平行度の高い量子ビームを試料に入射し、文字どおり“小角”領域 (おおよそ 5 度以下) の散乱波の強度を精度良く測る手法である。小角散乱のプローブとしては主として、X 線と中性子が挙げられる。X 線小角散乱 (Small-Angle

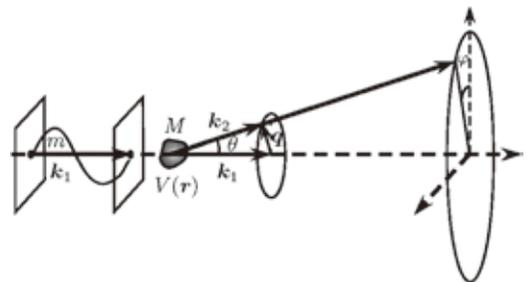


図 1 小角散乱の模式図

* 中性子応用専門委員会

X-ray Scattering：以降 SAXS) では放射光を光源とすることで非常に強度の高いビームを得ることができ、少量・短時間で測定が可能である。また、近年の実験室設置型の X 線源の高輝度化や光学機器・検出器技術の進歩により、実験室設置型の SAXS 分光器でも精度の高いタンパク質溶液散乱が可能になってきている。一方、中性子をプローブとした小角散乱 (Small-Angle Neutron Scattering：以降 SANS) では光源に原子炉又は加速器を必要とし、線源強度も X 線と比較して弱い。そのため、分光器数が少ない上に大量の試料を必要とするためタンパク質溶液散乱の主流は SAXS 法にあると言っても過言ではない。

このような状況下で「なぜ生体物質の溶液散乱として SANS を行うのか？」という質問が浮かんでくるのは当然である。筆者にとっての答えは“SANS 法では中性子散乱における (水素の) 同位体効果を利用することで他では得られない構造情報が得られるため”である。よく知られているように中性子散乱では軽水素と重水素間において非常に大きな同位体効果がある。そこで筆者は、“水素における同位体効果”と更に“溶液散乱の性質”を組み合わせることで、SAXS 法では得ることのできない構造情報の取得を SANS 法では目指している。

3 コントラストとラベリング

粒子濃度が十分希薄であり粒子間干渉が無視できる場合、溶液散乱における散乱強度 $I(q)$ は以下の式で与えられる。

$$I(q) = \left[\int_V (\rho_p(\mathbf{r}) - \rho_s) \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) dV \right]^2 \quad (1)$$

$\rho_p(\mathbf{r})$, ρ_s は溶質粒子、溶媒の散乱長密度であり、 $q=4\pi\sin(\theta)$ (θ : 散乱角) である。ここで、注目すべきは溶液散乱では散乱強度が $\rho_p(\mathbf{r})$ でなく、 $(\rho_p(\mathbf{r}) - \rho_s)$ のフーリエ変換の 2 乗で与えられることである。 $(\rho_p(\mathbf{r}) - \rho_s)$ は“散乱コントラスト”又は単に“コントラ

スト”と呼ばれ、このコントラストを水素の同位体効果を利用して変調させ、必要な構造情報を取り出すのが SANS 法の神髄である。

コントラストを変調させる手法は主として 2 つ存在する。第一の手法は軽水と重水の混合溶媒を用いて、式(1)における ρ_s を制御する手法である (溶媒コントラスト変調法)。軽水素の散乱長は -3.739 fm であるに対して重水素の散乱長は $+6.671 \text{ fm}$ である。したがって、分子の単位体積当たりの散乱長 (散乱長密度) は、軽水では $-0.0056 \text{ fm}/\text{\AA}^3$ であるに対して、重水では $+0.636 \text{ fm}/\text{\AA}^3$ となり、この範囲で両者の混合により溶媒の散乱長密度を制御することが可能である。

コントラスト変調法は散乱長密度の異なる 2 つ以上の分子から成る生体複合分子の構造解析に有効である。例えば DNA とタンパク質の複合体であるヌクレオソームは、タンパク質のコアの周りを DNA が巻き付いている構造をしている。図 2 に示すように DNA とヒストンの散乱長密度はそれぞれ $0.361 \text{ fm}/\text{\AA}^3$, $0.201 \text{ fm}/\text{\AA}^3$ である。したがって、40% 重水 (と 60% 軽水の混合) 溶媒中では、ヒストンと溶媒のコントラストが一致し (コントラスト = 0: マッチング)、ヒストンは式(1)より“散乱的に不可視”となり“ヌクレオソーム中の DNA の構造のみを観測することが可能”となる。一方、65% 重水溶媒中では立場が入れ替わりヒストンの構造のみを観測することが可能である^{3,4)}。また、マッチングのみにかかわらず幾つかのコントラストで測定を行い、複合体中の各分子に対応す

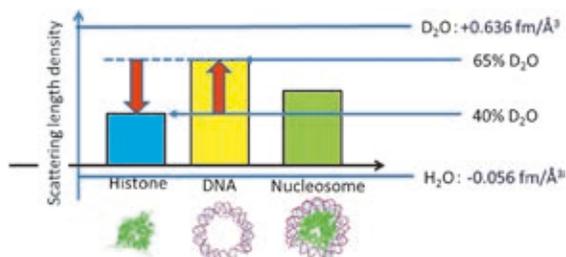


図 2 ヌクレオソームにおける散乱長密度

る部分散乱関数を連立方程式の解法により求める手法もある⁵⁾。これらの具体例については参考文献を参照していただきたい。

同じ散乱長密度の分子で構成されている複合分子（例えばタンパク質複合体）の部分構造を測定したい場合はどうすれば良いだろうか？

その解はコントラストの2項の内の $\rho_p(r)$ を重水素化により変化させることである。図3に示すように重水素化タンパク質の散乱長密度は通常の軽水素化タンパク質の散乱長密度とは大きく異なるので、特定のタンパク質（ドメイン・サブユニット）を重水素化させれば、溶媒コントラスト変調法と同様な手法で部分構造を解析することが可能である。これが第二のコントラスト制御法である重水素化ラベリング法である。

この手法は1980年代にはリボソームのサブユニットの配置決定⁶⁾や最近では解離会合系での構造解析に用いられている⁷⁾。一方、筆者らは重水素化ラベリング法が大きな分子によるタグ付けと比較して系の動的な性質に影響を与えることが少ないことに注目して、タンパク質複合体の動態解析に応用する手法の開発を進めている。

4 重水素化ラベリング法による動態解析⁸⁾

タンパク質分解酵素である20Sプロテアソームは、それぞれヘテロ7量体である α リングと β リングが $\alpha\beta\alpha$ の順に積み上がった中空円筒形状を持つ巨大タンパク質会合体である。この28個ものサブユニットが精緻に組み上げる機構は現在でも精力的に研究されている。筆者らは α リングの構成要素の1つである $\alpha7$ に注目した。 $\alpha7$ は α リングと同様な形状のホモ7量体リングを形成し、更に2つのホモリングが会合した14量体の2重リング（以降 $\alpha7$ リングと呼ぶ）を水溶液中で構築していることが報告されている。興味深い点は、この $\alpha7$ リングはお互いのサブユニットを交換している可能

性が指摘されていることである。しかし、“ホモオリゴマー間のサブユニット交換では、交換前後で系の全体構造に変化がない”ため、交換現象の存在を確認しその動態を明らかにすることは非常に困難である。筆者らは重水素化ラベリング法を用いてこの点を克服した。

図4に軽水素化 $\alpha7$ リング（h14リング）と重水素化 $\alpha7$ リング（d14リング）及び軽水素化 $\alpha7$ と重水素化 $\alpha7$ を等量持つリング（h7d7リング）の散乱長密度を示す。h7d7リングの散乱長密度はh14リングとd14リングの間であり、81%重水素化溶媒の散乱長密度と一致する。コントラストを考慮して散乱的に述べると“81%重水素化溶媒中ではh14リングとd14リングのSANSスペクトルは一致し、h7d7リングはマッチングするため不可視”となる。したがって、h14リングとd14リングを混合した場合、サブユニット交換が存在すれば、軽水素化 $\alpha7$ と重水素化 $\alpha7$ が入り混じったヘテロ同位体 $\alpha7$ リングが生成される。そして、81%重水素化溶媒中

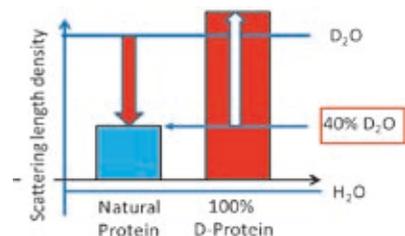


図3 重水素化による散乱長密度の変化

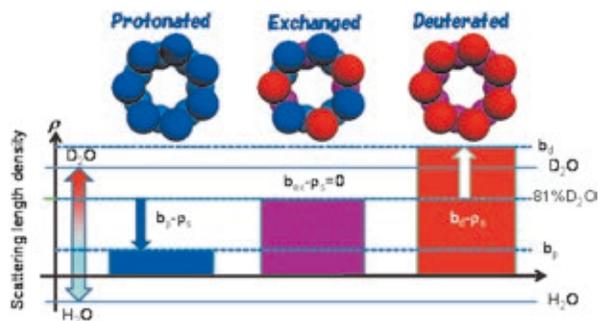


図4 h14（左）、h7d7（中）、d14（右）リングの散乱長密度

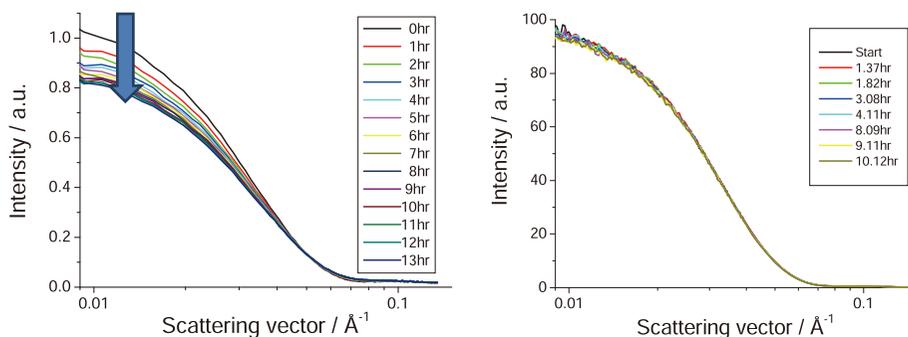


図5 h14, d14 リング混合後の散乱の経時変化。(左) SANS, (右) SAXS

はヘテロ同位体 $\alpha 7$ リングホモ同位体 (h14 又は d14) リングよりコントラストの絶対値は小さいので、サブユニット交換の進行に応じて SANS 強度の減少が観測されるはずである。

図5 (左) に h14 リングと d14 リングの混合後の時分割 SANS 測定の結果を示す。散乱強度が時間経過とともに減少していくことが明瞭に観測された。しかし、時間経過により $\alpha 7$ リングが分解した可能性も否定できない。そこで全く同じ条件の下で時分割 SAXS を行った。SAXS では同位体効果は存在しないので、分解等の形状変化が起こった場合のみ散乱スペクトルの変化が観測されるはずである。図5 (右) に示すように、この実験では SAXS スペクトルの変化は観測されず、SANS で観測された散乱強度の減少はサブユニット交換によるものであると結論付けられた。

図6 に原点散乱強度 $I_0(t)$ の経時変化を示す。測定された $I_0(t)$ は“①初期値の 76%まで減少が停止する”“②スペクトルは2つの指数減少関数で記述される”という特徴を持っている。これは“①は全てのサブユニットが交換するのではなく 14 量体中の2つのサブユニットが可換であること”“②は交換現象には2つの時定数の異なる機構が関与していること”を示している。②は“ $\alpha 7$ リングは交換前に交換活性状態に移行することが必要”であり、“活性状態にあるリング同士のみがサブユニット交換をす

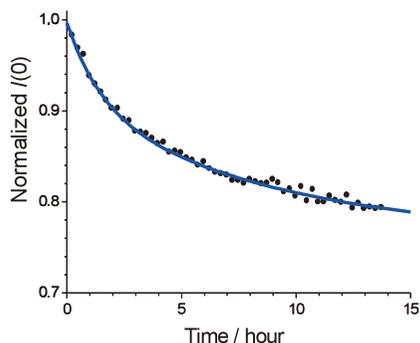


図6 原点散乱強度の経時変化
実線は2つの指数減少関数による Fitting 曲線

る”という“2段階機構の存在”を示唆している。この2段階機構により $I_0(t)$ も説明が可能である。

このように重水素化ラベリング法をうまく利用することで構造測定だけでなく溶液中のタンパク質の動態測定も行うことが可能となる。

5 終わりに

必要試料量・測定時間と観点では SAXS 法が SANS 法に勝っている。したがって、SANS 法は重水素化ラベリング法とコントラスト変調法を利用し、ほかの手法では得ることができない構造情報の取得を目指すべきであると筆者は考えている。困難な点は重水素化試料の調製であるが、筆者らのグループはこれをサポートし、

更に重水素化試料調製技術を進展・汎用化させるために KuamtorI Deuteration Station Project (通称 KIDS プロジェクト) を開始している。興味のある方は一報いただけると幸いである。

参考文献

- 1) Protein Data Bank Japan, <http://pdbj.org/>
- 2) Dyson, H.J. and Wright, P.E., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**(3), 197–208 (2005)
- 3) Sugiyama, M., *et al.*, *Biophys. J.*, **106**, 2206–2213 (2014)
- 4) Sugiyama, M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Rep.*, **4**, 28–32 (2015)
- 5) Hirai, M., Contrast Variation in “Neutrons in Soft Matter”, Imae, T., *et al.*, Eds. John Wiley & Sons, Inc. (2010)
- 6) Engelman, D.M., *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 3888–3892 (1975)
- 7) Sugiyama, M., *et al.*, *J. Appl. Cryst.*, **47** 430–435 (2014)
- 8) Sugiyama, M., *et al.*, *Biophys. J.*, **110**, 2037–2042 (2011)