

抗貧血薬候補ウシラクトフェリンの鉄イオン会合機構
Multiferric ion-induced bovine lactoferrin assembly from
acidic to neutral pH: A new antianemic material

松村義隆¹、山口智大¹、清野翔平¹、川上浩²、田之倉優³、小島正樹¹
¹東京薬科大学、²共立女子大学、³東京大学

We measured bovine lactoferrin (bLf) in the presence of 70 mol ferric ions (70FeLf) at pH 1-6 by small angle X-ray scattering (SAXS). The results indicated that 70FeLf in investigated pH range maintained a globular shape and included many bLf monomers. The number of bLf monomer in 70FeLf showed pH-dependent. Theses suggest that following: (1) Multiferric-bound-bLf may maintain a stable conformation in both stomach and digestive tract. (2) The number of bLf monomer in multiferric-bound-bLf might be correlated with internal conformational change of bLf or apparent pKa of bicarbonate ion. Multiferric-bound-bLf may be useful for antianemic materials.

食品タンパク質の溶液散乱測定 Solution scattering measurement of a food protein

渡邊 康・農研機構

タンパク質や多糖などの生体高分子の関連する多様な分野において、それらの溶液中の構造特性解析は重要である。そのなかでも、食品に関連する粘性糖タンパク質は高分子量で大量(60-90 wt%)の糖鎖が結合しているため、その結晶化やNMR解析は難しく溶存状態の知見は十分でない。軟骨プロテオグリカン(軟骨細胞間マトリックスの主要構成成分)であり、イオン成分の膜透過性を調整するなど生理的に重要な機能や構造体構成成分としての物理的な機能を果たしている。本研究では、高分子量糖タンパク質の溶液中の構造物性評価における溶液X線散乱測定の有効性の検証を進行中である。本年は食品関連糖タンパク質であるサメ軟骨およびサケ軟骨プロテオグリカンについて、主として溶液X線散乱法による評価結果について報告する。

水溶液中の分子鎖構造は、放射光小角X線散乱測定により評価した。溶液X線散乱測定装置は、高エネ機構 PFBL10C(検出器:一次元位置敏感比例係数装置、X線波長:0.1488 nm、試料検出器間距離:1.98 m)を主として使用した。一部のデータの再現性の確認においては、SPring8BL45XU(検出器:2次元検出器 R-AXIS4++、X線波長:0.09 nm、試料検出器間距離:3.5 m)を利用した。得られた散乱データは試料直前のイオンチェンバーの出力により入射X線強度の補正をした。また、サメ軟骨プロテオグリカンの水溶液中の分子量はレーザー光散乱測定により評価した。

結果として、サメ軟骨プロテオグリカンは生理的な条件では、わずかな量の超高分子成分と分子量 200 万前後の主要成分から構成される。水溶液中のサメ軟骨およびサケ軟骨試料の主要成分の分子鎖構造は、排除体積を持ったほどけた構造である。高分子鎖の堅さの指標である持続長は、サメ軟骨試料については13-16 nm程度、サケ軟骨試料については約9 nmと評価された。サメ軟骨プロテオグリカンはサケ軟骨プロテオグリカンに比べて水中における分子鎖の柔軟性に欠けることが示唆される。

リン脂質膜の X 線ダメージ —エステル結合とエーテル結合脂質の比較を中心に—

X-ray damage of phospholipid membranes - A Comparison of the ester- and ether-bonded lipids-

高橋 浩
群馬大院理工

施設・光学系の高度化により放射光強度は、大幅に増大した。そのため、有機分子や生体高分子系の試料においては X 線ダメージが顕著になってきている。生体膜の基本骨格であるリン脂質膜も、X 線ダメージを比較的強く受ける。X 線ビームの直接的な効果であるか、X 線照射によって発生したラジカルによる二次的な効果であるかについては、まだ、決着は付いていないが、M. Caffrey らの研究[1]により、リン脂質膜の X 線ダメージは、炭化水素鎖が極性頭部から切り離される切断反応と、重合反応の二種類がメインであることが明らかにされてきている。特に、前者の疎水鎖の切断が、リン脂質膜における X 線ダメージの大部分を占める。

切断された脂肪酸とリゾリン脂質は、それら自身の組み合わせで二重層膜を形成するため、X 線ビームダメージを受けても膜構造は維持される。そのため、タンパク質の場合と異なり、小角領域に観察される膜構造由来の散乱・回折強度が、ダメージ量に従って消滅して行くということ起こらず、注意が必要である。ただ、M. Caffrey ら指摘しているように、ダメージ産物として脂肪酸とリゾリン脂質が存在するようになると、膜の相挙動が異なってくる。本来液晶相である温度に保持していても、X 線ダメージが進行すると、ゲル相を示す反射が広角領域に出現してくるようになる。

主に、この現象を利用して、本研究では、炭化水素鎖が、エーテル型で結合しているリン脂質と、生物界では主流であるエステル型で結合しているリン脂質の二者に関して、X 線に対するダメージの受けやすさを比較検討した。酸やアルカリなどの攻撃には、エステル結合よりも、エーテル結合のリン脂質の方が遙かに耐性を持つが、今回調べた範囲では、エーテル結合脂質の X 線ダメージに対する耐性は、エステル結合脂質よりもやや劣るものであった。一般の化学反応における反応性から推測されるものとは異なる結果で、X 線による直接的な寄与による損傷が大きいのかかもしれない。

[1] V. Cherezov, K. M. Riedl and M. Caffrey. *J. Synchrotron Radiation*. **9** (2002) 333-341.

J-PARC および PSI の μ SR による酵素反応における電子と プロトン移動の可視化の予備的研究

Preliminary visualization study of electron and proton transfer process in an enzyme reaction by μ SR in J-PARC and PSI

小林政義¹・清谷多美子²・田中伊知朗^{3,4}・髭本亘⁵・新村信雄⁴

1 茨城大院理工、2 昭和薬大、3 茨城大工、

4 茨城大フロンティアセンター、5 JAEA

【目的】酵素反応の素過程の一つである電子伝達・プロトン移動の直接観測は反応機構の解明、更には酵素反応制御に大きく寄与する。中性子回折法はプロトン伝達に関与するプロトンの同定は可能であるが、プロトン移動の実態(方向や頻度など)の観測には不得手である。本研究で用いる素粒子の一種であるミュオンはそれ自体がプローブとしての機能を有する。実際には、ミュオンを試料に注入、試料内に停止させ、ミュオンが停止した位置周辺の内部磁場を感じるによりその近傍の情報を得る。即ち、ミュオンは局所構造を観測することが可能であり、酵素反応に関与する電子伝達・プロトン移動のダイナミクスを原子レベルで直接観測が可能な唯一のプローブであると考えられている。本研究では、ミュオンの生命科学への有用性および創薬研究への応用の可能性を探るために、世界に先駆けて、消化酵素の一種であるセリンプロテアーゼとその阻害剤との複合体を用いて、茨城県東海村の J-PARC およびスイスの PSI で実験を行った。

【方法】測定試料は、chymotrypsin と LBTI (lima bean trypsin inhibitor)、純水を混合し、12~24 時間の間、凍結乾燥により脱水後、60-80%の湿度環境下で静置し、重量比で水分含量 20%に調整したものを準備した。実験は、J-PARC/MLF のミュオン科学実験施設の D1 実験装置、および PSI/S μ S の GPD を用いて、ミュオンスピン回転緩和(μ SR)法により、温度と縦磁場(LF)を変化させた試料環境で行い、解析には Risch-Kehr (R-K)関数および久保-鳥谷部関数を用いた。

【結果・考察】J-PARC の実験結果を R-K 関数を用いて解析を行ったところ、2つの緩和定数(Γ)が得られた。PSI の実験結果については久保-鳥谷部関数と指数関数を用いて解析を行い、酵素反応が起こっているサンプルと起こっていないサンプルで差がみられた。しかし、試料として用いたタンパク質は分子量が数万の高分子で複雑な構造を持つこと、更に前例がないことから、電子伝達・プロトン移動が生じている位置の特定については、他の分析機器によるデータや計算科学によるシミュレーションなどとともに、慎重な解析および議論を要する。

SAXS によるウイルス複製タンパク質の構造変化 Conformational changes in virus replication protein by SAXS

加藤悦子¹、清水伸隆²、加藤昌彦³、石橋和大¹、石川雅之¹
¹ 生物研、² 高エネ研、³ シスメックス

ウイルスは自身のゲノムに必要最小限の複製に関わるタンパク質(複製タンパク質)をコードしている。このためウイルスの複製タンパク質は、構造やドメインの空間配置などを巧みに変化させながら複数の機能を獲得していると考えられている。しかし、その詳細には不明な点が多い。ウイルスの複製機構を真に理解し有効な抗ウイルス戦略を立てるためには、複製の各過程における複製タンパク質の機能と構造(変化)を解明することが重要である。

本研究では、プラス鎖ウイルスに属するトマトモザイクウイルス(ToMV)の複製タンパク質(メチルトランスフェラーゼドメインとヘリカーゼドメインを含む130Kとその翻訳リードスルー産物の180K)のうち130Kタンパク質について、ゲル濾過分析およびSAXSによる構造変化を解析した。その結果、130Kは二量体で存在し、ATP存在下で構造が変化し安定化することが分かった。また、130Kは複製に関わるとともに、ウイルス感染に伴う宿主のRNAサイレンシングの抑制にも関与すると考えられている。そこで、130KとsiRNAとの複合体についてもSAXSによる解析を試みた。その結果、130Kは二量体でsiRNAと結合することが分かった。またSAXSの結果から130K/ATP複合体と130K/siRNA複合体の低分解能構造を計算した結果、これら複合体間で130Kの構造は大きく異なることがわかった。これらの結果から、ウイルス複製タンパク質の多機能性の獲得には大きな構造変化が関わっていることが示唆された。

骨格筋を強くする遠心性収縮負荷の筋節内検知センサ Stress sensor of skeletal muscle sarcomere in myogenetic eccentric contraction

中原 直哉¹、平野 和宏¹、山内 秀樹¹、平塚理恵²、竹森 重¹

1) 東京慈恵会医科大学 医学部 分子生理学

2) 東京慈恵会医科大学 自然科学 生物研

【背景・目的】加齢性骨格筋減弱(サルコペニア)による転倒や不活動が問題となる中、骨格筋を強くする処方が熱望される。この中で重い物を支えながら机上にそっと置く、骨格筋の遠心性収縮が注目されている。この遠心性収縮では短縮しようとする筋節が外力によって強制的に引き伸ばされており、筋節構造内の力支持装置に大き目の力学的負荷がかかる。この力学負荷が強すぎれば遅発性筋痛や肉離れなどの筋損傷を惹き起こすが、適当な強度の遠心性収縮は筋力増強・筋肥大という骨格筋を強くする変化を誘導するというのが注目される理由である。ここで適当な強度の遠心性収縮が筋節内力支持装置のどこに作用して骨格筋を増強する変化を誘導するのかを、光学顕微鏡、電子顕微鏡、X線回折で検索するのが研究目的である。

【方法】8週齢 F334系雄性ラット足底筋の血流を保ったまま支配神経を露出し、この神経を矩形波電気刺激して筋を収縮させた。ラットは収縮能のみ評価した対照群(CON)、刺激頻度 100Hz で筋長一定(等尺性)の負荷収縮をさせた等尺性収縮群(ISO)、負荷収縮に同期して筋長を至適長の 10%分強制伸展した遠心性収縮群(ECC)に分けた。ISO と ECC 群の負荷収縮は一回 300ms を 3 秒間隔で 10 回行わせた。ECC 群は、電気刺激頻度に 50Hz、75Hz、100Hz の 3 段階を設けることで、各々軽度、中等度、強度の遠心性負荷収縮をさせた3亜群とした。負荷収縮後 60 分間の収縮能変化を刺激頻度 200Hz および 250Hz の等尺性収縮で経時評価し、その後光学、電子顕微鏡用標本に調製した。X線回折用標本は 60 分の収縮能評価後、直ちに界面活性剤で細胞膜を除去したスキンド骨格筋標本とし、後日 BL6A での X線回折像取得に用いた。

【結果・考察】中等度・強度 ECC 亜群は刺激後 60 分間の収縮能評価で明らかな収縮張力の低下を示した。強度 ECC 亜群の筋には光学顕微鏡レベルで横紋構造の崩壊、膜の歪みを認め、中等度 ECC 亜群でも電子顕微鏡レベルでは筋節の乱れを認めた。筋節内周期構造の劣化を最も鋭敏に反映して減弱する X線回折像のミオシン層線は、CON 群では強く見られたが、中等度・強度 ECC 亜群ではほとんど認められず、軽度 ECC 亜群と ISO 群でも強度が低下していた。軽度 ECC 亜群と ISO 群でのミオシン層線強度低下について、現段階ではその程度の違いは明らかでないが、この両者の間に明らかな差を認めれば、極めて微妙な筋節周期構造の乱れが収縮負荷に対する骨格筋増強性の適応応答を誘導する可能性が高いと言えよう。

モノアシルグリセロールと脂肪酸の含有割合変化に伴う胆汁酸混合ミセルの形態変化

Morphological changes in bile salt-based micelles with content ratio of monoacylglycerol and fatty acid

相澤秀樹¹、市川創作²、小竹(奈良)英一³、長尾昭彦⁴

1 摂南大薬、2 筑波大生環系、3 農研機構食品総合研究所、4 十文字女大

脂溶性医薬品や食品油脂が摂取されると、十二指腸において胆汁に含まれる胆汁酸およびリン脂質により乳化されると共に、消化酵素により加水分解を受け、胆汁酸を主成分とする混合ミセルを形成後、腸で吸収される。医薬品もしくはサプリメントに含まれる脂溶性有効成分は一般に油脂に溶解した状態で存在しており、油脂とともに乳化された後、胆汁酸混合ミセルに可溶化され、腸で吸収される。このように胆汁酸混合ミセルは、脂溶性有効成分の可溶化と吸収に大きな役割を果たしている。胆汁酸混合ミセルの構造を解析し、胆汁酸混合ミセルの組成とその構造との関係を議論することは、脂溶性有効成分の体内吸収を制御する技術の開発に有用な基礎的知見となる。

胆汁酸混合ミセルは、トリアシルグリセロールの酵素加水分解物であるモノアシルグリセロールと脂肪酸の混合物の周りを胆汁酸が取り囲むように形成されると考えられている。このような構造では、胆汁酸混合ミセルの内部の混合物の割合が増加するにつれて胆汁酸混合ミセルの形態が変化すると推察される。そこで本研究では、胆汁酸混合ミセルの形態に対するモノアシルグリセロールと脂肪酸混合物の含有割合の影響を検討した。

胆汁酸混合ミセルの組成は、ヒト結腸腺癌由来の Caco-2 細胞を用いて β -カロテンの吸収性を評価した研究¹⁾を参考にした。モノオレインに対するオレイン酸のモル比を3:1に保ちながら、その含有割合を段階的に変化させた胆汁酸混合ミセルを調製した。フロンファクトリー BL-6A に設置されている小角 X 線装置でこれら組成の異なる混合ミセルを測定した。得られた散乱曲線に幾何学構造モデルに基づく理論散乱曲線をフィッティングすることで、各混合ミセルの大きさと形状を求めた。その結果、胆汁酸(BS):モノオレイン(MO):オレイン酸(OA)のモル比が60:0:0と60:3:1の混合ミセルは球状ミセルであり、BS:MO:OAが60:24:8の混合ミセルでは回転楕円体状ミセルに変化した。さらに、BS:MO:OAが60:36:12の混合ミセルでは円柱状ミセルへと変化した。この結果から胆汁酸混合ミセルのモノオレインとオレイン酸の含有割合により混合ミセルの形態が変化することが明らかになった。

[1] T. Sugawara, M. Kushiro, H. Zhang, E. Nara, H. Ono, A. Nagao, *J. Nutr.*, 131 (11), 2921 (2001).

ブルー銅タンパク質電子状態のアロステリック制御

Allosteric Regulation of Electronic Structure
in Blue Copper Protein山口峻英¹、Robert K. Szilagy²、高妻孝光¹

1 茨城大院理工、2 モンタナ州立大学

Pseudoazurin は、脱窒において亜硝酸還元酵素、亜酸化窒素還元酵素に対し、電子供与体として機能している。Cu⁺²⁺にHis40、His81、Cys78、Met86が配位した活性中心は Type 1 銅に分類され、異方性の高い独特の電子状態によって青色を呈している。Pseudoazurin では、Type 1 銅の電子状態に異方性の高い成分(Axial 成分)と低い成分(Rhombic 成分)が見出されている。また、銅の第二配位圏に存在する Met16 は Type 1 銅に弱く相互作用し、電子状態の調節していることがこれまでに報告されてきた。

X 線吸収分光法(XAS)および密度汎関数法によって Pseudoazurin Met16 変異体の Type 1 銅の構造・電子状態を検討した。Cu K 吸収端と S K 吸収端における XAS の測定は SSRL BL 7-3、4-3 において行った。Cu K 吸収端における XANES では立ち上がりエネルギーのシフトから、Axial 成分では Rhombic 成分よりも有効核荷電が減少していることがわかった。EXAFS からは、Cu-N(His)、Cu-S(Cys)の距離が活性中心の電子状態によらず 1.94-1.96Å、2.15-2.16 Å になった。また Rhombic 成分における Cu-S(Met)の距離は 2.48 Å に決定され、Axial 成分では Cu-S(Met)の結合距離が長くなっているものと考えられた。S K 吸収端で 2469 eV 付近に pre-edge バンドが観測された。pre-edge バンドの強度にもとづき Cu-S(Cys)の共有結合性を推定したところ、Axial 成分では 49 %、Rhombic 成分では 31 %になることが判明した。密度汎関数法による構造・電子状態計算から、タンパク質主鎖が銅に提供するキャビティ(外圏)がフレキシブルな性質を持つことで Type 1 銅(内圏)において Axial/Rhombic の電子状態遷移が起こるものと推察された(図1)。Met16 を変異したことによる弱い相互作用の違いが、主鎖コンフォメーションの変化を誘起し活性中心に伝達されるアロステリックな電子状態の調節メカニズムが存在しているものと考えられる。

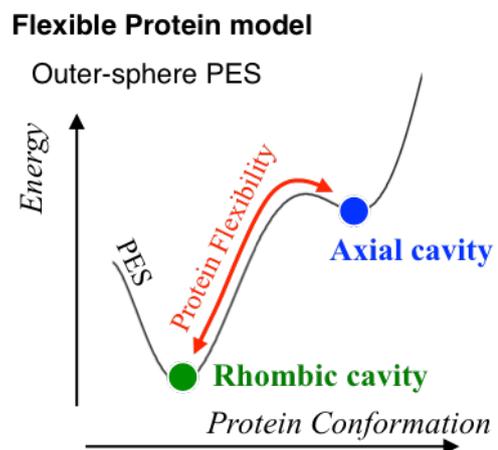


図 1:外圏のフレキシビリティによる電子状態制御の機構

PF-AR NW12A における分光装置の開発 The Development of Spectroscopic System at PF-AR NW12A

引田理英¹、山田悠介¹、富田文菜²、松垣直宏¹、千田俊哉¹

1 KEK-放射光、2 自治医科大学

現在のタンパク質の機能メカニズムの解析研究において、X線結晶構造解析だけではなく、種々の分光法を組み合わせることの重要性が認識されるようになってきている。このことはAPS、NSLSやSPring-8といった世界中の多くの放射光施設で分光装置が導入されていることから明らかである。タンパク質の機能メカニズム解明のためにはタンパク質を構成する原子の位置とその化学的諸性質を明らかにする必要がある。原子の化学的諸性質は主にその原子の関与する化学結合によって決まる。X線結晶構造解析法は、基本的には、原子の空間的な配置を決定するが、分光学的方法によれば、化学結合を精密に解析することができる。種々の分光法の中でも、振動分光法は原子の化学的諸性質を明らかにするために最も重要な解析法の一つである。しかし、振動分光法により、原子の位置情報を得ることは不可能である。このようなX線結晶構造解析法と振動分光法との相補性を認識し、これらの方法によってタンパク質の機能メカニズム解析が推進された例は非常に少ない。

そこで、「X線結晶構造解析法と振動分光法の相補性」を活用できる研究拠点の形成を目標に、ビームラインPF-AR NW12Aにおいて、タンパク質水溶液及び結晶に適用できる分光装置を開発・設置するプロジェクトを開始した。タンパク質水溶液に適用できる分光装置を利用することで、X線結晶構造解析だけでは分かり得なかった動的な情報を得ることができるようになる。さらに結晶に適用できる分光装置を利用することで、X線照射に伴うX線損傷を最小化するためのX線回折実験条件の検討や得られたX線構造が目的の状態であることを検証することができるようになる。本ポスターでは、相補性が活用された研究報告を例に、「X線結晶構造解析法と振動分光法の相補性」の重要性について、より詳細に解説している。またタンパク質水溶液及び結晶に適用できる分光装置の開発・設置の構想についても紹介する。

時分割小角X線散乱測定によるブロック共重合体溶液の
蒸発過程におけるマイクロ相分離構造形成過程の解析

奥村真大¹・富田翔伍¹・五十嵐教之²・清水伸隆²・佐々木園¹・○櫻井伸一¹
¹京工織大院工 ²高エネ研

【緒言】 ブロック共重合体が形成するマイクロ相分離構造の中で、球以外の形態のマイクロ相分離構造(例えばシリンダー)は異方的な形状であるため、流動場や電場等の外場を印加すると配向することが知られている。これに対して球状マイクロ相分離構造の場合は、その等方的形状ゆえ外場に対して配向することはないと考えられる。しかしながら球は、三次元空間では体心立方(BCC)格子を構成することが知られており、BCC格子は外場に対して配向すると予想される。また、外場だけでなく、試料自身の表面(自由表面)や基板との界面が原因でBCC格子の配向が誘発されることも予想できる。そこで本研究では、ブロック共重合体溶液のキャスト過程における構造形成・配向の過程をその場観察することを目的に時分割小角X線散乱(SAXS)測定を行った。

【実験】 用いた試料は、スチレン-エチレンブチレン-スチレントリブロック共重合体(SEBS16)である。そのキャラクタリゼーションは数平均分子量(M_n)が 6.6×10^4 、分子量分布の多分散指数(M_w/M_n)が 1.03、ポリスチレン(PS)の体積分率(ϕ_{PS})が 0.16 である。この試料をエチレンブチレンに対して選択的に良溶媒であるヘプタンと共通溶媒である塩化メチレンの混合溶媒に溶解させてポリマー濃度 5wt%の溶液を作製した後、塩化メチレンをすべて蒸発させ、ポリマー濃度 10wt%の溶液を作製した。この溶液を図1に示す自作の実験治具のカプトンフィルム上にのせ、さらに重量変化を計測するため図1の治具一式を電子秤量計にのせた。これを用いて、高エネルギー加速器研究機構放射光研究施設の SAXS ビームライン (BL-10C)にて時分割2次元 SAXS(2d-SAXS)測定を室温で行った。なお以下に示す結果はX線ビームを試料溶液の最表面近傍に入射して測定した結果である。

【結果と考察】 図1に示した自作の治具の特徴はX線をさえぎる容壁がないことである。このような壁のないサンプルホルダーを用いることで、ブロック共重合体溶液のキャスト過程で2d-SAXS測定を行うことに初めて成功した。図2に2d-SAXS測定の結果を示す。図中のスケールバーは散乱ベクトル q に対するものであり、 $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ で定義される。ここで、 λ はX線の波長で $\lambda = 0.1488$ nm、 θ は散乱角である。(a)は蒸発開始後1分経過時の結果であり、蒸発過程の早い段階で円環状のピークが現れた。これに対して(d)は約10分経過後の結果であり、蒸発が進むにつれて楕円状に変わっていった。これは蒸発方向に垂直な面の間隔が狭まっていることを表すが、その理由として、溶媒蒸発に伴って液面が徐々に下っていったためと考えられる。図3の黒丸と白丸はそれぞれのポリマー濃度における、カプトンフィルムに平行ならびに垂直な(110)面の面間隔 d をプロットしたものであり、 d は $d = 2\pi/q^*$ (q^* :一次ピーク位置)で算出した。図3が示すようにポリマー濃度が約40wt%を境にカプトンフィルムに平行な(110)面の面間隔が減少しており、先述の2d-SAXSパターンの変化が起こりはじめる濃度が約40wt%であることが定量的に示された。逆に、ポリマー濃度40wt%まで面間隔がほぼ一定なのは、BCC格子のひずみを解消できる状態を保てるぐらいに、系はまだ流動的である、すなわち、粘度は高くなく、またPS球はまだガラス化していないことを示している。

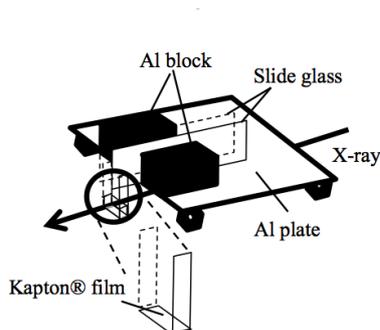


Fig. 1 Wall-free solution container for SAXS measurement.

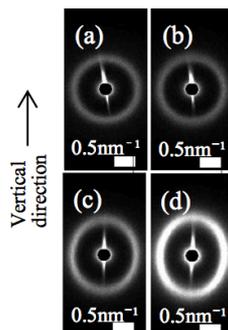


Fig. 2 Change in the 2d-SAXS pattern along with the evaporation. Polymer concentration (a) 12wt%, (b) 42wt%, (c) 65wt%, (d) 96wt%.

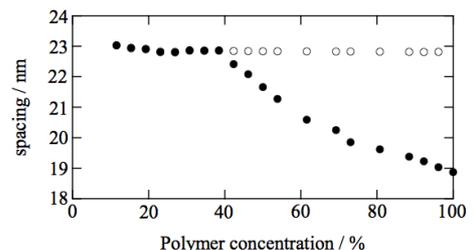


Fig. 3 Plots of spacing vs polymer concentration for the (110) planes parallel (●) and perpendicular (○) to the Kapton film.

Photon Factory における BioSAXS ビームラインの整備状況

Current Status of BioSAXS instruments at Photon Factory

西條慎也¹, 清水伸隆¹, 森丈晴¹, 大田浩正², 永谷康子¹,
谷田部景子¹, 高橋 正剛¹, 高木秀彰¹, 小菅隆¹, 五十嵐教之¹

¹ KEK-PF、² 三菱電機 System & Service

生体高分子の X 線小角散乱(BioSAXS)は、タンパク質や核酸、およびそれらの複合体溶液を試料として分子のサイズや形状、またそれらの動的な変化の情報を得ることが可能な手法である。Photon Factory には、3本の小角散乱ビームライン(BL-6A, 10C, 15A2)が設置されており、その全てで BioSAXS 実験を実施することができる。本報告では BioSAXS 実験に用いる設備に関する整備・高度化の状況について報告する。

3 ビームラインに共通な設備として、PILUTAS 検出器、R-AXIS 検出器に対応したデータ処理・解析ソフトウェア SAngler のダウンロードによる配布を2015年7月から開始した。また、試料の放射線損傷を回避するため、測定中に試料溶液をシリンジポンプによってフローさせるサンプルフローシステムの利用を開始した。BL-6A では、試料調製に必要な機器の整備(高速冷却遠心機、小型インキュベーター)をおこなった。BL-15A2 ではハイスループット測定のための溶液用サンプルチェンジャー(SSC)の開発を行っている。サンプルロード機能と分注機能がシステムに組み込まれており、試料原液に対して4種類の溶液を混合してサンプルを調製することができ、最大 192 サンプル(96×2plate)の連続測定が可能である。さらに、試料セル位置での紫外可視分光測定が可能となっており、測定データはSAnglerを用いたパイプライン解析システムを利用して自動的に解析される。また、HPLC(Size Exclusion Chromatography)、MALS(多角度静的光散乱)とX線小角散乱測定システムを連結し、分子量・単分散性評価の高精度化、ならびに不安定な試料の測定を可能にする SEC-MALS/SAXS システムを導入し、利用を開始(BL-10C, 15A2)した。

固視微動をする外眼筋の超分子構造と収縮特性

Supramolecular structure and contractile characteristics of extraocular muscle involved in flickering eye movement

栗原貫, 中原直哉, 大野哲生, 山澤徳志子, 山口眞紀, 竹森重
東京慈恵会医科大学分子生理

【背景・目的】: 静止している一点を固視しているときにも眼球は固視微動する。このために眼球運動を行う外眼筋には独特の性質があるはずである。事実外眼筋には独特のミオシンアイソフォームが発現していることが知られている。外眼筋と四肢や体幹の骨格筋との違いは発現アイソフォームの違いだけとは限らないが、違いの検索には外眼筋の生理的な構造と機能を保った筋標本を作製することがまず必要である。本研究の目的は生理的な超分子形態をよく保存した外眼筋スキンドファイバーを調製し、その基本収縮特性を検索できるようにすることにある。

【方法】: ウサギ(日本白色種)の固視微動をカメラで記録したところ、平均周期 2.1 秒の大きな後頭部向きの水平眼振様の運動を示していた。このため、その急速相を起こす外側直筋に注目することとした。外側直筋と腸腰筋の筋束を丁寧に摘出し、界面活性剤による除細胞膜処理によりスキンドファイバーとした。この標本の X 線回折像を高エネルギー加速器研究機構の BL6A で記録する一方、筋がたるみ始めるスラック長や収縮特性を調べた。

【結果・考察】: 外側直筋のスラック長は 2.0 から 2.5、腸腰筋の平均スラック長 2.0 ミクロンに比べて長かった。このことは外側直筋のコネクチン/タイチンが腸腰筋とは異なる可能性を示唆する。標本からは良好な二次元 X 線回折像が得られた。このことから今回の実験に用いた標本は生理的な超分子構造をよく保存していることが確認された。 Ca^{2+} 依存性張力変化(Ca^{2+} -張力関係)を測定したところ、最大収縮張力の 50%の張力が出る Ca^{2+} 濃度($\text{pCa}_{50} = -\log[\text{Ca}^{2+}]_{50}$)が腸腰筋では 5.68 ± 0.01 であったのに対して、外側直筋では 5.64 ± 0.07 であった。また Hill 係数は腸腰筋では 5.2 ± 0.8 であったのに対して、外側直筋では 2.8 ± 0.3 であった。腸腰筋と比較して外側直筋は筋線維の Ca^{2+} 感受性が高く、一方で協同性が低いと考えられる。X 線回折像の詳細な検討から、これらの収縮特性の少なくとも一部は、腸腰筋と外側直筋のタンパクのアイソフォームの違いではなく、筋節の超分子構造構築に由来する可能性が示された。

Crowding 環境下におけるタンパク質の熱安定性 Thermal Structural Stability of Protein Under Crowding Environment

味戸聡志¹, 平井光博²

1 群馬大学理工学部, 2 群馬大学理工学府

【研究の背景と目的】

細胞内は生体分子が密に存在しており、タンパク質濃度は 200~400mg/ml、排除体積は 20~40%に達する。一方、溶液におけるタンパク質の構造状態やフォールディングに関する研究は、その多くが希薄溶液中で行われており、より生体内の環境に近い分子混雑下(crowding)や、生理的塩濃度における研究が必要である。

また、クリプトビオシスで知られるクマムシや氷点下で活動する低温耐性生物などは、細胞内に高濃度の糖や糖アルコール、不凍タンパク質を貯蔵することで、凍結によるタンパク質の凝集や低温変性を防いでいるが、その機構は未だ不明瞭である。

そこで本研究は、細胞凍結保存液に含まれる物質や低温耐性生物が産生するトレハロースを crowder 分子とみなし、高温・低温状態でのタンパク質構造への影響を、広角 X 線散乱法を用いて明らかにしようとする目的で行った。モデルタンパク質としてウマ心臓ミオグロビンを用い、緩衝液と塩化ナトリウムによって生理的環境を模した。また、トレハロースとの比較のためにグリセロールも crowder として用いた。

【実験方法】

高エネルギー加速器研究機構 PF の BL10-C を用いて昇温 X 線散乱法、高輝度光科学研究センター Spring-8 の BL40B2 を用いて降温 X 線散乱法を行った。温度変化は 25°C から 85°C への昇温、25°C から -20°C への降温を行い、crowder 濃度は最大で 25wt%とした。

解析法としては、得られた散乱関数の階層別解析、回転半径 R_g の評価、CRY SOL による理論散乱関数との比較、階層構造型領域別解析を行った。

【結論】

昇温条件では Crowding により、pH7 におけるミオグロビンの α - β 転移温度、及び pH3.5 における二次構造の転移中点温度の上昇を確認した。降温条件では、pH3.5 のグリセロール溶液中における二次構造の転移中点温度の上昇を確認した。これより、Crowder は低温に比べて高温におけるタンパク質の変性を抑制する作用が大きく、特に二次構造領域に関して顕著であることが判明した。現在、crowding 環境下に於けるミオグロビンの水和状態を CRY SOL を用いて解析中である。

固体表面に作製した SAM-DNA 二重膜の軟 X 線照射効果

Soft X-ray irradiation effect of SAM-DNA bilayer on solid surface as an irradiation sample

成田あゆみ 1、藤井健太郎 2、横谷明德 2、馬場祐治 2、下山巖 2

1 産総研 省エネルギー 2 原子力機構 量子ビーム

【緒言】シリコン表面の DNA 薄膜に対して軟 X 線を照射すると、DNA 分子中に生じる鎖切断や塩基損傷などの収率が軟 X 線エネルギーに依存して大きく変化することが報告されている[1]。しかし生体内での DNA は有機分子であるヒストンタンパクに巻き付いた複合体として存在しており、物理吸着したシリコン表面との間でイオン化により生じた電荷の移動が起こり得る状況とは大きく異なっていると考えられる。そこで、より生体環境に近い DNA の状態を実現するため、本研究では自己組織化した有機単分子膜(SAM)をヒストンタンパクと見立て、共有結合により SAM に DNA を固定した二重膜試料を作製し、膜としての評価を行うとともに、軟 X 線照射実験を行い SAM 上の DNA の照射効果を観察した。

【実験】サファイア基板の上に、アルキル鎖の両端にチオール基(-SH)とシリコンアルコキシド(-Si(OCH₃)₃)を持つ SAM を作製した。SAM の上に、1 μ M の SH-オリゴヌクレオチド DNA(以下、オリゴ)-TrisHCl 溶液を 100 μ l 滴下し、二重膜を形成した。作成した膜は PF BL27Aにおいて X 線光電子分光(XPS)を用いて、二重膜にオリゴが吸着されているかを評価した。膜厚は基板および吸着分子由来の光電子強度比により算出した。照射実験は N 1s のイオン化エネルギーを超えた 430 eV を試料薄膜に照射し、照射前後の化学状態変化を吸収端近傍 X 線吸収微細構造(NEXAFS)スペクトルより評価した。

【結果・考察】SAM-DNA 二重膜試料に関して、P 1sXPS スペクトル中にオリゴ中のリン酸基に由来する 2150.0eV のピークが現れたことから、SAM 上にオリゴが吸着していることを確認し、二重膜の膜厚は約 7.7 nm と算出された。二重膜試料の照射前後の N K-edge NEXAFS スペクトルを図1に示す。照射により π^{*1} 、 π^{*2} 双方のピーク強度が減少した。オリゴ分子では塩基部位にのみに N 原子が存在するため、塩基中の不飽和結合が解離したと推測される。以上より、SAM-DNA 二重膜の試料を用いることで照射による DNA の化学状態変化を見出し、照射効果を観察することができた。

[1] K. Fujii et al., J. Phys. Chem. B 113 (2009) 16007.

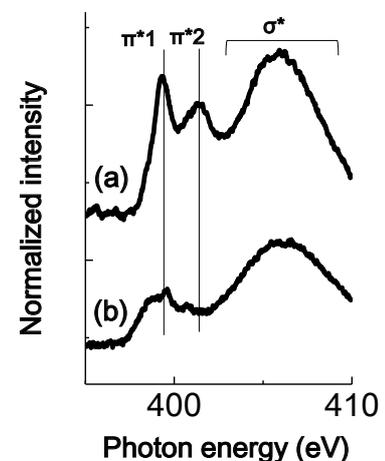


図1. SAM-DNA 二重膜試料に対する 430 eV での(a)照射前および(b)照射後の N K-edge NEXAFS スペクトル

DDS モデルとしてのタンパク質内包リポソームの研究 Structural study of liposome encapsulating protein as the DDS model

高橋孝輔¹、平井光博¹
1 群馬大・工学部

[研究の背景と目的]

生体膜の主要構成成分であるリン脂質は、親水性基と疎水性基をもつ両親媒性分子であり、2つのリン脂質が互いに疎水性基を向け合うことで脂質二重層が形成される。この脂質二重層が単一膜小胞構造をとったものはリポソームと呼ばれ、生体膜の単純なモデルとして幅広く研究されている。さらに近年では、リポソームに低分子の薬剤やタンパク質などの高分子を封入した Drug Delivery System (DDS)の研究が進んでおり、脂質分子の生体適合性、分子認識能力が優秀な薬物キャリアーとして注目を集めている。しかし、DDSリポソームについての構造特性、外的環境変化に対する構造安定性等のナノスケールレベルでの構造学的知見は乏しく、重要な課題が残されている。そこで我々は、小角、広角 X 線散乱実験を用いて、外的環境変化に対する非内包リポソーム及びタンパク質内包リポソームの構造解析を行い、タンパク質内包・非内包リポソームの構造特性やタンパク質内包率などが、小角、広角 X 線散乱法により、解析可能であることを既に報告した(文献 1, 2)。今回、より生理的条件に近い溶媒を用い、分子混雑(crowding)環境下での熱安定性を評価することを目的として、研究を行った。

[実験方法]

測定には、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory BL10C 分光器ならびに高輝度光科学研究センター SPring-8 BL40B2 分光器を用い、X 線散乱実験を行なった。測定リポソームの調製として、ガングリオシド(GM)、コレステロール(Chol)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)をモル分率 GM / Chol / DPPC = 0.1/0.1/1 で混合し、超音波処理、凍結融解、押し出し形成器によってリポソームを調製した。内包するタンパク質にはミオグロビン、溶媒には生理的な Hanks 緩衝液、分子混雑(crowding)環境のモデル化のためにグリセロールを用いた。

[実験結果]

リポソームの全階層構造領域(形状、脂質二重層膜構造、アルキル鎖の充填状態)に対応する小角・広角散乱曲線を観測して、階層構造領域別解析によって、タンパク質内包および非内包リポソームの構造安定性を検討した結果、生理的な溶媒を用いた場合、crowding 環境では、41°C 付近でまずアルキル鎖の構造変化が起こり、次いで二重膜構造、全体の構造が逐次的に変化することを見出した。

[文献]

- 1) M. Hirai et al., J. Phys. Chem. B 2015, 119, 3398–3406.
- 2) M. Hirai et al., J. Synchrotron Rad. (2013). 20, 869–874.

高速重イオン照射による CeO_2 中欠陥構造の SAXS 評価 SAXS Observations of Defect Structure in CeO_2 by Swift Heavy Ions

○吉岡 聡¹, 鶴田幸之介¹, 高木聖也¹, 安田和弘¹, 松村 晶¹,
堀出朋哉², 石川法人³

1 九州大学 工, 2 九州工業大 工, 3 原子力研究機構

高速重イオンをセラミックス材料に照射すると, 材料中に高密度の電子励起が付与されイオントラックと呼ばれるナノメートルサイズの柱状欠陥が形成される. このような微細構造変化は, 例えば原子炉材料の性能劣化を把握するために重要であり, 定量的な評価が求められている. 酸化セリウム(CeO_2)は, 核変換処理材料として期待され, また, 軽水炉燃料の酸化ウランと同一の結晶構造であるため模擬材料としても広く研究されている. 一方, ケイ酸(SiO_2)ガラスは, 非晶質中に生成するイオントラックの構造理解を目的とした数多くの研究がある. 本研究では, SiO_2 ガラス基板上に CeO_2 を成膜した 2 層構造試料に対して高速重イオンを照射し, 各層でのイオントラック構造を小角 X 線散乱(SAXS)法により調べた.

CeO_2 薄膜は, SiO_2 ガラス基板上にパルスレーザー蒸着法を用いて作製した. 高速重イオン照射は日本原子力研究開発機構(JAEA)のタンデム加速器を用い, ビーム方向に対して基板面が垂直となるように試料を配置して実験した. イオン種およびエネルギーは 70 MeV Xe イオンとした. SAXS 測定はカメラ長 1 m, 波長 1.5 Å に設定し, 2 次元検出器(PILATUS 2M)で散乱パターンを観察した.

図 1 に 70 MeV Xe イオンを 3×10^{11} および 1×10^{14} ions/cm² まで照射した試料の SAXS パターンを示す. 両者を比較すると, ピーク位置はほぼ同様であるが, 高照射量の 1×10^{14} ions/cm² の場合に高いピーク強度および広いピーク幅を示している. これらは, 生成しているイオントラックの面密度およびイオントラックの半径の違いに起因している.

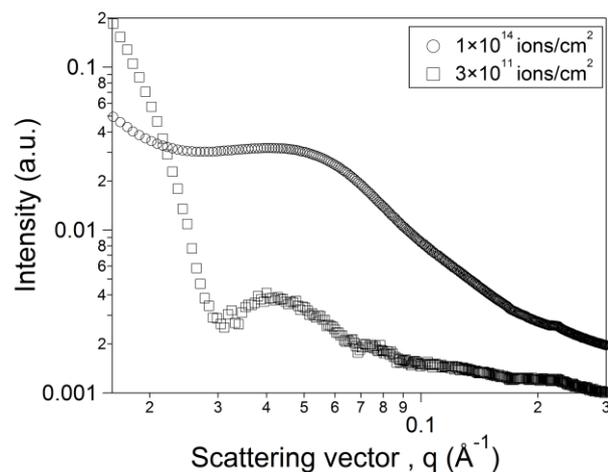


図 1 70 MeV Xe イオンを照射した $\text{CeO}_2/\text{SiO}_2$ の SAXS プロファイル

リン脂質とコレステロールからなる 非ラメラ液晶が示す相挙動の小角 X 線散乱分析 Analysis of phase behavior of non-lamellar liquid crystals consisting of phospholipid and cholesterol by small angle X-ray scattering

端山琢人¹、黒岩崇¹、市川創作²、金澤昭彦¹

1 都市大院工、2 筑波大生命環境

リン脂質やコレステロールの混合物は水溶液中で脂質二分子膜を形成し、ベシクルやミエリンなどラメラ液晶相が出現するほか、温度や濃度などの諸条件により非ラメラ相に転移することが知られている。本研究グループでは、リン脂質/コレステロール/水系において、目視可能なミリメートルオーダーの球状および膜状分子集合体を作製する手法を開発し、これらが多形のリオトロピック液晶であることを明らかにしてきた。これまでに、脂質成分および水相成分を変化させることで、ヘキサゴナル相やキュービック相などの非ラメラ液晶相が出現することがわかっている。本研究では、小角 X 線散乱(SAXS)測定を中心として、本液晶性分子集合体に見られる非ラメラ液晶相の出現条件について検討を行った。

卵黄由来ホスファチジルコリン(EPC)、コレステロール(Chol)および種々の添加成分(Add)を EPC:Chol:Add=5:5:1 のモル比で *n*-ヘキサンに溶解し脂質溶液とした。この脂質溶液を NaCl 水溶液または種々の pH に調整した緩衝液上に静かに積層し、約 24 時間静置してヘキサンを蒸発除去することで水相中に巨大分子集合体を得た。

水相に NaCl 水溶液を用いた場合、添加成分として長鎖アルキルアミンを用いて得られた分子集合体は直径数 mm に達する球状になったのに対し、長鎖脂肪酸を用いて得られた分子集合体は膜状になった。SAXS 測定の結果、球状および膜状分子集合体は温度に依存してそれぞれ cubic- lamellar 相転移および hexagonal-lamellar 相転移を起こすことがわかった。さらに、水相の pH を変化させて得られた分子集合体は、添加成分が同じであってもその相挙動は大きく異なることが明らかとなった。

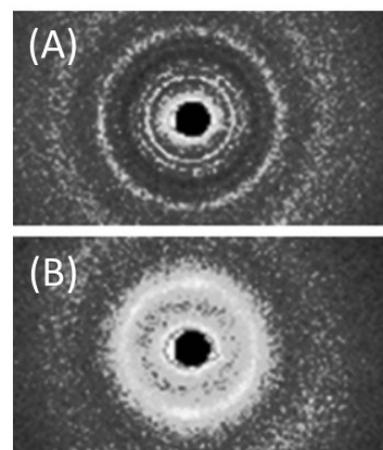


Figure 1. Small angle X-ray scattering patterns for liquid crystalline molecular aggregates consisting of EPC/Chol/SAm at 40°C in (A) acetate buffer of pH 4 (cubic) and (B) borate buffer of pH 10 (hexagonal).