

## アリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の リガンド結合に伴う構造変化

The structural changes induced by ligand binding of  
the chemosensory protein found in the sensillum of

*Camponotus japonicus*.

温 都日格<sup>1</sup>・李 興<sup>1</sup>・平井 光博<sup>2</sup>・北條 賢<sup>3</sup>・尾崎 まみこ<sup>3</sup>・岩佐 達郎<sup>1,4</sup>  
(<sup>1</sup>室蘭工大・工学専攻、<sup>2</sup>群馬大学・理工学府、<sup>3</sup>神戸大学理学研究科生物学専攻、<sup>4</sup>室蘭工大環境科学  
・防災研究センター)

【研究目的】 オオクロアリ (*Camponotus japonicus*) の感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」(chemosensory protein; CSP) は多くの昆虫種の化学感覚器に存在する親油性物質結合タンパク質の一種類であり、化学分子を受容体まで輸送していると考えられている。CjapCSPs は水溶性低分子蛋白質で、4 個のシステイン残基を一定の位置に持ち、4-5 本の  $\alpha$  ヘリックスで構成されている。疎水性の炭化水素と結合でき、親水的環境に炭化水素を溶かし込むことができる。オオクロアリで網羅的発現解析の結果 12 種類の CjapCSPs が見出された。最初に感覚子で見つかった CjapCSP1 はアリの巣仲間と敵との区別に関係するフェロモン分子を運ぶと考えられている。この作用機構を、CjapCSP1 のリガンド結合に伴う構造変化の視点から解明することを目的として研究を行っている。

【試料調製】 CjapCSP1 の遺伝子を発現ベクターに導入し、大腸菌 BL21(DE3)で大量発現、精製した。散乱測定前に、紫外吸収、蛍光測定 (Trp 残基近傍の情報)、CD 測定 (タンパク質の二次構造情報) を行った。

【散乱測定・結果】 SAXS、WAXS 測定には BL10C を利用した。カメラ長と波長を変えて測定を行った (1.35 Å, 28.9 cm ; 1.7Å, 203.7 cm)。溶媒の pH を変化させ、リガンドとの結合・非結合状態での構造変化を検討した。また、研究対象である CjapCSP1 の立体構造は決定されていないため、フォールド推定ソフト Phyre2 を使用し、溶液散乱シュミレーションソフト CRYSOLE により実験散乱データとの比較を行った。

## 胆汁酸混合ミセルの形態変化におけるコレステロールの影響 Effect of cholesterol on morphologic change in bile salt based mixed micelles

相澤秀樹<sup>1</sup>、小竹(奈良)英一<sup>2</sup>、市川創作<sup>3</sup>

1 摂南大薬、2 農研機構食品研究部門、3 筑波大生環系

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、胆汁酸によって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明らかにし、胆汁酸混合ミセルの組成、構造、腸への脂溶性有効成分の吸収性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。

我々は、緑黄色野菜に多く含まれる $\beta$ -カロテンは、脂溶性の食品機能成分であり、ヒト腸管モデルである Caco-2 細胞を用いて $\beta$ -カロテンの腸への吸収性とそのミセル構造を明らかにした。混合ミセルは胆汁酸、モノオレイン、オレイン酸を一定の割合で混合し、さらに 1-パルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン(MPPC)、あるいは 1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)のどちらかを異なった割合で加えて調製した。このような混合ミセルでは、MPPC あるいは POPC の割合により $\beta$ -カロテンの Caco-2 細胞への取り込み量が異なっており、また MPPC の割合により球形ミセルから楕円体ミセルへ変化していき、POPC の割合により球形ミセルから楕円体ミセル、そして円柱ミセルへと変化していったことを明らかにした<sup>[1-2]</sup>。本研究では、本来の胆汁酸混合ミセルの成分の一つであるコレステロールを、これら組成の異なる混合ミセルに添加し、フォトンファクトリー BL-6A に設置されている小角 X 線装置を用いて測定し散乱曲線を得た。その散乱曲線に幾何学構造モデルに基づく理論散乱曲線をあわせることで、これら組成の異なる混合ミセルの大きさと形状を求めた。その結果、コレステロールの有無にかかわらず、混合ミセル中の MPPC の割合により球形ミセルから楕円体ミセルへ変化していき、POPC の割合により球形ミセルから楕円体ミセル、そして円柱ミセルへと変化していった。コレステロールは、ミセルの変化過程には影響を与えなかったが、ミセルの大きさに若干の影響を与えた。

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

[2] H. Aizawa, S. Ichikawa, A. Nagao, *Photon Factory Activity Report 2013* #31(2014) B

## 糖によるタンパク質安定化作用の構造学的研究

### Structural study of the stabilization of protein by sugars

味戸聡志<sup>1</sup>, 平井光博<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 群馬大・院理工

#### 【研究の背景と目的】

極限環境で活動可能な生物は, 外部から熱や低温, 乾燥等の強いストレスを受けると, 抗ストレス物質を生産し, 細胞内に含蓄することが知られている. 抗ストレス物質には, 糖を始めとした osmolyte やストレスタンパク質がある. 熱ショックタンパク質に代表されるストレスタンパク質の作用機構は明らかにされつつあるが, osmolyte が生体分子に作用する機構は未だに明らかではない.

以上を踏まえ, 放射光 X 線溶液小角広角散乱法(SR-SWAXS)を用いて, タンパク質に対する osmolyte(主として糖)の安定化作用を構造学的に検討した. 様々なストレスに対して糖が生産されることを考慮して, 糖濃度依存性だけでなく, pH, 変性剤濃度, 温度等, 様々な条件で実験を行った.

#### 【試料】

測定試料にはモデルタンパク質としてウマ Myoglobin(1WLA)を用いた. osmolyte には特異的な生体保護作用を有するとされる Trehalose を主とし, 比較対象として Sucrose や Glucose, Glycerol も用いた.

#### 【実験方法】

高エネルギー加速器研究機構 PF の BL10-C と, 高輝度光科学研究センター Spring-8 の BL40B2 を用いて SR-SWAXS を行った. Myoglobin 濃度は 1~2 wt%, 糖濃度は 2.5~30 wt% とした. 緩衝剤として中性条件には HEPES と塩化ナトリウムを, 酸性条件にはクエン酸ナトリウムを用いた. 変性剤としては GdnHCl を最大で 2.0 M 使用した. 温度変化は 25°C から 85°C への昇温, 25°C から -20°C への降温を行った. 解析法として, 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, 階層構造性領域別解析を行った.

#### 【実験結果】

糖の添加によって, 熱, 低温, 酸性条件, 変性剤による Myoglobin 構造の変化が抑制されることが確認された. しかし, 一部の条件では糖によって構造変化が促進された. 総じて, Trehalose が突出した安定化作用を及ぼすことは確認されなかったが, GdnHCl による変性実験では, Sucrose に比べて大きな安定化作用を示した. また, CRY SOL との比較により, タンパク質の水和シェルから糖分子が排除されることが示唆された. これは熱力学シミュレーションや MD シミュレーションによって示されている結果と符合するものであった.

## ピロリ菌 CagA EPIYA セグメントと複合体を形成した SHP2 の SAXS 解析

### SAXS analysis of SHP2 in complex with the EPIYA segment of *Helicobacter pylori* CagA

鈴木喜大<sup>1</sup>、林剛瑠<sup>2</sup>、千田美紀<sup>1</sup>、長瀬里沙<sup>1</sup>、畠山昌則<sup>2</sup>、千田俊哉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>高エネ機構・物構研、<sup>2</sup>東大・院医

ピロリ菌が産生する CagA は胃潰瘍や胃がんなど胃粘膜疾患発症に関与することが知られている。CagA はピロリ菌の IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞内に移行し、様々な細胞内標的分子と複合体を形成する。その結果、脱制御された細胞内シグナルが胃がんなどの疾病を引き起こす。CagA は分子量約 130 kDa で N 末端部分の構造領域と C 末端部分の天然変性領域で構成されている。この天然変性領域に細胞内標的分子との相互作用部位が集まっており、SH2ドメインと相互作用する EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) 配列や PAR1b のキナーゼドメインと相互作用する CM モチーフが存在する。CagA の代表的な標的分子であるチロシンホスファターゼ SHP2 はがんタンパク質として知られ、自身の SH2 ドメインがホスファターゼドメインを覆う自己活性阻害機構を有する。細胞内に侵入した CagA は、EPIYA 配列内のチロシン残基の Src ファミリーキナーゼによるリン酸化を受け、SHP2 の SH2 ドメインに結合する。これにより SHP2 の高次構造が変化し、ホスファターゼドメインが解放された活性型になると考えられている。SHP2 の脱制御は、異常な細胞増殖シグナルを誘導し発がんに関与することが知られる。本研究で我々は、CagA による SHP2 脱制御の分子基盤を理解するため、SHP2 とリン酸化 EPIYA モチーフ含有ペプチドとの複合体の溶液構造を X 線小角散乱法で解析した。さらに、得られた複合体の SAXS データと既知の不活性型 SHP2 の結晶構造と組み合わせて活性化型の溶液構造を解析し、リン酸化 EPIYA モチーフの SH2 ドメインへの結合による SHP2 の構造変化を明らかにした。

# 高濃度コレステロールは薬剤クロルゾキサゾンの リン脂質膜への結合を阻害する

## High concentration cholesterol's inhibition of the binding of chlorzoxazone to phospholipid bilayers

山田安由美<sup>1</sup>、清水伸隆<sup>2</sup>、引間孝明<sup>3</sup>、高田昌樹<sup>3,4</sup>、小林俊秀<sup>5</sup>、高橋 浩<sup>1,3,5</sup>

1 群馬大、2 KEK-PF、3 理研播磨、4 東北大、5 理研和光

筋弛緩作用を持つ薬剤クロルゾキサゾン(CZX)を、はじめとして多くの薬剤は、小胞体膜に存在する膜タンパク質シトクロム P450(CYP)で酸化され親水性が高まることで、尿とともに体外に排出されるようになる。

この CYP による薬剤代謝プロセスに関して、分子動力的研究 [1] なされている。その研究では、部分構造しか解かれていないが、CYP の結晶構造解析の原子座標データを基礎にし、リン脂質膜に CYP を埋め込み、水相にイブプロフェン等の薬剤を入れた系での各分子の動きをシミュレーションしている。結論として、次の描像が提案された。(1)薬剤は、まずリン脂質膜に結合し膜の疎水性内部に入り込み、その後、(2)リン脂質膜の疎水性内部に口が開いている CYP のチャンネルを介して、薬剤は CYP の疎水性領域の内側にある触媒部位へ運ばれ、(3)酸化作用を受けた後、先とは別のチャンネルを通して薬剤は細胞質側に放出される。

この研究を受けて、我々は、CZX のリン脂質膜へ結合および侵入が、コレステロール(Chol)を添加することで、どう変化するかを実験的に調べることを行った。その動機は主に2つあって、上記の研究ではコレステロールの存在が無視されていることと、CYP が主に存在する小胞体膜は、他の細胞内小器官と比較すると、Chol 含有量が少ないという特徴を持つことに興味があるからである。実験手法としては、熱測定、分光法、および、放射光 X 線回折を使用した。リン脂質としては、代表的なホスファイジルコリン(PC)を使用した。

結果、分子動力学計算が示唆したように、CZX は確かに PC 膜の内部に侵入した。しかし、Chol 濃度の増減に応じて、その結合・侵入の度合いは 2 相的に変化した。小胞体膜程度の 10mol%の低濃度で、リン脂質膜の CZX の取り込み量は最大に達し、その後は、Chol 量が増加するにしたがって減少した。形質膜程度の 30-50mol%の高濃度では、Chol は CZX のリン脂質膜への結合を阻害した。この結果から、Chol 濃度に応じて、CZX の生体膜への侵入が制御され、それが効率良く CYP が存在する小胞体へ薬剤を導くことに役立つとの仮説を提唱した [2]。

[1] K. Berka *et al.*, *J. Phys. Chem. A*, **115** (2011)11248–11255.

[2] A. Yamada *et al.*, *Biochemistry*, **55** (2016) 3888–3898.

**低強度の遠心性収縮は反復しても  
サルコメア構造に分子レベルでほとんど影響を与えない  
Repetitive low-intensity eccentric contraction has  
little effect on sarcomere structure  
at a molecular level.**

平野和宏<sup>1</sup>、中原直哉<sup>1</sup>、山内秀樹<sup>1</sup>、平塚理恵<sup>2</sup>、山口真紀<sup>1</sup>、竹森重<sup>1</sup>

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学生物研

**【目的】**遠心性収縮(ECC)は、収縮する骨格筋が外力に負けて伸長される収縮様式である。興味深いことに ECC は高強度で筋を損傷し、低～中強度で筋を強化・肥大させるといふ。我々は X 線回折法を用い、中等度強度(75Hz の電気刺激で収縮を誘発)の ECC がミオシン層線強度を顕著に低下させ、筋の結晶構造(サルコメア)の分子レベルでの明らかな劣化を起こすことを報告した。本研究では、低強度 ECC が筋の結晶構造に与える効果を評価した。

**【方法】**麻酔下にて 8 週齢の F344 雄ラットに血流供給下で神経を介して足底筋を電気刺激した。300 ミリ秒の持続的収縮を、以下の条件で 3 秒に 1 回の間隔で 10 回誘発した; 100Hz 等尺性収縮(ISO)、50Hz ECC、75Hz ECC。また、総収縮負荷の影響を評価するために、50Hz ECC を 30 回連続で誘発(50Hz ECC × 30)する条件を設けた。

**【結果】**力-時間積分( $N \cdot s/cm^2$ )として評価された全体の収縮負荷は、50Hz ECC < ISO = 75Hz ECC < 50Hz ECC × 30 であった。収縮負荷の 1 時間後に評価された等尺性最大張力は、ISO = 50Hz ECC < 50Hz ECC × 30 < 75Hz ECC であった。ミオシン層線強度は、75Hz ECC では殆ど観察されなかったが、ISO、50Hz ECC、および 50Hz ECC × 30 では収縮負荷を与えない対照群と同等の強度であった。

**【結論】**ミオシン層線によって表されるサルコメアの劣化は、発生する力の大きさに大きく依存し、総収縮負荷にはよらない。したがって、リハビリテーションにおいては、反復性の低強度運動をさせることが、サルコメアを劣化させることなく筋力を増強する上で適していることが示唆された。

**【COI】**申告すべきものなし。

## 抗貧血薬候補鉄配位ウシラクトフェリンの pH 依存による会合機構

### pH-dependent assembly mechanism of multiferric ion-bovine lactoferrin: A new antianemic material

松村義隆<sup>1</sup>、山口智大<sup>1</sup>、清野翔平<sup>1</sup>、川上浩<sup>2</sup>、田之倉優<sup>3</sup>、小島正樹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京薬科大学、<sup>2</sup>共立女子大学、<sup>3</sup>東京大学

Previously, we prepared soluble bovine lactoferrin (bLf) in the presence of 70 mol ferric ions (70FeLf). In the present study, we have measured the 70FeLf at pH 1-6 by small angle X-ray scattering (SAXS). The results indicated that 70FeLf takes a globular shape. Besides, it is indicated that 70FeLf has many bLf monomers at investigated pH range. The number of bLf monomer in 70FeLf showed pH-dependent. These results suggest that following: (1) Multiferric-bound-bLf may maintain physicochemically 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  $pK_a$  of bicarbonate ion. Multiferric-bound-bLf may be useful for antianemic materials.

## Breast tumor kinase 活性化機構の解明 Insight into the activation mechanism of Brk

松尾友樹<sup>1</sup>, 神田諒<sup>1</sup>, 西條慎也<sup>2</sup>, 清水伸隆<sup>2</sup>, 前仲勝実<sup>1</sup>, 尾瀬農之<sup>1</sup>  
1 北大院薬, 2 KEK-物構研

Brk (Breast tumor kinase) は細胞内に存在する非受容体型チロシンキナーゼである。Brk は多くの乳がん細胞や卵巣がん細胞に発現が見られ、浸潤性乳管がん細胞においては 86%の割合で過剰発現しているという報告もある。ヒト Brk を人為的に導入したトランスジェニックマウス乳がんモデルでは、Brk の効果により STAT3 経路の活性化がみられる。対照的に正常な細胞にはほとんど、あるいは全く発現していないことから、乳がん治療薬の標的分子としての可能性も指摘されてきた。Brk は Src ファミリーに類似したドメイン構造をもっており、N 末端から SH3, SH2, kinaseドメインが並ぶが、Src とは異なり N 末端側にパルミトイル化修飾配列をもたない。一方、signal-transducing adaptor protein (STAP) -2 は多機能のアダプタータンパク質であり、その機能の一つは Brk の活性化であることが発見された。ヒト乳がん培養細胞において STAP-2 と Brk が共存すると、STAT3 や STAT5b は活性化され、細胞増殖の亢進との相関が見られる。したがって STAP-2 と Brk との間の相互作用はがんの発生等に直接関与することが予測され、分子レベルでの緻密な解析が必要である。

Brk の活性化機構を理解するため、BL-10C を使用して溶液散乱測定をおこなった。用意した試料は、非リン酸化状態での Brk およびリン酸化 Brk、また、リン酸化部位を制限するための変異体であり、ゲル濾過クロマトグラフィの下流に SAXS 測定用の flow cell を配置した SEC-SAXS での測定を行った。Src と同様にリン酸化によって open/close 構造が変化しているのではないかという予測に反し、全てのデータからは、慣性半径、分子内最大長、 $P(r)$ 関数の形状には大きな差はみられず、今回のリン酸化部位におけるリン酸化の有無は、全体のコンフォメーション変化に大きな影響を与えていないと考えられた。

## BioSAXS における連続データ解析用ソフトウェアの開発 The Software Development for Serial BioSAXS data analysis

米澤健人<sup>1</sup>、高橋正剛<sup>1</sup>、谷田部景子<sup>1</sup>、西條慎也<sup>1</sup>、清水伸隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KEK-放射光

X線小角散乱(SAXS)はナノからサブミクロンスケールの構造情報得るための有力な測定手法である。SAXS は幅広い分野に用いられており、特に生体高分子の溶液試料を測定する BioSAXS は、蛋白質(複合体)の溶液中での性状や構造を解析するために活用されている。フォトンファクトリーでは SAXS データの測定・解析を初心者でも容易に、また有効に行えるようにソフトウェア SAngler を開発しリリースしている[1]。SAngler は複数の 2 次元画像データを 1 次元データへと変換し、データファイルに対してバックグラウンドを一度に差し引くことができる。さらに、BioSAXS データの解析では必須の Guinier 解析に関しては、読み込んだ多数のデータに対して一度に自動で実行することも可能である。自動 Guinier 解析のアルゴリズムは独自に開発したものだけでなく、プログラムパッケージ ATSAS[2]をインストールしていれば同様のプログラム autorg をリンクして実行することも可能である。

ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた SAXS 測定(SEC-SAXS)では、一度に数百枚のデータを連続的に測定するため、SAngler を有効に活用することができる。しかしながら、SEC-SAXS での連続データは、基本的に様々な試料濃度における散乱強度データとなっているため、各散乱強度に粒子間干渉効果が観測される場合は濃度ゼロに外挿した散乱強度データを求める必要がある。さらに、SEC-SAXS の溶液試料はカラムを通ることによって希釈されるため、測定データの S/N が減少する問題もある。そこで我々は、SEC-SAXS の連続データからゼロ濃度外挿データを高精度に導出するために、ユーザーフレンドリーなインターフェースを持つ新たな連続データ自動解析ソフトウェアを開発した。ポスターセッションでは、本ソフトウェアの機能や評価方法、出力される結果の精度について発表する。

[1] N. Shimizu *et al.* *AIP Conf. Proc.* **1741**, 050017 (2016).

[2] M. V. Petoukhov *et al.* *J. Appl. Cryst.* **45**, 342-350 (2012).

## 超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来アルコール脱水素 酵素の熱活性化に伴う構造変化の解明

### Elucidation of the structural changes in heat activation of alcohol dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*

郷田秀一郎 梶山晃成 永野結花 内田拓郎 海野英昭 畠山智充  
長崎大学大学院・工学研究科

超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来アルコール脱水素(StADH)は、大腸菌を宿主に用いて生産されると活性が低い状態で得られ、加熱によって活性が上昇する。StADHの酵素活性測定を、基質に ethanol、補酵素に NAD を用いて行ったところ、比活性は加熱することによって 0.28 U/mg から 1.31 U/mg へと約 5 倍上昇した。また、ミカエリス定数( $K_m$ )を算出すると、基質に対する  $K_m$  値に大きな違いは見られなかったものの、補酵素に対する  $K_m$  値は加熱によって減少が見られ、補酵素と酵素の親和性が高くなると考えられた。大腸菌で生産された低活性 StADH を 90°C で加熱し、構造及び酵素活性の経時変化を測定した。構造の変化は X 線小角散乱測定で行い、その結果、分子の回転半径であるギニエ半径は 15 秒加熱することによって活性型ほどのサイズに変化した。酵素活性は 45 秒ほど加熱することによって最大値を示した。このことから StADH の熱活性化は、分子全体の構造が変化した後で、微細な構造変化が起こることによって完全な酵素活性を示すと考えられた。非加熱状態の StADH の原子レベルでの構造解析を目指して結晶化を行い、いくつかの条件で結晶化に成功し、構造を解析した。その結果、酵素活性には亜鉛が必要であり、他の菌由来ではタンパク質 1 分子あたり 2 分子の亜鉛が見られているが、不活性型酵素ではそのうちの 하나가マグネシウムとなっていた。マグネシウムは補酵素の近傍に位置しており、このことが酵素活性に影響を与えたと考えられた。

## ポリエチレングリコール存在下におけるタンパク質安定化作用の構造学的研究

### Structural study of protein stabilizing action in the presence of polyethylene glycol

前澤侑吾<sup>1</sup>, 平井光博<sup>2</sup>

1 群馬大・理工

2 群馬大・院理工

#### [実験の背景と目的]

生体高分子は細胞内で他の様々な生体高分子が存在する中で、それぞれの機能を失うことなく安定に存在している。こうした生体高分子の細胞内の総濃度は 20% から 30% 程度に及んでいる。このような混雑した媒体は各生体高分子間の相互作用や平衡に大きな影響を及ぼすことが既に示されている。しかし、多くの生体高分子の研究は細胞外かつ、非混雑下における知見にとどまっており、混雑下における知見は非混雑下に比べ少ない。

そこで本研究では、X 線溶液散乱を用い、擬似的な細胞内環境を模倣した中のタンパク質の安定性について、タンパク質の階層構造を反映した散乱パターンを測定、解析を行い評価した。今回の実験では crowding 環境を再現するために水に可溶で、重合度によって物理学的な性質が変化するポリエチレングリコール (PEG) を用いた。生体内に多く存在する myoglobin をモデルとして、PEG の分子量、濃度、温度に関してタンパク質の安定性についてどのような効果があるのかを検討した。

#### [実験方法]

測定は、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 分光器を用いて X 線散乱実験を行った。測定試料として、0-30% の PEG 溶液内に 2% myoglobin を含ませた溶液を用いた。使用した PEG の分子量は 200, 400, 600, 1000 の 4 種類を用いた。

#### [実験結果]

PEG は myoglobin の安定化作用に対して影響を及ぼしていることが示唆された。昇温を行った場合、重合度が低いものは熱に対して不安定化させ、全体構造及び、二次構造の転移 ( $\alpha$ - $\beta$  転移) の転移温度が低くなり、高い重合度のものは転移が抑制されることが示唆された。領域別解析を行いその構造転移の協同性に関して議論を行う。

## 高速重イオン照射による SiO<sub>2</sub> ガラス中欠陥構造の SAXS 評価

### SAXS Observations of Defect Structure in SiO<sub>2</sub> glass by Swift Heavy Ions

○吉岡 聰<sup>1</sup>, 鶴田幸之介<sup>1</sup>, 安田和弘<sup>1</sup>, 松村 晶<sup>1</sup>, 石川法人<sup>2</sup>  
1 九州大学 工, 2 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. ケイ酸(SiO<sub>2</sub>)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<sub>2</sub> ガラス基板に対して高速重イオンを照射し, イオントラック構造を小角 X 線散乱(SAXS)法により調べた.

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試料を配置して実験した. イオン種およびエネルギーは 200 MeV Xe, 100 MeV Kr イオンとした. SAXS 測定はカメラ長 2 m, 波長 1.5 Å に設定し, 2次元検出器(PILATUS 300K-W)で散乱パターンを観察した.

図 1 に 200 MeV Xe イオンを  $3 \times 10^{11}$  まで照射した試料の 2D イメージを示す. イオン照射の方向と平行に X 線を入射した場合の散乱像が(a)であり, 試料基板面を X 線ビーム方向に対して 1, 2, 4, 6, 10°傾斜したそれぞれの場合の散乱像を(b)~(f)に示している. (a)では, 同心円状の散乱パターンが得られ, イオントラック径のサイズを反映している. 一方, (b)~(f)では, イオントラックの長さとの径のアスペクト比が大きいことに起因して, 細いストリークが出現し, 傾斜角の増加に伴ってその変化は顕著である.

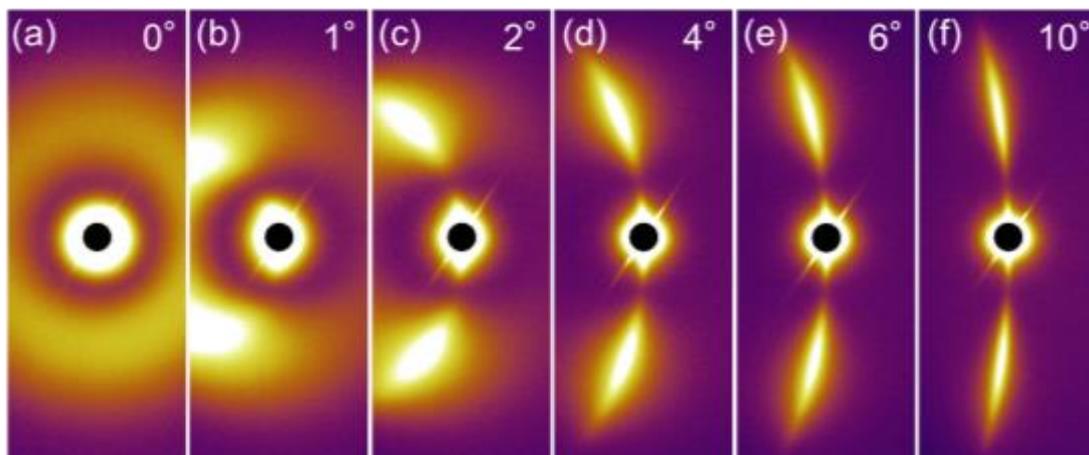


図 1. イオン照射した SiO<sub>2</sub> 試料を傾斜した場合の 2次元検出器上の小角散乱パターン。

# 脂質の種類を変えたタンパク質内包リポソームの構造学的研究

## Structural study of liposomes encapsulating proteins depending on lipid species

高橋孝輔<sup>1</sup>, 平井光博<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 群馬大院・理工

### [研究の背景と目的]

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ナノスケールレベルでの構造学的知見は乏しい。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、リン脂質の種類を変える事によって、リポソーム構造の熱安定性を検討した。

### [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), リン脂質(PC)をモル分率 GM / Chol / PC = 0.1/0.1/1 で混合し、リン脂質(PC)には DPPC, DMPC, POPC, DOPE の 4 種類を用いた。混合後は、超音波処理、凍結融解、押し出し形成器によって約 100nm の LUV を調製した。タンパク質にはミオグロビンを用いた。

### [実験結果]

LUV 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、タンパク質を内包させたそれぞれのリン脂質からなる LUV はいずれも、タンパク質を内包させない LUV よりも熱安定性の向上を示唆する結果が得られた。また、距離分布関数を算出することによって、DMPC, POPC, DOPE それぞれのタンパク質内包 LUV は内包させない LUV よりも昇温に伴う平均半径, 最大長の増加が抑制された。さらに、DMPC および DPPC からなる LUV について、タンパク質を内包させると、昇温に伴うアルキル鎖のゆらぎが抑制されるという結果が得られた。

### [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.

**リン脂質/コレステロール/水系で得られる  
巨大分子集合体の相構造に及ぼす  
長鎖アルキルアミンおよび長鎖脂肪酸添加の影響**  
Effect of addition of long-chain alkylamines and fatty acids on  
the phase structure of giant lipid assemblies formed in  
phospholipid/cholesterol/water systems

黒岩崇<sup>1</sup>、家才子翔平<sup>1</sup>、端山琢人<sup>1</sup>、市川創作<sup>2</sup>、金澤昭彦<sup>1</sup>

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をはじめとする生体脂質は、水溶液中で様々な分子集合体を形成することが知られている。本研究グループでは、リン脂質とコレステロールを主成分とする脂質混合物が水溶液中で大きさが数 mm に達する巨大な分子集合体を形成することを見出している。これまでの研究で、温度、pH、脂質混合物の組成などの様々な条件により、巨大分子集合体の形状が著しく変化することがわかっている。この形状の変化は、分子集合体内部の脂質分子の配向状態の変化を反映していると考えられる。本研究では、少量の長鎖アルキルアミンおよび脂肪酸類の添加が、この巨大分子集合体の相構造にどのような影響を及ぼすかについて、小角/広角 X 線散乱測定 (SAXS/WAXS)により検討した。

卵黄由来ホスファチジルコリン(EPC)、コレステロール(Chol)に種々の長鎖アルキルアミンまたは脂肪酸を加えた脂質混合物を *n*-ヘキサンに溶解し、脂質溶液を作製した。この脂質溶液を NaCl 水溶液または pH 4~11 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球状または膜状の巨大分子集合体を得た。

EPC、Chol およびステアリルアミンからなる脂質混合物を用いた場合、弱酸性~中性付近の pH では球状、アルカリ性 (pH>10) では膜状の巨大分子集合体を得られた。これに対し、EPC、Chol およびステアリン酸からなる脂質混合物を用いた場合、弱酸性~中性付近の pH で膜状、弱アルカリ性~アルカリ性の pH で球状の巨大分子集合体を得られた。SAXS 測定の結果、ステアリルアミンおよびステアリン酸のいずれを添加した場合においても、球状の分子集合体は温度に依存してそれぞれ cubic-lamellar 相転移を示し、膜状の分子集合体は hexagonal-lamellar 相転移を示すことがわかった。これらの結果は、pHにより添加成分の親水基サイズが変化することで、脂質分子の充填状態に影響を及ぼしたものと考察した。