

VUV-CD を用いたリン酸化 XRCC4 の構造変化解析 structural analysis of phosphorylated XRCC4 with VUV-CD

西久保開^{1,2}、長谷川真保^{2,3}、泉雄大⁴、藤井健太郎²、
松尾光一⁴、松本義久⁵、横谷明德^{2,1}

- 1)茨城大学大学院理工学研究科、2)量子科学技術研究開発機構(QST)
3)茨城大学理学部、4)広島大学放射光科学研究センター
5)東京工業大学科学技術創成研究院

アミノ酸残基のリン酸化などエピジェネティックな化学修飾によって、生体内のタンパク質はその活性が制御されていることが最近明らかになりつつある。DNA二本鎖切断(DSB)の非相同末端結合(NHEJ)修復におけるXRCC4もまた、DNA-PKによりリン酸化を受けることで、DNAリガーゼのLigIVの機能をサポートし、DNA修復を促進させる役割を持つと考えられている。リン酸化によりアミノ酸残基の電荷が変わることで、XRCC4は活性化構造へと変化すると推測される。私たちはこの仮説を実証するために、リン酸化を受けたXRCC4の構造と活性の変化の相関を明らかにすることを目指している。本研究では、円二色性(CD)分光により水溶液中における完全長のXRCC4の二次構造構成比を解析した。解析結果から、C末端側はb-strand構造をほとんど持たず、turn構造を多く保持していることが分かった。C末端側のセリンのうちの一つだけを負電荷をもつアスパラギン酸で置換し、疑似的なリン酸化状態にした場合には、strand構造の総量が減少することを確認した。本来C末端にはほとんど含まれていないb-strand構造が減少したため、C末端側のアスパラギン酸置換により、活性中心を持つN末端を含めたタンパク質全体の構造が変化したことが推測された。このことから、XRCC4は、C末端側のリン酸化により、活性中心の構造を変化させ、活性効率を変化させていることが示唆された。

角層細胞間脂質の微細構造と水素結合の関連 Relationship between microstructure of stratum corneum intercellular lipids and hydrogen bonding

早坂和磨¹、表萌々¹、新井裕子¹、清水伸隆²、高橋浩³、小幡誉子¹

1 星薬科大、2 KEK-PF、3 群馬大

【目的】皮膚は生体と外界の境界に位置し、脱水や異物侵入から生体を保護する働きをもつ。この防御機構は、最外層に位置する角層の細胞間脂質が形成するラメラ構造を中心として機能する。これまで多くの研究から、皮膚のバリア機能と角層細胞間脂質の規則的な配列の関連が推察されてきた。しかし、角層を使用した実験では、測定で得られるデータが不明瞭な場合も少なくない。そこで、代表的な脂質を組み合わせて脂質モデルを調製し、角層細胞間脂質の挙動を詳細に検討した。

【方法】セラミド[NDS](CER[NDS])、セラミド[NP](CER[NP])、コレステロール、パルミチン酸をクロロホルム・メタノール混液に溶解し、有機溶媒を留去して脂質薄膜を調製した。これに精製水を加え、超音波照射をした後、凍結乾燥を行った。得られた脂質モデルを用いて放射光 X 線回折測定、顕微赤外分光測定、示差走査熱量測定を行った。

【結果】CER[NP]は CER[NDS]と比べ、スフィンゴイド塩基に結合する水酸基が一つ多い構造をもつ。CER[NDS]、コレステロール、パルミチン酸の等モルの脂質モデルでは、50°C付近で直方晶が液晶化する相転移が認められた。一方、CER[NP]を用いたモデルでは、同様の相転移が 55°C付近で生じた。これより、CER[NP]モデルでは、より安定した直方晶を形成する可能性が示唆された。また、小角領域では、CER[NP]モデルにおいて 50°C付近に特徴的なピークが認められた。この温度で形成される構造は、皮膚表面付近温度で形成されているラメラ構造から、融点の低いパルミチン酸が脱離した構造と推察した。これに対して、2 種類のセラミドを等量混合した共晶モデルでは、ヒト角層の熱挙動と類似した挙動が得られた。この結果から、スフィンゴイド塩基水酸基は、水素結合を介して皮膚のバリア機能と密接な関係がある可能性が示唆された。また、CER[NP]および CER[NDS]を配合した共晶モデルでは、実際の角層細胞間脂質の熱特性と類似した不明瞭な熱挙動が得られたことから、複雑な微細構造により細胞間脂質が生体を保護する機構が示された。

S100A3 蛋白質 R51Q 変異体の $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合による 構造変化

Structural change duo to $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -binding of S100A3 protein R51Q mutant

井手賢司^{1,2}、米澤健人³、木澤謙司⁴、北西健一^{1,2}、清水伸隆³、海野昌喜^{1,2}

1 茨城大院理工、2 茨城大 iFRC、3 KEK 物構研、4 (株) 花王

【緒言】 S100A3 は毛髪キューティクル細胞に特異的に存在し、共発現している脱イミノ化酵素 peptidylarginine deiminase のⅢ型アイソザイム PAD3 により、51 番目のアルギニン (Arg) 残基が選択的にシトルリン化される。このシトルリン化に伴い、EF ハンドモチーフを有する S100A3 の Ca^{2+} と Zn^{2+} への結合親和性が協同的に上昇し、金属イオン依存的に二量体から四量体に構造変化する [1]。S100A3 のシトルリン化と毛髪の耐性には相関があり、シトルリン化に伴う構造変化が、毛髪の成熟化過程に重要な役割を担っていることが示唆されている [2]。この特異な構造変換機構を構造生物学的手法により解明することを考えたが、シトルリン化した S100A3 は調製が困難であった。そこで、本研究グループは Arg51 をグルタミンに置換させた R51Q 変異体をシトルリン化 S100A3 モデルとして作製し、その構造と物性を解析している。溶液中の apo 体と holo 体の構造変化を、動的光散乱 (DLS)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、X 線小角散乱 (SAXS) により分析した。

【結果と考察】 DLS の結果から、apo 体では約 40 Å の粒径であり、 Ca^{2+} と Zn^{2+} の片方だけの存在下では、粒径に変化はなかった。それに対し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ の存在下では約 60 Å に粒径が増していることを確認した。SEC 分析では、 Ca^{2+} のみが存在している条件よりも、 Ca^{2+} と Zn^{2+} の両方が存在している条件の方が、四量体と推定される成分が多く溶出してきた (図 1)。これらの結果より、R51Q の効率的な分子集合には Ca^{2+} と Zn^{2+} の両方が必要であることがわかった。SEC 分析の結果から、holo 体の試料が四量体と二量体が混ざった状態であることが示唆されたため、単一成分として解析を行える SEC-SAXS を行なった。本シンポジウムでは現在解析中の結果を発表する。

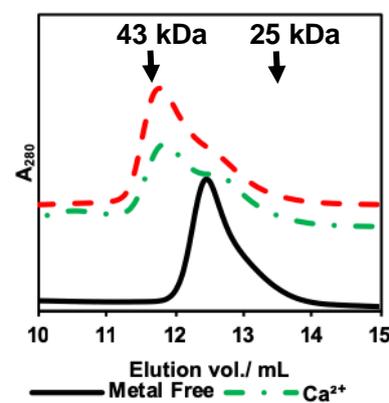


図 1. SEC 分析の結果

【参考文献】

[1] K. Kizawa, et al, *J. Biol. Chem.*, **283** (2008) 5004-5013.

[2] Takahashi, T., et al., *J Cosmet. Dermatol.*, **15** (2015), 211-218.

トレハロースによるタンパク質水和殻保護作用および アミロイド様凝集からの回復作用

Protective action of protein hydration shell by trehalose and recovery action from amyloid-like aggregation

味戸聡志¹、平井光博¹

1 群馬大・院理工

糖は生物のエネルギー源としてだけでなく、様々な環境ストレス(高温、低温、乾燥等)に対する生体保護物質として自然界で広く利用されている。特に非還元二糖のトレハロースは、昆虫や微生物における anhydrobiosis (乾燥による完全無代謝状態からの再生現象)に関与することから盛んに研究が行われ、タンパク質の変性凝集を抑制することが明らかとされた。この糖によるタンパク質安定化作用についてはその機構に未だ不明瞭な点が多く、さらなる研究が必要とされている。また、トレハロースは生体試料の保存剤として応用されており、これらの研究は新たな保存剤の開発に寄与するものと考えられる。

我々は糖によるタンパク質水和殻への作用を検討するため、糖溶液中におけるミオグロビンの X 線広角散乱(WAXS)と中性子小角散乱(SANS)を測定し、実験値と理論散乱曲線との定量的な比較から、糖分子はタンパク質表面の水和領域から排除される傾向があり、その結果として選択的水和が生じ水和殻が保護されることを構造学的に明らかとした^[1,2]。単糖(グルコース、フルクトース)では 20% w/w より高濃度になると水和殻への部分的な浸透が生じたが、二糖(トレハロース、スクロース)では 30% w/w まで選択的排除が保たれ、二糖の持つ高い安定化作用の一因であると考えられる。

また、WAXS を用いて pH 4.0~3.0 の酸変性条件下でのトレハロースによるタンパク質保護作用を検討した。ミオグロビンは変性により α -ヘリックスから β -シートへの構造転移が部分的に生じ、 β -シートを介したスタッキングによりアミロイド様の線維凝集を生じることが知られている。凝集体形成が十分に進行した pH 3.5 のミオグロビン溶液にトレハロース 30% w/w を添加し攪拌したところ、凝集体由来の小角の立ち上がりと cross- β 由来の高角のピークが消失した。本結果はトレハロースにより凝集体が解離し、ミオグロビンの変性構造が天然構造へ回復されたことを示す^[3]。現在、ミオグロビン回復作用の時間依存性と、ヒト A β -42 のアミロイド線維形成に対するトレハロースによる抑制作用について検討中であり、それらの結果も合わせて発表する予定である。

[1] S. Ajito, M. Hirai *et al.*, *Physica B*. **551**, 249–255 (2018).

[2] S. Ajito, H. Iwase, S. Takata, M. Hirai, *J. Phys. Chem. B*. **122**, 8685–8697 (2018).

[3] M. Hirai, S. Ajito *et al.*, *J. Phys. Chem. B*. **122**, 11962–11968 (2018).

DNA 修復タンパク質のリン酸化構造の SAXS 解析 SAXS analysis of a phosphorylated DNA repair protein

長谷川真保^{1,2}、西久保開^{3,2}、松尾龍人²、藤原悟²、横谷明德^{2,3}

1 茨城大学理、2 量研機構、3 茨城大学大学院理工

放射線照射により誘発されたゲノム DNA 上の二本鎖切断(DSB)の多くは、XRCC4 や LigIVなど様々な修復タンパク質が関与する非相同末端結合修復(NHEJ)で効率よく修復される。DNA-PK によってリン酸化を受け活性化したXRCC4 は切断端再結合反応の足場として XLF と複合体を形成し、これらがさらに多量体化したフィラメント構造を形成することで、不安定な DSB 末端をサポートするモデルが提唱されている[1]。このような複雑な DSB 修復装置(machinery)の熱力学的な自己組織化プロセス(ダイナミクス)を知ることは、DSB 修復メカニズムを理解する上で重要である。この高次構造形成には、タンパク質のリン酸化による構造変化が重要な役割を果たしていると推測される。そこで私たちは野生型及び特定のアミノ酸残基をアスパラギン酸置換することで疑似リン酸化したXRCC4 変異体に対してX線小角散乱(SAXS)を行った。その結果、XRCC4 は疑似リン酸化により何らかの構造変化を起こし、慣性半径や外形の長さが増加している可能性が示唆された。しかし、今回得られた散乱曲線はサンプル濃度が低く十分なS/Nが得られていないため、両者の定量的な比較はまだ難しい。また、サンプルの調整から測定までの間にタンパク質の会合状態が変化している可能性も考えられる。今後は、これらの課題を検証し再度 SAXS 測定を行う必要がある。

[1] Williams, G.J. et al. *DNA Repair* 17, 110–120 (2014).

放射光X線マイクロビーム細胞照射装置の 線量率向上の試み

Improvement in dose rate of synchrotron X-ray microbeam irradiation system for radiobiology

宇佐美 徳子, 大原 麻希, 小林 克己
KEK-IMSS-PF

放射線による細胞応答には, 細胞間コミュニケーションが重要な役割を果たしている. 細胞間コミュニケーションを担うエクソソームには, 内包物としてマイクロ RNA やシグナルペプチド等の機能性分子が存在しているが, 放射線応答に関する役割についてはほとんど明らかにされていない.

我々の開発した放射光X線マイクロビーム細胞照射装置は, 高精度のスリットによりビームサイズを最小 $5\mu\text{m}$ から簡単に変更でき, さらに細胞核程度の大きさのX線マスクにより中心部が遮蔽された「細胞質照射」ビームも作ることができる. これまでに細胞内の照射部位によって異なる細胞応答を示す知見を得ているが, 現在の装置の性能では, タンパク質発現の定量的な解析や, エクソソームの内容物解析等に必要な照射細胞数を得ることが難しく, メカニズム解明には至っていない.

この装置では, 放射光単色X線を試料の直下に置いた Si(311)結晶によって真上に跳ね上げているため, X線のエネルギーは 5.35keV に固定されており, 強度も犠牲になっている. そこで, 放射光のビーム方向を水平のまま利用することにより線量率の増加を図った. X線強度を測定したところ, 5.35keV において毎秒 200 R (1.7Gy/sec に相当)と, これまでより1桁高い線量率を得た. 細胞やビームの位置再現性を確認したところ, $1\mu\text{m}$ 程度のずれに収まっており, 通常の細胞照射実験には問題ないことがわかった.

がん細胞では細胞膜表面に PD-L1, CD47 といった免疫チェックポイントタンパク質を発現することにより免疫細胞の排除機能を阻害することが知られ, がんの悪性度に深く関わる. がん免疫療法の標的でもある PD-L1 は, DNA 損傷修復と共通のシグナル伝達機構によって制御されていることが最近明らかにされた. 現在, X線照射による免疫チェックポイントタンパク質の発現変化を調べており, 3Gy 程度の比較的低線量で発現が変化するタンパク質があることを確認した. 今回評価した水平ビームでマイクロビームを細胞あたり 3Gy 相当照射する場合, 1時間で約 2000 細胞が照射可能である. 今後はエクソソーム内包物であるシグナルペプチドの影響や, マイクロビーム照射による DNA 損傷応答シグナリングの制御による発現変化などを調べることを計画している.

謝辞: 本研究は JST, CREST, JPMJCR17H3 の支援を受けて実施しました.

Natural Killer 細胞を用いたX線 1 分子動態観察 X-ray Single Molecule Observations of Natural Killer Cell

張宰源^{1,2}、Y. Baek³、倉持昌弘^{1,2}、関口博史⁴、一柳光平⁵、池崎圭吾⁶、李仁志³、佐々木裕次^{1,2}

1 東大新領域、2 産総研－東大 OIL、3 CHA Biotech、4 JASRI、
5 KEK 物構研 6 東大理学系

近年、がん細胞を攻撃できる Natural Killer cell (NK 細胞)が発見され、その細胞を用いた免疫療法が精力的に研究されている。多くの免疫療法研究から、Interleukin-2 (IL-2) 投与によりNK細胞を活性化させる方法が有力視されている。Interleukin-15 (IL-15)もまた、NK細胞活性に寄与し、IL-2より高い機能をもつが、自己免疫疾患や多くの感染症を引き起こしてしまうことが報告されている。IL-2とIL-15はそれぞれ、IL-2受容体及IL-2受容体に結合し、セカンドメッセンジャー産出を誘起する。しかしながら、IL-2とIL-15は共通受容体を持つにも関わらず、異なる活性化プロセスを誘発するメカニズムについては不明な点が多い。これら共通分子によるIL-2/IL-2R、IL-15/IL-2Rを介したNK細胞活性化メカニズムを明らかにするため、膜内ドメインのシグナル伝達系を区別できる物性評価システムの発見が期待されるようになった。

2000年代から佐々木らは、X線をプローブとする Diffracted X-ray Tracking (DXT)という1分子計測法を開発し、様々な生体分子のダイナミクスを高精度かつ高時間分解能の実測・可視化して来た。DXTでは、水中の実測対象分子に修飾した金結晶($\phi 20 - 40$ nm)のX線回折を追跡する。DXTは、水中対象分子のブラウン運動に沿った金結晶の回折を広い角度範囲で追跡するため、高輝度の白色光(白色放射光)を利用する。一方、生きた生物内での測定となると測定途中のダメージを考慮しなければならない。最近、DXTのダメージ問題を軽減するため、Diffracted X-ray Blinking (DXB)が開発された。DXBでは、相対的に強度が弱いX線を発する実験室X線がプローブとして用いられる。本研究ではまず、S/Nが良い放射光(KEK PF-AR、NW14A、単色光=1 Å)でDXB測定を行い、実験室内X線源(Cu-K α 1.54 Å、FR-D、Rigaku社製)でも同様な測定を行った。放射光と実験室X線源両方のDXB測定結果が再現され、構造のホモロジーが非常に高いIL-2/IL-2RとIL-15/IL-2Rの分子内部運動を高精度で計測した。

本研究では、NK細胞上のIL-2/IL-2R、およびIL-15/IL-2Rにおける分子内部運動ダイナミクスの違いと、それら生化学機能との相関関係について新たな洞察を提供する。

バイオベース系添加剤を用いた ポリL乳酸の結晶化促進 Improvement of Crystallizability of Poly(L-Lactic Acid) Using Biobased Additives

Amit Kumar Pandey¹、Pham Thi Ngoc Diep¹、高木秀彰²、五十嵐教之²、清水伸隆²、櫻井伸一¹

1 京都工芸繊維大学 バイオベースマテリアル学専攻

2 KEK-放射光

ポリ乳酸は、バイオベースポリマーの代表選手であり、現在、実用化が最も進んでいる。しかしながら、強度や耐熱性が不十分である。また、結晶化が終了するまで時間がかかり、熔融紡糸した繊維を巻き取った状態で保存している間にゆっくりと結晶化が進行してしまう結果、体積収縮を引き起こし、巻き取った糸がきつく引き締まって取れなくなってしまうという、「巻締まり」と呼ばれる問題が発生することが知られている。一方、耐熱性が不十分であることも融点が高い(170°C程度)ことに起因している。ポリ乳酸繊維を衣服にした場合、アイロンの温度(180~210°C)に耐えることができず破れてしまう。これらの課題を解決するための方策として、添加剤を混合して結晶化を促進させる方法がとられている。本発表では、バイオベース材料を用いたポリ乳酸の結晶化促進について、2つの具体例を紹介し、放射光を用いた小角・広角 X 線同時測定を行い、結晶化性能が向上した結果を報告する。まず最初の例は、産業廃棄物としてのシルクや繭の有効利用を想定した、シルクナノクリスタル(SNC)を結晶化促進剤として利用する研究である[1]。この研究では、インドアッサム州で飼育されるカイコ(ムガ蚕)の繭を濃硫酸で処理して加水分解することによって、フィブロインの β シート構造のみからなる円形ディスク状のナノ粒子を抽出し、これが結晶化促進剤として利用できるかどうかを検討された。2つ目の事例は、100%植物由来のチラバゾール®(ポリグリセリン脂肪酸エステル; 分子量500、融点70°C)添加による結晶化促進効果である[2]。これは、太陽化学(株)で開発された100%植物由来の材料(チラバゾール®)である。通常、結晶化促進剤は固体状態で機能するので、液体状態で促進効果があるという結果はこれまでに報告されたことがなく、全く新規な現象である。それは全く異なるメカニズムに基づくと考えられるため、これまでの常識を覆すコンセプトを考える必要がある。本発表では、そのメカニズムについても解説する。

1. R. Patwa, A. Kumar, V. Katiyar, J. Appl. Polym. Sci., 135, 46590 (2018).

2. P. T. N. Diep, M. Mochizuki, M. Doi, H. Takagi, N. Shimizu, N. Igarashi, S. Sasaki, S. Sakurai, Polymer J., 51, 283–294 (2019).

生きた細胞上の GPCR1 分子動態計測 Single molecular measurements of GPCRs in living cells

石原正輝^{1, 2}、藤村章子²、一柳光平^{3, 4}、野澤俊介³、足立伸一³
深谷亮³、倉持昌弘^{1, 2}、三尾和弘²、佐々木裕次^{1, 2}

1 東大院新領域、2 東大—産総研 OIL、3 KEK PF-AR、4 自治医大

膜タンパク質の一種である GPCR(G タンパク質共役受容体)には、細胞外の神経伝達物質やホルモンと結合し、G タンパク質を介してシグナルを細胞内に伝えるという機能があり、細胞の興奮状態や生理機能の調整を行っている。そのため、創薬の約半数は、直接的もしくは間接的に GPCR をターゲットとしており、生命にとって非常に重要なタンパク質分子群と言える。しかし、GPCR の活性や構造の研究は、世界中で盛んに行われている一方で、シグナル伝達時の分子内部動態については全く研究が進んでいない。

本研究では、細胞上にある GPCR1 分子の運動を、DXB(Diffracted X-ray Blinking)という手法を用いて計測した。DXB とは、金ナノ結晶を結合させたタンパク質分子に単色 X 線を照射し、金ナノ結晶からの回折点の輝度の揺らぎから分子内部運動を評価する 1 分子計測法である。測定には PF-AR NW14A および実験室 X 線光源(Rigaku FR-D)を利用した。また測定対象には、セロトニン受容体(GPCR)を発現させた HEK293F 細胞を用い、金ナノ結晶は細胞膜全体にランダムに、またはセロトニン受容体に挿入したタグに特異的に結合させた。その結果、回折点の 100 ミリ秒域における強度揺らぎから導出される各ピクセルの自己相関関数の減衰係数や、検出強度のポアソン分布を比較すると、セロトニン(リガンド)10 μ M 存在下では、減衰係数が大きくなっていることが確認された。これらの結果は、セロトニン受容体の運動において、リガンド結合により細胞膜全体の揺らぎ運動、さらには受容体 1 分子の分子内部運動が激しくなっていることを示している。また、回折スポットの MSD カーブより、GPCR の二量体化運動を示唆する結果も確認された。

本研究では世界で初めて生きた細胞上の GPCR1 分子の動態情報の取得に成功した。現在は、金ナノ結晶の細胞上への結合位置を制御することで、GPCR 内部の色々な部位ごとの動態評価に取り組んでいる。多点部位におけるリガンドある/なしでの動態計測によって、細胞膜上 GPCR の動態挙動がどのように変化するかを明確に検出することができる。

KEK クライオ電顕の立ち上げと単粒子解析 Installation of cryo-electron microscopy in KEK and single particle analysis of protein complexes

安達成彦¹、川崎政人¹、守屋俊夫¹、小祝孝太郎¹、湯本史明¹、
山田悠介¹、篠田晃¹、千田俊哉¹

¹ KEK-物構研-構造生物

生命はタンパク質・核酸・糖・脂質などから構成されるが、なかでもタンパク質は生体内における様々な反応の実行部隊として重要な役割を担っている。タンパク質の働きを理解する上で、その形を知ることは極めて重要であり、現代の生命科学では、タンパク質の立体構造の解明が必要不可欠な位置を占めている。X線結晶解析はタンパク質の立体構造情報を原子分解能で与えてくれるが、タンパク質を結晶化させることが必須である。しかし、多くのタンパク質は生体内で複合体を形成して働いており、複合体の結晶化は一般的に困難であることから、生体内の機能単位である複合体の立体構造解析には、異なるアプローチを組み合わせることが必要である。近年、クライオ電子顕微鏡の分野において、検出器や解析ソフトウェアの革命的な進歩があり、結晶化することなく、近原子分解能でタンパク質複合体の立体構造を解析することが可能となった。そのため放射光施設において、X線結晶解析やX線小角散乱と、クライオ電子顕微鏡による立体構造解析を複合的に進められる環境整備が待望されていた。

このような状況を踏まえて、2018年3月、KEKに200kVの加速電圧を有するクライオ電子顕微鏡(Thermo Fisher Scientific社、Talos Arctica)が導入された。検出器としてFalcon IIIを備え、画像コントラスト増強用の位相板を有している。4月よりKEKスタッフがThermo Fisher Scientificの初期トレーニングを受講し、その内容をテキストとしてまとめることで、KEKスタッフのみで運用可能となった。6月よりユーザー向けの初期トレーニングを開始し、10月より共同利用を開始している。アカデミアユーザーはBINDS経由で利用可能であり、申請件数は既に20件に達している。企業ユーザーは12社が試験的な利用を済ませており、うち3社は来年度の継続的な利用を確定している。来年度以降、年間稼働日数は、メンテナンスおよび留保を除いた200日を予定しており、140日はアカデミア、60日は企業に配分される予定である。さらに、単粒子解析に必要な解析環境も整備を進めており、モデルタンパク質を除けば、最高で2.85Å分解能の立体構造解析に成功している。その他、5Å以上の解析については既に6件の解析に成功している。今後とも、ユーザーの方々と一緒に、KEKのクライオ電子顕微鏡を発展させていきたい。

細胞膜破壊が脊椎動物平滑筋 X 線回折像に与える影響
Effects of cell membrane permeabilization on X-ray
diffraction patterns of vertebrate smooth muscle

渡辺賢¹、中原直哉²、石田行知¹

1 首都大学東京、2 東京慈恵会科大学

脊椎動物平滑筋の収縮フィラメント構造は、デンスボディを介して細胞膜と連結していると考えられている。細胞膜破壊(スキンド)処理を行うことにより、デンスボディの破壊等が起こり、フィラメント格子が攪乱される可能性がある。そこでサポニンエステル的一种 β エスシンによってモルモット盲腸紐平滑筋処理をスキンド処理前後の収縮フィラメント規則配列に由来する X 線赤道反射及び子午反射を比較検討した。赤道反射、子午反射のいずれもスキンド処理後に反射強度の減弱が起こった。一方で、相対強度の変化は殆ど観察されなかった。従って、 β エスシン処理によっても、盲腸紐収縮フィラメント規則配列には大きな影響がみられないことが示唆された。更に詳細に解析を行った結果、スキンド処理後に子午反射の位置は変化しないが、赤道反射を構成する 3 つの収縮フィラメント由来格子間隔が広がることを見出した。骨格筋でもスキンド処理後にフィラメント格子間隔が拡大する(Matsubara & Elliott, 1972)が、メカニズムが同様かは現在のところ不明である。

Photon Factoryにおける連続滴定X線溶液散乱測定を用いた蛋白質複合体の測定・解析環境の構築

Construction of measurement and analysis environment of protein complex using continuous titration SAXS measurement at Photon Factory

米澤健人¹、清水伸隆¹、上久保裕生²

1 KEK 物構研、2 NAIST 先端

近年の蛋白質におけるX線溶液散乱(BioSAXS)は解析ソフトウェアであるATSAS[1]の高度化によって、蛋白質複合体におけるドメイン構造の配置等の複雑な溶液構造解析も可能になってきた。蛋白質複合体の複雑な溶液構造解析を精度よく実現するためには単分散状態の溶液散乱曲線を得ることが要求されており、蛋白質群の混在した状態から標的とする複合体のみの成分を抽出することが必要となる。

複合体を対象とした標準的な測定手法となりつつあるゲル濾過クロマトグラフィーとSAXSを組み合わせたSEC-SAXSはゲルろ過によって複合体のみを単離した上でSAXS測定が可能となる。しかしながら、単離できる蛋白質複合体は蛋白質同士が強く結合している場合のみであり、弱く結合する場合は結合に関与する蛋白質群と形成された複合体とのクロマトグラフィー上での分離が困難となる。一方でSEC-SAXSに対して、弱く結合する複合体の散乱成分を抽出する手段として、連続滴定X線溶液散乱測定法(Tit-SAXS)が近年開発されてきた。この手法は滴定によって、複合体を構成する蛋白質成分の濃度を変化させ、複合体形成の平衡反応から解析的に複合体のみに由来する散乱曲線を抽出できる手法である。この測定を行うためには濃度を厳密に制御するための高精度な実験と、結合する蛋白質濃度の希釈率を変えた多点測定が必要となる。この濃度変調を高精度で行うことのできる μ 流路型自動サンプリングシステムは少量の蛋白質量で濃度の多点測定を実現することができる[2]。この装置はシリンジポンプによって3つの溶液の流速を制御しており、滴定で1つの溶液の濃度を変える際には、3液の流速比を層流の幅の比へと変換させることによって変調させることができる。本研究では、この μ 流路型自動サンプリングシステムをPhoton Factory(PF)に導入し、SEC-SAXSでは測定できない蛋白質複合体の系を対象としたTit-SAXSの測定・解析基盤の構築を目指す。本発表では μ 流路型自動サンプリングシステムを用いたtit-SAXSの測定・解析環境のPFへの導入状況について発表する。

[1] D. Franke. *et al.* (2017). *J. Appl. Cryst.* **50**, 1212–1225.

[1] H. Kamikubo. (2018). *J. Comput. Chem. Japan.* **17**, 57–64.

KEK-PF におけるクライオ電子顕微鏡施設の開設と共同利用

Current Status and User-Operation of Cryo-EM Facility in the KEK-PF

湯本史明 1, 安達成彦 1, 川崎政人 1, 守屋俊夫 1,
小祝孝太郎 1, 篠田晃 1, 山田悠介 1, 千田俊哉 1
1 高エネルギー加速器研究機構/KEK
物質構造科学研究所・構造生物学研究センター

放射光X線を利用した生体高分子の立体構造解析は生命科学研究や創薬プロセスにおいて有用な技術として活用されてきた。ところが、近年クライオ電子顕微鏡(クライオ電顕)による単粒子解析技術の飛躍的な発展により、これまで結晶化が困難であったタンパク質やその複合体の立体構造が近原子分解能で解明されるようになってきた。このように、現在、構造生物学を取り巻く環境は急激に変化している状況にある。そして、世界的な動きを受けて、日本においても日本医療研究開発機構(AMED)による創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業(BINDS)を通じ、最高峰のクライオ電子顕微鏡装置の導入が進められてきた。KEK 物構研・構造生物学研究センターは平成 29 年度に共同利用のためのクライオ電顕施設(200 kV の電顕 Talos Arctica (Thermo Fisher Scientific)を保有)を設立し、平成 30 年 10 月から共同利用を開始し、現在、アカデミアおよび製薬企業等の多くの研究者が利用されている。

本発表では、電顕装置をはじめ、測定や解析のために構築してきた環境について紹介すると共に、BINDS クライオ電顕ネットワークを通じた共同利用や企業による施設利用方法について紹介する。また、クライオ電顕による構造解析の最新情報を共有する場として立ち上げた「SBRC 国際クライオ電顕セミナー」や「PF 研究会(X 線とクライオ電子顕微鏡で挑む生命の機能と私たち)」の様子、今後の予定について報告したい。

糖タンパク質軟骨プロテオグリカンの溶存状態 Solution properties of a glycoprotein proteoglycan

渡邊 康・(国研)農研機構

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。我々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散乱測定の有効性を検証してきた。本年は食品関連巨大糖タンパク質としてサケ軟骨プロテオグリカンについて、溶液散乱法による分子量と分子サイズの評価について報告する。

溶液X線散乱測定装置は、高エネ機構 PFBL10C(X線波長:0.1488 nm、試料検出器間距離:1.98 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。鶏の腱から取り出したコラーゲン繊維束を標準物質として、検出器の単位チャンネルを散乱ベクトル $q(=4\pi/\lambda)\sin\theta$, λ はX線波長, 2θ は散乱角)に変換した。分子量評価は、試料溶液をゲル濾過クロマトグラフィーカラムに供し、その溶出液を検出器として低角レーザー光散乱検出器、示差屈折計を接続した測定システムで解析した。また、溶液中の分子サイズは動的散乱測定により評価した。

溶液X線散乱測定より、水溶液中のサケ軟骨プロテオグリカンの主要成分は、排除体積を持ったほどけた構造で、高分子鎖の堅さの指標である持続長は約 9 nm であることが示唆された。分子量評価についての予備的な結果として、サケ軟骨プロテオグリカンは生理的な条件では、重量平均分子量は約 40 万と評価された。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィー分離により、分子量は約 100 万から数万の分布があり主要成分の分子量は 27 万前後であった。動的散乱測定による分子サイズ評価の結果、生理的な条件では平均粒子径は 1~3 μm と評価され、多分散系であることが示唆された。今後、溶液散乱測定データの精査をさらに進める予定である。

PF SAXS ビームライン SAXS beamlines at the Photon Factory

清水伸隆¹、高木秀彰¹、永谷康子¹、米澤健人¹、大田浩正²、森丈晴¹、
谷田部景子¹、高橋正剛¹、西條慎也³、鈴木文俊³、及川哲郎³、五十嵐教之¹

1 KEK-IMSS、2 三菱電機 SC、3 日本アクシス

PFでは、BL-6A、10C、15A2という3本の小角散乱ビームラインが稼働している。BL-6A、10Cは偏向電磁石光源で、BL-15A2は短周期アンジュレータを光源とするビームラインである。ただし、BL-15AはXAFS分野(BL-15A1)との相乗りになっているため、利用時間は全体の半分となっている。3本のビームライン共に基本的に共通の制御系が導入されており、ユーザーはどこでも同じ操作系で実験を行なうことが可能だが、測定エネルギー固定(8.3keV)のBL-6Aと異なりBL-10C(6.5-14keV)や15A2(2.1-15keV)では、エネルギー変更やそれに伴うGAP連動機能などが実装されている。現在、幾つか測定及び解析ソフトウェアの開発や高度化を進めており、さらには装置の導入なども行なったので報告する。PFではSAXSデータの初期解析用ソフトウェアSAnghler(1)を公開しているが、水やGlassy Carbonでの絶対強度補正、吸収補正に基づくバックグラウンドの差し引き機能、SEC-SAXSなどの連続測定データの自動モニタリング機能などを実装したVer. 2を公開した。また、SEC-SAXSデータの全自動解析を行なうSerial Analyzer(2)を開発公開した。測定制御では、これまで進めていた全自動測定をさらに推し進めて、試料の多次元自動マッピングスキャン(SAXS-CT測定)を実現するために、各軸をステップワイズに動かしながら連続測定できるだけでは無く、軸の動作と検出器測定を連動させて、シャッターレスでラスタースキャン測定を可能とするシステムを開発した。その結果、同じ測定では、ラスタースキャンの方がステップワイズより3倍の速度で測定出来ることが実証された。現状は2軸動作にしか対応出来ないが、今後さらに多次元の動きが可能になる様に開発を進める予定である。これに関連して、ダイレクトビーム位置に対してラジアル方向の散乱強度プロファイルを求め、さらにその強度を積分して散乱方向(360度)に対してプロットするソフトウェアRadial Integrated Intensities Profiler(RIIP(リープ))を現在開発中である。RIIPは、マルチコア/マルチスレッド環境に対応しており、試料のマッピングスキャンを行う様な高速連続測定に対応している。一方、装置に関しては小型引張試験機(アイエス技研製)を導入し、試料を引張ながら多軸スキャンを連続的に自動測定するシステムを導入した。発表では、上記を含めた最新の開発・整備状況に関して発表する。

1) <http://pfwww.kek.jp/saxs/SAnghler.html>

2) <http://pfwww.kek.jp/saxs/SerialAnalyzer.html>

X線照射による免疫チェックポイント応答変化 Influence on immune checkpoint response induced by X-rays

大原 麻希¹、宇佐美 徳子¹、小林菜穂子^{2,3}、吉田徹彦^{2,3}

1 KEK-IMSS-PF, 2 慶応義塾大 医学 遺伝子医学,

3 東亜合成 先端科学研

体内の免疫機構は外部から侵入した病原体だけでなく、内部に発生したがん細胞に対しても機能している。免疫には自然免疫と獲得免疫が存在し、自然免疫では好中球やマクロファージなどの食細胞が、獲得免疫では T 細胞や B 細胞などのリンパ球が、病原体やがん細胞を排除する。しかし、がん細胞では細胞膜表面に PD-L1、CTLA-4、CD47 といった免疫チェックポイントタンパク質を発現することにより免疫細胞の排除機能を阻害する。近年、免疫チェックポイントタンパク質とリガンドとの結合を抗体で抑制する免疫チェックポイント阻害剤によるがん治療が注目されている。がん細胞において X 線照射により生じる DNA 損傷を修復するシグナル伝達経路が一部の免疫チェックポイントタンパク質の発現調節に関与することが報告されているが、放射線による免疫チェックポイント応答への作用は不明である。本研究ではがん細胞への X 線による免疫チェックポイント応答への影響を解析するため、悪性黒色腫 (A2058)、肺がん (HCC827)、大腸がん (SW480) の性質の異なる 3 種類のがん細胞を用いて X 線照射後の免疫チェックポイント関連タンパク質の局在と発現量の変化を調べた。

PD-L1 は HCC827 で高発現しており、SW480 では発現していなかった。X 線照射による PD-L1 発現の増減はなかった。PD-L1 タンパク質の安定化を行う CMTM6 は全てのがん細胞で X 線照射により発現が増加した。CD47 は A2058 で高発現しており、1Gy の低線量 X 線でも発現の増加が見られた。今後はこれらの発現への変化が DNA 損傷応答と関連するのかを検討するため、放射光 X 線マイクロビーム照射装置を用いて核のみ、細胞質のみに照射した場合の発現変化を解析する予定である。

謝辞: 本研究は JST, CREST, JPMJCR17H3 の支援を受けて実施しました

リン脂質が水中で形成する巨大分子集合体の 形状と微細構造に及ぼす添加成分の影響

Effect of additives on the morphology and microstructure of giant lipid aggregates formed in aqueous media

家才子翔平¹、黒岩崇¹、市川創作²、金澤昭彦¹
東京都市大学大学院工学研究科

生体膜の構成成分であるリン脂質は、溶液中で濃度や温度、圧力などの条件によって様々な分子集合体を形成する。本研究室では、独自の作製法によりリン脂質に種々の添加成分を加えた脂質混合物が水溶液中で直径数ミリメートルにも及ぶ巨大な分子集合体を形成することを見出し、その構造や特性について研究を行っている。

本研究では、リン脂質を主成分とする巨大分子集合体の形状および相構造に影響を及ぼす因子として、コレステロール、長鎖アルキルアミンおよび長鎖脂肪酸など、異なる親水基・疎水基を有する脂溶性成分の添加効果に着目した。これらの添加成分の分子構造と、得られる巨大分子集合体の巨視的な形状と微視的な分子の会合構造との関係を詳細に調べることで、本巨大分子集合体の形成メカニズムを明らかにすることを目的としている。種々の添加成分を様々な組成比で混合し、巨大分子集合体の形状、および安定性に与える影響について調査した。

卵黄由来ホスファチジルコリン(PC)に、コレステロールおよび長鎖アルキルアミンまたは長鎖脂肪酸を種々のモル比で *n*-ヘキサンに溶解し混合脂質溶液とした。この混合脂質溶液を種々の pH に調整した水溶液上に静かに積層し、25°C以上の温度で約 24 時間静置してヘキサンを蒸発除去後、水相中で得られた巨大分子集合体を試料とした。作製した試料に対し、KEK-PF BL-6A ステーションにて SAXS および WAXS 測定を行った。X 線の波長は 1.5 Å とした。各試料に対し、試料温度を変えながら、SAXS および WAXS 測定を行い、得られた 2 次元散乱データを用いて微細構造を解析した。

PC のみを使用した場合、上記の作製法により不定形かつ非常に脆い白濁した凝集物が得られた。これに対し、PC にコレステロールおよび長鎖アルキルアミンまたは長鎖脂肪酸を種々のモル比で添加することで、膜状または球状の透明な巨大分子集合体を得られた。SAXS および WAXS 測定の結果、膜状の集合体ではヘキサゴナル液晶相、球状の集合体ではキュービック液晶相が発現し、いずれも温度を下げるとうメラ液晶相に転移することがわかった。集合体の形状や相構造は、脂質組成、pH、添加成分のアルキル鎖長や不飽和結合の有無などによっても大きく変化することを明らかにした。