

ユーザーからの溶液小角散乱装置遠隔操作テスト報告 — 新型コロナウイルスを想定した 新しい生活様式の実践を目指して —

**User report on remotely operate control trial for
solution small angle scattering device with the aim of
executing the New Normal style against COVID-19.**

相澤秀樹
摂南大薬

2019 年末頃から始まった新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染によって引き起こされる急性呼吸器疾患 (COVID-19) の世界的流行が続いており、with/after コロナにおける新しい生活様式 (New Normal) が求められている。高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 物質構造科学研究所 (IMSS) 放射光実験施設 (フotonファクトリー: PF) (茨城県つくば市) の 2020 年第 1 期の運転は一旦中止となったが、6 月 18 日から 30 日の期間についてはテストビームタイムとして運転が再開された。6 月 26 日に摂南大学薬学部 (大阪府枚方市) から PF の小角散乱ビームライン BL-10C (茨城県つくば市) へ、KEK が提供するインターネットに跨ってプライベートネットワークを拡張する技術 Virtual Private Network (VPN) と Microsoft 社が提供するコンピューター同士をネットワークで接続することで遠隔操作を可能としたリモートデスクトップ機能を利用して接続し、溶液小角散乱装置の遠隔操作テストを実施した。

このテストは、試料などは事前に PF に送付し、測定装置のセッティングからビームラインでの現地における試料に関する実験操作は PF スタッフが行い、測定操作を摂南大学薬学部から遠隔操作で行うものである。測定結果はネットワークを介してダウンロードし、即座に解析を行なった。本発表においては、遠隔操作テストの概要を説明するとともに、遠隔操作での測定制御下で直鎖状の界面活性剤 Octaethylene glycol monododecyl ether (OEM) 水溶液を測定し、OEM ミセルの構造を解明したので発表する。

さらに実際に実施してみて、ユーザーの立場から現状の溶液小角散乱装置の遠隔操作についての問題点を指摘し、その改善点を提案するとともに、with/after コロナにおける新しい生活様式にあった溶液小角散乱実験手法を提案したい。

生きた細胞上の GPCR のミリ秒-マイクロ秒ダイナミクス Milli- to microsecond dynamics of Single GPCR in Living Cells

藤村章子¹、石原正輝^{1,2}、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}、関口博史⁵、三尾和弘¹、佐々木裕次^{1,2}

1 産総研-東大 OIL、2 東大院新領域、3 KEK、4 自治医大、5 JASRI

GPCR (G protein-coupled receptors) は細胞外のリガンドと結合し、G タンパク質を介することでシグナルを細胞内に伝達し、細胞の興奮状態や生理機能の調整を行っている巨大なタンパク質群である。GPCR に結合し活性化するリガンドには、光感受性化合物、臭気、フェロモン、ホルモン、神経伝達物質などがある。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、生命活動にとって非常に重要なタンパク質群と言える。しかし、GPCR の機能・構造の研究とは対照的に、シグナル伝達時の分子内部動態について実験的な知見はほとんどない。

本研究では DXT (Diffracted X-ray Tracking) および、DXB (Diffracted X-ray Blinking) という手法を用いて、生きた細胞上の GPCR1 分子の内部運動計測を行った。DXT 法は金ナノ結晶を標識したタンパク質分子に白色 X 線を照射し、得られる回折点の動きをトラッキングすることで、分子内部運動を測定する1分子計測法である。特にマイクロ秒域の時間分解能での測定に使用される。一方で DXB 法は単色 X 線を使用するため、回折点のトラッキングはできないが、ピクセルごとの輝度の揺らぎから分子内部運動の評価を行う手法である。DXB 法ではサンプルへのダメージを抑えられるため、長時間の測定が可能となる。本研究では異なる 2 つの時間軸で測定した。短い時間スケールでの実験 (100 μ s/frame) として DXT を SPring-8 (BL40XU) で行い、長い時間スケールでの実験 (100 ms/frame) として DXB を KEK (PF-AR NW14A) にて行った。測定試料は、HEK293F 細胞に発現させたセロトニン受容体 (5-HT_{2A})とし、金ナノ結晶は、セロトニン受容体の N 末端に挿入した FLAG タグに対する抗体に結合させた。

サブミリ秒領域の短い時間スケールでは、リガンドの存在下において GPCR の分子内部運動が遅くなり、分子が安定化することが示された。この差は細胞上でのねじれ方向の運動解析により明確になった。一方で、サブ秒領域での長い時間スケールでは、逆にリガンド存在下において GPCR の分子内部運動が激しくなるという結果が得られた。異なる時間軸で運動が逆転するという興味深い現象は、GPCR とリガンドの会合、及び GPCR と G タンパク質に代表される細胞内分子との相互作用を反映しているものと考えられた。

SEC-iCM-SANS による抗体分子の精密構造解析 High-precision structural analysis of antibody molecules by SEC-iCM-SANS

佐藤信浩¹、與語理那^{2,3,4}、谷中冴子^{2,3,4}、Anne Martel⁵、Lionel Porcar⁵、
守島健¹、井上倫太郎¹、富永大輝⁶、有森貴夫⁷、高木淳一⁷、
杉山正明¹、加藤晃一^{2,3,4}

1 京大複合研、2 分子研、3 生命創成探究センター、4 名市大院薬、
5 ILL、6 CROSS、7 阪大蛋白研

X線や中性子線をプローブとする小角散乱法は、溶液中の生体分子構造を解析するための強力な実験手法として広く用いられているが、凝集体の形成や解離成分の混入により、しばしば対象分子の構造決定に支障をきたす場合がある。目的外成分を除去し対象分子単独の測定を可能とするために、小角散乱 (SAS) 測定にインラインのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を組み合わせた SEC-SAS 法が近年急速に発展しつつある。一方、中性子小角散乱 (SANS) においては、試料の重水素化により、複合体中の部分構造に対応する散乱を選択的に抽出して解析するコントラスト変調法が広く利用されてきた。これまでは 40%重水溶媒中で軽水素化タンパク質を不可視化し、重水素化したタンパク質の選択的観測を行う手法が用いられてきた。我々はこの手法を一步進め、非干渉性散乱の少ない 100%重水中で重水素化率 75%のタンパク質を不可視化し、軽水素化タンパク質を選択測定する逆転コントラストマッチング法 (iCM-SANS) により、様々なタンパク質複合体の部分構造解析に成功してきた [1–3]。これらの凝集除去法と選択測定法を統合した SEC-iCM-SANS 法を用いることにより、溶液中の生体高分子複合体中に対して、より精密な部分構造解析が可能になるものと期待される。そこで、本研究では、抗体分子をモデル系として SEC-iCM-SANS によるタンパク質会合体の選択的部分構造解析を実施しその有効性を明らかにするとともに、X線小角散乱 (SAXS) や分析超遠心 (AUC) などの手法を相補的に用いることにより、生体分子の精密構造解析を実現する実験的手法を確立した[4]ので、その結果について報告する。

- [1] M. Sugiyama *et al.*, *J. Appl. Cryst.*, **47** (2014) 430–435.
- [2] M. Sugiyama *et al.*, *Sci. Rep.*, **6** (2016) 35567.
- [3] R. Inoue *et al.*, *Sci. Rep.*, *in press*.
- [4] N. Sato, R. Yogo *et al.*, *J. Biochem.*, *in press*.

中性子散乱解析を目指した タンパク質試料調製技術の確立

Establishment of protein sample preparation technology for Neutron Scattering

奥田 綾, 井上 倫太郎, 守島 健, 清水 将裕, 佐藤 信浩, 裏出 令子,
杉山 正明
京都大学複合原子力科学研究所

様々な生命現象を担う生体高分子であるタンパク質の機能発現の場は細胞内、つまり溶液環境であり、複数種類のタンパク質が存在する多成分系である。そのような条件を再現した環境での構造解析には溶液散乱の手法が有効である。特に、多成分系で特定のタンパク質のみを選択的に構造解析するには、軽水素と重水素の散乱長が大きく異なる中性子散乱の特長を利用した「逆転コントラスト同調中性子小角散乱法 (iCM-SANS)」が有効である。本手法では重水素化タンパク質と軽水素化タンパク質を重水溶媒中で観察することで重水素化タンパク質がコントラストマッチングにより散乱的に不可視となり、軽水素化タンパク質の散乱だけを抽出することが可能である。この解析には重水素化率が 75%に精密に制御されたタンパク質を調製する必要がある。

我々は大腸菌発現系を用いて 75%重水素化タンパク質を調製し、さらに、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) を用いた質量分析により、タンパク質の重水素化率を簡便かつ迅速に測定する手法を確立した。また、測定に使用する重水溶媒の D_2O/H_2O 比率をフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)により精密かつ簡便に測定する手法も併せて確立した。以上の技術を用いることで、正確なタンパク質の重水素化率と重水溶媒の D_2O/H_2O 比率が得られ、重水素化タンパク質を非常に良好にマッチアウトさせることが可能となった。

さらに、本手法をタンパク質の多成分系のみならず、タンパク質の特定領域 (ドメイン)にのみ着目した構造解析に適応するために現在開発を進めている技術についても報告する。

タンパク質結晶構造解析ビームライン AR-NW12A における 顕微分光装置の利用について

The Use of Spectroscopic System at Protein Crystallography beamline AR-NW12A

引田理英^{1,2}、山田悠介^{1,2}、松垣直宏^{1,2}、平木雅彦^{2,3}、千田俊哉^{1,2}

¹ 高エネ機構 物構研 構造生物学研究センター

² 総研大 高エネルギー加速器研究科

³ 高エネ機構 共通 機械工学センター

タンパク質の機能メカニズム解析研究において、タンパク質の分子・原子レベルでの立体構造は不可欠であり、高輝度放射光源を利用した X 線結晶構造解析法は、タンパク質の立体構造を原子レベルで解明するための強力なツールとして利用されている。一方、振動分光学的方法によれば、タンパク質を構成する原子の化学的諸性質を決定する化学結合を精密に解析することができる。これら X 線結晶構造解析法と振動分光法は相補的な手法として、タンパク質の機能メカニズム解析研究に用いられてきた。KEK-PF のタンパク質結晶構造解析ビームライン AR-NW12A では、X 線結晶構造解析法と振動分光法が同時に利用可能な拠点形成のため分光装置の開発及び開発・利用環境の整備を行ってきた。現在では、ビームライン側室であるレーザーブースに設置した、オフライン紫外・可視吸収測定装置やラマン分光装置が稼働を開始し、ユーザー利用に供している。装置の利用を進めていくにつれ、いくつかの問題も発生しており、その一つが結晶の厚みや霜による測定精度への影響である。結晶の厚みや霜によって、スペクトルのノイズやバックグラウンドが増加し、ピークの検出が困難なケースが生じている。この問題を解決するため、深紫外レーザーを用いた結晶加工装置を導入し、結晶サイズの調整や結晶周りについた霜を取り除き、バックグラウンドやノイズの影響を最小限に抑えた測定が可能となっている。

本ポスターでは、オフライン分光装置の利用について、最近の利用例とともに紹介する。また、現在開発を進めているオンライン分光装置の進捗についても紹介する。

熱処理した食品タンパク質の溶液物性 Solution properties of a heat-treated food protein

渡邊 康

農業・食品産業技術総合研究機構(農研機構)

食品産業などのタンパク質の関与する分野において、タンパク質の溶液物性は重要である。熱処理によりタンパク質は変性温度以上で構造変化するので、放射光溶液X線散乱測定により食品タンパク質の熱処理後の溶存状態について報告する。

放射光溶液X線散乱測定装置は、BL10C (X線波長 : 0.1488 nm、試料検出器間距離 : 1.98 m) を利用した。中性低イオン強度溶媒における熱処理後の溶存状態解析の対象は、モデル食品タンパク質として卵白アルブミンとした。クロマトグラフィー分離直後の時分割散乱測定 (3分毎) よりタンパク質溶出分子の散乱データを得ることができ、熱処理後の可溶性会合分子のサイズと分子量を計算した。フラクタル次元の評価から熱処理後の可溶性分子は直鎖状の分子形状で表面構造は天然構造と相似的ななめらかさをもつ会合体であり、クラツキープロットから、天然状態とランダムコイル状態と異なる構造であることが示唆された。

ミュオンによるセリンプロテアーゼ加水分解反応の追跡 Study of serine protease hydrolysis by muon

小柳文哉¹、清谷多美子²、新村信雄³、田中伊知朗¹

中村惇平⁴、西村昇一郎⁴、幸田章宏⁴

1 茨城大院理工、2 昭和薬科大、3 茨城大工、4 KEK

酵素タンパク質セリンプロテアーゼの加水分解反応では、触媒基トリオ Ser195、His57、Asp102 の触媒機構で電子・プロトン移動が発生していると推測される。本研究では、触媒機構による電子・プロトン移動に起因する内部磁場を、正ミュオンによる μ SR 実験を用いて調べた。

測定試料は、トリプシンと、その阻害剤であるリマ豆由来トリプシンインヒビター (LBTI) の複合体を、重量比で水分量 0%、20%、50% に調整した 3 種類を用いた。この系については、阻害剤によりタンパク質の加水分解反応は阻止されるが、触媒基トリオ周辺の電子・プロトン移動が常時生じていることが示されている^[1]。測定条件は温度を常温の 300K および低温の 200K で、印加磁場は縦磁場(LF) = 0~100G、横磁場(TF) = 20G で行った。

測定データを比較したところ、水分量によって緩和の様子に違いが観測された(Fig.1)。電子・プロトン移動が発生しているとされる水分量 50%、300K の条件について、musrfit で詳細を調べると Fig.2 を得て、内部磁場は 5~10G と推定された。これは、以前計算した内部磁場の大きさ(約 1G)とほぼ同じオーダーであった^[2]。

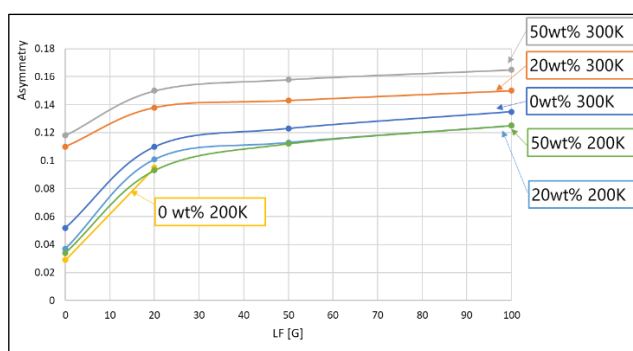


Fig.1 LF 依存 Asymmetry (at 20 μ s)の
水分量による違い

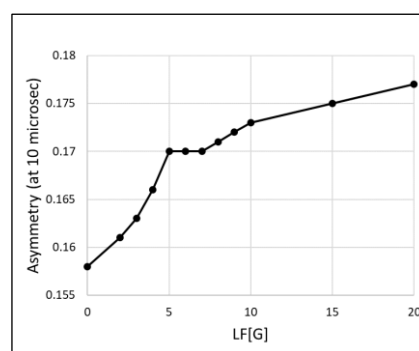


Fig.2 水分量 50%、300K の
LF 依存 Asymmetry

[1] K. Kawamura, *et al.*, *Acta Cryst.* **D67**, 140–148, (2011)

[2] M. Kobayashi, *et al.*, *JPS Conf. Proc.* **8**, 033006 (2015)

DXB 法を用いた不凍タンパク質結晶の内部分子動態計測 Molecular motion of antifreeze protein in crystal measured by Diffracted X-ray Blinking

新井達也¹、倉持昌弘¹、三尾和弘²、佐々木裕次^{1,2}

1 東京大学新領域、2 産総研－東大 OIL

不凍タンパク質(Antifreeze protein: AFP)は、低温環境の生物が生産する生体保護物質であり、氷結晶に結合する機能を持つ。これまでの X 線結晶構造解析により、AFP は疎水的な分子表面の上に氷のような構造の水和水を保持すると考えられている。しかし、AFP 自身が結晶内部においてどのような分子動態を示すのかは、よく分かっていない。本研究では、分子動態計測法である DXB (Diffracted X-ray Blinking)を用いて、タンパク質結晶内部の AFP 分子の動態を計測することにした。本研究で使用したナガガジ由来の AFP の結晶を図 1A に示す。DXB は測定した X 線回折強度の揺らぎから自己相関関数を用いてサンプル分子の運動性を測定する手法である (図 1B,C)。X 線回折は 50 ms×2000 frame の露光時間で測定し、検出器には実験室では PILATUS3 R 200K-A、PF-AR NW12A では PILATUS-3M を使用した。

AFP 結晶の分子動態の温度依存性を図 2 に示す。このボックスプロットの y 軸、減衰係数は分子の動態の大きさを表す。温度低下と共に AFP の分子動態が増加するという通常のブラウン運動とは逆の結果が、実験室と放射光施設の双方で得られた。AFP は分子の内部と表面ともに非常に疎水的であり、一般的に疎水性相互作用は低温において減少することが知られている。つまり、**AFP 分子は低温においてより大きく揺らいでおり、このような分子の揺らぎが、氷結晶結合機能に重要な要素であると考えられる。**

これまでの DXB 法では、サンプル分子に対して金ナノ結晶を標識し間接的に分子運動を測定していたが、本研究は結晶自身の構成分子の揺らぎを直接計測した初めての例である。今後、様々な結晶性物質への応用が期待される。

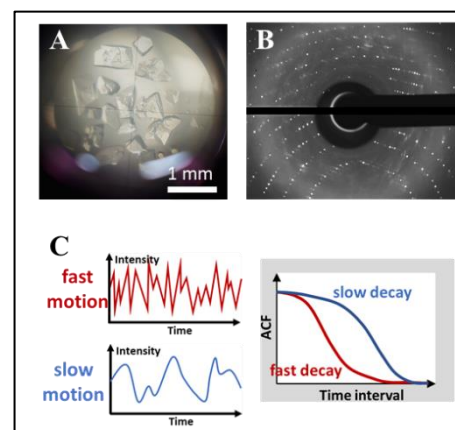


図 1. AFP 結晶ディフラクション(A, B)と DXB 解析のイメージ図(C).

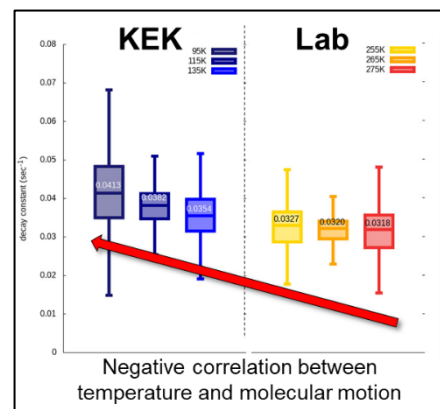


図 2. AFP 結晶の ACF 解析による減衰係数ボックスプロット

X 線小角散乱データと分子動力学計算に基づくマルチドメインタンパク質 ER-60 の動態解析

Study on dynamics of multi-domain protein ER-60 based on multi-scale simulations and small angle X-ray scattering data

清水将裕、奥田綾、守島健、佐藤信浩、井上倫太郎、裏出令子、杉山正明
京大複合研

X 線小角散乱(SAXS)測定にから得られる生体分子の散乱プロファイルは、そのメソ・ナノスケールの構造情報を有している。加えて、SAXS プロファイルには試料中の全分子から散乱が寄与しているため、生体分子の構造アンサンブルを解明するための重要な手がかりとなる。

そこで我々は、分子の挙動を視覚的に解析可能な分子動力学計算を用い、SAXS プロファイルが示す生体分子の構造アンサンブルを近原子解像度で解明する手法の確立を目指している。

本研究では4ドメインから構成されるマルチドメインタンパク質 ER-60 を標的とした。ER-60 は2つのシステインを含む活性部位を2か所に有し、それぞれがジスルフィド結合を形成した酸化型及び、ジスルフィド結合を形成していない還元型の2状態が存在する。我々の研究グループではそれぞれの SAXS プロファイルを得ており、両プロファイルには違いがみられている。そこで、分子動力学計算により、それが示す分子構造・挙動の違いの解析を進めている。

我々はマルチスケール分子動力学法のアプローチを採用し、時空間スケールの小さいドメイン内分子構造揺らぎの解析には全原子分子動力学計算を、時空間スケールの大きいドメイン間運動・ドメイン配置の解析には粗視化分子動力学計算を適用した。

全原子分子動力学計算からは酸化型 ER-60 と還元型 ER-60 の間で活性部位の構造揺らぎが異なることが明らかになったが、ER-60 の各ドメインの概形に大きな影響を及ぼすものではなかった。

粗視化分子動力学計算からは非常に多様な分子構造が現れたため、まずは個々のシミュレーションスナップショットに着目し、小角散乱データを再現する分子構造を収集した。酸化型 ER-60 の SAXS プロファイルを再現する分子構造と、還元型 ER-60 の SAXS プロファイルを再現する分子構造の間では、4ドメインの内 α' と呼ばれるドメインの配置の違いが最も顕著であった。この結果は ER-60 の酸化状態の違いによる構造違いの傾向を反映していると考えられる。

現在は ER-60 の動態解明に向けた粗視化分子動力学計算のモデル改良に取り組んでおり、その成果についても報告する。

超遠心分析と X 線小角散乱の統合手法 (AUC-SAXS) によるタンパク質複合体の構造解析 Structural analysis of protein complex by integrative method with analytical ultracentrifugation and small-angle X-ray scattering (AUC-SAXS)

守島健¹、宮本洋祐²、清水将裕¹、柚木康弘³、奥田綾¹、佐藤信浩¹、
井上倫太郎¹、裏出令子¹、矢木宏和³、加藤晃一^{3,4,5}、杉山正明¹

1 京大複合研、2 京大院理、
3 名市大院薬、4 分子研、5 生命創成探究センター

生命現象は多種多様な生体高分子が協奏的に解離会合を繰り返すことで実現しており、それらの機能の理解には生理条件に近い多成分系における生体高分子及びその複合体の構造解析が求められる。一方、X 線小角散乱(SAXS)法は溶液中の全成分の集団平均散乱プロファイルを与えるため、多成分溶液中の目的成分の構造解析を行うためには、その散乱プロファイルを選択的に求める必要がある。この選択測定手法の一つとして、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)-SAXS 法が近年注目を集めており、生体高分子を対象とした SAXS の主流となりつつある。一方で、SEC-SAXS 法は、解離会合速度が速い平衡系では SEC で複合体を分離した直後に解離成分が生じてしまうため、複合体の散乱プロファイルを得ることができないことが問題であった。そこで、近年、溶液中の成分の存在比率が求められる超遠心分析(AUC)と SAXS を組み合わせた「AUC-SAXS」法^[1]が考案された。AUC-SAXS 法は、SEC-SAXS 法のように「試料を分離して選択的に測定する」のではなく、「多成分溶液の散乱プロファイルから目的成分の散乱プロファイルを導出する」ため、上記の問題は生じない。これまでに AUC-SAXS 法は SEC により複合体の分離が困難な解離会合平衡系に対しても適用され、複合体の散乱プロファイルの導出に成功している^[1]。しかし、生理条件に近い溶液では、「凝集を伴う解離会合平衡系」のように、より複雑な多成分系であることが多い。本研究では、AUC-SAXS 法を更に発展させ、「凝集を伴う解離会合平衡系」で形成されるタンパク質複合体の散乱プロファイルの選択的導出法の確立を行った。当日はモデル系として時計タンパク質 KaiA と KaiC の解離会合系を用い、KaiA-KaiC (AC) 複合体の散乱プロファイルの導出手順の詳細を説明する。さらに、粗視化分子動力学シミュレーションを用いて、導出された散乱プロファイルを再現する AC 複合体の構造解析を行った結果についても発表する。

[1] K. Morishima, *et al. Commun. Biol.* **3**, 294, (2020).

さつまいもの処理方法による回折パターンの変化 Changes in diffraction pattern depending on the processing method of sweet potato

星川晃範¹、渡辺万里²、山口峻英¹、高妻孝光¹

1 茨城大学, 2 茨城県農業総合センター

茨城県はさつまいもの栽培面積・生産量ともに鹿児島県に次ぐ全国第2位(2019年)の産地である。さつまいもは甘藷(かんしょ)ともいわれ、中南米原産のヒルガオ科の植物である。日本への伝来に関しては諸説あるが、中国を經由して江戸初期に伝わり、九州の薩摩にて主に栽培されていたことからその名がついたと言われている。干し芋は江戸時代に静岡県で誕生し、茨城県へは1908年に現ひたちなか市に最初に伝わったとされている。干し芋にする独特の甘みがあるが、生芋は甘くない。このことは干し芋にする過程でデンプンが何らかの糖質へ変化していると考えられる。今回、茨城県の人材育成事業の一環として、農業総合センターで試験栽培されている「べにはるか」を試料とし、様々な処理方法に対する変化について量子ビームを使って調査を行なった。今回使用したサンプルは、生芋、蒸し芋、干し芋、さらに保存処理の異なる芋から抽出されたデンプンを用意した。ここでの保存処理は、適当な温度と湿度に置くことで収穫時の芋の傷口を自然治癒させるキュアリング(curing)処理のことである。中性子用の試料に関しては重水置換処理を行った試料を別途用意し、MLFのiMATERIAで計測を行った。図1にこれらの回折パターンを示す。個体差の可能性もあるが、キュアリング処理の有無により、デンプンの回折パターンに違いがみられた。これは何らかのデンプン構造の変化を反映していると考えられる。さらにデンプンの回折パターンと同様のピークが生芋でも観測されており、生芋にはデンプンが結晶として存在していることがわかった。一方、蒸し芋と干し芋に関しては、デンプンの回折ピークは観測されおらず、デンプンの結晶は無いと考えられる。この他、重水置換しない場合の中性子回折パターンと実験室系X線、PFのBL6Aで計測した結果について合わせて報告を行う。

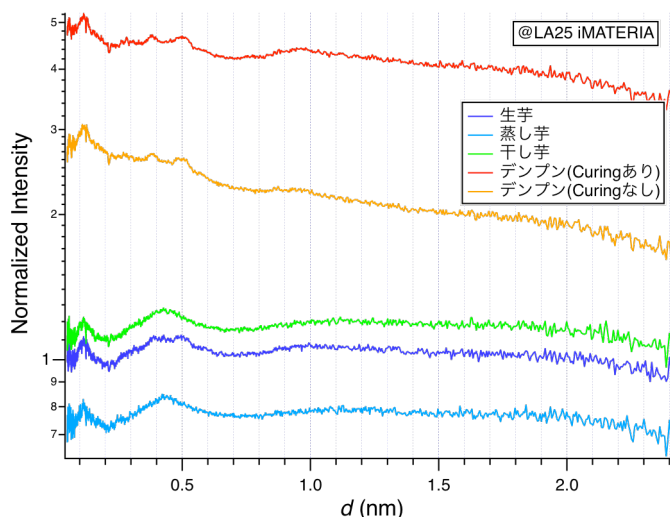


図1. さつまいもの中性子回折パターン

磁気受容蛋白質候補 ISCA1 の SAXS 解析 SAXS analysis of the magnetoreceptor candidate protein ISCA1

新井栄揮¹、清水瑠美¹、安達基泰¹、味戸聡志²、平井光博³

1 量研・量子生命科学領域、2 原子力機構、3 群馬大・院理工

近年、多くの動物種において、網膜細胞内の蛋白質クリプトクロム(CRY)を量子磁気センサーとして利用する磁覚(磁場の方位や強さを知覚する感覚)の存在が確認されている。青色光によって CRY が含有するフラビン補酵素(FAD)が励起されると、Trp から FAD へ電子が移動し、FAD と Trp で構成されるラジカル対を生じる。このラジカル対の電子ペアが外部磁場の影響を受けることで一重項状態と三重項状態の項間交差の効率が変化し、その化学反応性の変化が磁覚の要因になると推測されている [1,2]。また、CRY の磁覚への寄与は、CRY を失活したショウジョウバエが磁覚を喪失することなどから実証されている[3]。しかし、CRY が受容した磁気情報を神経系へ伝達する機構は未解明であり、磁気情報伝達を仲介する物質の探索が当該研究分野の大きな課題となっている[4]。磁覚保有種であるカワラバト由来 Fe-S クラスター輸送蛋白質 cIISCA1 は、上記仲介物質の候補の一つである[5]。カワラバト由来 cICRY4/cIISCA1 複合体は、青色光存在下において、地磁気程度の弱磁場(0.4 – 10G)に対しても配向する稀有な性質を有する[5]。我々は、cIISCA1 の溶液構造・物性を明らかにするために SAXS 解析を行った。その結果、cIISCA1 は 2 種類の構造異性体(球状の Type-A と棒状の Type-B)を形成し、Type-A は 4 量体以上の柱状の自己会合体を形成することが明らかになった。また、SAXS データと相同蛋白質の結晶構造(PDB: 2D2A、1R94、1X0G)に基づいた分子モデリングから、Type-A 自己会合体の分子間界面に Fe-S クラスター結合部位が形成されることが示唆された。Type-A の自己会合は、起磁力・帯磁率向上の要因となり得る多くの Fe-S クラスターの結合を可能にすると考えられる。一方、Type-B の自己会合は 2 量体が上限であり、且つ、Fe-S クラスター結合能を有さないことも明らかになった。Type-A から Type-B への構造変化は、cIISCA1 から他の蛋白質へ Fe-S クラスターを転移する際に必要な機能である可能性がある。cIISCA1 は立体構造に応じて異なる機能(磁気受容もしくは伝達機能、Fe-S クラスター転移機能)を発現する多機能蛋白質である可能性が示された。(JSPS KAKENHI Grant No. JP18K06174)

[1] Ritz T, *et al.*, *Biophys J.* (2000) 78, 707; [2] Maeda K, *et al.*, *PNAS.* (2012) 109, 4774; [3] Gegeer RJ, *et al.*, *Nature* (2008) 454, 1014; [4] Wu H *et al.*, *Sci Rep.* (2020) 10, 7364; [5] Qin S, *et al.*, *Nat Mater.* (2016) 15, 217

弱い相互作用によるシュウドアズリンの動的構造変化 Effect of Noncovalent Weak Interaction on Dynamic Structure of Pseudoazurin

橋本将太¹、山口峻英^{1,2}、Attila Taborosi¹、Kathleen Wood³、Alice
Klapproth³、高妻孝光^{1,2}

1 茨城大院理工、2 IFRC、3 ANSTO

シュウドアズリン(Pseudoazurin : PAz)は、脱窒菌において、亜硝酸還元酵素と亜酸化窒素還元酵素に電子を供与する銅イオン含有タンパク質である。PAz の全体構造は、C 末端側にある 2 つの α -ヘリックスと、8 本のストランドからなる β -バレル構造からなる。*Acromobacter cycloclastes* 由来の PAz は、銅イオンに His40、Cys78、His81、Met86 が歪んだ四面体型に配位したタイプ 1 銅を有している。活性中心の His81 のイミダゾール環と、第二配位圏の Met16 側鎖の硫黄原子との間に S- π 相互作用が存在し、タンパク質の機能や構造に大きな影響を与えていると考えられている。これまで、Met16 位を芳香族アミノ酸(Phe、Trp、Tyr)や脂肪族アミノ酸(Ile、Val、Leu)に置換した変異体の分光学的・電気化学的性質と構造安定性が変化することが報告されている[1,2]。本研究では、野生型および Met16Ile 変異体の動的構造を中性子準弾性散乱法(Quasi-elastic Neutron Scattering:QENS)で測定した。

PAz の QENS を 283 K で測定したところ、Met16Ile 変異体のスペクトルが WT に比べて、中心付近の散乱強度が小さい幅広いスペクトルになった(Fig. 1)。フィッティングにより解析したところ、各 Q 値において、Met16Ile PAz の半値全幅(FWHM)が、WT よりも大きいことが判明した(Fig.2)。これは、第二配位圏と活性中心との弱い相互作用の変化によって、Met16Ile の動的構造が増加したことを示している。

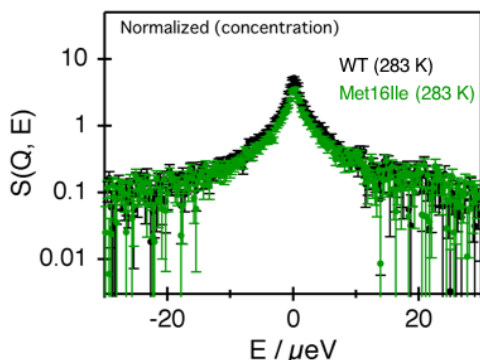


Fig.1 WT と Met16Ile 変異体の散乱スペクトル

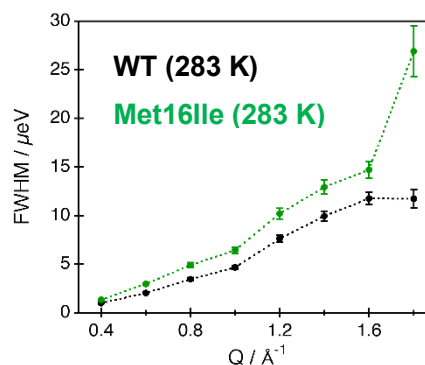


Fig.2 FWHM vs. Q

References.

1. M.B. Fitzpatrick et al, *J.Inorg.Biochem.*, **2010**, 104, 250–260
2. Yamaguchi et al, *Protein Society*, **2017**, 26, 1921–1931

免疫チェックポイントタンパク質の放射線応答解析 Analysis of immune checkpoint proteins in radiation response

大原 麻希、宇佐美 徳子
KEK-IMSS-PF

がんに対する治療法には手術療法、化学療法、放射線療法、免疫療法の 4 種類がある。近年注目を集めているがん免疫療法は体の免疫を強めることによりがん細胞を排除する治療法で、がん細胞が免疫機能を抑制する仕組みを解除して活性化を持続させる免疫チェックポイント阻害剤や、全体的な免疫機能を促進するサイトカイン療法などが行われる。免疫チェックポイント阻害剤のターゲットの 1 つである PD-L1 (Programmed cell Death ligand 1) はいくつかのがん細胞において高発現し、CMTM6 (CKLF-like MARVEL Transmembrane domain-containing 6) により発現が維持されている。放射線の細胞応答において PD-L1 は DNA 損傷シグナル依存的に ATM/ATR や STAT1/3 などの経路を介して細胞膜表面への発現が誘発される。CMTM6 も一部のがん細胞で高発現してがんの悪性化に関与することは報告されているが、CMTM6 の発現調節機構は明らかにされていない。本研究ではがん細胞の免疫チェックポイントタンパク質の放射線応答を解析するため、ヒト悪性黒色腫 A2058 細胞を用いて、X 線照射後の PD-L1 と CMTM6 の局在と発現量変化を調べた。

細胞全体への X 線照射により PD-L1、CMTM6 とも発現量が増加することが確認できた。これらの発現変化が DNA 損傷応答と関連するのかを検討するため、放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置を用いて、核のみ、細胞質のみに限定照射した場合の発現変化を調べたところ、PD-L1 は核のみの照射でも発現量の増加が見られ、DNA 損傷依存的に発現調節されることが確認できた。一方、CMTM6 は核のみへの照射では発現量が増加しなかった。CMTM6 の放射線応答は PD-L1 とは異なる経路を介すると考えられる。今後は放射線誘発 CMTM6 発現増加に必要な細胞内器官を特定するため、細胞内照射領域を変えて CMTM6 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

α B-クリスタリンのサブユニット交換機構 Mechanism of subunit exchange in α B-crystallin

井上倫太郎¹、酒巻裕介¹、高田匠¹、Kathleen Wood²、守島健¹、奥田綾¹、
清水将裕¹、佐藤信浩¹、裏出令子¹、藤井紀子¹、杉山正明¹

1 京大複合研、2 ANSTO

水晶体はレンズとして機能するため 100~200mg/mL という高いタンパク質濃度を維持している器官である。非常に興味深いことに水晶体は上述した非常に高いタンパク質濃度を維持しているにも関わらずに、少なくとも半世紀以上はその透明性を保持している。その水晶体の透明性の維持に深く関与しているのが、クリスタリンの主要構成成分である α -クリスタリンのシャペロン機能である [1]。これまで α -クリスタリンのシャペロン機能解明のために構造機能相関を調べる研究がなされたが、結晶構造 (4 次構造) が得られていないため未だ明確な結論は得られていない。

我々は α -クリスタリンの 4 次構造が未だ解明されていない原因として、 α -クリスタリン分子同士のサブユニット交換によると仮定した。この仮定を立証するため、 α -クリスタリンのサブユニットの一つである α B-クリスタリンを用いてサブユニット交換の有無を希薄環境下 (~ 1 mg/mL) で重水素支援中性子小角溶液散乱と無変性質量分析法の組み合わせた実験により確認をした [2]。そこで、更にサブユニット機構を詳細に解明するために、サブユニット交換における濃度依存性の検討を行った。今回は、準濃厚環境下 (~ 30 mg/mL) における α B-クリスタリンのサブユニット交換を、重水素支援中性子小角溶液散乱に加え、X 線小角溶液散乱、動的光散乱、分析超遠心等の様々な手法を統合的に組み合わせることで機構解明を行なったので報告する [3]。当日は、更なる高濃度環境下 (~ 100 mg/mL) におけるサブユニット交換を観測するための技術開発も紹介する。

[1] J. Horwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10449 (1992).

[2] R. Inoue, *et al. Sci. Rep.* **6**, 29208 (2016).

[3] R. Inoue, *et al. Sci. Rep.* **11**, 2555 (2021).

糖ガラスに包埋されたタンパク質の構造安定性 Structural Stability of Proteins Embedded in Sugar-Glass

平井光博¹、新井栄揮²、中川洋³、味戸聡志³、岩瀬裕希⁴

1 群馬大学、2 量研機構、3 原子力機構、4 総研機構

昆虫や両生類の乾燥状態や低温状態などの極端環境耐性(クリプトビオシス「無代謝状態」)として、水に代わって生体成分や細胞膜などを保護する「適合溶質」として糖を蓄積して代謝活動を停止・低下させて(冬眠, 乾眠)で生き延びることが知られている。このような環境耐性機構として、「ガラス状態説」(糖によるガラス化に伴う細胞膜やタンパク質などの高次構造の保護), 「水置換説」(結合水の代理をする糖による直接的な水素結合), それらの複合的作用の関与, などの説が有るが, 何れも分子構造レベルでの研究例は殆どないためその機構の詳細は未だに不明である。

一方, ES 細胞や iPS 細胞の医療応用が急速に展開する中で, 細胞の生存率が高い好適に使用できる細胞ガラス化保存液の開発が重要となっている。現在開発されている保存液は, エチレングリコール, プロピレングリコールやジメチルスルホキシドなどの細胞膜透過性物質と糖類, 糖アルコール, ポリエチレングリコール, ポリビニルピロリドンなどの細胞膜非透過性物質を含んでおり, 特に, トレハロースおよびスクロースは, ガラス化促進物質として使用されているが, 細胞の保存率や生存率の顕微鏡を用いたマクロスケールでの経験的な確認に留まっているため, 細胞膜やタンパク質そのものに対する保存液の効果に関するナノスケールレベルでの構造物性の知見が明らか不足しており, それらの向上が課題となっている。さらに, 糖質は脂質およびタンパク質と並ぶ食品三大成分の一つであると同時に, 食品加工における温度および水分含量の変化によって, 糖質は様々な物理的性状変化(結晶化, 融解, ガラス転移, 包摂複合体形成など)を示し, 食品の品質や保存を決定付けている。現在, 「食材の凍結、貯蔵、解凍」におけるガラス転移の重要性が認識されつつある。T_g よりも高い保存温度では温度差が大きければ食品の傷みはひどくなるが, 通常の食品(肉, 魚, 果実, 野菜)では T_g は-30℃よりも低く, 輸送等を考量すると経済的な採算性が低い。そのため, 糖添加(スクロースやマルトース)により T_g を上昇させ, 比較的容易な貯蔵温度に設定できれば, 保存や品質の期間の長期化が可能となる。

そこで, 生物の極限環境耐性や食品保存などで未解決となっている「糖ガラスの構造物性とその役割」を明らかにするため, 各種糖ガラス・ラバー状態に包埋された数種類のタンパク質の構造を検討した。(科研費 20K03878)

光合成細菌光捕集タンパク質の分子内部動態観察

Molecular motion analysis of photosynthetic bacterial light harvesting 1 reaction center complex

本田舞^{1,2}、藤村章子²、佐々木大輔³、三尾和弘^{1,2}、大友征宇⁴、
佐々木裕次^{3,2}

1 横浜市立大生命医科学、2 産総研東大先端オペランド計測 OIL、3 東
大院新領域、4 茨城大学

光合成細菌のクロマトフォアを用いて光合成反応時の光捕集タンパク質の分子動態を計測した。光捕集タンパク質は光励起により呼吸様の運動(breathing motion¹)を起こすことが提唱されている。しかし、光エネルギーを化学エネルギーに変換する光化学反応時の各タンパク質の動態は未だに解明されていない。

我々は光化学反応が行われるクロマトフォアに金ナノ結晶を標識した。ピクセル毎の自己相関の減衰係数から分子運動速度を導出する X 線 1 分子運動回折法(DXB:Diffracted X-ray Blinking²)を用いて分子運動を測定した。DXB 法では、個々のタンパク質に標識された金ナノ結晶から得られた回折を高速時分割計測し、タンパク質 1 分子の動態情報を得る。特にタンパク質の θ 方向運動の検出が可能である。本実験では 50 ms/frame でデータを収集した。

クロマトフォアに異なる波長のレーザー光を照射し、励起応答に関する DXB 測定を行ったところ、波長特異的に光捕集タンパク質の運動を確認することが出来た。また、クロマトフォアの運動亢進と温度依存性の関係についても検討を行った。

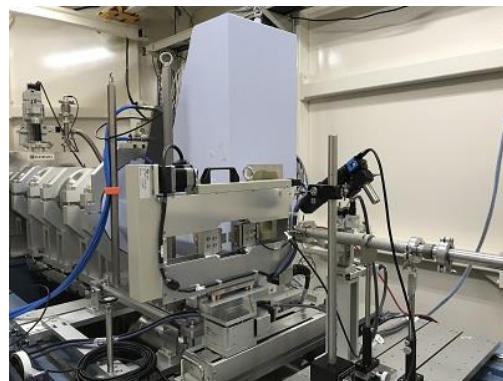
- 1) Heyes et al ., “Light-induced structural changes in a full-length cyanobacterial phytochrome probed by timeresolved X-ray scattering” *Communications biology* (2019)
- 2) Sekiguchi et al ., “Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions” *Scientific Reports* (2018)

Photon Factory の小角散乱ビームライン Small-Angle X-ray Scattering 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、羽方望³、五十嵐教之¹
¹高エネ機構・物構研・放射光、²三菱電機 SC、³日本アクシス

Photon Factory には、偏向電磁石光源の BL-6A, BL-10C、短周期アンジュレータを光源とする BL-15A2 という 3 本の小角散乱 (SAXS) ビームラインが稼働している。いずれのビームラインも、生体分子を含むソフトマテリアルからハードマテリアルまで広い試料分野を対象として、構造解析、及び構造物性相関解析等に活用されている。3 本のビームラインは基本的に統一的な高度化整備を行っており、共通の制御系、操作系を導入し、また試料環境装置に関しても、一部を除いて共通で利用できるように整備している。解析を支援するためのソフトウェアの開発も積極的に進めており、散乱強度の円周平均による解析を様々な実行可能な小角散乱解析用 SAngler と高角散乱解析用の FLOUNDER、PILATUS 検出器 (DECTRIS) で測定された画像データの GAP-less 画像合成用 Synthesizer、SEC-SAXS データ全自動解析用 MOLASS (旧名称: Serial Analyzer) を公開している。

試料環境装置として、加熱冷却ステージ (10002L (Linkam)、HSC302-LN190 (Instec)、36 連装回転式サンプルチェンジャー (理学相原精機)、SEC-SAXS 用 HPLC システム (Prominence-i、Nexera-i (SHIMADZU))、滴定 SAXS 用マイクロ流路システム、溶液フローシステム (ユニソク) などをこれまで公開しているが、今年度から 1 軸引張試験機 (アイエス技研) の供用を開始した。また、DSC-SAXS 測定を可能とするための DSC 装置 (DSC8231 (Rigaku)) のテスト運用、さらには北海道大学の真栄城博士と共同で進めている流路型の時分割溶液セルシステムのテストなども進めており、来年度以降、これらの装置も共同利用に供出するべく開発整備を進めている。発表では、ビームラインの開発、整備状況に関して紹介する。



1 軸引張試験機 (アイエス技研)

ヒト S100A3 蛋白質のシトルリン化モデルの溶液構造特性 The solution structural properties for a mutant model of the citrullinated human S100A3 protein

井手賢司^{1,2}、米澤健人³、木澤謙司⁴、北西健一⁵、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、5 東京理科大学

S100A3 蛋白質 (S100A3) は、毛髪キューティクル細胞に特異的に存在しており、共発現している蛋白質脱イミノ化酵素のⅢ型アイソザイム (PAD3) により、その Arg51 が選択的にシトルリン化される^[1]。この選択的なシトルリン化に伴い、S100A3 の Ca^{2+} 及び Zn^{2+} への結合親和性が協同的に上昇し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 依存的に構造が変化する。高齢者において、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 S100A3 のシトルリン化と毛髪の成熟化の関係をより詳細に理解するために、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合理型 S100A3 の構造を明らかにすることを考えた。そのためには PAD3 によってシトルリン化した S100A3 (R51Cit) を必要としたが、調製が困難であったため、Arg51 を他のアミノ酸に置換した変異体を R51Cit のモデルとすることを考えた。本研究では、野生型 (WT)、R51Cit と様々な変異体の物性を比較し、Arg51 をグルタミンに置換した R51Q が適したモデル変異体であることがわかった^[3]。

R51Q の Ca^{2+} と Zn^{2+} への結合親和性と $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 依存的な構造変化を評価するため、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、分析トリプトファン (Trp) 蛍光分析、円偏光二色性 (CD) スペクトル分析と X 線小角散乱 (SAXS) を行った。SEC 分析、Trp 蛍光分析と CD スペクトル分析から、R51Q は R51Cit と同等の $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合親和性を持っていることを確認した。SAXS の結果、金属が存在しない条件下では WT と R51Q の散乱曲線はほとんど重なった。この結果から、S100A3 はシトルリン化が生じただけでは分子概形が変化しないことを示唆した。さらに、 Ca^{2+} と Zn^{2+} が存在する条件下では、WT の散乱曲線が金属の存在しない条件のものとは一致し、分子概形が変化していないことを示した。それに対し、R51Q は Ca^{2+} と Zn^{2+} の存在により散乱曲線に変化が生じ、分子概形が大きくなっていることを示した。また、 Zn^{2+} の存在比が増加することで、分子概形がさらに大きくなっていることが示唆された。

[1] Kizawa, K., et al., *J. Biol. Chem.*, **208** (8), 5004-5013 (2008)

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

[3] Ite, K., et al., *ACS Omega*, **5** (8), 4032-4042 (2020)

金属錯体による絹の染色過程の検討 Study of Metal-mediated Silk Dyeing Process

山口峻英¹、中野睦子²、篠塚雅子²、星川晃範¹、日下勝弘¹、高妻孝光¹

1 茨城大学, 2 茨城県産業技術イノベーションセンター 繊維高分子研究所

絹は、衣服をはじめとして有用な生活材料として、古来より活用されてきたタンパク質である。染色技術は、社会に提供される上で、絹のような生体高分子材料に彩りを与え、付加価値をつけるという重要な役割を有している。染色過程には少なからず遷移金属錯体が媒染剤として利用されてきているが、これまで絹の染色メカニズムにおける媒染剤としての金属錯体の役割や高分子繊維への結合状態は未だ明らかにされていない。本研究では、絹フィブロイン染色における媒染剤モデルとして $[\text{Cu}(\text{bpy})]^{2+}$ 錯体 (bpy=2, 2'-ビピリジン) を用い(図 1)、絹の染色過程を検討した。

広角 X 線散乱法により絹の内部構造周期を調べたところ、繊維処理の方法によらず同じ位置に強度ピークが観測された。また $[\text{Cu}(\text{bpy})]^{2+}$ 錯体で試験的に染色した絹繊維の X 線吸収スペクトルを測定し、EXAFS では約 2 Å の距離に Cu-N と考えられる寄与が見出された(図2)。

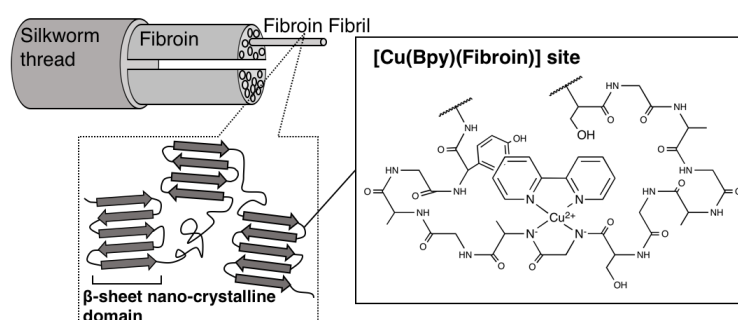


図 1. 予想される $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{fibroin})]$ の予想構造

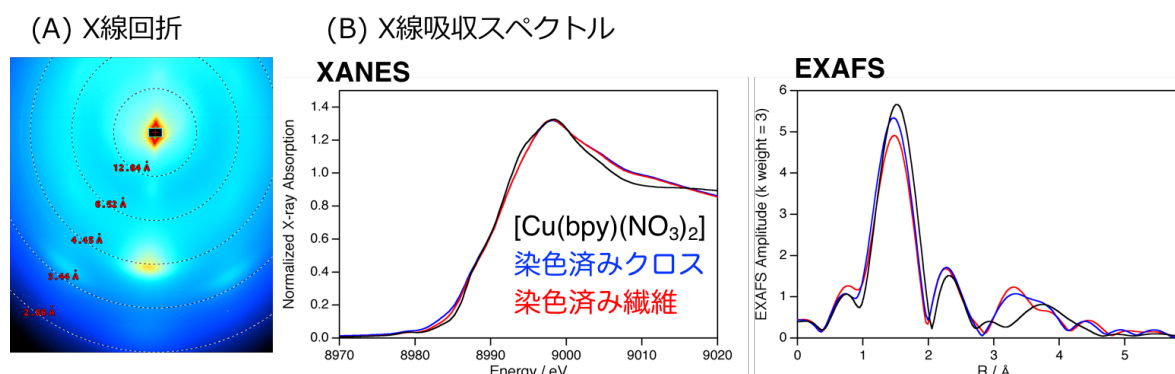


図 2. 絹繊維の X 線回折像と、 $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{fibroin})]$ の X 線吸収スペクトル

KEK クライオ電顕の共同利用型の運用と単粒子解析 Operation of cryo-EM in KEK and single particle analysis of multi-subunit complexes

安達成彦¹、川崎政人¹、守屋俊夫¹、阿久津誠人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。これらの生体分子が働く「仕組み」を理解する上で、その「形」を知ることは極めて重要であり、現代の生命科学において、タンパク質・核酸などの複合体、脂質を貫通する膜タンパク質複合体の立体構造解明は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強力な手法であるが、タンパク質を結晶化させることが必須である。タンパク質複合体、タンパク質-核酸複合体の結晶化はきわめて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、放射光施設におけるX線結晶解析・X線小角散乱と、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を統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 3EC を備え、画像コントラスト増強用の位相板を有している。同年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、6月よりユーザー向けの初期トレーニングを開始、10月より共同利用型の運用を開始した。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40件に達している。これまで、企業ユーザーは通算18社が利用し、2020年度は7社と年間契約を結んでいる。年間稼働日数は、メンテナンス100日、留保65日を除いた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、導入から34ヶ月で39種類のマップを得て、2020年度は3報の論文を出版した[1-3]。今後とも、ユーザーの方々と共に、KEKのクライオ電子顕微鏡を発展させていきたい。

- [1] Sato, Y. et al., J. Struct. Biol X 4, 100030 (2020)
- [2] Tojo, S. et al., Nature Comm 11, 5204 (2020)
- [3] Asai, T. et al., Structure 29, 1-10 (2021)

X 線回折法による血流を保った骨格筋の除神経後の変化 Effect of denervation on in vivo skeletal muscle with maintained blood supply using X-ray diffraction

中原 直哉、山内 秀樹、山口 眞紀、平野 和宏、竹森 重
東京慈恵会医科大学 分子生理学講座

【背景・目的】我々は骨格筋のサルコメア内構造の周期性に着目し、PF-BL6Aにて小角散乱を用いて生きたまま固定せずにサルコメア内微細構造を観測してきた。この手法を用いて神経切除後 0.5 日の細胞膜を除去した除膜筋細胞ではサルコメア格子間隔が狭くなることを既に報告している。ただし除膜筋細胞を用いる方法では拡散がよく ATP を入れた細胞内類液に浸漬することで生きた状態を保てる一方で、筋の摘出による影響や細胞膜がないことによる溶質分子の漏出の影響も考えられた。そこで今回、麻酔下で血流を保った全筋での除神経後のサルコメア格子間隔および赤道反射強度の変化を X 線小角散乱で調べた。

【方法】6 か月齢 ICR 系雌性マウスの片側坐骨神経を大腿部で一部切除し、他方は坐骨神経の剖出のみを行う Sham 側とした。PF-BL6A にて深麻酔下での長趾伸筋の X 線小角散乱像をイメージングプレートを用いて取得し、除神経処置後のサルコメア格子間隔および赤道反射強度を評価した。

【結果・考察】除膜筋線維の結果と同様に除神経後 0.5 日で除神経側のサルコメア格子間隔が狭くなる傾向がみられた。さらに処置後 2 日では除神経前と同程度のサルコメア格子間隔になり、処置後 5 日では除膜筋線維では認められなかったサルコメア格子間隔の増加が認められた。また、1,1 反射と 1,0 反射の強度比(1,1/1,0 比)が処置後 2 日までは大きな変化がなかったが、処置後 5 日で強度比が大きくなった。これらの結果から処置後 5 日目に部分的な筋の崩壊が始まることが示唆された。

【結論】除膜筋線維では認められなかった処置後 5 日での筋サルコメア構造の変化を血流を保った骨格筋でとらえられた。

シュウドアズリンにおける Open-Domain 型変性中間構造 Open-Domain Unfolding Intermediate of Pseudoazurin

津金聖和¹、山口峻英^{1,2}、TaborosiAttila¹、
Kathleen Wood³、Andrew Whitten³、高妻孝光^{1,2}
1 茨城大理工、2 IFRC、3 ANSTO

非共有結合性の弱い相互作用は、タンパク質の機能発現や構造安定化において重要な役割を演じている。シュウドアズリン(PAz)は、脱窒菌において亜硝酸還元酵素(NiR)と亜酸化窒素還元酵素(N₂OR)への電子供与体として機能している。シュウドアズリンの活性中心には、銅イオンに His40、Cys78、His81、Met86 の4つのアミノ酸が配位し、歪んだ四面体構造を有している。これまで、活性中心の第二配位圏において His81 に弱く相互作用する Met16 を他のアミノ酸残基に置換することで、活性中心の分光学的・電気化学的性質や構造安定性が変化することを報告してきた[1-3]。本研究では、野生型 PAz および Met16 変異体 (Met16Phe、Met16Ile) の酸変性過程を中性子小角散乱法、MD 計算によって明らかにした。また、Met16 変異体の X 線結晶構造を比較し、変異導入部位近傍の水素結合距離の変化を明らかにした。

pD 3.0 における野生型 PAz の中性子小角散乱と MD 計算から、C 末端ヘリックスとβバレルドメインが開いた Open-Domain 型の変性中間状態が明らかになった。Met16 変異体の X 線結晶構造では、C 末端ヘリックスに位置する Arg114 の N^ε 原子と、2 番の β-sheet に属する Asp13 の O^δ 原子の水素結合距離が変化し、構造安定性が高い場合にこの距離が短くなることが判明した。また、C 末端ヘリックスとβバレルドメインを繋ぐヒンジ部分に位置する、Lys24 の N^ε 原子と Asp94 の O^δ 原子の距離は、野生型 PAz、Met16IlePAz ではそれぞれ 2.79Å、2.69Å であったが、構造安定性が高い Met16Phe の場合は水素結合が消失しているものと考えられた。

1. R. F. Abdelhamid, Y. Obara, Y. Uchida, T. Kohzuma, D. M. Dooley, D. E. Brown, H. Hori, J. Biol. Inorg. Chem. 2007, 12, 165-173
2. M. B. Fitzpatrick, Y. Obara, K. Fujita, D. E. Brown, D. M. Dooley, T. Kohzuma, R. S. Czernuszewicz, J. Inorg. Biochem. 2010, 104, 250-260
3. T. Yamaguchi, Yuko Nihei, Duncan E. K. Sutherland, Martin J. Stillman, Takamitsu Kohzuma, Protein Sci. 2017, 26, 1921-1931