

小角散乱を用いた生体高分子の構造解析

名古屋大学シンクロtron光研究センター 杉本泰伸

はじめに

構造生物学は細胞を形作っている生体高分子の構造を解明することで、生命の仕組みを明らかにする研究分野であるが、対象は主にタンパク質となっている。これはタンパク質が様々な機能を固有の構造によって実現しているためであり、構造を知ることと機能を知ることがイコールに近い形で結び付けられているから、だと言える。さらに、一種類のタンパク質は基本的に均一の構造をとっており、それゆえ結晶化が可能であり、小角散乱による構造解析も可能となっている。以下に小角散乱によるタンパク質構造解析の基本について述べ、研究例を紹介する。

X線小角散乱実験

文字通りの「小角散乱」は対象によらないものだが、一般に生物系で小角散乱、あるいはSAS (small-angle scattering) と言うと溶液系での測定を指すことが多い。ここではタンパク質の溶液に対する小角散乱について、はじめにあいちシンクロtron光センターのBL8S3での実験を例として見ていく。

タンパク質溶液の精製は個々の試料に依存するが、小角散乱の測定のために重要なことは、夾雑物と重合や変性したタンパク質を取り除き、さらに非特異的な会合をなくす点である。とくに非特異的な会合の除去は重要であるが、これは小角散乱が分子会合に対して敏感であることが理由であり、結果的に会合体の存在によりデータの解釈を誤った方向に導きかねない。試料は測定直前に準備し、ゲルろ過クロマトグラフィーなどによる精製を行うことが望ましい。あいちSRのBL8S3での測定は通常、溶液セルを利用した静的な実験により数十秒程度の露光時間で行う。近年はフローセルにより試料の放射線損傷を抑えるようにした測定や、ゲルろ過クロマトグラフィーとX線散乱測定セルを直結して行うSEC-SAXSなどが徐々に広く用いられるようになってきているが、BL8S3では現在のところ未対応である。1回、もしくは複数回の露光によりタンパク質試料の散乱を測定すると、二次元検出器でデータ化されると同時に一次元化された散乱強度が得られる。測定はタンパク質溶液と共に溶媒の散乱も測定する必要がある。これらのペアを、一つのタンパク質に対して mg/mL のオーダーの濃度シリーズを数点測定することが一般的である。溶液と溶媒の散乱強度は、散乱と同時に測定している照射 X 線の入射強度積分値で規格化したのち、両者の差をとることで「タンパク質試料の散乱」を得ることができる。

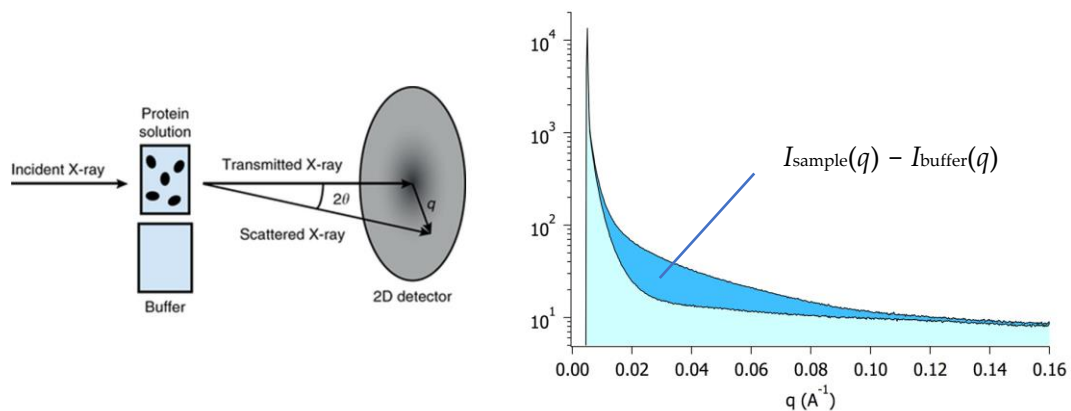


図1 タンパク質溶液の小角散乱の概念を示した。溶液中にあるタンパク質はあらゆる方位を向いて存在しており、散乱は空間平均となる。同時に測定する溶媒 (buffer) の散乱との差 $I_{\text{sample}}(q) - I_{\text{buffer}}(q)$ をとることにより、正味のタンパク質の散乱が得られる。

古典的な構造解析

近年は低分解能ながら三次元構造のモデルを導出できたり、バイオインフォマティクスの技術と組み合わせた解析によりアミノ酸レベルでの構造、また構造アンサンブルモデルなどを導出したりと、小角散乱の一次元散乱強度から得られる情報は格段に増加している。これらの発展のきっかけともいえる *ab initio* ビーズモデル解析法を開発した Svergun は、「これまでは慣性半径以外のものが得られるとは思われていなかった」と述べている。こうした新しい解析法以前の、慣性半径が得られる古典的な解析について簡単に述べる。溶液中の分子は時間平均するとあらゆる方向をとることから、分子からの散乱を考察するには空間平均を考える。1個の分子からの散乱は以下の式によって与えられる。

$$i(q) = 4\pi \int_0^D p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr$$

ただし、 $p(r)$ は

$$p(r) = r^2 \gamma(r)$$

$$\gamma(r) = \frac{1}{V} \int \rho(\mathbf{r} + \mathbf{r}') \rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'$$

で与えられる。溶液中の個々の分子は十分に希薄であり、したがって互いに散乱を干渉しないと考えられるので、散乱強度は

$$I(q) = N i(q)$$

となる。タンパク質溶液は単分散であり、理想的な希薄溶液であると考えている。散乱強度は構造に依存するが、小角領域だけを近似すると次のギニエの近似式が得られる。

$$I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{R_g^2}{3} q^2\right)$$

ここで

$$R_g^2 = \frac{\int \rho(\mathbf{r}) r^2 dV_r}{\int \rho(\mathbf{r}) dV_r}$$

$$I(0) = \left\{ \int \rho(\mathbf{r}) dV_r \right\}^2$$

である。 R_g が慣性半径と呼ばれる量であり分子の広がりを表す。 $I(0)$ は原点散乱強度を表し、タンパク質の場合は種類によらず電子密度がある程度一定だと仮定して、標準試料から相対的な分子量を求めることができる。これらのギニエ解析は小角散乱測定の基本となる。散乱強度は一次関数なので比較的簡単に慣性半径などを求めることができるが（例えば表計算ソフトでも可能である）、European Molecular Biology Laboratoryのグループにより開発された一連の解析ソフトウェアパッケージ ATLAS を用いることができる（<https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>）。ソフトウェアの一つである PRIMUS（図2）を利用することで、データを確認しながら、また一般的には経験の必要だった解析上のパラメータを自動的に当てはめながら、解析を進めることができる。

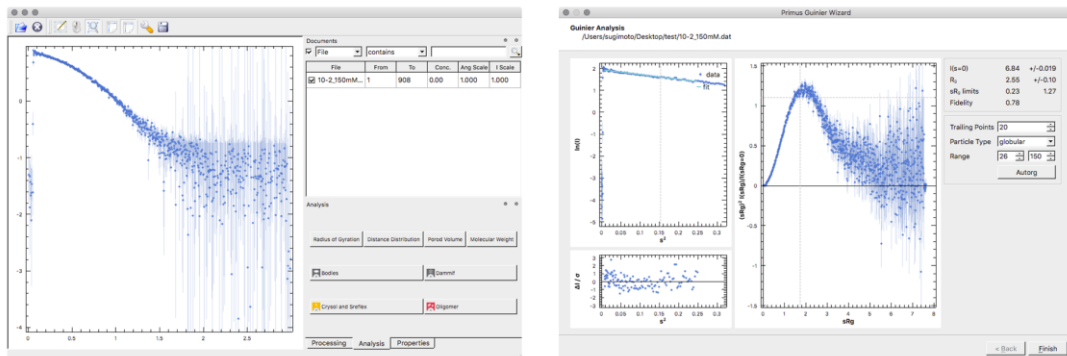


図2 ATLAS プログラムパッケージより PRIMUS を利用した散乱強度のプロットと、ギニエプロットによる慣性半径、原点散乱強度の解析を行った例。図では同時に Kratky プロットも示されている。

構造モデル解析

先に述べたように、散乱強度データから導出することができるようになった構造および動的情報は多い。このような構造モデルを構築するアルゴリズム発展の一つのきっかけとなったのは、ATLAS に含まれる DAMMIN であった。DAMMIN は「dummy atom」と呼んでいる小球の集合により任意の構造を作り出すものである。与えられた構造が、観測された散乱強度と一致するか否かは判断しながら、次々と構造を試していき、最適解を求めるプログラムとなる。問題は、通常このような最適解の探索を行うと、非常に多くの局所解が求

められてしまう点である。DAMMIN はモデル構造から予想される散乱強度が観測値に一致しているかに加えて、モデルに関するいくつかのペナルティ関数を導入して最適解を求める。こうすることで局所解を避ける仕組みを作り出している。

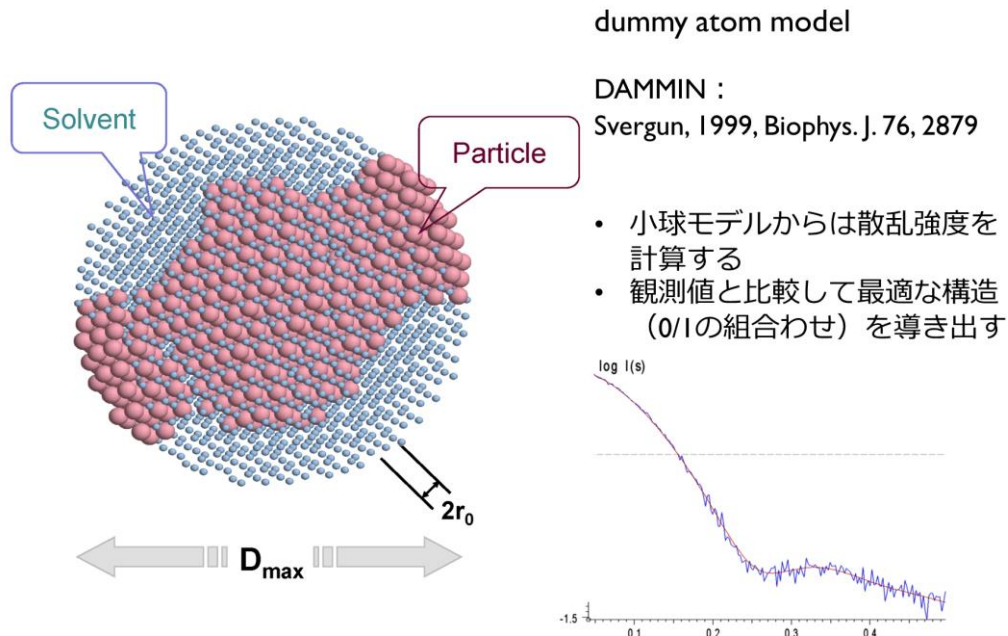


図3 dummy atom をつけた構造モデリングは、より現実的なタンパク質の構造を数値化した関数と散乱強度の一致度を合わせた評価関数から最適解を求めるものである。

研究例：タンパク質の多量体化の解析

細胞には多くの物理的、化学的な刺激が引き金となる信号伝達の仕組みがある。細胞外から与えられる刺激に対して、細胞内で最終的にはタンパク質の発現の形で刺激に対応するが、そのカスケードの中で機能を持つタンパク質分子に Ras がある。Ras は GTP 加水分解能を持つ低分子量 G タンパク質で、信号伝達を担う分子スイッチに相当する。Ras が GDP 結合型から GTP 結合型へとヌクレオチド交換されると活性型となり、細胞膜上で二量体になることで標的タンパク質との相互作用が可能となり下流側へ情報を伝達するとされている。標的タンパク質の種類によってその反応としては細胞の増殖、分化、アポトーシスなどがあり、Ras は生物学的にも重要な信号伝達に関与するタンパク質である。

このような研究の中で、光反応性のケージド化合物を Ras の C 末端領域に化学修飾すると多量体化した Ras が得られることが分かった。ここで見られる多量体化と細胞内信号伝達で生じている多量体化 (二量体化) の関係は明らかではないが、ケージド化合物による多量体化ということで光照射により化合物の遊離も制御できるため、この Ras 多量体の構造

と性質を X 線小角散乱で調べる研究を行った。

Ras タンパク質ファミリーの一つである分子量約 22 kDa の H-Ras を大腸菌発現系で調製した。このとき C 末端以外の Cys は変異させて、ケージド化合物 NBB を C 末端 Cys 残基に修飾した。タンパク質濃度は 2 - 8 mg/mL の間で調製し X 線小角散乱測定を行った。あいちシンクロトン光センターの BL8S3 を利用し、カメラ長 ~2 m、Pilatus 100K 検出器を用いて露光時間 30 秒の測定を行った。測定した試料は、調製した単体の Ras (native Ras) と NBB 修飾した Ras (NBB-Ras)、および NBB-Ras に紫外光を照射して NBB を遊離させたもの、標準試料としてのオブアルブミンである。

得られた散乱強度は規格化して溶媒の差をとり、ギニエプロットを行った。ギニエプロットから得られる原点散乱強度を濃度の関数としてプロットした (図 XX)。散乱強度から得られた見かけの分子量は、NBB-Ras では native Ras のおよそ 5 倍程度の結果となった。したがって、NBB の化学修飾で Ras は 5 量体を形成していることが示唆された。これはサイズ排除クロマトグラフィによる予想と近いものであった。また測定前に紫外光を照射すると見かけの分子量は低下した。NBB の遊離による Ras 多量体からの解離と考えられる。測定条件の試料では完全な単量体には解離していないものの、多量体と単量体の移行という分子のメカニズムを外部刺激から制御できる可能性を示した。

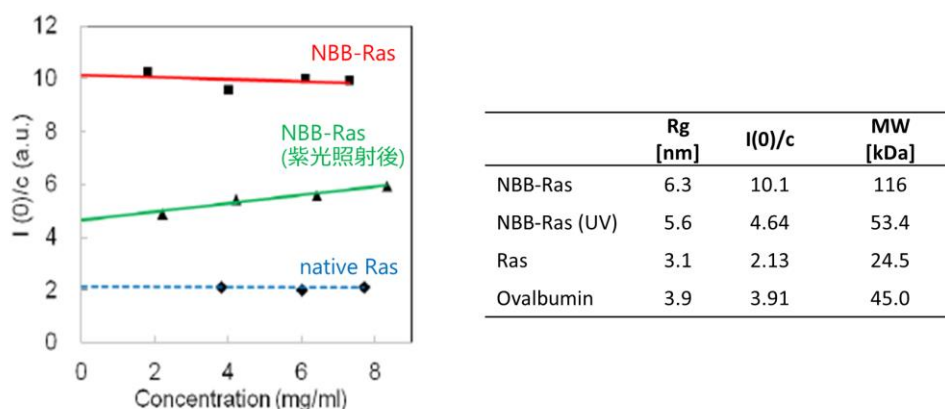


図4 Ras タンパク質にケージド化合物 NBB を化学修飾したものを小角散乱で測定した。ギニエ解析による分子量からは、native Ras にたいして NBB-Ras は 5 量体を形成していると予想できた。NBB は紫外光照射で Ras から遊離し、その結果 Ras は 5 量体から解離していることが予想されたが、完全に単量体になるには至っていないと考えられる。

本研究のように、単量体の分子構造を調べる実験ではない場合でも、構造モデルによる解析は可能である。今回は得られた散乱強度からビーズモデルを構築するにあたって、Ras が五量体であるという仮定を入れた上で、モデルが 5 回対称性を持つ条件に限定した解析を行ってみた。得られたモデルは花びらを持つドーナツ状であった。一方で native Ras について

もモデル構築はできるので、両者を重ね合わせて示した。5量体モデルの1個のローブと単量体モデルとは大ききさ的におよそ一致するものであった。

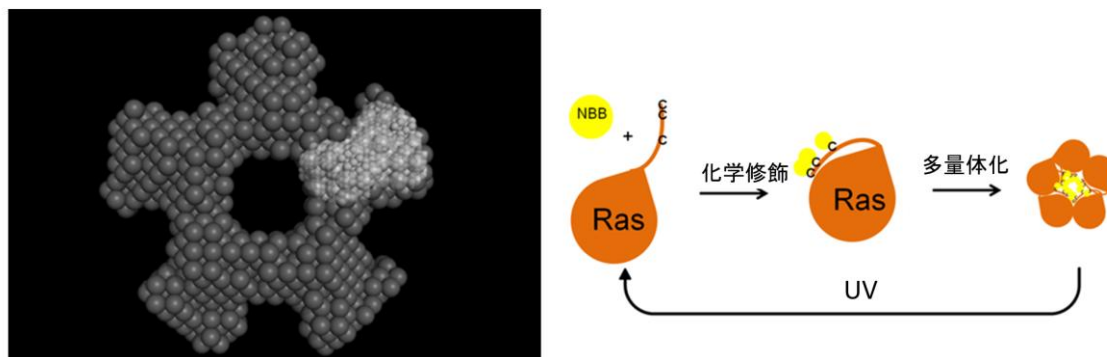


図5 NBB-Ras の構造モデルを構築した。ここでは5量体であり5回対称性を持つことを仮定したモデルとなっている。また同時に単量体である native Ras の構造モデルを構築し、NBB-Ras モデルに重ねた。薄色が native Ras のモデルである。こうした測定結果から、Ras の化学修飾と光照射による分子会合、解離を制御する可能性を示した。

以上の Ras に関する小角散乱実験を解析の観点から簡単にまとめると、

- 1) 試料調製、X線測定は一般的なプロトコルに従って行った
- 2) ギニエプロットによる解析では化学修飾およびケージド化合物の解離に伴うタンパク質の多量体化と解離の様子を主に分子量から求めた
- 3) ビーズモデルによる解析は多量体構造に対しては構造の対称性を仮定して求めた

この研究例ではタンパク質分子間の相互作用を含めた会合、解離を解析できた。光照射による NBB の遊離は比較的ゆっくりとした反応なので、時間分割による測定も行った。その結果は、5量体からの解離は中間状態を経るものではなく、5量体と単量体の二者平衡を示唆するものであった。詳細は解析中であるが、小角散乱はこうした動的性質を生理条件下で測定できる手法となっている。