

実験番号：201402024 03027 03049



AichiSR

溶液中の繊維状タンパク質の X 線小角散乱

杉本泰伸¹、林桜子²、林沙也加³、加藤一徳⁴

1) 名古屋大学シンクロトン光研究センター、2) 名古屋大学工学部、
3) 名古屋大学大学院工学研究科、4) あいちシンクロトン光センター

1. 測定実施日

2026年7月17日 10時 – 18時30分 (2シフト), BL8S3

2026年9月3日 10時 – 18時30分 (2シフト), BL8S3

2026年9月4日 10時 – 14時0分 (2シフト), BL8S3

2. 概要

II 型コラーゲン繊維について、無配向の溶液中と、溶液中で配向させた条件で、X 線小角散乱実験を行った。無配向溶液中では棒状分子としての散乱像から断面の慣性半径を求めた。溶液中のコラーゲン繊維を配向させた実験は、せん断流を使った繊維物質のアライメント装置を利用し、繊維軸方向の周期反射を観測することに成功した。

3. 背景と研究目的

アクチンやフィブロンネクチンのようなタンパク質、また DNA 鎖などのように繊維状ポリマーは生体高分子に見られる最も一般的な特徴の一つであり、このような繊維構造は生体の機能とも密接に関連している。しかしながら繊維状ポリマーは結晶化による構造解析は容易ではない。X 線小角散乱、X 線繊維回折は構造解析の一つの有効な手段であるが、筋肉などのように天然の組織内で非常に高度な周期性を持った高次構造の生体高分子の解析を除けば、繊維方向の配向などは容易ではなく、周期性を有効に利用して解析することは一般には困難である。本研究ではコラーゲンの繊維構造を X 線小角散乱法で調べるために、せん断流を利用して溶液中で繊維を配向させた測定[1]を行い、配向繊維からの回折像を得ることを目的とした。

コラーゲンは真皮、靱帯、腱、軟骨などを構成するタンパク質の一つで[2]、その組織構造は機能に密接に関係しており、生体組織に弾力性や強度を与える。原子レベルでの構造が知られているが、高次構造と機能の関係性については解明されていない部分も多く残っている。ここでは軟骨などに含まれる II 型コラーゲンを繊維化して、溶液中の構造を X 線小角散乱により調べた。

4. 実験内容

溶液中の繊維コラーゲンを無配向状態で測定した実験と配向させた実験の

二種類を行った。

ウシ軟骨由来の II 型コラーゲンを PBS 溶液中でインキュベートして繊維化させ（約 3 mg/mL）、溶液無配向の試料として X 線小角散乱実験を行った。測定は BL8S3 小角散乱ビームラインを利用し、カメラ長約 2200 mm、波長 1.5 Å の条件で、Pilatus 100K 検出器により 30 秒の露光を 10 シリーズ測定した。得られた散乱像からは X 線照射によるダメージがないことを確認した。回折像は円環平均して一次元化し、入射強度による規格化を行い溶媒散乱の差を取って散乱強度曲線を得た。コラーゲン繊維が溶液中で十分長い棒状分子であるとして、散乱強度のギニエ解析を行った。また、繊維化させた II 型コラーゲン溶液にメチルセルロースを混合して 1 % 溶液とし、配向試料の X 線散乱実験をおこなった。間隔 ~ 0.3 mm の高分子膜にはさんでせん断流により繊維を配向させ、小角散乱測定を行った。無配向溶液の実験と同様、BL8S3 でカメラ長約 2200 mm、波長 1.5 Å とし、検出器には R-AXIS を用いて 20 分間の露光を行った。

5. 結果および考察

無配向溶液の散乱像は 1 次元化した後、横軸 Q^2 、縦軸 $\ln[QI(Q)]$ でプロットすることにより棒状分子のギニエ解析を行い、断面の慣性半径を求めた。試料作成におけるインキュベート時間（5-9 時間）における断面慣性半径 R_c に大きな違いはなく、 $R_c = 22.2$ nm であった。コラーゲン繊維の断面が円であると仮定すると、これは半径 $r = 31.4$ nm に相当するものであった。

せん断流を利用して溶液中のコラーゲンを配向させ、小角散乱像を測定した結果を図 1 に示した。コラーゲンは繊維軸方向に 67 nm の周期構造を持つことが知られており、配向させることにより周期性に由来した子午軸反射が観測できた。これは無配向溶液の散乱像では観測できなかった。散乱像における周期反射を子午軸にそってプロットした物を図 2a に示した。2-10 次の反射が観測できた。これらの反射強度は積分して図 2b に示した。

本実験ではコラーゲンの構造の詳細を議論するにはいたらなかったが、繊維の大きさと、配向させることにより回折像を観測できることが示された。配向繊維の子午反射からは、特に 3、6、9 次の反射強度が強く観測された。また腱由来の乾燥コラーゲンからの反射強度と比較すると、2、4 次反射が弱く観察された。

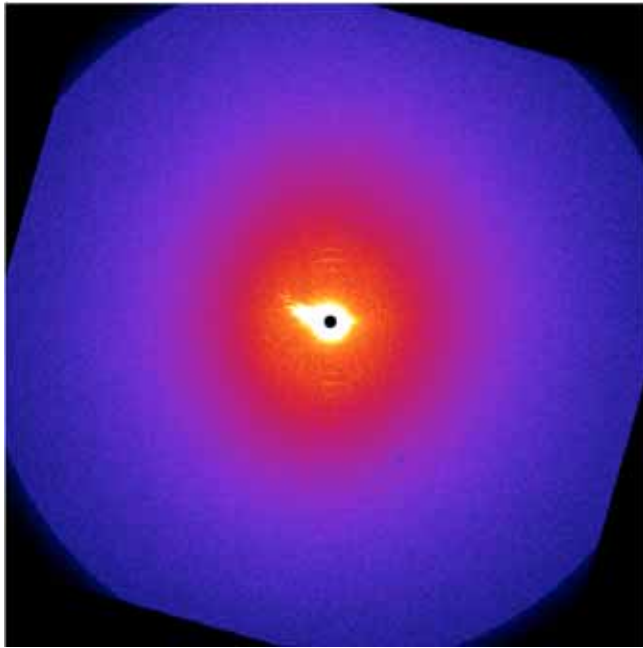


Fig.1 配向させたコラーゲン試料からの X 線小角散乱像

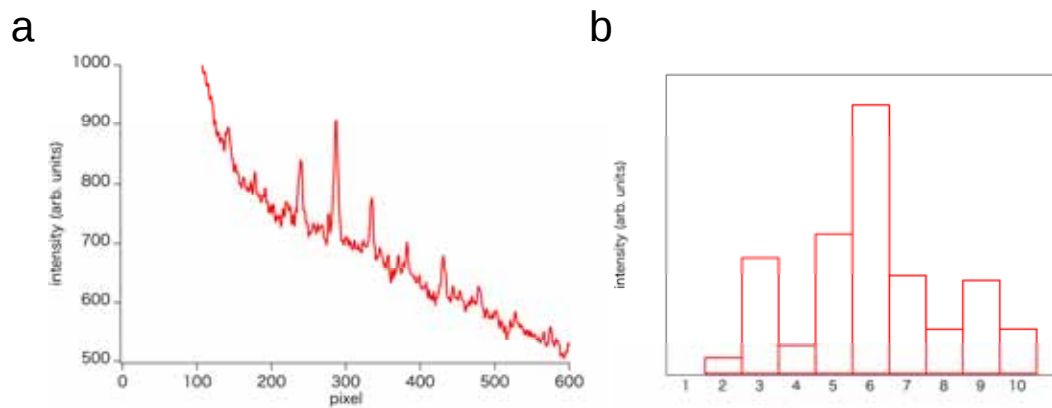


Fig.2 (a) 配向させたコラーゲン繊維の子午軸強度プロファイル (縦軸 Intensity (arb. units)) (b) 配向コラーゲンの n 次反射における散乱強度 (縦軸 I (arb. units))

6. 今後の課題

II 型コラーゲンの構造を議論するために、配向試料の X 線散乱像をより高い精

度で測定する必要がある。せん断流は、溶液試料を間に挟んだ 2 枚の高分子膜を回転させることで発生させているが、高分子膜の間隔および回転数についての条件を本実験試料に対して十分検討することができなかった。今後は条件を最適化し、S/N のよい散乱像を得ることを目指す。これにより周期内の **gap** と **overlap** の構造の詳細を溶液中のコラーゲンで明確にする。また、せん断流を使った配向 X 線小角散乱実験はコラーゲンだけでなく、繊維構造を持った他の生体高分子への適用は可能であるので、F-アクチンなどに対しても配向 X 線小角散乱実験を検討していきたい。

7. 参考文献

- [1] T. Sugiyama *et al.*, *Biophys. J.* **97**, 3132-3138 (2009)
- [2] M. D. Shoulders and R. T. Raines, *Ann. Rev. Biochem.* **78**, 929-958 (2009)