

小角X線散乱法による球状タンパク質の分子間相互作用の評価

(千葉大院・融合¹, 岡山大・理², 富山県大・工³, 立命館大・薬⁴)今村 比呂志¹, 森田 剛¹, 墨 智成², 磯貝 泰弘³, 加藤 稔⁴, 西川 恵子¹

A small angle X-ray scattering study on the intermolecular interaction of globular proteins

(Chiba Univ.¹, Okayama Univ.², Toyama Prefectural Univ.³, Ritsumeikan Univ.⁴)

[序]

タンパク質の凝集は、結晶化、ホフマイスター系列に従う塩析現象から神経変性疾患原因タンパク質の沈着、タンパク質医薬品の不溶化など、広範な分野に関わる問題である。また我々はタンパク質設計研究を通じて、人工設計タンパク質は不溶化（凝集）しやすく、天然タンパク質が実現しているような水に対する高い溶解性を持っていないことを確認した[1]。これらの問題に対してはタンパク質の分子間相互作用を評価することが有用と考え、本研究では溶液中におけるタンパク質分子配置に起因するX線散乱に着目した。溶液中におけるタンパク質の小角X線散乱の強度 $I(q)$ は以下の式で記述される。

$$I(q) = ckP(q)S(q) \quad (q \text{ は散乱ベクトルの絶対値, } c \text{ はタンパク質濃度, } k \text{ は定数})$$

$P(q)$ はタンパク質の形状、大きさに依存する散乱（形状因子）であり、 $S(q)$ はタンパク質粒子間に起因する散乱（構造因子）である。 $S(q)$ は液体論と同様の取り扱いをすることで、フーリエ変換によりタンパク質粒子間の動径分布関数、さらにOrnstein-Zernikeの式とclosure方程式を組み合わせることで、分子間ポテンシャルと関係づけることができる。我々はこの構造因子 $S(q)$ を利用して、球状タンパク質の分子間相互作用を議論することを目的とした。

[実験]

ミオグロビンの溶液小角X線散乱測定はSAXSess(Anton Paar社, $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$, 検出器Imaging Plate)で行った。リゾチーム溶液の測定はPhoton Factory (高エネルギー加速器研究機構, $\lambda = 1.50 \text{ \AA}$, 検出器Pilatus300KW) のBL10Cで行った。放射光照射によるタンパク質の損傷を防ぐため、0.26 wt%リゾチーム溶液は、溶液を流動させながら1分露光し、80回分を平均化した。10 wt%のリゾチーム溶液は、露光2分で2回測定し平均化した。

[結果と考察]

対象としたミオグロビンは、酸素の貯蔵に必須なリガンドであるヘム（ポルフィリン類）を持っている。興味深いことに、ヘムが結合したミオグロビン（ホ口体）が非常に高い水への溶解度を示すのに対して、ヘムが外れたミオグロビン（アポ体）は凝集しやすく、条件によってアミロイド線維となることが報告されている[2]。タンパク質濃度で規格化した散乱強度をみると、ホ口体とアポ体の6.3 wt%ではいずれも0.5 wt%に比べて粒子間相互作用による散乱強度の変化が観測された（図1）。分子間ポテンシャルとして、Derjaguin-Laudau-Verwey-Overbeek (DLVO)モデルの形を仮定し、実験で得られた構造因子 $S(q)$ を再現する分子間ポテンシャルを探索した。結果、図2に示すようにアポ体ではタンパク質分子同士が接触する付近の領域に強い引力を示すポテンシャルが得られた。一方、ホ口体の接触領域の引力は、熱エネルギー（ $\sim k_B T$ ）程度であり、一度分子が接触しても容易に再度離れることが示唆された。得

られた描像は、ホロ体の高い溶解度や、アポ体の不可逆的な凝集現象と合致するものである。興味深いのは、天然構造を保ち、かつ凝集していない条件で、このような相互作用の違いがみられているということである。

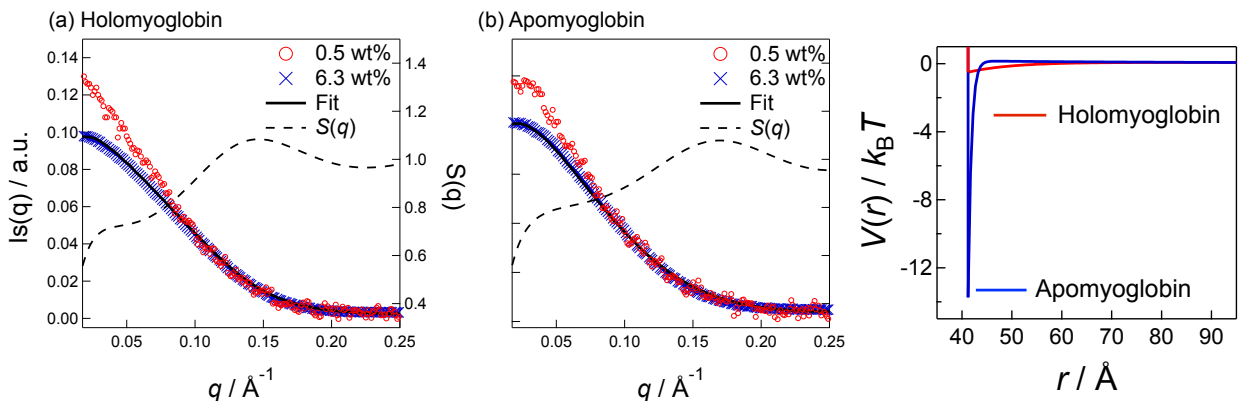


図1. ホロ体(a)およびアポ体(b)ミオグロビンの小角X線散乱

図2. 分子間ポテンシャル

上記の解析においては、ポテンシャル関数を仮定して、さらに既知のパラメータ値（有効電荷、誘電率、デバイ長など）が必要であった。また、タンパク質の分子間相互作用がDLVOモデルで記述できる保証はなく、溶媒分子の寄与による分子間相互作用（例えば疎水性相互作用）が有意な可能性もある。そこで我々は上記の解析とは別に、 $S(q)$ からポテンシャル形状を仮定せず、積分方程式を用いて、ポテンシャルを得る新規の解析法（モデルフリー解析）の開発を進めた。本方法では分子間ポテンシャルを斥力コア部と"それ以外"による寄与とし、後者にrandom phase approximationを適用して、hypernetted-chain近似にbridge補正を考慮するclosure式を導いた。この式を用いることにより、モデルポテンシャル形状を仮定する必要がなくなり、代わりに実験で得られる $S(q)$ を入力として積分方程式を自己無撞着に解くことにより、動径分布関数および分子間ポテンシャルを得ることが可能になった。リゾチームの小角X線散乱の $S(q)$ およびモデルフリー解析の結果を図3に示す。

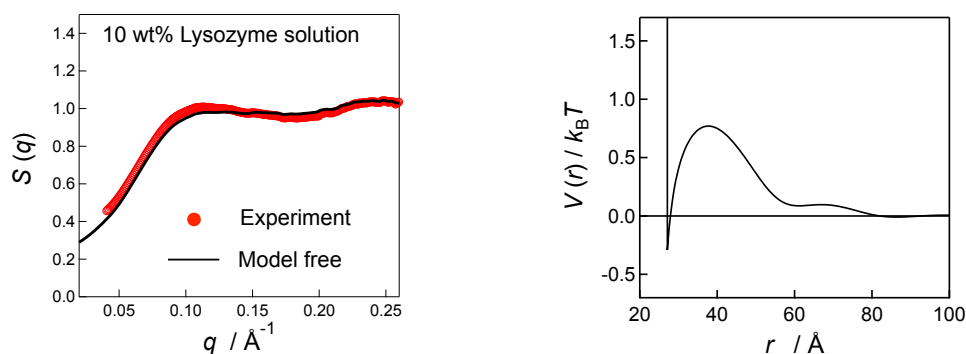


図3. (左) 実験およびモデルフリー解析で得られたリゾチームの構造因子 $S(q)$
(右) モデルフリー解析で得られたリゾチームの分子間ポテンシャル

[1] Imamura, H., Isogai, Y., Kato, M. (2012) *Biochemistry* **51**, 3539-3546.

[2] Fändrich, M., Fletcher, M. A., Dobson, C. M. (2001). *Nature*. **410**, 165–166.