

脂質・タンパク質系の 放射光X線・中性子散乱利用の有効性と展望

X線・中性子小角散乱の相補的利用と得られる構造情報を中心として

群馬大学大学院工学研究科 平井光博

連絡先:

mhirai@fs.aramaki.gunma-u.ac.jp

027-220-7554

目次

- [1] X線・中性子散乱法の役割, 得られる構造情報, いくつかの解析法
- [2] 放射光X線と中性子線の特徴の比較, その相補性
- [3] 応用例
 - 1) タンパク質の階層構造と放射光X線広角散乱
 - 2) タンパク質の立体構造構築原理とアミロイド化に関する研究
 - 3) 生体脂質ミセル, リボソームの機能構造に関する研究
- [4] 量子ビームを用いた生命科学の今後の展望

「細胞，その動的なるもの」

細胞の構造と物質輸送

細胞内膜系の機能：生存に不可欠な様々な生化学反応の場

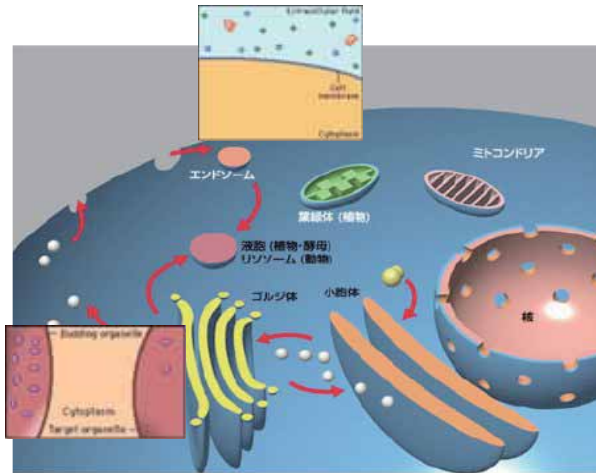
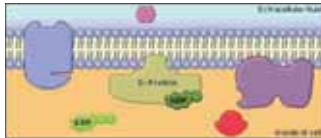
細胞内膜系（オルガネラ：細胞内小器官）

- 反応の場としての膜の増加
- 細胞質と隔絶された局所環境の形成，反応・機能の分業
(代謝反応物の濃縮，反応の加速，分解酵素のような危険なものとの隔離など)

オルガネラ群を結んで造る動的な輸送ネットワーク（メンブレントラフィック）

- 細胞の有効表面積の増大
- 細胞膜や各オルガネラの膜の恒常性維持
(タンパク質や脂質を所定の場所への移送)
- 外部環境との大規模かつ多面的な相互作用の装置としての機能
(栄養摂取，抗体分泌など)
- 細胞間の情報や物質の交換
(細胞極性形成，情報伝達物質の放出や取り込みなど)

細胞膜情報伝達



細胞小器官（オルガネラ）を結ぶ輸送ネットワーク

生命科学におけるX線・中性子構造生物学の役割

(階層構造とダイナミクスの解明)

生体系の各構成要素の性質と相互作用，階層構造 (molecule, cell, tissue...)

広い時間・空間スケールで起きる生体反応・機能発現の多様性

in vivo, in vitro...
*in situ*測定的重要性

様々な階層レベル(時空間)における構造とダイナミクスに関する情報

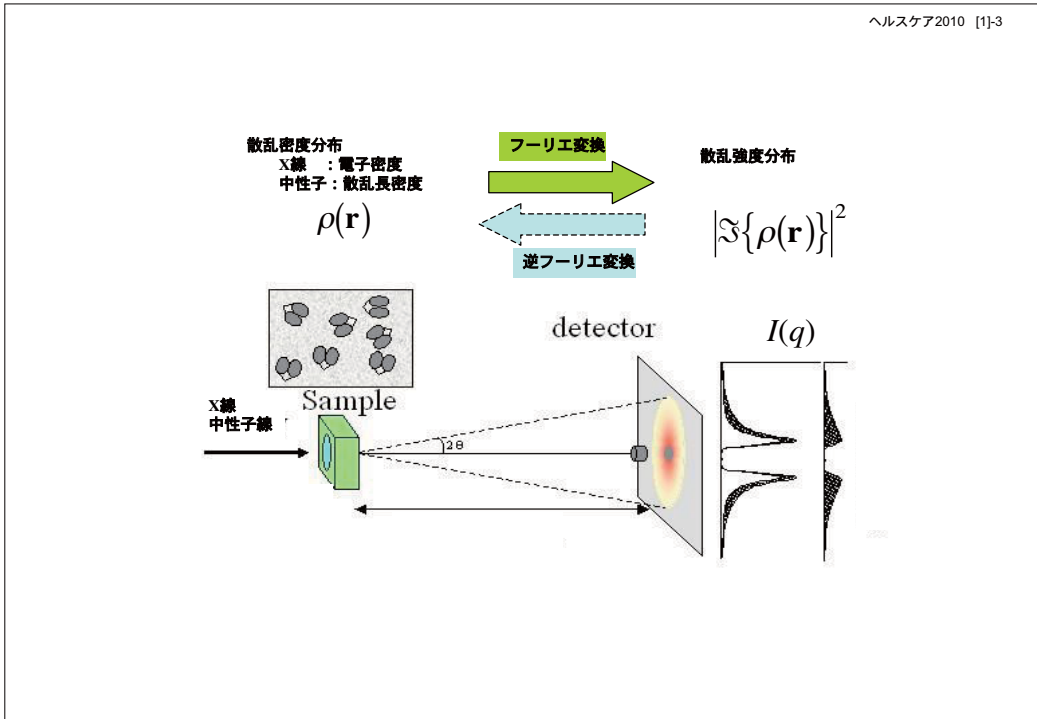
SAXS, WAXS, SANS, NSE
SR-XR, NR...

多様な物理・化学的，生理的な環境下(溶液中)における中性子・X線測定

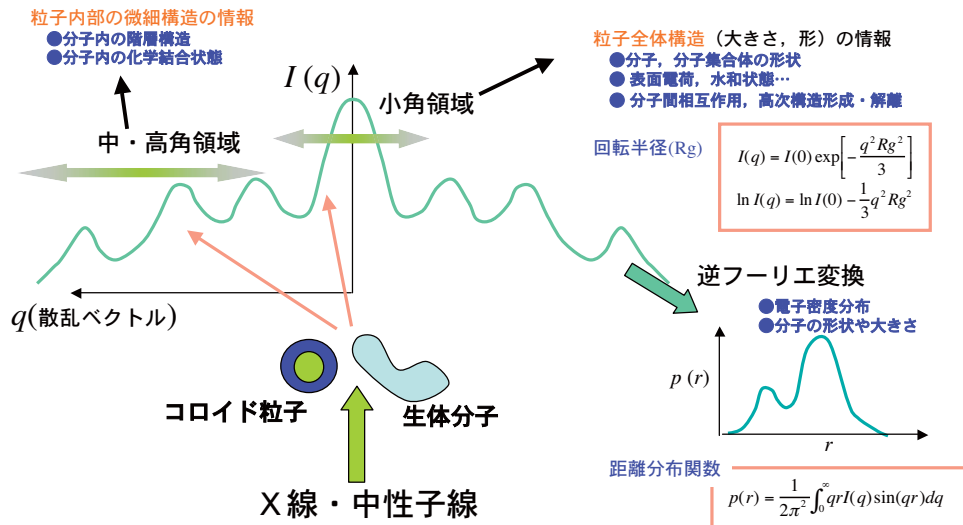
高い統計精度のデータ & モデル解析

- 分子，分子集合体の形状
- それらの内部構造，表面電荷，水和状態...
- 分子間相互作用，高次構造形成・解離
-

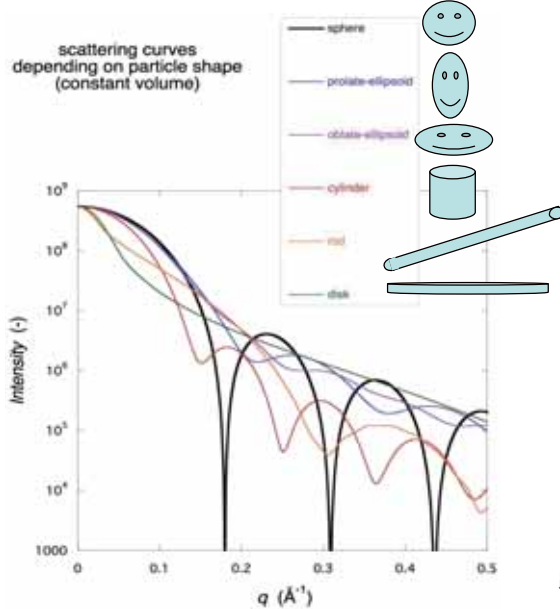
ナノスケールレベルでの生体反応システムの解明



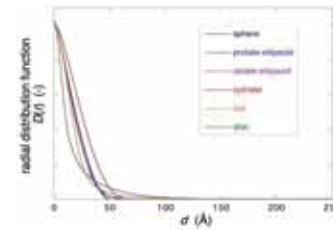
X線・中性子散乱法によって得られる 様々な構造情報



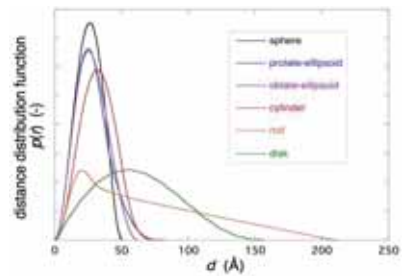
散乱曲線は粒子の形状に依存する



粒子の形状と動径分布関数



粒子の形状と距離分布関数

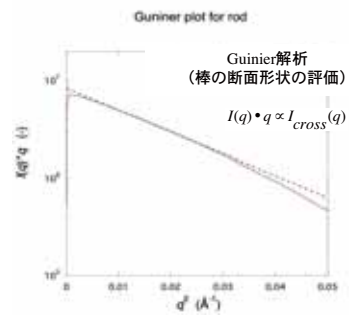
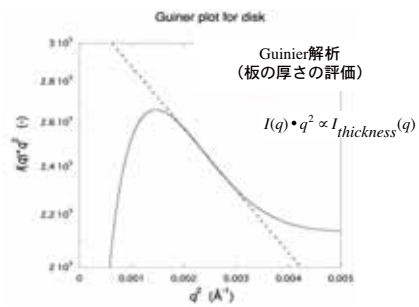
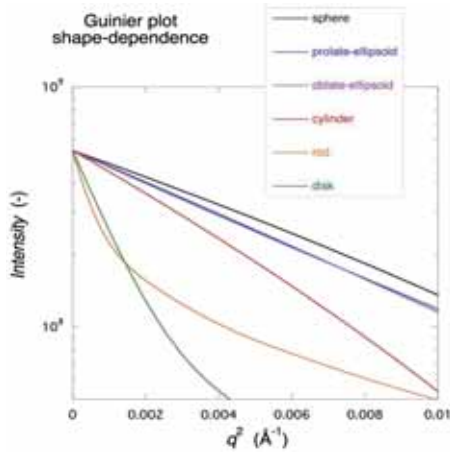


距離分布関数は粒子の形状を反映する。

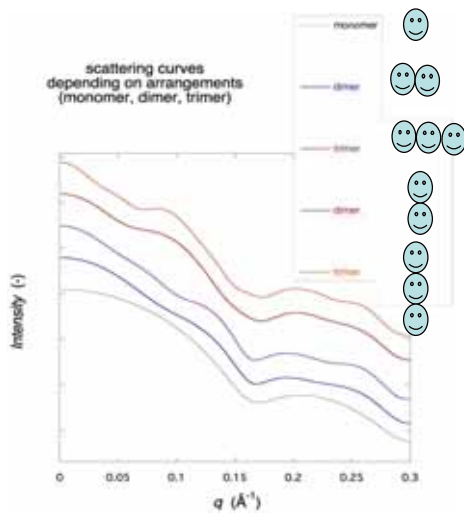
分子量や慣性半径を評価する (Guinier解析)

$$I(q) = I(0)\exp(-q^2 R_g^2 / 3)$$

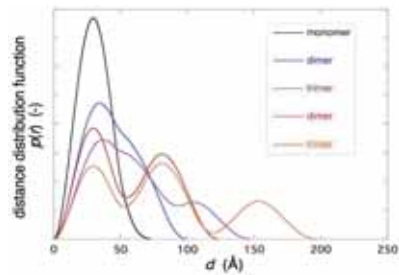
$$I(0) \propto N(\bar{\rho}V)^2 \propto NM^2 \propto cM$$



複合体粒子の配列に散乱曲線は依存する

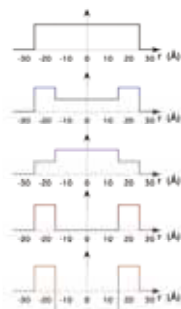
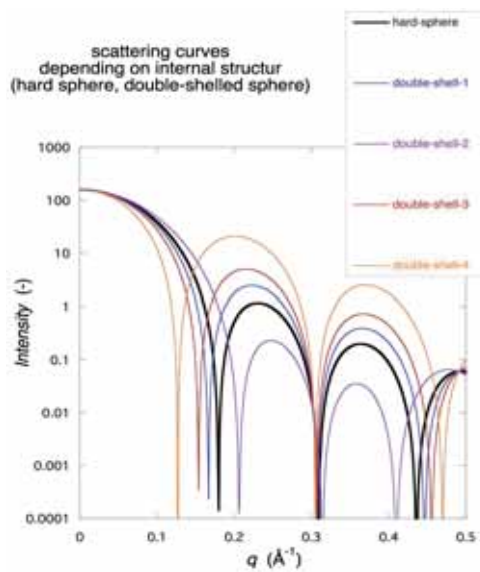


粒子配列と距離分布関数

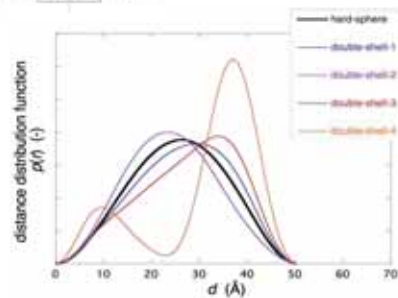


粒子が特定の配列をした複合体を形成すると距離分布関数から配置を予測できる。

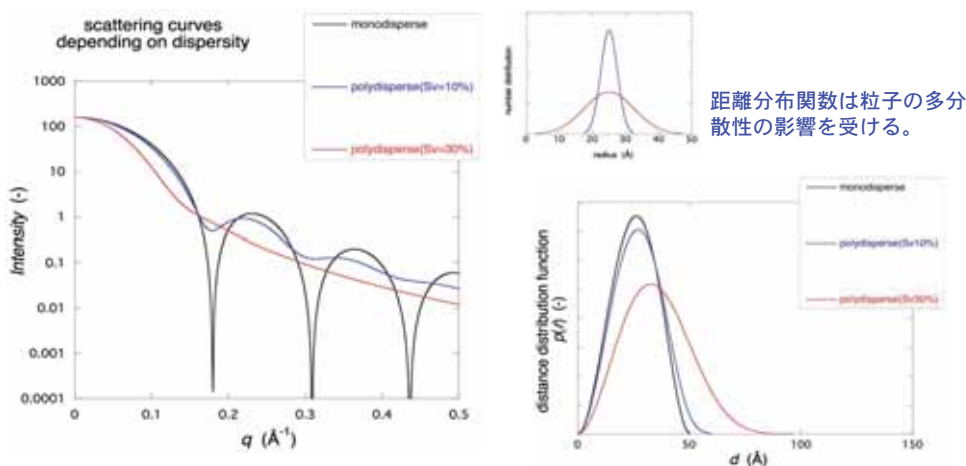
粒子の内部構造により散乱曲線は変化する



距離分布関数は粒子の内部構造を反映する。



散乱曲線から多分散性を評価する



小角散乱の基本的な各種の解析方法 (例)

分子の大きさ, 広がり

Guinier analysis:

$$I(q) = I(0)\exp(-q^2 R_g^2 / 3) \quad (1)$$

for a rod (height 2H, radius R)

$$I(q) = I(0) \frac{1}{2qH} \exp(-q^2 R^2 / 4)$$

for a disk (width 2H, radius R)

$$I(q) = I(0) \frac{1}{q^2 R^2} \exp(-q^2 H^2 / 3)$$

分子の大きさ, 形, 内部構造

Distance distribution function analysis:

$$p(r) = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty r q I(q) \sin(rq) dq \quad (2)$$

$$\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q I(q) \sin(rq) dq$$

$$I_{total} = \int_0^{D_{max}} p(r) dr \quad (3)$$

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{max}} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{D_{max}} p(r) dr} \quad (4)$$

凝集体の集まり方

Porod slope analysis:

$$\log I(q) = const. + \alpha \log(q) \quad (5)$$

$$\alpha = D - 6 \quad (\text{fractal dimension } D)$$

高分子鎖の剛直性

Kratky plot analysis:

$$q^2 I(q) \text{ vs. } q \text{ plot} \quad (6)$$

$$a = 1.91 / q^* \quad (\text{persistent length } a)$$

分子量

Zero-angle scattering intensity analysis:

$$I(0) \propto N \left[(\rho_p - \rho_s) V \right]^2 = N (\bar{\rho} V)^2 \quad (7)$$

where N, the number of the solute particles; V, the particle volume; ρ_p and ρ_s the average scattering densities of the particle and the water solvent ($\rho_s = (-0.562 + 0.0697x) 10^{10} \text{ cm}^{-2}$, x is the volume percentage of D₂O in water), $\bar{\rho}$, the average excess scattering density, so-called contrast.

分子の大きさ, 内部構造野不均一性

Stuhrmann plot analysis:

$$R_s^2 = R_{s0}^2 + \frac{1}{\bar{\rho}^2 V} \int_V \rho_f(\mathbf{r}) r^2 d^3 r - \frac{1}{(\bar{\rho} V)^2} \left(\int_V \mathbf{r} \rho_f(\mathbf{r}) d^3 r \right)^2 \quad (8)$$

簡便な形状モデルを用いた解析方法 (1)

Modeling Analysis

Form factor $A(\mathbf{q})$ of a particle composed of n subunits:

$$A(\mathbf{q}) = \int \left\{ \sum_{i=1}^n \rho_i(\mathbf{r}) + \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \right\} \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (1)$$

$$= \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{q}) \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_i)$$

where $A_i(\mathbf{q})$ represents the structure factor of the i th subunit with the scattering density distribution $\rho_i(\mathbf{r})$ and the mass center coordinate \mathbf{r}_i .

$I(\mathbf{q})$ averaged over the solid angle for a particle composed of identical subunits:

$$I(\mathbf{q}) = \langle A(\mathbf{q}) A^*(\mathbf{q}) \rangle$$

$$= (4\pi)^{-1} \int_{\Omega} I(\mathbf{q}) d\Omega$$

$$= (4\pi)^{-1} \int_{\Omega} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n A_i(\mathbf{q}) A_j^*(\mathbf{q}) \exp\{i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)\} d\Omega \quad (2)$$

$$= (4\pi)^{-1} \int_{\Omega} I_{sub}(\mathbf{q}) \left[n + \sum_{i \neq j} \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_{ij}) \right] d\Omega$$

where $\langle \rangle$ means the spherical average of the scattering intensity, $I_{sub}(\mathbf{q})$ is the scattering function of the subunit.

In the case of a particle composed of spheres with same radius r_0 :

$$I(q) \propto n I_{sub}(q) \left[1 + \frac{2}{n} \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}} \right] \quad (3)$$

where $I_{sub}(q)$ is well known the scattering function of the solid sphere and r_{ij} denotes the mass center distance between the i th and j th subunits. $I_{sub}(q)$ is given by

$$I_{sub}(q) = 9 \left\{ (\bar{\rho}_{sub} - \bar{\rho}_{sol}) V \right\}^2 \left\{ \frac{\sin qr_0 - qr_0 \cos qr_0}{(qr_0)^3} \right\}^2$$

簡便な形状モデルを用いたの解析方法 (2)

In the case of a particle composed of spheres with same radius r_0 :

$$I(q) \propto n I_{sub}(q) \left[1 + \frac{2}{n} \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}} \right] \quad (1)$$

where $I_{sub}(q)$ is well known the scattering function of the solid sphere and r_{ij} denotes the mass center distance between the i th and j th subunits.

$I_{sub}(q)$ is given by

$$I_{sub}(q) = 9 \left\{ (\bar{\rho}_{sub} - \bar{\rho}_{sol}) V \right\}^2 \left\{ \frac{\sin qr_0 - qr_0 \cos qr_0}{(qr_0)^3} \right\}^2$$

Spherically averaged scattering function $I(q)$ of an ellipsoid of rotation composed of n shells with different average scattering densities:

$$I(q) \propto \langle A(\mathbf{q}) A^*(\mathbf{q}) \rangle$$

$$= \int_0^1 \left[3 \left\{ \bar{\rho}_i V_i j_1(qR_i) / (qR_i) + \sum_{i=1}^n (\bar{\rho}_i - \bar{\rho}_{i-1}) V_i j_1(qR_i) / (qR_i) \right\}^2 \right] dx \quad (2)$$

where $\langle \rangle$ means the spherical average of the scattering intensity $I(\mathbf{q})$ defined by $A(\mathbf{q}) A^*(\mathbf{q})$ (the structural factor $A(\mathbf{q})$), $\bar{\rho}_i$ is the average excess scattering density (so-called contrast) of i th shell with a shape with an ellipsoid of rotation, j_1 is the spherical Bessel function of the first rank.

$$R_i \text{ is defined as } R_i = r_i (1 + x^2 (v_i^2 - 1))^{1/2} \quad (3)$$

where r_i and v_i are the semiaxis and its ratio of i th ellipsoidal shell, respectively. $\bar{\rho}_i$, r_i and v_i were used as fitting parameters.

Appendix:

$$j_1(z) = (\sin z - z \cos z) / z^2 \quad (4)$$

$$j_{n+1/2}(z) = \sqrt{\frac{\pi}{2z}} J_{n+1/2}(z) \quad (5)$$

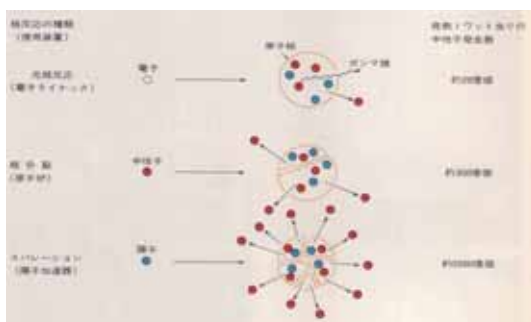
$$R_x^2 = \frac{3 \left\{ \bar{\rho}_1 R_1^5 + \sum_{i=2}^n \bar{\rho}_i (R_i^5 - R_{i-1}^5) \right\}}{5 \left\{ \bar{\rho}_1 R_1^3 + \sum_{i=2}^n \bar{\rho}_i (R_i^3 - R_{i-1}^3) \right\}}$$

$$R_y^2 = \frac{v_1 (2 + v_1^2) \bar{\rho}_1 R_1^5 + \sum_{i=2}^n \bar{\rho}_i \left\{ v_i (2 + v_i^2) R_i^5 - v_{i-1} (2 + v_{i-1}^2) R_{i-1}^5 \right\}}{5 \left\{ v_1 \bar{\rho}_1 R_1^3 + \sum_{i=2}^n \bar{\rho}_i (v_i R_i^3 - v_{i-1} R_{i-1}^3) \right\}}$$

[2] 放射光X線と中性子線の特徴の比較, その相補性

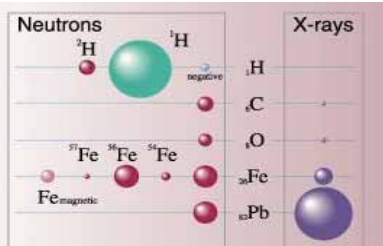
X線・中性子では何が見えるか

[中性子の発生方法]
 原子炉のウラン燃料の核分裂
 加速器を用いた核破砕



[原子のX線・中性子線との相互作用]
 X線の場合 : 核外電子と相互作用する
 (強度は電子数の2乗に比例)
 中性子の場合 : 原子核と相互作用する
 (強度は核散乱振幅の2乗に比例)

X線と中性子の散乱断面積の比較



散乱断面積の例

この図は、球の大きさが大きいほど中性子が敏感であることを示しています。同じ水素(H)でも、軽水素(^1H)と重水素(^2H)では大きく散乱断面積が異なるのです。

生体物質を対象とした構造研究において、**X線**では主に**炭素原子の位置情報**が、**中性子**では**水素原子の位置情報**が得られる。

中性子の呼び名 (中性子が持っている運動エネルギーでの分類)



生体物質・ソフトマターの構造研究における 放射光X線と中性子の特性の比較

【放射光X線散乱・回折の特長】

短時間分割測定
微量試料、微結晶の構造解析
異常分散効果の利用

波の種類: 電磁波, 核スピンの無し

エネルギー: 高い(12.4~2.1 keV)

散乱能: 核外電子数に比例

実験法: 重原子置換, 異常分散(MAD法)
弾性散乱

入射線強度: 大強度 (10^{11} ~ 10^{14})

試料透過率: 低い, 試料損傷: 大きい, 試料必要量: 少量

特長: 炭素の位置 (静的構造)

【中性子散乱・回折の特長】

水素原子の「位置と動き」(静的・動的構造)の測定
各種コントラスト変化法の利用
低エネルギー励起の測定 (数十meVからneV領域)

波の種類: 粒子波, 核スピンの有り

エネルギー: 低い(82~0.36 meV)

散乱能: 核種に依存、核外電子数に無関係

H (-0.37×10^{-12} cm)

D (0.67)

実験法: 重水素置換, 各種コントラスト変化法
弾性・準弾性・非弾性散乱

入射線強度: 弱い (10^4 ~ 6)

試料透過率: 高い, 試料損傷: 小さい, 試料必要量: 多量

特長: 水素の位置 (静的構造)
分子の低エネルギー励起 (動的構造)

生体物質・ソフトマターの構造研究における
放射光X線と中性子の利用上の特徴比較

位相情報の拡張, 広い時間(エネルギー)・空間情報

[放射光X線散乱]

長所:

- 短時間時分割測定 (msec以下)
- 微量試料 (~10 μ l)
- マイクロビーム (~1 μ m) による局所構造測定
- 複合体, 反応系の全体の構造解析
- 異常分散効果の利用
-

短所:

- 放射線損傷 (高含水率の試料) (ラジカル発生, 発熱...)
- 長時間時分割測定
- 複合体, 反応系の部分構造解析
- 低透過率
-

[中性子散乱]

長所:

- 試料の非破壊測定
- 各種コントラスト変化法の利用 (安定同位体) 複合体, 反応系の特定部分の選択的構造解析
- 長時間時分割測定
- 高透過率 (各種の外部条件: 圧力, シアー, 電磁場...)
-

短所:

- 多量試料 (~数100 μ l)
- 短時間時分割測定
- 低い統計精度
- 局所構造測定
-

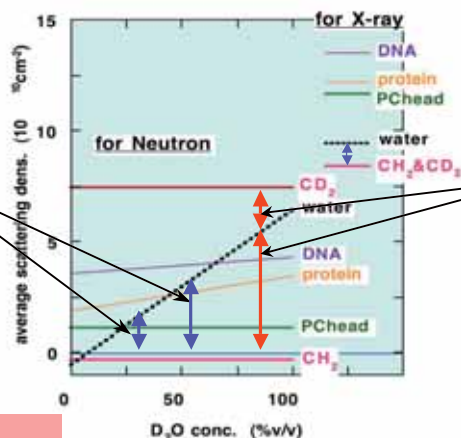
中性子・X線散乱法において最も重要な概念『コントラスト』
主な生体物質の平均散乱密度

溶媒と溶質との散乱密度の差(コントラスト)が構造情報を与える。

生体物質(タンパク質, 核酸, 脂質)の平均散乱密度は, すべて, 重水と軽水の平均散乱密度の中間に位置する。
そのため, 溶媒中の重水と軽水の割合を変えるだけで, 特定の成分の構造を選択的に消去(或は, 浮かび上がらせる)ことができる。

溶媒コントラスト変化法

溶媒の散乱密度(H_2O/D_2O)を変えて測定

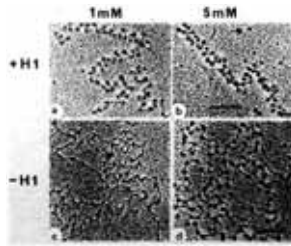


生体分子を構成する特定の成分を重水素化することにより, その構造を選択的に消去(或は, 浮かび上がらせる)ことができる。

逆コントラスト変化法

溶媒の散乱密度(重水素化率)を変えて測定

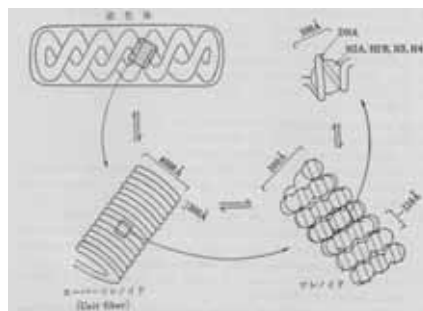
コントラスト変化法の最も初期行われた研究 —ヌクレオソームの構造解析—



染色質の電子顕微鏡像

構造の形態観察から分子構造の解析へ

染色体の超分子構造の構築



ヌクレオソーム

ヌクレオソーム
⇕
クロマチン(染色質)
⇕
クロモソーム(染色体)

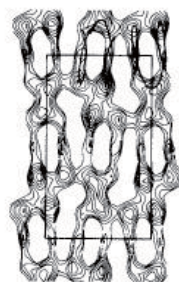
最も初期行われたコントラスト変化法の研究 —ヌクレオソームの構造解析—中性子とX線の相補性

コントラスト変化法によって、ヌクレオソームコア粒子を構成するヒストンタンパク質とDNAの構造を分離して解析



Electron density

X線から得られた構造 (DNAとタンパク質)



DNA (39% D₂O)

中性子から得られた構造 (DNAのみ)

39%D₂O 溶媒



Protein (65% D₂O)

中性子から得られた構造 (タンパク質のみ)

65%D₂O 溶媒

決定されたヒストンタンパク質の構造



決定されたヌクレオソームコア粒子の構造



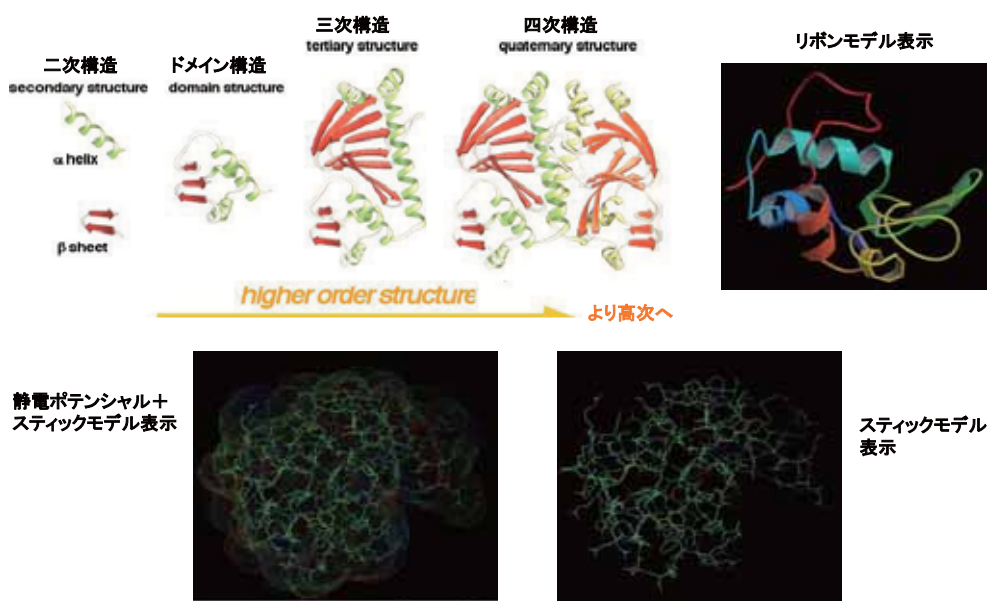
[3] 応用例

1) タンパク質の階層構造と放射光X線広角散乱

SPring-8で行ったタンパク質溶液研究の例

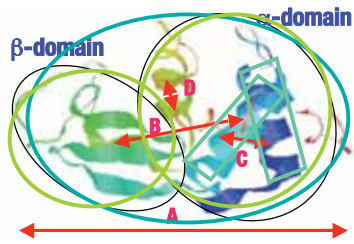
「タンパク質の内部構造（階層構造）の解析」

タンパク質の立体構造と階層性

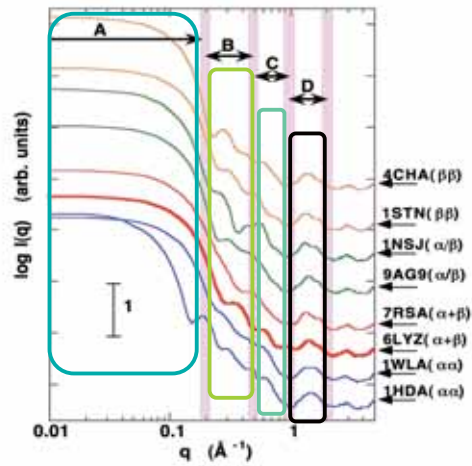


タンパク質の階層構造とX線散乱パターン

Lysozymeタンパク質の立体構造



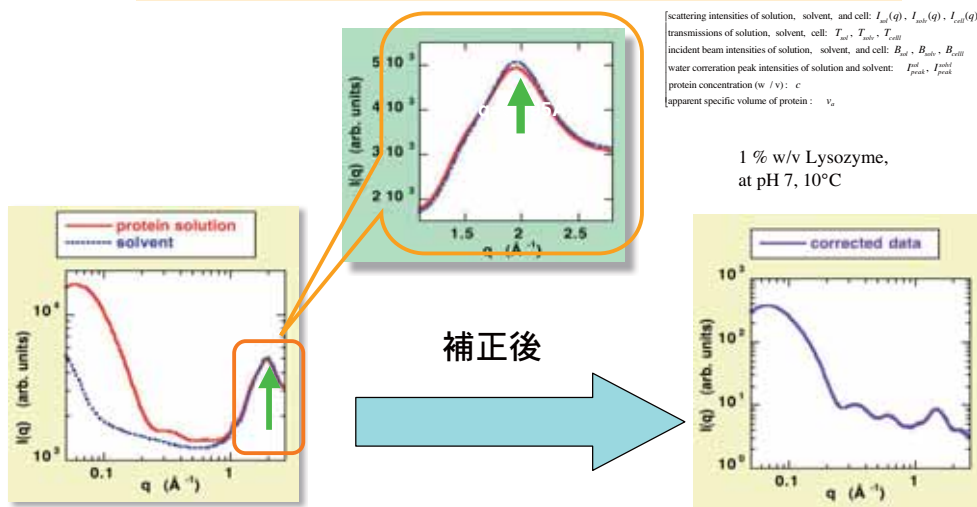
様々なタンパク質の理論X線散乱パターン



希薄なタンパク質溶液の広角X線散乱のデータ処理

$$I(q) = \frac{1}{I_{peak}^{sol}} \left\{ \frac{1}{B_{sol} T_{sol}} I_{sol}(q) - \frac{1}{B_{cell} T_{cell}} I_{cell}(q) \right\} - \frac{(1-cv_p)}{I_{peak}^{sol}} \left\{ \frac{1}{B_{sol} T_{sol}} I_{sol}(q) - \frac{1}{B_{cell} T_{cell}} I_{cell}(q) \right\}$$

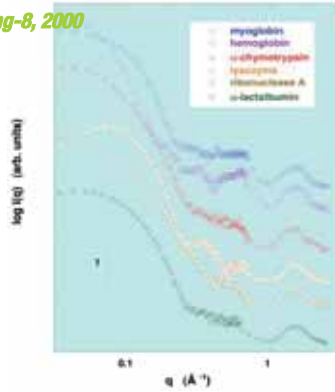
[scattering intensities of solution, solvent, and cell: $I_{sol}(q)$, $I_{sol}(q)$, $I_{cell}(q)$]
 transmissions of solution, solvent, cell: T_{sol} , T_{sol} , T_{cell}
 incident beam intensities of solution, solvent, and cell: B_{sol} , B_{sol} , B_{cell}
 water correlation peak intensities of solution and solvent: I_{peak}^{sol} , I_{peak}^{sol}
 protein concentration (w/v): c
 apparent specific volume of protein: v_p



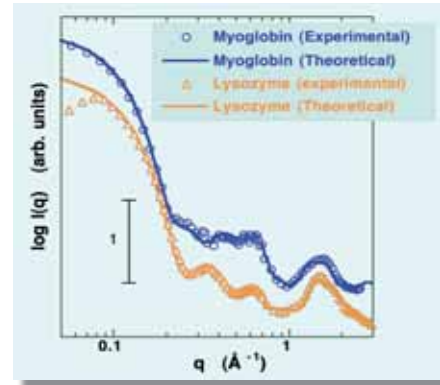
異なる構造分類のタンパク質の広角X線散乱曲線

WAXS curves of globular proteins
different types of protein structure categories
(all- α protein, all- β protein, α + β protein)

SPring-8, 2000



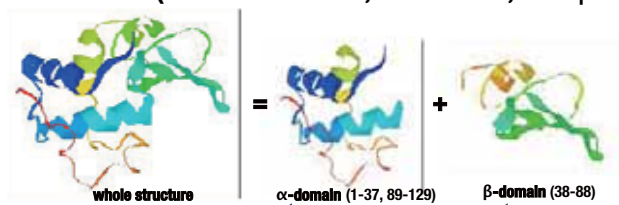
実験データと理論散乱曲線との比較



高い統計精度で測定を行えば、得られる広角X散乱の各領域のデータは、タンパク質内部の階層構造の特徴を反映する。

Hirai et al., J. Synchrotron Rad., 9, 202 (2002)

タンパク質(HEWL)の広角X線散乱曲線の特徴 (whole structure, α -domain, and β -domain)

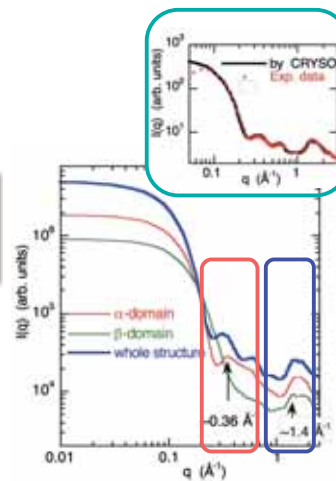


$$A(\mathbf{q}) = \int \left[\sum_{\alpha\text{-domain}} \rho_i \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \right] \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_\alpha) + \left[\sum_{\beta\text{-domain}} \rho_j \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j) \right] \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_\beta) \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r}$$

$$= \left\{ \sum_{\alpha\text{-domain}} f_i \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_i) \right\} \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_\alpha) + \left\{ \sum_{\beta\text{-domain}} f_j \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) \right\} \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_\beta)$$

$$I(q) = \langle I(q) \rangle = \langle |A(q)|^2 \rangle = \langle |A_\alpha(q)|^2 \rangle + \langle |A_\beta(q)|^2 \rangle + 2 \langle \Re [A_\alpha(q) A_\beta^*(q) \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_\alpha - \mathbf{r}_\beta))] \rangle$$

$$I(q) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n f_i f_j \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}}$$



Hirai et al., Biochemistry, 28, 9036 (2004)

[3] 応用例

2) タンパク質の立体構造構築原理とアミロイド化に関する研究

Spring-8で行ったタンパク質溶液研究の例

「タンパク質の熱構造転移の可逆性と階層構造間の協同性の解析」

タンパク質の折畳み(フォールディング)問題 -1-
どのような機構で機能を獲得するのか？

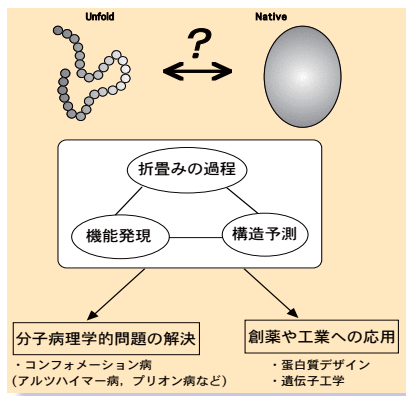
タンパク質

アミノ酸配列（一次構造）に従い特異的な立体構造（Native構造）に折り畳まれて機能を発現する。



アミノ酸配列の一残基を置換すると、多くの場合タンパク質は元の構造と異なる構造を形成し、機能も失われる。

生体内では様々な分子が補助（分子シャペロン）するが、基本的には、自立的に立体構造を形成する。



タンパク質の立体構造

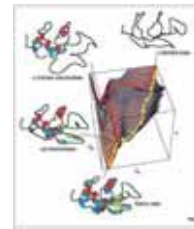
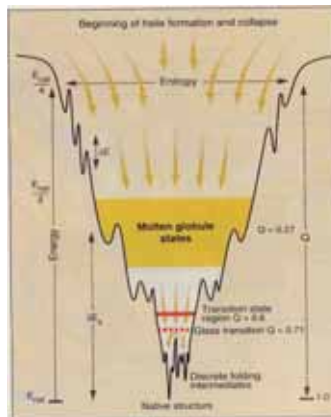
タンパク質の折畳み機構の研究の展開

Brief History

Anfinsenのドグマ: *Science* 181, 571 (1973)
 「Native構造がアミノ酸配列と溶媒環境によってきまる自由エネルギー最小の状態である。」
 (フォールディングの熱力学仮説)

フォールディング・ファネルの二次元表示

Levinthalのパラドックス
 「ランダムサーチではnative構造に達するまでに天文学的な時間を要する。」



さまざまなモデルの提案と実験的検討
 特定経路モデル
 枠組みモデル
 疎水性凝集モデル
 衝突拡散モデル 等々。

格子モデルシミュレーション, ヘテロ高分子鎖の統計力学の展開

フォールディング・ファネルの提案
 「タンパク質のエネルギー曲面の特性がフォールディングを決める」

Aaron R. Dinner et al., *TIBS* 25 – JULY 2000

タンパク質の折畳み過程の階層構造別解析

Spring-8, 2002

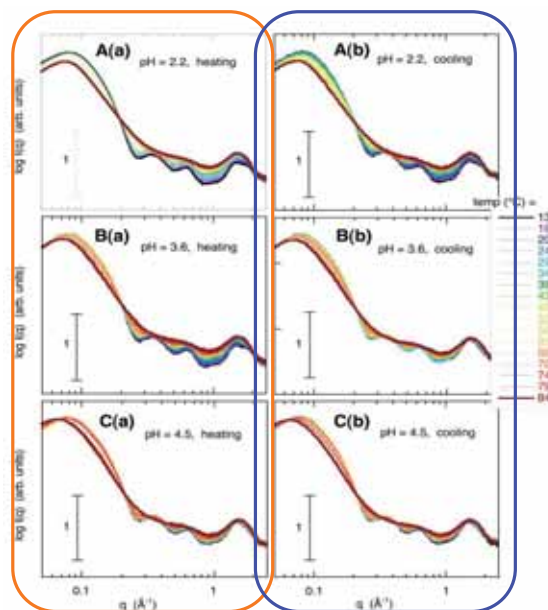
A: pH 2.2
B: pH 3.6
C: pH 4.5

(a): 加熱過程 (変性)
(b): 冷却過程 (折畳み)

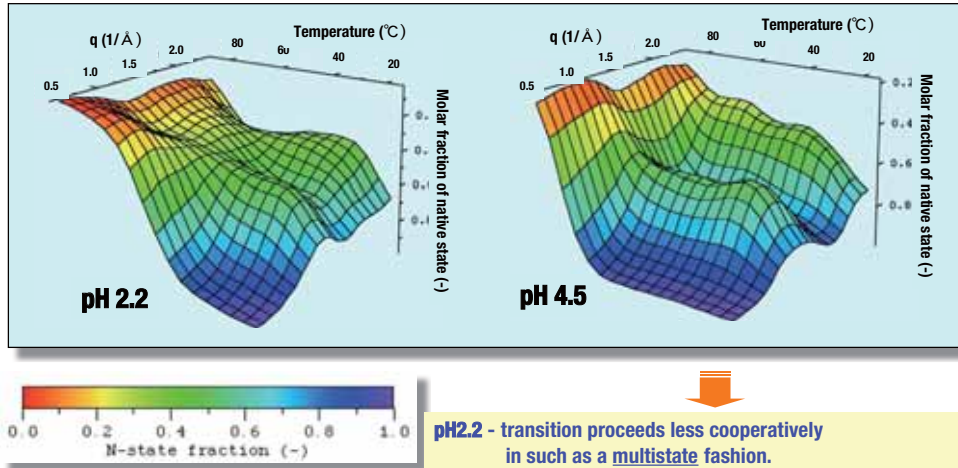
タンパク質の折畳み・変性過程(構造転移)は、階層構造に依存する。
 また、構造転移の階層構造間の協同性は溶媒環境に強く依存する。

Hirai et al., *Biochemistry*, 28, 9036 (2004)

タンパク質の変性・折畳み過程のX線散乱曲線の変化



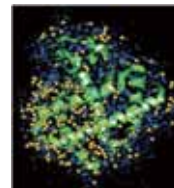
熱構造転移過程の3次元階層地図 (階層構造, 温度, native構造のモル分率の対応)



pH2.2 - transition proceeds less cooperatively in such as a multistate fashion.
pH4.5 - transition proceeds cooperatively for all hierarchical levels like a two-state transition.

タンパク質の水和と生理的機能

水分子は、生体内でタンパク質の周囲を取り巻き、水和層(水和シェル)を形成している。



X線結晶構造解析で得られたタンパク質を取り巻き水和分子

Makarov et al (2000) *Biophys. J.* 76, 2966.

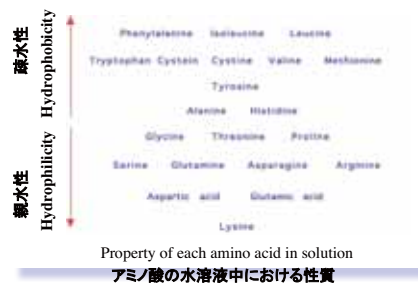
タンパク質表面

- 解離基 → 静電的水和
- 疎水基 → 疎水性水和
- 極性基 → 水素結合による水和



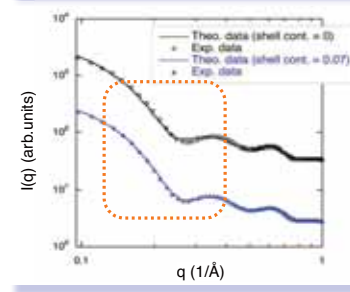
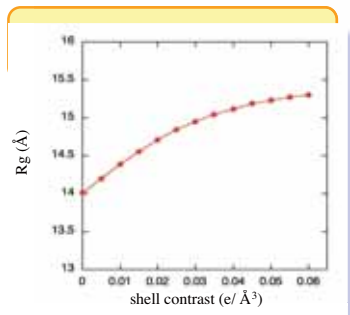
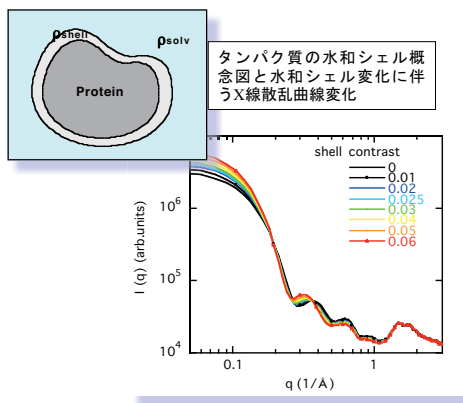
- ◆ 安定性
- ◆ 機能
- ◆ 分子認識
- ◆ ダイナミクス etc...

タンパク質の水和構造は、構造の安定化や、機能発現に重要な役割を担っている。



タンパク質の水和状態の解析

水和シェルと散乱関数の変化



水和シェルを考慮すると、実験散乱曲線が再現できる。
計算した理論溶液散乱曲線を実験データに対して最適化することにより、平均的な水和量を求めることができる。

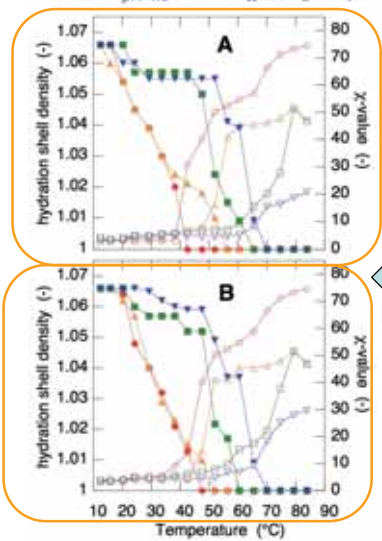
タンパク質の水和状態の解析

水和シェルの崩壊と再生



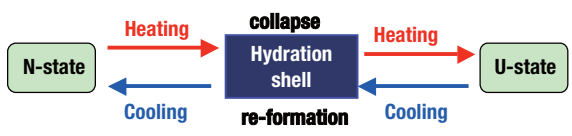
$$\chi^2 = \frac{1}{N_{data} - 1} \sum_{i=1}^{N_{data}} \left[\frac{I_{cal}(q_i) - I_{exp}(q_i)}{\sigma(q_i)} \right]^2$$

Koizumi et al., J. Appl. Cryst. 40, s175 (2004)



三次構造の転移開始温度より低い温度域から、水和シェルが崩壊する。この傾向は、pHの低下に伴い顕著になる。

三次構造形成後に、水和シェルが再形成している。



[3] 応用例

2) タンパク質の立体構造構築原理とアミロイド化に関する研究

SPring-8で行ったタンパク質溶液研究の例

「タンパク質のアミロイド熱構造転移の解析」

タンパク質の折畳み(フォールディング)問題 -2-

「タンパク質の折畳み問題」が関わる**疾病との関連**

生理的条件下では, *native*とは異なる構造を形成し,
品質管理で処分されないタンパク質が存在する。

ミスフォールディング病(コンフォメーション病)

失活が関わる病気:

鎌状赤血球貧血症, メープルシロップ尿症, フェニルケトン尿症, コラーゲン欠乏症...

凝集・蓄積が関わる病気:

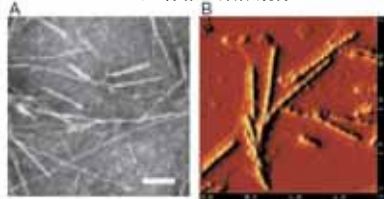
アミロイド疾患(アルツハイマー病, プリオン病, 透析アミロイドーシス...)

非アミロイド性凝集疾患(白内障, 筋萎縮性側索硬化症, パーキンソン病...)



どのような機構で誤った立体構造形成がなされるのか。

アミロイド線維の顕微鏡像



アミロイドーシス(amyloidosis)

タンパク質が正常に折り畳まれないで, 枝分かれのない線維構造(アミロイド線維)を形成して, 全身の諸臓器の細胞外に沈着することにより, 機能障害を引き起こす一連の疾患群の総称。**コンフォメーション病の一つ。約20種類**が知られている。

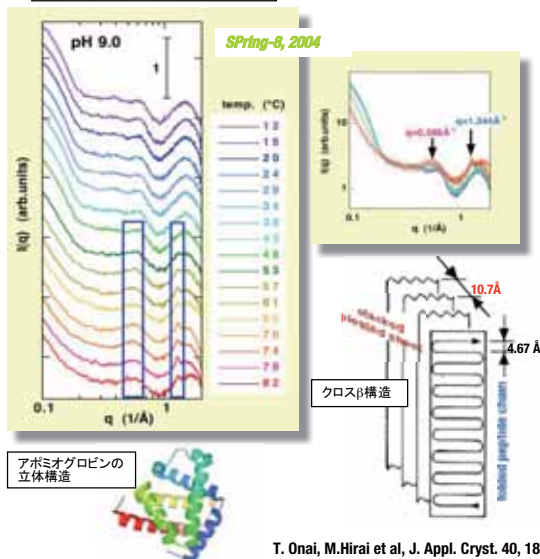
β 2ミクログロブリンのアミロイド線維の電子顕微鏡(A)と原子間力顕微鏡画像(B)

AはKozhukh T, et al. J Biol Chem(2002)277:1310-1315

BはKatou H, et al. Protein Sci(2002)11:2218-2229

タンパク質のアミロイド形成の初期過程の解析

アポミオグロビンのアミロイド形成
X線散乱データ(α-β構造転移)



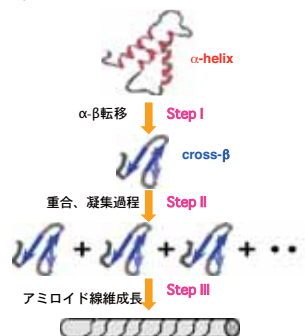
T. Onai, M.Hirai et al, J. Appl. Cryst. 40, 184 (2007).

疾患と関係しないタンパク質やペプチドも、条件によりアミロイドと類似した線維を形成する → タンパク質はアミロイド類似線維を形成する性質を有している？



モデルタンパク質を用いたアミロイド形成機構の理解は、生体内で生じている反応を探求するために有効である。

アミロイド線維形成における、タンパク質の構造転移と核生成、線維成長過程のメカニズムの理解する。

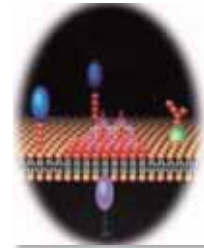


生体膜情報伝達系の機能構造と 情報伝達異常の分子機構の解明

細胞膜モデルの進展

- モザイクモデル (1971 by Wallach)
- 流動モザイクモデル (1972 by Singer & Nicolson)
- プレートモデル (1977 by Jain & White)
- ラフト (筏) モデル (1997 by Simons & Ikonen)
- GSLシグナルドメイン (1998 by Hakomori)

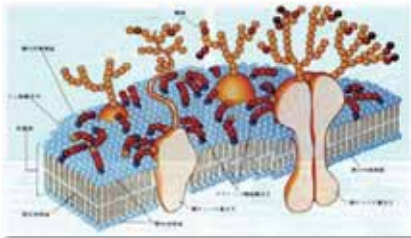
GSLシグナルドメイン



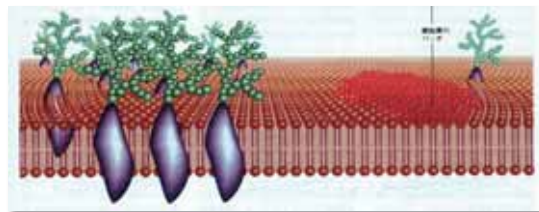
流動モザイクモデル



脂質ラフトモデル



Singer & Nicolson (1972)

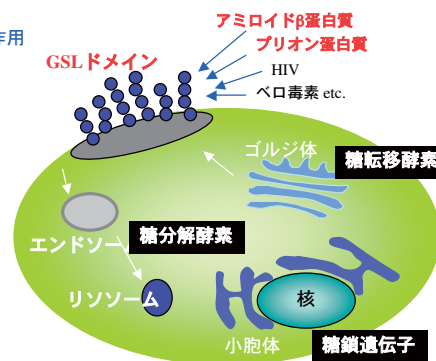
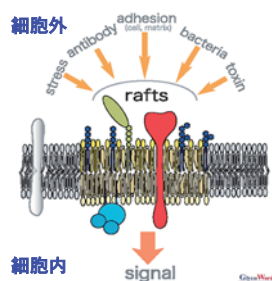


Simons & Ikonen (1997)

細胞膜表面における スフィンゴ糖脂質ドメイン (脂質ラフト) の生理的役割

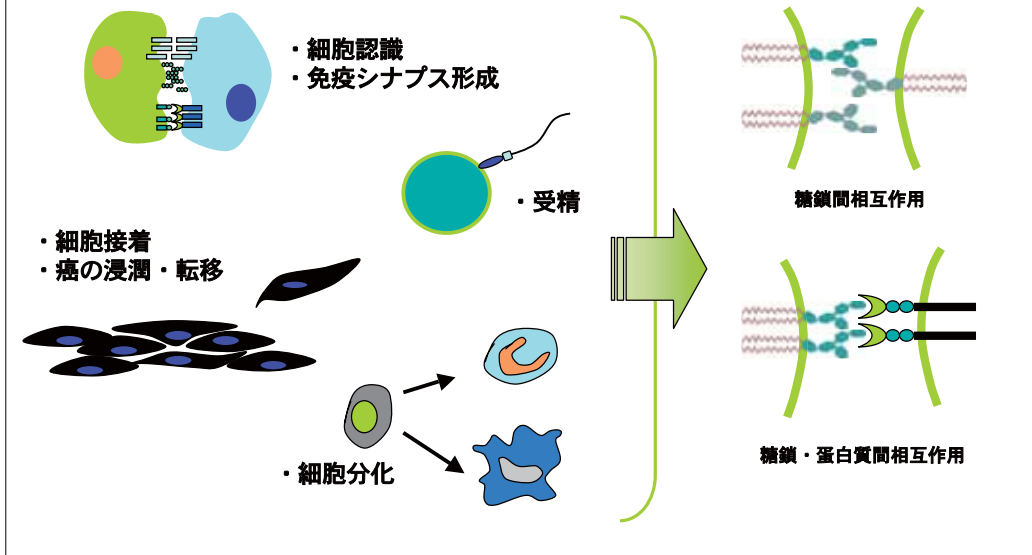
Clarified or Assumed Functions

- 外来性分子との相互作用, 同じ細胞膜内の会合分子との相互作用
- シグナル伝達に関わる蛋白質の集積とそれらの活性の制御
- シグナル伝達効率の向上
- シグナル伝達の不適切なクロストークの排除



細胞情報伝達のプラットフォーム
としてのGSLドメインの機能

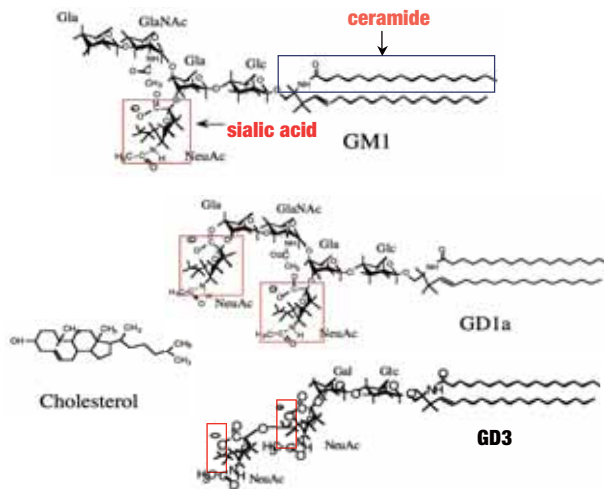
糖脂質ドメインの細胞間相互作用における役割



糖脂質ドメインの特性と疾病との関係

- プリオン病の原因であるプリオン蛋白質（正常型，異常感染型）のGSLマイクロドメインにおける α - β 転移と集積，神経芽細胞腫や脳への濃縮
- GSLマイクロドメインへのアルツハイマー病に関わるアミロイド β 蛋白質のカベオラへの集積と細胞内シグナル伝達障害
- 癌遺伝子によるトランスフォーメーションのガベオリン1の抑制作用，筋ジストロフィーとガベオリン3の異常などとGSLマイクロドメインとの関連
- GSLの中枢神経系への蓄積異常による神経障害「スフィンゴリビドーシス」
etc. etc.

スフィンゴ糖脂質ガングリオシドの分子構造



Unique Features of Gangliosides

[頭部領域]

- Highly hydrophilic sugar head with sialic acids
- Diversity of sugar heads in chemical composition & conformation
- Hydroxy- and amido groups in sugar head

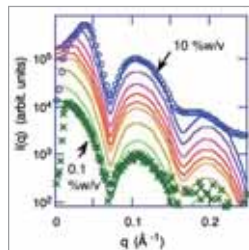
[尾部領域]

- A long chain base linked to a fatty acid
- Hydroxy- and amido groups in ceramide moiety

↓
水素結合の受容体・
供与体としての働き!!

X線・中性子散乱法によって得られる脂質膜系構造情報 for ordered or unordered system

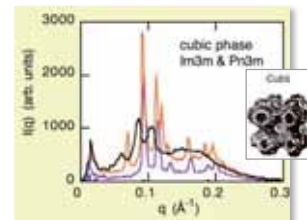
Micelle & Vesicle



サイズ分布, 形,
内部構造 (low resolution)
表面電荷 (粒子間相互作用)
水和状態,
etc.

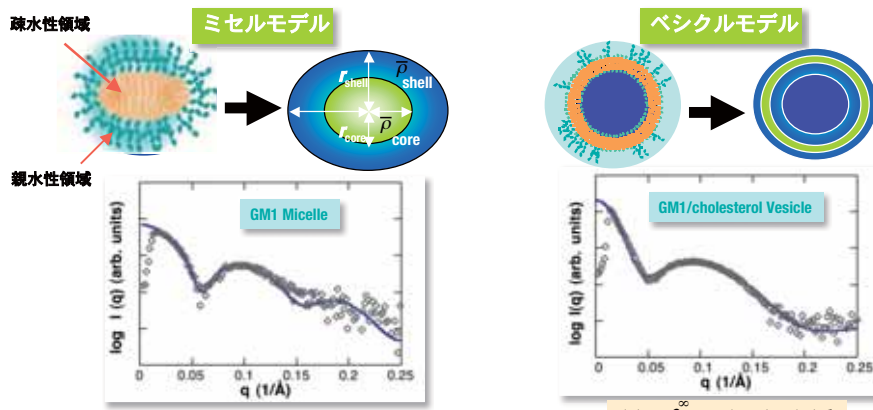
↑
モデル解析

Lamellar & Ordered Membrane



膜の周期や形態,
内部構造 (high resolution)
膜間力 (hydration force, etc.)
etc.

モデル散乱関数によるミセル, ベシクル系の解析法



$$I(q) \propto NI_s(q)S(q)$$

$$I(q) = \int_{R_{min}}^{\infty} I_s(q, R)D(R)dR$$

粒子間相互作用
散乱関数

$$I_s(q) = \int_0^1 \left[3 \left\{ \bar{\rho}_i V_i j_i(qR_i) / (qR_i) + \sum_{i=2}^n (\bar{\rho}_i - \bar{\rho}_{i-1}) V_i j_i(qR_i) / (qR_i) \right\}^2 \right] dx$$

多重シェル回転楕円体
モデル散乱関数

粒子径分布関数

$$S(q) = 1 / [1 - 24\eta a(q\sigma)]; \quad D(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[-\frac{(R - \bar{R})^2}{2\sigma^2}\right]$$

[3] 応用例

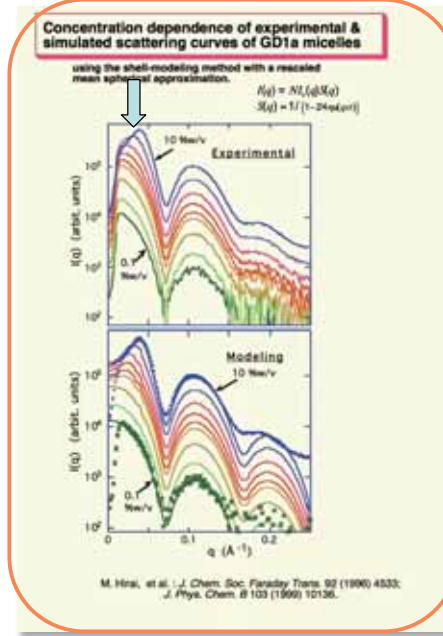
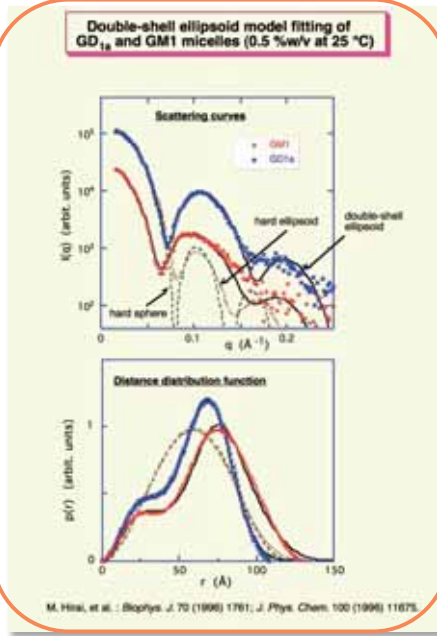
3) 生体脂質ミセル, リポソームの機能構造に関する研究

「脂質ラフトの主要成分であるガングリオシドが形成するミセルの機能構造の解析」

糖鎖の構造, 水和・脱水和, 有効電荷の温度依存性

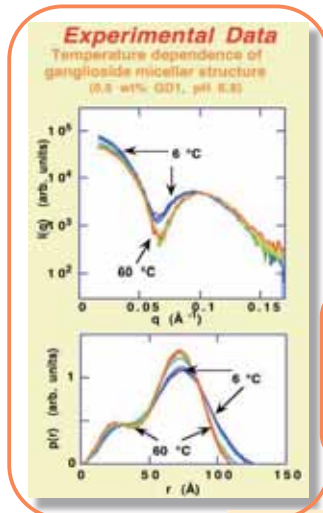
ミセルの構造、水和、表面電荷の評価 実験データとモデル散乱関数との対応

ヘルスケア2010 [3]-3-8

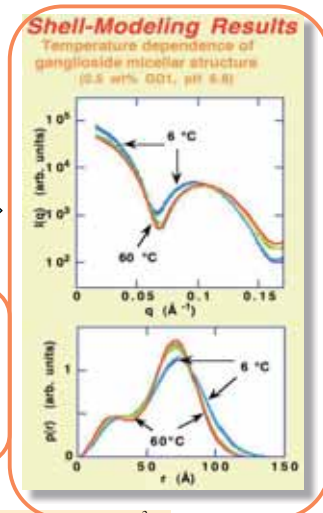


昇温による糖脂質ミセルの構造変化を評価する

ヘルスケア2010 [3]-3-9



- Scattering density of head & tail regions
- Axial ratios
- I(0) intensity



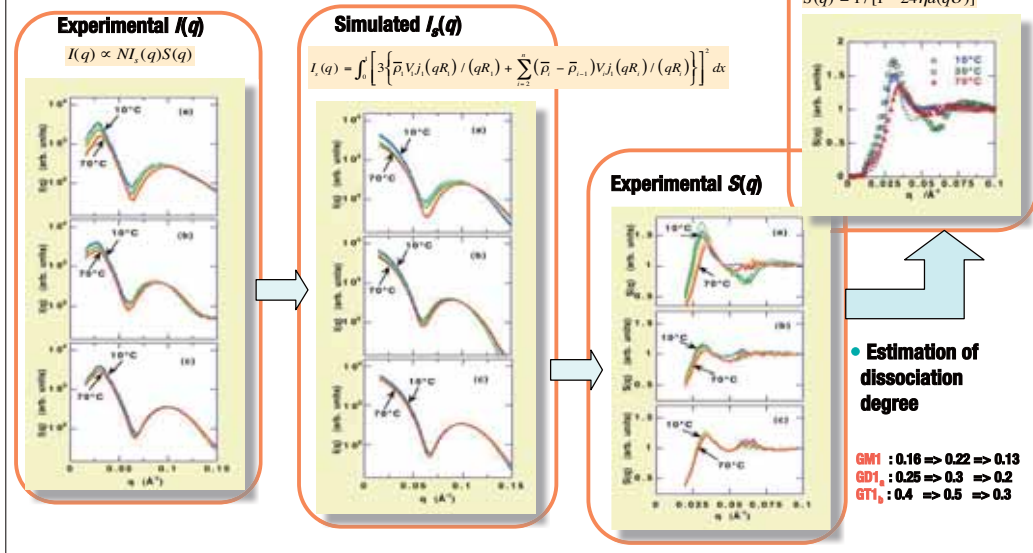
Ellipsoidal Shell Scattering Function :

$$I_s(q) = \int_0^1 \left[3 \left\{ \bar{\rho}_1 V_i(qR_i) / (qR_i) + \sum_{j=2}^n (\bar{\rho}_j - \bar{\rho}_{j-1}) V_j(qR_j) / (qR_j) \right\}^2 dx \right]$$

$$R_i = r_i (1 + x^2 (v_i^2 - 1))^{1/2}$$

昇温による糖脂質ミセルの有効電荷の変化を評価する

Separation of Interparticle Structure Factor

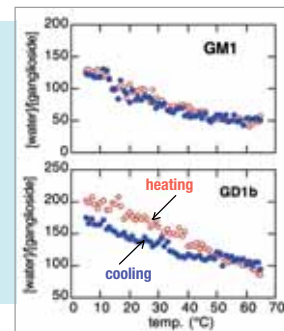


糖脂質ガングリオシドが形成するミセルの機能構造

Conformations, hydration-dehydration, charges of GSL sugar chains depending on temperature

- Gangliosides take prolate ellipsoidal micellar structures in solution, which are very stable for several months.
- By elevating temperature from 6 to 60 °C, the hydrophilic region composed of sugar heads shrinks.
- The reversibility of the thermal transition depends on the sugar head. $G_{M3} > G_{M1} > G_{D1a} > G_{D1b}$
- This transition accompanies hydration and dehydration of the head region and changes of the degree of dissociation of sialic acids.

水和水の温度依存性



ガングリオシドは、その糖鎖構造や水和の変化を通じて、温度、アルコール、イオンなどの外部環境の変動に対して生体膜表面の親水性や表面電荷を制御し得る。

[3] 応用例

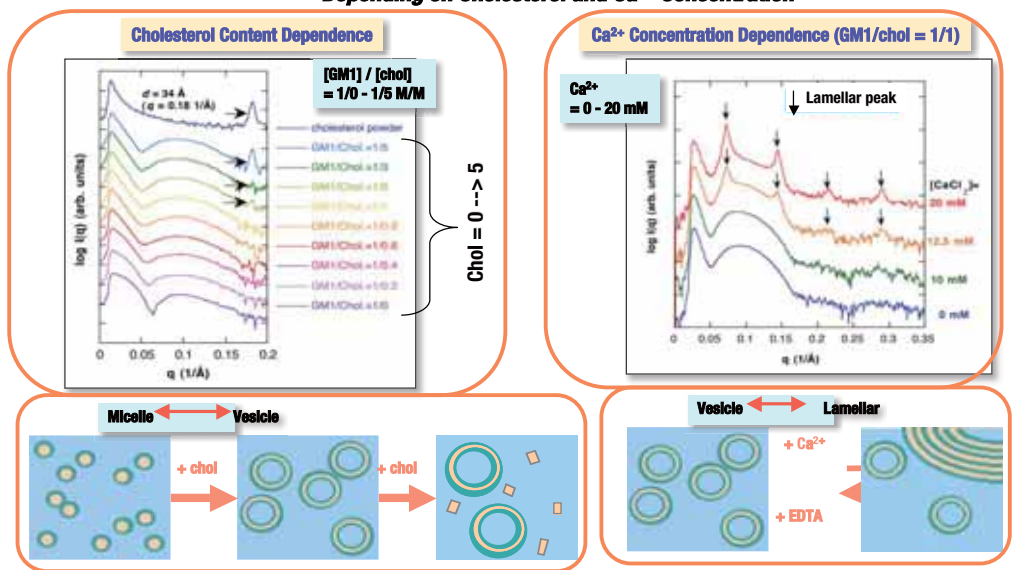
3) 生体脂質ミセル, リポソームの機能構造に関する研究

「脂質ラフトの主要成分 ganglioside/コレステロール混合系の特性」

コレステロール依存ミセル→ベシクル転移 Ca^{2+} 誘起ベシクル→ラメラ転移

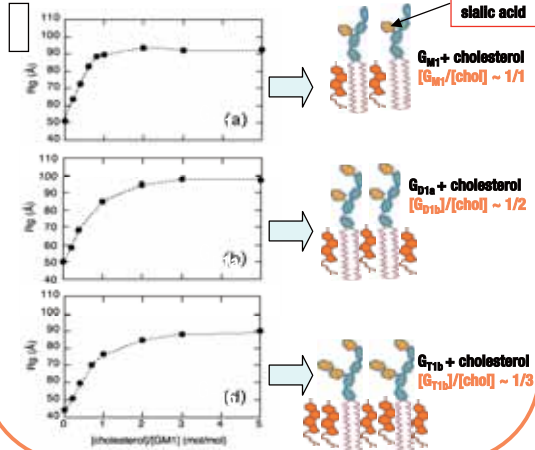
糖脂質/コレステロール混合系が機能構造を明らかにする

Micelle to Vesicle & Vesicle to Multi-lamellar Transitions of Ganglioside/Cholesterol System Depending on Cholesterol and Ca^{2+} Concentration

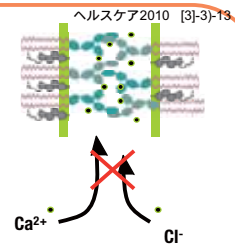


コレステロールのガングリオシドに対する相溶性, および, Ca^{2+} 依存ベシクルラメラ転移による糖鎖間指組構造形成

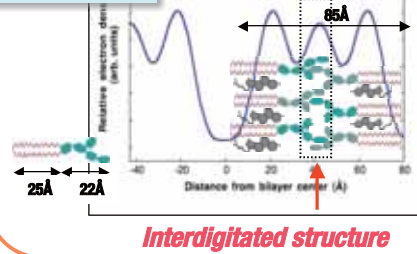
Cholesterol dependence of radius of gyration



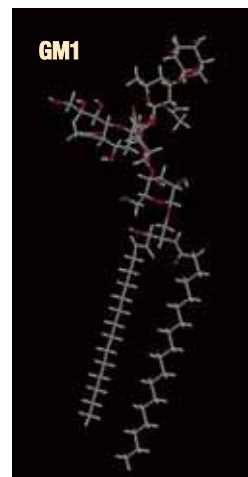
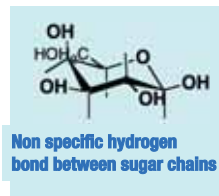
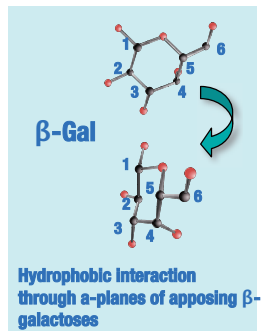
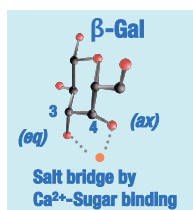
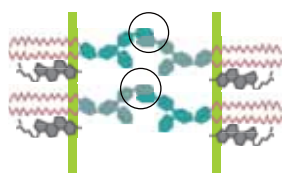
Lamellar peaks depending on Ca^{2+} concentration



Electron Density of GM1/chol Bilayer at 20 mM Ca^{2+}



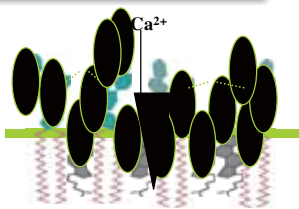
Possible Attractive Interactions Between Ganglioside Sugar Chains against steric, electrostatic, and hydration repulsions



脂質ラフト主要成分 ガングリオシド／コレステロールの機能構造の特性

- **Micelle to vesicle transition** depending on cholesterol content ($G_{M1} > G_{D1b} > G_{D1a} \geq G_{T1b}$)
- **Maximum miscibility of cholesterol** in ganglioside aggregates ($G_{M1} < G_{D1} \leq G_{T1}$)
- **Ca²⁺-dependent vesicle adhesion** (vesicle to lamellar transition; 85, 98, 100 Å for G_{M1} , G_{D1a} and G_{T1b})
- **Interdigitated structure formation between sugar heads** of apposing bilayer
- **Reversible vesicle adhesion** (vesicle-to-lamellar) by Ca²⁺ addition and Ca²⁺ chelation.

Membrane Adhesion Model Induced by Ca²⁺



コレステロールとの相互作用に伴う適切な糖鎖間隔の形成

Ca²⁺による糖鎖領域の脱水和
Ca²⁺によるシアル酸間の塩橋の形成

糖鎖間の水和斥力, 静電反発力の減少

膜の協同的な接着

糖鎖を介した水素結合, 疎水結合, ファンデアワールス力

T. Hayakawa & M. Hirai, J. Appl. Cryst., **36** (2003), 489-493.
M. Hirai et al, J. Phys.: Condens. Matter, **17** (2005), s2965-s2977.

[3] 応用例: 中性子と放射光の相補的利用研究の例

3) 生体脂質ミセル, リポソームの機能構造に関する研究

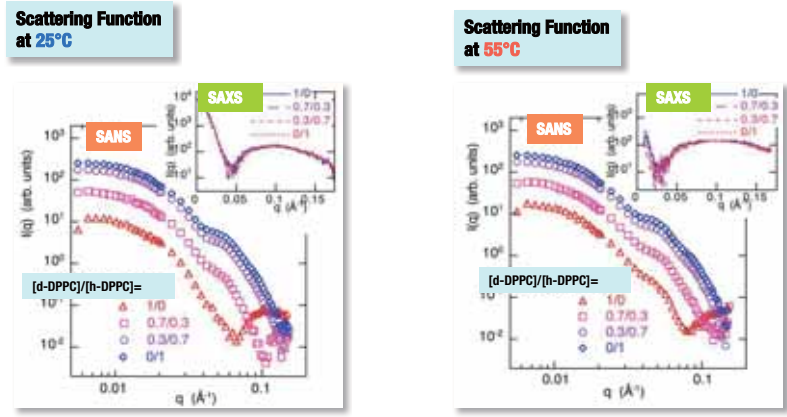
「ラフト成分を含む生体膜の非対称二重膜構造の解析」

脂質2重膜上でガングリオシドは選択的に膜外表面に存在するか?
その糖鎖構造 & 水和の状態は.....

重水素化を用いた同一形のラフトモデル膜リポソームの 中性子・X線散乱関数 (同一物を5通りの異なるコントラストで見る)

[GM1]/[DPPC] = 0.1/1 mixed SUV
1%w/v DPPC, in D₂O, 50 mM Hepes buffer at pH 7

Four different molar ratio between d-DPPC and h-DPPC



多分散リポソーム (単一膜ベシクル) の モデル散乱関数

Model Scattering Function

$I_s(q, R)$: Vesicle Scattering Function
 $D(R)$: Size Distribution Function

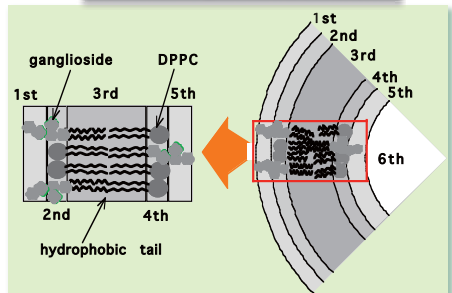
$$I(q) = \int_{R_{min}}^{\infty} I_s(q, R) D(R) dR$$

$$I_s(q, R) = \int_0^R \left[3 \left\{ \bar{\rho}_0 V_{i,j}(qR_i)/(qR_i) + \sum_{i=2}^n (\bar{\rho}_i - \bar{\rho}_{i-1}) V_{i,j}(qR_i)/(qR_i) \right\}^2 dx \right]$$

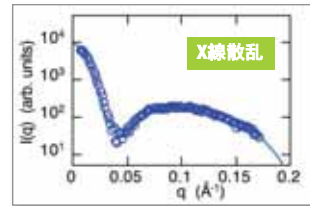
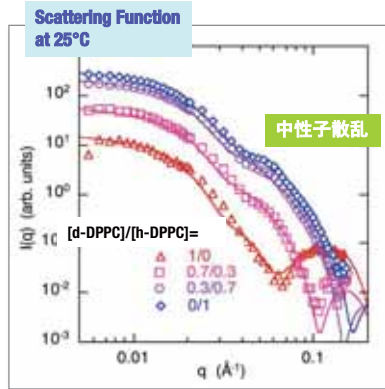
$$R_i = r_i \{ 1 + x^2 (v_i^2 - 1) \}^{1/2}, \quad D(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \left\{ -\frac{(R - \bar{R})^2}{2\sigma^2} \right\}$$

Under an appropriate physical constrain in modeling analysis.

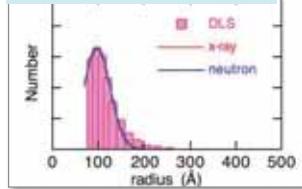
Model of Ganglioside/DPPC Vesicle



中性子散乱, X線散乱, 光散乱のすべてのデータを
単一の構造モデルで説明できる



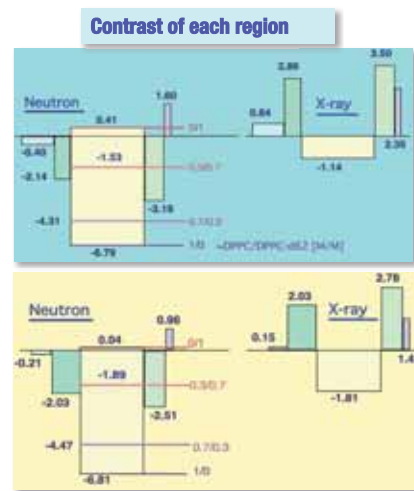
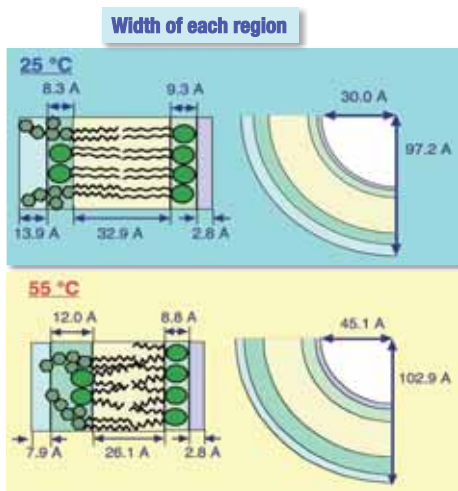
光散乱 & 中性子・X線散乱で得られた
粒子径分布関数



Reliability factor: $R = \frac{\sum |I_{\text{experiment}}(q) - I_{\text{model}}(q)|}{\sum I_{\text{experiment}}(q)}$

$R = 0.02-0.09$ at 25 °C, $0.05-0.11$ at 55 °C.

ラフトモデル膜においてgangliosideはベシクル2重膜の
外側に選択的に分布する (非対称構造)



M. Hirai et al., *Biophys. J.*, 85 (2003) 1600-1610.

[3] 応用例: 中性子と放射光の相補的利用研究の例

3) 生体脂質ミセル, リポソームの機能構造に関する研究

「ラフトモデル生体膜の水透過機能の解析」

G_{D3} ガングリオシドを含むラフトモデル膜に対する K^+ イオンの効果?
 K^+ イオン特異性..... 神経興奮における G_{D3} の役割....

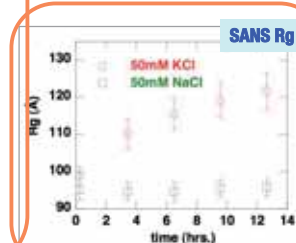
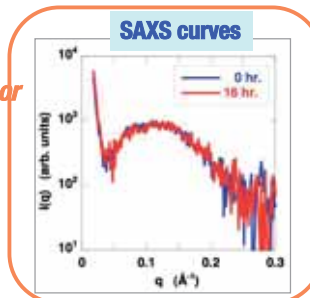
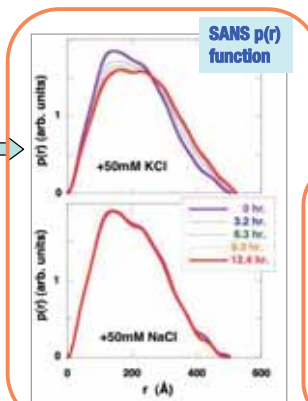
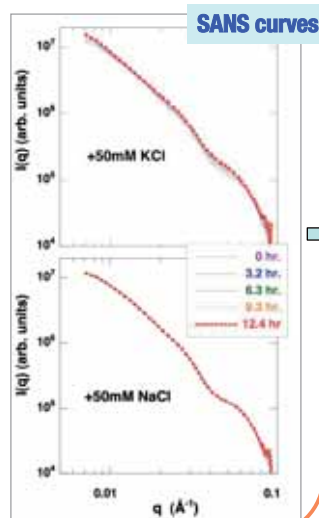
ラフトモデル膜の溶媒ジャンプ法による時分割中性子・X線散乱測定

$[G_{D3}]/[cholesterol]/[PC]=0.1/0.1/1$

0.5 % w/v total lipids
 in 50 mM Hepes, pH 7, 80% D_2O at 25. C

Only SANS curve with K^+ changes.

SAXS curve with Na^+ or
 K^+ does not change.



回転半径の変化と水の透過率との関係

How to explain the change of Rg observed

The flux of the permeability of water molecules across the vesicle membrane

$$J_w = P_w S (F_w - F_{ws}) C = V_w C \frac{dF_w}{dt} \quad \text{Eq. 1}$$

$$J_{D_2O} = P_{D_2O} S (F_{D_2O} - F_{D_2O}^s) C = V_w C \frac{dF_{D_2O}}{dt}$$

J_w , flux of H₂O; J_{D_2O} , flux of D₂O
 P_w, P_{D_2O} : permeability of H₂O and D₂O
 $F_{Cw}, F_{CD_2O}, F_{Sw}, F_{SD_2O}$: molar fractions of H₂O and D₂O in the water pool of the vesicle and in the solvent,
 C , molar concentration of water; V_w , volume of the water pool;
 S , surface area of the vesicle

Due to the initial conditions ($F_{Cw}=1, F_{CD_2O}=0$ at $t=0$),

$$F_w = (1 - F_w) \exp(-P_w S t / V_w) + F_w = 0.8 \exp(-P_w S t / V_w) + 0.2 \quad \text{Eq. 2}$$

$$F_{D_2O} = -F_{D_2O} \exp(-P_{D_2O} S t / V_w) + F_{D_2O} = -0.8 \exp(-P_{D_2O} S t / V_w) + 0.8$$

Change of contrast of SUV is given as

$$\rho_t = \left\{ (\rho_{w,v} - \rho_{s,v}) F_w V_w \exp(-P_w S t / V_w) + (\rho_s - \rho_s) V_s \right\} / (V_w + V_s) \quad \text{Eq. 3}$$

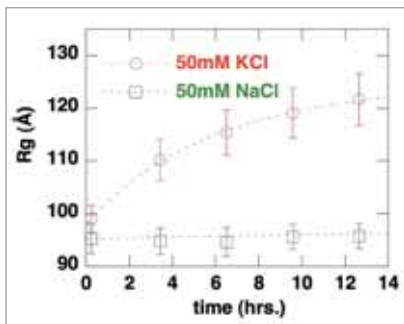
$$= A \exp(-P_w S t / V_w) + B$$

V_w, V_s are the volume and average scattering density of the bilayer; r_s , the average scattering density of the solvent

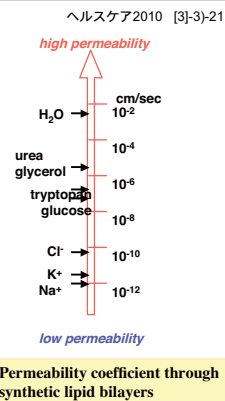
Change of Rg of SUV is given as

$$R_{gt} = \left[R_v^2 + \frac{1}{\rho_s V} \int_V \rho(r) r^2 dr \right]^{1/2} = [\alpha R_v^2 + (1 - \alpha) R_{gt}^2]^{1/2} \quad \text{Eq. 4}$$

$\alpha = \exp(-P_w S t / V_w)$, R_{gt} and R_{gt} are the radii of gyration at initial and final times,

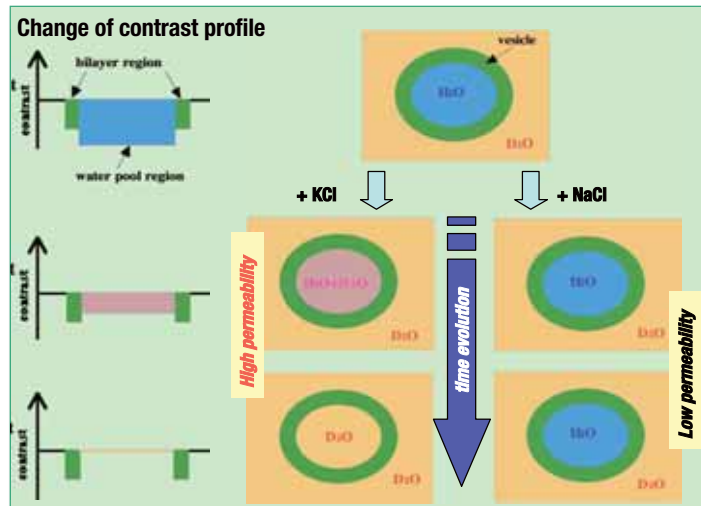


R_{gt}, R_{gt} and P for the SUV with the addition of 50 mM KCl are obtained to be $98.0 \pm 0.5 \text{ \AA}$, $124.9 \pm 1.1 \text{ \AA}$, and $(5.4 \pm 0.5) \times 10^{-3} \text{ cm/s}$, respectively.



ガングリオシドG_{D3}とコレステロールを含有するリポソーム膜では、K⁺イオン選択的に水の透過率が增大する。
 G_{D3}-コレステロールマイクロドメイン（脂質ラフト）のK⁺イオン選択的な構造応答が、神経インパルスによるK⁺イオン流出にともなうタンパク質リン酸化酵素の活性変化に関係する可能性を示唆する。

**K⁺イオン選択的に
ラフト成分を含む膜の水透過率は上昇する**



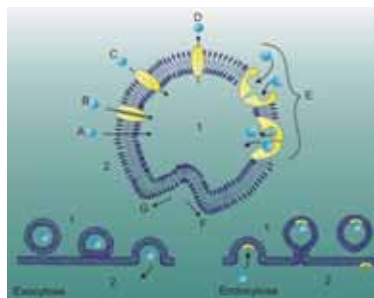
M. Hirai et al., J. Appl. Crystal., 2007, 40, s159-164.

[3] 応用例: 中性子と放射光の相補的利用研究の例

3) 生体脂質ミセル, リポソームの機能構造に関する研究

「ラフトモデル膜の機能はどうか？」

細胞内環境を模した浸透圧下における
ラフトモデル膜の構造特性、転移……「エサイトーシスモデル」

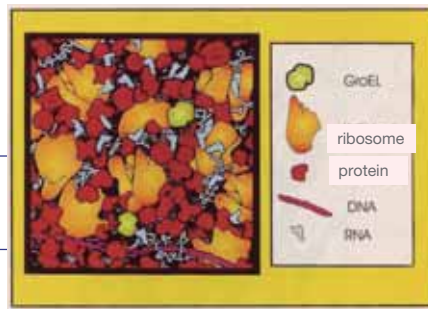


細胞内は極めて混雑した環境にある

Various physiological events in a cell, such as signaling through membrane traffics are known to take place under a highly crowded molecular environment where the total macromolecular concentration is approximately 350 mg/ml in a cytoplasm .

細胞内では個々の分子を感じる浸透圧は高い。

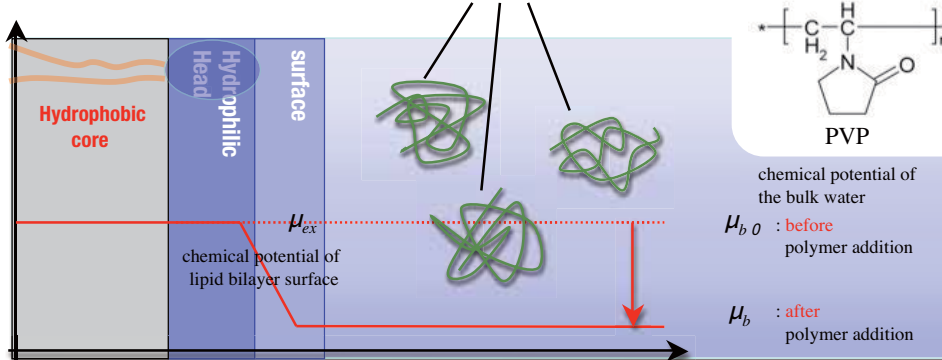
A presentation of the interior of a bacterial cell
 Goodsell, D.S. *Trends Biochem. Sci.* 16 (1991) 203



浸透圧のラフトモデル膜に対する影響は？

脂質 2 重膜表面における浸透圧の効果

Osmolytes such as Polyvinylpyrrolidone (PVP) or Dextran, ...



Due to steric hindrance, the osmolytes are hardly distributed into lipid bilayer.

When the osmolytes do not coexist : $\mu_{ex} = \mu_{b0}$.

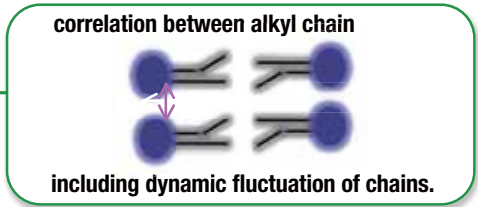
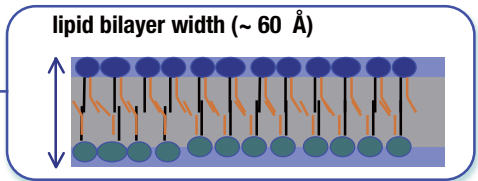
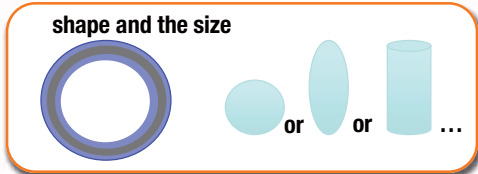
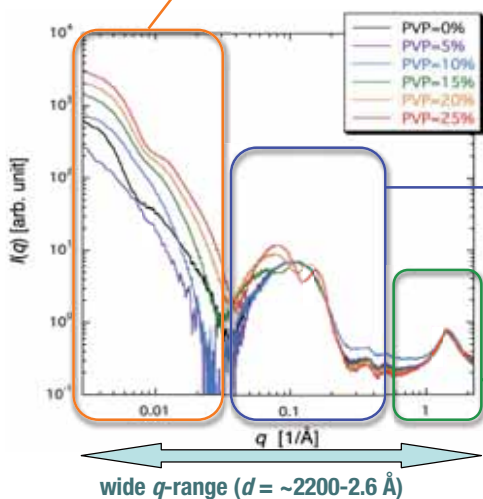
When osmolytes coexist, by the decrease of the chemical potential of the bulk water ($\mu_{b0} \rightarrow \mu_b$), osmotic pressure (Π_{os}) is generated;

$$\Pi_{os} = (\mu_{ex} - \mu_b) / V_w = (\mu_{b0} - \mu_b) / V_w \quad \text{Osmo-elastic coupling} \quad \left(\frac{\partial F}{\partial V_w} \right)_T = -\Pi_{os}$$

X線広角散乱で観測した脂質リポソームの構造階層性

Spring-8 2008

[G_{M1}]/ [chol.]/ [DOPC] = 0.1/ 0.1/ 1



浸透圧の上昇による 広角散乱曲線(WAXS)の変化

LUV of [G_{M1}]/ [chol.]/ [DOPC] = 0.1/ 0.1/ 1

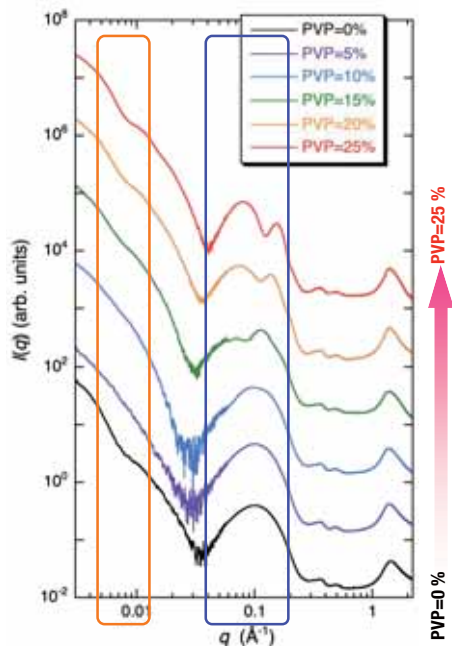
二重膜構造の変化

The WAXS curve in the q range of ~0.04-0.2 Å⁻¹ reflects the bilayer structure (thickness).
The single broad peak at q = ~0.1 Å⁻¹ split in double peaks depending on the increase of PVP concentration.

リポソーム形状の変化

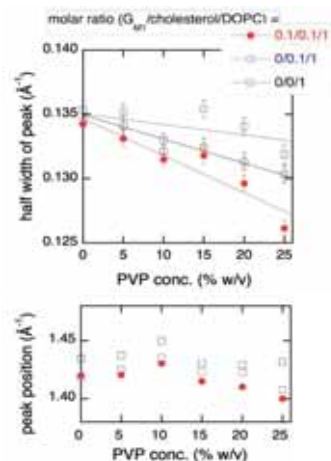
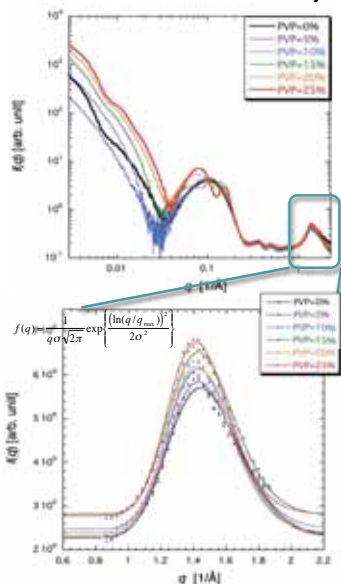
The WAXS curve below q = ~0.02 Å⁻¹ reflects the shape of the LUV.
The shoulder at q = ~0.01 Å⁻¹ disappears once at PVP=5%, and it appears again above PVP=15%.

PVP conc. (w/v)	P (N/m ²)	P (atm)
0	-	-
5	1.27E+04	0.125
10	4.30E+04	0.424
15	1.09E+05	1.08
20	2.28E+05	2.25
25	4.16E+05	4.11



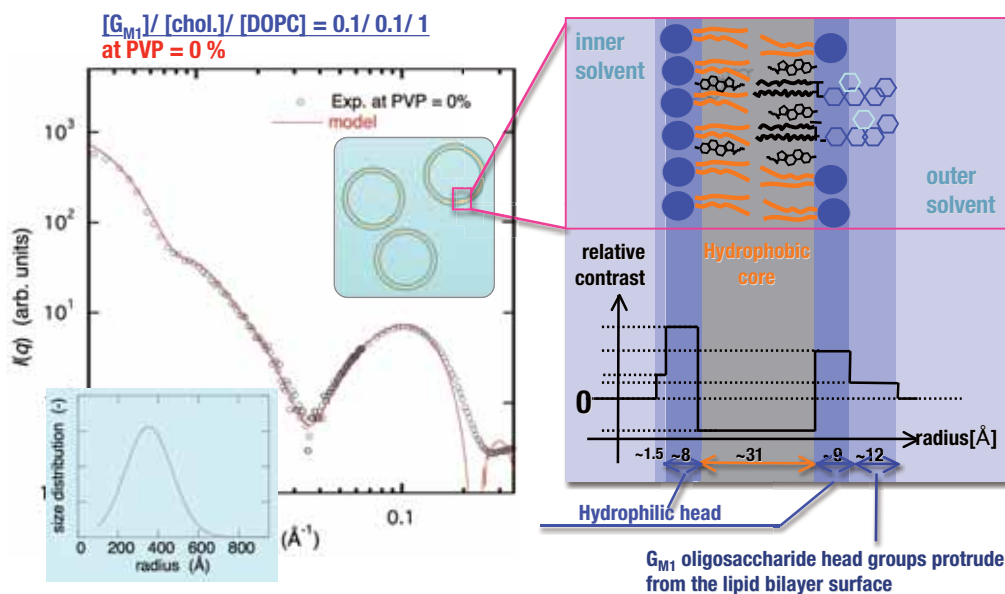
アルキル鎖のパッキング・揺らぎの変化

The peak around $q \sim 1.4$ [\AA^{-1}] reflects the packing of the alkyl chain. The variance, σ^2 , of the fitting function reflects the fluctuation of the alkyl chains.



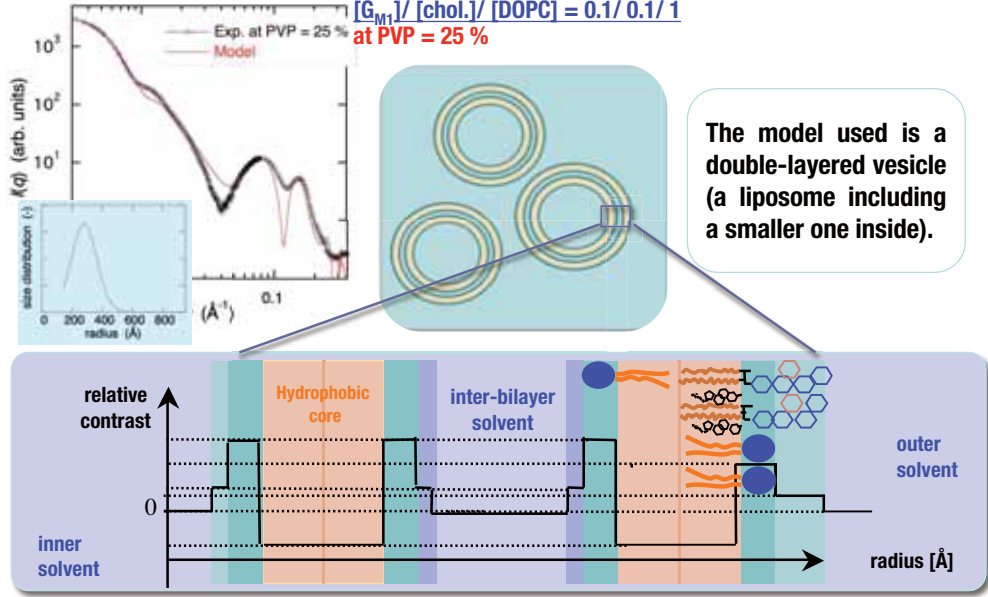
The osmotic pressure induces the ordering of the alkyl chain packing and suppresses the chain fluctuation. This tendency is evidently seen for the case of lipid mixtures containing G_{M1} .

サイズ分布を考慮した多重シェルモデル散乱関数による解析 -I- (浸透圧無し)

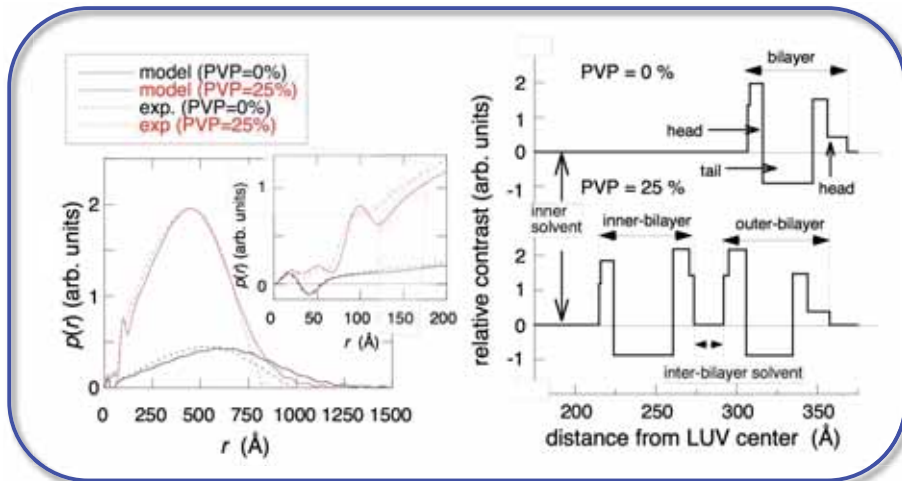


サイズ分布を考慮した多重シェルモデル散乱関数による解析
 -II- (浸透圧を負荷)

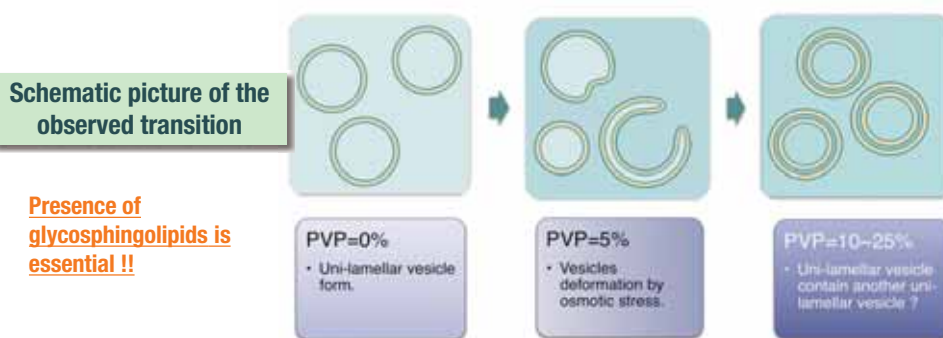
$[G_M]/[chol.]/[DOPC] = 0.1/0.1/1$
 at PVP = 25 %



実験およびモデル散乱関数の距離分布関数 $\rho(r)$ と
 得られた構造パラメータ



- (1) LUV (large uni-lamellar vesicle) の外表面に選択的に分布するスフィンゴ糖脂質(G_{M1}) の構造変化(糖鎖構造)が、浸透圧の変化に敏感に応答し、2重リポソーム構造への転移を誘起する。
- (2) G_{M1} /コレステロール/リン脂質(DOPC)三元系のみならず G_{M1} /DOPC二元系でも同様の変化が起きる。コレステロール/リン脂質およびリン脂質のみでは観測されない。
- (3) 転移が観測された浸透圧変化巾の値は小さく、生体系でも自立的に誘起される可能性がある。



Onai & Hirai, J. Phys. 247 (2010) 012018.

[4] 量子ビームを用いた生命科学の今後の展望

より複雑な反応系への放射光X線・中性子の相補的利用 生体系の場合

生体膜系—その未知なるもの—
「埋もれた生体膜界面」の構造と機能の解明



特殊な反応場としての生体膜系の機能の解明
動的な膜ネットワークを介した物質輸送, 情報伝達の分子機構の解明

多様な条件下における, 広い時間空間にわたる膜界面の構造とダイナミクスの情報

X線広角散乱
反射率

中性子広角散乱
反射率

中性子非・準弾性散乱

多細胞生物の生命現象の理解
創薬設計, マイクロリアクター,
バイオセンサー, デバイスなどへの応用

より広い空間・時間領域の測定への挑戦 SPring-8, PF etc. & J-PARC, JERI, etc.の相補的利用 放射光・中性子を用いた生物学科学の更なる飛躍！！

- 一度の測定で広角領域散乱データ ($0.002 < q < 600 \text{ nm}^{-1}$) を収集。
広角溶液散乱 at SPring-8, 超広角溶液散乱 at J-PARC
- 様々な条件における溶質分子の内部構造 (ドメイン間相関・配列や二次構造, 原子間距離など) から分子集合体の凝集体の高次構造の変化まで同時に解析。

J-PARC
At SPring-8
SR-WAXS : $0.02 < q < 30 \text{ nm}^{-1}$
SR-USAXS : $0.002 < q \text{ nm}^{-1}$

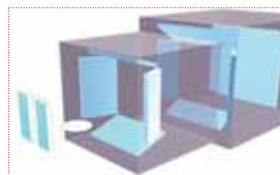
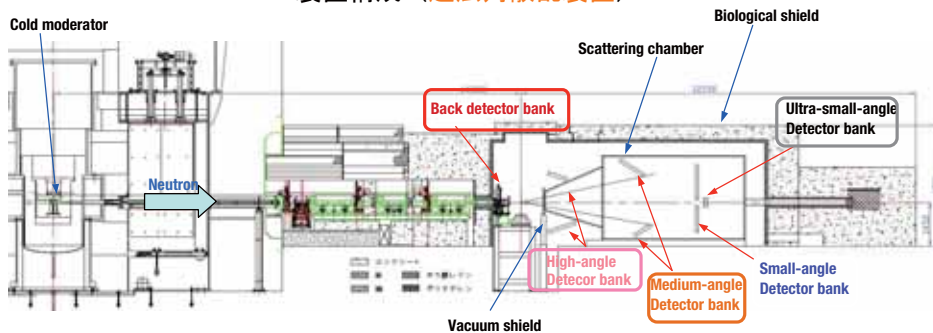


- 1) 対象となる系の実空間距離
超分子 : 10 ~ 1000 nm
蛋白質 : 1 ~ 10 nm (内部構造 : 0.2 nm ~ 3 nm)
蛋白質と核酸, 糖, 脂質などの複合体 : 1 ~ 30 nm
脂質, 生体膜 : 0.2 ~ 10 nm
- 2) 各種測定条件
温度 : 4.2 ~ 380K
圧力 : 15 kbar
各種ジャンプ法の時間分解能 : ~数msec以下
(温度, 光, 電磁場, 溶媒条件等)



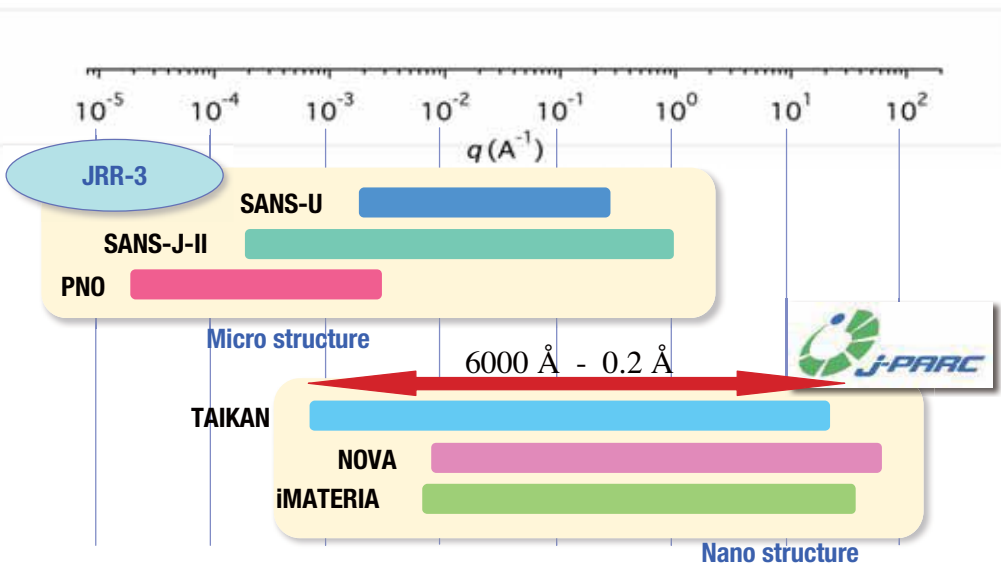
パルス中性子小角散乱装置(TAIKAN:大観) at J-PARC

装置構成 (超広角散乱装置)

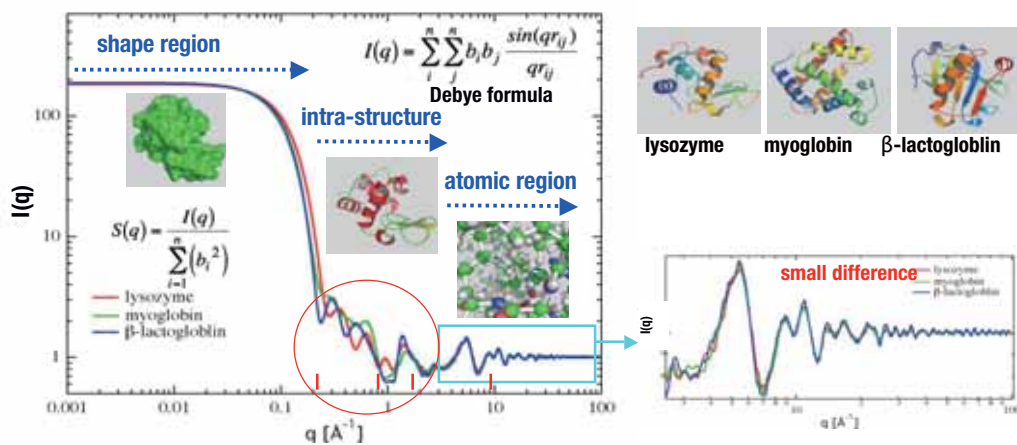


Detector arrangement

国内の代表的な中性子小角散乱装置の比較



TAIKAN can cover all hierarchal structure levels of proteins.
TAIKAN will be far beyond the limit of low-resolution analysis in SANS!!



Let's Leap Before You Look in Structural Biology & Biophysics
Complementary Use of Neutron & Synchrotron X-ray Scattering
Facilities in Japan



ご清聴有り難うございました.

研究の推進に協力いただいた学生諸氏に感謝致します.