

今後の展望

杉山先生 2つの方向性があります。1つはある種の蛋白質の溶液中での挙動や、その理由を徹底的に深掘りすること、もう1つは複数の蛋白質が構築する1つの秩序的なシステムを解析することです。

将来的にはこの2つの方向性を統合して、より生体に近い環境において、複数の蛋白質が共存する多成分系の溶液中で構築される解離会合平衡系などの秩序だったシステム全体の機能を解明したいと考えています。

最後にベックマン・コールターについて一言

杉山先生 ベックマン・コールターの分析用超遠心機は、溶液中の分子量分布が明確に見えるという点で、我々の研究にとっては必要不可欠な素晴らしい装置です。AUCは1920年代にスウェーデンで考案された古い技術ですが、さらに精密化することによって今まで見えなかった分子の世界が見えるようになると思います。

参考文献

- 1) Morishima K et al., Commun Biol 2020; 3: 294-300.
- 2) Fujii N et al., Amino Acids, 2007; 32: 87-94.
- 3) Peschek J et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2009; 106: 13272-13277.
- 4) Inoue R et al., Sci Rep 2016; 6: 29208.
- 5) Inoue R et al., Sci Rep 2021; 11: 2555.
- 6) Ishiura M et al., Science 1998; 281: 1519-1523.
- 7) Nakajima M et al., Science 2005; 308: 414-415.
- 8) Sugiyama M et al., Sci Rep 2016; 6: 35567.
- 9) Snijder J et al., Science 2017; 355: 1181-1184.

ベックマン・コールターの分析用超遠心システム

Optima AUC

使い勝手と光学系を一新した次世代分析用超遠心システム



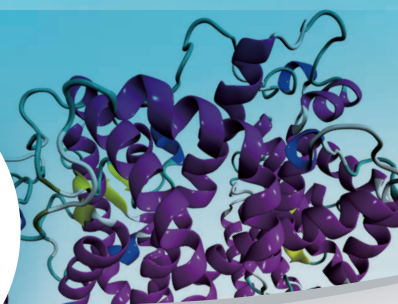
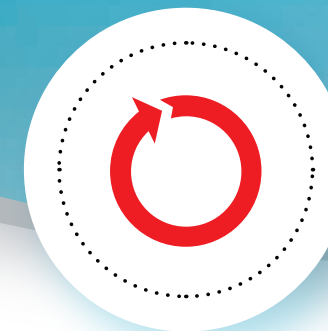
分析用超遠心システムがより正確に、より再現性高く、より簡単になりました。

特長

- 15インチのタッチスクリーンにより、操作性が大幅に向上
- 光学系はロータチャンバーの外側に収納されており、光学系は汚れることなく、ツマミを回すだけで簡単にセッティングが完了
- 迅速なスキャンと波長再現性の改善により、多波長分析が可能
- 最大同時20波長測定 (190~800 nm) できる多波長分析により、複数の発色団を利用した分析が可能
- 迅速なスキャンにより、より大きな複合体の測定に対応
- インターフェアレックス光学系システムにより、波長吸収の少ないサンプルも解析可能

Interview

水溶液中での蛋白質構造解析における 超遠心分析法の役割



杉山 正明 先生

京都大学複合原子力科学研究所 教授



守島 健 先生

京都大学複合原子力科学研究所 助教



ベックマン・コールター株式会社

お客様専用 ☎ 0120-566-730
C21v0390a

☎ 03-6745-4704

FAX 03-5530-2460

E-mail bckkcas@beckman.com
MAPSS-LS-202105-58

URL https://www.beckman.jp
B90070
2021.05-2000(C)

本 社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

Delivering INNOVATIVE and trusted scientific solutions across the globe

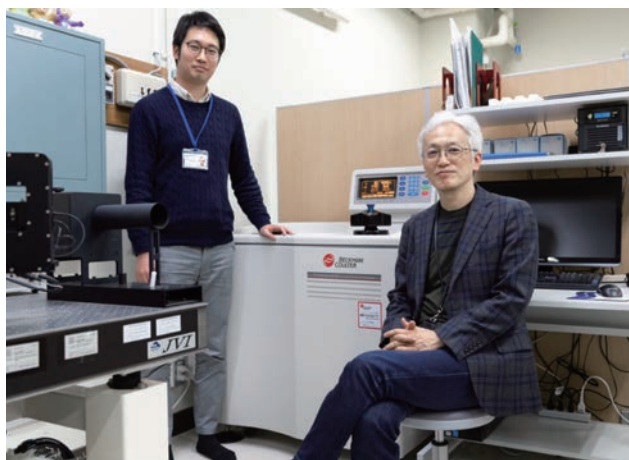
**BECKMAN
COULTER**
Life Sciences

水溶液中での蛋白質構造解析における 超遠心分析法の役割

生命現象の構造生物学的な側面からのアプローチとして、蛋白質の立体構造を高い空間分解能で解析する手法であるクライオ電子顕微鏡解析 (Cryo EM) や単結晶X線結晶構造解析がありますが、これらの解析では蛋白質が凍結・結晶状態での観察であるため、実際の蛋白質の溶液中での挙動や機能について情報を得ることができません。一方、X線や中性子を用いた小角散乱法 (SAS) は、溶液中での蛋白質の挙動や機能ならびに構造を解析する強力な測定法です。しかし、SASでは溶液中にわずかに存在する蛋白質の凝集体が解析データに大きく影響し、蛋白質の正確な散乱プロファイルが得られず、間違った構造解析につながるものが長年の問題でした。2020年、この問題を解決する新しい構造解析アプリケーションとして超遠心分析法 (AUC) で定量的に測定された凝集体の存在比率を用いて散乱プロファイルから凝集体のデータを適切に除去し、本来の構造データを取得できる画期的な解析方法 (AUC-SAS) が見いだされ、Communications Biology 誌に紹介されました¹⁾。

本日は、AUC-SASを開発された京都大学複合原子力科学研究所の杉山先生、守島先生に、先生方の研究テーマ、サンプル調製ならびに純度検定法、AUC-SASの有用性、AUC-SASによる蛋白質解析例や今後の展望について伺いました。

2021年5月



杉山 正明 先生

京都大学複合原子力科学研究所 教授

略 歴

京都大学大学院理学研究科物理学第2専攻博士 (理学)
九州大学理学部物理学科助手
文部省在外特別研究員 (ミネソタ大学化学工学科)
京都大学原子炉実験所 助教授
京都大学原子炉実験所 教授
京都大学複合原子力科学研究所 教授

専 門

ナノ構造物理学

所属学会

日本蛋白質科学会、日本生物物理学会、日本中性子科学会



守島 健 先生

京都大学複合原子力科学研究所 助教

略 歴

大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻 博士 (理学)
東京大学物性研究所 博士研究員
京都大学原子炉実験所 助教
京都大学複合原子力科学研究所 助教

専 門

ソフトマター物理化学

所属学会

高分子学会、日本中性子科学会、日本生物物理学会、
日本蛋白質科学会

水溶液中における蛋白質構造解析の意義

杉山先生 蛋白質の機能と構造を解析するためには、より生体に近い環境において、複数の蛋白質が共存する多成分系の溶液中で構築される解離会合平衡系などの、秩序だったシステム全体の機能を解明する必要があります。すなわち、構造体を構成する最小単位の各成分の分子の挙動と、これらが統合されたすべての分子の複雑な挙動の両者を解析する必要があります。

このような複数の蛋白質が共存する多成分系の溶液の分子挙動を解析するためには、小角散乱法(SAS)が絶大な威力を発揮します。しかし、SASを用いて蛋白質など生体高分子の溶液中での精密な構造解析を進める際に問題となるのは、不可逆的に形成される凝集

体の存在です。体積分率わずか数%の凝集体の混入が、SASの散乱プロファイルに無視できない影響を及ぼすことがあります。

この問題を解決する方法として、超遠心分析法(AUC)により測定される目的蛋白質と凝集体の成分比率を用いて、散乱プロファイルから凝集体の影響を取り除く解析方法(AUC-SAS)を開発しました¹⁾。AUC-SASを用いることで、SASによる溶液中における蛋白質の構造、機能のメカニズムの解明の精度が飛躍的に向上しました。

サンプル調製ならびに純度検定の重要性

杉山先生 研究室で行うX線を利用したSAS測定などのpreliminaryな実験では、1～数 mgの高純度に精製した蛋白質が必要となります。一方、他施設での中性子線を利用したSAS測定になると、100 mg程度の大量の高純度蛋白質が必要になる場合があります。

守島先生 遺伝子組換え蛋白質は大腸菌発現系を利用し作製します。サンプル調製の作業工程は、蛋白質発現用の大腸菌の作製・培養⇒蛋白質精製⇒蛋白質純度検定⇒構造解析というフロー(図1)です。また蛋白質を標識するために培地中に重水素置換処理を行うことがあります。この時、蛋白質の発現量が低下する恐れがあるため、約5 L以上の培地スケールから発現条件を検討しています。また、蛋白質の精製は主にカラムクロマトグラフィー法により行い、精製した蛋白質の純度検定は、AUC、SDS-PAGE、質量分析など多面的な方法で行います。

杉山先生 SAS測定で良い散乱データを取得するためには、サンプル調製で重要なポイントが2つあります。1つ目は、きれいなサンプルを大量に調製しておくこと、そして2つ目はそのサンプルの純度を定量的に検定することです。きれいなサンプルとは、正しいアミノ酸配列で末端などに欠損がなく、溶液中に凝集物や蛋白質以外の夾雑物が混入していない高純度のサンプルのことです。また、SAS測定で失敗する主な原因はサンプルの品質が劣化していることなので、測定前には必ずサンプルの定量的な純度検定をバックマン・コールターの分析用超遠心機で行い、溶液中の会合体や凝集体の存在を確認します。

図1 遺伝子組換え蛋白質の構造解析(AUC-SAS法)のための実験フロー



AUCの有用性

杉山先生 蛋白質などの生体高分子の構造や挙動を正確に観察・理解するためには、さまざまな解析手法を用いて多角的な視点で統合的な解析を行うことが重要です。SAS測定データを補完するための溶液中での蛋白質の特性解析手法としては、AUC、サイズ排除クロマトグラフィー、質量分析、動的光散乱などがありますが、このうち正確なSAS測定による構造解析データを補完するために我々はAUCを用いています。

AUCは、蛋白質溶液を高速で遠心し、沈降挙動をリアルタイムで観測する測定方法です。測定モードには、沈降速度法と沈降平衡法があり、前者では主に、溶液中の分子の均一性と凝集体の有無、沈降係数や分子量分布ならびに溶液成分の比率といった定量データ、後者では絶対分子量や蛋白質間の相互作用情報が得られます。さらに、AUCがほかの解析手法と比べて優れている点は、標準物質、同位体、蛍光物質によるラベルや支持体を必要とせず、そのままの状態の溶液で蛋白質を解析できることです。

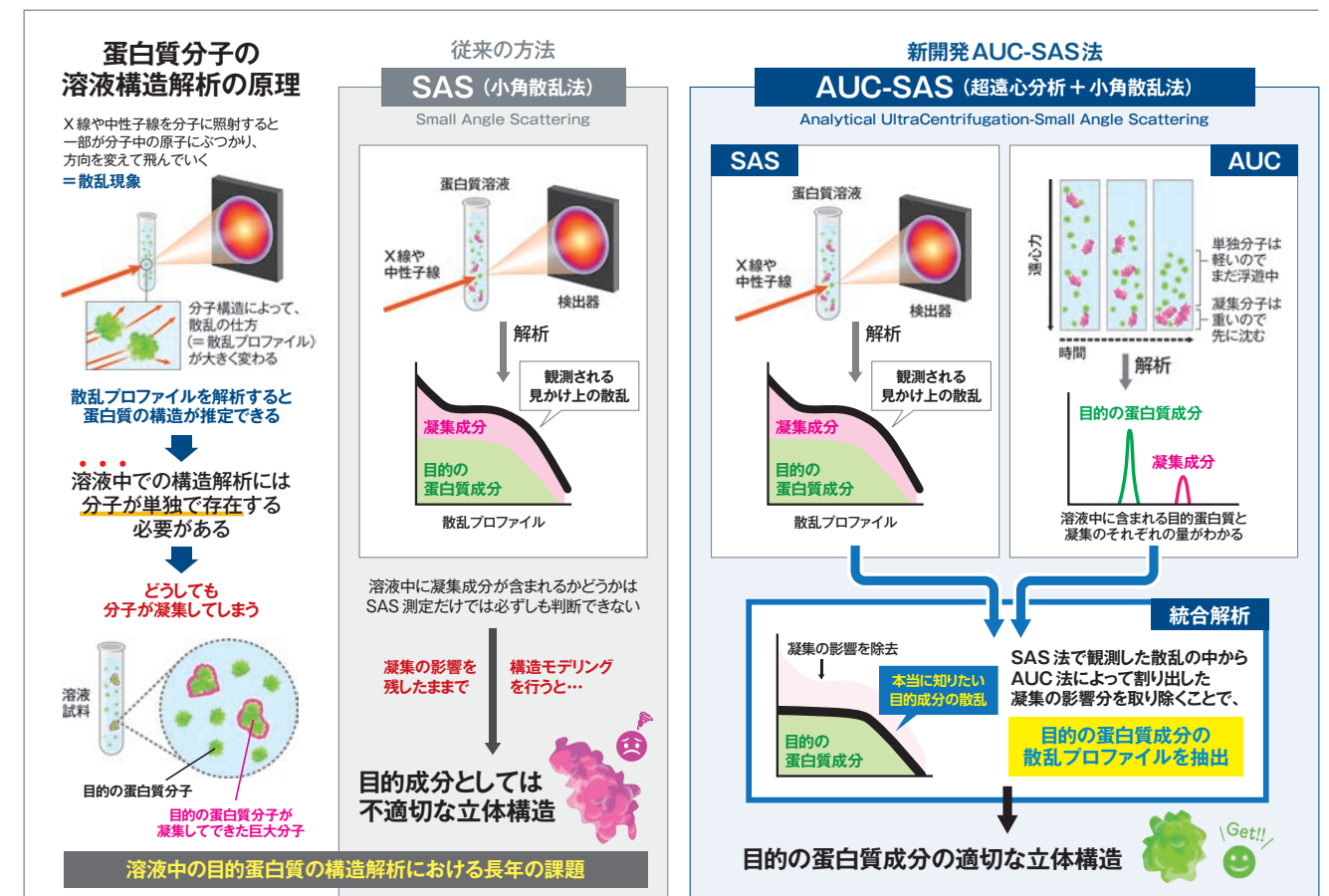
AUCから得られるこれらの有用な情報を、SASによる構造解析手法と相補的に用いることで、目的蛋白質の正しい散乱データを得ることができるので、溶液中の蛋白質の構造に関する理解を深めること

ができます。

SASでは、X線または中性子線を蛋白質水溶液に照射し、小角領域に散乱されたX線または中性子の強度を測定することで、その蛋白質に特有の散乱プロファイルを得ることができます。しかし、得られた散乱プロファイルは溶液に含まれるすべての物質の平均データであるため、目的蛋白質以外の物質、例えば蛋白質の凝集体が含まれる場合には、目的蛋白質に特有の正確な散乱プロファイルを得ることはできません。さらに、溶液中に凝集体が含まれているかどうかをSAS測定だけでは判断できない場合もあります。そこで、バックマン・コールターの分析用超遠心機から得られる溶液中の目的蛋白質と凝集体それぞれの沈降係数と定量的な成分比率データを勘案することで、SASの散乱強度の実験値から目的蛋白質と凝集体に分離することができ、目的蛋白質の正確な散乱プロファイルの抽出が可能になります。AUC-SASを用いることで、溶液中の目的蛋白質の適切な立体構造解析が可能になりました(図2)。



図2 新しい蛋白質溶液の構造解析 (AUC-SAS 法)



AUCとSASを用いた蛋白質解析例

① α クリスタリンのサブユニット動態の観測

杉山先生 目にはレンズの役割を果たしている水晶体を形成する特異な構造蛋白質としてクリスタリンがあります。クリスタリンはマルチドメイン蛋白質の1種で、クリスタリン同士の相互作用と秩序立った構造が保持されることにより、水晶体は何十年にわたり透明性が維持されます。

水晶体は劣化した蛋白質を分解排出する代謝機能を持ちません。そのため、変性したクリスタリンが生じると細胞内で不溶性の異常な凝集体となり、これらは代謝されることなく細胞内に蓄積されます。しかし、クリスタリンの構成蛋白質の1つには、このような異常な凝集体を見つけると、これらの立体構造を元に戻す分子シャペロン機能を有した α クリスタリンがあります。この α クリスタリンのおかげで水晶体は何十年の間、透明性を維持することができます。

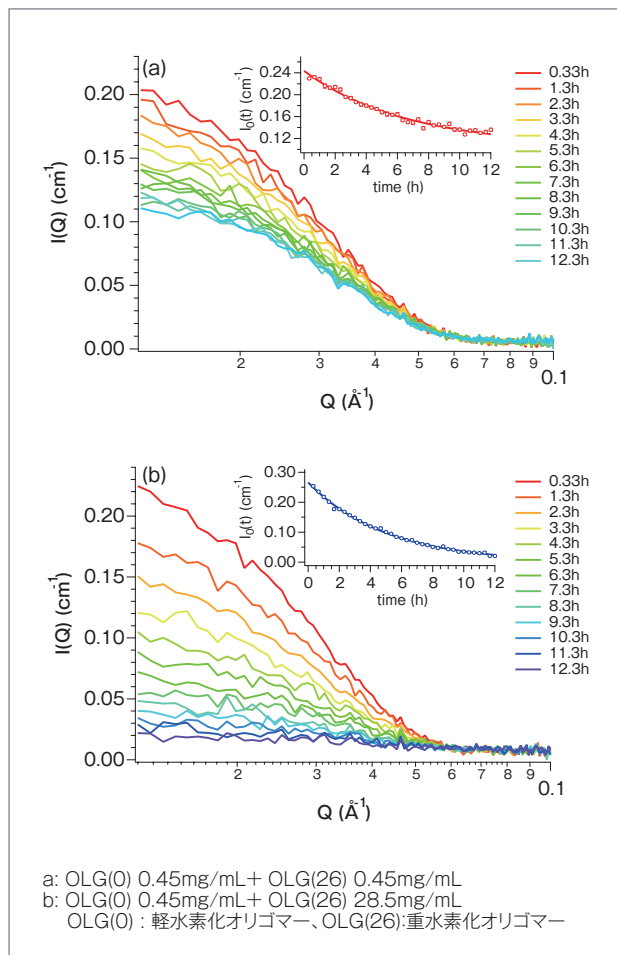
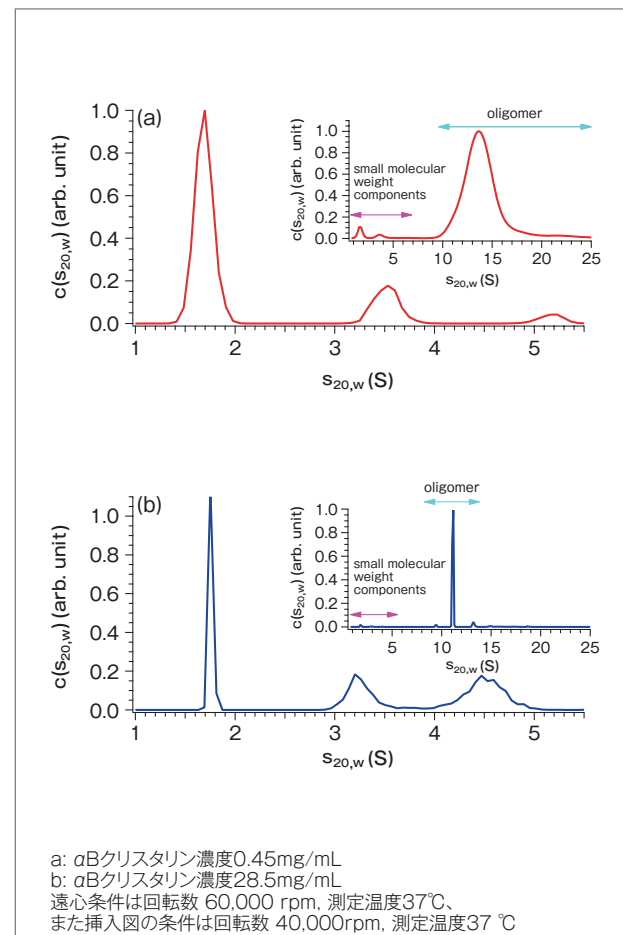
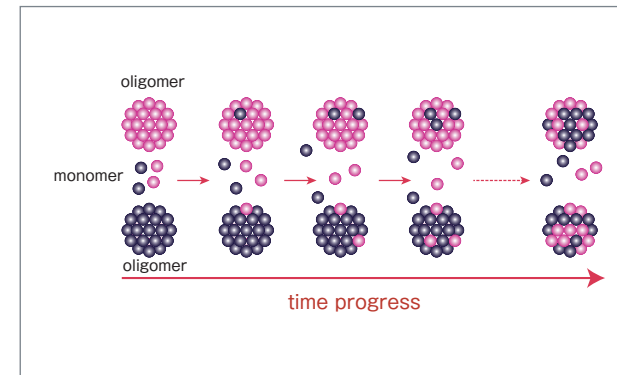
α クリスタリンは分子量約2万の α Aならびに α Bの2つのサブユニットを持ち、これらのサブユニットが20~40個と動的な平衡状態で解離会合し立体構造を維持している蛋白質で、決まったサブユニット数を持っていません。このことから α クリスタリンは単結晶の作製ができない

ため、単結晶X線結晶構造解析ができません^{2,3)}。

そこで、我々は α Aならびに α Bドメイン交換メカニズムと、それに伴う α クリスタリンの構造変化により制御されているシャペロン機能の解明のために、 α クリスタリンのサブユニットの1つで透明性の維持に重要な α Bクリスタリンのホモ会合体をモデル系として、重水素化ラベリング法を用いた中性子線SAS (DA-SANS)、沈降速度法AUC (SV-AUC)、非変性状態質量分析 (Native MS) などの測定手法^{4,5)}を用いて構造解析を行いました。

その結果、この系では会合体を壊すことなく一時的に会合体から遊離したサブユニット (traveling subunits) と別の会合体との間でサブユニット交換が起こっており、このtraveling subunitsによって蛋白質の機能がコントロールされていることが示唆されました⁴⁾。さらに、生体に近い状態での解析を試みるために、高濃度のサンプルをDA-SANSならびにAUCで測定したところ、小さなサブユニットの会合体ならびにサブユニットモノマーの溶液中での構造をとらえることができました (図3)。さらに、AUCではこれらの成分比と小さな会合体とモノマーの分子量も求めることができました (図4)。これらの解析データから、合理的な α Bクリスタリンのサブユニットの結合・遊離モデルを提唱することができました (図5)⁵⁾。

図3 DA-SANSによるSANSプロファイルの経時変化

図4 α BクリスタリンのAUCスペクトル図5 α Bクリスタリンのサブユニット交換モデル

② 時計蛋白質の溶液中動態の解明

杉山先生 生物には24時間周期のリズムを刻む生体時計が備わっています。その中でも、真正細菌であるシアノバクテリアは、時計蛋白質の存在が知られている最も下等な生物で、一番単純な24時間周期の概日リズムのシステムを持っています。シアノバクテリアの概日リズムは、3つの時計蛋白質、KaiA、KaiB、KaiC⁶⁾が複合体を形成することで生じており、試験管内でこれら3種の蛋白質とアデノシン三リン酸を混合すると、KaiCを中核として24時間周期でこれらの蛋白質が離合集散し、24時間前と同じ構造に戻るというユニークな性質を示します⁷⁾。

まず、KaiA、KaiB、KaiCのそれぞれの溶液中での挙動についてAUCによる解析を行ったところ、KaiAのみでは2量体、KaiBのみでは4量体、KaiCのみでは6量体を形成することを確認しました。次に、KaiBとKaiCの複合体の構造解析を試みました。擬似リン酸化したKaiC変異体を用いて調製したKaiB-KaiC複合体を対象に、Native MS、DA-SANSおよびSV-AUCを用いて構造解析を行いました。その結果、Native MSとSV-AUCによる測定から、KaiB-KaiC複合体は分子量 $428,600 \pm 410$ Da、沈降係数 13.7 Sで、6分子のKaiBと6分子のKaiCから構成されていることが明らかになりました (図6)⁸⁾。

さらに重水素化ラベルしたKaiCと軽水素のKaiBで構成される複合体に対してDA-SANSを行うことで、KaiB-KaiC複合体中のKaiBの構造情報を得ることができました。この結果から、KaiB-KaiC複合体の構造としては、KaiBがKaiCの上側に配置されたディスク状の6量体を形成する構造モデル (Model 1) が最も実測値に近い構造であることが示されました (図7)⁸⁾。

その後の研究で、KaiA、KaiB、KaiCの複合体の構造については、Cryo EMならびにNative MSによって、KaiCが6個、KaiBが6個の上にKaiAが12個会合したリング状の構造モデルが海外の研究者によって示されました⁹⁾。しかし、Cryo EMでは溶液中での揺らぎを反映した構造データを得ることは困難で、特にKaiAの部分については詳細な構造解析が必要と考えました。そこで、我々はKaiAの溶液中でのより詳細な構造解析をAUC-SAS法により進めています。

図6 KaiB-KaiC複合体の検出

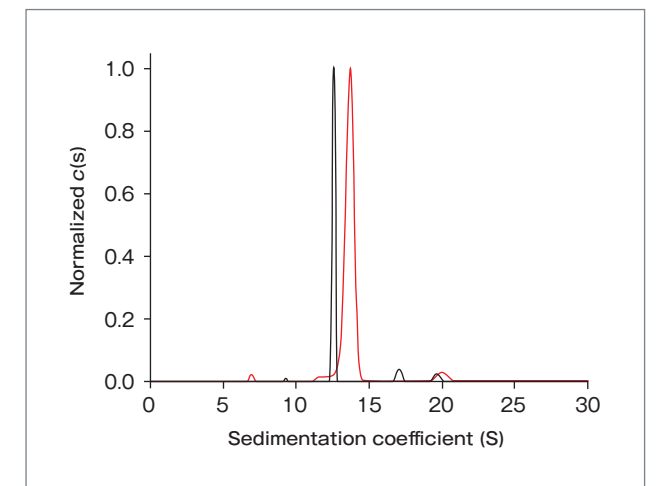


図7 KaiB-KaiC複合体構造モデルに基づいて計算されたSANSプロファイルおよび実測値

