



タンパク質のフォールディングと溶液広角散乱, 階層構造の解析

平井光博 群馬大学工学部共通講座工学基礎2 前橋市荒牧町 4-2

要旨 放射光 (SR) を用いる X 線小角散乱法 (SAXS) は溶液中でのタンパク質の構造解析に汎用されてきた。従来の SR-SAXS 法では小角領域のデータから評価できる回転半径, 距離分布関数などの低分解能の構造情報を解析するに留まっていたが, SPring-8 のような第 3 世代 SR 光源の利用と光学系・検出器系の改善によって, 測定の時間分解能のみならず, 空間分解能が著しく改善されたため, タンパク質の全階層構造 (四・三次構造, ドメイン構造, 二次構造) にわたる解析を行うことが可能となった。この小論では, タンパク質広角散乱法の基本とデータ処理法について説明した後, 筆者らが行ったタンパク質のアンフォールディング・リフォールディング過程における構造転移の階層構造依存性, 協同性に関する研究を例に取り上げ, タンパク質溶液の X 線広角散乱法 (WAXS) が一般化することを期したい。

1. 序論

タンパク質のフォールディングに関する研究は, 組み換えタンパク質の作成技術や, NMR や CD などの各種の分光学的測定技術の発達, 計算機科学の進展により, フォールディング過程の速度論的解析やその理論的理解が急速に深まっている¹⁾。タンパク質のフォールディングの機構の解明には, フォールディングの中間体などの非天然状態の構造や, 構造転移の過程の詳細を明らかにする必要があるが, 「構築原理」解明の基礎となるのは, 様々なタンパク質の多様な条件下における立体構造情報であり, 溶液中での構造変化を直接測定可能な SAXS 法は重要な研究手法の一つとなっている。

そのため, SR-SAXS 法によるタンパク質のフォールディングに関する従来の研究の多くにおいて, 小角領域のデータ (Guinier 領域: $qR_g < 1$, R_g は分子の回転半径, q は散乱ベクトルの大きさを $q = (4\pi \sin \theta) / \lambda$, 2θ 及び λ は, それぞれ散乱角及び波長) から得られる回転半径 R_g の値や距離分布関数解析から, 非天然状態のタンパク質分子のおよその広がり (四次・三次構造) の変化などが主に議論されてきた。また, 第 2 世代放射光源の利用が始まった当初から, 小角領域のみならず中・高角領域に至る広い角度範囲の散乱データ全体には, Fig. 1 に示したようなタンパク質の構造階層性 (四次・三次構造, ドメイン構造, 二次構造) に依存した分子内構造相関が反映されると期待されていたが, 希薄なタンパク質溶液からの散乱を対象とするために, 中・高角領域の観測データにおいて十分な S/N が得られなかったために, 構造ドメイン間相関・ドメイン内構造や二次構造などを評価した研究は殆ど無かった。(以下, 本記事では「広角」, 「小角」, 「中角」, 「高



Fig. 1 Hierarchical structure of protein.

角) を, それぞれ階層構造全体, 四次・三次構造, ドメイン構造, 二次構造をカバーする領域の意味で用いる。) 筆者らは, 第 2 世代放射光源である PF の酵素回折計 BL-10C を利用したタンパク質の熱変性の研究において, 溶媒条件に依存して小角領域の散乱曲線の変化 (分子外形の変化) に先立って分子内構造ドメイン間の相関に由来する中角領域の散乱曲線の変化が起きること, 小角領域の転移温度は示差熱測定で得られるものと良い一致を示すが, 中角領域では大きくずれることなどを見出し, 測定領域を拡張することでタンパク質の構造転移の多状態性や階層性を議論可能であることを指摘した²⁻⁴⁾。

その後の, 第 3 世代放射光源 SPring-8 の稼働にともなうビームの平行性と輝度の向上, 大有効面積の検出器 (RIGAKU R-AXIS IV) や光学系の整備によって, SPring-8 構造生物 BL40B2 では, 波長 1 \AA を用いた場合, 小角分解能 (カメラ長 3 m で $q = \sim 0.0025 \text{ \AA}^{-1}$), 高角分解能 (カメラ長 0.4 m で $q = \sim 3 \text{ \AA}^{-1}$) と, 観測領域が格段に改善された。この BL40B2 で得られた広角散乱データと理論散乱関数の比較から, タンパク質の二次構造に至る全階層構造に対応する散乱関数が高い統計精度で測定可能

であることを初めて示し⁵⁾, また, アンフォールディング・リフォールディング過程におけるタンパク質分子の全体構造, ドメイン間相関, 二次構造のそれぞれの変化と構造階層間の転移における協同性の詳細な評価ができることを見出した⁶⁻⁷⁾。以下, タンパク質広角散乱測定データの解析の基本的事柄から説明する。

2. タンパク質溶液の広角散乱の基本

2.1 コントラストと基本散乱関数

一般に, 観測により識別可能な構造の限界を分解能と呼ぶが, 散乱法では, 測定可能な散乱角 (散乱ベクトルの大きさ q) と対応付けて, 小角分解能 (どの程度の大きな構造まで観測可能か), 高角分解能 (どの程度の小さな構造まで観測可能か) と表現する。通常の散乱法では原子レベルの分解能の構造を対象としないために, 単分散系における粒子の散乱関数は, 微小体積内に含まれる多数の原子の散乱振幅の平均値 (散乱密度) を用いて物質内の構造を議論する。そのため, 着目する粒子の散乱密度分布と, それが存在しているマトリックス (溶媒, 媒質など) の散乱密度分布との差が粒子の構造に関する情報をもたらす⁸⁾。

$$\begin{aligned} \rho(\mathbf{r}) &= \{\bar{\rho}\rho_C(\mathbf{r}) + \rho_F(\mathbf{r})\} - \rho_S\rho_C(\mathbf{r}) \\ &= (\bar{\rho} - \rho_S)\rho_C(\mathbf{r}) + \rho_F(\mathbf{r}) \\ &= \Delta\bar{\rho}\rho_C(\mathbf{r}) + \rho_F(\mathbf{r}) \end{aligned} \quad (1)$$

ここで, $\bar{\rho}$, ρ_S , $\Delta\bar{\rho}$ は, 粒子全体及びマトリックスの平均散乱密度, それらの差 (有効平均散乱密度, 「コントラスト」と呼ばれる), $\rho_C(\mathbf{r})$, $\rho_F(\mathbf{r})$ は, 粒子の形状関数および平均散乱密度からの揺らぎの分布関数である。したがって, 式(1)の散乱密度分布の自己相関関数のフーリエ変換として, 観測される散乱関数 $I(\mathbf{q})$ は, 式(2)で与えられる。

$$\begin{aligned} I(\mathbf{q}) &= |\mathcal{F}\{\Delta\bar{\rho}\rho_C(\mathbf{r}) + \rho_F(\mathbf{r})\}|^2 \\ &= (\Delta\bar{\rho})^2 |A_C(\mathbf{q})|^2 + 2(\Delta\bar{\rho}) \mathcal{R}\{A_C(\mathbf{q})A_F(\mathbf{q})^*\} \\ &\quad + |A_F(\mathbf{q})|^2 \\ &= (\Delta\bar{\rho})^2 I_C(\mathbf{q}) + \Delta\bar{\rho} I_{CF}(\mathbf{q}) + I_F(\mathbf{q}) \end{aligned} \quad (2)$$

ここで, $A_C(\mathbf{q})$, $A_F(\mathbf{q})$ は散乱体の形状 $\rho_C(\mathbf{r})$ および散乱密度の平均値からの揺らぎ $\rho_F(\mathbf{r})$ の散乱振幅, $I_C(\mathbf{q})$, $I_F(\mathbf{q})$ はそれらの散乱関数, $I_{CF}(\mathbf{q})$ は形状と揺らぎの干渉項の散乱関数であり, 式(2)の三つの項を基本散乱関数と呼ぶ (上付きの*は複素共役, \mathcal{R} は実部)。散乱体が等方的に分散している場合には, $I(\mathbf{q})$ の空間平均,

$$I(q) = (\Delta\bar{\rho})^2 I_C(q) + \Delta\bar{\rho} I_{CF}(q) + I_F(q) \quad (3)$$

式(3)が観測されることになる。式(3)から明らか

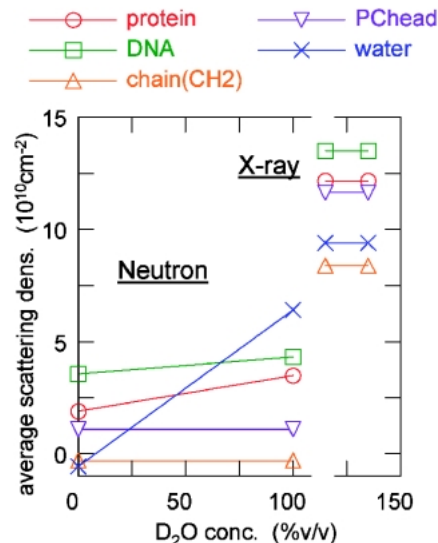


Fig. 2 Average scattering densities of representative biological materials (protein, DNA, alkyl chain and choline head of lipid) for neutron and X-ray.

に, 異なるコントラスト $\Delta\bar{\rho}$ の値三点以上で測定すると, 連立方程式を解くことにより原理的にそれぞれの基本散乱関数を分離できる。中性子溶液散乱法では, 水溶媒中の軽水/重水置換 (溶媒コントラスト変化法), 溶質分子の重水素化, プロトン核スピン偏極 (核スピンコントラスト法) などによって $\Delta\bar{\rho}$ を容易に変化できるように実用に供されてきたが⁹⁾, 基本となる考え方は, X線溶液散乱の場合にも成り立つ。Fig. 2には, 代表的な生体構成物質の中性子およびX線に対する平均散乱密度を示す。中性子の場合, タンパク質と核酸の平均散乱密度が軽水/重水の比率で変化するの, 解離基の水素と溶媒中の水素との交換により平均散乱密度が変化することによる。

式(3)から予測されるように, コントラストを変化させると散乱関数 $I(q)$ は大きく変化する。軽水/重水の比率を変えた溶液中でのタンパク質 (リゾチーム) の中性子散乱関数を計算して (Fig. 3), 式(3)の各基本散乱関数を分離した例を Fig. 4 に示す。

計算には蛋白質結晶構造データベース (PDB) の原子座標と溶液散乱計算プログラム (CRYSON)¹⁰⁾を使用した。図から明らかな様に, 小角領域 ($q < \sim 0.25 \text{ \AA}^{-1}$) を除き, $\sim 0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ の領域の散乱関数 $I(q)$ は, 分子内部の散乱密度揺らぎ $\rho_F(\mathbf{r})$ を強く反映していることが分かる。言い換えると, 中・高角領域では散乱体の形状による散乱関数 $I_C(q)$ の効果が低下し, $I_F(q)$ の寄与が増大する。実際に, 中性子溶媒コントラスト変化法を用いて基本散乱関数を実験的に分離した例もある¹¹⁻¹³⁾。尚, $q > \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$ の領域では「コントラスト」の概念そのものが成立しない (コントラスト変化に散乱関数は依存しない) ので注意されたい。

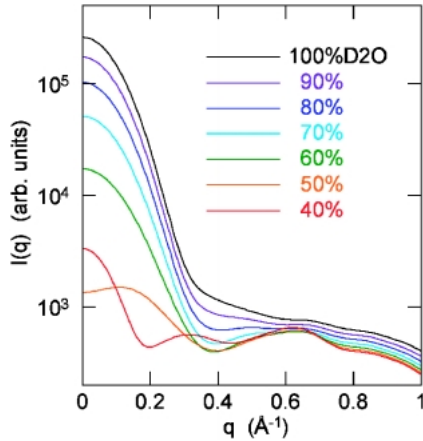


Fig. 3 Simulated scattering functions of hen egg-white lysozyme (HEWL) depending on solvent contrast. The contrast was varied by D₂O/H₂O ratio in water solvent.

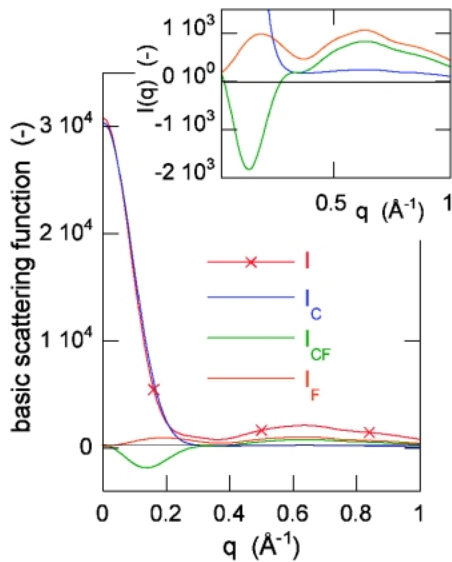


Fig. 4 Separation of basic scattering functions of hen egg-white lysozyme (HEWL). I , I_C , I_F , and I_{CF} are defined by Eq. 2.

2.2 内部構造と基本散乱関数の特徴, その意義

タンパク質結晶構造解析の急速な進展によって, 膨大な原子座標データが蓄積されている。それらをもとに, 基本散乱関数を計算し, それぞれのタンパク質の内部構造に由来する溶液散乱パターンの特徴を推測できる¹⁴⁾。Fig. 5には, タンパク質立体構造分類データベース (SCOP)¹⁵⁾に従って選び出した, all- α (ヘリックスが豊富), all- β (シートが豊富), $\alpha+\beta$ (ヘリックス領域, シート領域が并存) タンパク質の例を示してある。

Fig. 4と同様に, 散乱体の形状を反映する $I_C(q)$ は散乱角の増加とともに急激に減少するが, 散乱体内部の散乱密度揺らぎの相関関数に起因する $I_F(q)$ は, 個々のタンパク質内部の構造の特徴を反映して高角領域まで大きく変動している。タンパク質の内部構造は, その機能や構造安定

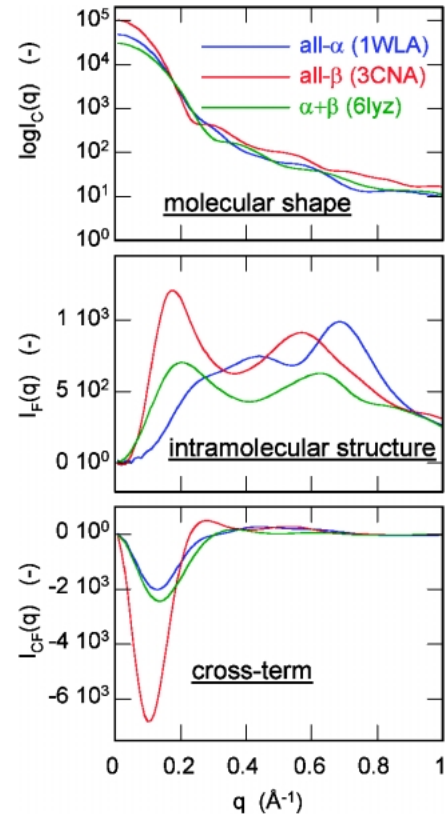


Fig. 5 Basic scattering functions of three different types of proteins classified in SCOP (Structural Classification of Protein) data base (all- α , all- β , $\alpha+\beta$).

性, 機能状態における構造変化に深く関わっており, このことが高い統計精度の広角散乱測定が重要な第一義的な理由である。また, 現在の結晶構造を基礎とした構造分類データベース (SCOP, CATH, FSSP) や立体構造比較プログラム (VAST, CE) とは異なった観点からの構造分類を行い, さらに, それを基礎として, 他の立体構造予測プログラムとリンクすることで, 非結晶化タンパク質の構造の予測にも利用できる可能性がある。

2.3 タンパク質溶液 X 線広角散乱のデータ処理

通常, X 線を用いた希薄溶液の散乱測定では, 単純に溶液の散乱強度 $I_{sol}(q)$ から溶媒の散乱強度 $I_{solv}(q)$ を引くことによって散乱体の $I(q)$ を評価することが多い。しかし, WAXS データのバックグラウンド処理では, 単純な散乱強度の差し引きを行うだけでは, 高角側のデータを再現性良く得ることはできない。Fig. 6 に示した様に, 高角領域では, 溶媒からの散乱が支配的になる。

溶媒 (水) の分子間相関の効果は $q = \sim 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ 以上から増加を始めて $q = \sim 2 \text{ \AA}^{-1}$ においてブロードなピークを示す。この分子間相関ピークの位置は, 温度に敏感であり, 284 K から 357 K の温度域では $q = 1.95 \text{ \AA}^{-1}$ から 2.05 \AA^{-1} へとシフトする (Fig. 7)。そのため, WAXS データのバ

バックグラウンド処理には、タンパク質分子の排除体積のみならず、測定温度における水の分子間相関ピークを考慮する必要があります。

次式によりタンパク質からの散乱強度 $I(q)$ を再現性良く得られることが見出された⁵⁾。

$$I(q) = \frac{1}{I_{peak}^{sol}} \left[\frac{I_{sol}(q)}{B_{sol} T_{sol}} - \frac{I_{cell}(q)}{B_{cell} T_{cell}} \right] - \frac{(1 - cv_a)}{I_{peak}^{sol}} \left[\frac{I_{sol}(q)}{B_{sol} T_{sol}} - \frac{I_{cell}(q)}{B_{cell} T_{cell}} \right] \quad (4)$$

ここで、 c 及び v_a はタンパク質の濃度および偏比容、 T_{sol} 、 T_{sol} 、 T_{cell} は、それぞれ溶液、溶媒及び試料セルの X 線透過率、 B_{sol} 、 B_{sol} 、 B_{cell} はそれぞれ溶液、溶媒及び試料セルの測定時の入射ビーム積分強度である。式(4)で効果的な

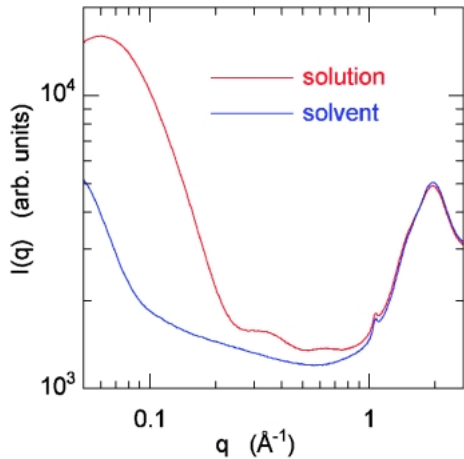


Fig. 6 Comparison of raw WAXS data of HEWL solution (5%w/v, at pH 7, 16°C) with its buffer solvent. The broad peak at $q \sim 0.06 \text{ \AA}^{-1}$ for the solution is ascribed to the repulsive interaction between the solute molecules. The peak at $q \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$ is attributable to the film of the scattering chamber.

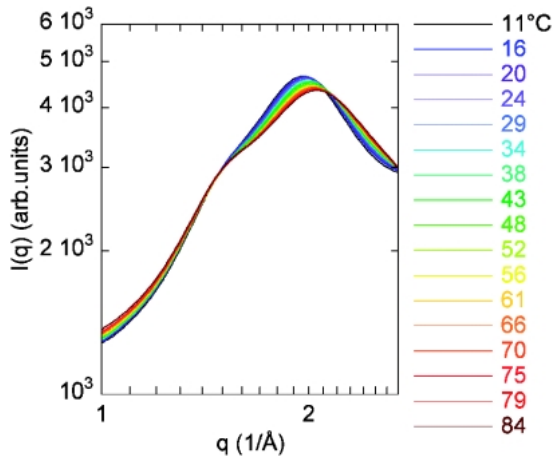


Fig. 7 Temperature dependence of high-angle scattering curve of water solvent.

バックグラウンド処理が可能な理由は、高角領域の水の分子間相関ピークを言わば基準物質として利用していることによる。

3. タンパク質の X 線広角散乱の現状

3.1 タンパク質の X 線広角散乱データと階層構造、理論散乱関数との比較

SR-WAXS により得られる散乱曲線からは、およそ、各散乱領域別にタンパク質の階層構造に関する情報が得られる。**Fig. 8** に、式(4)を用いて得られた卵白リゾチーム (HEWL) と馬ミオグロビンの広角散乱データと理論散乱関数の比較を示す⁵⁾。小角領域で HEWL では反発的分子間相互作用によるずれが見られるが、二次構造領域まで理論散乱関数と極めて良い一致をしていることが分かる。また、図中には HEWL の立体構造の模式図および主要な分子内相関距離を示す。HEWL のような球状タンパク質の場合、各散乱領域のデータはおよそ図に示したような構造情報をそれぞれ反映している。A) $q < \sim 0.2 \text{ \AA}^{-1}$: 分子の形状 (四次・三次構造), B) $\sim 0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.5 \text{ \AA}^{-1}$: 構造ドメイン間相関, C) $\sim 0.5 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.8 \text{ \AA}^{-1}$: 構造ドメイン内のヘリックスやシートの配列, D) $\sim 1.1 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 1.9 \text{ \AA}^{-1}$: α ヘリックスや β シートの含量及び近接す

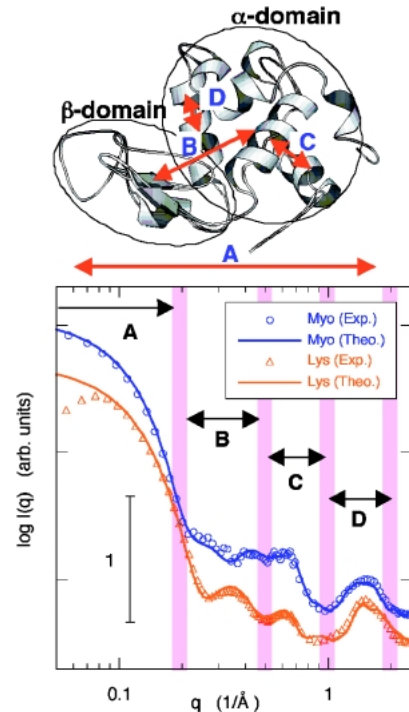


Fig. 8 Experimental and theoretical wide-angle X-ray scattering curves of HEWL and horse skeletal muscle myoglobin with schematic image of three-dimensional HEWL structure. 5% w/v myoglobin at pH 6.4, 5%w/v lysozyme at pH 5. The regions of A, B, C and D mostly correspond to the different hierarchical structural levels.

る側鎖のパッキング。理論散乱曲線の計算には Svergun
らが開発したプログラム CRYSOLO を使用した。このプロ
グラムでは, PDB に登録された結晶構造原子座標に基づ
き, 高次の球面調和関数展開 (50 次まで) を利用して水
和シェルを考慮したタンパク質の溶液中での散乱曲線が計
算できる⁹⁾。そのため, 溶液中での構造と結晶構造との差
が小さいタンパク質では, 小・中角領域の理論散乱関数と
実験データの一致はきわめて高い。実験的に広い角度領域
で散乱観測できれば, 溶液中での構造に関して, 分子の形
状からドメイン構造・二次構造に至る広い空間領域の構造
情報を一度に評価できると同時に, CRYSOLO などを用い
た理論散乱関数との直接の比較が容易となる。

3.2 リゾチームの熱アンフォールディング・リフォー ルディング過程の広角散乱解析

Fig. 9 に HEWL の熱可逆構造転移 (アンフォールディ
ング・リフォールディング) の観測結果を示す⁶⁾。通常,
タンパク質のフォールディング研究では, 構造転移に伴う
凝集体形成を避けるために低濃度で行われることが多い
が, 低イオン強度溶媒下におけるタンパク質分子間の反発
的相互作用を利用すると, 高濃度 (1~5% w/v 程度) 溶
液を利用して, 小角領域にその影響が現れるもの ($q >$
 $\sim 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ では濃度効果は無視できる), 散乱関数の可逆
的な変化を高い統計精度で観測できる^{4,6)}。

そこで, 得られた WAXS データに式 (5) を用いて,
HEWL の構造転移における階層的特徴を, 領域別に解析
(TMA 解析: Transition Multiplicity Analysis)^{3,6)} する
ことが可能となる。

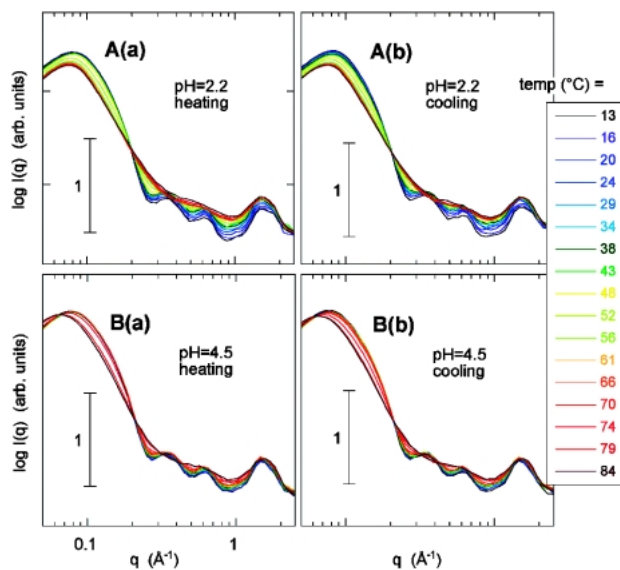


Fig. 9 Temperature dependence of WAXS curve $I(q)$ of 5% w/v HEWL (A, pH 2.2 B, pH 4.5). (a), heating (unfolding) (b), cooling (refolding).

$$\Delta_{ij} = \sum_{q=q_i}^{q_j} \left| \frac{I(q, T)}{\sum_{q=q_i}^{q_j} I(q, T)} - \left\{ \alpha_{ij} \frac{I(q, T_N)}{\sum_{q=q_i}^{q_j} I(q, T_N)} + (1 - \alpha_{ij}) \frac{I(q, T_U)}{\sum_{q=q_i}^{q_j} I(q, T_U)} \right\} \right| \quad (5)$$

ここで, T_N, T_U は, それぞれネイティブ状態および変性
状態の温度。 T_N, T_U の散乱関数により, 中間温度域の散
乱関数 $I(q, T)$ をフィッティングしたときのずれ因子が
 Δ_{ij}, α_{ij} は, 中間温度における特定の散乱角領域 (構造領
域) に対応するタンパク質構造のネイティブ状態のモル分
率を示す。実際の計算では T_N, T_U を測定開始および終了
時の温度とし, 中間温度域の様々な $I(q, T)$ について Δ_{ij}
が最小になるように α_{ij} を最適化する。その結果, 特定の
散乱領域 (領域 $q_i < q < q_j$) の α_{ij} と Δ_{ij} が温度の関数とし
て求まる。三次構造の転移温度やネイティブ状態のモル分
率の温度依存性は, 示差熱測定 (DSC) で得られるそれ
らの値と良い一致を示すが³⁾, pH の低下にともなって,
三次構造の変化に先立って, ドメイン構造・二次構造の変
化が起きること, 即ち, 階層構造間の協同性が失われるこ
とが明らかになった⁶⁾。さらに, 二次構造領域の詳細な解
析から, 二つの構成ドメイン (α ドメイン, β ドメイン)
の熱安定性の違いも分かった⁶⁾。また, 得られた各散乱領
域 (階層構造領域) のネイティブ状態のモル分率の温度依
存性を二次元地図 (階層構造地図: Structural Hierarchy
map, SH-map) として表示できる (Fig. 10)。

$\alpha_{ij} = 0.5$ の等高線の横軸への外挿値はそれぞれの領域の

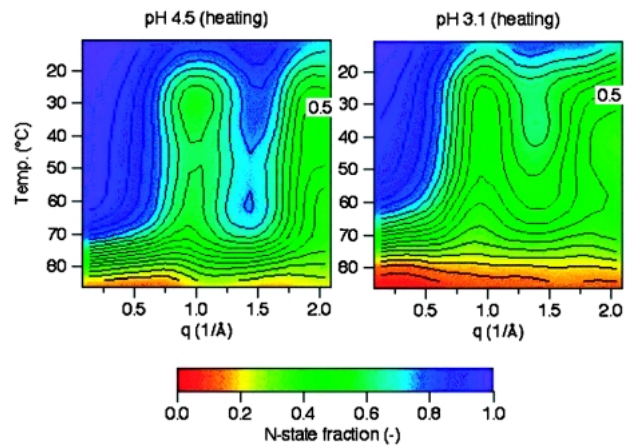


Fig. 10 Two-dimensional hierarchical maps of unfolding transitions of HEWL structure against temperature and q -value, termed SH maps, which are obtained from the molar fractions α of native-like structures for different q ranges (intervals of $q = 0.05 \text{ \AA}^{-1}$) in the WAXS curves in Fig. 7. The α values are displayed with rainbow colors and contour lines. The contour line of $\alpha = 0.5$ corresponds to the transition-midpoint for each hierarchical structure.

転移中点温度に対応する。等高線の間隔の広がりや勾配は転移の協同性を表している。即ち、狭い温度域で等高線がほぼ平行に密集している領域では、その範囲の構造転移がほぼ同時に協同的に起きていることを意味する。pHの低下に伴い、三次構造領域 ($q < \sim 0.2 \text{ \AA}^{-1}$)、ドメイン領域 ($\sim 0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.8 \text{ \AA}^{-1}$)、二次構造領域 ($\sim 1.1 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 1.9 \text{ \AA}^{-1}$) の各構造領域間の転移の協同性が失われることなどが、視覚的に理解できる⁶⁾。さらに、SH-mapをタンパク質のフォールディングファネル^{16,17)}と関連付けて理解することも可能に思われる。尚、 $q = \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$ 近傍および $q > \sim 2 \text{ \AA}^{-1}$ の領域は、理論散乱関数からも明らかな様に、分子内の構造の特徴に依存しない⁶⁾。

3.3 溶液中での構造と結晶構造との相違、内部構造の揺らぎ

高統計精度の広角散乱データが観測できると、タンパク質の溶液中での構造と結晶構造との相違を比較できる。HEWL及び α -ラクトアルブミン(α -LA)は、二つの構造ドメインからなる相同タンパク質としてよく知られている。BLASTプログラム¹⁸⁾によるアミノ酸配列の相同性解析によると、HEWLと α -LAの相同性は68.1%と極めて高い。立体構造の相似性も高く、立体構造類似タンパク質

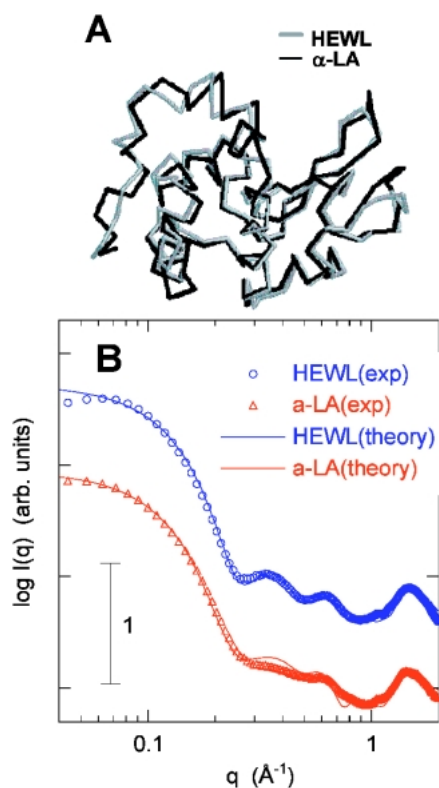


Fig. 11 Comparison of main chain conformations between HEWL and α -lactalbumin (α -LA) using FSSP data base (A). In B, experimental WAXS curves of HEWL and α -LA (5%w/v in 50 mM Hepes at pH 7, 25 °C) are displayed with theoretical ones obtained by CRY SOL program.

データベース FSSP¹⁹⁾を用いて得られた HEWL と α -LA の主鎖の立体構造比較を **Fig. 11A** に示す。また、**Fig. 11B** に室温における両タンパク質の実験 WAXS データと理論散乱関数との比較を示す。前記の様に、HEWL では全領域で理論散乱関数と良い一致を示すが、 α -LA では、中角領域 ($\sim 0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.8 \text{ \AA}^{-1}$) で明瞭な不一致が見られる。この散乱領域は分子内のドメイン間の相関やドメイン構造を反映していることから、溶液中において α -LA は HEWL と比べて構造が揺らいでいる (緩んでいる) と考えられる。このような溶液中での揺らぎは、両者の構造の安定性の違いに直接関与していると考えられる。実際に、DSC, CD, SAXS など用いたフォールディング研究において、両タンパク質は詳細に検討されており²⁰⁾、 α -LA は転移中間状態 (モルテングロビュール状態) を示す典型的なタンパク質として知られている。温度をパラメータとして WAXS 測定を行い、前節と同様の解析を行うと両者の構造転移の違いを明瞭に観測できた。

4. 今後の展開

以上、タンパク質の溶液中での広角散乱測定の現状を説明した。タンパク分子の機能に関する研究において、非結晶状態の構造情報は基礎的に極めて重要である。現在、タンパク質結晶構造解析の進展によって膨大な数の結晶構造が明らかとなっているため、より生理的環境に近い溶液中でのタンパク質からの高統計精度の X 線広角散乱データを測定して、結晶構造を基に解析することで機能状態での構造変化を知ることも可能であり、リガンド等との特異的/非特異的相互作用にとまなうタンパク分子の僅かな構造変化の相違を検出して、創薬設計などに展開し得る²¹⁾。また、結晶構造の明らかな多くのタンパク質の溶液 X 線広角散乱を測定してデータベース化、クラス分けをすることにより、結晶化を経ずに溶液散乱パターンから直接タンパク分子の二次構造や三次構造を推定することにも繋がる²²⁾と期待される。タンパク質溶液の広角散乱測定とその解析、応用はまだ途についたばかりであり、読者諸貴のご理解とさらなる展開を期待したい。

謝辞

本研究は、SPring-8 の井上勝晶博士、三浦桂子博士のご協力と、本研究室の学生の小泉将治博士、早川智宏博士 (現、理研)、岩瀬裕希博士 (現、原研) など多くの学生諸氏の努力によって行われた。謝意を表する。

参考文献

- 1) R. H. Pain, Ed.: *Mechanisms of Protein Folding*, Oxford University Press, New York (2000).
- 2) M. Hirai, S. Arai, H. Iwase and T. Takizawa: *J. Phys. Chem. B*. **102**, 1308 (1998).

- 3) M. Hirai, S. Arai and H. Iwase: *J. Phys. Chem. B* **103**, 549 (1999).
- 4) S. Arai and M. Hirai: *Biophys. J.* **76**, 2192 (1999).
- 5) M. Hirai, H. Iwase, T. Hayakawa, K. Miura and K. Inoue: *J. Synchrotron Rad.* **9**, 202 (2002).
- 6) M. Hirai, M. Koizumi, T. Hayakawa, H. Takahashi, S. Abe, H. Hirai, K. Miura and K. Inoue: *Biochemistry* **43**, 9036 (2004).
- 7) M. Koizumi, M. Hirai and K. Inoue: *Bunseki Kagaku* **55**, 411 (2006).
- 8) H. B. Stuhrmann and A. Miller: *J. Appl. Cryst.* **11**, 325 (1978).
- 9) 平井光博: 波紋 **12**, 210 (2002); 生物物理 **40**, 270 (2000).
- 10) D. Svergun, C. Barberato and M. Koch: *J. Appl. Cryst.* **28**, 768 (1995).
- 11) H. B. Stuhrmann: *J. Mol. Biol.* **77**, 363 (1973).
- 12) H. B. Stuhrmann and H. Fuess: *Acta Crystallogr.* **A32**, 67 (1976).
- 13) K. Ibel and H. B. Stuhrmann: *J. Mol. Biol.* **93**, 255 (1975).
- 14) H. Iwase and M. Hirai: *J. Phys. Soc. Jpn.* **70**, 420 (2001).
- 15) A. G. Murzin, S. E. Brenner, T. Hubbard and C. Chothia: *J. Mol. Biol.* **247**, 536 (1995).
- 16) K. A. Dill and H. S. Chan: *Nat. Struct. Biol.* **4**, 10 (1997).
- 17) A. R. Dinner, A. Sali, L. J. Smith, C. M. Dobson and M. Karplus: *Trends Biochem. Sci.* **25**, 331 (2000).
- 18) A. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman: *J. Mol. Biol.* **215**, 403 (1990).
- 19) L. Holm and C. Sander: *Trends in Biochem. Sci.* **20**, 478 (1995).
- 20) K. Kuwajima: *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **6**, 87 (1989).
- 21) R. F. Fischetti, D. J. Rodi, D. B. Gore and L. Makowski: *Chem. Biol.* **11**, 1431 (2004).
- 22) R. F. Fischetti, D. J. Rodi, A. Mirza, T. C. Irving, E. Kondrashkina and L. Makowski: *J. Synchrotron Rad.* **10**, 398 (2003).

● 著者紹介 ●



平井光博

群馬大学大学院工学研究科・教授

E-mail: mhirai@fs.aramaki.gunma-u.ac.jp

専門: 生物物理学, 構造生物学, X線・中性子構造解析学

【略歴】

1985年4月, 東北大学大学院理学研究科博士課程修了, 理学博士。1986年神奈川工科大学講師, 1989年GKSS研究所招聘研究員, 1991年群馬大学教養部講師, 1994年群馬大学工学部助教授, 1998年より現職。

Wide-angle X-ray scattering study and analysis of protein folding and hierarchical structure

Mitsuhiko HIRAI Department of Physics, Gunma University, 4-2 Aranaki, Maebashi 371-8510, Japan

Abstract Small-angle X-ray scattering method using synchrotron source (SR-SAXS) has been widely employed for structural analyses of proteins in solutions for a long time, however conventional SR-SAXS method for protein solutions has remained to supply us structural information with low resolution, such as radii of gyration, distance distribution functions, and so on. However, due to the construction of the third generation SR source facilities, the experimental resolutions both in space and time have been greatly improved, which allows us to analyze whole hierarchical structural levels of proteins from quaternary and tertiary structures, domain structures, to secondary structures by using wide-angle X-ray scattering method (WAXS). This paper is focused to explain the meaning and significance of WAXS of proteins in solutions and its data treatments and to show recent results on protein folding obtained at SPring-8.