BUNSEKI KAGAKU Vol. 55, No. 6, pp. 411–418 (2006) © 2006 The Japan Society for Analytical Chemistry

報 文

第3世代放射光 X 線広角散乱によるタンパク質の熱アンフォール ディング過程の階層構造依存性の解明

小泉 将治¹,平井 光博^{®1},井上 勝晶²

α-ラクトアルブミン(α-LA)と鶏卵白リゾチーム(HEWL)は互いに相同なタンパク質であり,三次構造は極めて類似していることが知られている。一方,それらのアンフォールディング・リフォールディング 過程は異なった熱力学的特徴を示すことが明らかにされているが,その違いと構造転移との関係の詳細は明 らかにされていない.そこで,この報告では、pH7の溶媒中におけるα-LAとHEWLの熱構造転移の特徴 をX線溶液散乱法によって比較検討する.放射光(SR)光源を用いる小角X線散乱法(SAXS)は溶液中 でのタンパク質の構造解析,特にタンパク質のフォールディングの研究に利用されてきた.従来のSR-SAXS法では小角領域のデータから評価する回転半径などの低分解能の構造情報を解析するにとどまってい た.本研究では、第3世代SR光源を用いた広角X線散乱測定(WAXS)によって、2.5 Åから200 Åにわ たる広い空間領域で観測し、全階層構造(四・三次構造、ドメイン構造、二次構造)に依存した構造転移過 程の特徴の詳細を解析した.ここで示すSR-WAXSデータ解析法を用いると、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階層構造別の変化、階層構造間の転移の協同性、局所的な構造変 化などを定量的に明らかにできる.我が国の高輝度光科学研究センター(SPring-8)のような第3世代SR 光源の利用によって、実験データの時間・空間分解能が著しく改善された溶液散乱法の現状を示す.

1緒 言

近年の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製技術や,核磁気共鳴法 (NMR) や円二色性法 (CD) など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 解析とその理論的解釈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のためには,変性状態 やフォールディングの中間体などの非天然状態の構造,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 状態における立体構造情報であり,これら各種条件下にお ける溶液中での構造変化を直接測定可能な小角 X 線散乱 法 (SAXS) は研究の重要な手法の一つとなっている.

しかし、従来の第2世代放射光源を利用した SAXS 法 (SR-SAXS) による研究では小角領域のデータ(Guinier 領 域: $qR_g < 1$, q は散乱ベクトルの大きさ、 R_g は分子の回 転半径)を用いた回転半径 R_g や距離分布関数の評価など から分子のおよその広がり(四次・三次構造)の変化を議

論することが多く、小角側から中・高角側に至る広い角度 範囲の散乱曲線全体に順次反映されるタンパク質構造の階 層性(三次構造、ドメイン構造、二次構造)に起因する分 子内構造相関散乱(2Åの局所構造から20~50Åの構造 ドメイン間相関の情報)を積極的に利用した研究は少ない. 著者らは,第3世代放射光源を利用した広角 X 線散乱法 (SR-WAXS)を用いるとタンパク質の階層構造を反映した 散乱パターンの解析が可能であることを初めて示し²⁾、特 に、小角・中角・高角から得られる高い統計精度の散乱デ ータを利用して、タンパク質の変性・折り畳み過程におけ るタンパク質の全体構造、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構造転移における協同性を評 価できることを見いだした³⁾.しかし,残念ながら SR-WAXS を用いたタンパク質の機能状態解析のための入り 口に立ったに過ぎず、そのポテンシャルを十分に引き出し たとは言い難い.

本研究では、代表的な球状タンパク質(α-lactalbmin, hen egg-white lysozyme)を取り上げ、それらの昇温下に おける高分解能構造解析を行い、タンパク質のアンフォー ルディング過程の階層構造地図を作成することにより、構 造転移における階層間の協同性を検討した.本研究におい て示す領域別解析と階層構造地図は、フォールディングの 経路や階層構造間の協同性を直接理解する上で重要な情報

¹群馬大学工学部共通講座工学基礎 II: 371-8510 群馬県前橋市 荒牧町 4-2

² 財団法人高輝度光科学研究センター: 679-5198 兵庫県佐用郡 三日月町光都 1-1-1

BUNSEKI KAGAKU

を与える.また,本解析手法はX線溶液散乱法を用いた タンパク質の一般的な機能構造解析法となり得ると考えら れる.

2 実 験

2・1 試料

試料は, SIGMA 製の α -lactalbmin (α -LA), hen eggwhite lysozyme (HEWL) を用いた. 各タンパク質を 50 mM HEPES |N-(2-hydroxymethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) 緩衝液に, 5% w/v で分散させた. 溶液の pHは7に調整した.溶液はポータブルアスピレーター (柴田科学器械工業製 MDA-015)を用いて減圧し、溶液中 に含まれる気泡を除去した.溶液の pH は pH メーター (東亜電波工業製 HM-60V)を用いて測定した.一般にタ ンパク質のアンフォールディング・フォールディング実験 ではタンパク質濃度やイオン強度などの溶液条件に依存し て、しばしば凝集を生じるために希薄溶液を用いて行われ ることが多い.しかし、第3世代 SR-WAXS 測定を用いて 検討する場合においてさえ、低濃度のタンパク質溶液の測 定では、解析に耐えられる統計精度のデータを得るために 一測定当たりの露出時間を大幅に増加せざるを得ない、そ の場合,同一試料を用いた温度変化測定では X 線照射に よる試料のダメージの問題が生じる. 散乱曲線の濃度依存 性を測定して低濃度への外挿を行い、粒子サイズよって決 まるある小角領域の散乱データ(Guinier 領域)を用いて 回転半径を評価して構造変化を論ずることも可能である が、粒子外形の変化がほとんど見られない場合においても 粒子内部の散乱密度分布の変化により回転半径は著しく変 化し、また、逆に粒子外形が変化しても内部の散乱密度分 布の変化と相殺されて回転半径に大きな変化が現れない場 合も存在する4)5). それらを判別するには高い統計精度の データを広角領域で収集して構造変化を議論する必要があ る. そこで本研究では、凝集体形成を避けるために低イオ ン強度の高濃度タンパク質溶液を用いて測定を行った.

2·2 放射光 X 線広角散乱測定

SR-WAXS は、兵庫県播磨科学公園都市にある高輝度光 科学研究センター(SPring-8)の BL-40B2 ラインに設置さ れた散乱装置を用いて行った.用いた入射 X 線の波長は 0.729 Å,試料から検出器までの距離は 41 cm とし、 ~0.03 Å⁻¹ < q <~ 2.5 Å⁻¹までを測定範囲とした.検出 器には、イメージングプレート(IP)(RIGAKU 製 R-AXIS IV)を用いた.試料を封入するステンレス製のセルの光路 長は 1 mm、内容量は~ 50 μ l であり、ビームが通過する 窓の部分には厚さ 30 μ m 以下の石英板を使用した.試料 の温度は、セルホルダー内に恒温槽(LAUDA 製 RC25CP) の水を循環させることにより調節した.また、試料位置で の入射 X 線のビームサイズは~ 0.1 mm × 0.1 mm に設定 した.また,昇温過程における測定温度範囲は,284 K か ら358 K までとし,段階的におよそ5 K ずつ昇温し,各温 度にて測定を行った.1回の測定時間は30 秒とし,毎回 の測定ごとにサンプルを流動させて X 線によるダメージ を抑えた.

2・3 散乱データ補正及び解析法

溶液試料の場合は等方的な散乱を与えるため,得られた 二次元データを円周平均することにより一次元の散乱デー タ I(q) に変換する. 観測した散乱データの範囲(~0.03 Å⁻¹<q <~ 2.5 Å⁻¹) は,実空間距離 2.5 ~ 200 Å に相当 する. ここで q は散乱ベクトルの大きさであり,

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\frac{\theta}{2} \tag{1}$$

で定義される(θ は散乱角, λ は X 線の波長).溶質からの散乱強度 I(q)は,溶液の散乱強度 $I_{sol}(q)$ から溶媒の散乱強度 $I_{sol}(q)$ を引くことによって得られる.しかし, WAXS データのバックグラウンド処理は,この単純な散乱強度の差し引きを行うだけでは,広角側のデータを得ることはできない.それは,溶媒(水分子間の相関ピーク)に起因する.水の構造因子は $q = \sim 0.8 \text{ Å}^{-1}$ 以上で増加を始めて $q = \sim 2.0 \text{ Å}^{-1}$ においてブロードな分子間相関ピークを示す.この水分子間の分子間相関ピークの位置は,284 K から 358 K の温度域で $q = 1.95 \text{ Å}^{-1}$ から 2.05 Å⁻¹ へとシフトする.そのため,WAXS データのバックグラウンド処理には、タンパク質分子の排除体積と各温度における水分子間の分子間相関ピークを考慮する必要がある²⁾.そこで,次式によりタンパク質散乱強度 I(q)を得た.

$$I(q) = \frac{1}{I_{\text{peak}}^{\text{sol}}} \left\{ \frac{I_{\text{sol}}(q)}{B_{\text{sol}}T_{\text{sol}}} - \frac{I_{\text{cell}}(q)}{B_{\text{cell}}T_{\text{cell}1}} \right\} - \frac{(1 - c\nu_{a})}{I_{\text{peak}}^{\text{solv}1}} \\ \left\{ \frac{I_{\text{solv}}(q)}{B_{\text{solv}}T_{\text{solv}}} - \frac{I_{\text{cell}}(q)}{B_{\text{cell}}T_{\text{cell}}} \right\}$$
(2)

ここで、c及び \overline{v} はタンパク質の濃度及び偏比容; T_{solv} , T_{solv} , T_{cell} は、それぞれ各温度における溶液、溶媒及び試料セルのX線透過率; B_{sol} , B_{solv} , 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. タンパク質分子の回転半径 R_{g} の評価には次式を用いた⁶.

$$R_{\rm g}^2 = \int_0^{D_{\rm max}} p(r) r^2 dr \,/ \left\{ 2 \int_0^{D_{\rm max}} p(r) dr \right\} \tag{3}$$

ここで *p*(*r*) は, *I*(*q*) の逆フーリエ変換(下式)により 得られる距離分布関数である.



Fig. 1 Theoretical WAXS curve and three-dimensional structure of protein (HEWL)

WAXS curve was calculated by using CRYSOL program. The correspondence of different WAXS curve regions to different hierarchal structure levels are shown schematically. A $(q < 0.2 \text{ Å}^{-1})$, quaternary and tertiary structures; B $(0.25 \text{ Å}^{-1} < q < 0.5 \text{ Å}^{-1})$, interdomain correlation; C $(0.5 \text{ Å}^{-1} < q < 0.8 \text{ Å}^{-1})$, intradomain structure; D $(1.1 \text{ Å}^{-1} < q < 1.9 \text{ Å}^{-1})$, secondary structures including closely packed side chains. The details are in the text.

$$p(r) = \frac{2}{\pi} \int_{0}^{\infty} rqI(q)\sin(rq)dq \qquad (4)$$

距離分布関数 p(r) は、散乱体粒子の形状と内部の散乱 密度分布(X線の場合は電子密度分布)を反映している. また、散乱体粒子の最大長を D_{max} とすると、 $r \ge D_{max}$ で p(r) = 0となるので、距離分布関数 p(r) から D_{max} を求め ることができる.距離分布関数 p(r) 用いた回転半径 R_g の 評価は、Guinier プロットを利用する方法に比べて、用い るデータの数が非常に多いため、統計精度の良い値を求め ることができ、Guinier 領域に現れる粒子間相互作用や凝 集などの影響を受けにくい⁷.

2.4 領域別解析法

SR-WAXS により得られる散乱曲線からは、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. 1に HEWL の溶液中での理論散乱曲線と立体構造の 模式図及び主要な分子内相関距離を示す. 縦軸は散乱強度 I(q) であり, 横軸は散乱ベクトル q を示している. 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 Fig. 1 に示したような構造情報をそれぞれ 反映している. A) q < 0.2 Å⁻¹: 分子の形状(四次・三次 構造), B) 0.25 Å⁻¹ < q < 0.5 Å⁻¹: 構造ドメイン間相関, C) $0.5 \text{ Å}^{-1} < q < 0.8 \text{ Å}^{-1}$: 構造ドメイン内のヘリックス やシートの配列, D) $1.1 \text{ Å}^{-1} < q < 1.9 \text{ Å}^{-1}$: $\alpha \land$ リック スやβシートの含量及び近接す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 (CRYSOL)を使用した⁸⁾.このプログラムでは、タンパク 質結晶構造データーベース (protein data bank, 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⁹⁾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. したがっ て、実験的に広い角度領域で散乱曲線が観測できれば、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,理論散乱曲線との比較が可能となる.今回著者 らは、タンパク質の構造転移における階層的特徴を、得ら れた WAXS データを基に転移多状態解析法(transition multiplicity analysis, TMA)¹⁰⁾ を用いて評価した. TMA 法 は,次式によって表される.

$$\Delta_{ij} = \sum_{q=q_1}^{q_2} \left| I(q,T) / \sum_{q=q_i}^{q_j} I(q,T_{\rm N}) - \left\{ \alpha I(q,T_{\rm N}) / \sum_{q=q_i}^{q_j} I(q,T_{\rm N}) + (1-\alpha)I(q,T_{\rm U}) / \sum_{q=q_i}^{q_j} I(q,T_{\rm U}) \right\} \right|$$
(5)

ここで,最初の native 状態の温度を T_N ,最後の変性状 態の温度を T_U とする.それらの温度の散乱曲線により, 中間温度域の散乱曲線をフィッティングしたときのずれ因 子を Δ とする. α は,中間温度域におけるタンパク質の native 状態のモル分率を示す. $\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q,T)$, $\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q,T_N)$, $\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q,T_U)$ は各温度の散乱曲線の $q_1 \sim q_2$ の領域における 規格化因子である. 実際の計算では T_N を測定開始の温度, T_U を測定終了の温度とし,中間温度域の様々な I(q,T) に ついて Δ が最小になるように α を最適化する.その結果, $q_1 \sim q_2$ の領域の α と Δ が温度の関数として求まる.本研 究では, $T_N = 284$ K, $T_U = 358$ K として解析を行った.

BUNSEKI KAGAKU



Fig. 2 Comparison of main chain conformations between HEWL and α -LA using FSSP data base (upper figure)

Comparison of experimental WAXS curves of HEWL and α -LA (5% w/v in 50 mM Hepes at pH 7, 298 K) with theoretical ones obtained by CRYSOL program based on the atomic coordinates from PDB data base. Marks, experimental data; full lines, theoretical WAXS curves.

3 結果及び考察

3・1 HEWL と α-LA の広角散乱曲線:理論と実験との 比較

HEWL 及び α -LA は, 分子量, アミノ酸残基数がそれぞ れ 1.43 kDa, 129 残基, 及び 1.42 kDa, 123 残基の二つの 構造ドメイン (α -ドメイン, β -ドメイン) から成る類似タ ンパク質である. BLAST プログラム¹¹⁾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, Fig. 2 (a) に立体構造類似タンパク質データーベース FSSP¹²⁾を 用いて得られた HEWL と α -LA の主鎖の立体構造比較を 示す. Fig. 2 (a) と (b) にそれぞれ HEWL と α -LA の室 温, pH 7 における実験散乱曲線と理論散乱曲線の比較を それぞれ示す.理論散乱曲線の計算には PDB 登録コード の $6LYZ^{13}$ (HEWL) 及び $1ALC^{14}$ (α -LA) の原子座標を 使用した. Fig. 2(b)から明らかなように,溶質分子間 の相互作用の影響が現れる q <~ 0.05 Å の領域を除いて, HEWL では理論散乱曲線と実験散乱曲線は良い一致を示 すが、 α -LA では一致があまり良くない.特に、q = 0.25~0.85 Å⁻¹の範囲において,HEWL では明瞭なリップル が見られるが, α-LA ではそれが緩やかになっている. Fig. 1 に示したように、この領域の散乱曲線は分子内のド メイン間の相関とドメイン構造を反映している.また,溶 液散乱法で得られるのは、あくまで散乱体粒子の構造のア ンサンブル平均である.したがって,結晶構造から計算さ れる理論散乱曲線には共に明瞭なリップルがあることか ら,溶液中において α-LA は HEWL と比べて構造が揺ら いでいるためにドメイン間の相関が不明確になっていると 考えられる.このような揺らぎは、下記に示す両者の熱安 定性の違いに直接関与していると考えられる.既に報告し たように²⁾³⁾,およそ $q = 0.8 \sim 1.1 \text{ Å}^{-1}$ の領域はタンパク 質の内部構造の特徴にほとんど依存しない、g=1.1~1.9 Å⁻¹の領域は二次構造,特にヘリックスとシートの含量に 強く依存する. 立体構造分類データーベース SCOP¹⁵⁾ に 従えば、 α -LA と HEWL は ($\alpha + \beta$) タンパク質に分類さ れており、ヘリックス/シートの含量比は 30.2/6.2 (HEWL) と 30.1/6.5 (α-LA), ヘリックス/シート領域の 数の比は共に 4/3 である.そのため,q = 1.1~1.9 Å⁻¹ の 領域の散乱パターンは両者でほぼ同じであり、理論散乱曲 線とも一致する.

3・2 広角散乱曲線の温度依存性

Fig. 3は, 284~358 Kの昇温過程における各タンパク 質の散乱曲線の変化を示している. 散乱曲線には式(2) の補正を行っている. (a) 及び(b) はそれぞれ, 5% w/v HEWL (pH 7), 5% w/v α-LA (pH 7) の散乱曲線である. ここで, Fig. 3 (a) 及び (b) $\mathcal{O} q = 0.07 \text{ Å}^{-1}$ 及び q =0.05 Å⁻¹ 近傍のブロードなピークは溶質分子間の反発的粒 子間相互作用を反映しており、このピークの位置や高さ は、溶質濃度や pH 及びタンパク質の等電点(有効電荷) に依存する.両者の等電点は、11.0~11.4 (HEWL)、4.1 ~ 4.8(α-LA)である.既に示したように¹⁶⁾, q = 0.1 Å⁻¹ より高角側の散乱曲線は粒子間相互作用の温度変化や濃度 変化の影響を受けない.タンパク質の全体的な構造(三次 構造)の特徴を反映する q = 0.1 ~ 0.2 Å⁻¹ の領域の散乱曲 線の変化を比較すると,HEWL では 344 ~ 354 K の間で 不連続的で急激な変化を示しており {Fig. 3 (a)}, HEWL の三次構造の熱構造転移が二状態転移的であるこ とを示唆している.一方, α-LA では HEWL と比較して全 温度域で緩やかな連続的変化になっている {Fig. 3 (b)}



Fig. 3 Temperature dependence of the WAXS curves of HEWL and α -LA

The solution conditions are as in Fig. 2. A slight decrease of the scattering intensity below $q = 0.1 \text{ Å}^{-1}$ is attributable to a repulsive interaction between the solute molecules.

が、299~304K近傍から変化が始まり、314~333Kの 範囲でいったん変化が小さくなった後、再び明瞭な変化を 始める. すなわち, 三次構造の転移の様相が多状態的であ ることを示唆している.分子内構造を強く反映する q= 0.25~0.85 Å⁻¹の範囲では,HEWL では三次構造の転移 温度よりやや低い 344~ 349 Kの間で急激な変化を示し, α-LAでは全温度域で連続的な変化となっている.また, 二次構造を反映する 1.1 Å⁻¹ < q < 1.9 Å⁻¹の領域に関し て, HEWL では 319 K 近傍からの散乱曲線のプロファイ ルの変化が始まり、344~349Kの間でブロードなピーク の位置が $q = \sim 1.45 \text{ Å}^{-1}$ から $q = \sim 1.53 \text{ Å}^{-1}$ へ移動する. α-LA では 314 K 近傍からの変化が始まり, q = ~1.45 Å⁻¹ のピークの位置は $q = \sim 1.5 \text{ Å}^{-1}$ へ徐々に移動する. これ らの変化は二次構造の含量の変化に対応している. HEWL の場合, pH の低下(4.5~2.2)に伴い, 各領域の散乱曲 線の転移温度に大きなずれが生じること、特に二つのドメ インの熱安定性に違いあることは既に報告した³⁾⁹⁾.また, HEWL の三次構造,分子内構造及び二次構造の転移は熱 可逆的であることも報告している³⁾¹⁶⁾.



Fig. 4 Distance distribution functions p(r) of HEWL and α -LA calculated by the inverse Fourier transform (Eq. 4) of the WAXS curves in Fig. 3

3・3 距離分布関数及び回転半径の温度依存性

Fig. 4 (a), (b) は式(4) を用いて Fig. 3の散乱曲線 I(q) のフーリエ変換処理から得られた HEWL 及び α-LA の距離分布関数 p(r) を示す. p(r) 関数は散乱体の実空間 の構造情報を表している. 単分散系において、対称的なべ ル型の p(r) 関数のプロファイルは均一な内部散乱密度分 布を有する散乱体粒子が球状構造をとることを意味する. 昇温に伴い, HEWL 及び α -LA の p(r) 関数のプロファイ ルがベル型から長距離側にすそを引いた形へ変化する.こ れは、昇温によってタンパク質の球状構造が崩れて広がっ た構造へ変化したことを示唆している. Fig. 4 (a) の HEWL では, 温度上昇に従い *p*(*r*) 関数は 344 ~ 354 K の 間で急激で不連続的な変化を示す.また,Fig.4(b)の α-LA では、HEWL と比較して連続的な変化を示している が、314~333Kの範囲で変化が小さくなっている.これ らの変化の傾向は、3・2 で述べた q = 0.1 ~ 0.2 Å⁻¹の領域 の散乱曲線の変化の傾向と一致する.

Fig. 5 に式(3) から評価した各タンパク質の回転半径 R_g の温度依存性を示す. 回転半径 R_g は単分散溶液系では 溶質分子の広がりを反映するため,しばしばタンパク質の 三次構造変化の指標に利用される¹⁷⁾. 図中の矢印はおよそ の変化開始温度 (T_{on})を示している. HEWL では T_{on} は 343 K近傍にあり,それより高温で急激に増加する. α -LA



Fig. 5 Temperature dependence of the radii of gyration $R_{\rm g}$ of HEWL and α -LA obtained from the p(r) functions in Fig. 4 using Eq. 3

The arrows indicate the apparent on-set temperatures T_{on} showing evident transitions. α -LA has two T_{on} temperatures.

では R_g は、298 K 近傍から増加した後、313 ~ 333 K の 範囲でいったん変化が見られなくなり、再び増加を始め る. R_g やp(r)などの三次構造を強く反映する構造学的パ ラメーターの変化の解析から、HEWL と α -LA は熱アンフ ォールド過程において異なる構造転移の道筋をとることを 示唆している.

3・4 領域別解析法による構造転移の階層性の評価

HEWL と α-LA の熱構造転移における階層構造に依存し た特徴を, 2·3 に示した TMA 法 {式(5)} を用いて詳細 に解析できる. Fig. 6 に, TMA 法によって Fig. 2 の散乱 データから直接求めた HEWL と α-LA のアンフォールデ ィング過程における各温度での native 状態のモル分率 α を示す. Fig. 6 中において, 縦軸は native 状態のモル分率, 横軸は温度を示している. モル分率は, 3つの異なった代 表的な q 領域 $(0.1 \sim 0.2 \text{ Å}^{-1}, 0.25 \sim 0.8 \text{ Å}^{-1}, 1.2 \sim 1.9$ Å⁻¹)を用いて評価を行った. 2·3 で示したように,これ らの散乱領域は、タンパク質の三次構造、分子内構造(構 造ドメインの距離相関、ドメイン構造)、二次構造にそれ ぞれ対応している. ここで, モル分率 α が 0.5 の値の温 度は、各階層構造の転移中点温度(T_m)に相当している。 HEWL {Fig. 6 (a)} では三次構造の T_m は~ 349 K, ド メイン構造及び二次構造の Tm は同じ~346 K であり,各 階層での構造転移がほぼ同時に起きている. 三次構造及び ドメイン構造の変化の開始温度は共に343K近傍であり, 前節で示した回転半径 Rgの Ton と一致する.二次構造の 変化の開始温度が低いのは、低 pH 条件下の HEWL の研 究で示したように³⁾, β-ドメインの熱安定性が低いことを



Fig. 6 Molar fractions α ($\alpha \leq 1$) of native-like structures at intermediate temperatures in the heating process

(a) HEWL; (b) α -LA. The α values were estimated by applying Eq. 5 to the WAXS curves in different qranges in Fig. 3. The q ranges of $0.1 \text{ Å}^{-1} < q < 0.2$ Å^{-1} , $0.25 \text{ Å}^{-1} < q < 0.8 \text{ Å}^{-1}$, and $1.2 \text{ Å}^{-1} < q < 1.8$ Å^{-1} were used. These ranges mostly correspond to the different hierarchal structure levels as shown in Fig. 1.

反映しており、二次構造の測定に多く用いられるフーリエ 変換赤外吸収法¹⁸⁾¹⁹⁾ や CD²⁰⁾の実験結果と一致する.ま た、フォールディングの速度論的実験結果とも符合す る²¹⁾. α -LA {Fig. 6 (b)} では、三次構造の大きな変化 (崩壊)に先立ってドメイン構造及び二次構造の変化が同 時に起きており、転移中点温度 T_m の値はそれぞれ~336 K、~306 K であり、明らかに異なる.中間温度域 313~ 333 K でいったん変化が小さくなり、再び変化を始める. この様相は α -LA の回転半径 R_g の温度依存性と同様の傾 向を示している.すなわち、 α -LA では分子の全階層構造 領域で二状態転移的な様相から大きく異なり、中間的な構 造状態が存在していることを示唆しており、過去の報告と 合致する²¹⁾²²⁾.また、 α -LA の逐次的な変化と転移中点温 度 T_m の階層構造による相違は、pH の低下に伴って明瞭 になる HEWL の場合と同様である³⁾.



Fig. 7 Two-dimensional hierarchical maps of the unfolding transitions of HEWL and α -LA

These maps show the molar fractions α of native-like structures at different temperature and at q values. (a) HEWL; (b) α -LA. The contour lines are plotted with $\alpha = 0.05$ interval. The thick lines show $\alpha = 0.5$ corresponding to the transition midpoints.

3.5 階層構造地図による転移の可視化

今回得られた構造転移過程の高い統計精度の高分解能散 乱データを利用して、native 状態のモル分率 α を、温度 と q に関する二次元マップ (structural hierarchy map, SH 地図)として表示できる (Fig. 7). Fig. 7 ではモル分 率 α を 0.05 間隔の等高線として示している. α = 0.5 の 等高線(Fig. 7 中の太線)を q = 0 へ外挿した温度は三次 構造の転移の中点に相当する.3・1 で指摘したように, $0.8 \,\text{\AA}^{-1} < q < 1.1 \,\text{\AA}^{-1}$ の領域は SH 地図においてもタンパ ク質の内部構造の特徴にほとんど依存しない. Fig. 7の SH 地図から、アンフォールディング過程における各階層 構造領域の変化と階層間の転移の同時性・協同性を視覚的 に理解することができる. $q < 0.7 \text{ Å}^{-1}$ の領域において, HEWL では特定の温度領域に等高線がほぼ平行に密に並 んでおり、この狭い温度域で三次構造とドメイン構造の変 化がほぼ同時に協同的に起こることを示している. q= 0.25 Å⁻¹ 以下で等高線がやや高温側に傾いているのは、ド

メイン構造領域の変化が先に誘起されることを示唆する. 1.3 Å⁻¹ < q < 1.7 Å⁻¹ の領域に関しても,ほぼ同じ温度 域に等高線が集中しており,二次構造も同様の変化をする ことを示している. α -LA では全領域で等高線の間隔が比 較的開いており,低温から連続的に変化している.特徴的 な変化として,0.3 Å⁻¹ < q < 0.7 Å⁻¹ 及び 1.3 Å⁻¹ < q < 1.7 Å⁻¹ の領域に関して,298 ~ 308 K 近傍では等高線は 密になっており,308 ~ 333 K の温度領域で疎になった後, 再び密になる傾向が見られる.中間温度領域の台地の存在 は,HEWL の場合と大きく異なる α -LA の構造転移の様相 (構造転移の中間状態の存在など)を特徴づけている.

4 結 語

第3世代の放射光源を利用すると、極めて高い統計精 度のWAXSデータが得られることから、階層構造を有す る様々な非結晶物質の高分解能構造解析が可能であり、タ ンパク質に関しては全体構造から二次構造に至る広い空間 領域の構造を一度に解析できる.本論文ではアンフォール ディング過程の平衡論的な研究結果を示した.現在、分子 動力学などによる理論的研究やストップトフロー CD、蛍 光、パルス水素交換 NMR などによる速度論的解析などに よって、タンパク質のフォールディングファネルあるいは エネルギー地図との関連が議論の対象となっている¹⁾.本 研究で示した領域別解析や階層構造地図は、それらとの関 連においても重要な情報を与えるものと考える.

本研究は SPring-8 の利用申請課題 2004B0082-NL2a-np 及び平成 16 年度 SPring-8 萌芽的研究支援により実施されたことを付記 する.

文 献

- 1) K. Kuwajima, M. Arai: "*Mechanisms of Protein Folding*", Edited by R. H. Pain, p. 142 (2000), (Oxford University Press, UK).
- M. Hirai, H. Iwase, T. Hayakawa, K. Miura, K. Inoue: J. Synchrotron Rad., 9, 202 (2002).
- M. Hirai, M. Koizumi, T. Hayakawa, H. Takahashi, S. Abe, H. Hirai, K. Miura, K. Inoue: *Biochemistry*, 43, 9036 (2004).
- 4) M. Hirai, T. Takizawa, S. yabuki, Y. Nakata, K. Hayashi: *Biophys. J.*, **70**, 1761 (1996).
- 5) M. Hirai, T. Takizawa, S. Yabuki, T. Hirai, K. Hayashi: *J. Phys. Chem.*, **100**, 11675 (1996).
- O. Glatter: "Small-Angle X-ray Scattering", Edited by O. Glatter, O. Kratky, p. 119 (1982), (Academic Press, London).
- L. A. Feigin, D. I. Svergun: "Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering", Edited by G. W. Taylor, p. 68 (1987), (Plenum Press, New York).
- D. Svergun, C. Barberato, M. Koch: J. Appl. Cryst., 28, 768 (1995).
- 9) D. Svergun, S. Richard, M. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, G. Zaccai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2267 (1998).

418

BUNSEKI KAGAKU

- 10) M. Hirai, S. Arai, H. Iwase: J. Phys. Chem. B, 103, 549 (1999).
- 11) A. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman: *J. Mol. Biol.*, **215**, 403 (1990).
- 12) L. Holm, C. Sander: *Trends in Biochem. Sci.*, **20**, 478 (1995).
- 13) K. R. Acharya, D. I. Stuart, N. P. C. Walker, M. Lewis: J. Mol. Biol., 208, 99 (1989).
- 14) R. Diamond, D. C. Phillips, C. C. F. Blake, A. C. T. North: *J. Mol. Biol.*, **82**, 371 (1974).
- 15) A. G. Murzin, S. E. Brenner, T. Hubbard, C. Chothia: J. Mol. Biol., 247, 536 (1995).
- 16) S. Arai, M. Hirai: Biophys. J., 76, 2192 (1999).

- 17) M. Kataoka, Y. Goto: Folding Design, 1, 107 (1996).
- 18) G. Anderle, R. Mendelsohn: *Biophys. J.*, **52**, 69 (1987).
- 19) I. H. I. van Stokkum, H. Linsdell, J. M. Hadden, P. I. Haris, D. Chapman, M. Bloemendal: *Biochemistry*, 34, 10508 (1995).
- L. Chen, K. O. Hodgson, S. Doniach: J. Mol. Biol., 261, 658 (1996).
- 21) S. E. Radford, C. M. Dobson: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **348**, 17 (1995).
- 22) K. Kuwajima: Protein: Structure, Function, and Genetics, 6, 87 (1989).

Thermal Unfolding Process of Proteins Depending on Structural Hierarchy Clarified by Wide-Angle X-Ray Scattering at a Third Generation Synchrotron Source

Masaharu KOIZUMI¹, Mitsuhiro HIRAI¹ and Katsuaki INOUE²

¹ Department of Physics, Gunma University, 4 - 2, Aramaki-cho, Maebashi-shi, Gunma 371 - 8510 ² Japan Synchrotron Radiation Research Institute, Mikazuki-machi, Sayo-gun, Hyogo 679 - 5198

(Received 15 December 2005, Accepted 2 March 2006)

As is well known, α -lactalbumin (α -LA) and hen egg-white lysozyme (HEWL) are homologous with each other and closely similar in their ternary structures. On the other hand, their unfolding-folding processes were clarified to show different thermodynamic characteristics; however, the details of how such a difference relates to their structural transitions have not been clarified. In this report, based on an X-ray solution scattering method, we discuss the difference between the characteristics in the thermal structural transitions of α -LA and HEWL in solution at pH 7. A small-angle X-ray scattering (SAXS) method using a synchrotron radiation (SR) source was used for analyzing the protein structures in solutions, especially for studies of protein folding. For a long time the SR-SAXS method had provided us with low-resolution structural information, such as the radius of gyration obtained from SAXS data at a small-angle region. In the present study we observed the structural transitions of the above proteins in the wide-distance range from 2.5 Å to 200 Å, and analyzed the characteristics of the structural transition processes of the proteins, depending on all hierarchical structures (quaternary and ternary structures, domain structures and secondary structures). By using the method of SR-WAXS data analysis described in this report, we were able to analyze quantitatively and respectively the structural changes in a protein unfolding-refolding process, depending on different hierarchical structure levels and the structural transition cooperativeness between those structure levels, local structural changes, and so on. We show the recent development of an X-ray solution scattering method with significant improvements of the experimental resolutions in both time and space due to the use of third-generation SR sources, such as SPring-8 in Japan.

Keywords : synchrotron radiation; wide-angle X-ray scattering; protein; folding; hierarchal structure.