

## X線イメージングプレートを用いた高角X線散乱の精密測定

### [1] 組織

代表者：今元 泰

(京都大学大学院理学研究科)

対応者：岡 俊彦

(静岡大学電子工学研究所)

分担者：

小島 慧一 (京都大学大学院理学研究科)

### [2] 研究経過

生命現象の多くは蛋白質によって担われており、蛋白質の構造変化の解析は、蛋白質の機能メカニズムを明らかにするために必須である。蛋白質の構造は、X線結晶構造解析法や核磁気共鳴法 (NMR) など、さまざまな手法で解析されているが、中でもX線溶液散乱法は、空間分解能は低いものの水溶液試料をそのまま用いることができるので、X線結晶構造解析法を補完する手法として広く用いられている。

X線溶液散乱法では、散乱角と散乱強度の関係をプロットし、そのパターンから分子の形状を評価する。高角領域 (面間隔  $D = \text{数 } 10 \text{ \AA} \sim \text{数 } \text{\AA}$ ) のX線散乱強度は、小角領域と比較して非常に小さいが (図1)、 $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シートの位置関係に関する情報が含まれるため、この領域の測定を精度よく行うことができれば、蛋白質の構造変化を直接観測できると期待されてきた。

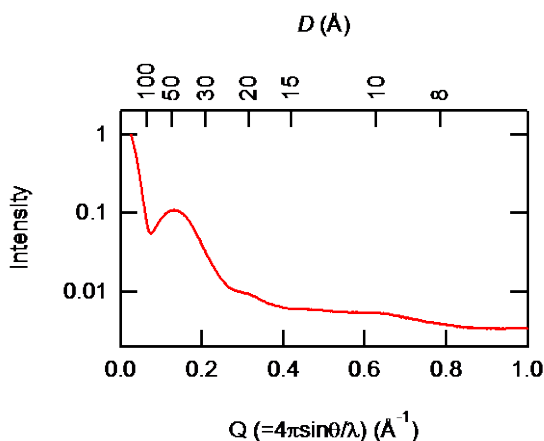


図1：今回用いた試料のX線散乱曲線。蛋白質の構造変化を検出するため、 $Q = 0.2 \sim 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ の測定を試みた。

溶液中では蛋白質分子が配向していないため、X線は試料から円錐状に散乱する。そこで、同心円状に散乱したX線をイメージとして取得し、その円周平均から散乱カーブを求めると、高角側に散乱したX線も広い面積で捉えることができるので、高角側の測定精度の大幅な向上が期待される。近年、X線イメージングプレートの性能や解析技術が飛躍的に進歩しており、高角領域のデータから生命科学で意味のある情報を抽出することが可能になってきた。そこで本プロジェクトでは、高角領域のX線溶液散乱データを用いて、蛋白質の構造変化に関する情報を得ることを目的とした。

なお、X線溶液散乱データの測定は、SPring-8で共同して実施し、データ解析のために今元と小島が静岡大学に滞在した (2015年1月)。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

G蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、細胞表面に存在する受容体蛋白質の中の最大のファミリーで、市販の医薬品の約半数が作用していると考えられている重要な蛋白質群である。網膜の光センサー蛋白質であるロドプシンもGPCRの一種である。光刺激を受けたロドプシンは、 $\text{Batho} \rightarrow \text{Lumi} \rightarrow \text{Meta-I} \rightarrow \text{Meta-II}$ の順に変化し、 $\text{Meta-II}$ の状態では視細胞に局在する三量体G蛋白質であるトランスデュシン (Gt) を活性化する。

GPCRはすべて、 $\alpha$ -ヘリックス部位が7回、細胞膜を貫通する共通の構造をもっている。不活性状態ではヘリックスが密にパッキングした構造 (クローズ構造) であるのに対し、活性状態ではヘリックスが外側に数 $\text{\AA}$ 外側に移動するような構造変化が起こり、Gtとの結合が可能になる (オープン構造)。GPCRの動作メカニズムを理解するためには、このようなヘリックス配置の変化を解析する必要がある。そこで本プロジェクトでは、高角領域の精密X線散乱測定によってロドプシンの中間体のヘリックス配置を解析することを試みた。

高角領域のX線散乱強度は弱いので、測定はSPring-8のビームラインBL40B2でおこなった。散乱X線の検出には、高速イメージングプレートX線検

出器であるR-AXIS VIIを用いた。波長 1.00 Å、カメラ長 540 nm とすることで、 $Q < 1.70 \text{ \AA}^{-1}$  までの領域をカバーした。散乱パターンを  $3,000 \times 3,000$  ピクセルの画像で取得し、円周平均を計算することで散乱カーブを得た。

まず、ウシ網膜から抽出したロドプシンを、水溶性の膜細片であるナノディスク (ND) に組み込んだ。このND試料をpH 6 の緩衝液中で光照射し、ロドプシンをMeta-IIに変化させた。ロドプシンのX線散乱パターン (光照射前) とMeta-IIの散乱パターン (光照射後) を測定し、散乱強度の変化を計算した (図2下)。次に、ND試料をpH 8 の緩衝液中で光照射することによりMeta-Iを生成させ、散乱強度の変化を同様に測定した (図2上)。Meta-IIが生成するときには、 $Q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  以下の大きな散乱強度の減少に加えて、 $Q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  付近の増加と  $0.6 \text{ \AA}^{-1}$  付近の減少が見られた。一方、Meta-Iが生成するときには、 $Q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  以下の大きな減少と  $Q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  および  $Q = 0.3 \text{ \AA}^{-1}$  付近の小さな減少が見られたものの、Meta-IIのような大きな増加は見られなかった。

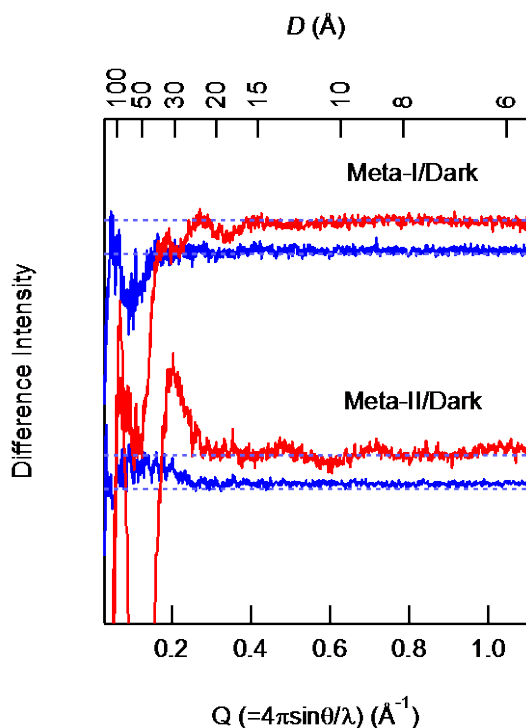


図2: 中間体の生成にともなう X 線散乱強度の変化。ロドプシンが Meta-I、および Meta-II に変化したときの X 線散乱強度の変化を示した (赤)。また、コントロールとしてロドプシンを含まない ND の X 線散乱強度の変化を同条件で測定した (青)。

X 線溶液散乱データの評価に広く用いられているソフトウェアである CrySol を用いれば、結晶構造から散乱カーブを予測することができる。そこで、

報告されている Batho、Lumi、Meta-II の結晶構造を用いて、それぞれの散乱カーブを計算した (図3)。実験データ (図2) と比較したところ、Meta-II の散乱パターンは計算とよく一致したので、ND 中でも活性構造 (オープン構造) になるような構造変化が起こっていると考えられた。一方、Meta-I の結晶構造は報告されていないが、Meta-I の散乱パターンは Meta-II よりも Lumi のものと近かった。そのため、Meta-I ではまだオープン構造を獲得していないと考えられた。

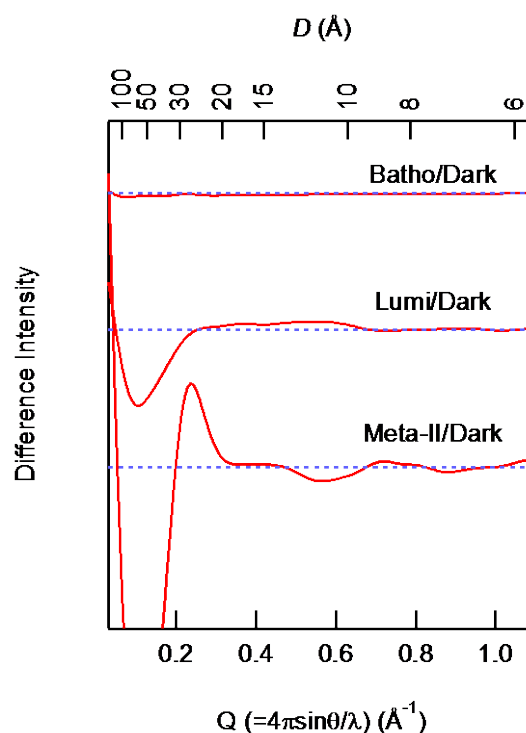


図3: Batho、Lumi、Meta-II の結晶構造から予測される X 線散乱強度の変化。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本プロジェクトは、X 線イメージング技術の応用から、高角領域の X 線散乱を精度よく測定することに成功した。今回の S/N 比は蛋白質の構造変化を検出するには十分であり、今後、さまざまな蛋白質に応用できると期待される。また、精度をさらに向上させれば、蛋白質が刺激にตอบสนองしてヘリックスが動く様子をリアルタイムで追跡できると考えられるので、本プロジェクトを発展により、先端的イメージング技術を生命科学に広く応用できると期待される。

出張報告（特別教育研究経費を使用した場合について，全員分記載して下さい。）

氏名：今元 泰

所属：京都大学大学院理学研究科

期間：2015年1月21日～1月23日

用務先：静岡大学大学院理学研究科

用務内容：実験データの解析

主たる対応者：岡 俊彦

氏名：小島 慧一

所属：京都大学大学院理学研究科

期間：2015年1月21日～1月23日

用務先：静岡大学大学院理学研究科

用務内容：実験データの解析

主たる対応者：岡 俊彦