

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

蛋白質は生命活動を担う分子である。蛋白質の機能は構造と密接に関連しているため、蛋白質の構造や、刺激に応答した構造変化を解析することは生命機能を理解するうえで不可欠である。蛋白質の構造は、結晶構造解析で詳細に調べることが可能であるが、結晶中での構造が必ずしも生理的条件（水溶液中）の構造を反映しているとは限らないため、生理的条件下での解析と相補的に進める必要がある。2014年度に開始した本プロジェクトでは、高角領域のX線散乱を精密に測定することで、生理的条件下にある蛋白質の構造を従来の小角X線散乱実験よりも詳細に解析することを試みてきた。

蛋白質のX線散乱測定では、蛋白質の水溶液試料にX線を入射し、その散乱角と散乱強度の関係から散乱体（蛋白質）のサイズや形状を評価する。散乱曲線から得られる距離情報は面間隔（ D ）に対応するため、散乱曲線には散乱角に応じた構造情報が含まれているといえる。散乱角が0に近い領域はギニエ領域とよばれ、低分解能の情報しか含まれていないものの慣性半径や分子量など、散乱体の全体的な情報を得ることができる。この領域は散乱強度が高く測定が容易なので、最も一般的に解析される領域である。一方、 $Q = 0.2 \sim 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ の高角領域は、おおむね面間隔 $6 \text{ \AA} \sim 30 \text{ \AA}$ に対応し、蛋白質の代表的な二次構造エレメントである α ヘリックスや β シートの間の距離に対応する。そのため、この領域には二次構造エレメントの位置関係、すなわち、蛋白質の構造変化に関する重要な情報が含まれていると期待される。しかしながら、入射したX線は円錐状に散乱されるので、高角領域ではギニエ領域と比べて広い面積に散乱される。そのため、従

来の一次元型の検出器では精度のよい測定が困難であった。2014年度には、X線イメージングプレートを用いて同心円状に散乱したX線を測定し、各ピクセルのカウント数を円周平均することで高角領域の散乱曲線を精度よく測定することができた（図1）。われわれはこの手法を動物網膜の光センサー蛋白質であるロドプシンに適用した。その結果、ナノディスクと呼ばれる水溶性の膜細片にロドプシンを埋め込むことによって生理的条件下にあるロドプシンの構造変化を検出できること、および結晶構造解析で提唱されている構造変化が、生理的条件下での構造変化を反映していることがわかった。

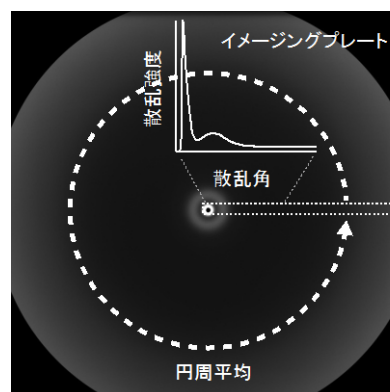


図1：イメージングプレートを用いた散乱X線の測定。円周平均を計算することで、広い面積に散乱した高角側のX線も検出できる。

今年度はロドプシンの構造変化をさらに詳細に解析した。ロドプシンは細胞表面受容体の重要なファミリーであるG蛋白質共役型受容体（GPCR）のひとつである。GPCRは細胞膜中では2量体化することや、2量体化することで活性の調節をしているなどが提唱されている。そこで今年度は、ロドプシンの2量体化が構造変化に及ぼす影響を調べた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

ナノディスクは足場蛋白質（MSP）、リン脂質、膜蛋白質（ロドプシン）から構成されるが、調製時の各成分の比率を調整することで、1分子～3分子のロドプシンを1個のナノディスクに組み込むことができる。今回は1分子のロドプシンを含むナノディスク試料と2分子のロドプシンを含むナノディス

ク試料を調製した。また、コントロールとしてロドプシンを含まないナノディスク試料を調製した。これらを光刺激した前後のX線散乱強度の変化を精密に測定した。

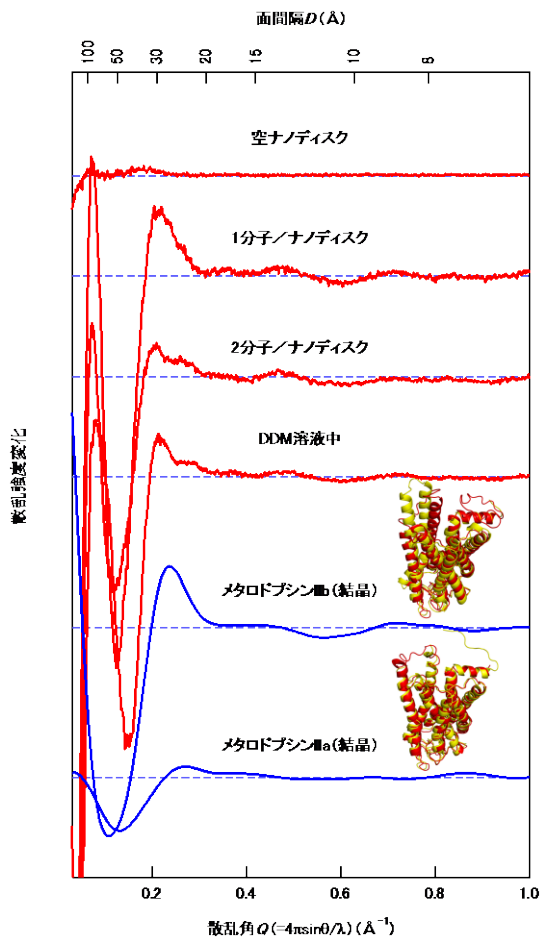


図2：光刺激によるX線散乱強度変化。上からロドプシンを含まない空ナノディスク試料、1分子のロドプシンを含んだナノディスク試料、2分子のロドプシンを含んだナノディスク試料、0.02% DDMで可溶化したロドプシン試料（赤）。これらをメタロドプシンIIb、メタロドプシンIIaの結晶構造から推測される散乱強度変化（青）と比較した。挿入図の分子モデルでは、暗状態のロドプシンの構造を赤、メタロドプシンIIb、あるいはメタロドプシンIIaの構造を黄で示した。

高角領域の微弱な散乱X線を精度よく測定するため、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL40B2を利用した。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。光刺激前後にX線散乱カーブを測定し、散乱強度変化を計算した（図2）。

まず、ロドプシンを含まない空ナノディスクでは、測定した領域で散乱変化は平坦になっており、この実験条件ではX線ダメージは考慮しなくてよいと考えられた。次に、1分子のロドプシンを含むナノディスク試料では、有意な散乱強度の変化が観測された。この変化パターンは、活性型ロドプシンであるメタロドプシンIIbの結晶構造からCRY SOLを用いて計算された散乱変化とよく一致した。

2分子のロドプシンを含むナノディスク試料で得られた散乱カーブの変化では、 $Q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ の散乱強度の増大が1分子を含むものよりも小さく、構造変化が小さいことが示唆された。この変化パターンは、メタロドプシンIIbの前駆体で構造変化が小さいメタロドプシンIIaの結晶構造から計算された散乱変化と類似していた。構造変化が小さくなる原因を探るため、界面活性剤であるドデシルマルトシド（DDM）で可溶化したロドプシン試料でも同様に測定したところ、2分子を含むナノディスクと同程度に構造変化が小さいことが示された。低濃度（0.02%）のDDMで可溶化したロドプシンは二量体化していると考えられている。そのため、ナノディスク中では2分子のロドプシンが2量体化し、構造変化を抑制していることが示唆された。

今後はプロトマー間のような相互作用が構造変化に影響をあたえるのか、およびこのような制御機構の生理的な意義について検討する予定である。

（3-2）波及効果と発展性など

本プロジェクトでは、先進的なイメージング技術を生体試料に適用することで、生化学的な解析では得られない情報を得ることを試みている。これまでもX線散乱実験は生命科学で広く用いられてきたが、従来の測定法では、散乱強度が弱い高角領域の散乱曲線を精度よく測定するためには、5~10%程度の高濃度の蛋白質溶液が必要であった。本プロジェクトの手法が確立されれば、0.1~1.0%程度の希薄溶液での測定が可能になると期待される。一般に生体試料は調製が困難であることが多いので、本プロジェクトにより、高角X線散乱測定の実用化への応用範囲が広がるものと期待される。

〔4〕 成果資料

- (1) Imamoto, Y., Kojima, K., Oka, T., Maeda, R., and Shichida, Y. (2015) Helical rearrangement of photoactivated rhodopsin in monomeric and dimeric forms probed by high-angle X-ray scattering. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1965-1973.

出張報告

氏名：今元 泰

所属：京都大学大学院理学研究科

期間：2015年12月7日～12月9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