

## 研究ノート

## 巨大糖タンパク質プロテオグリカンの小角 X 線散乱測定による特性解析

渡邊 康<sup>§</sup>

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所  
〒350-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

**Characterization of a large glycoprotein proteoglycan  
by small-angle X-ray scattering measurement**Yasushi Watanabe<sup>§</sup>

<sup>§</sup>National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

**Abstract**

The chain conformation of intact salmon cartilage proteoglycan in solution was characterized by using small-angle X-ray scattering measurement. Fractal analysis of small-angle X-ray scattering data revealed that the intact proteoglycan molecule is a chain with excluded volume (fractal dimension is 1.7) and a rod-like region as a local structure (fractal dimension is 1). The Kratky plots of the small-angle X-ray scattering data showed that the chain conformation of the cartilage proteoglycan molecules is an unfolded structure in solution. Moreover, the persistence lengths of the salmon and shark cartilage proteoglycan molecules are estimated to be 9 nm and 15 nm, respectively.

Key words: food biopolymer, solution property, physicochemical characterization

タンパク質は重要な食品構成成分であるため、食品科学および食品産業におけるタンパク質の特性解析は基盤的で重要な課題の一つである。プロテオグリカンはタンパク質に複数のオリゴ糖が結合した複合生体高分子であり、主として体内のあらゆる組織の細胞外マトリックス中に存在する<sup>1)</sup>。その機能に関しては、ポリアニオンとしてポリカチオンや陽イオンと結合しイオンの膜透過性を調整することや、軟骨の耐圧性に関

与するなど生理的および物理的に重要な役割をしている<sup>1)</sup>。しかし、プロテオグリカンは、分子量の巨大さ、高密度 (60-90% (w/w)) に大量の糖鎖が結合している複雑さから取扱および解析が難しいこともあり<sup>1)</sup>、構造特性の基礎的知見は十分に得られていない。

我々は、鮫軟骨の主要成分であるプロテオグリカンは食品成分であり、その溶液物性の知見を得ることはその機能や有効利用を考える上で重要であると考え、

<sup>§</sup> 連絡先 (Corresponding author), yasuw@affrc.go.jp

溶液散乱法による鮫軟骨プロテオグリカンの溶液物性解析を行ってきた<sup>2),3)</sup>。その結果として、中性子溶液散乱法による分子の内部構造解析からタンパク質が分子コアに存在し、溶液中の分子は細長い構造体であることを明らかにした<sup>2)</sup>。さらに、生理的な条件では、わずかな量の分子量数百万以上の超高分子成分と分子量200万前後の主要成分からなることが光散乱測定による分子量評価によりわかった<sup>3)</sup>。また、水溶液中の鮫軟骨プロテオグリカン主要成分は、ほどけた構造で、高分子鎖の堅さの指標である持続長は13-16 nmであることも明らかにした<sup>3)</sup>。

本研究では、軟骨プロテオグリカンの物理的役割の理解のためにはその溶液構造特性の解明が不可欠と考え、まだ溶液構造特性の報告のない鮭軟骨プロテオグリカン<sup>4),5)</sup>について、放射光小角X線散乱測定による溶液中の分子鎖構造解析を行った。また、本研究は溶液散乱法による複合タンパク質の構造解析を通して、広く食品関連生体高分子素材の溶液構造の解析に資する研究手法の提示も目的とした。その結果、溶液中の鮭軟骨プロテオグリカンは、排除体積をもつ高分子鎖と棒状の局所構造の特徴をそなえた柔軟な構造体であることがわかった。その鮭軟骨プロテオグリカンの持続長は、9 nmと評価された。また、標準的な静的（時分割測定でない）溶液X線散乱法により鮫軟骨プロテオグリカンの持続長は15 nmと評価され、先に報告した溶液X線散乱クロマトグラフィーによる結果<sup>3)</sup>と一致し、評価値の再現性が確認できた。これらの結果は、鮭軟骨プロテオグリカンは、鮫軟骨プロテオグリカンに比べて溶液中の分子鎖の柔軟性が高いことを示唆していて、今後その機能を考察する上で重要な知見となることが期待できる。

## 実験方法

鮭軟骨プロテオグリカンは、和光純薬（株）（東京）から購入し、鮫軟骨プロテオグリカンは鮫ひれ軟骨から精製した<sup>2),3)</sup>。試料溶液は50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.8,を溶媒とし、濃度は乾燥重量法により決定した<sup>6)</sup>。

分子鎖構造は小角X線散乱測定により評価した。放射光溶液X線散乱測定は、鮭軟骨プロテオグリカンについては、高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームライン10Cに設置された小角X線散乱測定装置（酵素回折計）を使用した<sup>6)~9)</sup>。検出器は一次元位置敏感比例係数装置（リガク（株）、東京）を用い、X線

の波長は0.1488 nm、試料検出器間距離は900 mmに設定した。試料セルはステンレス製で、厚み1 mm、縦3 mm、横15 mmの穴の両面に石英板（厚み20  $\mu\text{m}$ 、縦6 mm、横20 mm）を窓材として貼ったものを使用し、測定時間は10分とした。一方、鮫軟骨プロテオグリカンについては、高輝度光科学研究センター SPring8のビームライン45X Uの小角X線散乱測定装置を利用した。検出器はイメージングプレート自動読み取り装置 R-Axis IV++（リガク（株））を用い、X線の波長は0.09 nm、試料検出器間距離は3500 mmに設定した。試料セルはステンレス製で、厚み3 mm、縦3 mm、横5 mmの穴の両面に厚み20  $\mu\text{m}$ の石英板を窓材として貼ったものを使用し、試料濃度は3.7 mg/mLで測定時間は1分とした。

どちらも、試料セルホルダーを恒温水循環装置に接続し試料セル温度を24°Cに保持した。得られた散乱データは、試料直前のイオンチェンバーの出力により入射X線強度の補正を行った。溶質の散乱データは溶液の散乱強度から溶媒の散乱強度を差し引いた値とした。鶏の腱から取り出したコラーゲン繊維束を標準物質として、検出器のチャンネルを散乱ベクトル  $q (=4\pi \cdot \lambda^{-1} \sin \theta)$ 、 $\lambda$ はX線波長、 $2\theta$ は散乱角)に変換した。

## 実験結果と考察

本研究において、溶液構造特性について報告のない鮭軟骨プロテオグリカンを主な対象とし、生理的条件で生のままの溶液中の分子鎖構造を調べるために放射光小角X線散乱測定を行った。小角X線散乱法は低分解能ではあるが溶液中のタンパク質の構造情報を得られる手法である<sup>6)~9)</sup>。近年の放射光の発展により<sup>10)</sup>、比較的低濃度の試料での溶液散乱実験が可能となった<sup>6)~9)</sup>。図1に鮭軟骨プロテオグリカンの1.8-15 mg/mLの濃度における濃度補正後の散乱パターン（散乱ベクトル $q$ に対する散乱強度のプロット）を示す。この図から、この濃度範囲では低濃度であるほどデータのバラツキは大きいものの散乱パターンの差は見られないので、顕著な会合はなくこの溶媒条件で試料は測定時間内では十分に分散していることがわかる。鮭軟骨プロテオグリカンの分子量は200万程度と推定されていることから<sup>4)</sup>、この小角X線散乱装置の小角分解能では十分でないためサイズや分子量の評価には適さない。そこで、小角分解能を要求しない分子鎖構造の解析を行った。次の(1)式の様散乱強度 $I$ が散乱ベクトル $q$ のべき乗に比例する領域が散乱測定から得られる<sup>12)</sup>。

$$I \sim q^{-D} \quad (1)$$

ここで  $D$  はフラクタル次元である。すなわち、図2の様な散乱ベクトル  $q$  と散乱強度  $I$  の両対数プロットで得られる直線の傾きから、溶質構造体のフラクタル次元が得られる。図2中の直線の傾きは、小角領域つまり散乱ベクトル  $q$  が小さい方から、1.7、1.0および1.4を表している。この散乱データから鯨軟骨プロテオグリカン分子のフラクタル次元が、散乱ベクトル  $q$  が  $0.15 \text{ nm}^{-1}$  から  $0.25 \text{ nm}^{-1}$  付近の領域ではほぼ1.7に近似できる。フラクタル次元 1.67 ( $\approx 5/3$ ) は、排除体積を持った高分子鎖構造を表している<sup>11)</sup>。また、散乱ベクトル  $q$

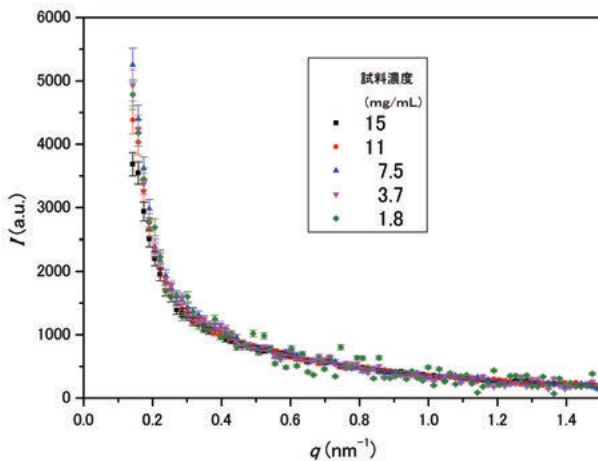


図1. 鯨軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱パターン  
各データに対応する試料濃度は図中に示している。

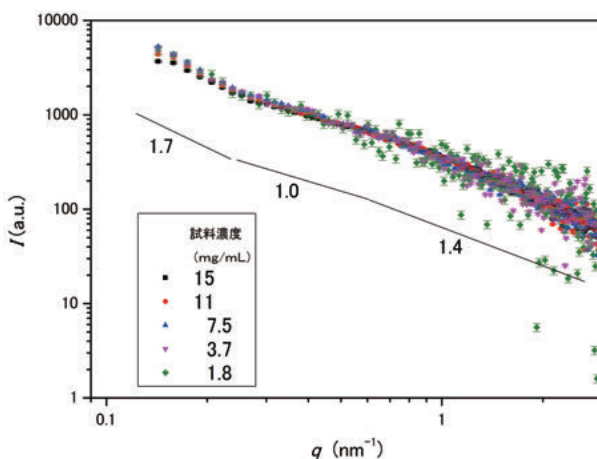


図2. 鯨軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱データの両対数プロット

測定条件は図1と同じである。図中の直線は散乱ベクトル  $q$  が小さい方から、傾きが1.7、1.0および1.4を表している。

が  $0.25 \text{ nm}^{-1}$  から  $0.6 \text{ nm}^{-1}$  の領域は傾きが1.0に近似でき、散乱ベクトル  $q$  の  $0.6 \text{ nm}^{-1}$  以上の領域の傾きは1.4と近似できる。棒状分子のフラクタル次元は1.0で、ランダムコイル状態のフラクタル次元は2であるので<sup>12)</sup>、プロテオグリカン分子の局所構造特性はランダムコイル状態より棒状であることを示唆している。つまり、鯨軟骨プロテオグリカン分子の構造体のイメージは、分子全体としてはガウス鎖よりわずかに広がったフレキシブルな細長い分子鎖である。プロテオグリカンの高密度に結合した糖鎖はマイナス荷電をもつ。その糖鎖が密集する部分は互いに静電的に反発し合い、分子鎖が適度に広がった構造を持ち、微視的な構造単位としては棒状構造を持っていると考えられる。

さらに、図3に示す様に、散乱ベクトル  $q$  と  $q^2 \cdot I$  の関係のクラツキープロット<sup>13)</sup>から、そのデータポイントは小角領域（散乱ベクトル  $q$  が  $0.5 \text{ nm}^{-1}$  以下）では右上がりでありそれより小角領域に屈曲点  $q^*$  が観察される。この屈曲点の値  $q^*$  と高分子鎖の硬さの指標である持続長  $L_p$  は式(2)の関係がある<sup>14)</sup>。

$$L_p = 2\pi \cdot (2.73 \cdot q^*)^{-1} \quad (2)$$

鯨軟骨プロテオグリカンについての屈曲点は  $0.25 \text{ nm}^{-1}$  なので、溶液中の分子鎖の持続長は  $9 \text{ nm}$  と計算できる。一方、鯨軟骨プロテオグリカンについては、先に溶液X線散乱クロマトグラフィーによりその持続長は  $13\text{--}16 \text{ nm}$  と報告した<sup>3)</sup>。本研究ではその評価値の再現性の確認のため時分割測定でない小角X線散乱測定を

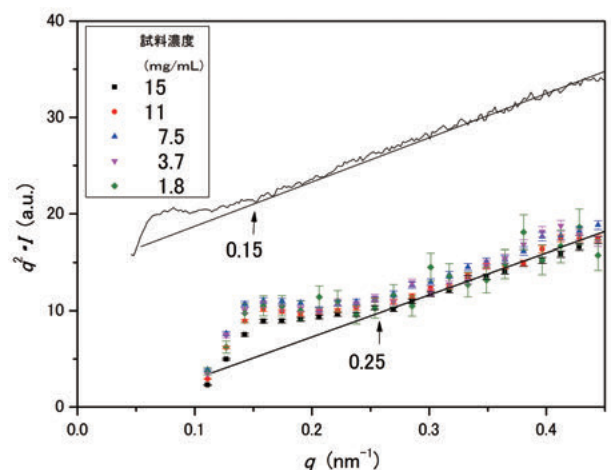


図3. 軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱データのクラツキープロット

鯨軟骨プロテオグリカンの測定条件は図1と同じである。鯨軟骨プロテオグリカンのデータは実線で示した。各軟骨プロテオグリカンのデータで観察される屈曲点  $q^*$  を示した。

行った。図3にはその測定データのクラツキープロットを示しており、屈曲点  $q^*$  が  $0.15 \text{ nm}^{-1}$  なので、持続長は(2)式により  $15 \text{ nm}$  と計算できる。たとえば棒状ウイルスやヒアルロン酸の持続長は、それぞれ  $880 \text{ nm}$ <sup>15)</sup> と  $4 \text{ nm}$ <sup>16)</sup> と報告されている。この結果から、軟骨プロテオグリカンは棒状ウイルスほど剛直でないものの、ヒアルロン酸よりは柔軟性に欠ける。また、鮭軟骨プロテオグリカン分子鎖は鮫軟骨プロテオグリカンより溶液中の柔軟性が高いことがわかる。鮫軟骨プロテオグリカンの持続長の値は、先に報告した溶液X線散乱クロマトグラフィーによる結果<sup>3)</sup>と一致し、評価値の再現性が確認できた点は意義深い。この柔軟性は、これら分子の保水性と関連すると考えられるので、今後その物理的機能と構造の関係をさらに探求することは重要な課題である。

さらに、細長い構造体が示唆される場合は、円柱体構造を仮定した断面プロット ( $q^2$  対  $\ln(I \cdot q)$ ) の中角領域の直線の傾きより次の(3)式から円柱体の断面の回転半径  $R_{gc}$  を評価し、構造について考察できる<sup>10)</sup>。

$$I \cdot q \sim \exp(-R_{gc}^2 \cdot q^2 \cdot 2^{-1}) \quad (3)$$

図4の直線の傾きより鮭軟骨プロテオグリカン分子の断面の回転半径は、実験で使用した濃度の範囲ではほぼ一定で、平均値は  $0.50 \pm 0.04 \text{ nm}$  ( $n=5$ ) で円柱の半径は  $0.7 \text{ nm}$  と計算できる。一方、鮫軟骨プロテオグリカンの断面の回転半径および円柱の半径は、試料濃

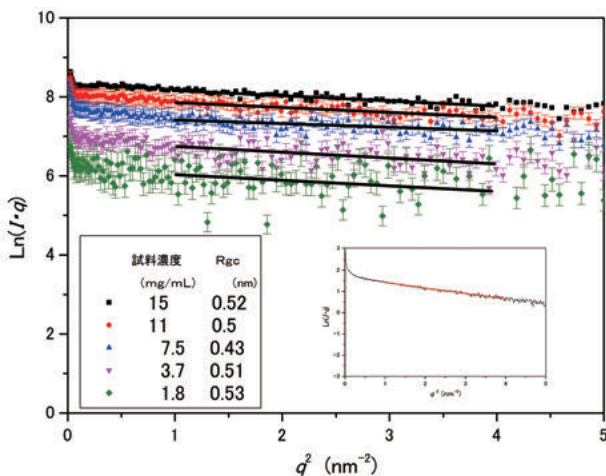


図4. 軟骨プロテオグリカンの断面プロット

鮭軟骨プロテオグリカンについて、各濃度データの違いを明確にするため散乱強度  $I$  は試料濃度補正をしていない。その他の測定条件は図1と同じである。鮫軟骨プロテオグリカンの断面プロットを挿入図に示した。各図中の直線は計算に使用した領域を示す。

度が  $3.7 \text{ mg/mL}$  において  $0.71 \text{ nm}$  および  $1 \text{ nm}$  と評価される。鮭軟骨プロテオグリカンの回転半径は報告がないのでこれ以上の議論はできないが、鮫軟骨プロテオグリカンの回転半径は  $25.3 \text{ nm}$  である<sup>2)</sup> ので、分子の長さは  $88 \text{ nm}$  と計算できる。この結果は電子顕微鏡によりプロテオグリカン分子の細長い構造体が観察されていることと矛盾しない<sup>1)</sup>。

NMRはタンパク質の溶液構造を原子レベルで解析できる手法である<sup>17)</sup>。しかし、タンパク質の分子量が大きくても数万、通常は2万以下のものが主な対象となる。分子量数十万以上のタンパク質の溶液構造解析は、食品分野のタンパク質の有効利用のためには不可欠な課題である。溶液散乱の長所は、生理的な条件ばかりでなく種々の溶媒条件での測定が可能である点である<sup>6)~9)</sup>。従って、溶液散乱法は、タンパク質の会合状態やゲル化初期過程あるいは分子間相互作用による超分子構造の解明に効果的に利用されることが期待される。さらに、タンパク質ばかりでなく多糖などの生体高分子についても本手法を適用することにより食品分野での生体高分子成分の特性解明への貢献が期待できる。今後、さらに適応例を増やすとともに、生体高分子の物性評価に適した手法の改良も重要な課題と考えられる。

## 謝辞

本研究の一部は、JSPS科研費24550111の助成を受けた。小角X線散乱測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光共同利用実験課題(2011G098および2013G099)として行った。また、高輝度光科学センターの小角X線散乱測定は、SPring-8量子ビーム施設震災優先枠課題番号2011A1927として行った。

## 要約

本研究では、食品関連糖タンパク質である軟骨プロテオグリカンについて、その機能の考察に重要な溶液構造特性を解明するために、放射光小角X線散乱測定による分子鎖構造解析を行った。その結果、溶液中の鮭軟骨プロテオグリカンは、棒状の局所構造特性を持つ細長いフレキシブルな構造体であることがわかった。さらに、分子鎖の溶液中の堅さの指標である持続長は、鮭軟骨および鮫軟骨のプロテオグリカンについて、それぞれ  $9 \text{ nm}$  と  $15 \text{ nm}$  と評価した。

## 文献

- 1) R.K.Murray and F.W.Keeley, The extracellular matrix. In "Harpers Illustrated Biochemistry", 29th ed., R.K.Murray, D.A.Bender, K.M.Botham, P.J.Kennelly, V.W.Rodwell, P.A.Weil, McGraw-Hill Medical, pp589-607 (2012) .
- 2) Y.Watanabe, I.Tanaka, Y.Sano and N.Niimura, Small-angle neutron scattering study on a proteoglycan in solution, *J.Phys.Soc.Japan*, **70**, 414-416 (2001) .
- 3) Y.Watanabe and Y.Inoko, Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by size-exclusion chromatography combined with light and X-ray scattering methods, *J.Chromatogr.A*, **1303**, 100-104 (2013) .
- 4) I.Kakizaki, Y.Tatara, M.Majima, Y.Kato and M.Endo, Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage, *Arch.Biochem.Biophys.*, **506**, 58-65 (2011) .
- 5) Y.Tatara, I.Kakizaki, Y.Kuroda, S.Suto, H.Ishioka and M.Endo, Epiphycan from salmon nasal cartilage is a novel type of large leucine-rich proteoglycan, *Glycobiology*, **23**, 993-1003 (2013) .
- 6) Y.Watanabe and Y.Inoko, Small-angle light and X-ray scattering measurements of a protein-oligosaccharides complex mucin in solution, *J.Appl.Crystallogr.*, **40**, s209-s212 (2007) .
- 7) 渡邊 康, 猪子洋二, 小林克巳, タンパク質の放射光溶液X線散乱測定におけるX線透過率の同時評価, *食品総合研究所研究報告*, **69**, pp19-22 (2005) .
- 8) 渡邊 康, 猪子洋二, タンパク質のクロマトグラフィ検出手段としての溶液X線散乱測定, *食品総合研究所研究報告*, **70**, pp1-5 (2006) .
- 9) 渡邊 康, 猪子洋二, 両親媒性環境下の疎水性タンパク質の分子集合状態の特性評価, *食品総合研究所研究報告*, **71**, pp33-37 (2007) .
- 10) I.Pilz, Proteins.In "Small angle X-ray scattering", eds. O.Glatter and O.Kratky, Academic Press, pp239-293 (1982) .
- 11) 菊田惺志, 放射光光源, 「X線回折・散乱技術(上)」, 初版(東京大学出版会, 東京), pp176-200 (1997) .
- 12) T.G.Dewey, *Fractals in Molecular Biophysics*, Oxford Univ.Press (1997) .
- 13) O.Kratky, Natural high polymers in the dissolved and solid state.In "Small angle X-ray scattering", eds. O.Glatter and O.Kratky, Academic Press, pp361-386 (1982) .
- 14) L.E.Alexander, *X-ray diffraction methods in polymer science*, John Wiley & Sons (1969) .
- 15) M.Hagenbüchle, B.Weyerich, M.Deggelmann, C.Graf, R.Krause, E.E.Maier, S.F.Schultz, R. Klein, and R. Weber, Static light scattering by aqueous solutions of rodlike fd-virus particles, *Physica A* **169**, 29-41 (1990) .
- 16) R.L.Cleland, The persistence length of hyaluronic acid: An estimate from small-angle X-ray scattering and intrinsic viscosity, *Arch.Biochem.Biophys.*, **180**, 57-68 (1977) .
- 17) K.Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley & Sons (1986) .