

研究ノート

蛋白質の溶液 X 線散乱測定における 2 次元データの評価

渡邊 康^{1§}, 猪子 洋二²

1) 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

2) 大阪大学大学院基礎工学研究科

An assessment study on two-dimensional X-ray scattering data for protein solutions

Yasushi Watanabe^{1§} and Yoji Inoko²¹ National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642² Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531

Abstract

Two-dimensional imaging plate data were evaluated in the solution X-ray scattering measurement of protein solutions. In the conversion of two-dimensional data into one-dimensional data, the circular averaged data were the same as the data calculated from the vertical sectoral areas ($330^\circ \sim 30^\circ$ and $150^\circ \sim 210^\circ$) and the horizontal sectoral areas ($60^\circ \sim 120^\circ$ and $240^\circ \sim 300^\circ$) in the measured scattering angles except for a very small-angle scattering region. The circular averaged data at the middle-angle scattering regions were less noisy than data of a one-dimensional detector under same conditions. These results show that the two-dimensional detector is useful for the static solution X-ray scattering measurements of homogeneous protein solutions at pseudo-point focus X-ray optics.

Keywords: 蛋白質溶液 (protein solution), 溶液 X 線散乱測定 (solution X-ray scattering measurement), 2 次元データ (two-dimensional data)

緒言

蛋白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蛋白質の特性解析技術の開発・改良は重要な課題の一つである。特に、温度や溶

媒成分の変化による蛋白質の溶液中の分散性や構造は、食品の品質や加工特性の制御における蛋白質の有効利用に役立つ知見となり得る。蛋白質の構造情報が、低分解能ではあるが多様な溶媒条件で得られる方法が溶液 X 線散乱法である¹⁾²⁾。近年の放射光の発展により比較的低濃度の試料で溶液 X 線散乱測定が可能となっ

[§]連絡先, yasuw@affrc.go.jp

たものの³⁾、放射光溶液X線散乱測定装置は、個々の放射光施設の光学系に適した測定装置ユニットの組み立てが必要であり、測定対象や実験目的に依存して改良・開発が要求される⁴⁾⁵⁾。

我々は、放射光溶液X線散乱測定装置として、高エネルギー加速器研究機構放射光施設のビームライン10Cを利用している。本測定装置では、偏向電磁石からの放射光を光源とし、2結晶モノクロメータおよび湾曲シリンドリカルミラーに対して1:1集光の光学系を採用していることから、低バックグラウンドを実現している⁶⁾。このため、これまでこの放射光溶液X線散乱測定装置を用いてタンパク質や酵素などの溶液X線散乱の静的測定および遅い反応の時分割測定を行ってきた^{7)~12)}。本ビームラインは垂直方向より水平方向の集光が十分に望めない線収束光学系であることから、本測定システムのX線散乱検出器として、1次元位置敏感比例係数装置を縦置きにして使用してきた。蛋白質の溶液X線散乱測定における中角領域のデータは、蛋白質の分子形態や比較的高次元の構造解析に必要な角度領域であるものの、1次元検出器の散乱X線を線で捕らえる特性から中角領域での統計精度の高い散乱データが得られない難点があった。最近、その状況を改善するため、散乱X線を面で捕らえる2次元検出器の導入試験を経て実験モードでの利用を可能とした¹³⁾。

本研究では、溶液X線散乱法の評価研究を通して、広く食品関連生体高分子の溶液構造の解析に資する研究手法の提示を目的として、蛋白質溶液の溶液X線散乱測定における2次元検出器の測定データの評価を行った。その結果、2次元データの1次元データへの変換において、垂直方向(0時と6時方向の $\pm 30^\circ$ 扇形)、水平方向(3時と9時方向の $\pm 30^\circ$ 扇形)、および全方向同心円の積算データの重なりは良好であった。さらに、同設定条件での1次元位置敏感比例係数装置の利用による測定データとの比較から、中角領域のデータのバラツキは小さいことが明らかとなった。従って、これらの結果は、蛋白質水溶液のような分散溶液の静的測定において、2次元検出器の導入のメリットが十分にあることを示している。

実験材料及び方法

ウシ血清アルブミンおよびウマ脾臓アポフェリチンは、シグマ株から購入した。溶媒は50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.8, を使用した。

放射光溶液X線散乱測定は、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に設置された小角溶液X線散乱測定装置(酵素回折計)を使用した。測定に供したビーム特性は、ミラー下流のスリットを上下1 mm, 左右1 mmに調整し、試料セル直前のスリットサイズを上下1.1 mm, 左右1.4 mmに設定した疑似点収束光学系である。検出器としては、有効検出サイズが200 mm \times 2 mmの1次元位置敏感比例係数装置(特別仕様高速PSPC, リガク株)、あるいはイメージングプレート(imaging plate; IP)のサイズが300 mm \times 300 mmのIP自動読み取り2次元検出器(特別仕様R-AXIS VII, リガク株)を使用した。試料検出器間距離は900 mmに設定し、6 mm径鉛製円形ビームストッパーおよび250 mm径カプトンフィルム製円形窓付き検出器前フランジを使用した。

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 μ m, 縦6 mm, 横20 mm)を窓材として貼ったものを使用した。X線の波長は0.1488 nm, 測定時間は5分とし、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線強度の補正をした。また、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あるいはピクセルあたりの散乱ベクトル q ($= (4\pi/\lambda)\sin\theta$, λ はX線波長, 2θ は散乱角)を算出した。蛋白質濃度は、光路長1 cm, 1%溶液の280 nmにおける吸光係数6.78(ウシ血清アルブミン)および9.0(ウマ脾臓アポフェリチン)を用いて計算した¹⁴⁾。

実験結果および考察

図1に、1次元検出器と2次元検出器の測定系の違いを模式的に示した。放射光X線が試料溶液に照射され、直進透過X線は検出器前のビームストッパーにより受け止められて検出器のダメージを防ぐ。1次元検出器は、垂直方向の散乱X線を検出し(図1 a)、2次元検出器はビーム中央から同心円状に面で検出する(図1 b)。本研究では、1次元検出器と2次元検出器の同測定条件下の蛋白質の分子形態や比較的高次元の構造解析に必要な角度領域である中角領域の散乱データを比較した。具体的には、アレルギー性を有する蛋白質であるウシ血清アルブミン水溶液について、2次元検出器を使用して散乱データを得た。図2に得られた2次元データ像を示した。中央の白い円状領域は、直進X線による検出器へのダメージを防ぐた

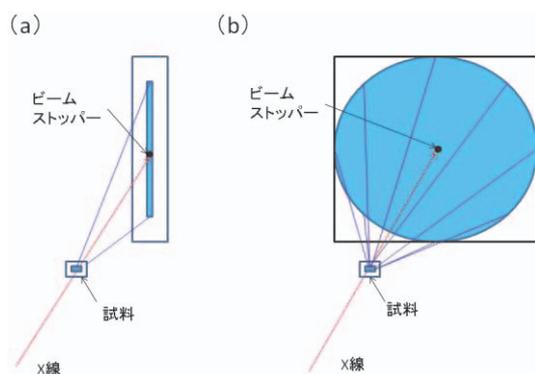


図1. 1次元検出器と2次元検出器の測定系の違い

1次元検出器 (a) では、垂直方向の散乱X線を直線的に計測し、2次元検出器 (b) では、散乱X線を面で計測する。試料およびビームストッパーの位置条件は同一とした。

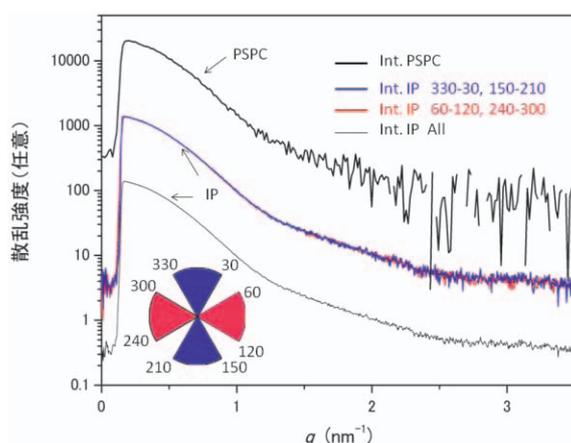


図3. ウシ血清アルブミン水溶液の溶液X線散乱パターン

試料濃度は10 mg/ml, 5分間の測定。図1の2次元IPデータの垂直方向の扇形(0時と6時方向の $\pm 30^\circ$; 青色, 挿入図参照), 水平方向の扇形(3時と9時方向の $\pm 30^\circ$; 赤色, 挿入図参照), および全方向同心円(黒色)の積算データをプロットした。差を明瞭にするために, 全方向同心円の積算データは下方にずらして再プロットした。また, 1次元位置敏感比例係数装置(PSPC)のデータは, 上方にずらしてプロットした。小角領域の散乱強度の急激な落ち込みはビームストッパーによるためである。挿入図は, 積算領域の理解のために示した。

めのビームストッパー(6 mm 径)の痕跡である。その痕跡外周端から外側全方向に徐々に濃度が薄くなっていることがわかる。つまり, 図における濃度の濃淡は散乱強度の強弱を表すので, 散乱強度が外側全方向に向かって弱くなっていることを示す。

この2次元データの1次元データへの変換例を図3に示した。図3の2次元データの垂直方向の扇形(挿

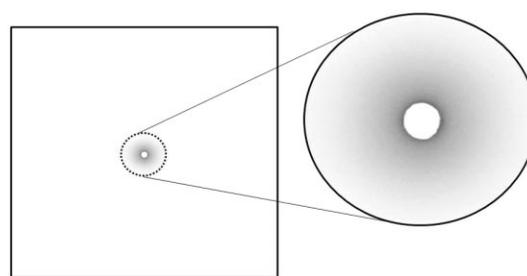


図2. ウシ血清アルブミン水溶液についての2次元イメージングプレート検出器のデータ像

試料濃度は10 mg/ml, 5分間の測定。中央の白い円部分は, 直進透過X線による検出器のダメージを防ぐためのビームストッパー(6 mm 径)の痕跡である。黒色の濃淡がわかりやすい中央部分を拡大表示した。黒色の濃いほど散乱強度が強いことを示す。

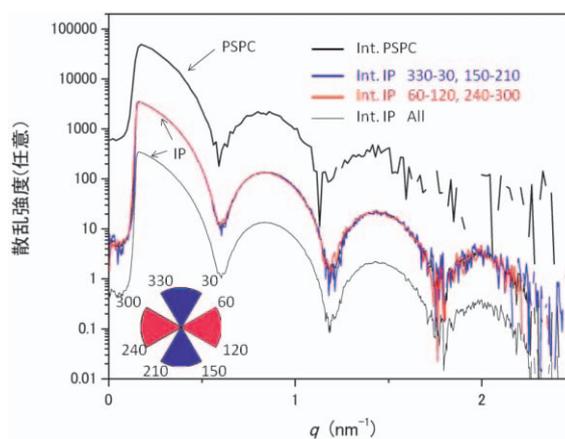


図4. ウマ脾臓アポフェリチン水溶液の溶液X線散乱パターン

試料濃度は5 mg/mlで, その他の条件は図2と同じである。

入図の青色領域参照, 0時と6時方向の $\pm 30^\circ$, つまり $330^\circ \sim 30^\circ$ と $150^\circ \sim 210^\circ$, 水平方向の扇形(挿入図の赤色領域参照, 3時と9時方向の $\pm 30^\circ$, つまり $60^\circ \sim 120^\circ$ と $240^\circ \sim 300^\circ$), および全方向同心円の積算データをプロットした。図3の測定された全散乱角領域において, 垂直, 水平, および全方向同心円積算データの重なりは良好であった。さらに, 散乱ベクトル q で 1 nm^{-1} から 3 nm^{-1} の中角領域における散乱データは, 同設定での1次元位置敏感比例係数装置による測定データとの比較において, 2次元データからの1次元変換データのバラツキが小さく, 全方向同心円積算データでもっとも良好であった。

次に, 図4では, 鉄貯蔵蛋白質であるアポフェリチンの水溶液中でのX線散乱パターンを示した。アポフ

エリチンは24個のサブユニットが中空球殻構造を形成している分子量約44万のオリゴマー蛋白質である。したがって、その構造に特徴的な山と谷が散乱パターンに現れている¹²⁾。その山と谷の位置は、同条件での1次元検出器のデータと良い一致を示した。また、図3と同様に、垂直、水平、および全方向同心円積算データの重なりは良好であった。さらに、散乱ベクトル q で 1 nm^{-1} から 2.5 nm^{-1} の中角領域における散乱データは、同設定での1次元検出器による測定データとの比較において、データのバラツキが小さい結果が再現されている。これらの結果は、2次元検出器が散乱X線を面で捕らえることにより同条件の測定における1次元検出器のデータに比べて中角領域の統計精度が上がり、蛋白質水溶液のような分散溶液の静的測定には2次元検出器の導入効果が十分であることを示している。今後は、ビームストッパーや検出器前フランジ窓などのサイズや形状をさらに工夫することにより、放射光施設のビームラインの光学系に適した測定法の高度化を展開する必要がある。

溶液X線散乱法は低分解能ではあるが溶液中の蛋白質の構造情報を得られる手法である。NMRは蛋白質の溶液構造を原子レベルで解析できる手法である¹⁵⁾。しかし、蛋白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10万以上の蛋白質（集合体）の溶液中の分子構造を解析することは、蛋白質の有効利用のために大変重要である。溶液散乱法の長所は、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。従って、溶液散乱法は、蛋白質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を解明する手段として効果的に利用されることが期待される。さらに、蛋白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素材の特性解明の手段として期待できる。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今後の重要な課題と考えられる。

要 約

食品素材成分である蛋白質を有効利用するため、溶液中の蛋白質の特性を解析する技術の開発は重要である。本研究では、蛋白質溶液についての溶液X線散乱測定における2次元データを評価した。2次元データの1次元データへの変換において、垂直方向の扇形(0

時と6時方向の $\pm 30^\circ$)、水平方向の扇形(3時と9時方向の $\pm 30^\circ$)、および全方向同心円の積算データは、測定された散乱角領域において良好な一致を示した。さらに、全方向同心円の積算データの中角領域は、同測定条件下の1次元検出器による測定データと比較して、きわめてばらつきが小さいことが明らかとなった。これらの結果は、蛋白質水溶液のような分散溶液の静的測定では、疑似点収束光学系における溶液X線散乱測定システムに2次元検出器を導入することのメリットが十分であることを示している。

謝 辞

溶液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(課題番号2011G098)として行った。

参考文献

- 1) I. Pilz, Proteins. In "Small angle X-ray scattering", eds. O. Glatter and O. Kratky, Academic Press, pp239-293 (1982).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 渡邊 康, タンパク質の相互作用解析技術, 食品技術総合辞典(朝倉書店), pp559-563 (2008).
- 6) 猪子洋二, 酵素回折計ビームラインの現状と将来計画, 「高輝度光源を利用したX線溶液散乱の展望新酵素回折計の役割」猪子洋二, 小林克巳編, (高エネルギー加速器研究機構報告書, 茨城), pp 2 - 5 (1999).
- 7) Y. Watanabe and Y. Inoko, Physicochemical characterization of the reassembled dimer of an integral membrane protein OmpF porin, *Protein J.*, **24**, 167-174 (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, pp 1 - 5 (2006).
- 9) Y. Watanabe and Y. Inoko, Small-angle light and X-ray scattering measurements of a protein-oligosaccharides complex mucin in solution, *Journal of Applied Crystallography*, **40**, s209–s212 (2007).
- 10) 渡邊 康, 猪子洋二, 両親媒性環境下の疎水性蛋白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).
- 11) Y. Watanabe and Y. Inoko, Size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics, *J. Chromatogr A*, **1216**, 7461–7465 (2009).
- 12) Y. Watanabe and Y. Inoko, Further application of size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics for characterization of biological macromolecules, *Anal. Bioanal. Chem.*, **399**, 1449–1453 (2011).
- 13) N. Igarashi, Y. Watanabe, Y. Shinohara, Y. Inoko, G. Matsuba, H. Okuda, T. Mori and K. Ito, Upgrade of the small angle X-ray scattering beamlines at the Photon Factory, *J. Phys.: Conf. Ser.*, **272**, 12026–12029 (2011).
- 14) G. D. Fasman, Handbook of biochemistry and molecular biology, Vol.2, CRC Press, Cleveland, OH, (1976).
- 15) K. Wüthrich, NMR of proteins and nucleic acids, John Wiley & Sons (1986).