

研究ノート

生体膜蛋白質の溶液中の集合状態の特性評価

渡邊 康[§] , 猪子 洋二^{*}

Characterization of the Molecular Assembly of a Membrane Protein in Solution

Yasushi Watanabe[§] and Yoji Inoko^{*}[§]National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642^{*}Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531

Abstract

The molecular assembly of an integral membrane protein porin in the presence of a non-ionic surfactant, octyl glucoside, was characterized by using synchrotron radiation solution X-ray scattering measurements. The membrane protein was solubilized as a trimeric form at 7 and 6 mg/ml octyl glucoside (at and just below its critical micelle concentration). The higher order aggregates of the protein were observed at 5.4 mg/ml octyl glucoside. The scattering pattern suggests that the assembly of the aggregates was made in the plane direction.

緒言

食品バイオテクノロジーおよび食品産業において、タンパク質の特性評価は重要な課題の一つである。タンパク質は、生命現象の一端を担うばかりでなく食品関係分野においても重要な生体分子である。タンパク質の研究はその扱いやすさから可溶性タンパク質を中心に展開されてきた。しかし、生体膜タンパク質は、受容体やその存在状態など水溶性タンパク質にない特性を持つものとして注目されているがその研究は立ち遅れている。生体膜タンパク質の研究は、生命科学分野だけでなく周辺の研究分野でも基礎的・基盤的側面から発展させる意義がある。生体膜タンパク質は単独では水に不溶であるため、水に可溶化する方法として界面活性剤の利用が必要不可欠ある。一方、界面活性

剤や種々の塩成分などを含んだ多様な溶媒条件でタンパク質の構造解析ができる手法の一つに溶液X線散乱法があげられる¹⁾⁻⁷⁾。

本研究では、農林水産物資源においては十分に研究されていない水に不溶性の生体膜タンパク質の構造制御特性の知見を得るため、非イオン界面活性剤であるオクチルグルコシドによる可溶化状態の分散特性を放射光溶液X線散乱法により評価した。具体的には、大腸菌外膜生体膜タンパク質ポーリン（外膜に内在して分子量600以下の親水性小分子に対する孔を形成する。ファージの受容体としても注目されている。）の可溶化状態における分散性が、界面活性剤オクチルグルコシドの濃度依存的に変化することについて報告する。

結果として、オクチルグルコシドの臨界ミセル濃度（7 mg/ml⁸⁾界面活性剤がミセルを形成する最少必要濃度）以下の6.0 mg/mlでも3量体として可溶化して

§ 連絡先 (Corresponding author)

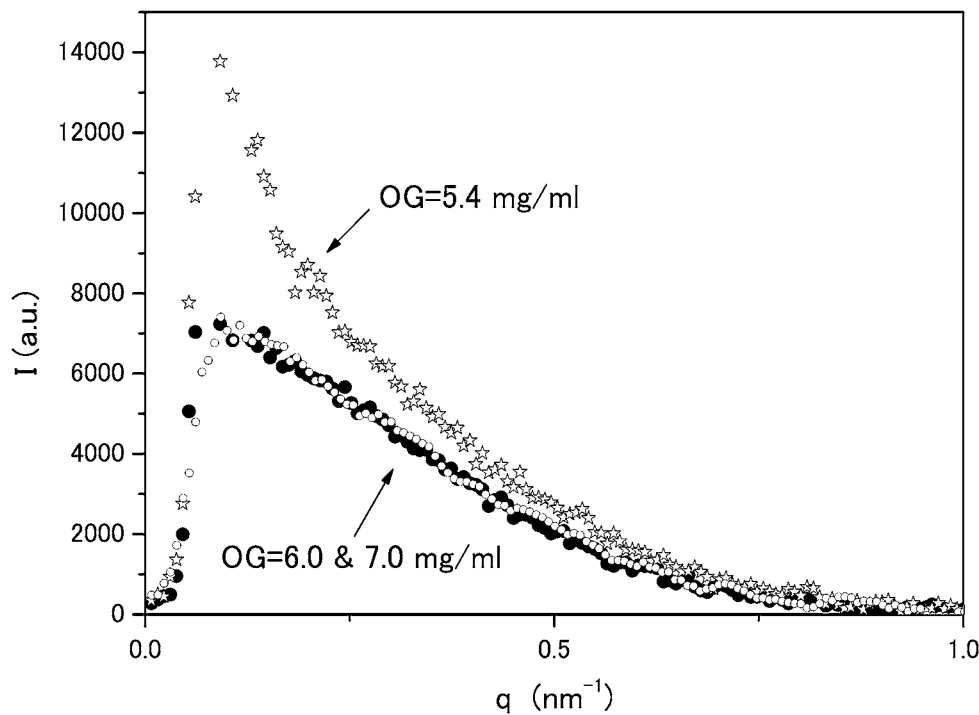


図1 溶液 X 線散乱パターンの一例

オクチルグルコシド濃度は図中に記載した。散乱ベクトル q が約 0.1 nm^{-1} 以下の散乱強度の低下は、ビームストッパー（試料を通り抜けた入射 X 線が検出器にあたることを防ぐ鉛板）によるものである。

おり、オクチルグルコシド 5.4 mg/ml においては 3 量体以上の会合体として可溶化していることがわかった。さらに、溶液 X 線散乱データの解析からその会合体は平面方向に集合していることが示唆された。このような溶液中のタンパク質分子の分散性を分子レベルで評価することは、今後の生体膜タンパク質が関与するバイオテクノロジーの発展に寄与することが期待できる。

実験方法

ポーリンは、大腸菌から精製した⁹⁾。オクチルグルコシドは、ナカライテスク(株)から購入した。

精製標品を 7.0 mg/ml のオクチルグルコシド、 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) で平衡化したゲル濾過クロマトグラフィーカラム (ガードカラム TSK-GCSWXL ($6 \times 40 \text{ mm}$) および主カラム TSK-G3000 SWXL ($7.8 \times 300 \text{ mm}$), 東ソー(株)) に供することにより、3 量体のシングルピークの分画溶液を分取し基準試料とした。他の濃度のオクチルグルコシドの

溶液は、X 線散乱測定用のセルに注入する直前に 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) を用いて、オクチルグルコシドの最終目的濃度まで希釈することにより調製した。タンパク質濃度は 280 nm における吸光係数 $1.41 \text{ ml/mg} \cdot \text{cm}$ を利用して決定した¹⁰⁾。

タンパク質の分子情報評価は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームライン BL10C 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²⁾⁻⁷⁾。検出器は一次元位置敏感比例係数装置を用い、X 線の波長は 0.1488 nm 、試料検出器間距離は 900 mm とした。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。鶏の腱から精製したコラーゲンを標準物質として、検出器のチャンネルを散乱ベクトル $q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$ 、 λ は X 線波長、 2θ は散乱角) に変換した。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 線強度の減衰補正をした。さらに、溶質からの散乱データは溶媒の散乱を差し引いて、タンパク質濃度の補正をした。また、標準試料のコラーゲンの品質検定

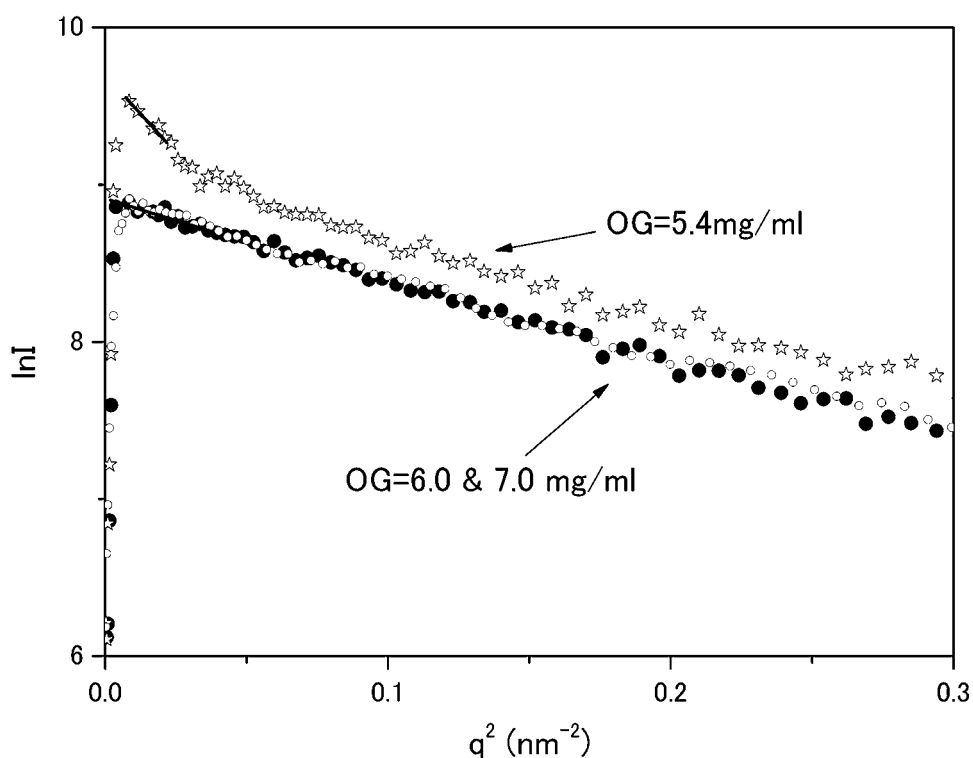


図2 溶液 X 線散乱データのギニエプロットの一部
条件は図1と同じ。

には、研究室規模の小角 X 線散乱測定装置（マックス イエンス(株), M18X) を利用した。

結果と考察

大腸菌外膜タンパク質ポーリンのサブユニットの分子量は3万7千で、3量体構造を基本機能構造としている¹¹⁾。生体膜タンパク質は単独では水に不溶性であるため水に可溶化するために界面活性剤を利用する必要があるため、本研究ではタンパク質に対して変性作用を示さない非イオン性界面活性剤としてオクチルグルコシドを利用した。本タンパク質は、界面活性剤ミセル中で3量体として可溶化されていることは知られている⁷⁾⁹⁾。

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が得られる手法である¹⁾⁻⁷⁾。近年の放射光の発展により¹²⁾、比較的低濃度の試料での溶液 X 線散乱実験が可能となった¹⁾⁻⁷⁾。本タンパク質の場合、放射能ダメージとデータのばらつきを考慮して、0.4 ~ 1 mg/ml 程度のタンパク質濃度が必要であった。図1に7 mg/ml のオクチルグルコシドで可溶化された試料の放射光溶液 X 線散乱測定で得られた散乱パターン

(散乱ベクトル $q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$, λ は X 線波長, 2θ は散乱角) に対する散乱強度) の一例を示した。7 mg/ml (24 mM) は、オクチルグルコシドの臨界ミセル濃度⁸⁾ (ミセルを形成する最低濃度) であり、界面活性剤ミセルの共存下ではタンパク質の可溶化力が維持されるので3量体として存在する。オクチルグルコシドの臨界ミセル濃度以下である6 mg/ml での散乱パターンは7 mg/ml での結果と良く一致した。この結果は、オクチルグルコシドのこの溶媒での臨界ミセル濃度以下でも可溶化状態が維持されている事を示している。さらに、オクチルグルコシドの濃度を5.4 mg/ml まで希釈すると、散乱パターンは上記の結果と異なり強度がそれらより増加し、分子量の増大を示している。

次に、分子サイズを評価するために、散乱ベクトルの2乗に対する散乱強度の対数のプロット (ギニエプロット) を図2に示した。小角散乱領域では、散乱強度 I は $I(0)\exp(-q^2 R_g^2/3)$ と表現できる。ここで、 R_g は回転半径、 $I(0)$ は角度ゼロにおける散乱強度である。この関係からギニエプロットの直線領域 ($q \cdot R_g < 1$) の直線の傾きと切片から、 R_g と $I(0)$ が評価できる¹⁾。オクチルグルコシド6.0 mg/ml では適合性はなく、3量体の回転半径 R_g の値である約4 nm⁷⁾を示し

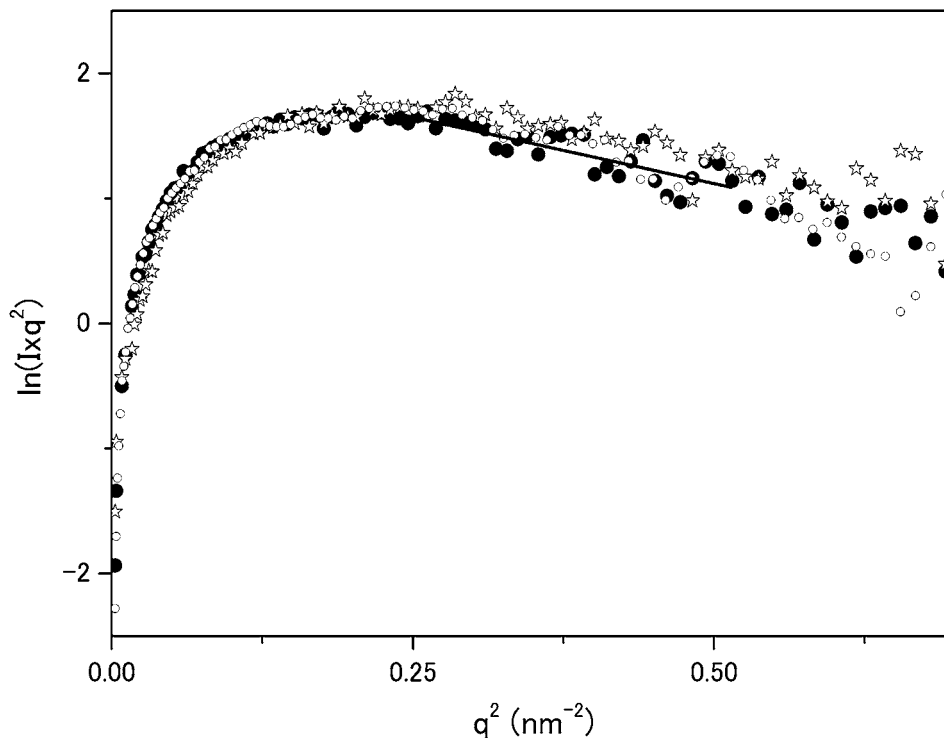


図3 溶液X線散乱データの厚みプロットの一例

条件は図1と同じ。直線は厚み計算に利用した中角領域データの直線近似により得た。

た。一方、オクチルグルコシド5.4 mg/mlでは小角領域に会合体の形成に反映する値の上昇が観察され、回転半径は 7.7 ± 2.5 nmと評価された。一方、角度ゼロにおける散乱強度 $I(0)$ の値は、タンパク質の分子量に比例する値である。その $I(0)$ は、オクチルグルコシド5.4 mg/mlでは明らかに大きくなっている。その $I(0)$ の値は約2.2倍の大きさであり、6量体以上の会合体の形成を示唆している。

一方、分子形状を調べるために、散乱ベクトルの2乗に対する散乱強度と散乱ベクトルの2乗の積の対数の厚みプロット¹³⁾を図3に示した。これらの値は散乱ベクトル 0.15 nm^{-1} から 0.5 nm^{-1} の中角領域でよい直線性を示し、この傾きは円盤状粒子の厚さの回転半径 R_t の2乗に等しい。この結果からオクチルグルコシドの濃度に関係なく示した領域ではほぼ同じ傾きを示すことがわかった。その傾きから、厚さの回転半径 R_t が約1.5 nmと計算できる。従って、円盤の厚み T は、 $T = \sqrt{12} R_t$ と表現できるので、分子の厚みは約5 nmと計算できる。この値は、本蛋白質の単量体結晶構造¹¹⁾から得られる本蛋白質の膜に垂直な方向の大きさにほぼ対応する。これらの結果は、界面活性剤濃度の減少で可溶性が低下し、高次の会合体が平板状に形成され

ていることが示唆される。以上のように、界面活性剤濃度により生体膜タンパク質の分子集合状態を制御できる可能性があることがわかった。

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¹³⁾。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。分子量十万以上のタンパク質の解析や相互作用により会合体を形成する場合などの分子論的な解析は、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X線散乱の長所は、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。従って、溶液X線散乱法は、タンパク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分子素材の特性解明への貢献が期待できる。今後、より低濃度の試料を測定するには、さらに高輝度のX線を照射するか高効率検出器を導入するなど種々の観点から継続的な生体分子の測定を意識した溶液X線散乱測定装置の改良開発が必要である。

謝 辞

放射光溶液 X 線散乱測定は、高エネルギー加速機研究機構放射光共同利用実験課題(番号03G139_05G084, 07G129および07G570)として行った。

要 約

本研究では、農林水産物資源においては十分に研究されていない水に不溶性の生体膜タンパク質の構造制御特性の知見を得るため、非イオン界面活性剤であるオクチルグルコシドによる可溶化状態の大腸菌外膜タンパク質ポーリンの分散特性を放射光溶液 X 線散乱法により評価した。オクチルグルコシドの臨界ミセル濃度以下の 6.0 mg/ml でも 3 量体として可溶化しており、オクチルグルコシド 5.4 mg/ml においては 3 量体以上の会合体として可溶化していることがわかった。さらに、その会合体は平面方向に会合していることが示唆された。

文 献

- 1) Pilz, I., Proteins. In "Small angle X-ray scattering", eds. Glatter, O. and Kratky, O., Academic Press, pp 239–293 (1982).
- 2) 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).
- 3) 渡邊 康, 猪子洋二, タンパク質のクロマトグラフィー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).
- 4) Watanabe, Y. and Inoko, Y., Small-angle light and X-ray scattering measurements of a protein-oligosaccharides complex mucin in solution, *Journal of Applied Crystallography*, **40**, 209–212 (2007).
- 5) 渡邊 康, 猪子洋二, 粘液糖蛋白質の溶液物性評価, 食品総合研究所研究報告, 72, pp31-36 (2008).
- 6) 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).
- 7) Watanabe, Y. and Inoko, Y., Physicochemical characterization of the reassembled dimer of an integral membrane protein OmpF porin, *The Protein Journal*, **24**, 167–174 (2005).
- 8) Shinoda, K., Yamaguchi, T., and Hori, R., The Surface Tension and the Critical Micelle Concentration in Aqueous Solution of β -D-Alkyl Glucosides and their Mixtures, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **34**, 237–241 (1961).
- 9) Watanabe, Y., Characterization of the refolding and reassembly of an integral membrane protein OmpF porin by low-angle laser light scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography, *J. Chromatogr. A*, **961**, 137–146 (2002).
- 10) Rosenbusch, J. P., Characterization of the Major Envelope Protein from *Escherichia coli*., *J. Biol. Chem.*, **249**, 8019–8029 (1974).
- 11) Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Paupit, R. A., Jansonius, J. N., and Rosenbusch, J. P., Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins, *Nature* **358**, 727–733 (1992).
- 12) 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).
- 13) Wüthrich, K., NMR of proteins and nucleic acids, John Wiley & Sons (1986).