

## X線と中性子の相補利用による糖のタンパク質水和殻の保護作用の解明

味戸聡志<sup>1</sup>, 平井光博<sup>1</sup>, 岩瀬裕希<sup>2</sup>, 清水伸隆<sup>3</sup>, 五十嵐教之<sup>3</sup>, 太田昇<sup>4</sup><sup>1</sup>群大理工, <sup>2</sup>CROSS, <sup>3</sup>KEK-PF, <sup>4</sup>JASRI

## Protective action of sugars on protein hydration-shell clarified by the complementary use of X-ray and neutron

Satoshi AJITO<sup>1</sup>, Mitsuhiro HIRAI<sup>1</sup>, Hiroki IWASE<sup>2</sup>, Nobutaka SHIMIZU<sup>3</sup>, Noriyuki IGARASHI<sup>3</sup>, Noboru OHTA<sup>4</sup><sup>1</sup>Department of Science and Technology, Gunma University,<sup>2</sup>Comprehensive Research Organization for Science and Society,<sup>3</sup>Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, KEK,<sup>4</sup>Japan Synchrotron Radiation Research Institute

## Abstract

糖がタンパク質構造を保持し、変性を抑制することはよく知られているが、その作用機構は未だ不明瞭である。我々は本研究において、シンクロトロン放射光X線広角散乱と中性子小角散乱を相補的に用いることで、糖によるタンパク質構造と水和に及ぼす影響の直接的な観測に成功した。実測散乱曲線と理論散乱関数のシミュレーションにより、糖がタンパク質表面の水和殻から選択的に排除され、水和殻を保持することが明らかとなった。

## 1. はじめに

水溶液中のタンパク質の構造安定性は、温度や圧力などの物理的環境だけでなくオスモライトの存在にも依存する [1]。糖やポリオールの添加によってタンパク質の変性や酵素の失活が防がれることは、熱力学的観点から説明されてきた [2]。ここではタンパク質と添加剤の間の特異的な結合や溶媒粘度の変化、糖の存在下におけるタンパク質の選択的な水和などが、安定化効果の主な要因であると考えられている。これらの先行研究では、密度測定、熱量測定、円偏光二色性、NMR などの手法が主に用いられてきたが、本研究ではシンクロトロン放射光X線広角散乱 (SR-WAXS) と中性子小角散乱 (SANS) を相補的に用いることで、タンパク質構造および水和に関する糖の効果を直接観測することに成功した。

生物学的な糖の重要性は、極限環境に対する耐性を持つ一部の生物が、高温や低温、乾燥、浸透圧などのストレスに暴露されると、ストレスタンパク質と共に糖を生産し、細胞内に蓄積することからよく知られている。特にトレハロースは、ストレス耐性を生物の積極的な適応なしに獲得する能力である biostasis (cryptobiosis) に関係することから注目されている。トレハロースは動物や植物、微生物などに広く見られ [3]、グルコース二分子の  $\alpha, \alpha\text{-}1, 1\text{-}$  グリコシド結合によって形成される天然の二糖である。還元基が互いに結合しているため、トレハロースは還元性を持たず、化学的に安定である。生体内におけるトレハロースの作用は、細胞液のガラス化、またはトレハロースと水分子の置換による分子内および分子間の移動制限によるものと考えられており [3]、水の構造が重要な要素であること

が指摘されている。

また、本研究で用いた中性子散乱法は、物質中の水素原子の位置やダイナミクスを観察する上で非常に有用であることが知られており、中性子非弾性散乱 [4] や分子動力学シミュレーション [5] によって、タンパク質表面のアミノ酸残基と周囲の水分子との相互作用がタンパク質のダイナミクスに大きく寄与することが示されている。

Fig. 1 に X線散乱法 (A) と中性子散乱逆コントラスト変化法 (B) における、タンパク質と糖の見え方の概念図

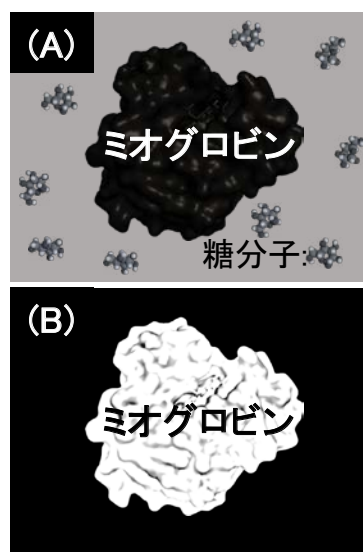


Figure 1 Schematic picture of views of a myoglobin in sugar solution. (A), by X-ray scattering method; (B), by inverse contrast variation method of neutron scattering.

を示す。X線散乱では糖の散乱密度（電子密度）と溶媒（バルク水）の散乱密度が異なるため、タンパク質と糖の両者が散乱へ寄与する。一方で、中性子散乱では重水素化糖を用いて、糖の散乱密度（核散乱長密度）とバルク水の散乱密度を一致させることで、タンパク質のみが散乱へ寄与する。この二つの手法から得られた実験結果を、理論散乱関数のシミュレーション結果と比較若しくはフィッティングを行うことで、タンパク質に対する糖の効果を詳細に議論した。

本研究は、トレハロースおよびグルコースがタンパク質表面領域から選択的に排除され、水和殻を保存する傾向を持つことを明確に示し、トレハロースの場合この傾向がより高い濃度まで維持されることを明らかとした。

## 2. 実験

測定試料であるミオグロビンは、馬の骨格筋由来（SIGMA Chemical）のものを使用した。糖として、グルコースおよび97%重水素化グルコース（SIGMA Chemical）、トレハロース二水和物（林原）を使用した。また、中性子散乱実験のために重水（99.9%重水素化）を使用した。緩衝液には50 mM NaCl および 10 mM HEPES を用い、pH7.0 (pD6.6) に調整した。測定試料の調製は、8% w/v のミオグロビン原液および10~50% w/w の糖溶液原液の1:3の体積比混合により行った。加えて、糖溶液の平均散乱密度を求めるため、振動密度測定器（DMA35, Anton-Paar）を用いて糖溶液の密度測定を行った。

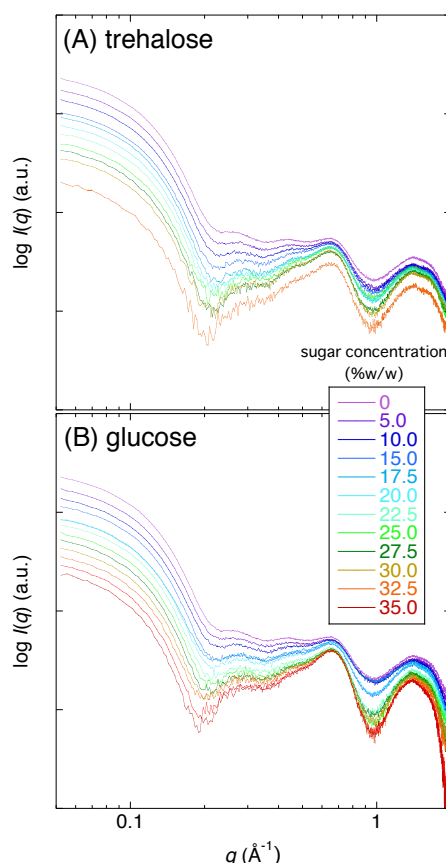
SR-WAXS 測定には、KEK-PF の BL-10C と SPring-8 の BL-40B2 を、SANS 測定には、J-PARC-MLF の BL15 TAIKAN を利用した。中性子の波長は1.0-7.8 Åであった。何れの実験においても、散乱測定の直前に50 kDaの分子量カット遠心フィルター（Merck）を使用して試料溶液内の凝集体を除去した。WAXS 散乱データのバックグラウンド処理については、引用論文に詳細に記述されている[6]。SANS データのバックグラウンド処理は一般的な方法で行った。距離分布関数  $p(r)$  は散乱曲線  $I(q)$  の逆フーリエ変換によって計算した。

## 3. 結果および考察

### 3-1. X線広角散乱（WAXS）の実験結果と理論値との比較

Fig. 2 にミオグロビンの WAXS 曲線  $I(q)$  の糖濃度依存性を示す。(A) はトレハロース溶液中、(B) をグルコース溶液中のものである。トレハロースの溶解度がグルコースより小さいため、最大濃度はトレハロースで32.5% w/w、グルコースで35% w/w である。散乱強度およびプロファイルの変化は、主に糖濃度の増加によるコントラストの変化に起因する。WAXS 曲線は非常に広い  $q$  領域を網羅しており、それぞれの  $q$  領域は、タンパク質の四次および三次構造 ( $q < \sim 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ )、ドメイン間の相関 ( $\sim 0.25 < q < \sim 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ )、ドメイン内構造 ( $\sim 0.5 < q < \sim 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ )、側鎖を含む二次構造 ( $\sim 1.1 < q < \sim 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ ) を反映する [19]。

実測した散乱曲線の変化を説明するため、X線理論散乱



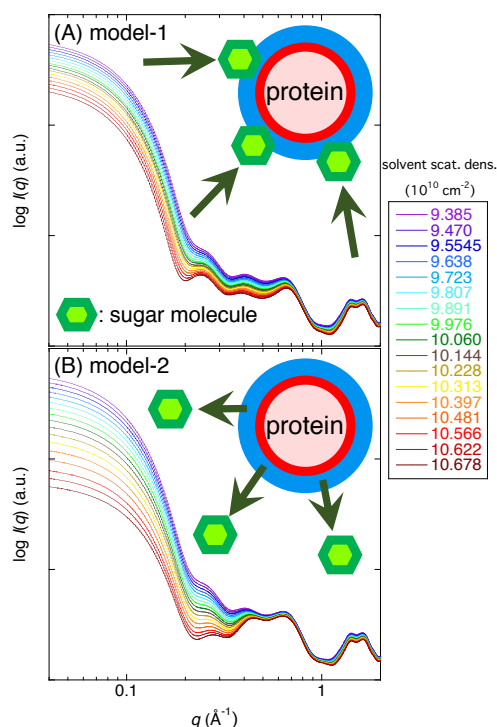
**Figure 2** Wide-angle X-ray scattering curve (WAXS) of myoglobin depending on sugar concentration (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.0 at 25 °C). The sugar concentration was varied from 0 to 32.5% w/w for trehalose, (A); from 0 to 35% w/w for glucose, (B).

関数計算プログラム CRY SOL を用いてシミュレーションを行った。Svergun らによって開発された CRY SOL [7] は、H. B. Stuhmann と A. Miller が示した理論に基づくものである [8]。当プログラムは、水和殻を考慮することで、溶液中のタンパク質から得られる実験的な X 線散乱曲線をよく説明することが知られている。シミュレーションに用いたミオグロビンの PDB ファイル番号は 1WLA である。本シミュレーションは、糖溶液におけるタンパク質の水和殻に起こり得る二つのモデルについて行った [2,9,10]。

モデル -1. 選択的溶媒和（タンパク質表面と糖分子の相互作用）により、水和（溶媒和）殻の水分子が糖分子によって選択的に置換される (Fig. 3A)。選択的溶媒和は、タンパク質溶媒和殻の散乱密度を増加させる。

モデル -2. タンパク質と糖との間の水和斥力により、タンパク質水和領域から糖分子が選択的に排除される [11] (Fig. 3B)。これはタンパク質の選択的な水和を意味し、水分子による水和殻の保存が生じる。選択的排除はタンパク質水和シェルを一定に保つ。

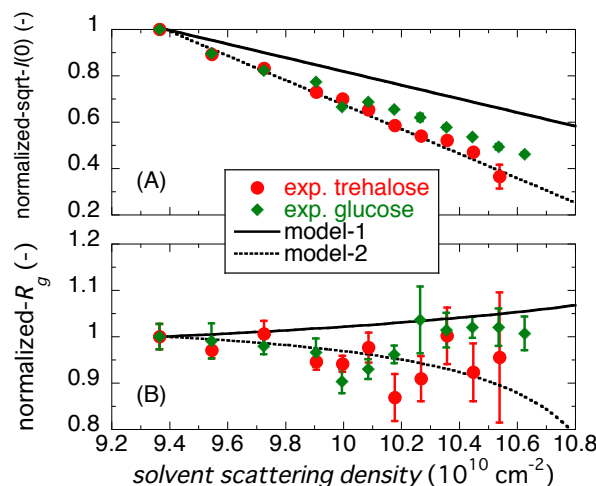
Fig. 3 は、ミオグロビン理論散乱関数の溶媒 ASD（平均散乱密度  $\propto$  糖濃度）依存性を示しており、(A) は選択的溶媒和（モデル -1）、(B) は選択的排除（モデル -2）に基



**Figure 3** Theoretical WAXS functions of myoglobin depending on the average scattering density of the solvent ( $\propto$  sugar concentration) for two different model cases. (A), model-1: replacement of hydrated water with sugar; (B), model-2: exclusion of sugar from the hydration-shell of the protein. The variation range of the solvent scattering density corresponds to that of the sugar concentration from 0 to 35% w/w.

づくものである。溶媒 ASD の範囲は、0~35% w/w の糖濃度に対応するように設定した。一般的な球状タンパク質の水和殻第一層の密度は、純水の 1.1 倍程度になることが知られており、モデル-1 では、タンパク質の溶媒和（水和）殻の ASD を溶媒の ASD の 1.1 倍に設定し、モデル-2 では、タンパク質の水和（溶媒和）殻の ASD を純水の ASD の 1.1 倍に固定した。Fig. 2 に示した実測 WAXS 曲線と理論散乱関数を比較すると、小角領域における散乱強度の減少幅や  $\sim 0.2 < q < \sim 0.4 \text{ \AA}^{-1}$  に見られる窪みの形状から、モデル-1 に比べてモデル-2 が実験値をよく説明した。

Fig. 4A には、実測散乱曲線および理論散乱関数から得られた散乱角ゼロの強度  $I(0)$  の平方根 ( $\text{sqrt-}I(0)$ ) を、Fig. 4B には Guinier プロットから求めた回転半径  $R_g$  を規格化したものを示す。 $I(0)$  は  $N(\Delta\rho V)^2$  に比例することが知られている ( $\Delta\rho$ : コントラスト,  $V$ : 分子量,  $N$ : 数濃度)。(A) に示した  $I(0)$  の変化は、トレハロース溶液中ではモデル-2 に完全に従った。一方で、グルコース溶液中では ASD が  $\sim 10.10 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  ( $\sim 20\%$  w/w) 以降にモデル-1 からの乖離が生じ、糖分子のタンパク質水和殻への侵入が徐々に生じることを示唆した。(B) に示す  $R_g$  の変化は、トレハロース溶液中では ASD が  $\sim 10.27 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  ( $\sim 25\%$  w/w) まで、グルコース溶液中では ASD が  $\sim 10.20 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  ( $\sim 22.5\%$  w/w) までモデル-2 の傾向を示し、それ以降はモデル-1 の傾向が現れた。 $I(0)$  および  $R_g$  の変化は、糖濃度が特定



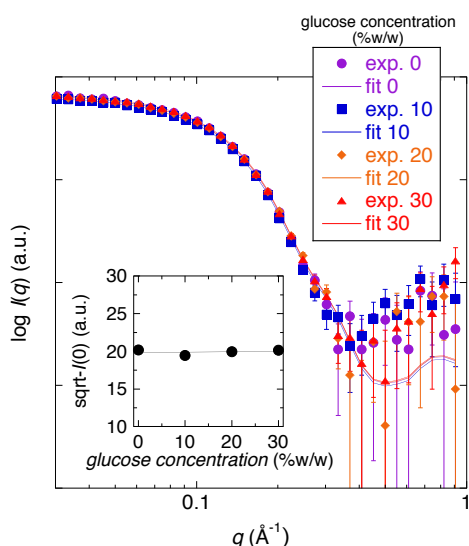
**Figure 4** Comparison of theoretical and experimental values of radius of gyration ( $R_g$ ) and square-root of zero-angle scattering intensity ( $\text{sqrt-}I(0)$ ). (A), normalized theoretical  $R_g$  values obtained from WAXS functions; (B), normalized theoretical  $\text{sqrt-}I(0)$  values are plotted against the solvent scattering density. In both (A) and (B), the symbols correspond to experimental values; the solid and dash lines correspond to model-1 and model-2, respectively.

の濃度 (20~25% w/w) まで糖分子のタンパク質水和殻からの選択的排除が支配的であり、より高濃度では選択的溶媒和が部分的に生じることを示しており、重量濃度当たりの選択的排除傾向が、グルコースに比べてトレハロースで大きいことを明確に示した。以下の中性子散乱実験結果は、本結果を強く支持している。

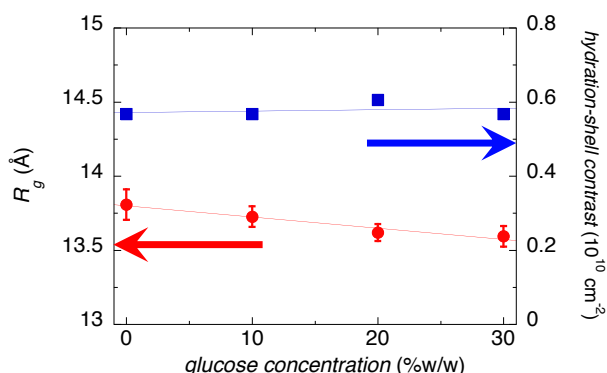
### 3-2. 中性子小角散乱 (SANS) 曲線の実験結果と理論散乱関数によるフィッティング

今回の中性子散乱に採用した重水素化物を用いた逆コントラスト変化法では、糖分子の添加による散乱への寄与を最小限に抑えることができる。密度測定から非重水素化グルコース (h-グルコース) および 97% 重水素化グルコース (d-グルコース) の ASD を計算すると、 $0.0267 \times 10^{-12} \text{ cm}^{-2}$  および  $0.0796 \times 10^{-12} \text{ cm}^{-2}$  であった。この値に基づき、 $[\text{h-グルコース}] / [\text{d-グルコース}] = 0.294 / 0.706$  (M/M) の割合で混合することでグルコースの ASD を重水の ASD に一致させた。そのため、タンパク質のコントラストはグルコースの添加によって変化しない。

Fig. 5 に実測したミオグロビンの SANS 曲線および  $\text{sqrt-}I(0)$  のグルコース濃度依存性を示す。SANS 曲線と  $I(0)$  はグルコース濃度に依存せずほぼ一定の値を取り、ASD の調節が成功したことを示す。Fig. 5 の SANS 曲線に示した実線は、CRYSON でフィッティングした理論散乱関数である。CRYSON プログラムも Svergun らによって開発されたプログラムであり、CRYSON と同様の原理で中性子散乱関数のシミュレーションが可能である [12]。フィッティングを行った際の偏差  $\chi^2$  値は 1.0~1.6 の範囲であり、議論を行うに十分な精度であった。Fig. 6 には CRYSON の



**Figure 5** Neutron scattering curve depending on the glucose concentration (100% D2O, 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pD 6.6 (= pH 7.0) at 25 °C). The insert shows the zero-angle scattering intensity,  $\sqrt{I(0)}$ . The solid lines show the theoretical scattering functions obtained by fitting experimental data.



**Figure 6** Contrast of the hydration-shell evaluated by the fitting and the experimental  $R_g$  values obtained from Fig. 5. The symbols (square and circle) correspond to the hydration-shell contrast and the  $R_g$  value, respectively.

フィッティングから得られたミオグロビンの水和殻のコントラストおよび  $p(r)$  から計算した  $R_g$  を示す。水和殻のコントラストはグルコース濃度に依らず  $\sim 0.58 \times 10^{-12} \text{ cm}^{-2}$  (重水の ASD の約 9.1%) とほぼ一定の値を示した。水和殻のコントラストは水和殻の密度と相関関係にあるため、本結果はミオグロビン水和殻の水分子がグルコース溶液中でも保存されることを明確に示している。これは、糖分子がタンパク質の水和殻から選択的に排除されるという WAXS の結果を強く支持している。

一方、ミオグロビンの  $R_g$  はグルコース濃度に依存して僅かな減少傾向を示し、緩衝液中の  $13.8 \pm 0.1 \text{ \AA}$  からグルコース 30% w/w 中の  $13.6 \pm 0.1 \text{ \AA}$  へと変化した。この結果を説明するため、一般的な物理化学的観点から次のように推

論することができる。溶媒への糖の添加により、バルク溶媒とタンパク質水和殻との間に化学ポテンシャルの差異が生じ、浸透圧ストレスが発生する。従って平衡状態では、タンパク質表面の運動が水和殻の水分子の化学ポテンシャルを減少させるように抑制若しくは制限される。その結果、浸透圧ストレスとタンパク質の界面張力が均衡する新たな平衡状態が生じる (オスモエラスティックカップリング) [13]。この現象が溶媒粘度および水和殻の変化に依存して、タンパク質全体の運動および分子内運動を抑制することが指摘されている [14]。1M のグルコース溶液の比粘度は  $\sim 1.4$  であり [15]、タンパク質の見かけの排除体積の圧縮として実験的に観察され得ると考えられる。この仮定に基づき CRYSON のシミュレーションを行った結果、ミオグロビンの排除体積の圧縮に伴い理論  $R_g$  の僅かな減少が確認された (図略)。シミュレーション結果によると、実測  $R_g$  の減少はミオグロビン排除体積の約 5% の減少に対応しており、基準振動解析 [16] で示されるようなタンパク質表面の熱ゆらぎの抑制に由来すると考えられる。

#### 4. 総括

本研究では、二つのモデルに基づく理論散乱関数シミュレーションを用いて、X線散乱および中性子散乱の実験結果を解析した。モデル-1は、タンパク質水和殻の水分子が糖分子の選択的溶媒和によって置換され、モデル-2は水和殻領域から糖分子が選択的に排除され、水分子からなる水和殻が保護されるというものである。X線散乱の実験結果およびシミュレーション結果は、糖濃度  $\sim 25\%$  w/w 未満ではモデル-2で仮定した選択的排除が支配的であることを明確に示した。この傾向はグルコースに比べてトレハロースで優勢であり、トレハロースの生体保護作用の要因の一つと考えられる。逆コントラスト変化法による中性子散乱の実験結果は、X線散乱の実験結果を強く支持し、糖溶液中でも水分子からなるタンパク質水和殻が保存されることを明確に示した。方法論的観点から本研究で採用した手法について述べると、X線散乱および中性子散乱の相補利用は、種々のオスモライトによるタンパク質構造およびその水和特性に対する効果を直接観測する上で高い優位性を持つことが改めて明白となった。

当記事は著者らが報告した論文に基づき執筆された [17]。また、我々の研究グループは合成高分子によるタンパク質水和殻への効果 [18]、グリセロールのタンパク質水和殻および熱安定性への効果 [19, in press] について、本記事と同様の解析を行い報告を行った。現在著者らは、本研究を拡張し、糖としてスクロースおよびフルクトースを加え、より詳細な水和状態の検討と、化学変性および熱変性に対する糖の効果についての報告を準備中である。

#### 5. 謝辞

本研究における X線散乱測定は、PF 共同利用実験課題 (No. 2016G560, 2017G698) および SPring-8 共同利用実験課題 (No. 2015A1557, 2017A1435) にて行われた。中

性子散乱実験は、J-PARC-MLF 共同利用実験課題 (No. 2016B0003, 2017B0218) にて行われた。

## 引用文献

- [1] J. Rösgen, B.M. Pettitt *et al.*, *Protein Sci.* **16**, 733 (2007).
- [2] P.R. Davis-Searles, A.J. Saunders *et al.*, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 271 (2001).
- [3] E.P. Feofilova, A.I. Usov *et al.* *Microbiology* **83**, 271 (2014).
- [4] F. Gabel, D. Bicout *et al.*, *Q. Rev. Biophys.* **35**, 327 (2002).
- [5] A. Oleinikova, N. Smolin *et al.*, *Biophys. J.* **93**, 2986 (2007).
- [6] M. Hirai, M. Koizumi *et al.*, *Biochemistry* **43**, 9036 (2004).
- [7] D.I. Svergun, C. Barberato *et al.*, *J. Appl. Cryst.* **28**, 768 (1995).
- [8] H.B. Stuhmann and A. Miller, *J. Appl. Crystallogr.* **11**, 325 (1978).
- [9] M. Auton, D.W. Bolen *et al.*, *Proteins* **73**, 802 (2008).
- [10] M. Auton, D.W. Bolen *et al.*, *Funct. Bioinfo.* **73**, 802 (2008).
- [11] S. Sukenik, L. Sapir *et al.*, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **18**, 495 (2013).
- [12] D.I. Svergun, C. Barberato *et al.*, *J. Appl. Cryst.* **28**, 768 (1995).
- [13] A. Suzuki, M. Yamazaki, *Biochemistry* **28**, 6513 (1989).
- [14] H. Frauenfeldera, G. Chena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5129 (2009).
- [15] M. Sola-Penna and J.R. Meyer-Fernandes, *Arch. Biochem. Biophys.* **360**, 10 (1998).
- [16] A. Kidera, N. Go *et al.*, *J. Mol. Biol.* **225**, 457 (1992).
- [17] S. Ajito, M. Hirai *et al.*, *Physica B: Condensed Matter* (2018).
- [18] M. Hirai, S. Ajito *et al.*, *Physica B: Condensed Matter* (2018).
- [19] M. Hirai, S. Ajito *et al.*, *Biophysical J.* in press.

(原稿受付日：2018年6月21日)

## 著者紹介

味戸聡志 Satoshi AJITO



群馬大学大学院理工学府 理工学専攻  
博士1年

e-mail : t161a002@gunma-u.ac.jp

最近の研究：低分子および高分子 crowding の溶液散乱法による解析。

趣味：開発途上国や新興国へのバックパッキング、ストリートダンス。

平井光博 Mitsuhiro HIRAI  
e-mail : mhirai@gunma-u.ac.jp  
群馬大学大学院理工学府 教授

岩瀬裕希 Hiroki IWASE  
e-mail : h\_iwase@cross.or.jp  
総合科学研究機構 中性子科学センター 研究員

清水伸隆 Nobutaka SHIMIZU  
e-mail : nobutaka.shimizu@kek.jp  
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 准教授

五十嵐教之 Noriyuki IGARASHI  
e-mail : noriyuki.igarashi@kek.jp  
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 准教授

太田昇 Noboru OHTA  
e-mail : noboru\_o@spring8.or.jp  
高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門 研究員