

博士論文

糖によるタンパク質の構造及び  
水和の安定化作用の分子機構の  
解明

2020年3月

群馬大学大学院 理工学府 理工学専攻  
博士後期課程  
味戸聡志

# 目次

## 第1章 序論

### 1.1 研究背景

- 1.1.1 糖による生体保護作用 5
- 1.1.2 糖によるタンパク質保護作用 6
- 1.1.3 糖の選択的排除とタンパク質の選択的水和 7
- 1.1.4 ミオグロビン 9
- 1.1.5 アミロイド線維 10
- 1.1.6 本研究で用いた糖の性質 10

### 1.2 研究目的及び本論文の構成 12

## 第2章 実験手法

### 2.1 X線溶液散乱法

- 2.1.1 放射光 14
- 2.1.2 X線散乱理論 15
- 2.1.3 コントラスト 17
- 2.1.4 X線広角散乱法における一次処理 17
- 2.1.5 Guinier 解析 18
- 2.1.6 距離分布関数による解析 20
- 2.1.7 転移多状態解析法 21

### 2.2 中性子溶液散乱法

- 2.2.1 パルス中性子源 22

2.2.2	中性子弾性散乱	23
2.3	理論散乱関数シミュレーション	
2.3.1	CRY SOL 及び CRYSON の計算理論	25
2.3.2	境界層の散乱振幅計算法	29
2.4	振動式密度計	
2.4.1	振動式密度計の原理	29

### 第3章 ミオグロビン水和殻に対するトレハロース及びグルコースの効果

3.1	緒言	31
3.2	実験	
3.2.1	試料	32
3.2.2	密度測定	32
3.2.3	X 線広角散乱測定	32
3.2.4	中性子小角散乱測定	32
3.3	結果及び考察	
3.3.1	糖溶液の密度から推定された散乱密度及びミオグロビンの散乱コントラスト	33
3.3.2	X 線散乱曲線の実測値及び理論値の比較によるミオグロビン水和殻への糖の効果の解析	34
3.3.3	中性子散乱曲線のフィッティングによるミオグロビン水和殻の解析	38
3.4	結言	41

## 第4章 ミオグロビン水和殻に対する二糖・単糖の効果、及び化学変性・熱変性の抑制作用

4.1 緒言	43
4.2 実験	
4.2.1 試料	44
4.2.2 密度測定	44
4.2.3 X線広角散乱測定	44
4.2.4 中性子小角散乱測定	44
4.3 結果及び考察	
4.3.1 糖溶液の密度から推定された散乱密度及びミオグロビンの散乱コントラスト	45
4.3.2 ミオグロビン水和殻に対する二糖及び単糖の効果	47
4.3.3 塩酸グアニジンの化学変性に対する糖による抑制作用	51
4.3.4 熱変性に対する糖による抑制作用	59
4.4 結言	62

## 第5章 ミオグロビンの酸変性及びアミロイド様凝集体形成に対するトレハロースの効果

5.1 緒言	64
5.2 実験	
5.2.1 試料	65

5.2.2	X線広角散乱測定	66
5.2.3	動的光散乱測定	66
5.3	結果及び考察	
5.3.1	中性条件における牛ミオグロビン構造に対するトレハロースの効果	66
5.3.2	ミオグロビンの酸変性によって生じるアミロイド様凝集体	69
5.3.3	トレハロースの添加によるミオグロビン天然構造の回復作用及びアミロイド様凝集体解離作用	71
5.4	結言	75
	第6章 総括	77
	謝辞	79
	引用文献	80
	本研究に関連した論文及び発表	90
	その他の論文及び発表	92

# 第1章 序論

## 1.1 研究背景

### 1.1.1 糖による生体保護作用

糖とは、単糖を最小構成単位とする化合物群の総称であり、代表的な有機化合物の1種である(モーラン他, 2013)。単糖は、炭素数3以上かつ直鎖状のポリヒドロキシアルデヒド(アルドース)及びポリヒドロキシケトン(ケトース)と定義され、単糖の重合数によって糖は大まかに分類がされている。単糖2つが脱水縮合によって結合したものを二糖、10個程度が重合したものをオリゴ糖、さらに重合したものを多糖と呼ぶ。糖は、タンパク質及び脂質と並び主要な生体高分子であり、あらゆる生体内化学反応に関与している。特に単糖や二糖は、生体内のエネルギー伝達を媒介しており「エネルギー通貨」とも呼ばれているが、微生物や昆虫、両生類等では生体保護物質としての役割も担っている(Storey and Storey, 1996)。以後、本博士論文では「糖」を単糖や二糖を示す語として用い、オリゴ糖や多糖とは区別する。本節では、この糖による生体保護作用について説明する。

糖による生体保護作用については、特に昆虫において多く報告がなされている(Andreadis and Athanassiou, 2017)。昆虫は血糖に二糖のトレハロースを用いており、その血糖濃度は0.5~5%程度である。これは、哺乳類の血糖濃度がおおよそ0.1%であることと対照的である。哺乳類は血糖として単糖であるグルコースを利用しているが、単糖の還元末端が絶えず酸化還元反応を起こすため開環構造と閉環構造の平衡として存在する。この還元末端が他の生体高分子と反応し共有結合を形成する現象を糖化反応とよび、生体高分子や生体組織の機能不全を引き起こすことが知られている。そのため、哺乳類は血糖値を低く抑えて糖化反応を抑制する必要がある。その一方で、トレハロースやスクロース(ショ糖)といった単糖の還元末端同士のグリコシド結合によって生成される二糖は非還元糖と呼ばれ、糖化能を持たない。従って、トレハロースのような非還元糖を血糖として用いる生物は、血糖値を高濃度に維持することができ、高濃度の糖を利用した生体保護が可能となる。

糖を用いた生体保護において最も一般的なものは低温耐性の獲得である(Clark and Worland, 2008)。越冬性の昆虫類では、冬越しの際にトレハロース濃度を20%程度まで高めることで氷晶の成長を抑制するとともに、生体高分子の構造を安定化することが知られている。高緯度に生息する昆虫では、日常的に血糖濃度を高く維持する種も知られている。これら低温耐性の獲得をクライオビオシス(cryobiosis)と呼ぶ(Hengherr and Schill, 2019)。乾燥耐性の獲得に糖を用いる生物も知られており、アフリカ原産のネムリユスリカは幼虫時代にトレハロースを用い乾季を超えることが可能である(Cornette, 2011)。ネムリユスリカは、トレハロースを雨季から乾季へ遷移する間に大量に生産することで体内をガラス化する。これにより生命活動を一時停止させ、仮死状態となる。再び水分を得る

ことで正常な生命活動を開始することが可能であり、この乾燥耐性の獲得をアンハイドロビオシス(anhydrobiosis)、仮死化による耐性獲得をクリプトビオシス(cryptobiosis)と呼ぶ(Clegg, 2001; 櫻井, 2016)。クリプトビオシスは緩歩動物のクマムシでも知られているが、この仮死状態ではあらゆる環境ストレスに対して極めて高い耐性を持つことが知られている。さらに、酵母菌で見られる現象として、糖を用いた高温耐性の獲得が知られている(Singer and Lindquist, 1998)。40~50°Cに加熱されると酵母菌はトレハロースを急速に生産し、生体高分子の熱による損傷を抑制する。ここで着目すべき点は、好熱細菌のように高温域に最適化された生体高分子を利用するのではなく(Vieille and Zeikus, 2001)、室温近傍に最適化された生体高分子を高温でも利用し続けることを可能とすることである。

以上で述べたものは、糖による生体保護作用の極一部に過ぎない。糖は様々な環境ストレスから生体を保護する作用を持ち、この生体保護作用を活用する生物種も多岐にわたる。また、保護される対象も、臓器といった顕微鏡スケールから細胞や生体高分子といったミクروسケールまで幅広いと考えられている。その中でも、タンパク質に対する保護作用については古くから研究が行われており(Lee and Timasheff, 1981)、本論文でもタンパク質に対する糖による保護作用について述べる。

### 1.1.2 糖によるタンパク質保護作用

糖によるタンパク質保護作用は、生物学的に重要であるだけでなく、産業応用の観点からも研究する価値がある。既に、近年研究開発が盛んとなっているタンパク質製剤や培養細胞の保存への糖の活用や(Ohtake and Wang, 2011)、食品保存への応用が行われている(Zhang et al., 2017; Hague et al., 2015)。タンパク質に対する保護作用については、溶液状態と乾燥したアモルファス状態についてそれぞれ研究が行われており(Jain and Roy, 2009)、今回我々は、溶液状態におけるタンパク質保護作用について検討を行った。

糖溶液中でタンパク質の天然構造が安定化され、様々な変性条件下でも変性や凝集が抑制されることが既に知られている(Arakawa and Timasheff, 1982)。これらの先行研究は、熱分析や分光測定によるものが多く、その微視的なメカニズムについては明確にされていなかった。生体高分子に対する糖の保護作用メカニズムとして、大きく 2 つの仮説が提唱されており、それぞれ選択的水和説および水素結合置換説と呼ばれている。

#### (1) 選択的水和説(Arakawa and Timasheff, 1982; Davis-Searles et al., 2001)

選択的水和説では、タンパク質表面の水和領域(水和殻)から糖分子が選択的に排除され、糖溶液中であってもタンパク質が水分子によって選択的に水和されると考えられており、この選択的水和によってタンパク質天然構造の安定性が向上すると説明されている。実際に、脂質二重層の表面からトレハロース分子が排除されることが SANS 実験により確認されている(Kent et al., 2014)。

#### (2) 水素結合置換説(Golovina et al., 2009)

水素結合置換説では、タンパク質表面の水和水を糖分子が置換し、直接水素結合を形成すると考えられている。これにより、糖分子がタンパク質同士の接触を防止する障壁となり、タンパク質の凝集を抑制すると説明されている。

上記 2 つの仮説が議論される要因として、タンパク質の水和状態を糖溶液中で直接観測する方法が限られていたためだと考えられる。そこで我々は溶液散乱法を用い、糖溶液中におけるタンパク質の水和殻を直接観測し、溶液状態でのタンパク質保護メカニズムが選択的水和説に従うことを証明した。次節では、この選択的水和が生じる理論背景について解説する。

### 1.1.3 糖の選択的排除とタンパク質の選択的水和

タンパク質は溶液中で天然構造にフォールドして存在する。このコンパクトで単一の構造が安定的に存在するには、水分子との相互作用、水和が大きく関係している(Eisenberg and McLachan, 1986)。一般に、球状のタンパク質天然構造は疎水性残基をコアとし、親水性残基を表面に露出している。そして、タンパク質表面には、水分子が 2 層(5~6 Å)に渡って水和し、水和殻を構成していると考えられている(Israelachvili and Wennerström, 1996)。第 2 層の水和殻は、第 1 層の水和殻によって構造化するため、第 1 層の水和殻に比べて結合が弱い。3 層以上の水和についても諸説あるが、バルクの水分子間相互作用との区別が困難ではっきりとしていない。直接的な観測では、水和水を含めたタンパク質結晶構造解析により、結晶におけるタンパク質内部の結合水の密度がバルク水に比べて 23% 高く、タンパク質表面の水和水の密度もバルク水に比べて~18%高いことが明らかとなっている(Gerstein and Chothia, 1996)。Svergun らはタンパク質溶液における X 線小角散乱(SAXS)と中性子小角散乱(SANS)を相補的に利用することで、溶液中におけるタンパク質水和殻第 1 層の密度が、バルク水に比べて 5~25%(平均 10%)高いことを示した(Svergun et al., 1998)。従って、溶質の存在によって溶液の性質やタンパク質水和殻の性質が変化すると、タンパク質の安定性に大きな効果を及ぼすと考えられる。

Timasheff は、タンパク質に対する種々の溶質の効果を統一的に議論した(Timasheff, 1992; Timasheff, 1993)。これによれば、タンパク質表面に対する溶質の作用は大きく 2 つに分類される。

- (1) タンパク質表面の溶質の濃度がバルクに比べて過剰となる。  
このケースは溶質-タンパク質間相互作用が、水-タンパク質間相互作用より有利である場合に生じる。
- (2) タンパク質表面の水の濃度がバルクに比べて過剰となる。  
このケースは水-タンパク質間相互作用が溶質-タンパク質間相互作用より有利である場合に生じる。

いわゆる変性剤は(1)に分類される。尿素(Prakash et al., 1981)や塩酸グアニジン(Hade and Tanford, 1968)、一部の有機溶剤(Inoue and Timasheff, 1968)はタンパク質をアンフォールディングさせる変性剤として知られている。変性剤は凝集した



タンパク質を可溶化する作用もあるため、タンパク質発現系で生じる凝集タンパク質を精製する過程で広く利用されている(Clark, 2001)。変性剤はタンパク質の疎水性残基に結合することで疎水性コアを露出させる(Simpson and Kauzmann, 1953)。この変性剤による選択的相互作用によってタンパク質の天然構造はアンフォールディングされる。ウシ血清アルブミンと塩酸グアニジンの研究により、タンパク質の質量に対して 20%w/w の水分子と 28%w/w の塩酸グアニジンがタンパク質表面に結合していることが示されている(Reisler et al., 1977)。2 価の金属塩も同様の傾向を示すことが明らかにされている(Arakawa and Timasheff, 1984)。タンパク質保護作用を持つとされる化合物の多くは(2)に分類されると考えられており、例として糖(Lee and Timasheff, 1981)、グリセロール(Na and Timasheff, 1981)、アミノ酸(Arakawa and Timasheff, 1983)、1 価の金属塩(Arakawa and Timasheff, 1984)、ポリエチレングリコール(Lee and Lee, 1981)が挙げられる。Wyman らによって、タンパク質表面と溶媒の相互作用が負の場合、天然構造と変性構造の平衡が天然構造側へシフトすることが示唆されており(Wyman et al., 1964)、選択的排除及び選択的水和によってタンパク質の安定性が高まることが理論的に推測されていた。

選択的排除が生じるメカニズムについては、以下の3種類が考察されている。

#### (1) 立体的排除

溶質の体積が水分子より大きいために、タンパク質表面から物理的に排除される(Lee and Lee, 1981)。この立体的排除は、溶質の分子量と比例して生じることがポリエチレングリコールに関する研究から明らかとなったが、溶質がタンパク質表面に対して不活性であることが条件となる。

#### (2) 溶質の親水性

塩や糖はその親水性のために水分子と強く水素結合し、水溶液の粘度と表面張力を増加させる(Arakawa and Timasheff, 1984)。そのため、溶質と水分子との相互作用に比べ溶質とタンパク質の親水性残基との相互作用が不利な場合、溶質がタンパク質表面から排除される。

#### (3) 疎溶媒性

疎溶媒性とは疎水性を水から溶液へ拡張したものである。タンパク質表面には親水性残基だけでなく部分的に疎水性残基も露出している(Teeter, 1991)。結晶構造解析から、五員環様に構造化した水分子にタンパク質表面の疎水性残基が取り囲まれることが明らかとなった。これは疎水性水和と呼ばれ、親水性水和と合わせてタンパク質の水和を構成している。グリセロールは標準的な水の水和構造(正四面体等)によく適合することから(Gekko and Timasheff, 1981)、反対に疎水性残基周囲の五員環構造への侵入が不利であり、その結果疎水性残基周辺から排除されると考えられる。

上記のメカニズムによって選択的排除が生じた上でタンパク質のアンフォールディングを考える。タンパク質の天然構造はコンパクトな球状であるため、タンパク質のアンフォールディングは溶媒露出表面積の増加を招く。溶媒露出表面積が増加すると、溶質が排除される体積も増加することになる。メカニズム(1)においては、溶質を排除する空間の拡張はバルクの溶質濃度の増加を招き、結果として水分子の占有空間の減少によりエントロピーが減少するため不利である。

メカニズム(2)においては、増加した溶媒露出表面積の水和のため溶質の水和水を奪取することとなり、系全体の自由エネルギーが増大するため不利となる。メカニズム(3)においては、変性によって新たに露出した疎水性表面から溶質を排除する必要がある、エネルギー的に不利となる。従って、選択的排除傾向をもつ溶質の存在下では、タンパク質のアンフォールディングは溶質の新たな排除が必要となるため、結果としてタンパク質の天然構造が安定化されると考えられている(Arakawa and Timasheff, 1985)。

#### 1.1.4 ミオグロビン

本研究では、研究対象のタンパク質としてミオグロビンを用いた。ミオグロビンは動物の骨格筋や心筋に高濃度で存在する酸素貯蔵タンパク質であり、X線結晶構造解析によって立体構造が解かれた最初のタンパク質でもある(Kendrew et al., 1958)。実験によって馬の骨格筋由来の馬ミオグロビン(PDBコード: 1WLA)と牛由来の牛ミオグロビン(PDBコード: 1Z2S)を使い分けた(図 1.1)。何れもアミノ酸残基数 153 および分子量 17 kDa、8本の $\alpha$ -helixから成るオール $\alpha$ タンパク質であるが、アミノ酸配列に20残基の差異を有する。

1WLA: GLY LEU SER ASP GLY GLU TRP GLN **GLN** VAL LEU ASN **VAL**  
 TRP GLY LYS VAL GLU **ALA** ASP **ILE** ALA GLY HIS GLY GLN  
 GLU VAL LEU ILE ARG LEU PHE THR GLY HIS PRO GLU THR  
 LEU GLU LYS PHE ASP LYS PHE LYS HIS LEU LYS THR GLU  
 ALA GLU MET LYS ALA SER GLU ASP LEU LYS LYS HIS GLY  
**THR VAL** VAL LEU THR ALA LEU GLY GLY ILE LEU LYS LYS  
 LYS GLY HIS HIS GLU ALA GLU **LEU** LYS **PRO** LEU ALA **GLN**  
 SER HIS ALA **THR** LYS HIS LYS ILE PRO **ILE** LYS TYR LEU  
 GLU PHE ILE SER ASP ALA ILE ILE HIS VAL LEU HIS **SER**  
 LYS HIS PRO **GLY** ASP PHE GLY ALA ASP ALA GLN GLY ALA  
 MET **THR** LYS ALA LEU GLU LEU PHE ARG **ASN** **ASP** **ILE** ALA  
 ALA **LYS** TYR LYS **GLU** LEU GLY PHE **GLN** GLY

1Z2S: GLY LEU SER ASP GLY GLU TRP GLN **LEU** VAL LEU ASN **ALA**  
 TRP GLY LYS VAL GLU **THR** ASP **VAL** ALA GLY HIS GLY GLN  
 GLU VAL LEU ILE ARG LEU PHE THR GLY HIS PRO GLU THR  
 LEU GLU LYS PHE ASP LYS PHE LYS HIS LEU LYS THR GLU  
 ALA GLU MET LYS ALA SER GLU ASP LEU LYS LYS HIS GLY  
**ASN THR** VAL LEU THR ALA LEU GLY GLY ILE LEU LYS LYS  
 LYS GLY HIS HIS GLU ALA GLU **VAL** LYS **HIS** LEU ALA **GLU**  
 SER HIS ALA **ASN** LYS HIS LYS ILE PRO **VAL** LYS TYR LEU  
 GLU PHE ILE SER ASP ALA ILE ILE HIS VAL LEU HIS **ASP**  
 LYS HIS PRO **SER** ASP PHE GLY ALA ASP ALA GLN ALA ALA  
 MET **SER** LYS ALA LEU GLU LEU PHE ARG **ASN** **GLU** **MET** ALA  
 ALA **GLN** TYR LYS **VAL** LEU GLY PHE **HIS** GLY

そのため等電点が異なり、それぞれ 7.36 および 6.97 である。また、1つの heme を有する酸素の貯蔵タンパク質であり、heme と 2つのヒスチジン残基で酸素分子を保持することが可能である。ミオグロビンはタンパク質の標準試料として様々な研究で利用されているため、先行研究と比較する上で有用である。それに加え、ミオグロビンはいくつかの変性条件でアミロイド線維様の凝集を形成す

ることが知られている(Fändrich et al., 2003)。そのため、アミロイド疾患に対する糖の効果を推測することが可能であり、これも本研究でミオグロビンを対象とした理由の一つでもある。

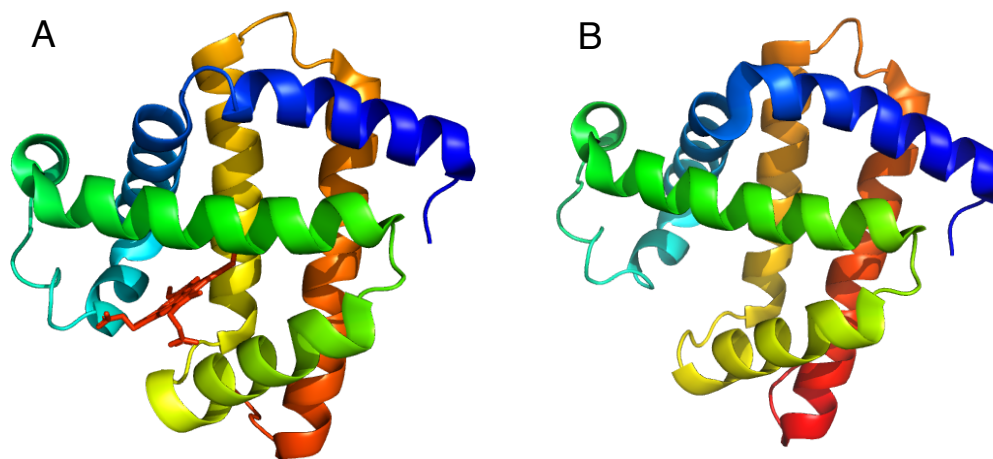


図 1.1. 本研究で用いたミオグロビンの立体構造。

A: 馬ミオグロビン(1WLA)、B: 牛ミオグロビン(1Z2S)。1WLA は X 線結晶構造解析から得られた立体構造であるが、1Z2S は理論的に想定される理論構造であるため heme が描写されていない。描写ソフトウェアには Schrodinger 社製の PyMOL を利用した。

### 1.1.5 アミロイド線維

アミロイド線維はヒトの沈着物からはじめて発見された線維状タンパク質であり、アミロイドと総称されるモノマータンパク質の水素結合によって形成される(後藤, 2009)。このアミロイド線維の沈着を伴う疾患をアミロイドーシスと呼び、アミロイド線維が疾患の原因ではないかと考えられている。病原性のアミロイドの多くはクロス $\beta$ と呼ばれる $\beta$ シートのヘアピン構造を持ち、それらが水素結合によってスタッキングし伸長することで線維が形成される。社会的に問題となっているアルツハイマー病がこのアミロイドーシスの一種であるため、アミロイド線維は医学や生物学の分野で特に注目されている。2001 年になると Dobson らによって、一般的な球状タンパク質であるミオグロビンでもアミロイド線維様の凝集体を形成することが明らかとされた(Fändrich et al., 2001)。その後、平井らによって溶液中におけるアミロイド線維の構造解析が X 線広角散乱法を用いて行われた(Onai et al., 2007)。本論文ではこれらの先行研究に基づき、ミオグロビンのアミロイド線維形成に対する糖の効果を溶液散乱法を用いて検討した。

### 1.1.6 本研究で用いた糖の性質

本項では、本研究で用いた糖であるトレハロース、スクロース、グルコース、フルクトースについて述べる。図 1.2 にそれぞれの化学構造式を示す。トレハロースおよびスクロースは何れも  $C_{12}H_{22}O_{11}$  で表される非還元性二糖であり、構造異性体の関係にある。それぞれの呼称は類似した異性体を含んでいるため、本論文では最も一般的な異性体である  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside をトレハロース(図 1.2A)、 $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside をスクロース(図 1.2B)とする(Brown et al., 1972; Levi and Purves, 1949)。トレハロースはグルコース 2 分子から成る二糖で、高い環境耐性を持つ生物が選択的に合成することから注目されており、他の二糖や単糖との物理化学的性質の差異が詳細に検討されてきた(Crowe et al., 1996)。特に、同じ非還元性の二糖であり、グルコースとフルクトースから成るスクロース(図 1.2B)と比較される。スクロースでは無水結晶が最も安定であるのに対し、トレハロースは二水和物結晶が最安定である(Sussich et al., 1998)。両者とも水溶性であるが、トレハロースはスクロースに比べて溶解度が低く、水溶液中での水和数が多いことが知られている(Miller et al., 1997)。この傾向は、トレハロース水溶液が他の糖溶液と異なり凍結乾燥や噴霧乾燥といった種々の乾燥方法によって容易にガラス化する要因として考えられている。また、スクロース結晶は単糖残基間で分子内水素結合を形成するが、トレハロース結晶は分子内水素結合を形成しない(Ekdawi-Sever et al., 2001)。FTIR とラマン分光による研究では、糖濃度の増加に伴う水和水の欠乏の結果、スクロースが折りたたまれて分子内水素結合を作るのに対し、トレハロースでは折りたたみが生じないことも明らかにされている(Kaucurakova and Mathlouthi, 1996)。トレハロースが水分子と強く相互作用する結

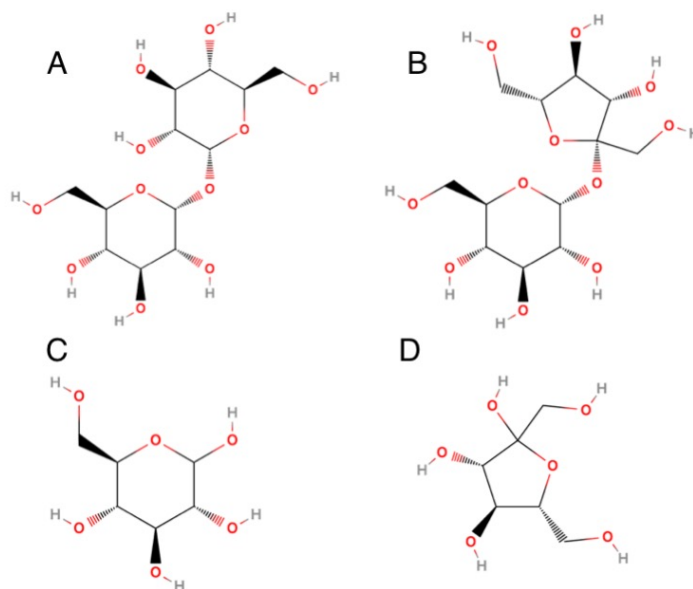


図 1.2. 本研究で用いた糖の化学構造

A: トレハロース、B: スクロース、C: グルコース(グルコピラノース)、D: フルクトース(フルクトピラノース)。結晶構造の CSD コードはそれぞれ、DEKYEX01、SUCROS13、GLUCSA、FRUCTO。

果、トレハロースを中心とする水和構造は他の糖に比べて大きくなる。実際に、粘度測定によってトレハロース溶液の濃度当たりの粘度が、単糖や二糖の 2.5 倍に達することが示されている(Sola-Penna and Meyer-Fernandes, 1998)。マイクロ波-テラヘルツ-遠赤外線における広帯域誘電分光法による研究では、糖分子周囲の水分子の配向させる作用についてもスクロース溶液に比べてトレハロース溶液で大きくなることが示された(Shiraga et al., 2017)。

本研究で用いた単糖であるグルコースとフルクトースは、何れも炭素数 6 の一般的な単糖であり( $C_6H_{12}O_6$ )、溶液中では直鎖構造と環状構造の平衡混合物として存在する(マッキー・マッキー, 2010)。図 1.2C 及び図 1.2D には主要な結晶構造であるグルコピラノース(六員環構造)およびフルクトフラノース(五員環構造)の化学構造式を示す。グルコースは 25°Cの水溶液中において直鎖型が 0.02% 存在する。この開環した直鎖型はアルデヒドの一種であり、生体高分子に対する糖化反応を生じ得る(Bunn and Higgins, 1981)。フルクトースは果糖とも呼ばれ、溶解性が高いため液糖と呼ばれることもある。水溶液中では一般に五員環のフラノースとして存在し、グルコースに比べて反応性が高い上に長い代謝経路を必要とする。そのため糖化反応が生じやすく、血中における毒性が高いと考えられている(Mcpherson et al., 1988)。

1.1.2 項で述べたように、溶質がタンパク質表面から排除されることでタンパク質構造が安定化すると考えられているが、溶質とタンパク質との反発的相互作用が大きくなると、タンパク質の溶解度が減少して凝集が促進される。これは、PEG 水溶液中でタンパク質の凝集沈殿(Atha and Ingham, 1981)や結晶化(Mcpherson, 1985)が生じることから明らかである。トレハロースは単糖や二糖の中では高い親水性を持つが、PEG 等の親水性高分子に比べれば分子量も小さく、排除傾向も小さい。多種多様な溶質のカオトロープ性(水分子間相互作用を弱める作用)及びコスモトロープ性(水分子間相互作用を強める作用)の統一的な評価を試みた研究では、トレハロースは単糖及び二糖の中で最大のコスモトロープ性を示すが、PEG に比べると 1/3~1/12 であることが報告されている(Cray et al., 2013)。このバランスの取れた親水性が、トレハロースを優秀な生体保護物質として確立させている要因の一つだと推測できる。

## 1.2 研究目的及び本論文の構成

本研究の目的は、放射光と中性子を用いた溶液散乱実験により、糖溶液中における水和を介したタンパク質保護作用のメカニズムを構造学的に証明するとともに、アミロイド線維形成を含めたタンパク質の変性凝集に対する糖の作用を分子レベルで構造学的に解明することである。水和を介した糖による保護作用については、熱測定や分光測定から得られるバルクの物性値によって議論されており、複数の仮説が提唱されていた。そこで本研究では、溶液散乱法を用いることで、糖溶液中のタンパク質水和殻を直接観測し、糖によるタンパク質保護作用仮説を構造学的に証明した。また、実際のタンパク質変性に対する糖の作用については、タンパク質の内部構造や二次構造に着目した研究や、アミロイド線維

形成に対する糖の効果を構造学的に議論した研究は乏しい。そこで本研究では、溶液散乱法を用いて、タンパク質の分子内構造に対する糖の効果を溶液中で観測するとともに、アミロイド線維形成に対する糖の効果を構造学的に検討した。

本博士論文は、第1章に序論を、第2章に実験手法を、第3章から第5章に実験結果と考察を、そして第6章に本博士論文の総括を記す。第1章の序論では、糖による生体保護作用の概要を述べ、特にタンパク質に対する糖の保護作用について既知の事実をまとめた。さらに、本研究で研究対象としたミオグロビン及びアミロイド線維について解説し、本研究で注目した糖であるトレハロースについて詳細に述べた。第2章では、研究の中心的手法として用いた溶液散乱実験法の概要について述べる。溶液散乱実験には放射光及びパルス中性子を用いたため、使用した共同利用についても端的に説明する。また、散乱実験の解析には公開プログラムを用いた理論散乱関数のシミュレーションを利用しており、このプログラムの計算理論についても説明する。シミュレーションの実施には糖溶液の散乱密度を質量密度から計算する必要があるため、質量密度の測定に振動式密度計を用いた。この振動式密度計の原理についても簡単に説明した。

第3章では、二糖であるトレハロースと単糖であるグルコースを用い、これらの糖溶液中でタンパク質水和殻を溶液散乱によって観測した。X線散乱実験では、糖の添加によるコントラスト変化が実験結果へ影響するため、理論散乱関数のシミュレーション結果と比較することで解析を行った。中性子散乱実験では、重水素化グルコースを用いてX線散乱で生じるコントラスト変化を避け、タンパク質水和殻の散乱コントラストを直接評価した。

第4章では、第3章で得られたトレハロースとグルコースによる差異が、糖の重合度だけに依存するのか確認するため、二糖であるスクロースと単糖であるフルクトースを加えて同様の実験を行った。それに加え、塩酸グアニジンによる化学変性、及び高温での熱変性に対する等による保護作用を検討した。ここではX線広角散乱の特徴を活用し、タンパク質の内部構造や二次構造に対する糖の効果を構造学的に検討した。

第5章では、第4章で検討した変性の抑制作用ではなく、変性凝集からの糖による回復作用を検討した。変性条件には低pHによる酸変性を用い、ミオグロビン酸変性によって生じたアミロイド様凝集がトレハロースの添加によって解離し、天然構造へリフォールドされる現象を構造学的に解析した。

第6章では、これらの研究結果を総括し、今後の展開について述べる。

## 第2章 実験手法

### 2.1 X線溶液散乱法

#### 2.1.1 放射光

本項では佐々木氏らによる著書を参考にした(佐々木・石井, 1986)。光速度に極めて近い速さの電子や陽電子が、磁場中においてローレンツ力で曲げられるとき、電磁波(放射光)を発生する。この現象はシンクロトロン放射と呼ばれ、1947年に初めて確認された。放射光は電子軌道の接線方向に高輝度で鋭い指向性を持った強力な白色光であり、紫外線領域からX線領域に渡って従来の実験室系光源に比べて桁違いの輝度を持つビームが得られる。この放射光を得るために、加速された電子を長時間一定のエネルギーで周回させる装置が蓄積リングである)。蓄積リングの内部は超高真空に保たれており、線形加速器によって入射された加速電子を偏光磁石によって向きを変えることで円形軌道に蓄積する。蓄積リングから発生した放射光は、ビームラインによって実験ハッチに導かれる。本研究では、大学共同利用法人・高エネルギー加速器研究機構(KEK)-物質構造化学研究所(IMSS)に設置された Photon Factory の BL-10C(図 2.1)と、公益財団法人高輝度光科学研究センター(JASRI)/理化学研究所(RIKEN)に設置された SPring-8 の BL-40B2(図 2.2)を利用した。

Photon Factory では電子を 2.5 GeV に加速し、周長 187 m の蓄積リングを周回させている(床次, 1985)。BL-10C では、発生した白色放射光は二結晶モノクロメータで単色化され、湾曲円筒集光ミラーによってサンプル位置に焦点を合わせられる。湾曲集光ミラーからサンプルまでには 2 つのスリットが存在し、サンプルに照射される X 線は縦 2mm 以下、横 10mm 以下に絞り込まれる。X 線強度をモニターするため、ビーム上流とサンプル直前にイオンチェンバーが、サンプル後方のビームストッパーに半導体 X 線検出器が設置されている。散乱実験の検出器には半導体二次元検出器 PILATUS3 2M(Dectris 社製)を、サンプルホルダーの温度調節には mK2000(Instec 社製)を使用した。カメラ長は 200~3000 mm、波長は 0.86~1.91 Å に可変できる。

SPring-8 では電子を 8.0 GeV に加速し、周長 1436 m の蓄積リングを周回させている(原, 2002)。BL-40B2 でも基本的な設備は PF BL-10C と同様であるが、入射 X 線を 0.1×0.1mm 以下に成形しており、極小さいサンプルでも散乱測定が可能である。検出器にはイメージングプレート R-axis IV(RIGAKU 社製)及び PILATUS3 2M(Dectris 社製)を利用した。カメラ長は 200~4000 mm、波長は 0.71~1.91 Å に可変できる。

測定には厚さ 1 mm、容量 70 μL のステンレス製の溶液セルを用いた。表裏の X 線入射窓には 20 μm の石英薄膜を接着した。

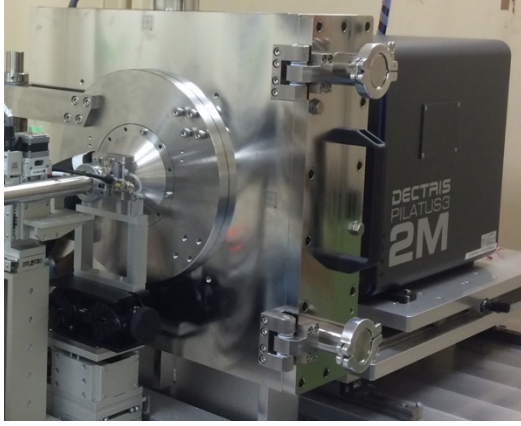


図 2.1. PF BL-10C の検出器及び試料ホルダー

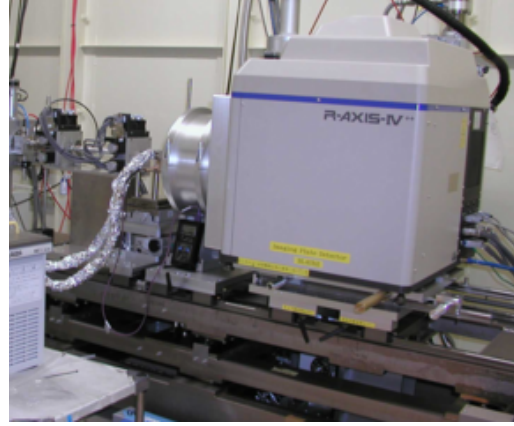


図 2.2. SPring-8 BL-40B2 の検出器及び試料ホルダー

## 2.1.2 X 線散乱理論

本項は小泉将治氏の博士論文を参考とした(小泉, 2006)。多数の電子を含む系で、電子による X 線散乱を考える。任意の原点  $O$  と任意の点  $k$  を与え、その位置ベクトルを  $\mathbf{r}_k$  と置き、入射 X 線の単位ベクトルを  $\mathbf{s}_0$ 、散乱角  $2\theta$  の散乱 X 線の単位ベクトルを  $\mathbf{s}$  とすると、その光路差は  $\mathbf{r}_k \cdot (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)$  で与えられる。X 線の波長を  $\lambda$  とすると、光路差を位相差  $\Phi_k$  に変換することができる。

$$\Phi_k = \frac{2\pi \mathbf{r}_k \cdot (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)}{\lambda} \quad (2.1)$$

ここで  $\frac{(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)}{\lambda}$  を散乱ベクトル  $\mathbf{q}$  として以下に定義する。

$$\mathbf{q} = \frac{(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)}{\lambda}, \quad |\mathbf{q}| = q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (2.2)$$

位相差  $\Phi_k$  を用いて点  $k$  からの散乱振幅  $E_k$  を表すと、

$$E_k = E_e f_k \exp[-i(\omega t + \Phi_k)] \quad (2.3)$$

$E_e$  は電子一つによる散乱振幅、 $f_k$  は点  $k$  の散乱因子(構成電子数に相当)、 $\omega$  は入射 X 線の角振動数である。この式を用いて散乱波の振幅  $E_t$  を表すと、

$$E_t = \sum_k E_k \exp(-i\omega t) \left[ \sum_k f_k \exp(-i\Phi_k) \right] = E_e A(\mathbf{q}) \exp(-i\omega t) \quad (2.4)$$

ここで  $A(\mathbf{q})$  は系の構造振幅である。

$$A(\mathbf{q}) = \sum_k f_k \exp(-i\Phi_k) \quad (2.5)$$

系の散乱強度  $I(\mathbf{q})$  は  $A(\mathbf{q})$  とその共役複素関数  $A^*(\mathbf{q})$  の積で与えられる。多くの場合は散乱体の無配向性や等方的分布により、 $I(\mathbf{q})$  を  $\mathbf{q}$  空間での平均  $I(q)$  とし、 $I(q) = \langle I(\mathbf{q}) \rangle$  として取り扱う。従って系の散乱強度は、

$$I(q) = I_e \langle A(\mathbf{q}) \cdot A^*(\mathbf{q}) \rangle = I_e |A(\mathbf{q})|^2 \quad (2.6)$$



ここで $I_e$ は電子一つによる散乱強度である。電子が連続して分布する系においては、構造振幅を積分系に置き換えることができる。体積 $dv_k$ における電子密度分布を $\rho(\mathbf{r}_k)$ とすれば、点 $k$ 及び系からの振幅は、

$$f_k = \rho(\mathbf{r}_k)dv_k$$

$$A(\mathbf{q}) = \int_{v_k} \rho(\mathbf{r}_k) \exp[-i(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_k)] dv_k \quad (2.7)$$

この式より系の散乱強度を示すと、

$$\begin{aligned} I(q) &= I_e |A(\mathbf{q})|^2 \\ &= I_e \left\langle \int_{v_k} \rho(\mathbf{r}_k) \exp[-i(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_k)] dv_k \cdot \int_{v_j} \rho(\mathbf{r}_j) \exp[-i(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j)] dv_j \right\rangle \\ &= I_e \left\langle \int_k \int_j \rho(\mathbf{r}_k) \rho(\mathbf{r}_j) \exp[-i(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_{kj})] dv_k dv_j \right\rangle, \quad (\mathbf{r}_{kj} = \mathbf{r}_k - \mathbf{r}_j) \quad (2.8) \end{aligned}$$

ここで散乱密度(電子密度) $\rho(\mathbf{r}_{kj})$ に対し、その自己相関関数 $\gamma(\mathbf{r}_{kj})$ を定義すると、

$$\gamma(\mathbf{r}_{kj}) = \rho(\mathbf{r}_{kj}) * \rho(-\mathbf{r}_{kj}) = \int_{v_j} \rho(\mathbf{r}_j) \rho(\mathbf{r}_j + \mathbf{r}_{kj}) dv_j \quad (2.9)$$

(\*: コンボリューション)

さらに、 $\mathbf{r}_{kj} \equiv \mathbf{r}$ として式(2.10)を用いて式(2.9)を書き換えると、

$$\begin{aligned} I(q) &= I_e \left\langle \int_v \left\{ \int_{v_j} \rho(\mathbf{r}_l + \mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}_j) dv_j \exp[-i(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r})] \right\} dv \right\rangle \\ &= I_e \left\langle \int_v \gamma(\mathbf{r}) \exp[-i(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r})] dv \right\rangle \quad (2.10) \end{aligned}$$

従って散乱強度 $I(\mathbf{q})$ は、散乱体の散乱密度分布 $\rho(\mathbf{r})$ の自己相関関数 $\gamma(\mathbf{r})$ のフーリエ変換像に対応していることが分かる。溶液散乱法によって得られる情報は散乱強度 $I(\mathbf{q})$ の空間平均で与えられるため、

$$\begin{aligned} I(q) &= \langle I(\mathbf{q}) \rangle \\ &= \int_{V_k} \int_{V_j} \rho(\mathbf{r}_k) \rho(\mathbf{r}_j) \langle \exp(i\mathbf{q} \cdot |\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_j|) \rangle dV_k dV_j \\ &= \int_{V_k} \int_{V_j} \rho(\mathbf{r}_k) \rho(\mathbf{r}_j) \frac{\sin(qr_{kj})}{qr_{kj}} dV_k dV_j \quad (2.11) \end{aligned}$$

となり、この式を Debye の式と呼ぶ。

## 2.1.2 コントラスト

本項は岩瀬裕希氏の博士論文を参考にした(岩瀬, 2002)。真空中の溶質粒子の散乱密度分布を $\rho_s(\mathbf{r})$ とすると、次のように平均散乱密度 $\bar{\rho}$ と平均からのゆらぎの項に分けて表すことが可能である。

$$\rho_s(\mathbf{r}) = \bar{\rho}\rho_v(\mathbf{r}) + \rho_f(\mathbf{r}) \quad (2.12)$$

$\rho_v(\mathbf{r})$ は溶質粒子の形状を表す散乱密度関数であり、溶質粒子内部では 1、それ以外では 0 となる。 $\rho_f(\mathbf{r})$ は平均からのゆらぎを表す関数である。ここで、溶液中における溶質粒子の有効散乱密度 $\rho(\mathbf{r})$ は次のように表される。

$$\begin{aligned} \rho(\mathbf{r}) &= (\bar{\rho} - \rho_{solv})\rho_v(\mathbf{r}) + \rho_f(\mathbf{r}) \\ &= \Delta\rho\rho_v(\mathbf{r}) + \rho_f(\mathbf{r}) \end{aligned} \quad (2.13)$$

$\rho_{solv}$ は溶媒の平均散乱密度、 $\Delta\rho$ は溶質粒子と溶媒の平均散乱密度の差であり、これを「コントラスト」と呼ぶ。従って、糖の添加により溶媒の平均散乱密度が増加するとコントラストは減少するため、散乱曲線を解析する際にコントラスト変化の寄与を考慮する必要がある(図 2.3)。

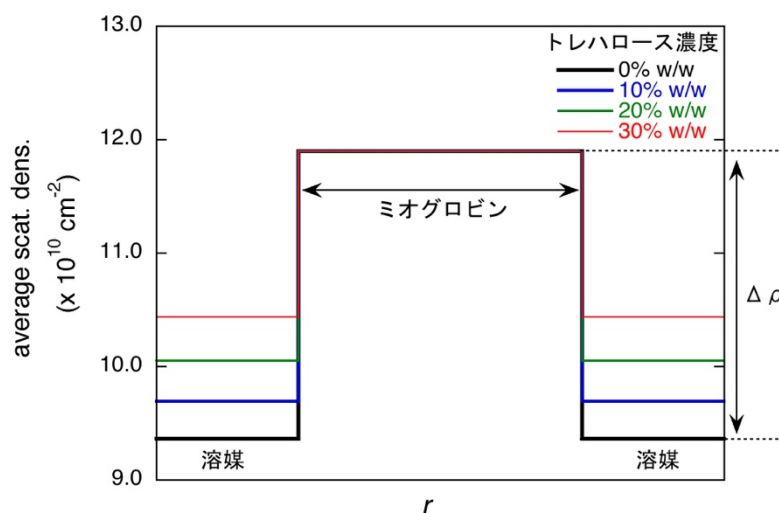


図 2.3 X 線に対するミオグロビンのコントラストのトレハロース濃度依存性。

## 2.1.3 X 線広角散乱法における一次処理

上で述べたように溶質粒子の構造情報は、溶媒と溶質粒子の散乱密度の差(コントラスト)によって与えられる。従って溶液散乱法では、溶質粒子を含んだ溶液の散乱から溶媒の散乱を差し引く(バックグラウンド処理)必要がある。生体試料の構造解析には  $q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$  の範囲を測定する X 線小角散乱法(small-angle X-ray scattering, SAXS)が一般的に利用され、溶質粒子の排除体積を考慮したバックグラウンド処理が行われる(Feigin and Svergun, 1987)。本研究では  $0.04 \text{ \AA}^{-1} < q < 2.0$

$\text{\AA}^{-1}$  の X 線広角散乱(wide-angle X-ray scattering, WAXS)を利用したため、測定領域に水の分子相関ピークが観測される。この水分子相関ピークは強度が高いだけでなく温度や塩濃度等に敏感であり(図 2.4)、高角領域のバックグラウンド処理を困難にしている。そこで、平井らが考案した方法を用いて X 線広角散乱データのバックグラウンド処理を行った(Hirai et al., 2002))。

$$I(q) = \frac{1}{I_{peak}^{sol}} \left[ \frac{I_{sol}(q)}{B_{sol}T_{sol1}} - \frac{I_{cell}(q)}{B_{cell}T_{cell}} \right] - \frac{(1 - cv_a)}{I_{peak}^{solv}} \left[ \frac{I_{solv}(q)}{B_{solv}T_{solv}} - \frac{I_{cell}(q)}{B_{cell}T_{cell}} \right] \quad (2.14)$$

$I(q)$ 、 $I_{sol}(q)$ 、 $I_{solv}(q)$ はそれぞれ溶質、溶液、溶媒の散乱強度である。 $c$ 及び $v_a$ は溶質濃度及び偏比容、 $I_{peak}^{sol}$ 、 $I_{peak}^{solv}$ は溶液及び溶媒の水分子ピークの散乱強度、 $T_{sol}$ 、 $T_{solv}$ 、 $T_{cell}$ はそれぞれ溶液、溶媒、試料セルの X 線透過率、 $B_{sol}$ 、 $B_{solv}$ 、 $B_{cell}$ はそれぞれの入射ビーム積分強度である。

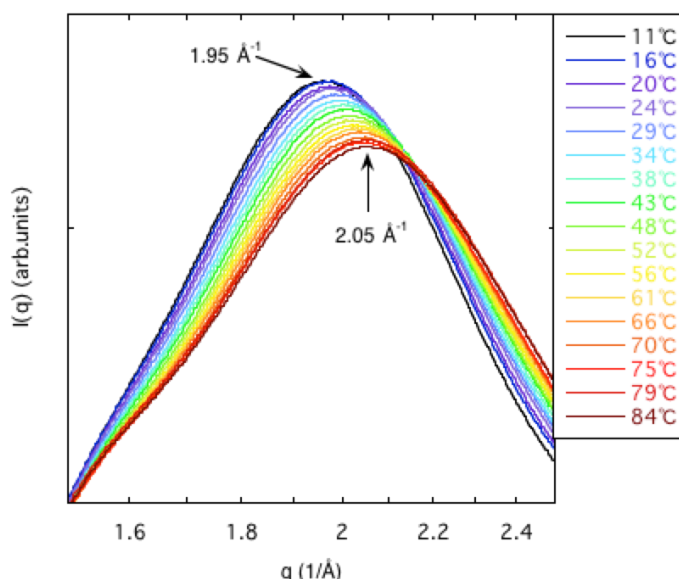


図 2.4 X 線広角散乱で観測される水の分子相関ピークの温度依存性

## 2.1.4 Guinier 解析

本項は小泉将治氏の博士論文を参考とした(小泉, 2006)。散乱体の散乱強度は式(2.10)で与えられている。ここで $q$ が非常に小さい場合を考えると、次のように近似できる。

$$\begin{aligned} \frac{\sin(qr_{12})}{qr_{12}} &= 1 - \frac{(qr_{12})^2}{6} + \frac{(qr_{12})^4}{120} + \dots \\ &= 1 - \frac{(qr_{12})^2}{6} \end{aligned} \quad (2.15)$$

この式を式(2.11)に代入すると散乱強度 $I(q)$ は次のように得られる。

$$\begin{aligned}
I(q) &= \int_{V_1} \int_{V_2} \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2) \left[ 1 - \frac{(qr_{12})^2}{6} \right] dV_1 dV_2 \\
&= \left| \int_V \rho(\mathbf{r}) dV \right|^2 - \frac{q^2}{6} \int_{V_1} \int_{V_2} \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2) r_{12}^2 dV_1 dV_2 \quad (2.16)
\end{aligned}$$

ここで角度  $0^\circ$  における散乱強度  $I(0)$  及び散乱体の回転半径  $R_g$  は以下のように定義される。

$$I(0) = \left| \int_V \rho(\mathbf{r}) dV \right|^2 \quad (2.17)$$

$$R_g^2 = \frac{\int_{V_2} \int_{V_1} \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2) r_{12}^2 dV_1 dV_2}{2 \int_{V_2} \int_{V_1} \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2) dV_1 dV_2} \quad (2.18)$$

式(2.17)及び式(2.18)を式(2.16)に代入すると、

$$I(q) = I(0) \left( 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} \right) \quad (2.19)$$

さらに、

$$\begin{aligned}
\exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) &= 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} + \frac{q^4 R_g^4}{18} - \dots \\
&= 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} \quad (2.20)
\end{aligned}$$

これより、 $q$  が非常に小さい領域で  $I(q)$  は次のように近似できる。

$$I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (2.21)$$

これを Guinier 近似と呼ぶ(Guinier et al., 1955; 角戸・笹田, 1993)。この近似により、 $\ln I(q)$  を  $q^2$  に対してプロット(Guinier プロット)することで直線の勾配から回転半径  $R_g$  を求めることができる。なお、Guinier 近似が成立する領域は、 $qR_g < 1.3$  が目安とされている(Feigin and Svergun, 1987)。

また、回転半径  $R_g$  はコントラスト  $\Delta\rho$  を用いて次のように表すことができる(岩瀬, 2002)。

$$R_g^2 = R_v^2 + \frac{\alpha}{\Delta\rho} - \frac{\beta}{\Delta\rho^2} \quad (2.22)$$

$R_v$  は溶質粒子の幾何学的回転半径である。これより、 $R_g^2$  を  $1/\Delta\rho$  に対してプロットすることで切片より  $R_v$ 、傾きから  $\alpha$ 、曲率から  $\beta$  を求めることができる(Stuhrmann プロット)。幾何学的回転半径  $R_v$  は粒子内の散乱密度が均一であると仮定した場合の回転半径であり、粒子のサイズのみ依存する。 $\alpha$  は散乱密度のゆらぎに関連し、粒子の外側の散乱密度が内側より大きい場合に正の値を、逆の場合は負の値となる。 $\beta$  は散乱密度分布の重心と幾何学的重心のずれに基づき、2つの重心が一致する場合は 0 となる(岩瀬, 2002)。

### 2.1.5 距離分布関数による解析

本項は小泉将治氏の博士論文を参考とした(小泉, 2006)。式(2.5)及び式(2.6)から、コンポリューションの Fourier 変換定理により散乱強度 $I(\mathbf{q})$ は以下のようにも表すことができる。

$$I(\mathbf{q}) = \int_{V_1} \int_{V_2} \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r} + \mathbf{r}_1)\exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r})dV_1dV_2 \quad (2.23)$$

ここで自己相関関数 $\gamma(\mathbf{r})$ は、

$$\gamma(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) * \rho(-\mathbf{r}) = \int_V \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r} + \mathbf{r}_1)dV \quad (2.24)$$

と定義されるので、(2.21)式に代入すると、

$$I(\mathbf{q}) = \int_V \gamma(\mathbf{r})\exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r})dV \quad (2.25)$$

となり、散乱強度 $I(\mathbf{q})$ と自己相関関数 $\gamma(\mathbf{r})$ が Fourier 変換の関係にあることが分かる。溶液散乱法では散乱体の時間・空間平均された情報が得られるので、(2.25)式を空間平均すると、

$$I(q) = 4\pi \int_0^\infty r^2\gamma(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dq \quad (2.26)$$

また、自己相関関数 $\gamma(\mathbf{r})$ は(2.26)式を逆 Fourier 変換することで、

$$\gamma(\mathbf{r}) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq \quad (2.27)$$

と求まる。この自己相関関数 $\gamma(\mathbf{r})$ に球殻の重み( $4\pi^2$ )をかけると距離分布関数 $p(r)$ が得られる。

$$\begin{aligned} p(r) &= 4\pi^2\gamma(\mathbf{r}) \\ &= \frac{1}{\pi} \int_0^\infty qrI(q) \sin(qr) dq \quad (2.28) \end{aligned}$$

距離分布関数 $p(r)$ は、散乱体粒子の形状と内部の散乱密度分布を反映する。散乱体粒子の最大径を $D_{\max}$ とすると、原理的には $r = D_{\max}$ で $p(r) = 0$ となるので、粒子の最大径 $D_{\max}$ を求めることができる。また距離分布関数の解析では、散乱密度 $\rho(\mathbf{r})$ の自乗の情報しか得られないが、散乱体粒子の散乱振幅または位相を仮定することによって、散乱密度分布(動径密度分布関数)を求めることができる。距離分布関数 $p(r)$ を求める際には、全 $q$ 空間( $0 < q < \infty$ )の散乱強度が要求されるが、実際の測定では分解能が存在するため補正が必要になる。小角分解能未満の

ビームストッパーによる欠損部分は Guinier プロットによる外挿値を利用することが一般的であり、本研究でもこの方法を用いた。また、高角分解能以降のデータ打ち切りによるリップルを避けるために次式を用いた。

$$I'(q) = I(q)\exp(-kq^2) \quad (2.29)$$

$k$ は補正強度(dumping factor)である。距離分布関数 $p(r)$ の規格化には次の全散乱強度を用いた。

$$I_{\text{total}} = \int_0^{D_{\text{max}}} p(r)dr \quad (2.30)$$

また、回転半径 $R_g$ を距離分布関数 $p(r)$ によって表すことができる。

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\text{max}}} p(r)r^2 dr}{2 \int_0^{D_{\text{max}}} p(r)dr} \quad (2.31)$$

式(2.31)は式(2.18)式と同等であり、式(2.31)から回転半径 $R_g$ を求める方法を Glatter 法と呼び、Guinier プロットと比べて計算に利用するデータ数が多く、統計精度の良い結果が得られる(Glatter and Kratky, 1982)。さらに、Guinier 領域に現れる粒子間相互作用や凝集等の影響を受け難いことが知られている。

### 2.1.6 転移多状態解析法

転移多状態解析法(transition-multiplicity analysis, TMA 法)は、平井らによって考案された生体分子の構造転移における多状態性の評価法である(Hirai et al., 1999)。TMA 法による熱転移の解析は次式を用いる。

$$\Delta = \sum_{q=q_1}^{q_2} \left| \frac{I(q, T)}{\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T)} - \left\{ \alpha \frac{I(q, T_N)}{\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T_N)} + (1 - \alpha) \frac{I(q, T_U)}{\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T_U)} \right\} \right| \quad (2.32)$$

$T_N$ 、 $T_U$ は、天然状態(native state,  $N$ )及び変性状態(unfolded state,  $U$ )の温度であり、 $I(q, T_N)$ 、 $I(q, T_U)$ はその温度における散乱曲線である。 $I(q, T)$ が対象の散乱曲線であり、 $q_1 < q < q_2$ の領域で解析を行う。 $\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T)$ 、 $\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T_N)$ 、 $\sum_{q=q_1}^{q_2} I(q, T_U)$ はそれぞれの規格化因子である。系の熱構造転移が  $N$  状態と  $U$  状態の二状態モデルに則るとすれば、中間温度 $T$ では  $N$  状態と  $U$  状態の両方が存在すると仮定でき、このときの  $N$  状態のモル分率を $\alpha$ とする。deviation factor  $\Delta$ は解析対象の散乱曲線と二状態モデルによる散乱曲線とのずれ因子であり、 $\Delta$ が最小となるように $\alpha$ を最適化することで、 $\Delta$ と $\alpha$ を求める。二状態モデルに従うのであれば $\Delta$ は小さくなり、従わなければ $\Delta$ は大きな値をとる。実際の解析では、 $T_N$ を測定における最低温度(常温)、 $T_U$ を最高温度(構造転移後の温度)として計算を行う。式(2.29)は熱転移に対応したものであるが、温度 $T$ の代わりに変性剤濃度や pH を用いることで種々の要因による構造転移の多状態性解析が可能である。

WAXS データに TMA 法を用いる場合、一般に $q$ 領域を指定して解析を行う (Hirai et al., 2002)。これは WAXS の観測領域に生体分子の階層構造情報が含まれるためである。タンパク質を例に挙げると、水和殻を含めた外形、内部ドメインの相関、ドメイン構造、二次構造の情報がそれぞれの $q$ 領域に観測される(図 2.5)。ミオグロビンのような小型の球状タンパク質から得られる WAXS 曲線は、(A)  $0.04 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ : 水和シェル及び分子外形、(B)  $0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ : ドメイン相関及び二次構造の遠距離相関、(C)  $0.5 \text{ \AA}^{-1} < q < 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ : ドメイン内の二次構造の相関、(D)  $1.0 \text{ \AA}^{-1} < q < 2.0 \text{ \AA}^{-1}$ : 二次構造自体と側鎖のパッキング、といった階層構造情報が得られる。この領域別に TMA 法による解析を行うことで、階層構造別に構造転移状態の解析が可能となる。

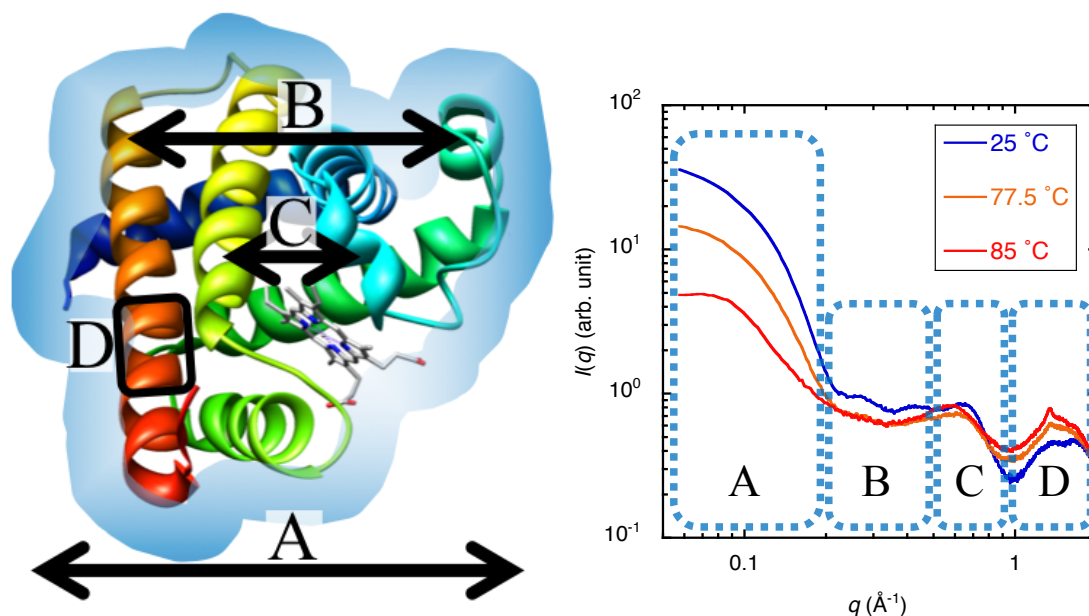


図 2.5. ミオグロビン構造(左)及び WAXS 散乱曲線とその対応領域(右)  
A: 分子外形及び水和殻、B: ドメイン相関、C: 二次構造相関、D: 二次構造領域

## 2.2 中性子溶液散乱法

### 2.2.1 パルス中性子源

本項は星埜氏らの著書および新村氏の総説を参考にした(星埜 et al., 1976; 新村, 1974)。中性子は、磁気モーメントは持つが電荷を持たない粒子である。そのため中性子線は高い透過性を有し、強力な非破壊プローブとして利用されている(星埜 et al., 1976)。中性子源には大別して原子炉と加速器(パルス中性子源)がある。本研究では日本唯一のパルス中性子源である大強度陽子加速器施設(J-

PARC)–物質・生命科学実験施設(MLF)を利用した。パルス中性子源からは白色中性子が得られるため、中性子の飛行時間から波長を求める飛行時間法(time of flight method, TOF 法)が利用される(新村, 1974)。パルス中性子が発生した時刻を  $t = 0$  [s]、減速材から測定試料までの距離を  $L_0$  [m]、測定試料から検出器までの飛行距離を  $L_1$  [m]、全飛行距離を  $L = L_0 + L_1$  [m] とする。このとき、 $\Delta t$  秒後に検出された中性子の波長[Å]は次式で表される。

$$\begin{aligned}\lambda &= \frac{h}{mv} \\ &= \frac{h \cdot \Delta t}{m \cdot L} \\ &= 3965 \left( \frac{\Delta t}{L} \right) \quad (2.33)\end{aligned}$$

$h$ はプランク定数、 $m$ は中性子の質量( $1.675 \times 10^{-27}$  kg)である。

本研究で利用した J-PARC–MLF は、249m の線形加速器と 3GeV シンクロトロンで陽子を加速し、水銀ターゲットに照射することで中性子を発生させる(池田, 2012)。発生した中性子はモデレーターを通過することで減速される。ビームラインには BL-15 TAIKAN 利用した。現在 TAIKAN には超小角、小角、中角、高角、背角それぞれの検出器が設置されているため測定範囲は  $0.005 < q < 18 \text{ \AA}^{-1}$  に及ぶ(Iwase et al., 2018)。測定には既設の試料交換機を利用し、試料セルには厚さ 1 mm の石英セルを用いた。

## 2.2.2 中性子弾性散乱

入射した中性子は試料を構成する原子の原子核と相互作用し、散乱する(星埜 et al., 1976)。中性子の散乱には中性子と散乱体の間でエネルギーのやり取りがない弾性散乱(elastic scattering)と、エネルギーのやり取りがある非弾性散乱(inelastic scattering)がある。非弾性散乱は主にダイナミクスの解析に利用される。本研究で行った中性子小角散乱法は、小角領域の弾性散乱を用いて構造解析を行う手法である。小角散乱の原理については X 線と同様であるためここでは省略し、本項では鍛冶東海氏の総説を参考に中性子弾性散乱について説明する(鍛冶・新村, 1983)。

中性子弾性散乱における原子の散乱能を中性子散乱長と言い、元素と同位体に固有である。中性子弾性散乱にはポテンシャル散乱と共鳴散乱の二種類があり、ポテンシャル散乱は散乱体(散乱ポテンシャル)による中性子の散乱で、共鳴散乱は中性子が原子核と複合核を作った後に再度中性子が放出される散乱現象である。両散乱過程を含んだ中性子散乱長  $b$  は次式で表される。

$$b = a + \frac{\Gamma_n}{E - E_r + i\Gamma} \quad (2.34)$$

第一項の  $a$  がポテンシャル散乱によるもので、原子核の半径とほぼ等しい。第二項が共鳴散乱による項で、 $E_r$  は共鳴エネルギー、 $\Gamma$  は複合核が崩壊する確率、 $\Gamma_n$  は種々の崩壊過程の中で中性子の放出を伴う崩壊の確率である。また、弾性散乱



には干渉性散乱(coherent scattering)と非干渉性散乱(incoherent scattering)が含まれる。N個の同一原子からなる系の中性子散乱の散乱断面積は次式で表され、

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \left| \sum_j^N b_j \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) \right|^2 \quad (2.35)$$

次のように書き換えられる。

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = N\langle b \rangle^2 \left| \sum_j \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) \right|^2 + N\langle (b - \langle b \rangle)^2 \rangle \quad (2.36)$$

散乱ベクトル $\mathbf{q}$ は中性子の波長と散乱角に依存する。第一項は位相を含むため散乱角に依存する干渉効果を与え、第二項は散乱角に依存しない一様な散乱であるため干渉効果を与えない。それぞれの散乱断面積は次式で表される。

$$\begin{aligned} \sigma_{coh} &= 4\pi\langle b \rangle^2 \\ \sigma_{inc} &= 4\pi\langle (b - \langle b \rangle)^2 \rangle \end{aligned} \quad (2.37)$$

$\sigma_{coh}$ を干渉性中性子散乱断面積、 $\sigma_{inc}$ を非干渉性中性子散乱断面積と呼ぶ。ここで核スピンを考慮すると、中性子は1/2のスピンの持つため、原子核のスピンをIとすると複合核のスピンは $I \pm (1/2)$ となる。原子のスピ多重度は $2I + 1$ であるから、複合核のスピ多重度は、 $2(I \pm (1/2)) + 1$ となる。このスピに対応する散乱長を $b_+$ 、 $b_-$ とすると、散乱断面積は、

$$\begin{aligned} \sigma_{coh} &= 4\pi \left[ \frac{I+1}{2I+1} b_+ + \frac{I}{2I+1} b_- \right]^2 \\ \sigma_{inc} &= 4\pi \frac{I(I+1)}{(2I+1)^2} [b_+ - b_-]^2 \end{aligned} \quad (2.38)$$

$b_+$ 、 $b_-$ のそれぞれの散乱長は実験的に求められている。例として水素を挙げると、 $I = 1/2$ 、 $b_+ = 1.04 \times 10^{-12}$  cm、 $b_- = -4.7 \times 10^{-12}$  cmであるので、

$$\begin{aligned} \sigma_{coh} &= 2.0 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \\ \sigma_{inc} &= 77.6 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \end{aligned}$$

となる。非干渉性散乱は散乱体の構造情報を含まないためバックグラウンドとなり、これが大きいと統計精度が悪化する。表 2.1 に生体試料の主要な元素の中性子散乱長と散乱断面積を示す。 $\sigma_{abs}$ は吸収断面積と言い、波長に比例する。 $f_{x\text{-ray}}$ はX線原子散乱因子であり、中性子との比較のために表記した。

ここで、測定対象の分子を原子の連続集合体とみなし、単位体積あたりの散乱能、中性子平均散乱長密度 $\bar{\rho}_N$ を定義すると、

$$\bar{\rho}_N = \frac{\sum b}{V} \quad (2.39)$$

Vは分子の体積である。文献値の軽水( $\text{H}_2\text{O}$ )および重水( $\text{D}_2\text{O}$ )の排除体積を用いると(Kell, 1977)、それぞれの $\bar{\rho}_N$ は以下のように計算される。

$$\bar{\rho}_{\text{NH}_2\text{O}} = -0.00562 \times 10^{-12} \text{ cm}^{-2}$$

$$\bar{\rho}_{N_{D_2O}} = +0.06404 \times 10^{-12} \text{ cm}^{-2}$$

これらの値から軽水と重水の混合水の $\bar{\rho}_N$ を求めることができる。

$$\bar{\rho}_{N_{water}} = (-0.00562 + 0.0006966C_{D_2O}) \times 10^{-12} \text{ cm}^{-2} \quad (2.40)$$

$C_{D_2O}$ は重水の体積濃度である。タンパク質や核酸は解離性残基の軽水素-重水素(H-D)交換が生じるため、重水の濃度に依存して $\bar{\rho}_N$ も増加することに注意が必要である(平井, 2002)。

表 2.1. 主要元素の中性子散乱長(星埜 et al., 1976)

原子	核種	$b_{coh}$ ( $10^{-12}\text{cm}$ )	$\sigma_{inc}$ ( $10^{-24}\text{cm}^2$ )	$\sigma_{abs(1\text{\AA})}$ ( $10^{-24}\text{cm}^2$ )	$f_{x-ray}$ ( $10^{-12}\text{cm}$ )
水素	$^1\text{H}$	-0.3742	80	0.18	0.28
重水素	$^2\text{H(D)}$	0.6671	2	0	0.28
炭素	$^{12}\text{C}$	0.6651	0	0	1.69
窒素	$^{14}\text{N}$	0.940	~0	0.99	1.97
酸素	$^{16}\text{O}$	0.5804	0	0	2.25
リン	$^{31}\text{P}$	0.517	~0.3	0.11	4.23
硫黄	$^{32}\text{S}$	0.2847	~0	0.07	4.5

## 2.3 理論散乱関数計算

本説では、Svergun らの論文を参考に、本研究で実施した理論散乱関数の計算方法について述べる(Svergun et al., 1995; Svergun et al., 1998)。

### 2.3.1 CRY SOL 及び CRY SON の計算理論

タンパク質の理論散乱関数の計算には、欧州分子生物学研究所(The European Molecular Biology Laboratory, EMBL)が公開している CRY SOL(X 線散乱用)及び CRY SON(中性子散乱用)を利用した(Svergun et al., 1995; Svergun et al., 1998)。これらのプログラムは Svergun らが Stuhrmann の発表した理論(Stuhrmann, 1970)に基づき開発したもので、タンパク質結晶構造データベース(PDB)に登録された結晶構造原子座標に基づき、最大 99 次の球面調和関数展開を用いて第 1 層の水和殻を考慮したタンパク質の溶液散乱関数を計算するものである。また、水和殻のコントラストをパラメーターとして理論散乱関数を実測散乱曲線にフィッティングし、水和殻のコントラストを求めることが可能である。これらのプログラムは Fortran77 で記述されており、UNIX プラットフォームの実行形式で配布されている。

ここで、粒子の散乱密度を $\rho_a(\mathbf{r})$ 、溶媒の平均散乱密度を $\rho_0$ と置き、厚さ $\Delta$ 、平均散乱密度 $\rho_b$ の境界層を仮定する。この場合、水和殻を考慮した粒子の散乱強度は次式で表される。

$$I(q) = \langle |A_a(\mathbf{q}) - \rho_0 A_c(\mathbf{q}) + \delta\rho A_b(\mathbf{q})|^2 \rangle \quad (2.41)$$

$A_a$ 、 $A_c$ 、 $A_b$ は、それぞれ溶質粒子、溶質の排除体積、境界層の散乱振幅である。 $\delta\rho$ は境界層と溶媒の平均散乱密度の差(コントラスト)であり、次式で定義される。

$$\delta\rho = \rho_b - \rho_0 \quad (2.42)$$

実際にプログラムを利用する場合は、任意の溶媒平均散乱密度 $\rho_0$ 及び任意の水和殻コントラスト $\delta\rho$ を用いて理論散乱関数のシミュレーションを行い、フィッティングを行う場合は $\delta\rho$ をパラメーターとして用いる。式(2.41)は Stuhrmann による多重極展開を用いて書き直すことが可能である(Stuhrmann, 1970)。原子配列 $\mathbf{r}_j$ 、形状因子 $f_j(q)$ 、原子数 $N$ の粒子の真空中における散乱振幅は次式で表される。

$$A_a(\mathbf{q}) = \sum_{j=1}^N f_j(q) \exp(i\mathbf{q}\mathbf{r}_j) \quad (2.43)$$

$\exp(i\mathbf{q}\mathbf{r}_j)$ は次式でも表すことができる(Edmonds, 1957)。

$$\exp(i\mathbf{q}\mathbf{r}) = 4\pi \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l i^l j_l(qr) Y_{lm}^*(\omega) Y_{lm}(\Omega) \quad (2.44)$$

$j_l(qr)$ は球面ベッセル関数、 $Y_{lm}(\Omega)$ は球面調和関数である。式(2.41)を式(2.42)へ代入すると次式が得られる。

$$A_a(\mathbf{q}) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l A_{lm}(q) Y_{lm}(\Omega) \quad (2.45)$$

$A_{lm}(q)$ は溶質粒子の部分振幅であり、次式で表すことができる。

$$A_{lm}(q) = 4\pi i^l \sum_{j=1}^N f_j(q) j_l(sr_j) Y_{lm}^*(\omega_j) \quad (2.46)$$

ここで、排除体積の部分振幅は、排除体積をダミー原子の重ね合わせで表現した場合の形状因子 $g_j(q)$ と式(2.45)を用いて、次式で表すことができる。

$$C_{lm}(q) = 4\pi i^l \sum_{j=1}^N g_j(q) j_l(qr_j) Y_{lm}^*(\omega_j) \quad (2.47)$$

Stuhrmann によれば、境界層は二次元の角度関数 $F(\omega)$ を用いて次のように表すことができる(Stuhrmann, 1970)。

表 2.2. 原子及び原子団の排除体積及び Van der waals 半径。<sup>a</sup>

原子・原子団	排除体積 V (Å <sup>3</sup> )	ファンデルワールス半径 r (Å)
H*	5.15	1.07
C*	16.44	1.58
CH†	21.59	1.73
CH <sub>2</sub> †	26.74	1.85
CH <sub>3</sub> †	31.89	1.97
N*	2.49	0.84
NH†	7.64	1.22
NH <sub>2</sub> †	12.79	1.45
NH <sub>3</sub> †	17.94	1.62
O*	9.13	1.30
OH†	14.28	1.50
S ‡	19.86	1.68
SH†	25.10	1.81
Mg ‡	17.16	1.60
P ‡	5.73	1.11
Ca ‡	31.89	1.97
Mn ‡	9.20	1.30
Fe ‡	7.99	1.24
Cu ‡	8.78	1.28
Zn ‡	9.85	1.33

<sup>a</sup>それぞれの引用符は\*Fraser et al., 1978、†Svergun et al., 1995、‡ MacGillavry and Rieck, 1968 に対応する。

$$\rho_b(\mathbf{r}) = \begin{cases} 1 & F(\omega) \leq r \leq F(\omega) + \Delta \\ 0 & 0 < r < F(\omega) \text{ or } r > F(\omega) + \Delta \end{cases} \quad (2.48)$$

部分振幅は実空間の動径関数のハンケル変換であり、境界層の部分振幅は次式で表すことができる。

$$B_{lm}(q) = i^l \left(\frac{2}{\pi}\right)^{1/2} \int_0^{\infty} \rho_{lm}(r) j_l(qr) r^2 dr \quad (2.49)$$

この $\rho_{lm}(r)$ は次式で表される。

$$\rho_{lm}(r) = \int_{\omega} \rho_b(\mathbf{r}) Y_{lm}^*(\omega) d\omega \quad (2.50)$$

式(2.49)へ式(2.50)及び式(2.48)を代入することで次式が得られる。

$$B_{lm}(q) = i^l \left(\frac{2}{\pi}\right)^{1/2} \int_{\omega} Y_{lm}^*(\omega) d\omega \int_{F(\omega)}^{F(\omega)+\Delta} j_l(qr) r^2 dr \quad (2.51)$$

式(2.46)及び式(2.47)、式(2.51)を式(2.41)へ代入すると、これらの部分振幅は多重極成分となる。クロス項は空間平均されると球面調和関数の直行特性により消去され、散乱強度を表す次のシンプルな式が得られる。

$$I(q) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l |A_{lm}(q) - \rho_0 C_{lm}(q) + \delta\rho B_{lm}(q)|^2 \quad (2.52)$$

ここで $L$ は打ち切り値であり、粒子の分解能を定義する。

### 2.3.2 境界層の散乱振幅計算法

形状因子 $f_j(q)$ 及び $g_j(q)$ は部分振幅 $A_{lm}(q)$ 及び $C_{lm}(q)$ の評価に必要となる。タンパク質構造データベース(PDB)に登録された構造情報の多くは水素原子を含まないが、CRY SOL 及び CRYSON では、共有結合した水素原子については原子団として取り扱う(表 2.2)。同様のアプローチが他の研究でも利用されている(Pavlov and Fedorov, 1983; Lattman, 1989)。原子団の形状因子は、各原子の独立した形状因子の球面平均と原子間距離  $0 \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$  の 5 ガウス近似で表現することができる(Ibers and Hamilton, 1975)。ダミー原子の形状因子は次式で表される(Fraser et al., 1978)。

$$g_j(q) = G(q) V_j \exp\left(-\pi q^2 V_j^{\frac{2}{3}}\right) \quad (2.53)$$

$j$  番目のダミー原子(半径 $r_{gj}$ のガウス球)で置き換えられる溶媒体積は $V_j = (4\pi/3)r_{wj}^3$ と表される。また、 $G(q)$ は次式で表される。

$$G(q) = (r_0/r_m)^3 \exp\left[-\left(\frac{4\pi}{3}\right)^{\frac{3}{2}} \pi q^2 (r_0^2 - r_m^2)\right] \quad (2.54)$$

$r_m$ は $r_m = N^{-1} \sum_{j=1}^N r_{gj}$ で表される実際の原子団半径である(一般に約  $1.62 \text{ \AA}$ )。有効原子半径である $r_0$ は全排除体積を一致させるために用いられる調節パラメータである。

境界層の角度関数 $F(\omega)$ の計算では、幾何学的中心が一致するよう粒子座標を移動する。そのために、フィボナッチ数及び $N_g$ 角度方向の準均一グリッドを利用する(Svergun and Pedersen, 1994)。実際には、原子からの最小距離が原子半径 $r_{gj}$ 及び水分子半径 $r_w = 1.5 \text{ \AA}$ の合計より小さい場合、境界層関数 $F(\omega)$ を次のように更新する。

$$F(\omega_i) = \max\{F'(\omega_i), (r_{ji+0.5}r_{gj})\} \quad (2.55)$$

$F'(\omega_i)$ は境界層関数の現在値、 $r_{ji}$ は $\mathbf{r}_j$ の $\omega_i$ 方向への投影である(図 2.11)。

全原子の配置が完了すると、境界層関数 $F(\omega)$ には原点から粒子表面の全角度における距離が含まれる。粒子表面近傍の溶媒密度がバルクの溶媒密度と大きく異なることが知られており(Cheng and Schoenborn, 1990)、CRY SOL 及び CRYSON では水分子の体積を考慮し境界層の厚さは  $3 \text{ \AA}$  として計算を行う。本研究では理論散乱関数のシミュレーション上記のプログラムを用いており、タンパク質の水和殻の厚さが  $3 \text{ \AA}$  に固定されていることに注意が必要である。

## 2.4 振動式密度計

### 2.4.1 振動式密度計の原理

本項は Liptak の著書を参考に記述した(Liptak, 2003)。振動体の質量によって固有振動数が変化する現象を利用した密度計を振動式密度計と呼び、その原理はばね-質量系の一般式に基づいている。

$$P = 2\pi \sqrt{\frac{m}{c}} \quad (2.56)$$

$P$ 、 $m$ 、 $c$ は、それぞれ固有振動の周期、質量、ばね定数である。また、振動に関与する質量を振動管と測定流体に分けると次式で表すことができる

$$m = M + \rho V \quad (2.57)$$

$m$ は全体質量、 $M$ は振動管の質量、 $\rho$ と $V$ はそれぞれ測定流体の密度及び体積である。式(2.52)に式(2.51)を代入すると次式が得られる。

$$\rho = \frac{c}{4\pi^2 V} P^2 - \frac{M}{V} \quad (2.58)$$

式(2.53)を簡略化するため、一般的に次の定数が用いられる。

$$A = \frac{c}{4\pi^2 V} \quad (2.59)$$

$$B = \frac{M}{V} \quad (2.60)$$

これより、次の一般式が導かれる。

$$\rho = AP^2 - B \quad (2.61)$$

通常、定数A、Bは標準物質の測定から定義される。この式(2.61)を用いることで、固有振動の周期から流体の密度が求められる。

## 第3章 ミオグロビン水和殻に対するトレハロース及びグルコースの効果

### 3.1 緒言

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、他の溶質の存在にも依存する(Pain et al., 2000; Dobson et al., 2003)。これは、溶質の存在によってタンパク質の水和状態が影響を受けるためだと考えられている(Rösgen et al., 2007)。タンパク質の変性及び酵素の失活が、糖やポリオールの添加により防止できることが古くから知られており、タンパク質と添加剤間の特異的結合や溶媒粘度の変化が要因であることが示唆された(Davis-Searles et al., 2001; Kaushik and Bhat, 1998)。糖溶液中における安定化作用については、糖の存在下でタンパク質が選択的に水和されることがその要因であると考えられてきた(Arakawa and Timasheff, 1982)。上記の先行研究では密度測定や熱量測定、円偏光二色性、NMR 等が実験手法として用いられており、タンパク質の水和構造を糖溶液中で直接観測した研究例はなかった。本章では、X線散乱及び中性子散乱を用いることでこの課題を解決し、糖による水和を介したタンパク質保護作用メカニズムの直接的な証拠を得た。

本章で用いた中性子散乱法は、さまざまな物質中の水素原子の位置とダイナミクスを観測するのに非常に役立つことがよく知られている。非弾性中性子散乱実験(Gabel et al., 2002; Tehei et al., 2007)及び分子動力学シミュレーション(Bizzarri and Cannistraro, 2002; Oleinikova et al., 2007)により、タンパク質と水和水のダイナミクスが連動していることが明らかとされた。本章の研究では、中性子小角散乱(SANS)と放射光 X線広角散乱(WAXS)を相補的に使用することで、ミオグロビン構造とその水和殻に対するトレハロースとグルコースの影響を研究した。実験データの解析には、タンパク質の結晶構造に基づいた理論散乱関数のシミュレーションも利用した。本結果は、両方の糖がタンパク質表面領域から選択的に排除される傾向を明確に示し、天然のタンパク質水和殻が保持されることが明らかとなった(Ajito et al., 2018b)。トレハロースの場合、グルコースに比べてこの排除傾向がより高い濃度まで維持された。

### 3.2 実験

#### 3.2.1 試料

測定対象のタンパク質であるミオグロビンは、SIGMA社から購入した馬骨格筋由来のものをそれ以上精製することなく使用した。糖としては、同じくSIGMA社製の非重水素化グルコース及び97%重水素化グルコース、さらに林原社製(日本)のトレハロース(二水和物粉末)を使用した。中性子散乱実験には、重水(99.9%重水素化、SIGMA社製)を使用した。化学物質はすべて分析等級のものを用いた。



緩衝液には、50 mM NaCl、10 mM HEPES 溶液を pH 7.0 に調製して用いた。5% w/v のミオグロビン溶液と、10~60%w/w の糖溶液をストック溶液として調製した。その後、タンパク質ストック溶液と糖ストック溶液を 1:4 の体積比で混合し、試料溶液として使用した。散乱測定の前直前に、100 nm ミリポアフィルター(Merck 社製)を使用し、大きな凝集体を除去した。溶液の最終タンパク質濃度は、紫外可視吸光度測定により決定し、およそ 1.0%w/v であった。

### 3.2.3 密度測定

糖溶液の平均散乱密度を推定するため、振動密度測定(DMA35、Anton-Paar 社製)を使用して質量密度測定を実施した。溶液の密度には温度の影響が大きいため、測定毎に溶液温度が 25.0 °C で安定するまで静置し、実験を行った。

### 3.2.4 放射光 X 線広角散乱測定

WAXS の測定には、SPring-8 の BL-40B2 分光器と PF の BL-10C 分光器を使用した。X 線の波長及びカメラ長は、BL-40B2 で 1.0 Å 及び 38.9 cm、BL-10C で 1.55 Å 及び 23.9 cm であった。検出器は、BL-40B2 では R-AXIS IV(面積 30×30 cm<sup>2</sup>、ピクセル解像度 100 μm、理学社製)、BL-10C では PILATUS3 2M(面積 253.7×288.8 cm<sup>2</sup>、ピクセル解像度 172 μm、Dectris 社製)、を利用し、露光時間は、BL-40B2 で 10 秒、BL-10C で 30 秒であった。試料セルに含まれる溶液の温度は、INTEC 社製の温度コントローラー mK2000 を使用して密度測定と同様の 25.0°C に制御した。測定中は、タンパク質の放射損傷を避けるために試料溶液をゆっくりと流動させた。WAXS データの解析は 2.1 節に則り行い、回転半径は Guinier プロットから算出した。

### 3.2.5 中性子小角散乱測定

SANS 測定は、J-PARC の BL15 TAIKAN 分光器を使用し、1.0~7.8 Å の波長の中性子を測定に用いた。試料セルには、光路長 1 mm の石英セルを使用し、露光時間は 1~3 時間であった。SANS 測定では、逆コントラスト変調法(Knoll et al., 1985)を採用した。測定温度は他の実験と同じ 25.0 °C に合わせた。SANS データの解析は一般的な方法を用いた(Hirai et al., 2003)。

## 3.3 結果及び考察

### 3.3.1 糖溶液の密度から推定された散乱密度及び ミオグロビンの散乱コントラスト

X線と中性子を使用した溶液散乱法では、溶質粒子の散乱関数は溶質と溶媒の平均散乱密度の差、いわゆるコントラスト( $\Delta\rho$ )に依存する(Stuhrmann and Miller, 1978)。糖溶液の平均散乱密度は糖濃度に応じて変化するため、質量密度の測定から平均散乱密度を決定した。図 3.1 に、25 °Cにおけるトレハロース及びグルコース溶液の質量密度の質量糖濃度(%w/w)依存性を示す。糖溶液の質量密度( $\rho_{\text{sugar}}$ )は次式で計算することができる。

$$\rho_{\text{sugar}} = 1 / \left[ \frac{N_a}{100} \left\{ \frac{xv_{\text{sugar}}}{M_{\text{sugar}}} + \frac{(100-x)v_{\text{water}}}{M_{\text{water}}} \right\} \right] \quad (3.1)$$

ここで、 $v_{\text{sugar}}$ 、 $v_{\text{water}}$ 、 $M_{\text{sugar}}$ 、及び $M_{\text{water}}$ は、それぞれ、糖分子の排除体積、水分子の体積、及びそれらの分子量である。 $N_a$ はアボガドロ定数である。式(3.1)

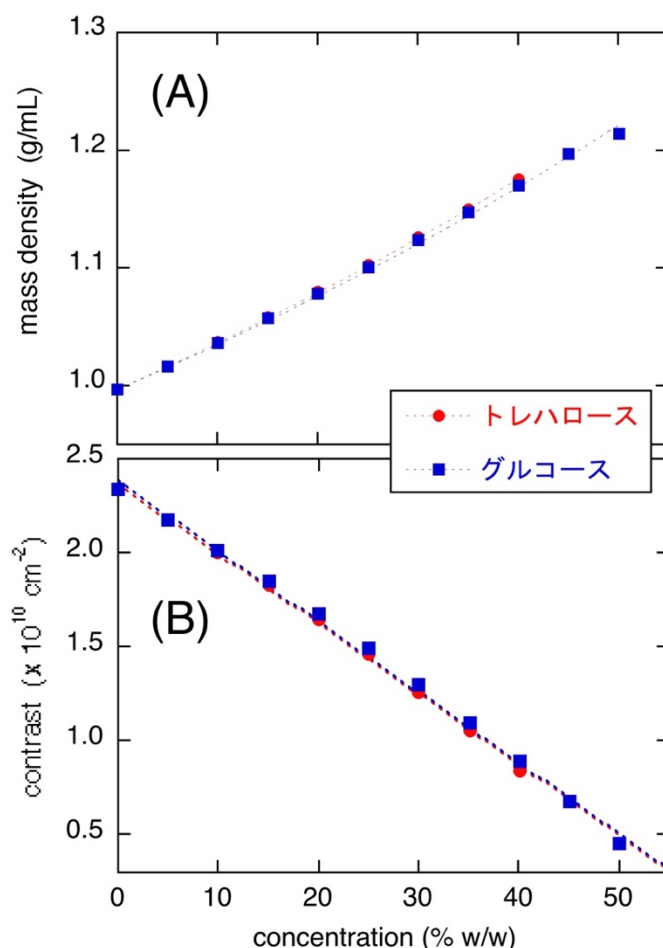


図 3.1. (A) 25.0 °C における糖溶液質量密度の糖濃度(%w/w)依存性。(B) X線に対するミオグロビンのコントラストの糖濃度(%w/w)依存性。

を用いた最小二乗法により、トレハロースとグルコースの $v_{\text{sugar}}$ は、それぞれ $353.3 \pm 0.4 \text{ \AA}^3$ 、 $189.7 \pm 0.8 \text{ \AA}^3$ と決定された。 $v_{\text{water}}$ は $30.01 \text{ \AA}^3$ であった。これらの値は、以前の報告(Auton et al., 2008; Banipal et al., 1997)と誤差範囲内で一致した。これより、トレハロース及びグルコース溶液の X 線平均散乱密度は次のように与えられた。

$$\text{トレハロース溶液: } \rho_{\text{trehalose}} = 9.3651 + 0.0361x (\times 10^{10} \text{ cm}^{-2}) \quad (3.2)$$

$$\text{グルコース溶液: } \rho_{\text{glucose}} = 9.3651 + 0.0360x (\times 10^{10} \text{ cm}^{-2}) \quad (3.3)$$

$x$ は糖の重量濃度である。タンパク質試料であるミオグロビンの平均散乱密度は、そのアミノ酸組成(Zamyatnin et al., 1984)に基づいて計算した結果、 $11.7 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ であった。原理的に、糖溶液中のミオグロビンの平均散乱密度差、つまり散乱コントラスト  $\Delta\rho$  は糖濃度に依存する。図 3.1B には、平均散乱密度から計算したミオグロビンの X 線散乱コントラスト  $\Delta\rho$  の質量糖濃度依存性を示す。これより、ミオグロビンのコントラストは糖濃度の上昇とともにほぼ直線的に減少することがわかる。

### 3.3.2 X 線散乱曲線の実測値及び理論値の比較による ミオグロビン水和殻への糖の効果の解析

図 3.2 には、糖濃度に応じたミオグロビンの WAXS 曲線、 $I(q)$ を示す。(A)はトレハロース溶液中、(B)はグルコース溶液中のものである。糖の最高濃度は、トレハロースの溶解度がグルコースの溶解度よりも低いため、トレハロースで 32.5%w/w、グルコースで 35%w/w であった。 $I(q)$ の強度とその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。ここで示した WAXS 曲線は、非常に広い  $q$  範囲をカバーしていることに注意が必要である。異なる  $q$  領域で観測されたミオグロビンの WAXS 曲線は、異なる階層構造レベル、つまり、四次及び三次構造( $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ )、ドメイン間相関( $0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ )、ドメイン内構造( $0.5 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ )、及び密にパッキングされた側鎖を含む二次構造( $1.1 \text{ \AA}^{-1} < q < 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ )に対応している(Hirai et al., 2002; Hirai et al., 2004)。

図 3.3 は、図 3.2 から得られた原点散乱強度の平方根  $I(0)^{1/2}$  と回転半径  $R_g$  を示す。(A)は  $I(0)^{1/2}$  の糖濃度依存性、(B)は  $R_g$  の糖濃度依存性である。 $I(0)$ は  $N(\Delta\rho V)^2$  に比例することが知られている(Stuhrmann and Miller, 1978)。ここで  $V$  は分子量、 $N$  は粒子数である。図 3.3(A)に示す  $I(0)^{1/2}$  と糖濃度の良好な線形関係は、試料調製が正しく行われ、糖濃度に依存してコントラストが減少したことを示す。図 3.1B 及び式(3.2)、式(3.3)から、糖濃度に依存するタンパク質のコントラストの変化はトレハロースとグルコースでほぼ同じになると予想され、 $I(0)^{1/2}$  も両方の糖で同じ線形関係を示すと予測された。しかし、図 3.3(A)に示すトレハロース溶液

中での  $I(0)^{1/2}$  の勾配は、グルコース溶液中よりも約 11%大きかった。図 3.3B に示した  $R_g$  は、0%w/w から 20~25%w/w の範囲において、トレハロースで  $16.9 \pm 0.4 \text{ \AA}$  から  $14.7 \pm 0.9 \text{ \AA}$  に、グルコースでは  $15.2 \pm 0.4 \text{ \AA}$  へと一度減少した。その一方で、より高濃度では  $R_g$  の増加が見られ、グルコースではトレハロースより低い糖濃度から  $R_g$  の増加が生じた。

この  $I(0)^{1/2}$  及び  $R_g$  の糖濃度依存性を説明するため、コントラストと水和殻密度の変化を考慮した X 線理論散乱関数の計算を実施した。シミュレーションには CRY SOL プログラムを使用し(2.3 節参照)、ミオグロビンの PDB ファイルには登録番号 1WLA を用いた(Maurus et al., 1997)。このシミュレーションでは、タ

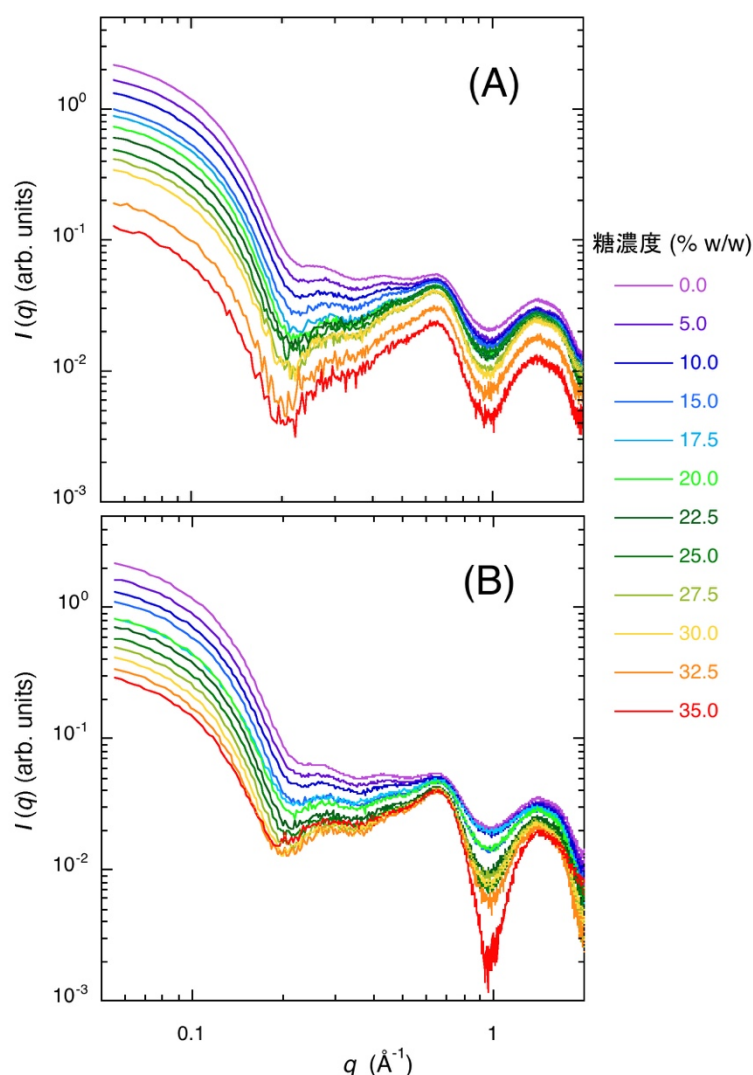


図 3.2. ミオグロビン WAXS 曲線の糖濃度依存性。(A) はトレハロース溶液中(最高濃度 32.5%w/w)、(B)はグルコース溶液中(最高濃度 35.0%w/w)。

ンパク質の水和殻について糖の存在下で生じる可能性のある以下の 2 モデルを想定した(Rösgen et al., 2007; Davis-Searles et al., 2001; Auton et al., 2008; Sukenik et al., 2013)。

(1) 選択的溶媒和モデル

タンパク質水和水の糖分子による置換(選択的溶媒和)が生じる場合、タンパク質水和水の散乱密度は糖濃度に依存して増加する

(2) 選択的排除モデル

タンパク質水和水から糖分子の選択的排除が生じる場合、水和水の散乱密度は糖濃度に依存せず、一定となる。

上記の極端なモデルは、タンパク質に比べて低分子量の溶質による影響を想定したもので、この仮定に基づき理論散乱関数をシミュレーションした。

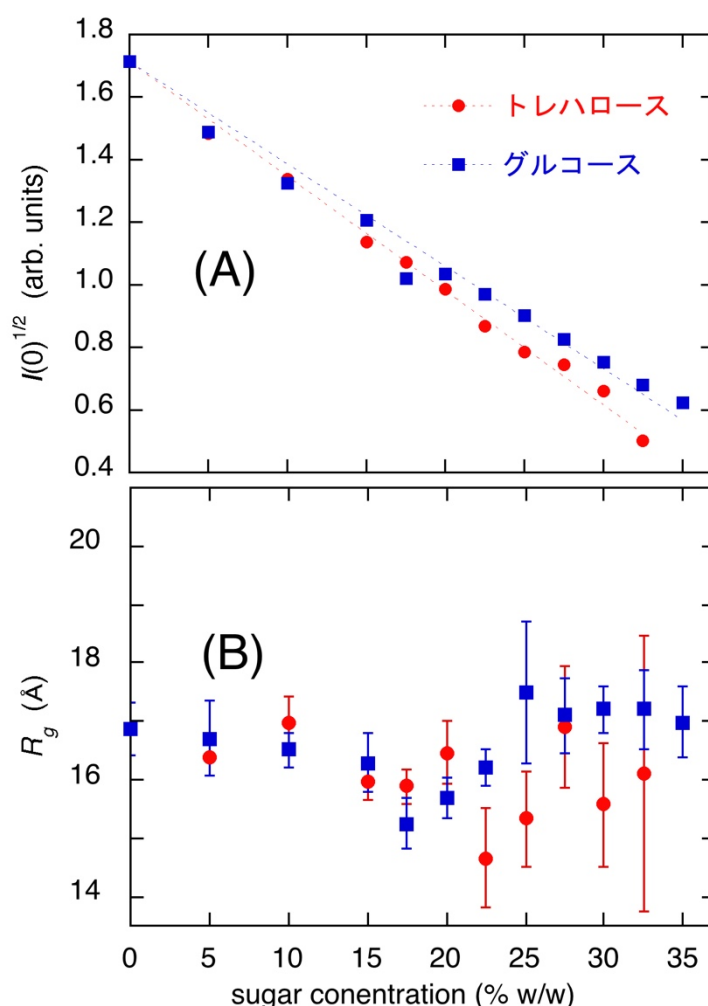


図 3.3. (A)は原点散乱強度の平方根  $I(0)^{1/2}$  の糖濃度依存性、(B)は回転半径  $R_g$  の糖濃度依存性。赤丸はトレハロース溶液中、青四角はスクロース溶液中。

図 3.4 に、ミオグロビン理論散乱関数の溶媒平均散乱密度依存性(糖濃度依存性)を示す。(A)は選択的溶媒和モデルを、(B)は選択的排除モデルを想定したもので、0~35%w/w の糖濃度の範囲に対応している。選択的溶媒和モデルでは、水和殻領域の平均散乱密度は糖溶媒の平均散乱密度の 1.1 倍に設定した。選択的排除モデルでは、水和殻領域の平均散乱密度は一定、つまり純水の 1.1 倍に設定した。この理論散乱関数から  $I(0)^{1/2}$  及び  $R_g$  算出し、実験データと比較したものが図 3.5 である。(A)が  $R_g$ 、(B)が  $I(0)^{1/2}$  であり、理論値と実験値はそれぞれ糖濃度 0%w/w で規格化して比較した。図 3.5A に示すように、両方の糖の実験的  $R_g$  の変動は、平均散乱密度が  $10.27 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  未満(糖濃度が 25%w/w 未満)の場合、選択的排除モデルによって定性的に説明できた。図 3.5B は、トレハロースの実

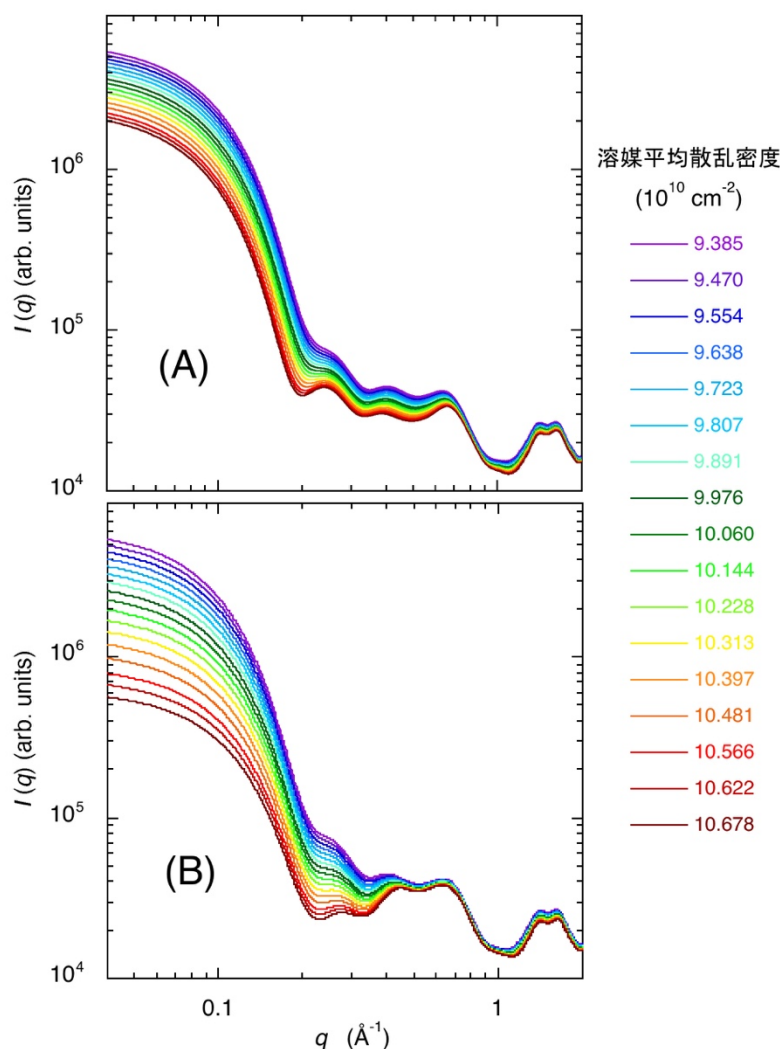


図 3.4. ミオグロビンの理論 WAXS 関数の溶媒平均散乱密度依存性。(A)は選択的溶媒和モデル、(B)は選択的排除モデルを仮定してシミュレーションしたもの。

験的  $I(0)^{1/2}$  の変化が、測定された全濃度範囲で選択的排除モデルに従うことを明確に示した。グルコースの実験的  $I(0)^{1/2}$  は、約 25%w/w で直線の傾きが変化し、高濃度では選択的排除モデルからの逸脱が生じた。この結果は、タンパク質水和殻へのグルコースの浸透が、特定の濃度を閾値として生じることを示唆するものである。

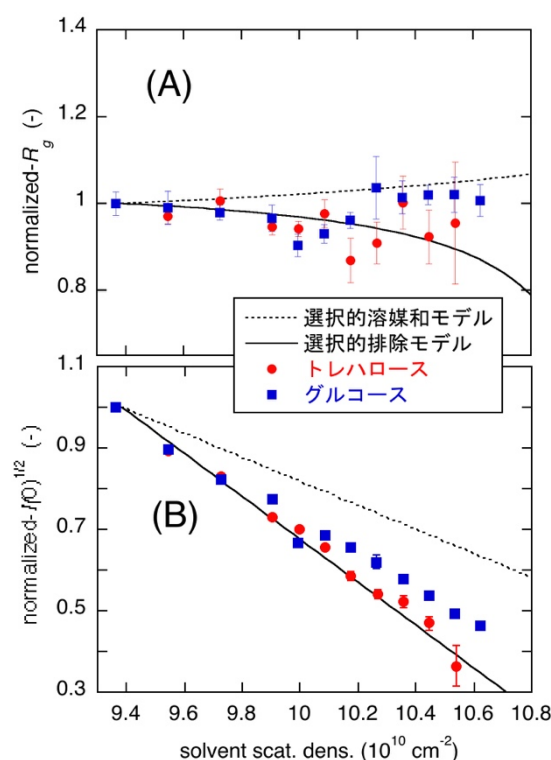


図 3.5. 散乱曲線から得られるパラメーターの実験値と理論値の溶媒平均散乱密度依存性の比較。(A)は回転半径  $R_g$ 、(B)は原点散乱強度  $I(0)^{1/2}$ 。赤丸はトレハロース溶液中、青四角はグルコース溶液中での実験値。点線は選択的溶媒和モデル(ケース 1)、実線は選択的排除モデルを仮定した理論値。実験値と理論値はそれぞれ規格化して比較した。

### 3.3.3 中性子散乱曲線のフィッティングによるミオグロビン水和殻の解析

WAXS の結果を確認するため、逆コントラスト変調法を使用して中性子散乱測定を実施した。生体物質の中性子散乱測定には、さまざまな種類のコントラスト変調法がある。特に、重水素化物を使用した逆コントラスト変調法は、糖分子

の添加によって生じる散乱曲線への人工的な影響を回避または最小限に抑えることができる。したがって、逆コントラスト変調法を適用した。実験には非重水素化グルコース(h-グルコース)と 97%原子重水素化グルコース(d-グルコース)を使用した。グルコースの分子量と分子体積から重水中の平均散乱長密度を計算すると、それぞれ  $0.0796 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$  及び  $0.0267 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$  であった。したがって、 $[\text{d-グルコース}]/[\text{h-グルコース}] = 0.706/0.294 \text{ (M/M)}$ の比で混合することで、重水の平均散乱長密度と一致させることができる。つまり、このグルコース混合物を使用する場合、重水溶媒中の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も影響を受けない。図 3.6 には、このグルコース混合物の濃度に依存したミオグロビン SANS 曲線を示す。挿入図は  $I(0)^{1/2}$  である。 $I(0)^{1/2}$  の大きさはグルコース濃度に依存せず一定に保たれており、グルコースと重水のコントラストマッチングが成功していることを示す。図 3.6 の実線は、CRYSON プログラムを用いた結晶構造とのフィッティングから得られた理論散乱関数である。フィッティングのずれ因子  $\chi^2$  値は 1.0 から 1.6 の範囲であった。

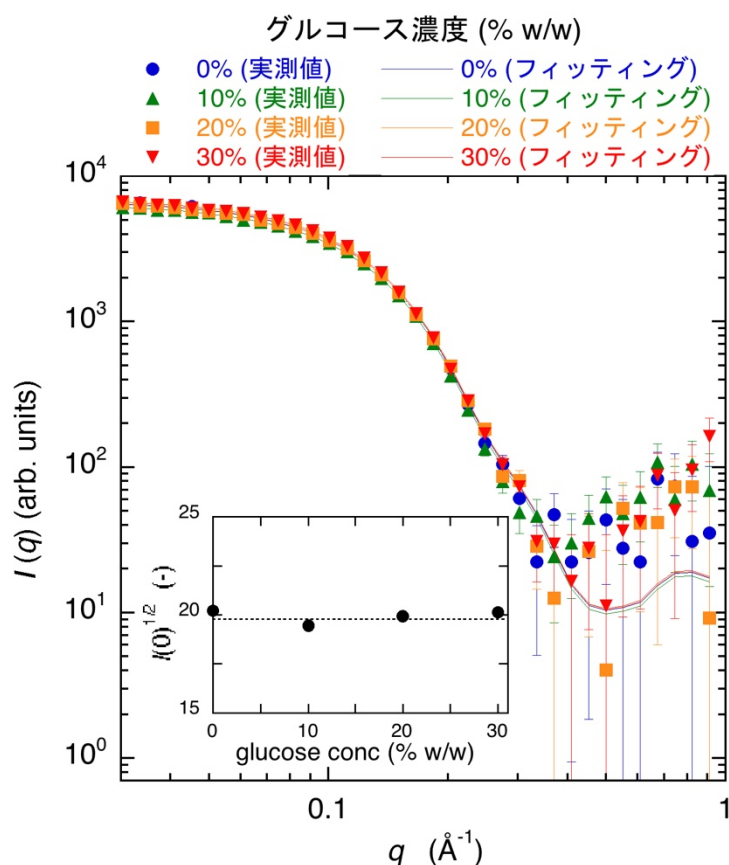


図 3.6. ミオグロビン SANS 曲線のグルコース濃度依存性。シンボルは実験値、実線は CRYSON のフィッティングで得られた理論散乱関数。青は 0%w/w、緑は 10%w/w、橙は 20%w/w、赤は 30%w/w。挿入図は原点散乱強度  $I(0)^{1/2}$  のグルコース濃度依存性。グルコースは重水 100%の散乱長密度に一致させた軽水素化物と重水素化物の混合物を用いた。



図 3.7A は、図 3.6 の SANS 曲線から計算した距離分布関数  $p(r)$  を示す。粒子最大長  $D_{\max}$  は、グルコース濃度を 30 %w/w へ増加させると 47.8 Å から 44.7 Å へ僅かに減少する傾向を示した。図 3.7B には、CRYSON によって得られた水和殻のコントラストと  $R_g$  値を示す。グルコース濃度の増加にも関わらず、水和殻密度はほぼ一定であった。水和殻のコントラストは、全てのグルコース濃度でおよそ  $0.58 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  (重水の平均散乱密度の 9.1%) の値を保持した。これは、糖分子が選択的にタンパク質の水和殻領域から排除されるという WAXS の結果を強く支持するものである。図 3.7B に示した  $R_g$  を見ると、グルコース濃度の増加に

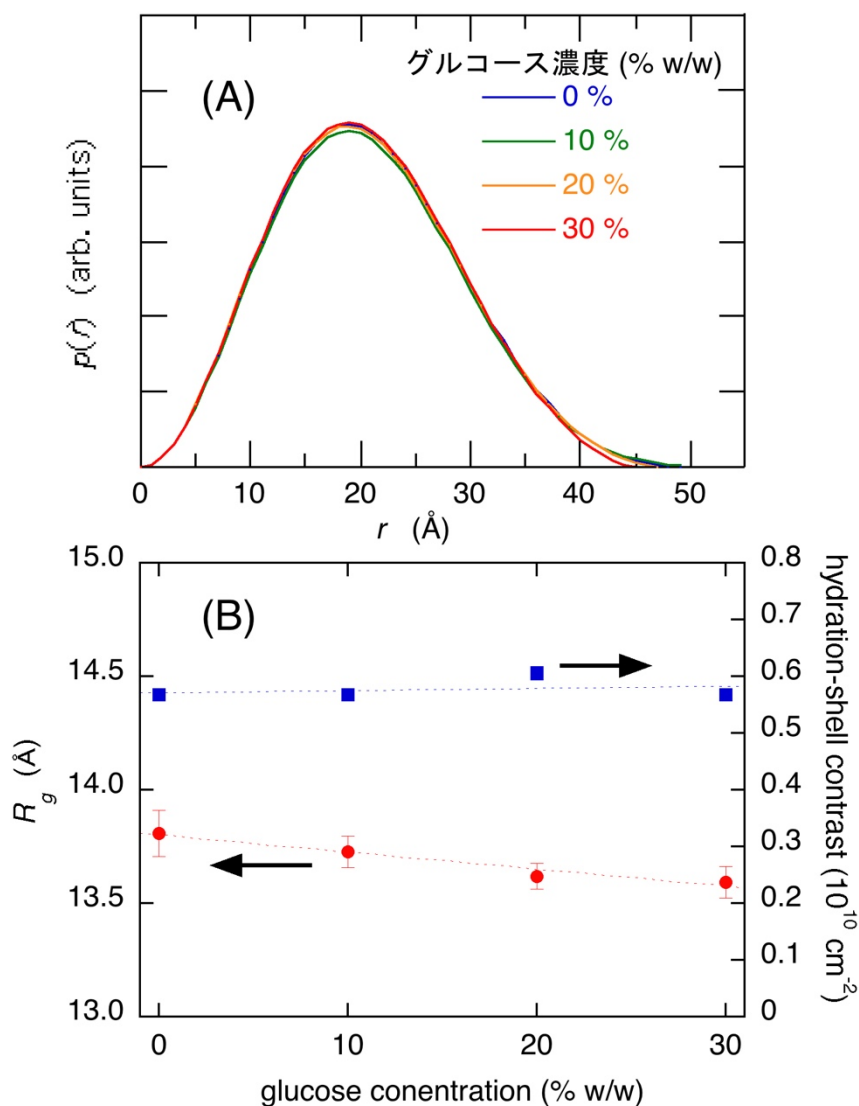


図 3.7. SANS 曲線から得られた距離分布関数  $p(r)$  及び水和殻コントラスト、回転半径  $R_g$  のグルコース濃度依存性。(A)は  $p(r)$  のグルコース濃度依存性であり、青は 0%w/w、緑は 10%w/w、橙は 20%w/w、赤は 30%w/w。(B)は水和殻コントラスト(青四角)及び  $R_g$ (赤丸)のグルコース濃度依存性。水和殻コントラストは CRYSON のフィッティングから得られた。

伴い  $13.8 \pm 0.1 \text{ \AA}$  から  $13.6 \pm 0.1 \text{ \AA}$  へ僅かに減少する傾向が認められた。これを説明するため、タンパク質構造に対する溶質分子の効果に関する一般的な物理化学的観点から、糖による他の効果を次のように仮定できる。溶媒に糖分子を加えると、バルク水とタンパク質表面水との化学ポテンシャルに差が生じ、いわゆる浸透圧ストレスが生じる。したがって、平衡状態では、タンパク質界面の拡散運動が抑制または制限され、排除体積領域の水の化学ポテンシャルが低下し、浸透圧とタンパク質の表面張力のバランスをとる新しい安定状態が生じる(浸透圧結合として知られる) (Suzuki and Yamazaki, 1989)。あるいは、このような効果は、溶媒と水和殻の密度変化にそれぞれ依存するような、大規模なタンパク質運動と内部タンパク質運動の抑制として現れる(Fenimore et al., 2002; Fenimore et al., 2004; Frauenfelder et al., 2009)。また、グルコース 1 M 溶液の比粘度は、1 から 1.4 へ増加する(Sola-Penna et al., 1998)。これらの効果は、タンパク質の排除体積の見かけ上の圧縮として実験的に観察され得る。この仮定に基づき理論散乱関数を計算し、そこから得られる  $R_g$  を図 3.8 に示す。これより、実験で生じた  $R_g$  の減少は、排除体積の約 5% の減少に対応した。タンパク質の排除体積減少は、主に、基準振動解析(Kidera et al., 1992)で示されるように、内側よりも外側で大きいタンパク質の熱ゆらぎの抑制に起因すると考えられる。

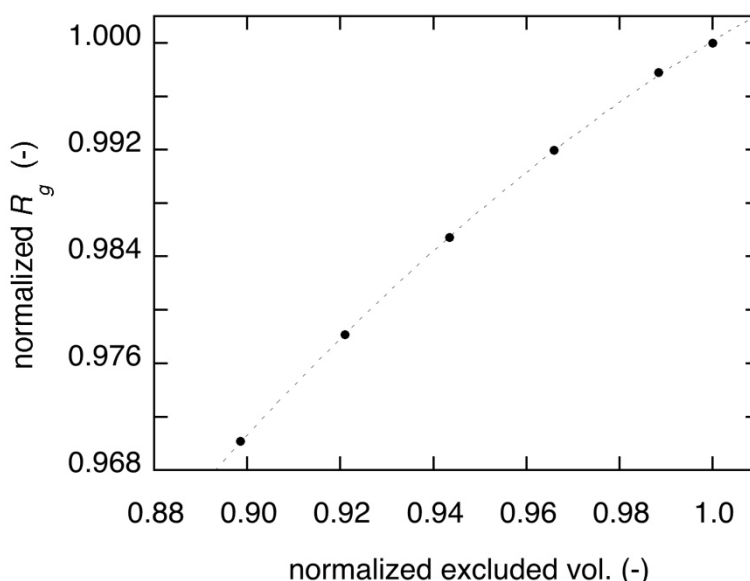


図3.8. CRYSONを用いてシミュレーションしたミオグロビン回転半径  $R_g$  の排除体積依存性。

### 3.4 結言

本章では、X線散乱と中性子散乱実験及び理論散乱関数のシミュレーションを行い、ミオグロビンの水和殻に対するトレハロース及びグルコースの効果を

検討した。理論散乱関数のシミュレーションは、水和殻水分子と糖分子の置換が生じる選択的溶媒和モデル、及び水和殻領域から糖分子が排除される選択的排除モデルの 2 つの異なるモデルに基づいて実施した。X 線散乱の結果は、25% w/w 未満の糖濃度では、タンパク質表面からの糖分子の排除が支配的であることを明確に示し、選択的水和説を支持した。トレハロースとグルコースの差異としては、トレハロースの選択的排除傾向が、グルコースの場合よりも支配的であることが明らかとなった。これは、トレハロースの優れた生体保護作用に関連するものと考えられる。逆コントラスト変調法を使用した中性子散乱実験の結果は、糖の選択的排除とタンパク質の水和殻の保存を強力に支持した。以上の結果は、糖によるタンパク質保護作用がタンパク質水和殻からの糖分子の選択的排除及び選択的水和によって発揮されている直接的な証拠である。

## 第4章 ミオグロビン水和殻に対する二糖・単糖の効果、及び化学変性・熱変性の抑制作用

### 4.1 緒言

タンパク質の変性及び酵素の失活の糖及びポリオールによる防止は、生化学及び食品保存の分野で広く適用されている。この保護作用を説明するため、タンパク質とそれらの添加物間の特定の結合、溶媒粘度の変化、さらに、タンパク質をそれらの添加物溶液に移す際の表面張力と自由エネルギー変化が議論されてきた(Gekko and Timasheff, 1981; Arakawa and Timasheff, 1982; Kaushik and Bhat, 1998; Davis-Searles et al. 2001; Rösgen et al., 2005)。特に、糖は水構造形成因子(コスモトロープ)として共通の性質を持っているため、水の構造が重要な要因であることが指摘された(Branca et al., 2007; Magazù et al., 2007)。コスモトロープに分類される溶質の一般的な性質として、溶液中のタンパク質及び疎水性凝集体を安定化し、疎水性物質の溶解性を低下させることが知られている(Ball and Hallsworth, 2015)。水はタンパク質の主な安定化因子である水素結合、疎水性相互作用、静電相互作用と常に関係する。したがって、コスモトロープは、タンパク質の水和構造の摂動の抑制を通じて変性を防ぐと合理的に考えられている。これまでに行われたタンパク質構造に対する糖の効果に関する実験的研究は、密度測定、熱量測定、円偏光二色性、NMR などの様々な手法が用いられたが、タンパク質と溶媒間の相互作用を直接議論したものは乏しい。したがって、このメカニズムはまだ完全には解明されていないと言える。

一方、タンパク質が天然構造に折りたたまれるメカニズムは、生物学における重要な問題の1つである(Pain, 2000; Dobson, 2003)。水溶液中のタンパク質の安定性は、塩や中性物質の添加、及び温度と圧力の変化によって影響を受ける。しかし、大量の共溶質が存在する濃厚溶液中で特定のタンパク質の構造を実験的に観察することは困難であったため、タンパク質のアンフォールディング-フォールディングの実験的研究のほとんどは希薄溶液条件下で行われてきた。

本研究では、放射光 X 線広角散乱法(WAXS)と中性子小角散乱法(SANS)を用いて、化学変性及び熱変性条件下におけるミオグロビンの水和(溶媒和)殻と構造転移の両方に及ぼす糖の影響を解析した。ミオグロビンは、アミロイド様凝集の形成に伴うヘリックス-シート転移を示すため、タンパク質のフォールディング研究でよく利用されている球状タンパク質の1つである(Fändrich et al., 2001, Fändrich et al., 2003)。既に、WAXS によってアポミオグロビンのアミロイド形成の初期過程が明らかにされており(Onai et al., 2007)、WAXS と中性子非干渉性弾性散乱の組み合わせにより、ヘリックスからシートへの転移におけるアポミオグロビンのダイナミクス変化が特徴づけられている(Fabiani et al., 2009)。本章の結果は、糖がタンパク質水和殻の保護作用を介してタンパク質の天然構造を安定化できること、及び化学変性及び熱変性による構造転移が異なる構造階層レベル間で協調的に進行することを明確に示した(Ajito et al., 2018a)。

## 4.2 実験

### 4.2.1 試料

タンパク質には馬骨格筋由来のミオグロビン(Sigma 社製)を、それ以上精製することなく使用した。糖には林原社製のトレハロース二水和物粉末、和光純薬社製のスクロース、グルコース、フルクトース、Sigma 社製の重水素化グルコースを用いた。すべて分析等級のものを使用した。緩衝液には pH 7.0 に調製した 10 mM HEPES、50 mM NaCl 溶液を用いた。8%w/v のミオグロビン溶液をタンパク質のストック溶液として使用し、測定試料は、タンパク質ストック溶液と糖のストック溶液を 1 : 3 の比率で混合することで調製した。糖濃度は、0%w/w から 37.5%w/w まで変化させた(トレハロースは 32.5%w/w まで)。散乱測定の前直前に、100 nm ミリポアフィルター(Merck 社製)を使用し、大きな凝集体を除去した。溶液の最終タンパク質濃度は、紫外可視吸光度測定(UV-1800、島津製作所社製)により決定し、およそ 1.0 %w/v であった。

### 4.2.3 密度測定

糖溶液の平均散乱密度を推定するため、振動密度測定(DMA35、Anton-Paar 社製)を使用して質量密度測定を実施した。溶液の密度には温度の影響が大きいため、測定毎に溶液温度が 25.0°C で安定するまで静置し、実験を行った。

### 4.2.4 X 線広角散乱測定

WAXS の測定には、SPring-8 の BL-40B2 分光器と PF の BL-10C 分光器を使用した。X 線の波長とカメラ長は、BL-40B2 で 1.0 Å 及び 38.9 cm、BL-10C で 1.55 Å 及び 23.9 cm であった。検出器は、BL-40B2 では R-AXIS IV(面積 30×30 cm<sup>2</sup>、ピクセル解像度 100 μm、理学社製)、BL-10C では PILATUS3 2M(面積 253.7×288.8 cm<sup>2</sup>、ピクセル解像度 172 μm、Dectris 社製)、を利用し、露光時間は、BL-40B2 で 10 秒、BL-10C で 30 秒であった。試料セルに含まれる溶液の温度は、INTEC 社製の温度コントローラー mK2000 を使用して密度測定と同様の 25.0°C に制御した。測定中は、タンパク質の放射損傷を避けるために試料溶液をゆっくりと流動させた。WAXS データの解析は 2.1 節に則り行い、回転半径は Guinier プロットから算出した。

### 4.2.5 中性子小角散乱測定

SANS 測定は、J-PARC の BL15 TAIKAN 分光器を使用し、1.0~7.8 Å の波長の中性子を測定に用いた。試料セルには、光路長 1 mm の石英セルを使用し、露光時間は 1~3 時間であった。SANS 測定では、逆コントラスト変調法(Knoll et al., 1985)を採用した。測定温度は他の実験と同じ 25.0°C に合わせた。SANS データの解析は一般的な方法を用いた(Hirai et al., 2003)。

## 4.3 結果及び考察

### 4.3.1 糖溶液の密度から推定された散乱密度及びミオグロビンの散乱コントラスト

X 線と中性子を使用した溶液散乱法では、溶質粒子の散乱関数は溶質と溶媒の平均散乱密度の差、いわゆるコントラスト( $\Delta\rho$ )に依存する(Stuhrmann and Miller, 1978)。糖溶液の平均散乱密度は糖濃度に応じて変化するため、質量密度の測定から平均散乱密度を決定した。図 4.1A に、密度測定から得られた 25°C における糖溶液質量密度の質量糖濃度(%w/w)依存性を示す。 $x\%$ w/w 糖溶液の質量密度( $\rho_{\text{sugar}}$ )は次式で表される。

$$\rho_{\text{sugar}} = 1 / \left[ \frac{N_a}{100} \left\{ \frac{xv_{\text{sugar}}}{M_{\text{sugar}}} + \frac{(100-x)v_{\text{water}}}{M_{\text{water}}} \right\} \right] \quad (4.1)$$

ここで、 $v_{\text{sugar}}$ 、 $v_{\text{water}}$ 、 $M_{\text{sugar}}$ 、及び $M_{\text{water}}$ は、それぞれ、糖分子の排除体積、水分子の体積、及びそれらの分子量である。 $N_a$ はアボガドロ定数である。式(4.1)の最小二乗法から得られた糖の排除体積、及びこの値を用いて計算された電子密度と X 線散乱密度を表 4.1 に示す。表 4.1 の値から、次式を用いて溶媒の X 線平均散乱密度(ASD)を計算した。

$$\text{ASD} = \frac{N_a \rho_{\text{sugar}}}{100} \left( \frac{xv_{\text{sugar}} \text{ASD}_{\text{sugar}}}{M_{\text{sugar}}} + \frac{(100-x)v_{\text{water}} \text{ASD}_{\text{water}}}{M_{\text{water}}} \right) \quad (4.2)$$

式(4.2)から計算された糖溶液の平均散乱密度を図 4.1B に示す。PDB コード 1WLA(Maurus et al., 1997)の結晶構造を用いてミオグロビンの電子密度及び X 線平均散乱密度を計算すると、それぞれ  $0.424 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$  及び  $11.9 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  であった。ここで得られた糖溶液とミオグロビンの平均散乱密度から計算したミオグロビンのコントラスト  $\Delta\rho$  を図 4.1C に示す。図 4.1B、及び図 4.1C の値は理論散乱関

表 4.1. 糖分子の排除体積、電子密度、及び X 線平均散乱密度。

	トレハロース	スクロース	グルコース	フルクトース
排除体積 ( $\text{\AA}^3$ )	$353.3 \pm 0.4$	$355.0 \pm 0.2$	$189.7 \pm 0.7$	$187.0 \pm 0.3$
電子密度 ( $\text{e}/\text{\AA}^3$ )	0.5152	0.5127	0.5061	0.5134
散乱密度 ( $\times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ )	14.48	14.41	14.22	14.43

数のシミュレーションに使用した。

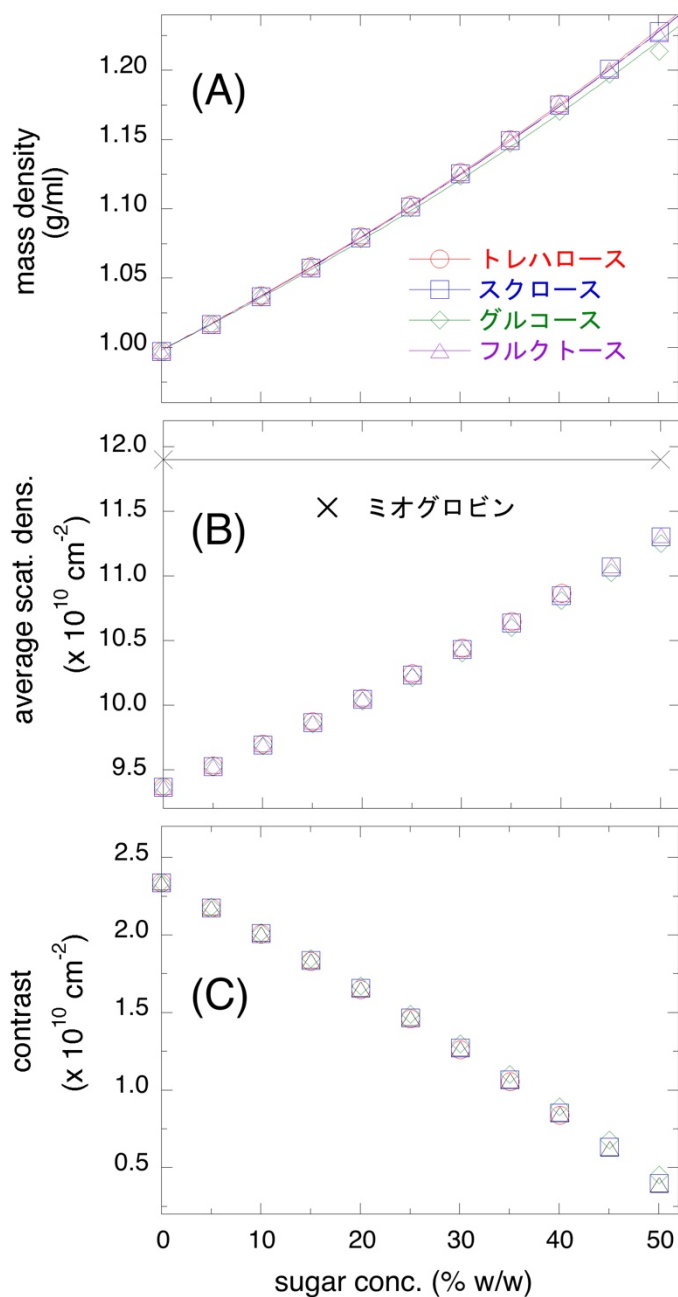


図 4.1. 25.0°Cにおける糖溶液の質量密度、X線平均散乱密度、ミオグロビンのコントラストの糖濃度(%w/w)依存性。(A)は質量密度(g/mL)、(B)はX線平均散乱密度( $\text{cm}^{-2}$ )、(C)はミオグロビンの散乱コントラスト( $\text{cm}^{-2}$ )。丸はトレハロース、四角はスクロース、菱形はグルコース、三角はフルクトースを示す。

### 4.3.2 ミオグロビン水和殻に対する二糖及び単糖の効果

ミオグロビン WAXS 曲線の糖濃度依存性を図 4.2 に示す。ここで、(A)から(D)は、それぞれトレハロース、スクロース、グルコース、フルクトース溶液中での測定結果である。スクロース、グルコース、及びフルクトースの濃度は、0 から 37.5%w/w まで変化させた。トレハロースは溶解度が比較的低いため、濃度は 0 ~32.5%w/w の範囲で変化させた。糖濃度の増加に伴い、 $q \approx 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  未満の小角領域の散乱強度が系統的に減少した。これは、コントラスト  $\Delta\rho$  の変化に起因する。しかし、小角領域の形状と勾配はほとんど維持されており、ミオグロビン三次構造の保存が示唆された。1.1~1.9  $\text{\AA}^{-1}$  の範囲はコントラストの変化に対する感度が低いため明確な変化を示さず、ミオグロビンの二次構造が、高糖濃度でも良好に保存されていることを示した。

図 4.3A、図 4.3B には、WAXS 曲線から得られた原点散乱強度の平方根  $I(0)^{1/2}$  及び回転半径  $R_g$  の糖濃度依存性を示す。 $I(0)^{1/2}$  はコントラストと体積の積に比例することが知られている(Stuhrmann and Miller, 1978)。糖濃度の増加に伴い  $I(0)^{1/2}$  の線形的な減少すべての糖でみられ、その傾向は特にトレハロースで明確であった。 $R_g$  は、タンパク質のサイズと形状の重要な指標であることが知られ

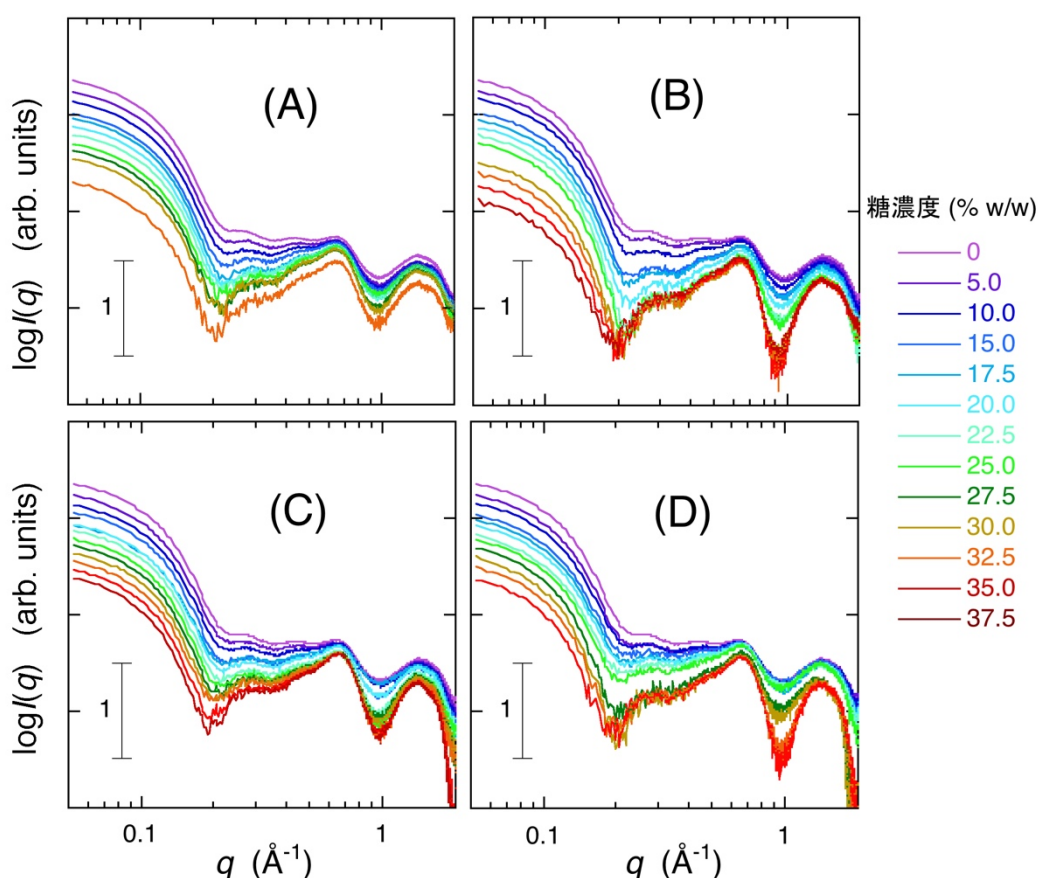


図 4.2. ミオグロビン WAXS 曲線の糖濃度依存性。(A)はトレハロース溶液中、(B)はスクロース溶液中、(C)はグルコース溶液中、(D)はフルクトース溶液中での測定結果。



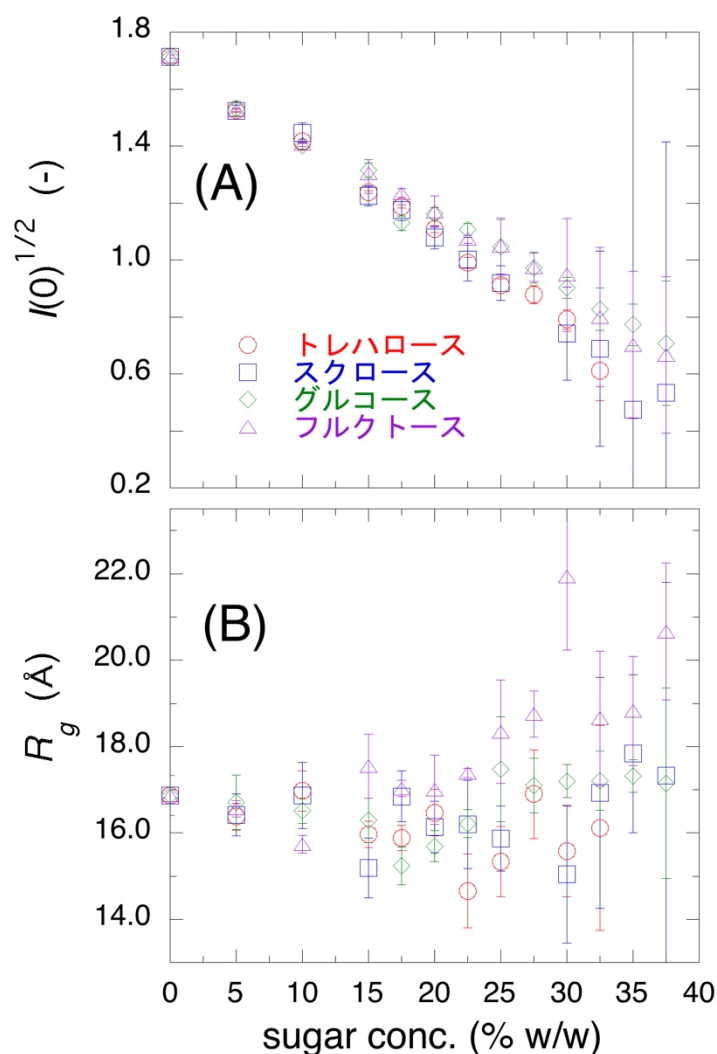


図 4.3. ミオグロビン WAXS 曲線から得られた(A)原点散乱強度の平方根  $I(0)^{1/2}$ 、及び (B)回転半径  $R_g$  の糖濃度依存性。丸はトレハロース溶液中、四角はスクロース溶液中、菱形はグルコース溶液中、三角はフルクトース溶液中のもの。

ている。球状タンパク質の場合、 $R_g$  はタンパク質表面を取り囲む溶媒和(水和)殻の密度にも依存する。トレハロース、スクロース、及びグルコース溶液の場合、 $R_g$  は一度約  $1.5 \sim 2 \text{ \AA}$  程度減少し、 $20 \sim 37.5\%w/w$  の糖濃度範囲では増加した。フルクトース溶液の場合、 $R_g$  の増加は  $15\%w/w$  から開始した。

これらの変化を解析するため、3章と同様に CRY SOL プログラムとミオグロビンの結晶構造データ(PDB コード: 1WLA)を使用して理論散乱関数のシミュレーションを実行した(Svergn et al., 1995; Svergun et al., 1998)。3章では糖溶液中での溶媒和モデルについて、選択的溶媒和モデルと選択的排除モデルを想定して理論散乱関数のシミュレーションを実施した。上記の 2 つのモデルは両極端な仮定に基づくものであり、その中間を埋める第 3 のモデルとして中性的溶媒和モデルを定義した。中性的溶媒和モデルでは、糖による水和水の置換が、糖の体

積分率に対応した特定の交換比(1未満)を掛けたものに比例すると仮定した。グリセロールの効果に関する分子動力学シミュレーション研究は、グリセリン水溶液中のタンパク質の選択的相互作用係数が、グリセロールのモル濃度と線形関係にあることを示している(Vagenende et al., 2009)。中性的溶媒和モデルでは、糖分子の排除に要するエネルギーが熱エネルギー $k_bT$ 以下の場合に、糖分子はタンパク質表面からわずかに排除される傾向を示すと想定している。上記の3つのモデルに基づく理論散乱関数の溶媒平均散乱密度依存性を図4.4に示す。

(A)は選択的溶媒和モデル、(B)は選択的排除モデル、(C)は中性的溶媒和モデルに基づく理論散乱関数である。溶媒平均散乱密度を  $9.365 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  から  $10.718 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  まで変化させたが、これは0から37.5%w/wの糖濃度に対応する。図4.4Aの選択的溶媒和モデルでは、溶媒和殻の平均散乱密度を糖溶媒の平均散乱密度の1.025から1.1倍まで変化させた。図4.4Bの選択的排除モデル(選択的水和モデル)の場合、水和殻の平均散乱密度をバルク水の1.05から1.1倍に固定した。図4.4Cの中性的(非選択的)溶媒和モデルでは、水和殻の平均散乱密度を $\beta$ で定義した特定の交換比率を糖の体積分率に掛けることで定義した。

$$D_{\text{shell}} = D_{\text{sugar}}\beta V_f + D_{\text{water}}(1 - \beta V_f) \quad (4.3)$$

ここで、 $D_{\text{shell}}$ 、 $D_{\text{sugar}}$ 、及び $D_{\text{water}}$ は、溶媒和殻、糖分子、及び水和殻(純水の1.1倍)の平均散乱密度である。 $V_f$ と $\beta$ はそれぞれ、糖の体積分率と交換比率 $\beta(\leq 1)$ である。 $\beta$ が1の場合、水和殻内の糖濃度が溶媒中の糖の体積分率と比例することを意味する。 $\beta$ が0の場合、選択的排除モデルと同じ状態となる。図4.4Cに示した理論散乱関数は、例として $\beta$ が0.5の場合を示す。図4.4では、溶媒の平均散乱密度(糖濃度)の上昇により、 $q = 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ 未満の小角領域のWAXS曲線が明らかに変化した。特に、図4.4Bの選択的排除モデルで大きな変化を示したことに注目すべきである。選択的排除モデルの小角散乱強度の変化は、他のモデルよりはるかに大きかった。

図4.5には、理論散乱関数から得られた $I(0)^{1/2}$ 及び $R_g$ と実験値との比較を示す。(A)が $I(0)^{1/2}$ 、(B)が $R_g$ であり、実験値と理論値は初期値で規格化して表示した。図4.5Aの $I(0)^{1/2}$ を見ると、実験値は全ての糖で選択的排除モデル及び中性的溶媒和モデルで説明できる。特に、二糖であるトレハロースとスクロースでは、全ての濃度範囲で選択的排除モデルに従った。単糖であるグルコース及びフルクトースでは、15%w/wより高濃度で選択的排除モデルからの逸脱が生じ、中性的溶媒和モデルの範囲内に収まった。糖濃度がさらに増加すると(>25%w/w)、実測値は $\beta = 1$ の理論値に近づいた。これは、糖分子がタンパク質表面に部分的に浸透することを示す。図4.5Bに示す実測 $R_g$ も、選択的排除モデルと中性的溶媒和モデルによってほとんど説明された。選択的排除モデルから中性的溶媒和

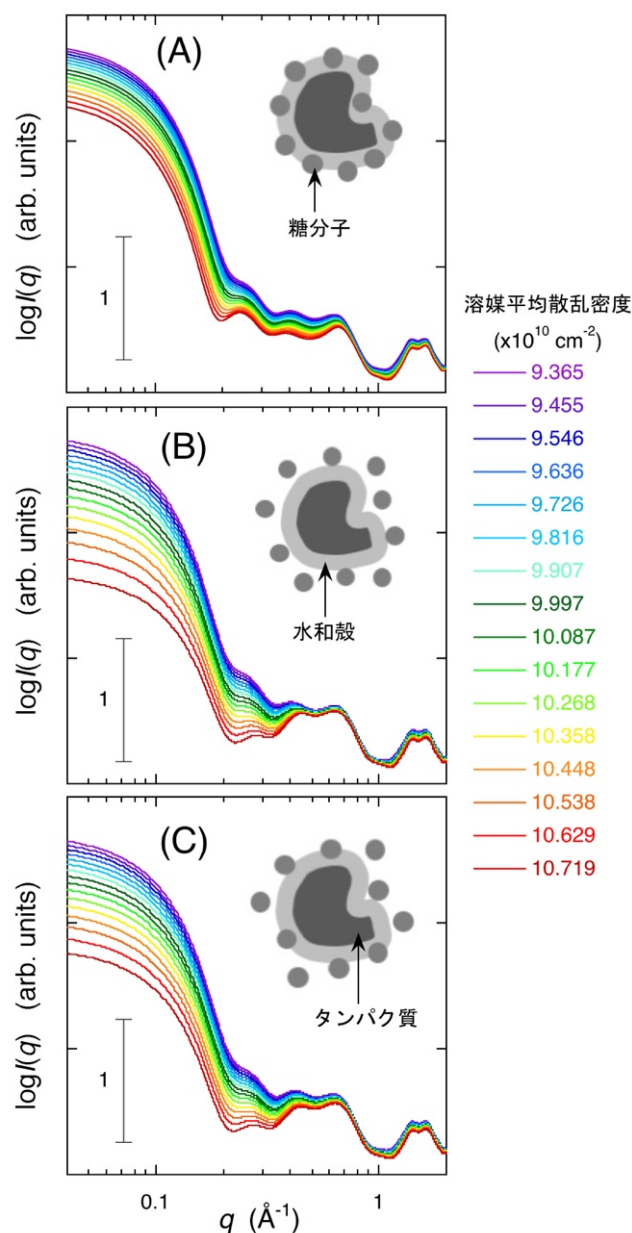


図 4.4. CRYSOLE プログラムから計算されたミオグロビン(PDB コード: 1WLA)の理論散乱関数の溶媒平均散乱密度依存性。(A)は水和殻内の水分子が選択的に糖分子に置き換えられる選択的溶媒和モデル、(B)は水和斥力により糖分子がタンパク質の水和殻領域から選択的に排除される選択的排除モデル、(C)は糖による水和水の置換が糖の体積分率に対応した特定の交換比  $\beta$  に比例すると仮定した中性的溶媒和モデルに基づきシミュレーションしたもの(例として  $\beta=0.5$  で計算したものを表示)。

モデルへの移行は、フルクトースでは15%w/wから始まり、他の糖では25~32.5% w/w の範囲から開始した。上記の結果は、低糖濃度では糖分子がタンパク質表面から本質的に排除されて天然の水和殻が保持され、高糖濃度では糖分子がタンパク質表面の水和殻へ部分的に浸透または置換する傾向があることを示すもの

である。

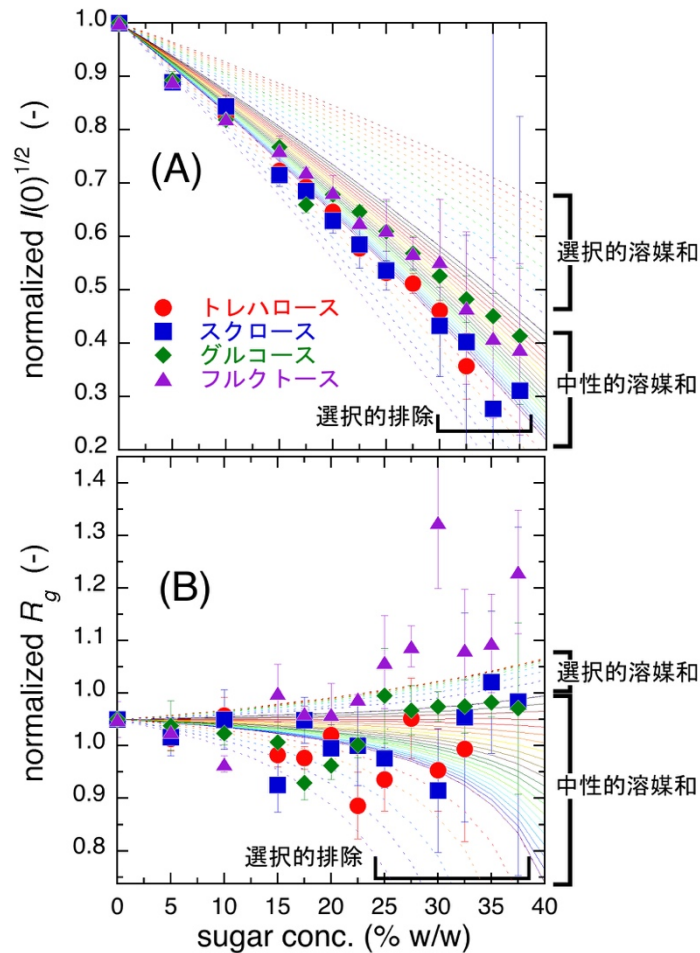


図 4.5. (A)原点散乱強度の平方根  $I(0)^{1/2}$ 、及び(B)回転半径  $R_g$  の理論値と実測値の比較。シンボルは実測値、線は理論値を示す。赤丸はトレハロース溶液中、青四角はスクロース溶液中、緑三角はグルコース溶液中、紫三角はフルクトース溶液中で実測したもの。選択的溶媒和モデルでは水和殻の散乱密度を溶媒の 1.025 倍から 1.1 倍の範囲でシミュレーションした。選択的水和モデルでは、水和殻の散乱密度を溶媒の 1.05 倍から 1.1 倍の範囲でシミュレーションした。中性的溶媒和モデルでは  $\beta$  の範囲は 0 から 1 でシミュレーションした。

#### 4.3.2 塩酸グアニジンの化学変性に対する糖による抑制作用

塩酸グアニジン(GdnHCl)は、タンパク質のフォールディング研究で広く使用されている強力な変性剤の 1 つである(Ball and Hallsworth, 2015; Bai et al., 1995)。塩酸グアニジンは水の構造を破壊するカオトロプの一種であり、疎水性凝集体を不安定化し、疎水性物質の溶解度を高める(O'Brien et al., 2007)。対照的に、

糖は溶液中のタンパク質及び疎水性凝集体を安定化するコスモトロップとして振る舞い、それにより疎水性物質の溶解性を低下させる。本実験では塩酸グアニジン濃度を 2.75 M、糖濃度を 10%w/w まで上げた。この系では、カオトロップである塩酸グアニジンとコスモトロップである糖の競合により、疎水性相互作用の強度が複雑に変化することが予想された。図 4.6 には、(A)糖非存在下、(B)5% w/w トレハロース、(C)10%w/w トレハロース、(D)10%w/w スクロース、(E)10% w/w グルコース、及び(F)10%w/w フルクトース溶液中における、ミオグロビン WAXS 曲線の塩酸グアニジン濃度依存性を示す。挿入図は、WAXS 曲線より計算された距離分布関数  $p(r)$  である。2 章でも述べたように、WAXS 曲線はそれぞれの  $q$  範囲が異なる階層構造領域、すなわち、三次構造( $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ )、内部構造( $0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ )、二次構造( $1.1 \text{ \AA}^{-1} < q < 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ )に対応している(Hirai et al., 2002; Hirai et al., 2004)。糖の非存在下では(図 4.6A)、塩酸グアニジン濃度 1.25 M から 2.75 M にかけて小散乱角領域( $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ )及び中角領域( $0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ )のモジュレーションの単調化が生じた。これは、塩酸グアニジンがミオグロビン三次構造の変性を誘起したことを明確に示している。ただし、二次構造を反映する高角領域( $1.1 \text{ \AA}^{-1} < q < 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ )の変化は比較的小さく、この実験では、塩酸グ

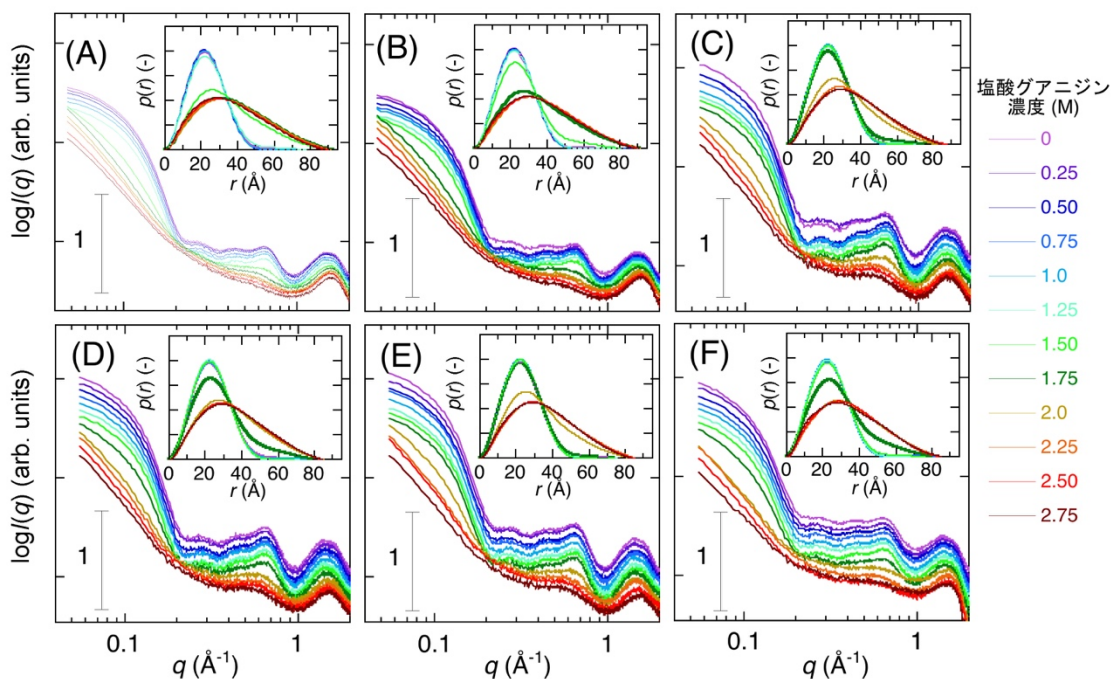


図 4.6. ミオグロビン WAXS 曲線の塩酸グアニジン濃度依存性。挿入図は WAXS 曲線から得られた距離分布関数  $p(r)$ 。塩酸グアニジン濃度範囲は 0 から 2.75 M。(A)は無糖溶液中、(B)は 5%w/w トレハロース溶液中、(C)は 10%w/w トレハロース溶液中、(D)は 10%w/w スクロース溶液中、(E)は 10%w/w グルコース溶液中、(F)は 10%w/w フルクトース溶液中で測定したもの。

アニジン最高濃度の 2.75 M であっても二次構造が部分的に保存されていることが示唆された。三次構造及び内部構造領域の WAXS 曲線の変化が開始する塩酸グアニジン濃度は、5%w/w 糖溶液では 0.25 M、10%w/w 糖溶液では 0.5 M 程度上昇した。これらのデータは、糖によるタンパク質天然構造の保護作用を示す。この傾向は、内部構造領域でより明確に見られた。タンパク質の三次構造を反映する  $p(r)$  関数は、塩酸グアニジン濃度を上げると、特定の濃度で対称なベル型のプロファイルからテーリングした非対称なプロファイルへ顕著に変化した。 $r > 0, p(r) = 0$  を満たす  $r$  は  $D_{\max}$  と呼ばれタンパク質の最大直径を示すが、この  $D_{\max}$  は約 50 Å から 85~90 Å へ増加し、三次構造のアンフォールディングを示唆した。アンフォールディングが開始する塩酸グアニジン濃度は、グルコースで最も高く、次点がトレハロース、スクロース及びフルクトースは比較的長くほぼ同じであった。この傾向は、後に示す  $R_g$  の変化傾向と一致した。

図 4.7 は、図 4.6 の WAXS 曲線の Kratky プロット ( $q^2 I(q)$  vs.  $q$ ) を示す。Kratky プロットは、高分子鎖の剛直性を特徴付けるために広く適用されている (Glatter and Kratky, 1982)。無糖溶液 (図 4.7A) では、 $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  に現れるピークが塩酸グアニジン濃度の増加とともに平坦になり、球状タンパク質構造が広がった形状に変化したことを示す。高分子鎖としてのペプチド骨格の剛直性の特徴は、 $q > 0.25 \text{ \AA}^{-1}$  の高角領域に現れる。塩酸グアニジン濃度を 2.0 M に上げると、 $q < 0.8 \text{ \AA}^{-1}$  の範囲で、曲線が単調な直線へ変化した。これは、ペプチド骨格が持続曲率を持つ持続鎖から、単純持続鎖へ変化したことを示す。一方、糖の存在下では、塩酸グアニジンの最高濃度 2.75 M でも持続曲率を持つ持続鎖の特徴が維持された。図

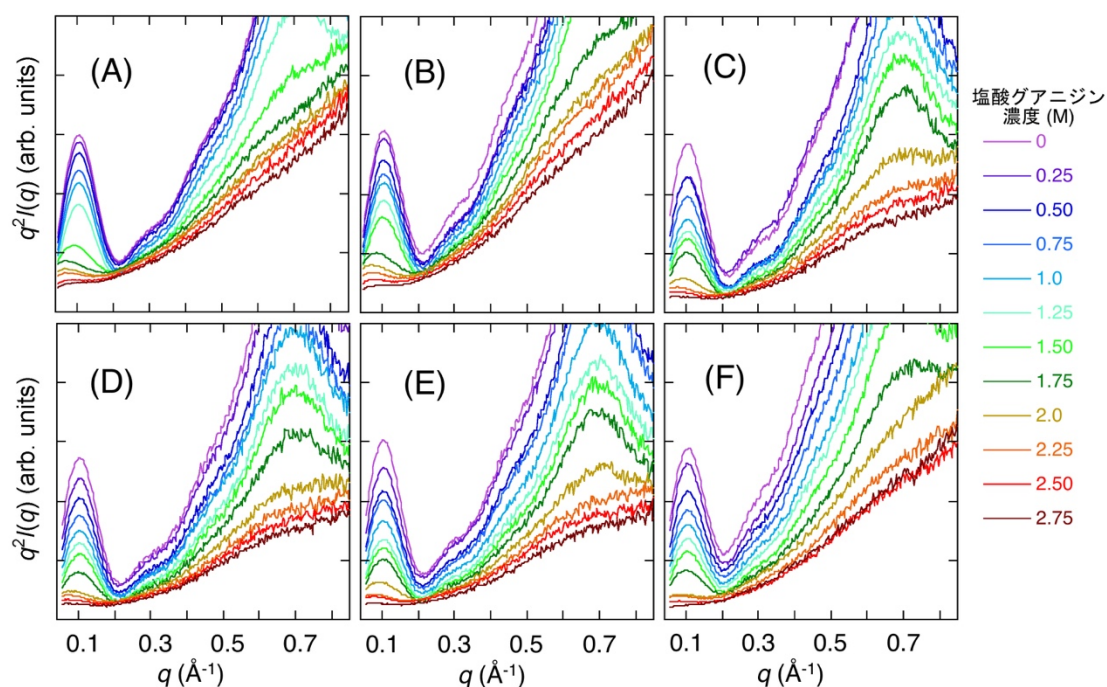


図 4.7. ミオグロビン WAXS 曲線の Kratky プロット。図の配置は図 4.6 と同様。

4.8 には、WAXS 曲線から得られた  $R_g$  を示す。0%及び 5%w/w の糖溶液は塩酸グアニジン 2.5 M 以上で  $R_g$  の減少が見られたが、これは小角領域の散乱データの欠損により生じるアーティファクトである。したがって、図 4.8 では、塩酸グアニジン 2.0 M 未満の  $R_g$  値をシグモイド関数でフィッティングし、転移中点の塩酸グアニジン濃度  $c_m$  を決定した(表 4.2)。  $c_m$  の上昇量は、5%w/w 糖溶液で 0.15~0.20 M、10%w/w 糖溶液で 0.33~0.52 M であった。質量濃度で比較すると、グルコースの  $c_m$  の増加量が最も大きく、モル濃度で比較するとトレハロースで最大の上昇量となった。興味深いことにこの 2 つの糖は両者ともアルドースである。

WAXS 曲線は、ミオグロビンの三次構造( $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ )、内部構造( $0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ )、二次構造( $1.1 \text{ \AA}^{-1} < q < 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ )の階層構造全体をカバーするため、異なる階層構造領域別に塩酸グアニジンによるミオグロビンの変性を特徴付けることができる。ここでは、2 章で述べた遷移多重度解析法(TMA 法)を使用した(Hirai et al., 2004; Hirai et al., 1999)。この方法を用いることで、変性過程における天然構造のモル分率を各階層構造別に求めることが可能となる。図 4.9 は、ミオグロ

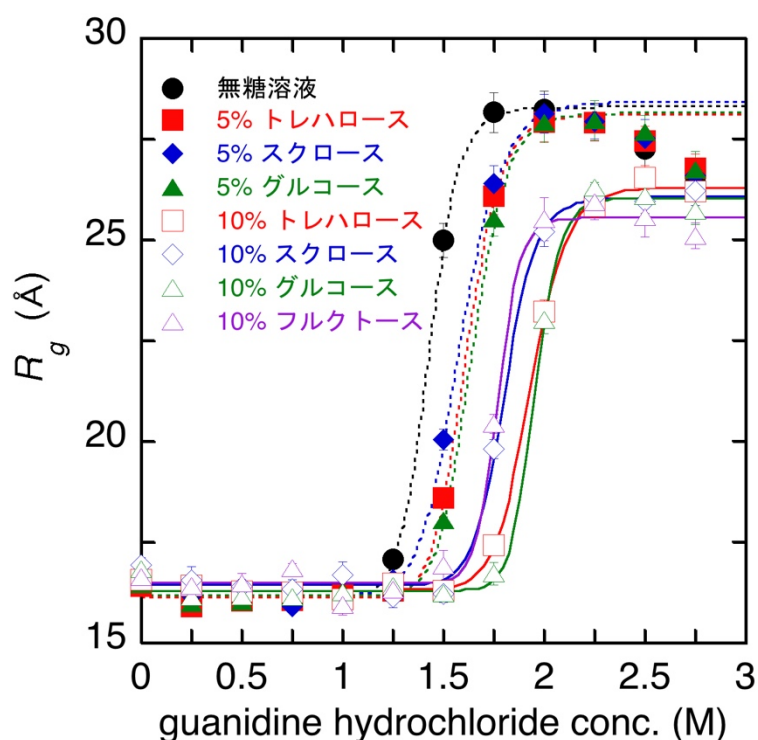


図 4.8. ミオグロビンの回転半径  $R_g$  の塩酸グアニジン濃度依存性。黒丸は無糖溶液中、黒四角は 5%トレハロース溶液中、黒菱形は 5%スクロース溶液中、黒三角は 5%グルコース溶液中、白四角は 10%トレハロース溶液中、白菱形は 10%スクロース溶液中、白三角は 10%グルコース溶液中、白下三角は 10%フルクトース溶液中のもの。線はシグモイド関数でフィッティングしたもの。

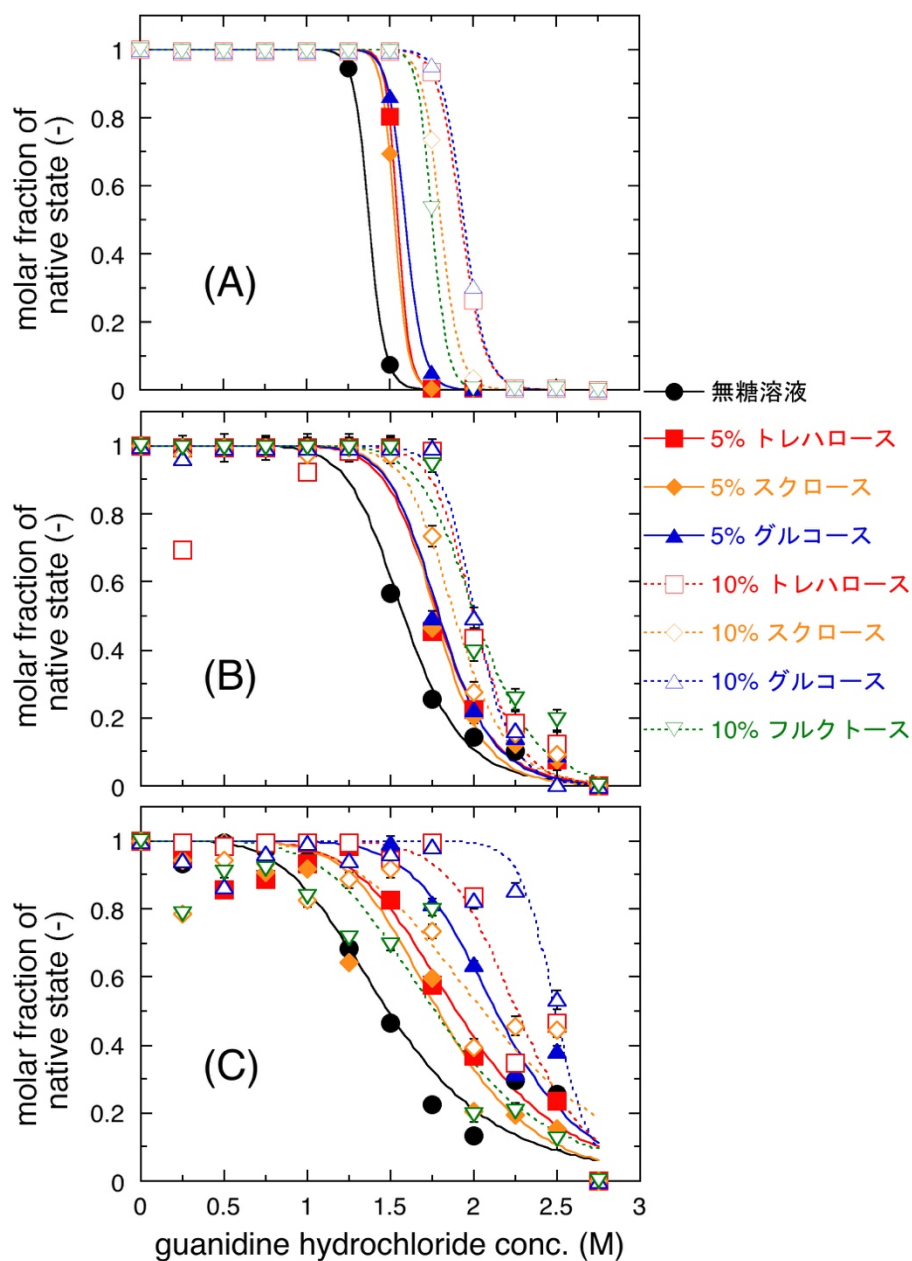


図 4.9. TMA 法から得られたミオグロビン天然構造のモル分率の塩酸グアニジン濃度依存性。(A)は三次構造領域( $q = 0.05 \sim 0.20 \text{ \AA}^{-1}$ )、(B)は内部構造領域( $q = 0.25 \sim 0.80 \text{ \AA}^{-1}$ )、(C)は二次構造領域( $q = 1.30 \sim 1.80 \text{ \AA}^{-1}$ )を解析したもの。シンボルは実測値、線はシグモイド関数でフィッティングしたもの。

ビンの三次構造、内部構造、二次構造にそれぞれ対応した天然構造のモル分率の塩酸グアニジン濃度依存性を示す。ここでも  $R_g$  と同様にシグモイド関数でフィッティングし、天然構造のモル分率が 0.5 となる中点濃度  $c_m$  を決定した(表 2)。無糖溶液中では、三次構造の  $c_m$  は内部構造及び二次構造の  $c_m$  と比較して約 0.2 M 低く、塩酸グアニジンによる変性過程で三次構造の変化が先行することを示唆した。糖溶液中では、10%w/w の糖濃度で  $c_m$  は 0.5~1.0 M と大幅に上昇した。



表 4.2. ミオグロビン構造の各階層における塩酸グアニジンの変性中点濃度<sup>a</sup>

	(A) 三次構造 $q = 0.05\sim 0.20 \text{ \AA}^{-1}$	(B) 内部構造 $q = 0.25\sim 0.80 \text{ \AA}^{-1}$	(C) 二次構造 $q = 1.30\sim 1.80 \text{ \AA}^{-1}$	(D) 回転半径
無糖溶液	$1.38 \pm 0.01 \text{ M}$	$1.58 \pm 0.03 \text{ M}$	$1.49 \pm 0.07 \text{ M}$	$1.43 \pm 0.01 \text{ M}$
5% トレハロース溶液	$1.55 \pm 0.01 \text{ M}$	$1.78 \pm 0.03 \text{ M}$	$1.89 \pm 0.06 \text{ M}$	$1.61 \pm 0.01 \text{ M}$
5% スクロース溶液	$1.53 \pm 0.01 \text{ M}$	$1.77 \pm 0.02 \text{ M}$	$1.79 \pm 0.08 \text{ M}$	$1.58 \pm 0.01 \text{ M}$
5% グルコース溶液	$1.59 \pm 0.01 \text{ M}$	$1.79 \pm 0.03 \text{ M}$	$2.13 \pm 0.05 \text{ M}$	$1.64 \pm 0.01 \text{ M}$
10% トレハロース溶液	$1.93 \pm 0.01 \text{ M}$	$2.00 \pm 0.05 \text{ M}$	$2.26 \pm 0.06 \text{ M}$	$1.93 \pm 0.01 \text{ M}$
10% スクロース溶液	$1.81 \pm 0.01 \text{ M}$	$1.89 \pm 0.02 \text{ M}$	$2.1 \pm 0.1 \text{ M}$	$1.80 \pm 0.01 \text{ M}$
10% グルコース溶液	$1.94 \pm 0.01 \text{ M}$	$2.01 \pm 0.01 \text{ M}$	$2.49 \pm 0.03 \text{ M}$	$1.95 \pm 0.01 \text{ M}$
10% フルクトース溶液	$1.76 \pm 0.01 \text{ M}$	$2.01 \pm 0.03 \text{ M}$	$1.8 \pm 0.1 \text{ M}$	$1.76 \pm 0.01 \text{ M}$

<sup>a</sup>変性中点濃度  $c_m$  は、A 列、B 列、C 列では図 4.9 に示す天然構造モル分率から、D 列は図 4.8 に示す回転半径  $R_g$  から計算した。

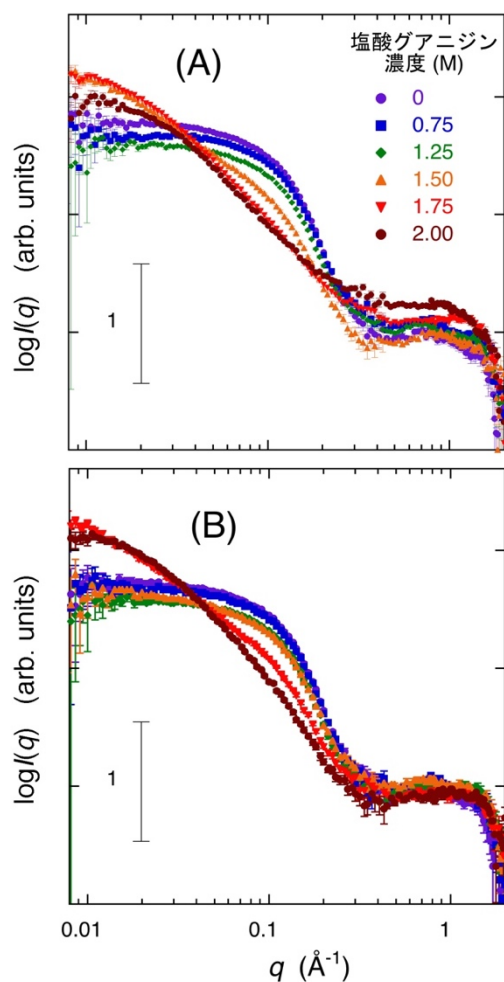


図 4.10. ミオグロビン SANS 曲線の塩酸グアニジン濃度依存性。(A)は無糖溶液中、(B)は 5%w/w グルコース溶液中で測定したもの。溶媒は 100%重水緩衝液を用い、グルコースは[重水素化物]/[軽水素化物]=0.706/0.294 (M/M)の混合物を使用し、散乱長密度を重水と一致させた。塩酸グアニジン濃度は 2.0 M まで上げた。

また、トレハロースとグルコースではスクロースとフルクトースに比べて二次構造の保護作用がより明確に生じた。塩酸グアニジンの添加は糖の添加と同様に溶媒の平均散乱密度を変化させることに注意が必要であるが、密度測定から推定したところ 0 M から 2.75 M へ濃度を上げて溶媒の平均散乱密度は  $9.365 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  から  $9.533 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  へ増加するにすぎない。この増加量は、図 4.2 に示した糖の添加による変化と比較すると限定的であり、図 4.6 に示した WAXS 曲線の変化は、塩酸グアニジン添加によるタンパク質構造の変化を反映しており、コントラストの変化による影響は小さいと考えられる。

WAXS の結果を確認するため、逆コントラスト変調法を用いた SANS 測定を実行した。3 章と同様に重水素化グルコースを用いることで、糖の添加によるコントラスト変化の散乱曲線への影響を回避した。図 4.10 にミオグロビン SANS 曲線の塩酸グアニジン濃度依存性を示す。(A)は無糖重水溶液中、(B)はグルコース重水溶液中のものである。図 4.11 には、図 4.10 から計算された  $R_g$  の塩酸グアニジン濃度依存性を示す。ここで、SANS と WAXS ではミオグロビンのコントラストプロファイルが異なるため、 $R_g$  の絶対値が本質的に異なることに注意が必要である。図 4.11 を見ると、 $R_g$  は塩酸グアニジン濃度の上昇に伴い無糖溶液で  $14.1 \pm 0.2 \text{ \AA}$  から  $26.3 \pm 0.8 \text{ \AA}$  へ、5%w/w グルコース溶液では  $14.2 \pm 0.2 \text{ \AA}$  から  $26.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$  へ増加した。この変化傾向は WAXS から得られた  $R_g$ (図 4.8)の傾向とよく一致し、糖の添加によるコントラスト変化が WAXS 測定結果へ大きく影響していないことが確認された。

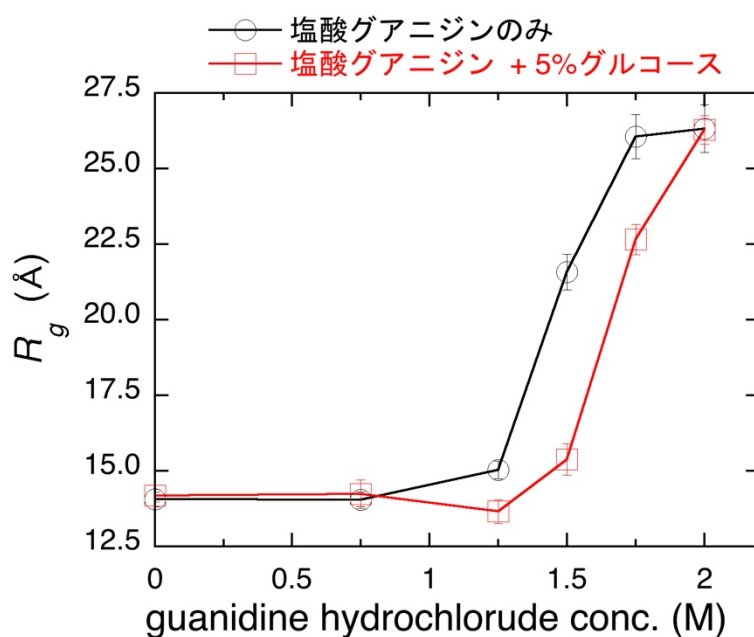


図 4.11. ミオグロビン SANS 曲線から計算した回転半径  $R_g$  の塩酸グアニジン濃度依存性。丸は無糖溶液中、四角は 5%w/w グルコース溶液中で測定したもの。

ミオグロビンは、1つのヘムを持つポルフィリン含有金属タンパク質である。ヘムのソーレーバンド(409 nm)の可視光吸収を観察することにより、ヘムを取り巻く微細構造に対する塩酸グアニジン及び糖の影響を解析した。図 4.12 に、ミオグロビンの紫外可視吸光スペクトルの塩酸グアニジン濃度依存性を示す。(A)は無糖溶液、(B)は 20%w/w トレハロース溶液、(C)は 20%w/w スクロース溶液中で測定したものである。図 4.13 にソーレーバンド(409 nm)の吸収強度を、タンパク質濃度を反映する 280 nm の吸収強度で割ったもの、つまりタンパク質濃度で規格化したソーレーバンドの吸収強度を示す。塩酸グアニジンの添加によって

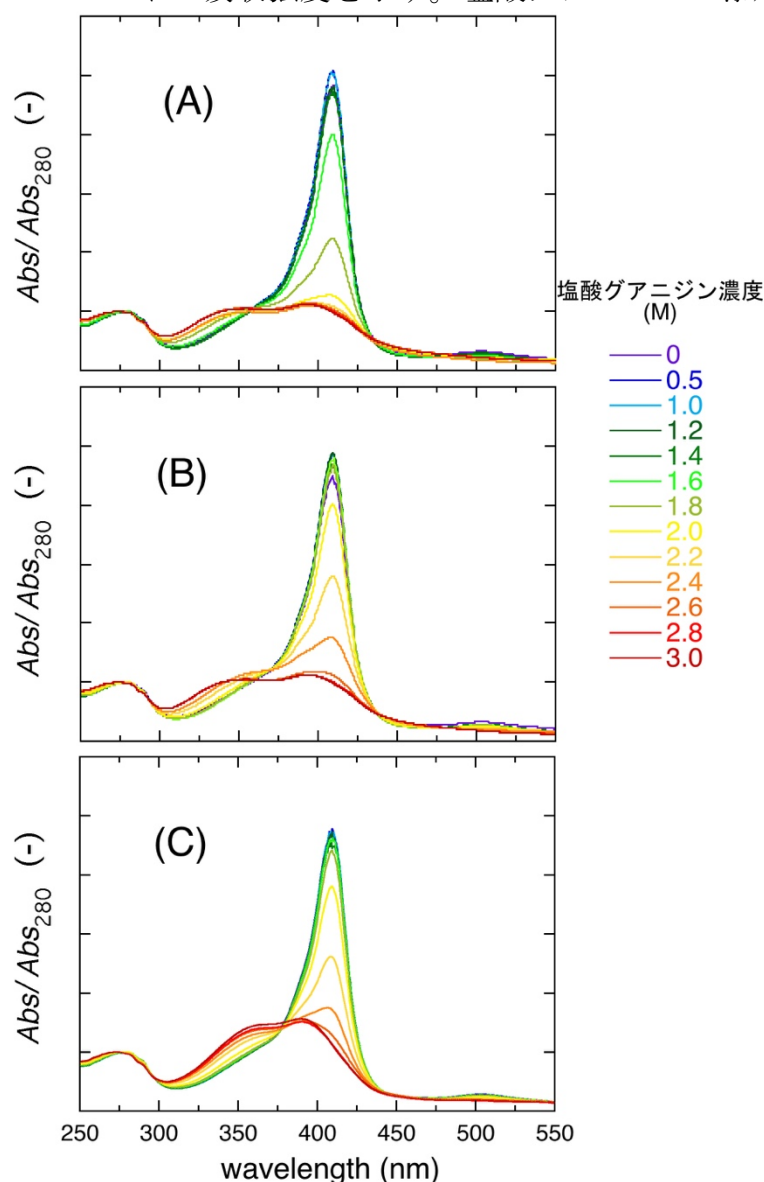


図 4.12. ミオグロビンの紫外可視吸光スペクトルの塩酸グアニジン濃度依存性。(A)は無糖溶液中、(B)は 20%w/w トレハロース溶液中、(C)は 20%w/w スクロース溶液中で測定したものを。タンパク質濃度に対応する 280 nm の吸光度で規格化した。

ミオグロビンのヘムが脱離するため、ソーレーバンドの吸収強度は減少する。20%w/w 糖溶液中では、ヘム脱離の生じる酸塩グアニジン濃度が無糖溶液に比べて約 0.5 M 上昇した。この結果は、WAXS 及び SANS の結果を補強するものであった。

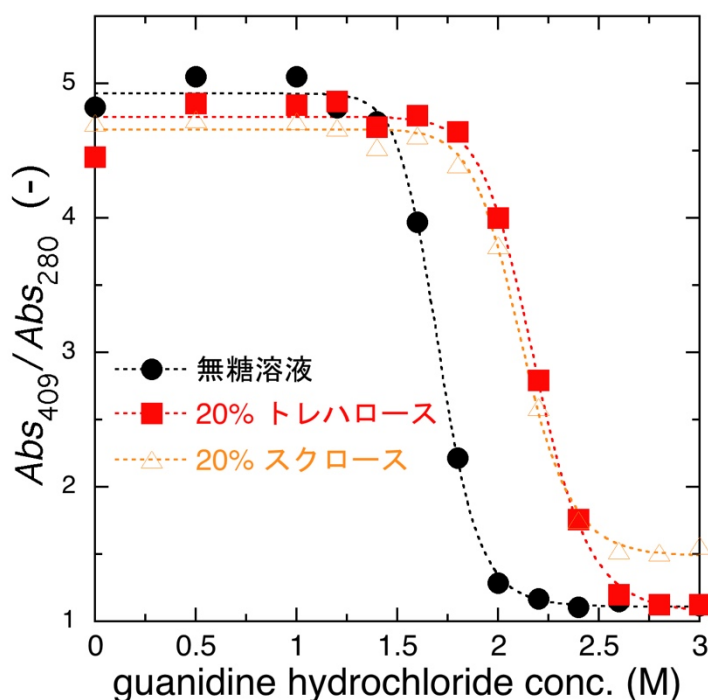


図 4.13. ミオグロビンのソーレーバンド(409 nm)吸光度の塩酸グアニジン濃度依存性。丸は無糖溶液中、四角は 20%w/w トレハロース溶液中、三角は 20%w/w スクロース溶液中のもの。280 nm の吸光度で規格化して表示した。

#### 4.3.3 熱変性に対する糖による抑制作用

ミオグロビンは、高温や酸性、アルカリ性による変性過程でアミロイド構造を形成することが知られている(Fändrich et al., 2001; Fändrich et al., 2003)。ここでは、ミオグロビンの高温変性及びアミロイド様凝集体形成に対するトレハロース、スクロース、グルコース、及びフルクトースの効果を検討した。糖濃度は 10%w/w 及び 20%w/w を用いた。図 4.14 にミオグロビン WAXS 曲線の温度依存性を示す。(A)は無糖溶液中、(B)は 20%w/w トレハロース溶液中、(C)は 20%w/w グルコース溶液中のものである。矢印は、ミオグロビンのアミロイド転移の初期過程に現れる典型的な特徴を示す(Onai et al., 2007; Malinchik et al., 1998)。 $q = 0.08 \text{ \AA}^{-1}$ 、 $0.58 \text{ \AA}^{-1}$ 、及び  $1.34 \text{ \AA}^{-1}$  の矢印はそれぞれ、アミロイドオリゴマーの形成、

プリーツ  $\beta$  シートのスタッキング、及びヘリックスからシート(クロス  $\beta$  構造)への構造転移に対応している。20%w/w の糖濃度では、すべての糖(トレハロース、スクロース、グルコース、及びフルクトース)でオリゴマー形成が抑制された。10%w/w の糖濃度でも、単糖であるグルコース及びフルクトースではオリゴマー形成が抑制された。この単糖では、プリーツ  $\beta$  シートのスタッキングも 21%

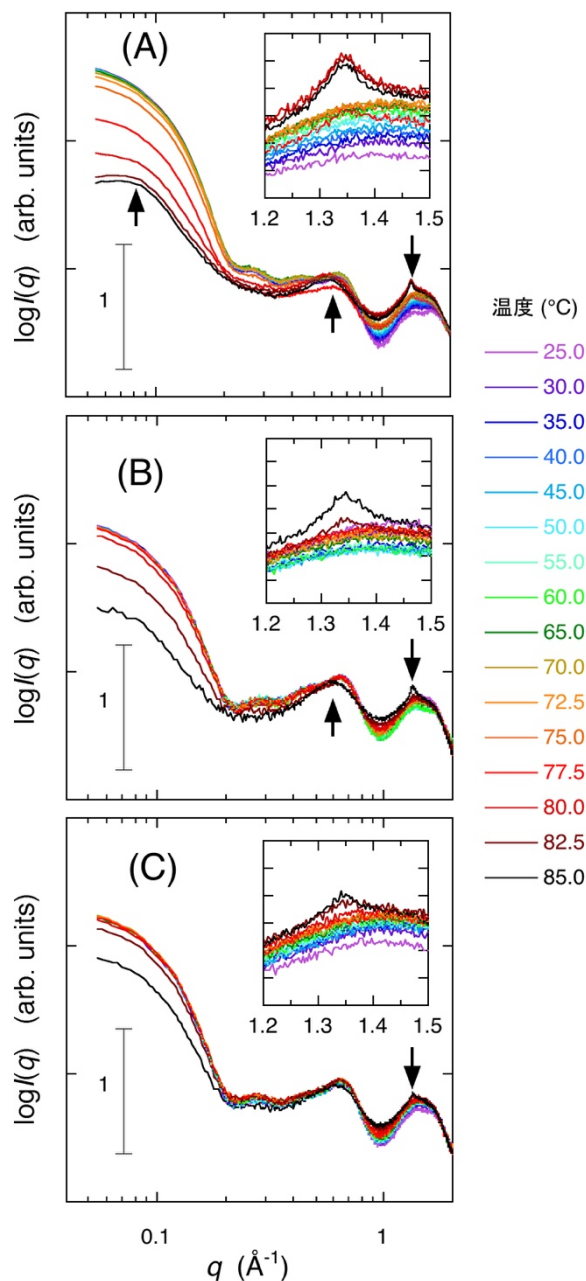


図 4.14. ミオグロビン WAXS 曲線の温度依存性。(A)は無糖溶液中、(B)は 20%w/w トレハロース溶液中、(C)は 20%w/w グルコース溶液中で測定したもの。温度は 25°C から 85°C まで昇温した。矢印はアミロイド転移によって生じる特徴的なピークを示す。挿入図はピークの現れる高角領域の拡大図。

w/w で抑制された。

前節と同様に、TMA 法を用いて階層構造領域別の熱安定性を評価した。 $q$  範囲には、 $0.05\sim 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ 、 $0.25\sim 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ 、 $0.55\sim 0.65 \text{ \AA}^{-1}$ 、 $1.30\sim 1.38 \text{ \AA}^{-1}$  を用いた。これらの領域はそれぞれ、三次構造、内部構造、プリーツ  $\beta$  シートのスタッキング、及びクロス  $\beta$  構造の構造転移に対応する。後ろ 2 つの領域はアミロイド転移に固有のものである。図 4.15 に領域別の天然構造モル分率の温度依存性を示す。ここから得られた構造転移の midpoint 温度  $T_m$  を表 3 に示す。無糖溶液では、全ての階層構造で  $T_m$  が  $78\pm 1^\circ\text{C}$  の範囲に収まり、熱による構造転移が各階層で協調的に進行することを示唆した。糖濃度 20%w/w では、全ての階層構造で  $T_m$  が  $4\sim 5^\circ\text{C}$  上昇した。アミロイド転移に対応する領域の  $T_m$  は、三次構造及び内部構造に対応する領域に比べて僅かに大きく上昇した。熱変性に対する糖による保

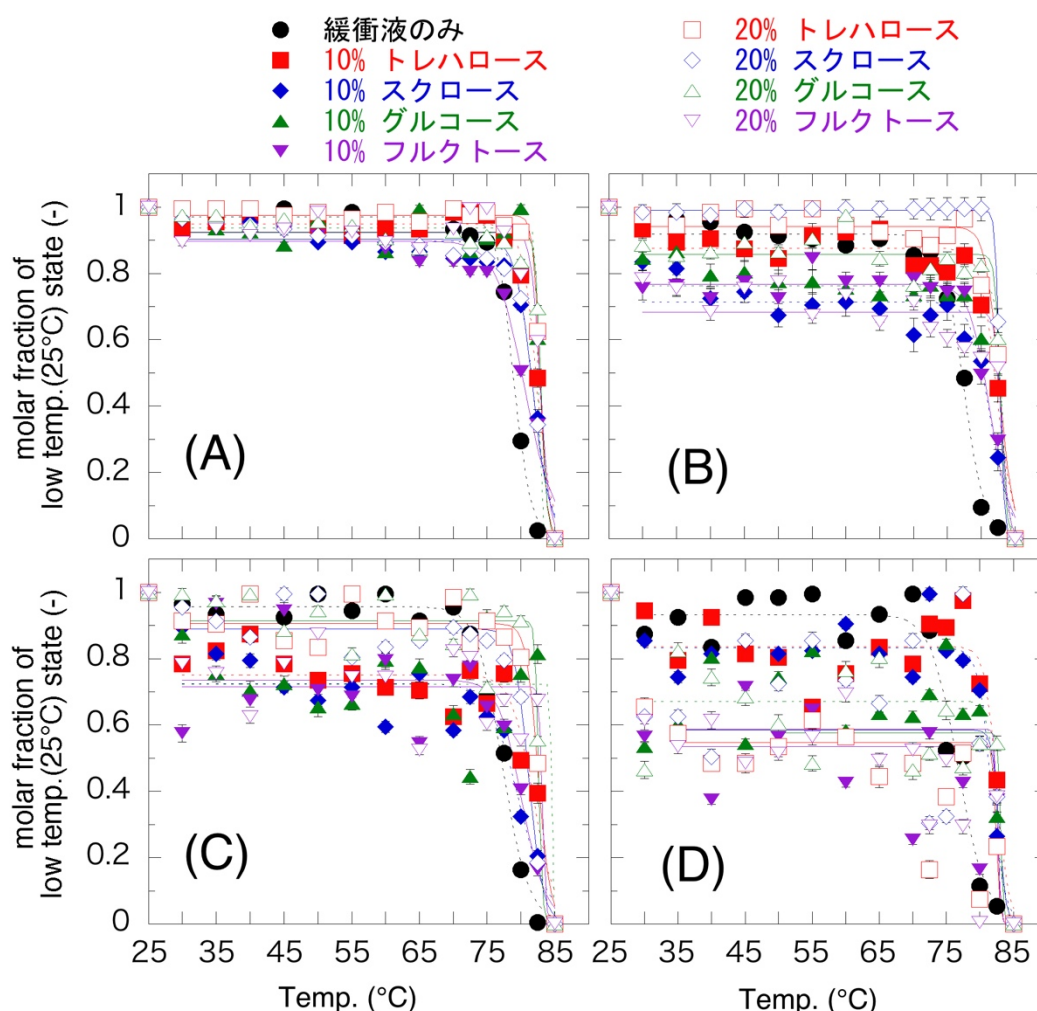


図 4.15. TMA 法から得られたミオグロビン天然構造のモル分率の温度依存性。(A)は三次構造領域( $q = 0.05\sim 0.20 \text{ \AA}^{-1}$ )、(B)は内部構造領域( $q = 0.25\sim 0.80 \text{ \AA}^{-1}$ )、(C)はプリーツ  $\beta$  シートスタッキング( $q = 0.55\sim 0.65 \text{ \AA}^{-1}$ )、(D)はクロス  $\beta$  構造( $q = 1.30\sim 1.38 \text{ \AA}^{-1}$ )に対応する。シンボルは実測値、線はシグモイド関数でフィッティングしたもの。

護作用が全ての階層構造領域に同程度で発揮されたが、これは塩酸グアニジン変性の場合とは対照的であった。

表 4.3. ミオグロビン構造の各階層における熱変性中点温度<sup>a</sup>

	(A) 三次構造 $q = 0.05\sim 0.20 \text{ \AA}^{-1}$	(B) 内部構造 $q = 0.25\sim 0.80 \text{ \AA}^{-1}$	(C) シートスタッキング $q = 0.55\sim 0.65 \text{ \AA}^{-1}$	(D) cross- $\beta$ 構造 $q = 1.30\sim 1.38 \text{ \AA}^{-1}$
無糖溶液	78.9 ± 0.1 °C	77.3 ± 0.2 °C	77.2 ± 0.2 °C	76.7 ± 0.5 °C
10% トレハロース溶液	82.3 ± 0.2 °C	82.3 ± 0.3 °C	81.8 ± 0.5 °C	82.5 ± 0.4 °C
10% スクロース溶液	81.8 ± 0.3 °C	81.4 ± 0.4 °C	79.8 ± 0.7 °C	81.7 ± 0.3 °C
10% グルコース溶液	82.7 ± 0.4 °C	83.1 ± 0.7 °C	83.8 ± 0.5 °C	82.4 ± 0.4 °C
10% フルクトース溶液	80.6 ± 0.4 °C	81.3 ± 0.3 °C	80.2 ± 0.9 °C	82.8 ± 0.9 °C
20% トレハロース溶液	82.8 ± 0.1 °C	82.6 ± 0.2 °C	82.5 ± 0.2 °C	82.4 ± 0.7 °C
20% スクロース溶液	81.7 ± 0.2 °C	82.7 ± 0.1 °C	81.1 ± 0.3 °C	82.5 ± 0.4 °C
20% グルコース溶液	83.0 ± 0.2 °C	82.9 ± 0.7 °C	82.7 ± 0.2 °C	83.1 ± 0.8 °C
20% フルクトース溶液	82.9 ± 0.2 °C	83.0 ± 0.7 °C	83.1 ± 0.5 °C	82.7 ± 0.9 °C

<sup>a</sup>熱変性中点温度  $T_m$  は、図 4.15 に示す天然構造モル分率から求めた。(C)及び(D)はアミロイド転移に特徴的な構造転移。

#### 4.4 結言

X線及び中性子散乱法、及び理論的シミュレーションにより、ミオグロビンの熱変性及び化学変性に対する糖の保護作用の分子メカニズムを明らかにした。タンパク質の水和(溶媒和)に対する糖の影響を主に解析した結果、下記の結果が得られた。

- (1) タンパク質の溶媒和殻に対する糖の影響に関して、糖分子はタンパク質表面から選択的に排除または弱く排除され、天然の水和殻が保存された。選択的排除モデル及び中性的溶媒和モデルから得られた各パラメーターの理論値は、実験結果を定性的に説明した。この傾向は、質量濃度で比較した場合、二糖であるトレハロース及びスクロースで顕著であった。糖濃度が20~25% w/w より高くなると、選択的排除(選択的水和)から中性的溶媒和(水和殻領域への糖の部分的浸透)への移行が観察された。フルクトースの場合、この移行は他の糖と比較して低濃度(15%w/w 未満)から始まった。
- (2) ミオグロビンの塩酸グアニジンによる化学変性に対する糖の保護作用に関して、糖の存在下では全ての階層構造で変性が抑制され、この保護作用は特に二次構造に対して顕著であった。塩酸グアニジンの変性中点濃度は、10% w/w の糖溶液中で0.5~1.0 M 上昇した。この現象はすべての糖で観察され、5%w/w の低糖濃度でも見られた。
- (3) ミオグロビンの熱変性に対する糖の保護作用に関して、糖の存在下では、全ての階層構造レベルでの構造転移温度が上昇し、その保護作用は各階層間で協調的であった。質量濃度で比較すると、二糖に比べて単糖で保護作用が大

きく現れた。

上記の結果は、化学変性条件及び熱変性条件における、糖によるタンパク質天然構造の保護作用が、天然の水和殻の保存に強く関係していることを示唆する。この傾向は、トレハロースとグルコースでより明確に見られた。極限環境生物が高温または低温、乾燥、浸透圧などの外部ストレス下で糖を蓄積することがよく知られており、トレハロースは特に注目されている(Welnicz et al., 2011; Feofilova et al., 2014; Lunn et al., 2014)。本章の研究では、単糖(グルコース、フルクトース)と二糖(スクロース、トレハロース)を用いた。前者は還元糖であり、意図しない糖化反応により生体分子の機能を損なわせる(Bunn and Higgins, 1981)。後者は非還元糖に分類され、化学的に安定である。また、トレハロースはスクロースよりも高いガラス転移温度(Crowe et al., 1998)と分子の柔軟性(Simperler et al., 2006)を持つ。今回の結果は、タンパク質の変性に対するトレハロースの保護作用に他の糖と比べて僅かな違いがあることを示したが、トレハロースだけが有すると想定されている突出した保護効果は観測されなかった。



## 第5章 ミオグロビンの酸変性及びアミロイド様凝集体形成に対するトレハロースの効果

### 5.1 緒言

糖やポリオールを添加することでタンパク質を安定化することが可能であり、生化学や食品の保存など、さまざまな分野で広く利用されている。糖やポリオールなどの小さな非荷電溶質がタンパク質の構造安定性に及ぼす影響について、分子間相互作用、溶媒粘度の変化、及びタンパク質の添加溶液への移動により生じる自由エネルギーの変化などに基づいて物理化学的に検討された(Gekko et al., 1981; Arakawa et al., 1982; Kaushik et al., 1998; Davis-Searls et al., 2001; Rösigen et al., 2005; Rösigen et al., 2007)。糖はコスモトロープとして機能するため(N. K. Jain et al., 2009; Magazu et al., 2007)、タンパク質を取り囲む水の構造が重要な要因になると指摘された。3章及び4章でも述べたように、本研究ではX線散乱法及び中性子散乱法を用い、糖がタンパク質表面から選択的または弱く排除され、その本来の水和殻を保持することを示す直接的な証拠を得た(Ajito et al., 2018a; Ajito et al., 2018b)。グリセロールを対象に同様の手法を用いた研究も行われた(Hirai et al., 2018)。水はタンパク質の主要な安定化因子である水素結合、疎水性相互作用、静電相互作用と常に関係するため、タンパク質の水和(溶媒和)は構造安定性に対する重要な要因となる。非弾性中性子散乱研究により、タンパク質のダイナミクスは周囲の水分子とも結合していることが明らかとされた(Makarov et al., 2000; Zaccai, 2000; Gabel et al., 2002; Frölich et al., 2009)。

糖のなかでも二糖の一種であるトレハロースは、極限環境生物の耐性獲得に関与することから注目を集めている(Elbein et al., 2003; Welnica et al., 2011; Møbjerg et al., 2014)。トレハロースによる生体保護作用は、ガラス化による分子内運動及び分子移動の制限、またはトレハロースによる水分子の置換から説明された(Feofilova et al., 2014)。しかし、トレハロースによるタンパク質保護作用の直接的な実験的証拠は乏しかった。4章で述べたように、最近我々は、塩酸グアニジンによる化学変性及び熱変性に対する糖による保護作用を構造学的に検討した。

タンパク質の構造安定性は、タンパク質のフォールディング問題と関係するため生物学的に重要な研究トピックであるだけでなく(Dobson et al., 2003)、アミロイド疾患との関連性から医学、薬学の分野でも研究対象とされている(Chiti et al., 2017)。多数のタンパク質フォールディングに関する研究が実施されたが、大量の共溶質の存在下ではタンパク質構造の観察が困難となるため実験的研究のほとんどは希薄溶液で行われてきた。従って、生物学的に重要な濃厚溶液中にお

けるタンパク質の折りたたみメカニズムは完全に理解されているとは言い切れない。本章で扱う、アミロイド様凝集体したタンパク質の糖によるリフォールディングについても、実験的な研究報告は調べた限り存在しなかった。

序章で述べたように、ミオグロビンは変性条件下でヘリックスからシートへの構造転移を伴うアミロイド形成を生じることが知られている(Fändrich et al., 2001; Fändrich et al., 2003; Onai et al., 2007)。アポミオグロビンのヘリックスからシートへの構造転移については、ダイナミクスの変化が関与することが既に明らかとなっている(Fabiani et al., 2009)。本研究では、X線広角散乱法(WAXS)を使用し、トレハロースがミオグロビンの酸変性によって生じたアミロイド様凝集を元の構造に還元することを構造的に観測した(Hirai et al., 2018; 味戸・平井, 2019)。このトレハロースによるタンパク質回復作用に関する発見は、タンパク質のフォールディング問題やアミロイド疾患に対する新しい洞察を提供する可能性がある。

## 5.2 実験

### 5.2.1 試料

測定試料として牛骨格筋由来のミオグロビン(Worthington Biochemical 社製)を精製することなく使用した。糖には林原株式会社製のトレハロース(結晶性二水和物粉末)のみを用いた。緩衝液には、pH 7.0、6.0に調製した10 mM HEPES、25 mM NaCl 溶液と、pH 5.0、4.0、3.5、3.0に調整した20 mM クエン酸ナトリウム、5 mM NaCl 溶液を用いた。WAXS 測定の前に、各 pH の緩衝液で8% w/v のミオグロビン溶液をストック溶液として調製し、約24時間静置して水和膨潤および変性凝集を進行させた。また、WAXS 測定の直前に100 nm ミリポアフィルター(Merck 社製)をストック溶液に使用し、大型の凝集体を除去した。無糖溶液の測定試料は、ミオグロビンのストック溶液と pH が対応する緩衝液を1:3の比率で混合することで調製した。溶液の最終タンパク質濃度は、紫外可視吸光度測定(UV-1800、島津製作所社製)により決定し、およそ1.75% w/vであった。トレハロース溶液の測定試料は、上記のストック溶液と同 pH のトレハロース溶液を同じく1:3の比率で混合することで調製し、約2時間静置した後に測定を行った。測定試料のトレハロース濃度は、0%w/w から30%w/w まで変化させた。動的光散乱(DLS)の測定では、pH 7.0 および3.5、トレハロース濃度0% w/w および30% w/w の試料のみを用いた。DLS 測定では、0.5% w/v のミオグロビン溶液の溶解直後に測定を開始し、時分割測定を実施した。12時間経過した試料とトレハロース溶液を1:3の比率で混合することでトレハロース30% w/w の試料を調製し、改めて時分割測定を実施した。

## 5.2.2 X線広角散乱測定

WAXS の測定には、SPring-8 の BL-40B2 分光器を使用した。X 線の波長とカメラ長は、 $1.0 \text{ \AA}$  及び  $59.6 \text{ cm}$  であった。検出器には R-AXIS IV(面積  $30 \times 30 \text{ cm}^2$ 、ピクセル解像度  $100 \text{ \mu m}$ 、理学社製)を使用し、露光時間は 10 秒であった。試料セルに含まれる溶液の温度は、INTEC 社製の温度コントローラー mK2000 を使用して密度測定と同様の  $25.0^\circ\text{C}$  に制御した。測定中は、タンパク質の放射損傷を避けるために試料溶液をゆっくりと流動させた。WAXS データの解析は 2.1 節に則り行い、回転半径は Guinier プロットから算出した。

## 5.2.3 動的光散乱測定

動的光散乱(DLS)測定は、He-Ne レーザー( $632.8 \text{ nm}$ )光源の CGS-3(ALV 社製)を使用した。試料温度は、水浴サーキュレーターを使用して  $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に制御した。粒径分布関数の計算に必要な糖溶液の反射指数と粘度は、以前に報告された値を参照した(Singh et al., 2013; Telis et al., 2007)。

## 5.3 結果及び考察

### 5.3.1 中性条件における牛ミオグロビン構造に対するトレハロースの効果

図 5.1 に pH 7.0 における牛ミオグロビン WAXS 曲線のトレハロース濃度依存性を示す。これまでの WAXS 実験と同様に、トレハロースの添加によるコントラスト変化が生じているため、この WAXS 曲線を直接評価することは困難である。そこで、CRY SOL を用いて牛ミオグロビンの理論構造(PDB コード: 1Z2S)から研鑽される理論散乱関数と実測した WAXS 曲線のフィッティングを行い、ずれ因子  $\chi^2$  を評価した(図 5.2)。フィッティングはタンパク質の外形を反映する  $0.041 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  の小角領域で実施した。これを見ると、pH 7.0 の中性溶媒中でも  $\chi^2$  値が大きく、牛ミオグロビンの溶液構造が理論構造に比べて緩んだ構造をとることを示唆した。その傾向は 5% w/w および 10% w/w のトレハロース溶液中でも同様であった。さらに濃度を上げると 15% w/w から  $\chi^2$  値が減少し、25 % w/w 以降に急減した。この結果は、トレハロースの添加により緩んだタンパク質構造がコンパクトな理論構造へ近づいたことを示すものである。

3 章および 4 章と同様に理論散乱関数のシミュレーションを用い、トレハロースの牛ミオグロビン水和構造への効果についても検討を行った。ここでは 4 章と同様に選択的溶媒和モデル、中性的溶媒和モデルおよび選択的排除モデルの 3 つのモデルに基づいてシミュレーションを実施した。図 5.3A に規格化した  $I(q)^{1/2}$

の実測値と理論値を比較したものを示す。実験値は全てのトレハロース濃度で中性的溶媒和傾向を示し、トレハロース分子は牛ミオグロビンの水和殻から完全に排除されはしないが、排除される傾向があることが明らかとなった。図 XB には  $R_g$  の実測値と理論値を比較したものを示す。上で述べたように、牛ミオグロビンの溶液構造はトレハロース濃度に依存してコンパクトな理論構造に近づく。従ってタンパク質の外形を反映する  $R_g$  を規格化した上で比較することは不適切であり、ここでは実測値は規格化せず比較を行った。図 5.3B を見ると、トレハロース非存在下では実験値が理論値から大きく乖離しており、牛ミオグロビンの溶液構造が結晶構造に比べて広がった構造をとることを示した。 $\chi^2$  値が大きい 0~10% w/w については溶液構造が理論構造と異なると考えられるため、理論値との比較は不適当である。15% w/w より高濃度では、中性的溶媒和モデルに従った。従って、 $I(0)$  と同様にタンパク質表面からトレハロース分子が排除される傾向を持つことを示した。

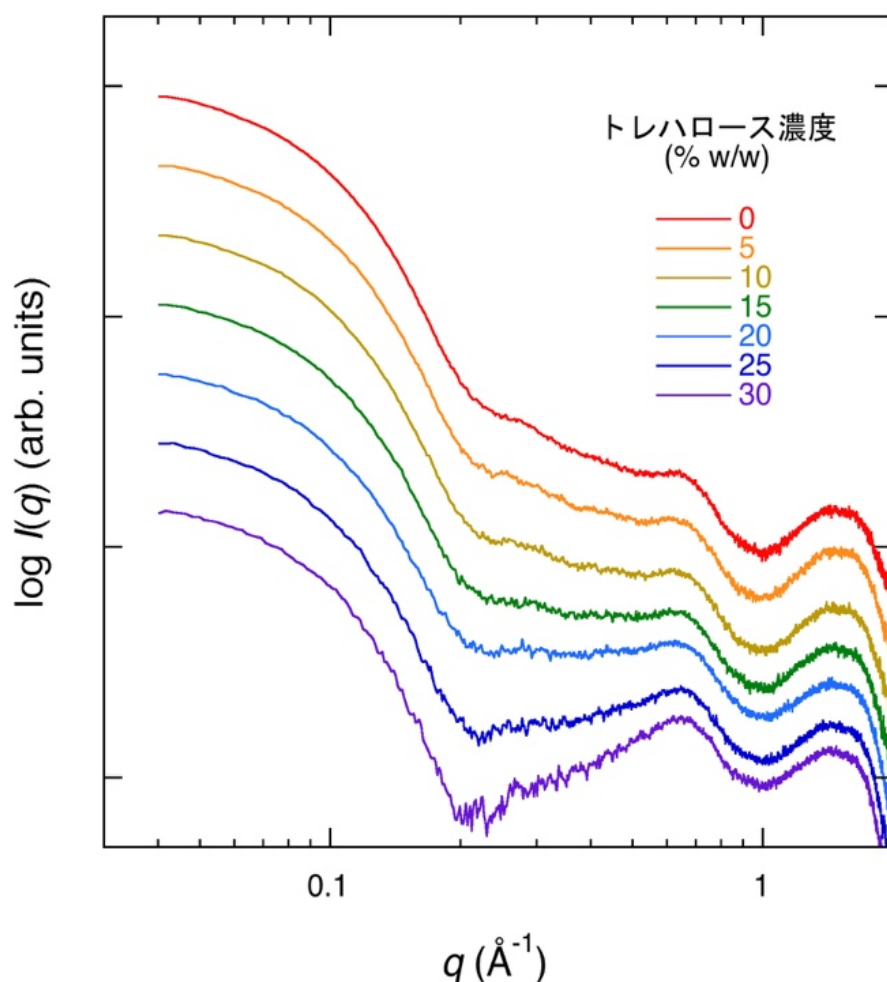


図 5.1. pH 7.0 における牛ミオグロビン WAXS 曲線のトレハロース濃度依存性。

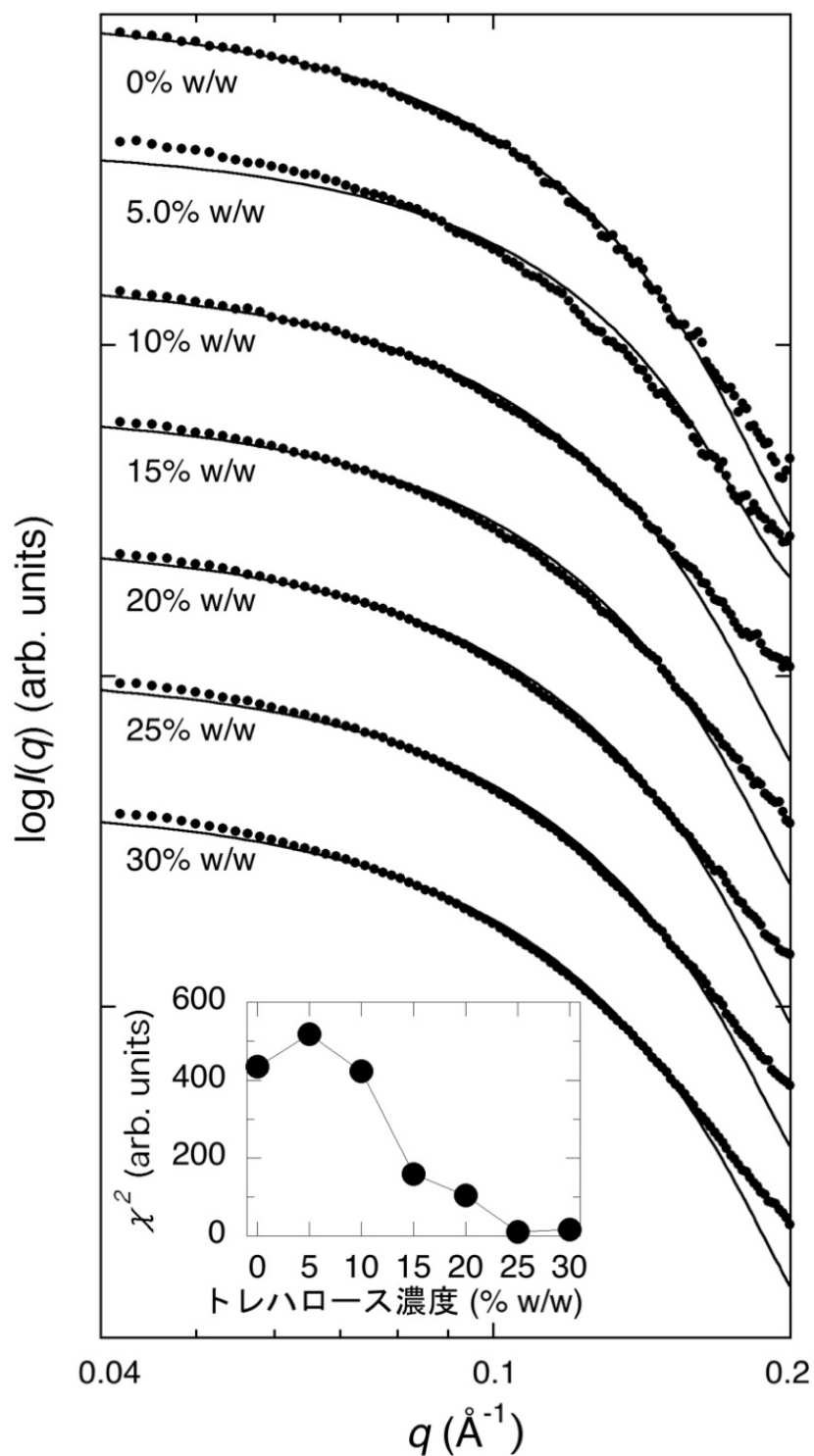


図 5.2. 牛ミオグロビン WAXS 曲線の理論散乱関数とのフィッティング結果。挿入図は実験値と理論値のずれ因子  $\chi^2$  値のトレハロース濃度依存性を示す。

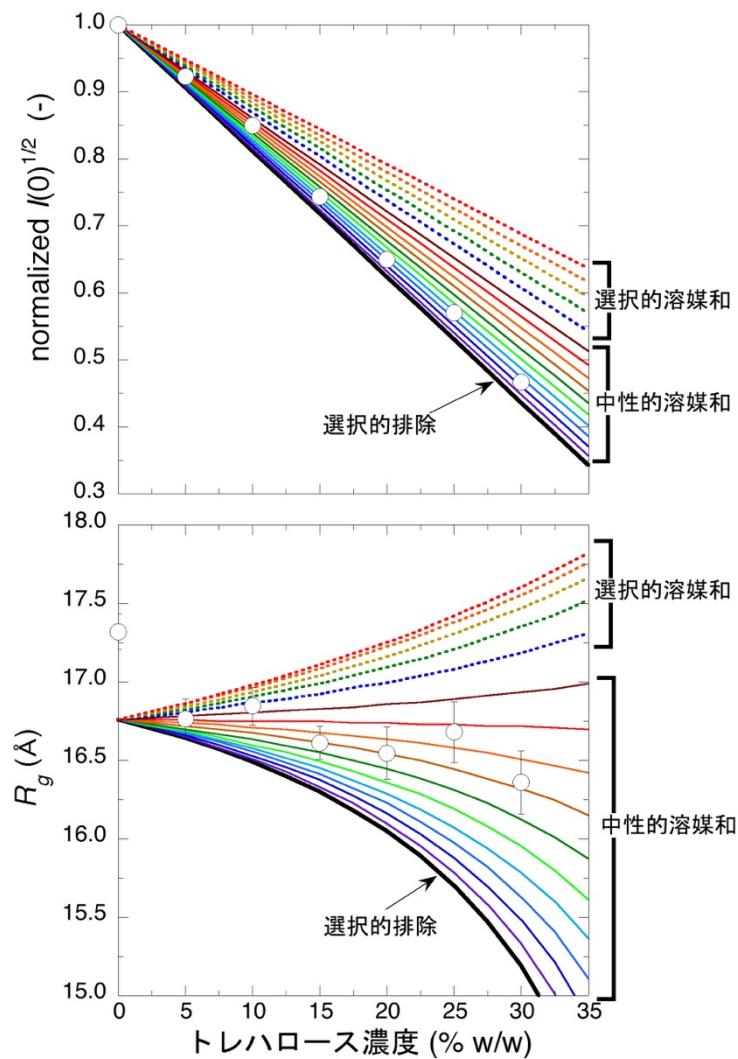


図 5.3. 規格化した  $I(0)^{1/2}$  および  $R_g$  の実測値と理論値の比較(A:  $I(0)^{1/2}$ 、B:  $R_g$ )。シンボルは実測値を、点線および実線はそれぞれのモデルに基づく理論値を示す。

### 5.3.2 ミオグロビンの酸変性によって生じるアミロイド様凝集体

図 5.4 に、ミオグロビン WAXS 曲線の pH 依存性を示す。挿入図は距離分布関数  $p(r)$  である。2 章でも述べたように、WAXS 曲線はそれぞれの  $q$  範囲が異なる階層構造領域、すなわち、三次構造( $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ )、内部構造( $0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ )、二次構造( $1.1 \text{ \AA}^{-1} < q < 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ )に対応している(Hirai et al., 2002; Hirai et al., 2004)。pH を 7.0 から下げると、pH 4.0 以下では  $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  の小角領域の曲線が単調な直線へと変化した。これは、酸変性によりコンパクトな天然構造から緩んだ構造または凝集体が形成されたことを示す。pH 4.0 では、pH 3.5 及び pH 3.0 と比べて曲線プロファイルがある程度保持されており、凝集体形成は生じておらず、部分的なアンフォールディングのみが生じたと推測できる。 $0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$  の

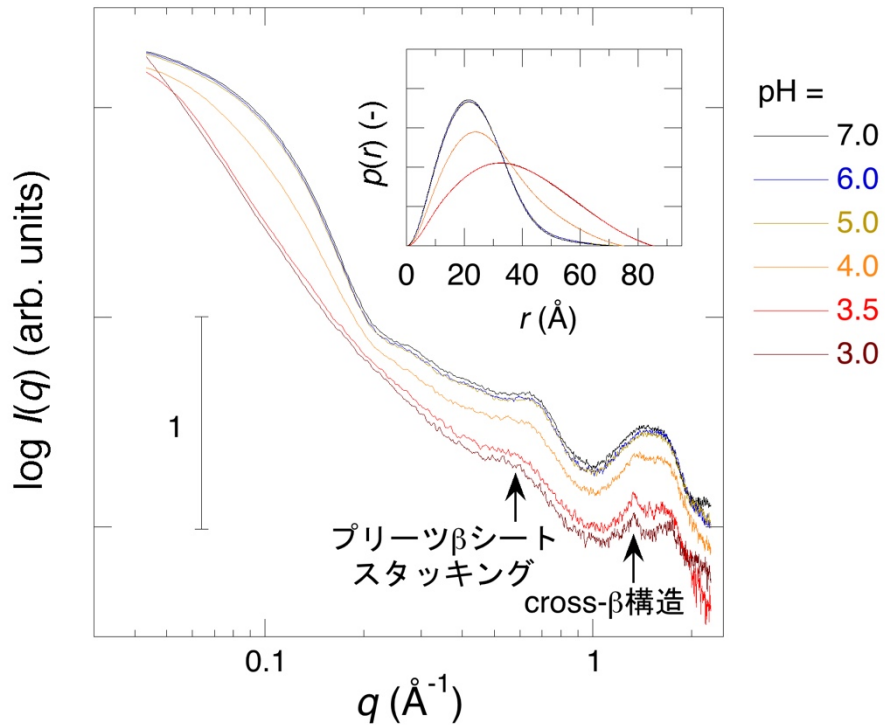


図 5.4. 牛ミオグロビン WAXS 曲線の pH 依存性。挿入図は WAXS 曲線から得られた距離分布関数。矢印はアミロイド様凝集の持つプリーツ  $\beta$  シート及びクロス  $\beta$  構造に由来するピークを示す。

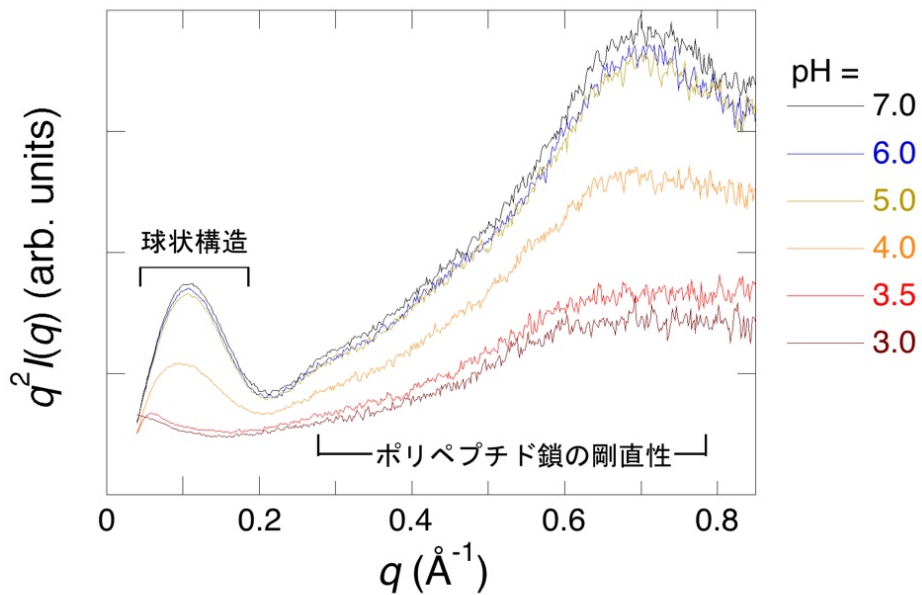


図 5.5. 牛ミオグロビン WAXS 曲線の Kratly プロットの pH 依存性。 $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  の領域はタンパク質の球状の三次構造を、 $q > 0.25 \text{ \AA}^{-1}$  の領域はポリペプチド鎖の剛直性を反映する。

中角領域でも単調化が見られ、天然構造のドメインパッキングが崩れたことを表す。また、pHの低下により  $q = 0.58 \text{ \AA}^{-1}$  と  $q = 1.34 \text{ \AA}^{-1}$  に新たなピークが出現した。この2つのピークは、アミロイド形成の初期段階に見られる特徴的な構造、すなわちプリーツβシートのスタッキング及びヘリックスからシート(クロスβ構造)への構造転移に対応するものである。ピーク位置からスタッキングしたプリーツβシート及びクロスβ構造のポリペプチド鎖間の実空間距離を計算すると、おおよそ  $10.8 \text{ \AA}$  及び  $4.69 \text{ \AA}$  であり、先行研究の値とよく一致した(Fändrich et al., 2001; Fändrich et al., 2003; Onai et al., 2007)。挿入図に示した距離分布関数  $p(r)$  は、実空間におけるタンパク質の三次構造を反映することが知られている(Glatter, 1982)。 $p(r)$  関数も WAXS 曲線と同様に pH 4.0 以下で長距離側へ拡大し、三次構造のアンフォールディングとそれに続く多量体形成を明確に示した。

図 5.5 には、図 5.4 に示した WAXS 曲線の Kratky プロット ( $q^2 I(q)$  vs.  $q$ ) を示す。Kratky プロットは、高分子鎖の剛直性または柔軟性の評価に使用され(Glatter et al., 1982)、タンパク質変性の解析にも利用される(Kataoka et al., 1993)。 $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  の小角領域は、コンパクトな天然構造の存在を反映し、 $q > 0.25 \text{ \AA}^{-1}$  の中高角領域はポリペプチド鎖の柔軟性を示す。 $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  に見られるベル型のプロファイルは、pH が低下するにつれて平坦に変化した。これは、球状のコンパクトな三次構造が次第に失われたことを示す(Kataoka et al., 1993)。pH 3.5 と pH 3.0 に見られる小角限界付近の僅かな立ち上がりは、大型の凝集体を反映するものと考えられる。 $q > 0.25 \text{ \AA}^{-1}$  の勾配の変化はポリペプチド鎖の剛直性の変化を反映しており、 $8 \text{ \AA}$  以上の実空間距離内で持続的な曲率を持つ持続鎖から、単純な持続鎖へ転移したことを示唆する。図 5.4 及び図 5.5 に示した結果は、pH の低下が、ミオグロビンのアミロイド転移の初期段階、すなわちクロスβ構造の形成とプリーツβシートのスタッキングを促進したことを明確に示した。

### 5.3.3 トレハロースの添加によるミオグロビン天然構造の回復作用及びアミロイド様凝集体解離作用

図 5.6 には、DLS 測定から得られた粒径分布関数を示す。試料には pH 3.5 のものを用い、12 時間かけて時間依存性を観測した。(A)は無糖溶液、(B)は 30%w/w トレハロース溶液である。図 5.6A を見ると、分布関数の第 1 ピーク(粒子半径の最頻値)が  $23.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$  から  $77.0 \pm 0.3 \text{ \AA}$  のへとシフトするとともに、 $210 \text{ \AA}$  に第 2 ピークが現れた。これは、酸変性によるアミロイド様凝集前駆体の形成及び凝集体の成長によるものと考えられる。図 5.7 には、粒子半径最頻値の時間依存性を示す。ここでは比較のため pH 7.0 のデータも加えた。pH 3.5 を見ると、トレ



ハロースの添加により多量体形成が大幅に抑制及び減速されたことがわかる。トレハロースの非存在下では、半径の増加は約 10 時間後に飽和傾向を示し、アミロイド様凝集の前駆体形成及び成長が停止したと考えられる。

図 5.8 には、トレハロースを添加後 2 時間以内に測定したミオグロビン WAXS 曲線を示す。(A)、(B)、(C)、(D)はそれぞれ pH 7.0、4.0、3.5、3.0 の溶媒に対応する。挿入図は距離分布関数  $p(r)$  である。pH 6.0 及び pH 5.0 のデータは pH 7.0

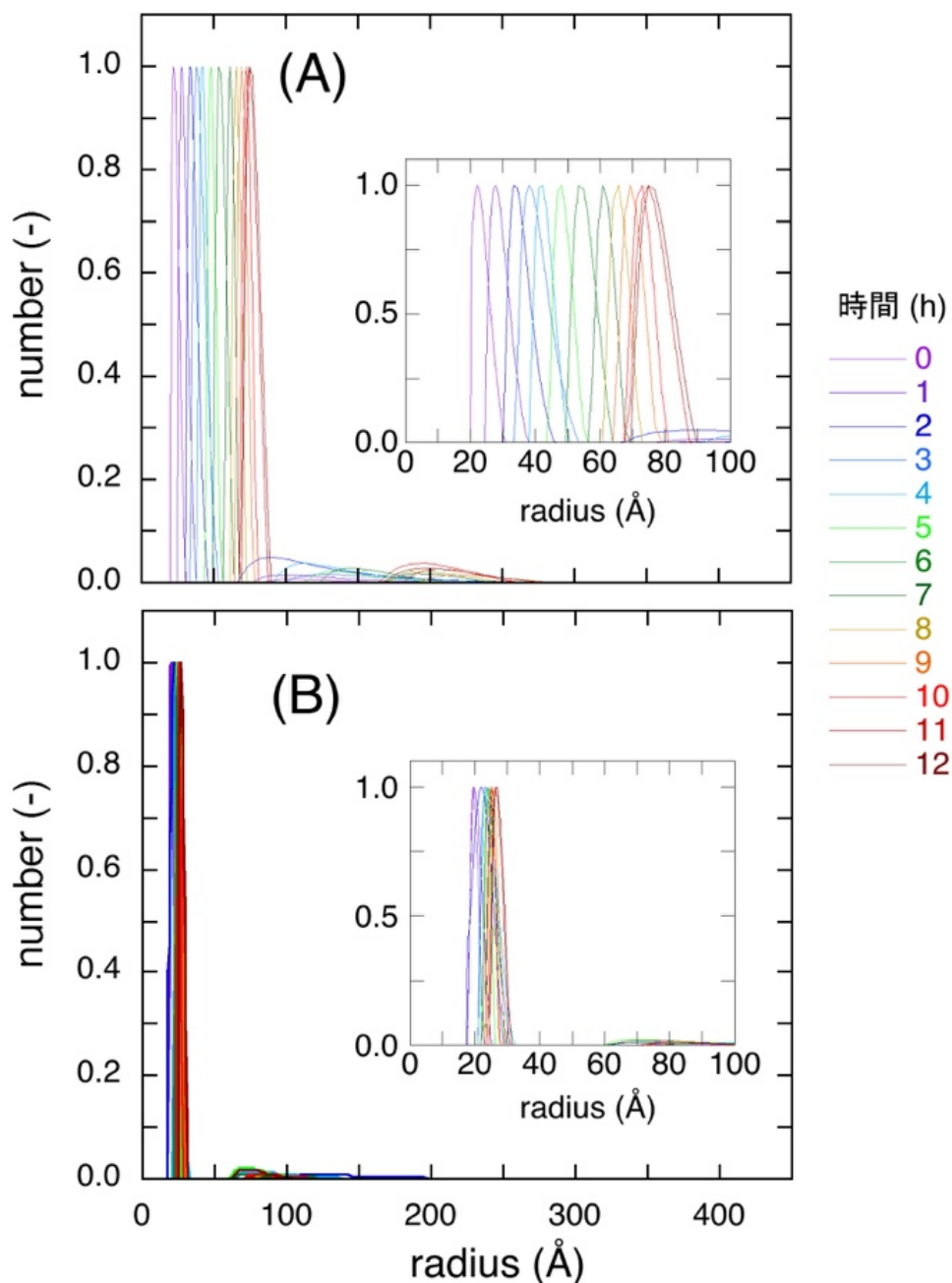


図 5.6. 動的光散乱測定(DLS)から得られた粒径分布関数の時間依存性。溶媒 pH は 3.5。(A)は無糖溶液中、(B)はトレハロース 30%w/w 溶液中で測定したもの。

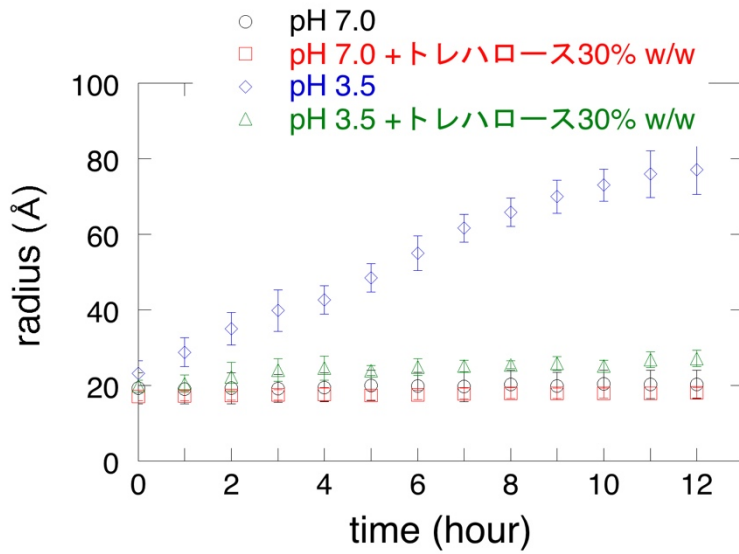


図 5.7. 粒径分布関数の第 1 ピーク位置(粒子半径の最頻値)の時間依存性。pH は 7.0 及び 3.5、溶媒条件は無糖溶液及びトレハロース 30%w/w。

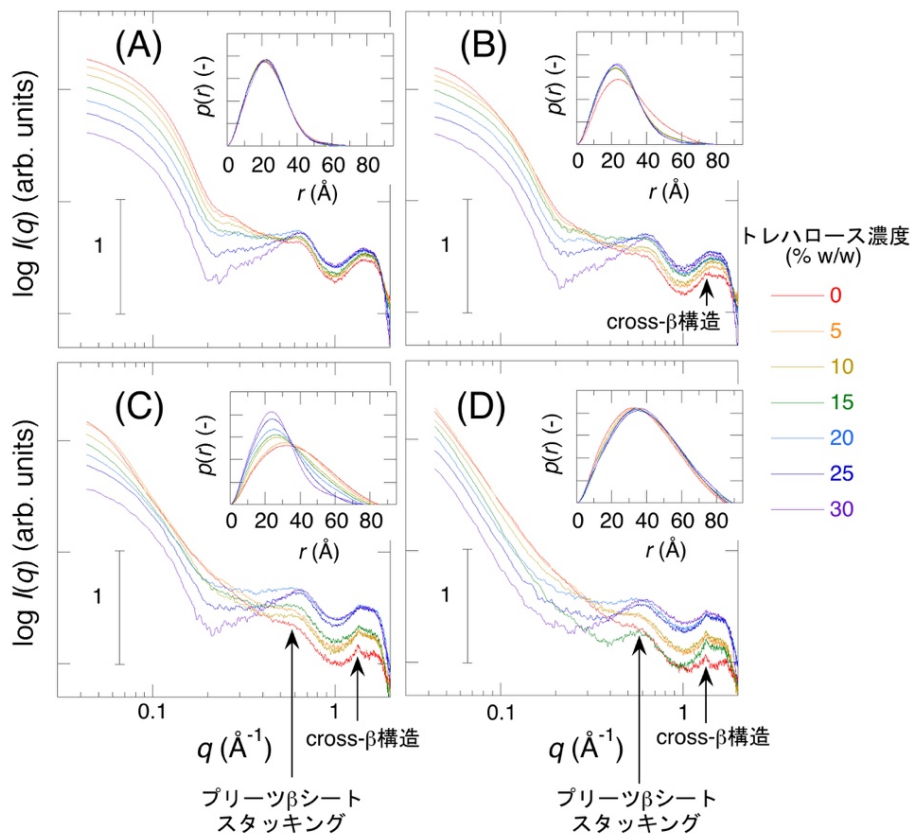


図 5.8. 各 pH におけるミオグロビン WAXS 曲線の糖濃度依存性。(A)は pH 7.0、(B)は pH 4.0、(C)は pH 3.5、(D)は pH 3.0。挿入図は距離分布関数  $p(r)$ 。

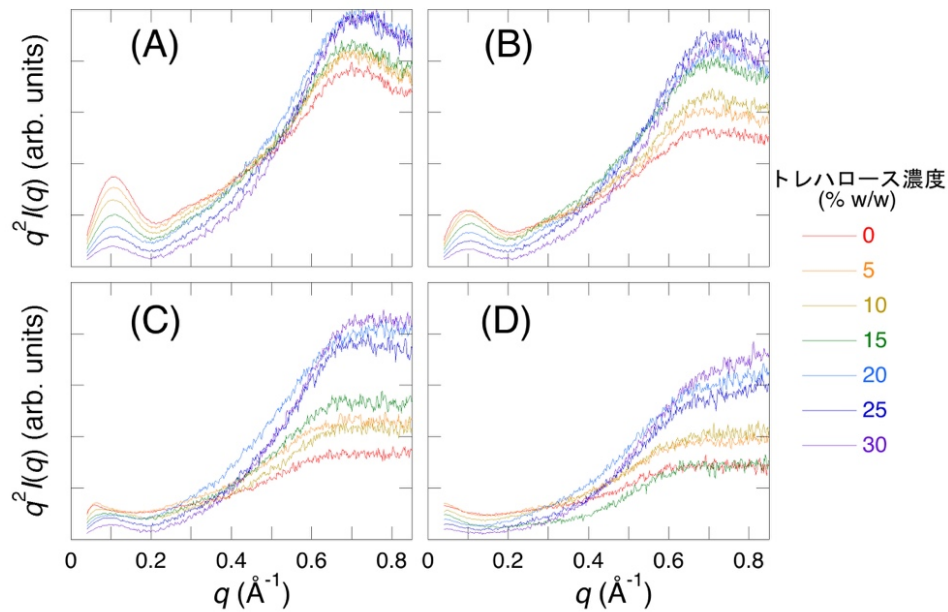


図 5.9. 図 5.5 に示した WAXS 曲線の Kratky プロット。(A)は pH 7.0、(B)は pH 4.0、(C)は pH 3.5、(D)は pH 3.0。

と同様の変化を示したため省略する。トレハロース濃度は 0~30%w/w まで変化させた。ここでも、トレハロースの添加によるコントラスト変化が測定結果に寄与することに注意が必要である(Stuhrmann and Miller, 1978)。3 章及び 4 章で示したように、pH 7.0 において糖はミオグロビンの分子構造自体を変化させることはないため、図 5.8A に見られる WAXS 曲線の変化はコントラスト変化に起因する(Ajito et al., 2018b)。pH 4.0(図 5.8B)及び pH 3.5(図 5.8C)を見ると、トレハロース濃度の上昇に伴いアミロイド様凝集に由来する WAXS 曲線の特徴が消失した。これは、トレハロースの添加によりアミロイド様凝集が解離、及びクロス  $\beta$  構造からヘリックスへの構造転移を伴う天然構造の回復を表す。 $p(r)$ 関数も同様に、凝集体の解離及びミオグロビンのリフォールディングを明確に示した。図 5.9 には、WAXS 曲線の Kratky プロットを示す。 $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  の小角領域はコントラスト変化の影響を大きく受けるため評価が困難であった。 $q > 0.25 \text{ \AA}^{-1}$  の中高角領域では、pH 4.0 及び pH 3.5 においてプロファイルの回復が見られた。これは、トレハロースによってポリペプチド鎖本来の配置が回復されたことを示す。

図 5.10 には、WAXS 曲線から得られた回転半径  $R_g$  の pH 及びトレハロース濃度依存性を示す。 $R_g$  は、タンパク質の形状変形や多量体及び凝集体形成に敏感な指標であることが知られている。無糖溶液では、pH が 7.0 から 3.0 に低下すると、 $R_g$  が  $16.9 \pm 0.1 \text{ \AA}$  から  $31.0 \pm 0.5 \text{ \AA}$  に増加した。これは、図 5.1 の  $p(r)$ 関数でも見られたように、凝集を伴うミオグロビンの酸変性を反映したものである。

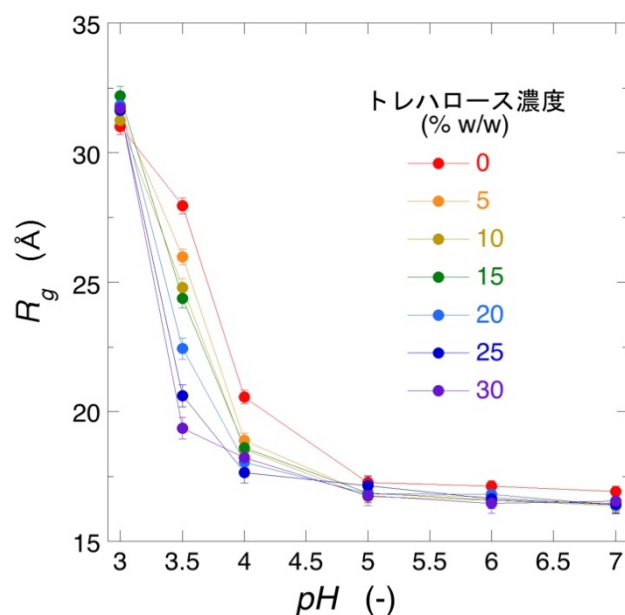


図 5.10. ミオグロビンの回転半径  $R_g$  の pH 及びトレハロース濃度依存性。

明確な変化が生じた pH は 4.0 以下であった。pH 3.5 を見ると、トレハロースの添加により  $R_g$  が  $27.9 \pm 0.3 \text{ \AA}$  から  $19.3 \pm 0.2 \text{ \AA}$  へ減少した。pH 4.0 でも減少傾向が観察された。ただし、pH 3.0 では  $R_g$  の減少傾向は見られず、これは図 5.5D の WAXS 曲線及び  $p(r)$  関数と同様である。この結果は、pH 3.0 では安定で大型のアミロイド様凝集が形成され、トレハロースによる回復作用が発揮されなかったことを意味する。

## 5.4 結言

本章の研究により、トレハロースが牛ミオグロビンの緩んだ溶液構造を収縮させ、酸変性構造及びアミロイド様凝集前駆体を元の天然構造へ回復させ得ることが明らかとなった。具体的には、 $q = 1.34 \text{ \AA}^{-1}$  で特徴付けられるヘリックスからクロス  $\beta$  への転移と、 $q = 0.58 \text{ \AA}^{-1}$  で特徴づけられるプリーツ  $\beta$  シートのスタッキングが、トレハロースの存在によって修復されることが示された。ミオグロビンの変性領域の同定を行った MD シミュレーション研究(Patel et al., 2017)及び質量分析研究(Katina et al., 2017)によると、A-、B-、E-、F-、及びG-ヘリックスがアミロイド転移の分子間相互作用に関与することを強く示唆した。また、水和に注目した研究によると、天然構造における水の排除領域とアミロイド形成部位が一致し、水分子の排除傾向がアミロイド転移の因子であることが示唆された(Fernandez and Scheraga, 2003)。また、MD シミュレーションを用いた研究により、タンパク質表面の水和領域がフォールディング時の局所構造の保

持に必要であり、凝集体形成にも関与することが明らかとされた(de Simone et al., 2005)。3 章及び 4 章で述べた我々の研究により、トレハロース分子がタンパク質表面から選択的に排除され、天然の水和殻が保護されることを示した(Ajito et al., 2018a; Ajito et al., 2018b)。トレハロースが天然構造を復元するメカニズムを上記の研究方向から推測すると、トレハロースが変性によって生じたクロスβ構造周辺の水和状態を回復させ、αヘリックスが回復されたと考えることができる。ミオグロビンの酸変性に関する準弾性中性子散乱を用いた研究によると、コンパクトな天然構造に比べて部分的にアンフォールディングした構造では水和水がより強く結合していることが示唆された(Stadler et al., 2015; Stadler et al., 2016)。これらの報告は、折り畳まれたクロスβ構造が一度緩みヘリックスが回復されるといふ本結果を、トレハロースの添加による選択的水和と結びつけるものである。

トレハロースによるアミロイド様凝集から天然構造への回復作用は、タンパク質のフォールディング問題だけでなく、アミロイド疾患の治療法開発においても重要となる可能性がある(Chiti and Dobson, 2017; Gertz et al., 2005)。ジメチルスルホキシド(DMSO)がアミロイド線維の回復及び不安定化に効果的であることが報告されたが(Abedini et al., 2006; Zhang et al., 2015)、人体に対する高濃度 DMSO のは、安全性の懸念のため実用的ではない(Kelava et al., 2010)。さらに、生理学的に問題の少ない低濃度の DMSO では、アミロイド線維形成を促進したとの報告もある(LeVine, 2004)。その一方、トレハロースは、非還元性の二糖であり、グルコースなどの還元糖の持つ糖化能力、すなわち細胞毒性を示さず、むしろ生物に環境耐性を与える(Elbein et al., 2003; Welnicz et al., 2011; Feofilova, 2014; Møbjerg, 2014)。そのため、アミロイド疾患のトレハロースによる治療法は、潜在的な有効性を持つと言えるかもしれない。

## 第6章 総括

本研究では、第2世代放射光源 Photon Factory 及び第3世代放射光源 SPring-8 を利用した放射光 X 線広角散乱法(WAXS)と、パルス中性子源 J-PARC-MLF を利用した中性子小角散乱法(SANS)を用い、糖によるタンパク質保護作用の分子メカニズムを検討した。本章では、各章で得られた研究結果を再度まとめ、今後の展開について述べる。

第3章では、タンパク質として馬ミオグロビンを、糖としてトレハロース及びグルコースを用い、タンパク質の水和構造に対する糖の効果を検討した。水溶液中における糖のタンパク質保護作用メカニズムについては、2つの異なる仮説が提唱されており、溶液散乱法を用いてこれらの仮説を構造学的に検証した。第1の仮説は選択的水和説と呼ばれ、タンパク質表面の水和領域から糖分子が選択的に排除され、タンパク質が水分子によって選択的に水和されることで天然構造が安定化されると説明されている。第2の仮説は水素結合置換説と呼ばれ、糖分子がタンパク質の水和水を置換し、糖とタンパク質の間の直接的な水素結合の形成により天然構造が安定化されると説明されている。そこで、WAXS と SANS 及び理論散乱関数のシミュレーションを行い、タンパク質水和殻から糖分子が選択的に排除され、天然の水和殻が糖溶液中でも保持されることを直接観測することに成功した。これらの実験事実は選択的水和説を明瞭に支持しており、糖による水和を介したタンパク質保護作用メカニズムを構造学的に明らかにした最初の研究報告であると考えている。また、トレハロースとグルコースではその排除傾向に差があり、トレハロースはグルコースに比べて高濃度でも排除傾向が継続した。この優れた排除傾向が、トレハロースに固有のものか、もしくは二糖に一般的なものか不明であったため、第4章の研究においてより詳細な検討を行った。

第4章では、第3章と同様に馬ミオグロビンを、糖として二糖であるトレハロースとスクロース及び単糖であるグルコースとフルクトースを使用した。手法として WAXS と SANS を用い、第3章と同様にタンパク質水和殻からの糖分子の排除傾向を観測するだけでなく、塩酸グアニジンによる化学変性及び加熱による熱変性に対する保護作用についても検討した。タンパク質水和殻からの排除傾向については、二糖であるトレハロースとスクロースで同じ傾向を示し、高濃度までほぼ完全な排除が持続した。その一方で、単糖であるグルコースとフルクトースでは、濃度の増加に伴いタンパク質水和殻への部分的な浸透が観測された。これらの結果より、質量濃度で比較すると二糖は単糖に比べてタンパク質表面からよく排除され、選択的水和を促進することが明らかとなった。

塩酸グアニジンは強力なタンパク質変性剤であり、タンパク質のフォールディング研究によく利用されてきた。変性剤による化学変性は凝集体形成を伴わないため、タンパク質1分子の変性に対する糖の効果を検証する上で有用であった。測定の結果、タンパク質の急激な変性が生じる塩酸グアニジン濃度が、糖の存在下では高濃度へシフトすることが明らかとなった。この保護作用は糖濃

度に依存しており、5%w/w に比べて 10%w/w でより大きく現れた。糖の種類によっても効果に差が見られ、トレハロースとグルコースではスクロースとフルクトースに比べてより大きな保護作用を示した。この保護作用の階層構造性を解析すると、三次構造やドメインのパッキングに比べて二次構造に対する保護作用が僅かに大きいことが明らかとなった。これらの実験事実から、タンパク質の化学変性に対する糖の保護作用は、局所的な二次構造の安定化を介して天然構造を安定化していると推測することができた。

タンパク質の熱変性は一般的に凝集体形成を伴い、ミオグロビンの場合はアミロイド様凝集体が形成されることが知られている。したがって、糖溶液中での熱変性・凝集過程を観察することで、アミロイド様凝集体形成に対する糖の効果を検討することが可能となる。ここでは 10%w/w と 20%w/w の糖溶液を用いた。WAXS 測定の結果、20%w/w の糖溶液中では、熱変性は生じるもののアミロイド様凝集体の形成が抑制された。また、単糖であるグルコースとフルクトースでは、10%w/w でも凝集体形成が抑制された。また、熱変性に伴う構造転移の階層構造性を解析すると、糖の存在下では各階層構造の構造転移が生じる中点温度が高温へシフトするとともに、構造転移における階層間の協調性が向上することが明らかとなった。

第 5 章では、牛ミオグロビンをを用い、タンパク質の酸変性とアミロイド様凝集に対するトレハロースの効果を検討した。WAXS 測定により、牛ミオグロビンは酸性溶媒中では天然構造が弛緩し、さらに pH を下げるとアミロイド様凝集を生じることが明らかとなった。このように変性及び凝集体形成が完了したミオグロビン溶液に対し後からトレハロースを加えることで、糖による変性抑制作用ではなく、変性凝集からの回復作用を検討した。その結果、pH 4.0 と pH 3.5 ではトレハロースの添加によりアミロイド様凝集の解離と天然構造の回復が観察された。特に pH 3.5 では、明確に現れていたβプリーツシートのスタッキング及びクロスβ構造由来の散乱ピークがほぼ完全に消失した。その一方で、pH 3.0 ではトレハロースの添加によるアミロイド様凝集体の解離作用などは観察されなかった。以上の結果から、比較的安定性の低いアミロイド凝集の前駆体に対してのみ、トレハロースによる回復作用が発揮されると推測することができた。

以上の 3 章から 5 章で実施した研究により、溶液中ではタンパク質水和殻から糖分子が排除されて天然の水和殻が保存されること、さらに、化学変性と熱変性に対する抑制作用や、酸変性に伴うアミロイド様凝集に対する回復作用を糖が有することが構造学的に明らかとなった。これらの研究は、放射光 X 線や中性子線を用いた溶液散乱法が、生体高分子と低分子化合物との間で生じる複雑な相互作用を分子レベルで解析する上で強力な手法であることを明確に示した。糖は、数あるオスモライトの中でも生物学的・医学的に重要な働きを占める化合物であり、今後は溶液散乱法以外の手法も取り入れつつ、糖の医薬品としての応用や、極限環境生物の生理解明を目指したいと考えている。

## 謝辞

指導教員である平井光博教授には学部 4 年生からご指導を頂き、学術研究のあり方や研究者としての矜持など、多くのこと学ばせて頂きました。深く感謝申し上げます。

また、本研究を実施するに当たり多くの共同研究者の方々にご指導ご協力を賜りました。

放射光実験では、下記の先生方にご指導ご協力を賜りました。

高エネルギー加速器研究機構 清水伸隆教授

高エネルギー加速器研究機構 五十嵐教之教授

高輝度光科学研究センター 太田昇研究員

室蘭工業大学 岩佐達郎名誉教授

中性子実験では、下記の先生方にご指導ご協力を賜りました。

総合科学研究機構 岩瀬裕希副主任研究員

総合科学研究機構 鈴木淳市主任研究員

総合科学研究機構 河村幸彦技師

J-PARC センター 高田慎一研究員

この場を借りて御礼申し上げます。

研究室の佐藤笙喜氏、高橋孝輔氏、木村豪氏、富田健介氏、望月由佳氏には実験にご協力頂きました。御礼申し上げます。

最後に、両親、祖父母、妹弟の皆様には精神的、経済的に力強いご支援を頂き、感謝申し上げます。また、日本学生支援機構には奨学金を貸与頂き、経済的な心配なく研究を行うことができました。感謝申し上げます。



## 引用文献

- Abedini, A., G. Singh, D.P. Raleigh. 2006. Recovery and purification of highly aggregation-prone disulfide-containing peptides: Application to islet amyloid polypeptide. *Anal. Biochem.* 351:181–186.
- Ajito, S., H. Iwase, S. Takata, M. Hirai. 2018a. Sugar-mediated stabilization of protein against chemical or thermal denaturation. *J. Phys. Chem. B.* 122:8685–8697.
- Ajito, S., M. Hirai, H. Iwase, N. Shimizu, N. Igarashi, N. Ohta. 2018b. Protective action of trehalose and glucose on protein hydration shell clarified by using X-ray and neutron scattering. *Physica B.* 551:249–255.
- Andreadis, S.S., C.G. Athanassiou. 2017. A review of insect cold hardiness and its potential in stored product insect control. *Crop Prot.* 91:93–99.
- Arakawa, T., S.N. Timasheff. 1985. Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins. *Biochemistry.* 24:6856–6762.
- Arakawa, T., S.N. Timasheff. 1984. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: Balance between hydration and salt binding. *Biochemistry.* 23:5912–5923.
- Arakawa, T., S.N. Timasheff. 1983. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 224:169–177.
- Arakawa, T., S.N. Timasheff. 1982. Stabilization of protein-structure by sugars. *Biochemistry.* 21:6536–6544.
- Atha, D.H., K.C. Ingham. 1981. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols: Analysis in terms of excluded volume. *J. Biol. Chem.* 256:2108–2117.
- Auton, M., D.W. Bolen, J. Rösgen. 2008. Structural thermodynamics of protein preferential solvation. *Protein-Struct. Funct. Bioinfo.* 73:802–813.
- Bai, Y., T.R. Sosnick, L. Mayne, S.W. Englander. 1995. Protein folding intermediates: Native-state hydrogen exchange. *Science.* 269:192–197.
- Ball, P., J.E. Hallsworth. 2015. Water structure and chaotropicity: Their uses, abuses and biological implications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17:8297–8305.
- Banipal, P.K., T.S. Banipal, B.S. Lark, J.C. Ahluwalia. 1998. Partial molar heat capacities and volumes of some mono-, di- and tri-saccharides in water at 298.15, 308.15 and 318.15 K. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 24:3527–3780.
- Bizzarri, A.R., S. Cannistraro. 2002. Molecular dynamics of water at the protein–solvent interface. *J. Phys. Chem. B.* 106:6617–6633.

- Branca, C., S. Maccarrone, S. Magazù, G. Maisano, S.M. Bennington, J. Taylor. 2005. Tetrahedral order in homologous disaccharide-water mixtures. *J. Chem. Phys.* 122:1745-13.
- Brown, G.M., D.C. Rohrer, B. Berking, C.A. Beevers, R.O. Gould, R. Simpson. 1972. The crystal structure of alpha, alpha-trehalose dihydrate from three independent X-ray determinations. *Acta Crystallogr. B.* 28:3145–3158.
- Bunn, H.F., P.J. Higgins. 1981. Reaction of monosaccharides with proteins: Possible evolutionary significance. *Science.* 213:222–224.
- Cheng, X., B.P. Schoenborn. 1990. Hydration in protein crystals: A neutron diffraction analysis of carbonmonoxymyoglobin. *Acta Cryst. B.* 46:195–208.
- Chiti, F., C.M. Dobson. 2017. Protein Misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annu. Rev. Biochem.* 86:27–68.
- Clark, E.D. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:202–207.
- Clark, M.S., M.R. Worland. 2008. How insects survive the cold: molecular mechanisms – A review. *J. Comp. Physiol. B.* 178:917–933.
- Clegg, J.S. 2001. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 128:613–624.
- Cornette, R. 2011. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: Current status of our Knowledge. *IUBMB Life.* 63:419–429.
- Cray, J.A., J.T. Russell, D.J. Timson, R.S. Singhal, J.E. Hallsworth. 2013. A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environ. Microbiol.* 15:287–296.
- Crowe, J.H., J.F. Carpenter, L.M. Crowe. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:73–103.
- Crowe, L.M., D.S. Reid, J.H. Crowe. 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71:2087–2093.
- Davis-Searles, P.R., A.J. Saunders, D.A. Erie, D.J. Winzor, G.J. Pielak. 2001. Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 30:271–306.
- de Simone, A., G.G. Dodson, C.S. Verma, A. Zagari, F. Fraternali. 2005. Prion and water: Tight and dynamical hydration sites have a key role in structural stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:7535–7540.
- Dobson, C.M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature.* 426:884–890.
- Edmonds, A.R. 1957. Angular momentum in quantum Mechanics. Princeton Univ. Press.

- Eisenberg, D., A.D. McLachlan. 1986. Solvation energy in protein folding and binding. *Nature*. 319:199–203.
- Ekdawi-Sever, N.C., P.B. Conrad, J.J. de Pablo. 2019. Molecular simulation of sucrose solutions near the glass transition temperature. *J. Phys. Chem. A*. 105:734–742.
- Elbein, A.D., Y.T. Pan, I. Pastuszak, D. Carroll. 2003. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology*. 13:17–27.
- Fabiani, E., A.M. Stadler, D. Madern, M.M. Koza, M. Tehei, M. Hirai, G. Zaccai. 2009. Dynamics of apomyoglobin in the alpha-to-beta transition and of partially unfolded aggregated protein. *Eur. Biophys. J.* 38:237–244.
- Fändrich, M., M.A. Fletcher, C.M. Dobson. 2001. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*. 410:165–166.
- Fändrich, M., V. Forge, K. Buder, M. Kittler, C.M. Dobson, S. Diekmann. 2003. Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:15463–15468.
- Feigin, L.A., D.I. Svergun. 1987. Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. Plenum Press.
- Fenimore, P.W., H. Frauenfelder, B.H. McMahon, F.G. Parak. 2002. Slaving: Solvent fluctuations dominate protein dynamics and functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:16047–16051.
- Fenimore, P.W., H. Frauenfelder, B.H. McMahon, R.D. Young. 2004. Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to alpha- and beta-fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:14408–14413.
- Feofilova, E.P., A.I. Usov, I.S. Mysyakina, G.A. Kochkina. 2014. Trehalose: Chemical structure, biological functions, and practical application. *Microbiology*. 83:184–194.
- Fernandez, A., H.A. Scheraga. 2003. Insufficiently dehydrated hydrogen bonds as determinants of protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:113–118.
- Fraser, R.D.B., T.P. Macrae, E. Suzuki. 1978. Improved method for calculating contribution of solvent to X-Ray-diffraction pattern of biological molecules. *J. Appl. Crystallogr.* 11:693–694.
- Frauenfelder, H., G. Chena, J. Berendzena, P.W. Fenimore, H. Janssonb, B.H. McMahoma, I.R. Stroec, J. Swensond, R.D. Younge. 2009. A unified model of protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:5129–5134.
- Gabel, F., D. Bicout, U. Lehnert, M. Tehei, M. Weik, G. Zaccai. 2002. Protein dynamics studied by neutron scattering. *Q. Rev. Biophys.* 35:327–367.

- Gekko, K., S.N. Timasheff. 1981. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*. 20:46667–4676.
- Gerstein, M., C. Chothia. 1996. Packing at the protein-water interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:10167–10172.
- Gertz, M.A., R. Comenzo, R.H. Falk, J.P. Fermand, B.P. Hazenberg, P.N. Hawkins, G. Merlini, P. Moreau, P. Ronco, V. Sanchorawala, O. Sezer, A. Solomon, G. Grateau. 2005. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): A consensus opinion from the 10th international symposium on amyloid and amyloidosis. *Am. J. Hematol.* 79:319–328
- Glatter, O., O. Kratky. 1982. Small angle X-ray scattering. Academic Press.
- Golovina, E.A., A.V. Golobin, F.A. Hoekstra, R. Faller. 2009. Water replacement hypothesis in atomic detail-factors determining the structure of dehydrated bilayer stacks. *Biophys. J.* 97:490–499.
- Guinier, A., G. Fournet, C.B. Walker. 1955. Small-angle scattering of X-rays. John Wiley & Sons.
- Hade, E.P.K., C. Tanford. 1967. Isopiestic compositions as a measure of preferential interactions of macromolecules in two-component solvents. Application to proteins in concentrated aqueous cesium chloride and guanidine hydrochloride. *J. Am. Chem. Soc.* 89:5034–5040.
- Hague, M.A., J. Chen, P. Aldred, B. Adhikari. 2015. Drying and denaturation characteristics of whey protein isolate in the presence of lactose and trehalose. *Food Chem.* 177:8–16.
- Hengherr, S., R.O. Schill. 2019. Environmental adaptations: cryobiosis. Water bears: The biology of tardigrades. Springer.
- Hirai, M., H. Iwase, T. Hayakawa, H. Takahashi. 2003. Determination of asymmetric structure of ganglioside-DPPC mixed vesicle using SANS, SAXS and DLS. *Biophys. J.* 85:1600–1610.
- Hirai, M., H. Iwase, T. Hayakawa, K. Miura, K. Inoue. 2002. Structural hierarchy of several proteins observed by wide-angle solution scattering. *J. Synchrot. Radiat.* 9:202–205.
- Hirai, M., S. Ajito, H. Iwase, S. Takata, N. Ohta, N. Igarashi, N. Shimizu. 2018. Restoration of myoglobin native fold from its initial state of amyloid formation by trehalose. *J. Phys. Chem. B.* 122:11962–11968.
- Hirai, M., S. Arai, H. Iwase. 1999. Complementary analysis of thermal transition multiplicity of hen egg-white lysozyme at low pH using X-ray scattering and scanning calorimetry. *J. Phys. Chem. B.* 103:549–556.
- Hirai, M., M. Koizumi, T. Hayakawa, H. Takahashi, S. Abe, H. Hirai, K. Miura, K. Inoue. 2004. Hierarchical map of protein unfolding and refolding at thermal equilibrium revealed

- by wide-angle X-ray scattering. *Biochemistry*. 43:9036–9049.
- Ibers, J.A., W.C. Hamilton. 1974. International tables for X-ray crystallography. Vol. IV . Kynoch Press.
- Inoue, H., S.N. Timasheff. 1968. The interaction of beta-lactoglobulin with solvent components in mixed water-organic solvent systems. *J. Am. Chem. Soc.* 90:1890–1897.
- Israelachvili, J., H. Wennerström. 1996. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature*. 379:219–225.
- Iwase, H., S. Takata, T. Morikawa, M. Katagiri, A. Birumachi, J. Suzuki. 2018. Installation of a high-resolution position-sensitive scintillation detector in the small and wide angle neutron scattering instrument (TAIKAN), MLF, J-PARC. *Physica B*. 551:501–505.
- Jain, N.K., I. Roy. 2009. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* 18:24–36.
- Kataoka, M., Y. Hagihara, K. Mihara, Y. Goto. 1993. Molten globule of cytochrome c studied by small angle X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 229:591–596.
- Katina, N.S., M.Y. Suvorina, E.I. Grigorashvili, V.V. Marchenkov, N.A. Ryabova, A.D. Nikulin, A.K. Surin. 2017. Identification of regions in apomyoglobin that form intermolecular interactions in amyloid aggregates using high-performance mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* 72:1271–1279.
- Kaucurakova, M., M. Mathlouthi. 1996. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: Characterization of the glycosidic bond. *Carbohydr. Res.* 284:145–157.
- Kaushik, J.K., R. Bhat. 1998. Thermal stability of proteins in aqueous polyol solutions: role of the surface tension of water in the stabilizing effect of polyols. *J. Phys. Chem. B*. 102:7058–7066.
- Kelava, T., I. Čavar, F. Čulo. 2010. Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88:960–967.
- Kell, G.S. 1977. Effects of isotopic composition, temperature, pressure, and dissolved-gases on density of liquid water. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 6:1109–1131.
- Kendrew, J.C., G. Bodo, H.M. Dintzis, R.G. Parrish, H. Wyckoff, D.C. Phillips. 1958. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-Ray analysis. *Nature*. 181:662–666.
- Kent, B., T. Hunt, T.A. Darwish, T. Hauß, C.J. Garvey, G. Bryant. 2014. Localization of trehalose in partially hydrated DOPC bilayers: insights into cryoprotective mechanisms. *J. R. Soc. Interface*. 11:20140069.
- Kidera, A., N. Go. 1992. Normal mode refinement: Crystallographic refinement of protein dynamic structure. *J. Mol. Biol.* 225:457–475.

- Knoll, W., G. Schmidt, K. Ibel. 1985. The inverse contrast variation in small-angle neutron-scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 18:65–70.
- Lattman, E.E. 1989. Rapid calculation of the solution scattering profile from a macromolecule of known structure. *Proteins.* 5:149–155.
- Lee, J.C., S.N. Timasheff. 1981. The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* 256:7193–7201.
- Lee, J.C., L.L. Lee. 1981. Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols. *J. Biol. Chem.* 256:625–631.
- Levi, I., C.B. Purves. 1949. The Structure and Configuration of Sucrose ( $\alpha$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-Fructofuranoside). *Adv. Carbohyd. Chemi.* 4:1–3.
- LeVine, H. 2004. Alzheimer's beta-peptide oligomer formation at physiologic concentrations. *Anal. Biochem.* 335:81–90.
- Liptak, B.G. 2003. Instrument engineers' handbook, volume one: Process measurement and analysis 4th edition. CRC Press.
- Lunn, J.E., I. Delorge, C.M. Figueroa, P. Van-Dijck, M. Stitt. 2014. Trehalose metabolism in plants. *Plant J.* 79:544–567.
- MacGillavry, C.H., G.D. Rieck. 1968. International tables for X-ray crystallography Vol. III 2nd edition. Kynoch Press.
- Magazù, S., F. Migliardo, A.J. Ramirez-Cuesta. 2007. Kosmotrope character of maltose in water mixtures. *J. Mol. Struct.* 830:167–170.
- Makarov, V.A., B.K. Andrews, P.E. Smith, B.M. Pettitt. 2000. Residence times of water molecules in the hydration sites of myoglobin. *Biophys. J.* 79:2966–2974.
- Malinchik, S.B., H. Inouye, K.E. Szumowski, D.A. Kirschner. 1998. Structural analysis of Alzheimer's beta(1–40) amyloid: Protofilament assembly of tubular fibrils. *Biophys. J.* 74:537–545.
- Maurus, R., C.M. Overall, R. Bogumil, Y. You, A.G. Mauk, M. Smith, G.D. Brayer. 1997. A myoglobin variant with a polar substitution in a conserved hydrophobic cluster in the heme binding pocket. *Biochem. Biophys. Acta.* 134:1–13.
- Mcpherson, A. 1985. Crystallization of macromolecules: General-principles. *Methods Enzymol.* 114:112–120.
- Mcpherson, J.D., B.H. Shilton, D.J. Walton. 1988. Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry.* 28:1901–1907.
- Miller, D.P., J.J. de Pablo, H. Corti. 1997. Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharm. Res.* 14:578–590.

- Møbjerg, N., K.A. Halberg, A. Jørgensen, D. Persson, M. Bjørn, H. Ramløv, R.M. Kristensen. 2014. Trehalose metabolism in plants. *Plant J.* 79:544–567.
- Na, G.C., S.N. Timasheff. 1981. Interaction of calf brain tubulin with glycerol. *J. Mol. Biol.* 151:165–178.
- O'Brien, E.P., R.I. Dima, B. Brooks, D. Thirumalai. 2007. Interactions between hydrophobic and ionic solutes in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: Lessons for protein denaturation mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 129:7346–7353
- Ohtake, S., Y.J. Wang. 2011. Trehalose: Current use and future applications. *J. Pharm. Sci.* 100:2020–2053.
- Oleinikova, A., N. Smolin, I. Brovchenko. 2007. Influence of water clustering on the dynamics of hydration water at the surface of a lysozyme. *Biophys. J.* 93:2986–3000.
- Onai, T., M. Koizumi, H. Lu, K. Inoue, M. Hirai. 2007. Initial process of amyloid formation of apomyoglobin and effect of glycosphingolipid (GM1). *J. Appl. Crystallogr.* 40:184–189.
- Pain, R.H. 2000. Mechanisms of protein folding. Oxford University Press.
- Patel, S., Y.U. Sasidhar, K.V.R. Chary. 2017. Mechanism of Initiation, association, and formation of amyloid fibrils modeled with the N-terminal peptide fragment, IKYLEFIS, of myoglobin G-helix. *J. Phys. Chem. B.* 121:7536–7549.
- Pavlov, M.Y., B.A. Fedorov. 1983. Improved technique for calculating X-ray scattering intensity of biopolymers in solution: Evaluation of the form, volume, and surface of a particle. *Biopolymers.* 22:1507–1522.
- Prakash, V., C. Loucheux, S. Scheufele, M.J. Gorbunoff, S.N. Timasheff. 1981. Interactions of proteins with solvent components in 8 M urea. *Arch. Biochem. Biophys.* 210:455–464.
- Reisler, E., Y. Haik, H. Eisenberg. 1977. Bovine serum-albumin in aqueous guanidine-hydrochloride solutions – Preferential and absolute interactions and comparison with other systems. *Biochemistry.* 16:197–203.
- Rösgen, J., B.M. Pettitt, D.W. Bolen. 2007. An analysis of the molecular origin of osmolyte-dependent protein stability. *Protein Sci.* 16:733–743.
- Rösgen, J., B.M. Pettitt, D.W. Bolen. 2005. Protein folding, stability, and solvation structure in osmolyte solutions. *Biophys. J.* 89:2988–2997.
- Shiraga, K., A. Adachi, M. Nakamura, T. Tajima, K. Ajito, Y. Ogawa. 2017. Characterization of the hydrogen-bond network of water around sucrose and trehalose: Microwave and terahertz spectroscopic study. *J. Chem. Phys.* 146:105102.
- Simperler, A., A. Kornherr, R. Chopra, P.A. Bonnet, W. Jones, W.D.S. Motherwell, G. Zifferer. 2006. Glass transition temperature of glucose, sucrose, and trehalose – An

- experimental and in silico study. *J. Phys. Chem. B.* 110:19678–19684.
- Simpson, R.B., W. Kauzmann. 1953. The kinetics of protein denaturation. I. The behavior of the optical rotation of ovalbumin in urea solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 75:5139–5152.
- Singer, M.A., S. Lindquist. 1998. Thermotolerance in *saccharomyces cerevisiae*: The yin and yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16:460–468.
- Sola-Penna, M., J.R. Meyer-Fernandes. 1998. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: Why is trehalose more effective than other sugars? *Arch. Biochem. Biophys.* 360:10–14.
- Stadler, A.M., F. Demmel, J. Ollivier, T. Seydel. 2016. Picosecond to nanosecond dynamics provide a source of conformational entropy for protein folding. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18:21527–21538.
- Stadler, A.M., M.M. Koza, J. Fitter. 2015. Determination of conformational entropy of fully and partially folded conformations of holo- and apomyoglobin. *J. Phys. Chem. B.* 119:72–82.
- Storey, K.B., J. M. Storey. 1996. Natural freezing survival in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27:365–386.
- Stuhrmann, H.B. 1970. Interpretation of small-angle scattering functions of dilute solutions and gases: A representation of structures related to a one-particle-scattering function. *Acta Cryst. A.* 26:297–306.
- Stuhrmann, H.B., A. Miller. 1978. Small-angle scattering of biological structures. *J. Appl. Crystallogr.* 11:325–345.
- Sukenik, S., L. Sapir, D. Harries. 2013. Balance of enthalpy and entropy in depletion forces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 18:495–501.
- Sussich, F., R. Urbani, F. Princivalle, A. Cesaro. 1998. Polymorphic amorphous and crystalline forms of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.* 120:7893–7899.
- Suzuki, A., M. Yamazaki. 1989. Osmoelastic coupling in biological structures: Formation of parallel bundles of actin filaments in a crystalline-like structure caused by osmotic stress. *Biochemistry.* 28:6513–6518.
- Svergun, D.I., C. Barberato, M.H.J. Koch. 1995. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* 28:768–773.
- Svergun, D.I., J.S. Pedersen. 1994. Propagating errors in small-angle scattering data treatment. *J. Appl. Crystallogr.* 27:241–248.
- Svergun, D.I., S. Richaied, M.H.J. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, G. Zaccai. 1998. Protein hydration in solution: Experimental observation by X-ray and neutron scattering. *Proc.*



- Natl. Acad. Sci. USA.* 95:2267–2272.
- Teeter, M.M. 1991. Water-protein interactions: Theory and experiment. *Annu. Rev. Biophys.* 20:577–600.
- Tehei, M., B. Franzetti, K. Wood, F. Gabel, E. Fabiani, M. Jasnin, M. Zamponi, D. Oesterhel, G. Zaccai, M. Ginzburg, B.Z. Ginzburg. 2007. Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a dead sea organism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:766–777.
- Timasheff, S.N. 1992. A physicochemical basis for the selection of osmolytes by nature. *Water and Life.* Springer.
- Timasheff, S.N. 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:67–97.
- Vagenende, V., M. G.S. Yap, B.L. Trout. 2009. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry.* 48:11084–11096.
- Vieille, C., G.J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:1–43.
- Welnicz, W., M.A. Grohme, Ł. Kaczmarek, R.O. Schill, M. Frohme. 2011. Anhydrobiosis in tardigrades – The last decade. *J. Insect Physiol.* 57:577–583.
- Wyman Jr, J., C. B. Anfinsen, M.L. Anson, J.T. Edsall, F.M. Richards. 1964. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: A second look. *Adv. Protein Chem.* 19:223–286.
- Zaccai, G. 2000. How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science.* 288:1604–1607.
- Zamyatnin, A.A. 1984. Amino acid, peptide, and protein volume in solution. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13:145–165.
- Zhang, B., H. Wu, H. Yang, X. Xiang, H. Li, S. Deng. 2017. Cryoprotective roles of trehalose and alginate oligosaccharides during frozen storage of peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chem.* 228:257–264.
- Zhang, G., V. Babenko, W. Dzwolak, T.A. Keiderling. 2015. Dimethyl sulfoxide induced destabilization and disassembly of various structural variants of insulin fibrils monitored by vibrational circular dichroism. *Biochemistry.* 54:7193–7202.
- 味戸聡志, 平井光博. 2019. トレハロースによるタンパク質の酸変性及び凝集に対する回復作用. *分析化学.* 68:43–49.
- 鍛冶東海, 新村信雄. 1983. 中性子散乱と生体内物質. *化学と生物.* 21:250–257.
- 池田裕二郎. 2012. J-PARC 中性子源. *RADIOISOTOPES.* 61:343–351.

- 岩瀬裕希. 2002. X線・中性子溶液散乱法による糖脂質/球場蛋白質凝集系の研究. 群馬大学大学院博士論文.
- 小泉将治. 2006. タンパク質のフォールディングとアミロイド化の構造学的研究. 群馬大学大学院博士論文.
- 後藤祐児. 2009. アミロイド線維形成とタンパク質科学. 高分子. 2:92-96.
- 櫻井実. 2016. 低温生物工学会誌. 63:1-10.
- 佐々木泰三, 石井武比古. 1986. シンクロトロン放射. 培風館.
- 床次正安. 1985. 放射光の性質とフォトン・ファクトリー. 鉱物学雑誌. 16:409-413.
- 新村信雄. 1974. TOF法中性子回折. 日本結晶学会誌. 16:355-368.
- 原雅弘. 2002. 「SPring-8」とは. 日本調理科学会誌. 35:404-412.
- 平井光博. 2002. コントラスト変化法. 波紋. 12:210-217.
- 星埜禎男, 国富信彦, 渋谷巖, 浜口由和. 1976. 実験物理学講座 22 中性子回折. 共立出版.
- マッキー, T., J.R. マッキー; 市川厚, 福岡 伸一. 2010. マッキー生化学第4版. 化学同人.
- モーラン, L.A., H.R. ホートン, K.G. スクリグアウト, M.D. ペリー; 鈴木紘一, 宗川惇子, 笠井献一, 宗川吉汪, 榎森康文, 川崎博史. 2013. ホートン生化学第5版. 東京化学同人.

## 本研究に関連した論文及び発表

### 原著論文

1. M. Hirai, S. Ajito, H. Iwase, S. Takata, N. Ohta, N. Igarashi, N. Shimizu. 2019. Restoration of myoglobin native fold from its initial state of amyloid formation by trehalose. *J. Phys. Chem. B*. 122:11962-11968.
2. 味戸聡志, 平井光博. 2019. トレハロースによるタンパク質の酸変性及び凝集に対する回復作用. *分析化学*. 68:43-49.
3. S. Ajito, H. Iwase, S. Takata, M. Hirai. 2018. Sugar-mediated stabilization of protein against chemical or thermal denaturation. *J. Phys. Chem. B*. 122:8685-8697.
4. S. Ajito, M. Hirai, H. Iwase, N. Shimizu, N. Igarashi, N. Ohta. 2018. Protective action of trehalose and glucose on protein hydration shell clarified by using X-ray and neutron scattering. *Physica B*. 551:249-255.

### 国際会議発表 (本人発表)

1. S. Ajito, H. Iwase, S. Takata, N. Shimizu, N. Igarashi, M. Hirai. 2018. Suppression of sugars on the protein denaturation by guanidine hydrochloride. XVII International Small Angle Scattering Conference. Traverse City. USA.
2. S. Ajito, N. Shimizu, N. Igarashi, M. Hirai. 2018. Wide-angle X-ray scattering studies of effects of sugars on thermal and chemical denaturation of protein. 8th International Colloids Conference. Shanghai. China.
3. S. Ajito, M. Hirai, H. Iwase, N. Ohta, N. Shimizu, N. Igarashi. 2017. How dose trehalose affect protein structure and its stability? International Conference on Neutron Scattering 2017. Daejeon. Korea.

### 国内会議発表 (本人発表)

1. 味戸聡志, 平井光博. 2019. トレハロースによるタンパク質水和殻保護作用およびアミロイド様凝集からの回復作用. 2018年度量子ビームサイエンスフェスタ. つくば市.

2. 味戸聡志, 平井光博. 2018. 糖・ポリオールによる蛋白質の溶媒和および構造安定性に対する効果. PF 研究会「多様な物質・生命科学研究に広がる小角散乱～多（他）分野の小角散乱を学ぼう！」. つくば市.
3. 味戸聡志, 平井光博. 2018. 糖によるタンパク質の構造安定化作用. 「生物の環境適応と分子科学」研究会. 文京区.
4. 味戸聡志, 平井光博. 2018. WAXS と SANS を用いた蛋白質の化学変性・熱変性に対する糖による抑制作用の研究. 溶液蛋白質構造研究の最先端. 熊取町.
5. 味戸聡志, 平井光博. 2018. How do sugars affect protein solvation and structure stability?: WAXS and SANS studies of chemical and thermal denaturation of proteins. 日本生物物理学会第 56 回年会. 岡山市.
6. 味戸聡志, 平井光博, 2018. タンパク質の化学変性・熱変性・酸変性に対する糖による安定化作用. 日本中性子科学会第 18 回年会. 水戸市.
7. 味戸聡志, 平井光博, 清水伸隆, 五十嵐教之, 太田昇, 岩瀬裕希, 高田慎一. 2018. 糖溶液におけるタンパク質水和シェルの構造学的研究. 第 18 回日本蛋白質科学会年会. 新潟市.
8. 味戸聡志, 平井光博, 清水伸隆, 五十嵐教之, 太田昇, 岩瀬裕希. 2018. WAXS と SANS を利用した糖溶液におけるタンパク質の構造,水和,安定性の研究. 2017 年度量子ビームサイエンスフェスタ. 水戸市.
9. 味戸聡志, 平井光博. 2017. Role of sugar on the stabilization of protein structure. 日本生物物理学会第 55 回年会. 熊本市.
10. 味戸聡志, 平井光博. 2017. 糖によるタンパク質安定化作用の構造学的研究. 2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ. つくば市.
11. 味戸聡志, 平井光博. 2016. SWAXS analysis on effect of trehalose on myoglobin structure. 日本生物物理学会第 54 回年会. つくば市.

## その他の論文及び発表

### 論文

1. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, T. Iwasa, X. Li, D. Wen, R. Kawai-Hirai, N. Ohta, N. Igarashi N. Shimizu. 2019. Structure of ultrafine bubbles and their effects on protein and lipid membrane structures studied by small- and wide-angle X-ray scattering. *J. Phys. Chem. B.* 123:3421-3429.
2. M. Hirai, S. Ajito, S. Arai, M. Adachi, R. Shimizu, K. Wakamatsu, S. Takata H. Iwase. 2019. Observation of protein and lipid membrane structures in a model mimicking the molecular-crowding environment of cells using neutron scattering and cell debris. *J. Phys. Chem. B.* 123:3189-3198.
3. M. Hirai, S. Ajito, S. Sato, N. Ohta, N. Igarashi N. Shimizu. 2018. Preferential intercalation of human amyloid-beta peptide into interbilayer region of lipid-raft membrane in macromolecular crowding environment. *J. Phys. Chem. B.* 122:9482-9489.
4. M. Hirai, S. Ajito, M. Sugiyama, H. Iwase, S. Takata, N. Shimizu, N. Igarashi, A. Martel L. Porcar. 2018. Direct evidence for the effect of glycerol on protein hydration and thermal structural transition. *Biophys. J.* 115:313-327.
5. M. Hirai, S. Ajito, M. Sugiyama, H. Iwase, S. Takata, N. Shimizu, N. Igarashi, A. Martel L. Porcar. 2018. Macromolecular crowding effect on protein structure and hydration clarified by using X-ray and neutron scattering. *Physica B.* 551:212-217.
6. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, K. Takeuchi, R. Kimura T. Iwasa. 2017. Analysis of intramolecular structural change of protein unfolding-folding process by using resonant X-ray scattering. *SPRING-8/SACLA Research Report.* 5:27-31.

### 国際会議発表 (共著)

1. M. Hirai, S. Ajito, S. Arai, S. Takata H. Iwase. 2018. Determination of protein structure in mimic-cell molecular crowding. XVII International Small Angle Scattering Conference. Traverse City. USA.

2. M. Hirai, S. Ajito, M. Sugiyama, H. Iwase N. Ohta. 2017. Effect of molecular crowding on protein structure clarified by neutron and X-ray scattering. International Conference on Neutron Scattering 2017. Daejeon. Korea.
3. T. Iwasa, D. Wen, X. Li, S. Ajito, M. Ozaki M. Hirai. 2017. Structural studies on the perireceptor proteins involving in the chemoreception. 19th IUPAB congress and 11th EBSA congress. Edinburgh. UK.

### 研究所報告書等 (共著)

1. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, Y. Maezawa, T. Iwasa, D. Wen, J. Kamimura, T. Kimura, X. Geng. 2017. 濃厚糖溶液中の蛋白質の構造状態と安定性、変性・折り畳み過程に関する研究. SPring-8 User Experiment Report. 2017A1435.
2. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, K. Tomita, Y. Maezawa. 2017. Effect of ultra-fine bubble water on the structure of protein and lipid membrane. Photon Factory Activity Report. 2016#34.
3. M. Hirai, K. Takahashi, S. Ajito, Y. Maezawa, K. Tomita, T. Iwasa. 2016. Structural characteristics of liposome entrapping protein depending on lipid composition and temperature. SPring-8 User Experiment Report. 2016B1381.
4. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, T. Iwasa. 2016. Effect of ultra-fine bubble water on protein structure. SPring-8 User Experiment Report. 2016A1487.
5. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, R. Kimura, K. Takeuchi. 2016. Development of resonant X-ray scattering method of metallo-proteins in solutions. Photon Factory Activity Report. 2015#33.
6. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, C. Katagiri, T. Iwasa. 2015. Effect of Crowding Environments on Protein Structure Below 0°C. SPring-8 User Experiment Report. 2015B1489.
7. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, T. Iwasa. 2015. Structural studies on the perireceptor protein of chemoreception. SPring-8 User Experiment Report. 2015B1355.
8. M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, S. Sato, T. Iwasa, X. Li. 2015. Effect of molecular crowding on protein structure stability and hydration. SPring-8 User Experiment Report. 2015A1557.