

解説

温度ジャンプ溶液小角散乱と構造学的速度論 —タバコモザイクウイルス蛋白質の会合過程を例として—

柘 弓絃¹⁾, 佐野 洋²⁾, 井上 英男³⁾,
植木 龍夫⁴⁾, 梶原 莞爾⁵⁾, 中谷 博⁶⁾

- | | |
|-----------------|--------------|
| 1) 京都大学化学研究所 | 2) 農業生物資源研究所 |
| 3) 島津製作所 | 4) 大阪大学基礎工学部 |
| 5) 京都工芸繊維大学工芸学部 | 6) 京都大学農学部 |

**Structural Kinetics by Rapid Temperature-Jump Solution Small-Angle
X-ray Scattering: an Application to the Self-Assembling Process of
Tobacco Mosaic Virus Protein.**

**Yuzuru Hiragi¹⁾, Yoh Sano²⁾, Hideo Inoue³⁾,
Tatuo Ueki⁴⁾, Kanji Kajiwara⁵⁾ and Hiroshi Nakatani⁶⁾**

- | |
|--|
| 1) Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611 |
| 2) National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba City, Ibaraki 305 |
| 3) Shimazu Corporation, Nakagyo-ku, Kyoto 604 |
| 4) Department of Biophysical Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560 |
| 5) Faculty of Engineering and Design, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606 |
| 6) Department of Food Science and Technology, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 |

Synopsis

The measuring system for synchrotron small-angle X-ray solution scattering coupled with a temperature-jump device was developed and applied to the study of the self-assembling process of tobacco mosaic virus protein (TMVP).

The analytical formalism for rod formation of TMVP was proposed and the kinetic constants for disk stacking were estimated.

Proposed analytical procedure is applicable not only to the temperature-jump method but also to the other kinetic small-angle solution scattering experiments.

1. はじめに

溶液のX線小角散乱法(SAXS)は、溶液中と言う生理状態に近い条件で、生理学的に意義を持つ生体高分子、例えばウイルス等の構造形成過程やタンパク質である酵素の様な物質の構造変化を直接的に追跡出来ることに意義がある。しかし、溶液の散乱強度は弱く、従来のX線発生装置を用いたのでは、PSPC等の効率的な検出等を用いても測定に数時間以上も要し、静的な構造変化の始めと終わりの構造を知ることはできても、動的に秒単位で変化する過程を観測することは不可能であった。また、構造変化の途中で形成される中間体は、時間が経過すれば消滅してしまうので、変化の時間過程を追跡する以外には検出できない。このように構造変化を直接的に観測できるのがSAXSの利点である。

特に、高エネルギー物理学研究所のBL-10Cは2次元的に集光された光源として強力であり、酵素回折ワーキンググループによって製作された酵素回折計(SAXES¹⁾)は、溶液散乱に適するように高い小角分解能と低バックグラウンドを達成するよう設計されているため、この目的にかなっている。

構造変化の時間的過程を研究するには、その目的によって、二つの物質を混合させて反応させるストップ・フロー法と物質の環境(例えば温度)に変動を与えるジャンプ法とに大別される。前者の方法に関しては酵素回折計では、牛血清アルブミンの-S-S-結合切断による変成過程の研究(Ueki et al.²⁾)を行ってきたし、筋肉回折計に於いても実験が行われている。ここでは、前者が主として不可逆的な過程の観測を目的とするのに対し、可逆的な過程を研究するのに適した温度ジャンプ法を例にとって述べる事にしたい。いずれの方法にしても実験手段が異なるだけで、速度論的取扱については変わらない。

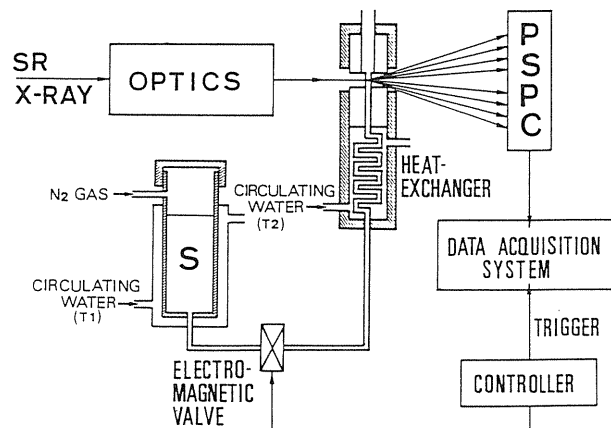


Fig. 1. Schematic diagram of the system for the time-resolved temperature-jump synchrotron small-angle X-ray scattering measurements. Sample solution S of the temperature T₁ is injected by the pressure of N₂ gas into the heat exchanger kept at the temperature T₂. A trigger pulse opens the electromagnetic valve and initiates the data-acquisition system simultaneously.

2. 温度ジャンプX線小角散乱装置

X線小角散乱法に適した温度ジャンプ装置を作るためには、特別の工夫が必要である。他の測定法(例えば可視、紫外分光学的方法)の場合には大きくて頑丈なセルを用いることができるので、大電流を流してジュール熱を発生させて急激に昇温させるのが普通であるが、小角散乱セルの様な小さなスペースに大きな電極をセットすることは不可能である。図1に我々が考案した方法と測定システムを示す。システムは3つの部分からなる。光学系とデータ収集系は既に説明があるので^{1, 2)}ここでは述べない。容量約10mlのガラスシリンダーのリザーバに入れた溶液試料に循環水をジャケットに流し温度T₁(例えば、タバコモザイクウイルス(TMV)蛋白質の時は5℃)に保つ。容器には1~2気圧の窒素ガスで加圧し、コントローラーで設定された時間だけ電磁バルブを開く。この時トリガーで、CAMACをコントロールするコンピューターにスタート信号を送る。

試料溶液は、温度T₂(例えば、25℃)の恒温槽になっている熱交換器中の内径約1mmの金属製

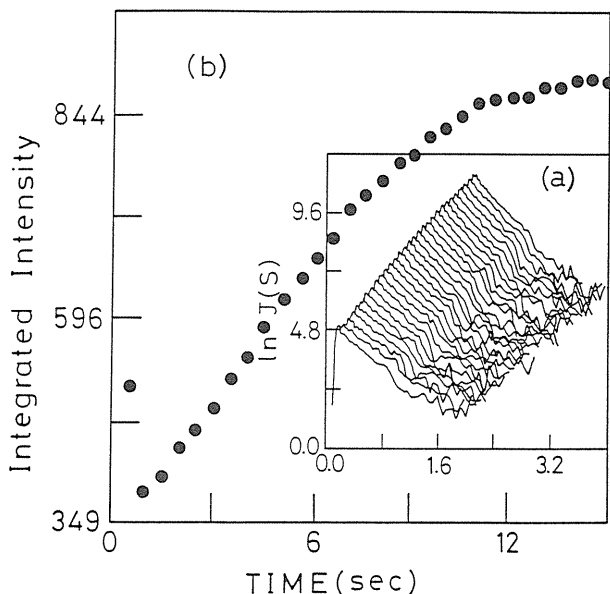


Fig. 2. An example of the result of time-resolved small-angle X-ray scattering experiments of TMV protein temperature-jumped from 5 °C to 25 °C. Fig. (a) shows Guinier plot ($\ln J(s)$ vs. S^2) of the net scattering curves and Fig. (b) shows the time course of "integrated intensity" defined by $\int J(s) ds$.

のパイプを流れる間に、T2にジャンプし同じ温度に保ったセルに送り込まれ、構造変化に伴う散乱曲線の変化を時分割測定する。この温度ジャンプ装置の、dead timeは約0.3秒で、10秒以内の速さの構造変化の過程を観測することができる³⁾。

結果の一例を図2に示した。従来の装置⁴⁾では、数分の速度過程でしか観測できなかったのに比べ、この装置では1桁以上速い過程の研究が可能となった。しかもこの時の、一測定点(フレーム)の積算計測時間は僅か7.5秒である。この様な短時間の測定で、図の様に非常に良いデータを得ることが出来たのは、高エネルギー物理学研究所のBL-10Cの光源強度の強さを示すものであり、同時に貴重な生物試料の節約にも大いに貢献している。

3. TMV蛋白質の会合特性

我々は、この装置を実際にTMV蛋白質の会合過程の研究に応用してみた。

生物はそれぞれ特有の形と大きさを持っている。しかし、生物における形態形成反応が余りにも複雑であるため、特有の形と大きさがいかにして形成されるかについては一般に説明がむずかしい。しかし、ウイルスはその構造が比較的簡単である。その形態形成のメカニズムを説明することは容易であるかもしれない。ウイルスは棒状、ひも状、球状、長方形など比較的解析しやすい特有の形を持っている。

タバコモザイクウイルス(TMV)はモザイク病のタバコから単離されたウイルスで最初に発見され、1935年にStanleyによって初めて結晶状に精製された植物ウイルスである。

TMVは直径18nm、長さ300nmの硬直型棒状ウイルスであって、同種類の蛋白質サブユニットがらせん状に2,200個積み重ねてウイルス外被を作り、その内側にRNA分子が1本、蛋白質と結合した状態で外被蛋白質と同じピッチでらせん状に巻いている。このウイルスグループにはTMVの他に、キュウリ緑斑モザイクウイルス、オドントグロッサムリングスポットウイルスなどが属する。これらはタバコウイルスグループにまとめられており、各ウイルスの病理学、血清学的性質および外被蛋白質の化学的性質から普通系統、トマト系統、ササゲ系統、キュウリ緑斑モザイクウイルスなど10系統以上に分類されている。最もよく研究されているTMVは普通系統に属する。

TMV粒子から化学的方法で分離調整したRNAと外被蛋白質から試験管内で活性のあるウイルス粒子を再構成することができる。このことは分子集合体の自己会合という概念を導入したという意味で重要なものである。すなわち、形態形成に必要な情報がその構成成分の構造の中に含まれているということである。

外被蛋白質それ自身でも、溶液のある条件では、ウイルス粒子とよく似た棒状の会合体を形成することが知られている。一般には蛋白質濃度、pH、イオン強度、温度などによって種々の会合体を作

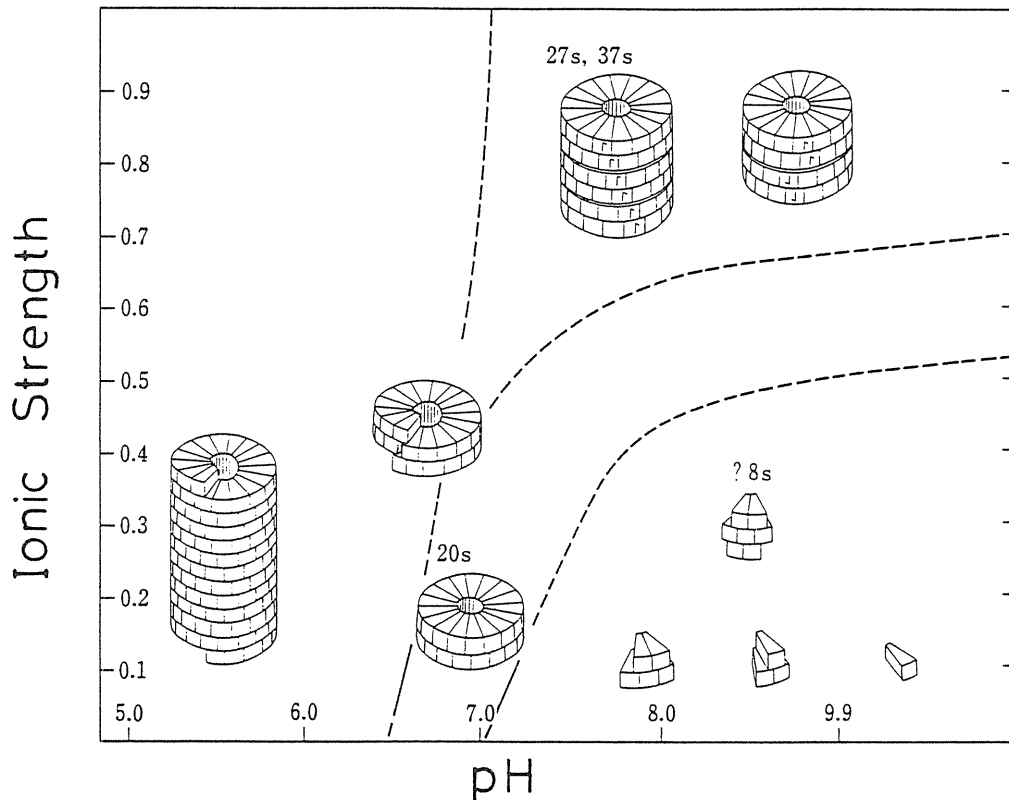


Fig. 3. Phase diagram of TMV protein. Adapted from Durham et al.⁵⁾

る。図3はDurhamら⁵⁾がまとめたTMV蛋白質会合体の状態図である。これはリン酸緩衝液を用い、20°C、蛋白濃度5 mg/mlにおける会合状態を表している。pHが酸性では蛋白質のみでもウイルス粒子と同様の長い棒状の会合体を作ることができる。しかし、RNAと反応することはできないのでRNAをまぜた時でも当然粒子には感染性はない。生理学的に近い中性付近では20Sディスクと呼ばれる2重の円板状の会合体が形成される。すなわち、1層17個のサブユニットがリング状に2層に重なり合計34個のサブユニットからなる会合体である。これは電子顕微鏡で円板状の会合体が観察されたため、ディスクと同定されている。低イオン強度でアルカリ側のpHでは主にA-蛋白と呼ばれる4Sの会合体として存在する。もちろん図3は図をわかりやすくするために、その条件における主な会合体の一つだけを図示しているのであって、実際には数種の会合体が共存している。図3の境界線は温度が低くなると左へ移行す

る。すなわち、TMV蛋白質は疎水結合によって会合するので温度を上げるとA-蛋白から、それらが会合した円板状ディスクになり、さらにディスクの積層した棒状にまで成長するわけである。再構成反応が起こる中性pH、低イオン強度条件では大部分の蛋白質が20Sディスク会合体を形成し、4S蛋白質と平衡状態で存在する。

ウイルス粒子が核酸と蛋白質から再構成反応を起こす時には、まずこの円板状の20Sディスクが形成されてウイルス粒子の直径を規定し、RNAと初期複合体を形成する。その後伸長反応によって棒状粒子にまで成長する。

この時、RNAはただ棒状構造をとるときの長さを決定する因子として働いており、ウイルスの形を決める因子としては蛋白質が非常に重要な役割をしている。たとえば、球形ウイルスのRNAとTMV蛋白質の反応では棒状構造が作られるが、逆にTMVのRNAと球形ウイルスの蛋白質との反応では球形構造が作られることから明らかで

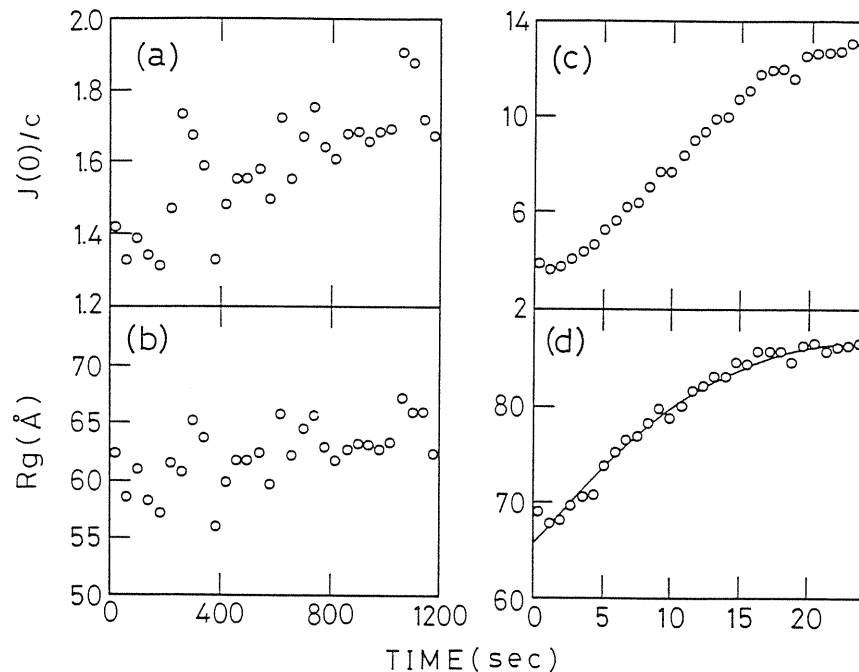


Fig. 4. Some results of temperature-jump experiments. (a) and (b) TMV protein concentration of 5 mg/ml in 50mM phosphate buffer (pH 7.2) jumped from 5 °C to 20 °C and (c) and (d) TMV protein concentration of 12 mg/ml in 100mM phosphate buffer (pH 7.2) jumped from 5 °C to 25 °C. $J(0)/c$ and R_g indicate reduced scattering intensity extrapolated to the zero scattering angle and radius of gyration, respectively.

あろう。

4. SAXSによるTMV蛋白質の会合過程

上述したごとく、温度ジャンプに伴うTMV蛋白質の会合状態変化の時分割測定は会合機構の解明にも寄与して興味ある問題である。

ただ反応測定が数ミリ秒から数秒とかなり速い過程を含んでいるので、放射光を利用した時分割小角X線散乱測定装置が開発されるまでは定量的な取り扱いは殆どされていなかった。ただSchusterら⁶⁾は3分間に2°Cから20°Cに溶液の温度を上昇させて366nmにおける90°方向の光散乱強度の変化を測定し、TMV蛋白質の会合体の形成には20Sディスクが中間体として存在することを示唆した。最近Schusterら⁷⁾は放射光を用いた小角X線散乱測定装置によってやはりTMV蛋白質の会合過程の温度ジャンプ測定を

行っている。これらの測定結果から彼らはTMV蛋白質の棒状粒子への会合には約20サブユニットを含んだ一層のヘリカルな核を中間体として進行していると提案している。この中間体は先の提案とは異なっており、測定X線散乱強度曲線を単分子分散と仮定したモデル計算と比較して導いたもので、説得力にかけるところがある。さらに温度上昇に要する5秒間に中間体が形成されて、この状態から測定が開始されたとも考えられるので、デッドタイムのさらに短い測定が必要と思われる。

そこで我々はこれらの点を考慮して、我々が開発した急速な温度ジャンプが行える装置を用いて、時分割X線小角散乱測定を高エネルギー物理学研究所放射光実験施設BL-10Cに於いてTMV蛋白質の会合反応を調べた。

図4は、会合過程の実験結果の1例である。蛋白質濃度、イオン強度が共に希薄で温度のジャンプ

幅が小さい時には、図4(a)の様に平均分子量に対した、 $J(0)/C$ は増大するのに、 R_g は不変であった。このことは、20Sディスクが会合の中間体で、集合体のサイズは大きくならないのに、数が増加していることを意味している。つまり20Sディスクが会合過程の中間体であることが判る⁹⁾。一般的には当然のことながら、図4(c)および(d)の様に両者共に増加する。この最終生成物の構造は、既に測定した静的実験の結果とも一致する⁹⁾。

5. 小角散乱法による実験結果の解析

先にも述べた様に、小角散乱法と組み合わせた速度論的研究をするには、従来の分光学的研究の解析法をそのまま適用することは出来ない。なぜなら、普通分光学的に観測される中間体あるいは最終生成物の量は吸光度に比例するが、散乱法の場合構造変化の過程を見ているので溶液は多分散系であり、与えられる量は、初期状態、中間体、最終生成物の構造と関連した平均値で与えられる。例えば、散乱強度の、 $S(=4\pi \sin \theta / \lambda) \rightarrow 0$ から求められる、 $J(0)/C$ (C は蛋白濃度)は、重量平均分子量であり、ギニエ・プロットより得られる回転半径は z -平均(2乗平均)である。従来、特に外国で用いられている散乱強度の積分値は、図2に見られるように一見誤差の少ない変化曲線を与えるので、この変化が指標として用いられてきた。しかし、この積分強度の値は物理的意味が明瞭でなく、解析に用いるのは適切でない。解析には、はっきりした意味を持つ平均分子量や、平均回転半径などを用いるべきである。また、単純に1次反応と仮定して、指数関数を含む多項式に積分強度を当てはめるのは、ますます意味が不明瞭になるので避けるべきである。

以下に小角散乱法による実験結果の解析法について述べる。TMV蛋白質の会合過程を例に取れば、図5に示したごとく、小さな集合体であるA-蛋白から、前述の20Sディスクを経てロッド状の集合体を形成する過程である。したがって、解

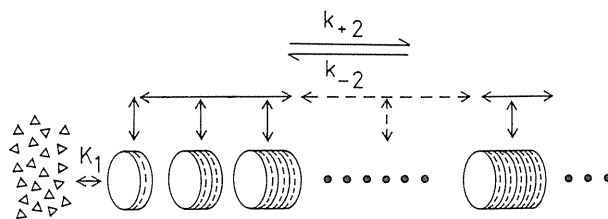


Fig. 5. Scheme for self-assembly of TMV protein, represented by a random association-dissociation mechanism. The following assumptions are made for the self-assembling process: (1) formation of the 20S disk from A-protein is very fast and there is an equilibrium between them; and (2) further association to form the several sizes of stacked disks (short rods) proceeds by stacking of the disk or rods with a single velocity constant k_{+2} , and velocity of dissociation of a rod to shorter rods the disk is k_{-2} .

析は次のように考えればよい。

(1) モノマー保存則。

全蛋白質濃度、 C_T はA-蛋白のサブユニット数、 n_A 、20Sディスクの積層した集合体のサブユニット数を n_{D_i} 、とし、 a 、を前者の、 d_i 、を後者の濃度とすれば：

$$C_T = n_A \cdot a(t) + n_{D_i} \sum_{i=1}^m \cdot d_i(t)$$

(2) 平衡条件

A-蛋白と20Sディスク間には平衡関係が成り立つとして：

$$d_i / a^2 = K_1$$

(3) 平均回転半径

時間、 t 、での各成分の濃度を、 d_i として：

$$R_g^2(t) = \frac{a(t)n_A^2 R_{gA}^2 + \sum d_i(t)n_{D_i}^2 R_{gD_i}^2}{a(t)n_A^2 + \sum d_i(t)n_{D_i}^2}$$

(4) 速度式 (連立微分方程式)

$$d(d)_i / dt = k_{+2} \sum_{1 \leq i \leq j/2}^m d_i \cdot d_{j-1} \\ + k_{-2} \sum_{j=i+1}^m d_i (i-1) \cdot k_{-2} \cdot d_j \\ - k_{+2} \cdot d_i \sum_{j=1}^{m-i} d_j$$

ここでは、観測量として平均回転半径を用いているが、平均分子量あるいは平均弦(コード)長を用いてもよい。ただ、回転半径を用いる法が、絶対強度の測定が必要でないこと、モデルからの構造の推定が容易に出来る点で便利である。

例として図4(d)の回転半径のデータを基にした解析結果を実線で示した。この時の平衡定数の値は、 $K_1 = 6625.3$ 、速度定数 $k_{+2} = 7.15 \times 10^4$ ($M^{-1} \text{sec}^{-1}$)、 $k_{-2} = 1.04 \times 10^{-1}$ (sec^{-1}) である¹⁰⁾。白丸の実験結果は上述の解析でよく説明出来る事がわかる。

6. おわりに

ここに述べた解析法は、TMV蛋白質の会合過程の解析に用いた方法であるため、一部特殊な点もあるが容易に一般化できる。なお、回転半径、分子量、コード長等の量に関しては、それぞれの物理的意味に特徴があるため、個別に速度論的解析を行い総合的に比較検討すれば、さらに興味ある結果が得られるのでは無かろうか。今後に残された課題である。

諸外国で我々がBL-10Cで行ったのと同じ様な実験が将来可能になれば、この解析法が参考になるのであろう。また、ストップ・フロー法の場合も散乱法である限り、同じ取扱ができる。

謝 辞

ここで述べた、温度ジャンプ溶液X線小角散乱法を中心とした、本格的な生体物質の動的構造の研究法を確率できたのは、安定で強力な光源を長時間供給するのに心血を注がれた、高エネルギー

物理学研究放射光施設のスタッフの方々のおかげであり、心より御礼申し上げます。

また、実験に際し直接に協力を戴いた、松下正(高エ研放射光)、雨宮慶幸(高エ研放射光)、片岡幹雄(東北大理)、小Link已(高エ研放射光)の各先生方に感謝します。

本研究は、BL-10Cに於て、酸素回折計を用いて行われた共同研究(課題番号84-003及び、86-026)として行われたものである。また、本研究の一部は、農林水産省別枠研究「生物情報の解明と制御による新農林水産技術の開発に関する総合研究」(BMP89-IV-1-4)のプロジェクト研究費(Y・Sに対する)の援助のもとに行われた。

文献

- 1) T.Ueki, Y.Hiragi, Y.Izumi, H.Tagawa, M.Kataoka, Y.Muroga, T.Matsushita and Y.Amemiya, **Photon Factory Activity Rep.** 1982/83, VI-70 (1983).
- 2) T.Ueki, Y.Hiragi, M.Kataoka, Y.Inoko, Y.Amemiya, Y.Izumi, H.Tagawa, and Y.Muroga, **Biophys. Chem.** 23, 115 (1985).
- 3) Y.Hiragi, H.Nakatani, K.Kajiwara, H.Inoue, Y.Sano, and M.Kataoka, **Rev.Sci.Instrum.** 59, 64 (1988)
- 4) E-M.Mandelkow, A.Hamsen, E.Mandelkow, and J.Bordas, **Nature** 287, 595 (1980).
- 5) A.C.H.Durham and A.Klug, **Nature New Biol.** 229, 42 (1971).
- 6) T.M.Schuster, R.B.Scheele, M.Adams, and S.J.Shire, **Biophys.J.** 32, 313 (1980).
- 7) M.Potschka, M.H.J.Koch, M.L.Adams, and T.M.Schuster, **Biochemistry**, 27, 8481 (1988).
- 8) Y.Hiragi, T.Ueki, H.Inoue, Y.Sano, K.Kajiwara and M.Kataoka, **Photon Factory Activity Rep.**

4 , 212 (1986).

- 9) Y.Hiragi, H.Inoue, Y.Sano, K.Kajiwara, T.Ueki,
M.Kataoka, H.Tagawa, Y.Izumi, Y.Muroga
and Y.Amemiya, **J.Mol. Biol.** 204, 129 (1988).
- 10) Y.Hiragi, K.Kajiwara, H.Inoue, Y.Sano, T.Ueki
and H.Nakatani, **Manuscript in preparation.**