

## An assessment study on a solution X-ray scattering measurement for protein chromatography

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 康, 猪子, 洋二 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00002684">https://doi.org/10.24514/00002684</a>

## 報 文

## タンパク質のクロマトグラフィー検出手段としての溶液X線散乱測定

渡邊 康<sup>§</sup>, 猪子 洋二\*

## An assessment study on a solution X-ray scattering measurement for protein chromatography

Yasushi Watanabe<sup>§</sup> and Yoji Inoko\*<sup>§</sup>National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

\*Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531

## Abstract

Protein characterization plays a valuable role in the various fields including life and food science. Proteins have various structure forms in solution depending on its solvent environment. As a general technique, chromatographic separation in solution is an indispensable procedure both in research and industrial protein characterization. In this study, the preliminary evaluation will be reported about a solution X-ray scattering measurement device as a protein chromatography detector. Protein size and the zero-angle scattering intensity which is proportional to the molecular weight of a protein during the separation of proteins in solution will be determined by using this technique.

タンパク質が関連する食品科学および食品産業において、タンパク質の分離・分析および特性解析技術の開発・改良は、重要な課題の一つである。具体的な例としては、食品素材研究において食品中の主要成分としてのタンパク質を単離・精製してその生化学的あるいは物理化学的特性を解明することは、新規な機能の発見や利用技術の開発・改良に不可欠である。タンパク質を効率的に分離精製する手法のひとつとして、タンパク質の分子サイズや形態による分離ができる液体ゲル濾過クロマトグラフィーが利用されている<sup>1)</sup>。

一方、溶液X線散乱法は低分解能ではあるが溶液中のタンパク質の構造情報を得られる手法である<sup>2)</sup>。近年の放射光の発展により<sup>3)</sup>、比較的低濃度の試料での溶液散乱実験が可能となった<sup>4)</sup>。溶液X線散乱の長所は、生理的な条件ばかりでなく種々の溶媒条件での測定が可能である点である。

現在、タンパク質のクロマトグラフィーの検出手段としては、紫外吸光度、示差屈折率あるいは蛍光強度測定などが主として利用されている。本研究では、新たな知見が得られる可能性のある方法として、タンパク質のクロマトグラフィーの検出手段に溶液X線散乱測定を適用した結果について報告する。本手法は、タンパク質の回転半径、ゼロ散乱強度の分離直後の計測が一度の実験から取得することができる有効な手法である。

## 実験方法

ウシ血清アルブミンは、ナカライテスク(株)から購入した。放射光溶液X線散乱測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームラインBL10Cに設置された小角溶液X線散乱測定装置(酵素回折計)を使用した<sup>5)</sup>。検出器は一次元位置敏感比例係数装置を用い、X線の

2005年10月19日受付, 2006年1月10日受理

<sup>§</sup>連絡先 (Corresponding author)

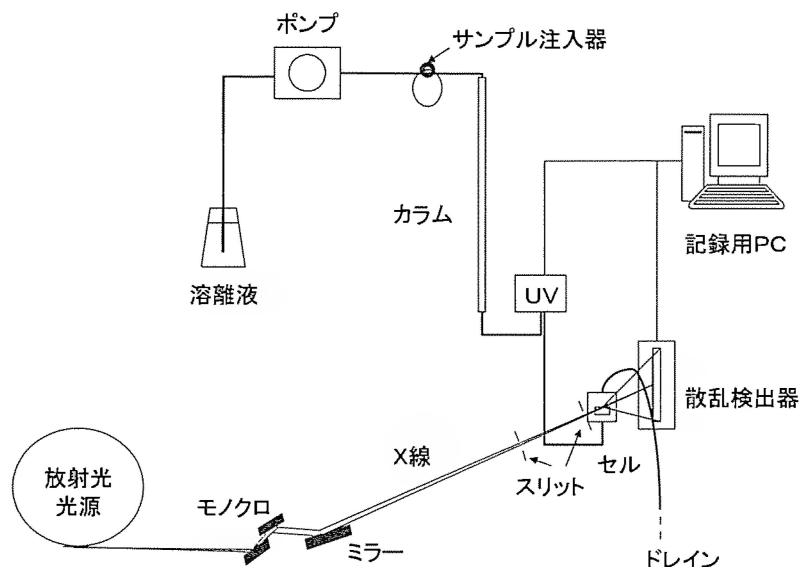


図1 測定系の概念図

波長は0.1488nm, 試料検出器間距離は900mmとした。

ゲル濾過クロマトグラフィーカラムは、Superdex200 (300 X 26mm, アマーシャム (株)) を使用し、溶出ポンプはシグナルペリスタティックポンプモデルTMP-6L (東洋科学産業 (株)) を使用した。溶出液の280nmにおける紫外吸収測定には、フロータイプの紫外吸光度計 (AC5100, アトー (株)) を使用した。ウシ血清アルブミンの濃度は、光路長1 cm, 1%溶液の280nmにおける吸光係数6.78を用いて計算した<sup>6)</sup>。

### 実験結果と考察

放射光溶液X線散乱測定装置は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームラインBL10Cに設置されている装置を利用した。この光学系では、電子蓄積リング光源より得られた放射光X線を2結晶モノクロメーターにより単色化し、湾曲円筒ミラーにより収束させ、1次元検出器上で高輝度の収束ビームを得ている。試料位置でのビームサイズは縦2 mm以下、横7 mm以下に調整でき、小角分解能は約100nmである。空気によるX線の吸収散乱を防ぐため、試料槽と検出器付近を除き光学素子やX線パスはすべて真空中に保たれている。図1に、本研究の測定系の概略を示す。ゲルクロマトグラフィーカラムの溶出後、紫外吸光度計につづけてX線散乱測定セルに溶離液を送液できるように設定した。

試料セルは、厚み1 mm, 縦18mm, 横30mmのステンレ

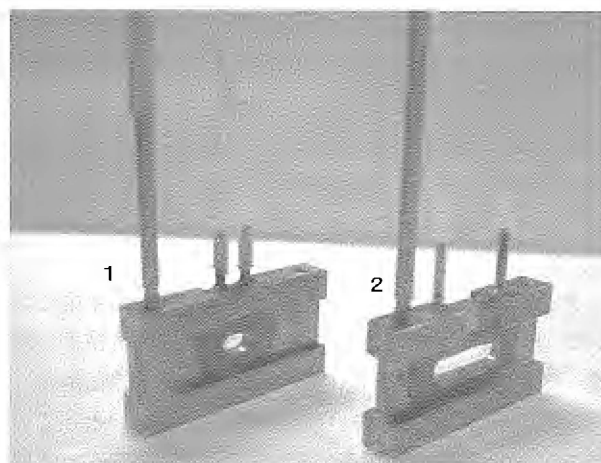


図2 溶液X線散乱測定セル

1: 厚みが2 mmで、縦3 mm, 横5 mmの試料部のセル。2: 厚みが1 mmで、縦3 mm, 横15mmの試料部のセル。両セルにおいて、最大厚み部分は5 mmであり、手前の棒は、セルホルダーにセットするためのハンドリングのために取り付けられた。

ス板の中央に縦3 mm, 横5 mmあるいは15mmの穴を開けその両面に窓材としてマイカを貼った (図2)。また、内径約0.6mm外径約0.9mmのステンレスパイプを2本左右に溶接し、溶離液を流せる構造を持つ (図2)。そのパイプにシリコンチューブ (内径1 mm, 外径3 mm) を接続しフローセルとした。セル容積は1 mm厚のセルで15  $\mu$ lあるいは45  $\mu$ lである。本研究で併用した紫外吸光

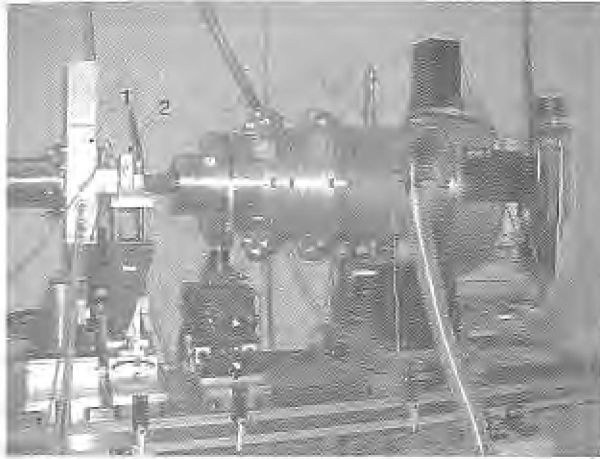


図3 溶液X線散乱測定装置の外観  
1: 試料直前のスリット, 2: 試料セルホルダー

度計のセル容量 (約 $60\mu\text{l}$ ) 以下に納めることが可能となり、今後、分離系およびX線散乱検出器などの改良により感度が向上した場合にも対応可能とした。通常、光源X線波長は $0.1488\text{nm}$ を使用するので、水溶液試料の測定効率から $1\text{mm}$ 厚のセルを使用する。しかし、本散乱測定装置は放射光源を利用する利点から比較的容易にX線波長を短くすることが可能で、セル厚を $1\text{mm}$ より厚くする方が測定効率が良いので、 $2\text{mm}$ 厚のセルも、今後の測定条件に備えて試作した (図2)。

試料位置でのビームサイズは、試料前方に設置されている4象限スリットで調整する (図3の1)。ビームサイズは縦約 $1\text{mm}$ 、横を数 $\text{mm}$ 以下で使用する。実際の測定においては、この自作フローセルを恒温循環水にて試料セルの温度を制御できるセルホルダーに設置する (図3の2の位置)。散乱測定の上流には、光路長 $5\text{mm}$ のフローセル型の紫外吸光度計を接続し (図4)、 $280\text{nm}$ の吸光度データを散乱測定と同期してコンピューターに保存できるようにデータ転送系を組み立てた。得られた散乱データは、試料直前のイオンチャンバーの出力により入射強度変化の補正をする。鶏の腱コラーゲンを標準物質として、検出器のチャンネルを散乱ベクトル $q (= (4\pi/\lambda) \sin\theta)$ 、 $\lambda$ はX線波長、 $2\theta$ は散乱角) に変換し、データ解析する。

クロマトグラフィーの条件として、流速 $0.25\text{ml}/\text{min}$ で溶離液 (50 $\text{mM}$ ナトリウムリン酸緩衝液,  $\text{pH}6.8$ ) でカラムを平衡化後、溶離液に溶解したタンパク質溶液 (濃度 $1.3\%$ 、 $0.2\text{ml}$ ) をカラムに添加した。試料としては、試料溶液中にタンパク質の会合体成分が含まれていることのわかっている市販ウシ血清アルブミンを選択し、複



図4 クロマトグラフィー測定系部分  
1: 溶離液ビン, 2: ペリスタポンプ, 3: カラム,  
4: 紫外吸光度検出器, 5: 試料セルホルダー

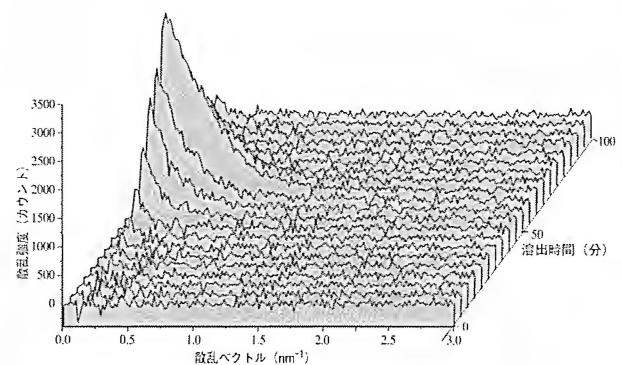


図5 散乱パターンの一例  
各溶出時の散乱パターン (散乱ベクトルに対する散乱強度のプロット) を手前から重ね書きした。

数成分の分離直後の散乱測定を以下のように行った。添加終了後1分目からX線散乱および $280\text{nm}$ の紫外吸収測定を開始し、 $280\text{秒}$ 測定その後 $20\text{秒}$ の休止を約 $100$ 分経過まで繰り返した。

図5に、上記のようにして得られた5分単位で連続計測した散乱パターン (散乱ベクトルに対する散乱強度のプロット) の変化を示した。溶出時間が約 $50$ 分から $70$ 分の間に、散乱ベクトルの $1\text{nm}^{-1}$ 以下の小角部分に散乱ピークが観察できる。タンパク質の溶出している各溶出時間における散乱データを散乱ベクトルの2乗に対する散乱強度の対数のプロット (ギニエプロット) を図6に示した。小角散乱領域では、散乱強度 $I$ は $I(0) \exp(-q^2 \cdot R_g^2 / 3)$ と表現できる。ここで、 $R_g$ は回転半径、 $I(0)$ は角度ゼロにおける散乱強度である。この関係から

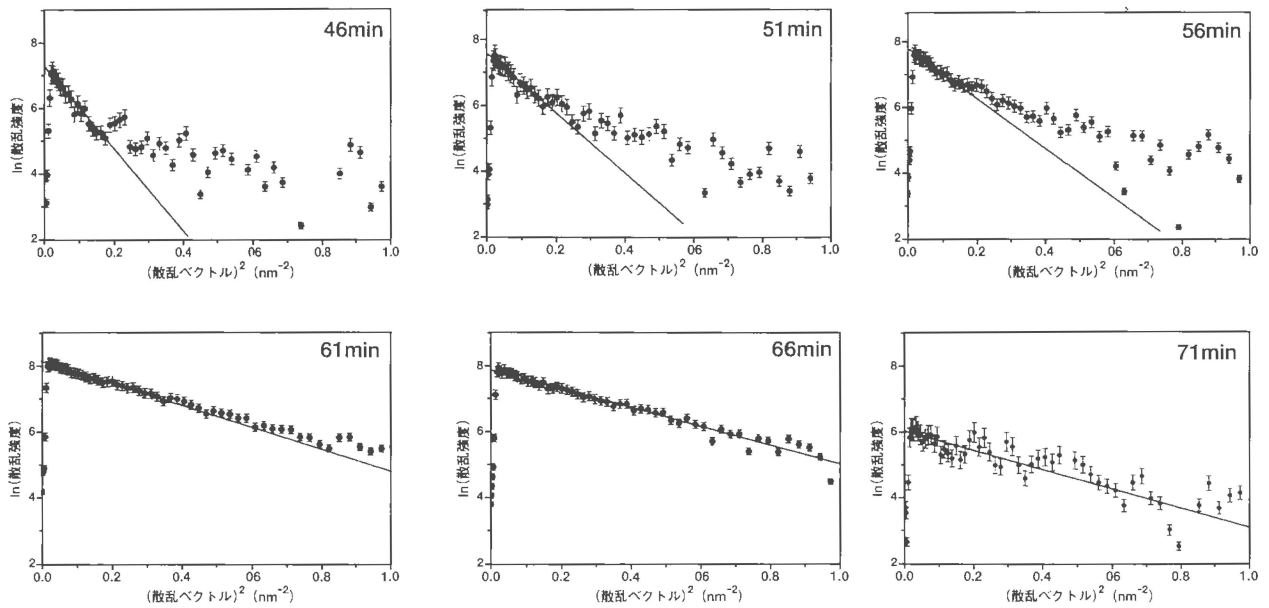


図6 各溶出位置でのギニエプロット  
各図の右上に溶出時間を示した。

ギニエプロットの小角領域 ( $q \cdot R_g < 1$ ) の直線の傾きと切片から、 $R_g$ と $I(0)$ が評価できる<sup>2)</sup>。

図7には、上記の計算結果をウシ血清アルブミンの紫外吸収測定から得られたタンパク質濃度と全X線散乱強度のクロマトグラムに重ね書きした一例を示した。タンパク質濃度と全散乱強度のクロマトグラムから、50分と60分付近にピークが観察される。この60分の主ピーク溶出付近の $R_g$ は、約3 nmと評価され、ウシ血清アルブミンの単量体であることがわかる。溶出は早いものほど $R_g$ の値は大きく評価されているので、約50分の小ピークは、本タンパク質会合体であることがわかる。一方、角度ゼロにおける散乱強度 $I(0)$ の値は、タンパク質の分子量に比例する値である。その値の主ピーク(60分)との比較から、約50分の小ピークは会合体であり、2から3量体であることがわかる。ウシ血清アルブミンの不可逆的な会合体は、市販されている精製評価品に含まれていることが知られている。しかし、その構造の実態および生理的な機能は未解決のため、今後の研究が必要である。

上記の様に、溶液散乱パターンの解析から回転半径、ゼロ散乱強度の分離直後の計測が一度の実験から得ることができる。従って、本手法は安定性の低いタンパク質などにおいて分離後に変性してしまう場合や形状の異なる分子の混合物の解析に有効な手法と思われる。光散乱測定においても分子量が評価できる<sup>7)</sup>が、溶液X線散乱では、分子形状・形態の解析が可能であるので、この点についても検討中である。

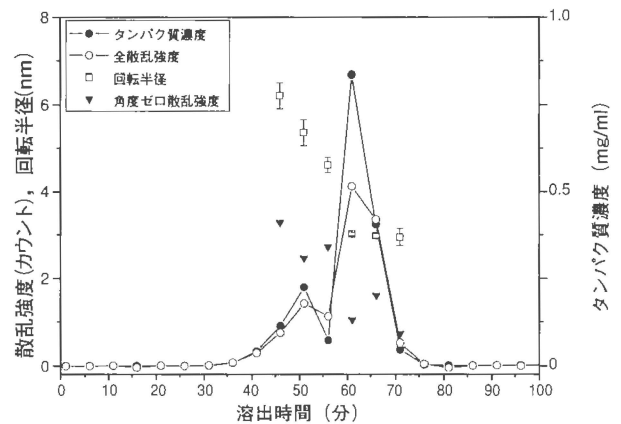


図7 クロマトグラムの一例

各溶出液の紫外吸光度計(280nm)の出力からタンパク質濃度(●)を計算した。全散乱強度(○)は280秒間の総カウント数をプロットした。回転半径(□)と角度ゼロ散乱強度(▼)は、タンパク質が溶出した部分のみの表示である。

NMRは、タンパク質の溶液構造を原子レベルで解析できる手法である<sup>8)</sup>。しかし、タンパク質の分子量が大きくても3-5万、通常は2万以下のものが主な対象となる。分子量数万のタンパク質の解析や相互作用して会合体を形成する場合などの分子論的な解析は、タンパク質の有効利用のためには不可欠な課題である。従って、本手法は、タンパク質会合状態やゲル化初期過程あるいは分子間相互作用による超分子構造の解明に効果的に利用されることが期待される。また、不安定な試料で変性

した会合体の混在が多くのタンパク質の溶液X線散乱測定において、質のいいデータ取得を困難にしている状況の解決策の一つであると思われる。さらに、タンパク質ばかりでなく多糖などの生体高分子についても本手法を適用することにより食品分野での生体分子素材の特性解明への貢献が期待できる。

放射光光源は従来のX線管を代表とする小型光源と比較して光源輝度性能が圧倒的に優れているので、比較的低濃度のタンパク質試料での溶液散乱実験が可能となった。小型光源測定系では、ウシ血清アルブミンの1%溶液で、1点の静的測定のためには数時間は必要であるので、本研究のようなクロマトグラフィー測定系の実験は不可能である。したがって、本研究で得られた結果は放射光光源を利用してはじめて得られた新規な知見である。しかし、小型光源には、大型放射光光源では不可能な簡便性と可搬性の利点があるので今後の発展を期待したい。

現状では、図7に示したようにウシ血清アルブミンの場合で溶出時のタンパク質濃度が約0.5mg/mlは必要である。より低濃度の試料の測定をするには、より高輝度のX線を照射するか高効率検出器を導入するなど種々の観点から継続的な生体分子の測定を意識した溶液X線散乱測定装置の改良・開発が重要である。

## 謝 辞

研究予算の一部は、農林水産省プロジェクト研究予算の援助を受けた。溶液X線散乱測定は、放射光共同利用実験課題（番号03G139および05G084）として行った。

## 要 約

タンパク質の関連する多様な分野において、タンパク質の溶液中の特性解析はタンパク質の有効利用や生活に関わる生命現象の解明から豊かな食生活を構築するためにはきわめて重要である。研究対象となるタンパク質は必ずしも単一の分子種でなく、分子間あるいは他分子と相互作用した分子集合体を形成し、その集合状態が

不均一である場合が少なくない。特に、溶液中においては溶媒環境によりタンパク質は多様な構造形態であることは明らかである。本研究では、そのような実態にできるだけ即したタンパク質の溶液物性の解析法の開発の一端として、放射光溶液X線散乱測定装置のクロマトグラフィー検出器としての性能を評価した。本手法により、分離直後のタンパク質のサイズと分子量に比例するパラメータを一度の測定で評価できる。

## 文 献

- 1) 角野富三郎, 分子篩高速クロマト, 「蛋白質・酵素の基礎実験法」, 改訂第2版, 堀尾武一編, (南江堂, 東京), pp241-254 (1997).
- 2) I. Pilz, Proteins. In "Small Angle X-ray Scattering", eds. O. Glatter, and O. Kratky, Academic Press, pp239-293 (1982).
- 3) 菊田惺志, 放射光光源, 「X線回折・散乱技術(上)」, 初版 (東京大学出版会, 東京), pp176-200 (1997).
- 4) 渡邊 康, 猪子洋二, 小林克己, タンパク質の放射光溶液X線散乱測定におけるX線透過率の同時評価, 食品総合研究所研究報告, **69**, pp19-22 (2005).
- 5) 猪子洋二, 酵素回折計ビームライン (BL10C) の現状と将来計画, 「高輝度光源を利用したX線溶液散乱の展望 新酵素回折計の役割」猪子洋二, 小林克己編, (高エネルギー加速器研究機構報告書), pp 2-5 (1999).
- 6) G. D. Fasman, Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Vol.2, CRC Press, Cleveland, OH, (1976).
- 7) Y. Watanabe and Y. Inoko, Physicochemical Characterization of the Reassembled Dimer of an Integral Membrane Protein OmpF Porin, *The Protein Journal*, **24**, 167-174 (2005).
- 8) K. Wüthrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, John Wiley & Sons (1986).