

巨大糖タンパク質プロテオグリカンの小角 X 線散乱測定による特性解析

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2019-12-20
	キーワード (Ja):
	キーワード (En): food biopolymer, solution property,
	physicochemical characterization
	作成者: 渡邊, 康
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002945

研究ノート

巨大糖タンパク質プロテオグリカンの小角 X 線散乱測定による特性解析

渡邊 康 §

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 〒 350-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by small-angle X-ray scattering measurement

Yasushi Watanabe§

[§]National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

The chain conformation of intact salmon cartilage proteoglycan in solution was characterized by using small-angle X-ray scattering measurement. Fractal analysis of small-angle X-ray scattering data revealed that the intact proteoglycan molecule is a chain with excluded volume (fractal dimension is 1.7) and a rod-like region as a local structure (fractal dimension is 1). The Kratky plots of the small-angle X-ray scattering data showed that the chain conformation of the cartilage proteoglycan molecules is an unfolded structure in solution. Moreover, the persistence lengths of the salmon and shark cartilage proteoglycan molecules are estimated to be 9 nm and 15 nm, respectively.

Key words: food biopolymer, solution property, physicochemical characterization

タンパク質は重要な食品構成成分であるため,食品 科学および食品産業におけるタンパク質の特性解析は 基盤的で重要な課題の一つである.プロテオグリカン はタンパク質に複数のオリゴ糖が結合した複合生体高 分子であり,主として体内のあらゆる組織の細胞外マ トリックス中に存在する¹⁾.その機能に関しては,ポ リアニオンとしてポリカチオンや陽イオンと結合しイ オンの膜透過性を調整することや,軟骨の耐圧性に関 与するなど生理的および物理的に重要な役割をしている¹⁾.しかし,プロテオグリカンは,分子量の巨大さ,高密度(60-90%(w/w))に大量の糖鎖が結合している 複雑さから取扱および解析が難しいこともあり¹⁾,構 造特性の基礎的知見は十分に得られていない.

我々は, 鮫軟骨の主要成分であるプロテオグリカン は食品成分であり, その溶液物性の知見を得ることは その機能や有効利用を考える上で重要であると考え, 溶液散乱法による鮫軟骨プロテオグリカンの溶液物性 解析を行ってきた^{2),3)}. その結果として,中性子溶液 散乱法による分子の内部構造解析からタンパク質が分 子コアに存在し,溶液中の分子は細長い構造体である ことを明らかにした²⁾. さらに,生理的な条件では, わずかな量の分子量数百万以上の超高分子成分と分子 量200万前後の主要成分からなることが光散乱測定に よる分子量評価によりわかった³⁾. また,水溶液中の 鮫軟骨プロテオグリカン主要成分は,ほどけた構造で, 高分子鎖の堅さの指標である持続長は13-16 nmである ことも明らかにした³⁾.

本研究では、軟骨プロテオグリカンの物理的役割の 理解のためにはその溶液構造特性の解明が不可欠と考 え、まだ溶液構造特性の報告のない鮭軟骨プロテオグ リカン^{4),5)}について,放射光小角X線散乱測定による 溶液中の分子鎖構造解析を行った.また、本研究は溶 液散乱法による複合タンパク質の構造解析を通して, 広く食品関連生体高分子素材の溶液構造の解析に資す る研究手法の提示も目的とした. その結果, 溶液中の 鮭軟骨プロテオグリカンは、排除体積をもつ高分子鎖 と棒状の局所構造の特徴をそなえた柔軟な構造体であ ることがわかった. その鮭軟骨プロテオグリカンの持 続長は、9 nmと評価された. また、標準的な静的(時 分割測定でない)溶液X線散乱法により鮫軟骨プロテ オグリカンの持続長は15 nmと評価され、先に報告し た溶液X線散乱クロマトグラフィーによる結果³⁾と一 致し,評価値の再現性が確認できた.これらの結果は, 鮭軟骨プロテオグリカンは、 鮫軟骨プロテオグリカン に比べて溶液中の分子鎖の柔軟性が高いことを示唆し ていて、今後その機能を考察する上で重要な知見とな ることが期待できる.

実験方法

鮭軟骨プロテオグリカンは、和光純薬(株)(東京) から購入し, 鮫軟骨プロテオグリカンは鮫ひれ軟骨か ら精製した^{2),3)}. 試料溶液は50 mMリン酸ナトリウム 緩衝液, pH 6.8,を溶媒とし, 濃度は乾燥重量法により 決定した⁶⁾.

分子鎖構造は小角X線散乱測定により評価した.放 射光溶液X線散乱測定は,鮭軟骨プロテオグリカン については,高エネルギー加速器研究機構放射光施 設ビームライン10Cに設置された小角X線散乱測定装 置(酵素回折計)を使用した^{6)~9)}.検出器は一次元位置 敏感比例係数装置(リガク(株),東京)を用い,X線 の波長は0.1488 nm, 試料検出器間距離は900 mmに設 定した. 試料セルはステンレス製で, 厚み1 mm, 縦 3 mm, 横15 mmの穴の両面に石英板 (厚み20 µm, 縦6 mm, 横20 mm)を窓材として貼ったものを使用し, 測 定時間は10分とした. 一方, 鮫軟骨プロテオグリカ ンについては, 高輝度光科学研究センター SPring8の ビームライン45 X Uの小角 X線散乱測定装置を利用し た. 検出器はイメージングプレイト自動読み取り装置 R-Axis N++ (リガク(株))を用い, X線の波長は0.09 nm, 試料検出器間距離は3500 mmに設定した. 試料セ ルはステンレス製で, 厚み3 mm, 縦3 mm, 横5 mmの 穴の両面に厚み20 µmの石英板を窓材として貼ったも のを使用し, 試料濃度は3.7 mg/mLで測定時間は1分 とした.

どちらも、試料セルホルダーを恒温水循環装置に接続し試料セル温度を24℃に保持した.得られた散乱 データは、試料直前のイオンチェンバーの出力により 入射X線強度の補正を行った.溶質の散乱データは溶 液の散乱強度から溶媒の散乱強度を差し引いた値とし た.鶏の腱から取り出したコラーゲン繊維束を標準物 質として、検出器のチャンネルを散乱ベクトル $q (= (4 \pi \cdot \lambda^{-1}) \sin \theta, \lambda dX線波長, 2\theta d t a t a t b a t c a t$

実験結果と考察

本研究において、溶液構造特性について報告のない 鮭軟骨プロテオグリカンを主な対象とし, 生理的条件 で生のままの溶液中の分子鎖構造を調べるために放射 光小角X線散乱測定を行った.小角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^{6)~9)}.近年の放射光の発展により¹⁰⁾, 比較的低濃度の試料での溶液散乱実験が可能となっ た^{6)~9)}. 図1に鮭軟骨プロテオグリカンの1.8-15 mg/ mLの濃度における濃度補正後の散乱パターン(散乱べ クトルqに対する散乱強度のプロット)を示す. この図 から、この濃度範囲では低濃度であるほどデータのバ ラツキは大きいものの散乱パターンの差は見られない ので、顕著な会合はなくこの溶媒条件で試料は測定時 間内では充分に分散していることがわかる. 鮭軟骨プ ロテオグリカンの分子量は200万程度と推定されている ことから⁴⁾, この小角X線散乱装置の小角分解能では 十分でないためサイズや分子量の評価には適さない. そこで、小角分解能を要求しない分子鎖構造の解析を 行った.次の(1)式の様に散乱強度Iが散乱ベクトルq のべき乗に比例する領域が散乱測定から得られる¹²⁾.

$$I \sim q^{-D} \tag{1}$$

ここで D はフラクタル次元である.すなわち,図2 の様な散乱ベクトル q と散乱強度Iの両対数プロットで 得られる直線の傾きから,溶質構造体のフラクタル次 元が得られる.図2中の直線の傾きは,小角領域つま り散乱ベクトル q が小さい方から,1.7,1.0および1.4 を表している.この散乱データから鮭軟骨プロテオグ リカン分子のフラクタル次元が,散乱ベクトルqが0.15 nm⁻¹から0.25 nm⁻¹付近の領域ではほぼ1.7に近似でき る.フラクタル次元1.67 (=~5/3)は,排除体積を持っ た高分子鎖構造を表している¹¹⁰.また,散乱ベクトルq



図1. 鮭軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱パターン 各データに対応する試料濃度は図中に示している.



図2. 鮭軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱データ の両対数プロット

測定条件は図1と同じである. 図中の直線は散乱ベクトル qが小さい方から,傾きが1.7,1.0および1.4を表している.

が0.25 nm⁻¹から0.6 nm⁻¹の領域は傾きが1.0に近似でき, 散乱ベクトルqの0.6 nm⁻¹以上の領域の傾きは1.4と近似 できる.棒状分子のフラクタル次元は1.0で,ランダ ムコイル状態のフラクタル次元は2であるので¹²⁾,プ ロテオグリカン分子の局所構造特性はランダムコイル 状態より棒状であることを示唆している.つまり,鮭 軟骨プロテオグリカン分子の構造体のイメージは,分 子全体としてはガウス鎖よりわずかに広がったフレキ シブルな細長い分子鎖である.プロテオグリカンの高 密度に結合した糖鎖はマイナス荷電をもつ.その糖鎖 が密集する部分は互いに静電的に反発し合い,分子鎖 が適度に広がった構造を持ち,微視的な構造単位とし ては棒状構造を持っていると考えられる.

さらに、図3に示す様に、散乱ベクトル $q \ge q^2 \cdot I$ の 関係のクラッキープロット¹³⁾から、そのデータポイン トは小角領域(散乱ベクトルqが0.5 nm⁻¹以下)では右 上がりでそれより小角領域に屈曲点 q^* が観察される. この屈曲点の値 q^* と高分子鎖の硬さの指標である持 続長 L_0 は式(2)の関係がある¹⁴⁾.

$$L_{\rm p} = 2 \,\pi \cdot (2.73 \cdot q^*)^{-1} \tag{2}$$

鮭軟骨プロテオグリカンについての屈曲点は0.25 nm⁻¹なので,溶液中の分子鎖の持続長は9nmと計算で きる.一方,鮫軟骨プロテオグリカンについては,先 に溶液X線散乱クロマトグラフィーによりその持続長 は13-16 nmと報告した³⁾.本研究ではその評価値の再現 性の確認のため時分割測定でない小角X線散乱測定を



図3. 軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱データの クラツキープロット

鮭軟骨プロテオグリカンの測定条件は図1と同じである. 鮫軟骨プロテオグリカンのデータは実線で示した.各軟骨 プロテオグリカンのデータで観察される屈曲点q*を示した. 行った.図3にはその測定データのクラツキープロッ トを示しており、屈曲点 q* が 0.15 nm⁻¹なので、持続 長は(2)式により15 nmと計算できる.たとえば棒状 ウイルスやヒアルロン酸の持続長は、それぞれ 880 nm¹⁵⁾と4 nm¹⁶⁾と報告されている.この結果から、軟 骨プロテオグリカンは棒状ウイルスほど剛直でないも のの、ヒアルロン酸よりは柔軟性に欠ける.また、鮭 軟骨プロテオグリカン分子鎖は鮫軟骨プロテオグリカ ンより溶液中の柔軟性が高いことがわかる.鮫軟骨プ ロテオグリカンの持続長の値は、先に報告した溶液X 線散乱クロマトグラフィーによる結果³⁾と一致し、評 価値の再現性が確認できた点は意義深い.この柔軟性 は、これら分子の保水性と関連すると考えられるので、 今後その物理的機能と構造の関係をさらに探求するこ とは重要な課題である.

さらに、細長い構造体が示唆される場合は、円柱体 構造を仮定した断面プロット (q²対 ln (*I*・q))の中角領 域の直線の傾きより次の(3)式から円柱体の断面の 回転半径 *Rgc* を評価し、構造について考察できる¹⁰.

$$I \cdot q \sim \exp\left(-R^2 g \mathbf{c} \cdot q^2 \cdot 2^{-1}\right) \tag{3}$$

図4の直線の傾きより鮭軟骨プロテオグリカン分子 の断面の回転半径は、実験で使用した濃度の範囲では ほぼ一定で、平均値は0.50 ±0.04 nm (n=5) で円柱の 半径は0.7 nmと計算できる.一方、鮫軟骨プロテオグ リカンの断面の回転半径および円柱の半径は、試料濃





鮭軟骨プロテオグリカンについて、各濃度データの違いを 明確にするため散乱強度 I は試料濃度補正をしていない. その他の測定条件は図1と同じである. 鮫軟骨プロテオグ リカンの断面プロットを挿入図に示した. 各図中の直線は 計算に使用した領域を示す. 度が3.7 mg/mLにおいて0.71 nmおよび1 nmと評価され る. 鮭軟骨プロテオグリカンの回転半径は報告がない のでこれ以上の議論はできないが, 鮫軟骨プロテオグ リカンの回転半径は25.3 nmである²⁾ので, 分子の長 さは88 nmと計算できる. この結果は電子顕微鏡によ りプロテオグリカン分子の細長い構造体が観察されて いることと矛盾しない¹⁾.

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¹⁷⁾.しかし、タンパク質の分子量が 大きくても数万、通常は2万以下のものが主な対象と なる.分子量数十万以上のタンパク質の溶液構造解析 は、食品分野のタンパク質の有効利用のためには不可 欠な課題である.溶液散乱の長所は、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^{6)~9)}.従って,溶液散乱法は,タンパク質の会合 状態やゲル化初期過程あるいは分子間相互作用による 超分子構造の解明に効果的に利用されることが期待さ れる. さらに、タンパク質ばかりでなく多糖などの生 体高分子についても本手法を適用することにより食品 分野での生体高分子成分の特性解明への貢献が期待で きる. 今後. さらに適応例を増やすとともに. 生体高 分子の物性評価に適した手法の改良も重要な課題と考 えられる.

謝辞

本研究の一部は、JSPS科研費24550111の助成を 受けた.小角X線散乱測定は、高エネルギー加速器 研究機構放射光共同利用実験課題(2011G098および 2013G099)として行った.また、高輝度光科学センター の小角X線散乱測定は、SPring-8 量子ビーム施設震災 優先枠課題番号2011A1927として行った。

要約

本研究では、食品関連糖タンパク質である軟骨プロ テオグリカンについて、その機能の考察に重要な溶液 構造特性を解明するために、放射光小角X線散乱測定 による分子鎖構造解析を行った.その結果、溶液中の 鮭軟骨プロテオグリカンは、棒状の局所構造特性を持 つ細長いフレキシブルな構造体であることがわかっ た.さらに、分子鎖の溶液中の堅さの指標である持続 長は、鮭軟骨および鮫軟骨のプロテオグリカンについ て、それぞれ9nmと15nmと評価した.

文献

- R.K.Murray and F.W.Keeley, The extracellular matrix. In "Harpers Illustrated Biochemistry", 29th ed., R.K.Murray, D.A.Bender, K.M.Botham, P.J.Kennelly, V.W.Rodwell, P.A.Weil, McGraw-Hill Medical, pp589-607 (2012).
- Y.Watanabe, I.Tanaka, Y.Sano and N.Niimura, Smallangle neutron scattering study on a proteoglycan in solution, J.Phys.Soc.Japan, 70, 414-416 (2001).
- Y.Watanabe and Y.Inoko, Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by size-exclusion chromatography combined with light and X-ray scattering methods, J.Chromatogr.A, 1303, 100-104 (2013).
- I.Kakizaki, Y.Tatara, M.Majima, Y.Kato and M.Endo, Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage, Arch.Biochem.Biophys., 506, 58-65 (2011).
- Y.Tatara, I.Kakizaki.Y.Kuroda, S.Suto, H.Ishioka and M.Endo, Epiphycan from salmon nasal cartilage is a novel type of large leucine-rich proteoglycan, Glycobiology, 23, 993-1003 (2013).
- Y.Watanabe and Y.Inoko, Small-angle light and X-ray scattering measurements of a protein-oligosaccharides complex mucin in solution, J.Appl.Crystallogr., 40, s209-s212 (2007).
- 7) 渡邊康, 猪子洋二,小林克巳,タンパク質の放射 光溶液X線散乱測定におけるX線透過率の同時評 価,食品総合研究所研究報告,69,pp19-22 (2005).

- 渡邊康,猪子洋二,タンパク質のクロマトグラ フィー検出手段としての溶液X線散乱測定,食品 総合研究所研究報告,70,pp1-5 (2006).
- 9) 渡邊康,猪子洋二,両親楳性環境下の疎水性タンパク質の分子集合状態の特性評価,食品総合研究所研究報告,71,pp33-37 (2007).
- 10) I.Pilz, Proteins.In "Small angle X-ray scattering", eds.
 O.Glatter and O.Kratky, Academic Press, pp239-293 (1982).
- 第田惺志,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).
- 12) T.G.Dewey, Fractals in Molecular Biophysics, Oxford Univ.Press (1997).
- 13) O.Kratky, Natural high polymers in the dissolved and solid state.In "Small angle X-ray scattering", eds.
 O.Glatter and O.Kratky, Academic Press, pp361-386 (1982).
- L.E.Alexander, X-ray diffraction methods in polymer science, John Weily & Sons (1969).
- 15) M.Hagenbüchle, B.Weyerich, M.Deggelmann, C.Graf, R.Krause, E.E.Maier, S.F.Schultz, R. Klein, and R. Weber, Static light scattering by aqueous solutions of rodlike fd-virus particles, Physica A 169, 29-41 (1990).
- 16) R.L.Cleland, The persistence length of hyaluronic acid: An estimate from small-angle X-ray scattering and intrinsic viscosity, Arch.Biochem.Biophys., 180, 57-68 (1977).
- 17) K.Wüthrich, NMR of proteins and nucleic acids, John Weily & Sons (1986).