

氏 名 狩 野 武 志

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第650号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 数物科学研究科 物質構造科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 小角散乱法によるケラチン蛋白質の会合状態の研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 池田 進
教授 安藤 正海
教授 永嶺 謙忠
教授 古坂 道弘
教授 若槻 壮市
教授 柴山 充弘 (東京大学)
Science Director 内藤 幸雄 (ロレアル株式会社)

小角散乱法によるケラチン蛋白質の会合状態の研究

毛や角を構成するケラチンは、アミノ酸組成および電荷の異なる酸性ケラチン Type I と塩基性ケラチン Type II があり、それらが対になって二重らせん(コイルドコイル)構造を形成する。さらに、それらが高次構造をとり、繊維状に会合したものが毛や角の微細構造であるマイクロフィブリルと考えられている。コイルドコイル構造は、ケラチンと α ヘリックスの X 線回折像の比較および詳細な解析により類推された最も妥当なモデルとして提案されたものである。

これまでの電子顕微鏡を用いた観察では、数ミクロンの長さを持ち、繊維状に会合したケラチン蛋白質が観察されている。しかし、測定条件は、pH や塩濃度の高い条件であるため、生体条件とは大きく異なり、さらに、固体および乾燥状態でのケラチンの会合体の観察になる。それに対し、生体条件に近く、かつ、水溶液中でのケラチン蛋白質の構造や会合状態についての研究例はない。また、Type I と Type II との間の静電相互作用や疎水性相互作用から、両者を混合することによりコイルドコイル構造を形成し、Type I 同士もしくは Type II 同士ではコイルドコイルを形成しないと予測されている。そこで本研究では、遺伝子工学を用いて Type I および Type II ケラチンをそれぞれ合成し、小角中性子散乱測定を行い、水溶液中におけるケラチン蛋白質の会合状態の研究を行った。

ケラチンは、システイン残基を多く含有している。システイン残基の置換基である SH 基は、非常に反応性が高く、水溶液中では、システイン残基同士による SS 結合が形成される。また、毛や角が非常に強い機械的性質を有するのは、分子間 SS 結合形成によるためである。したがって、毛は水に溶解しない。合成したケラチン蛋白質は、水に可溶化するために、システイン残基を、S-カルボキシメチルアラニルジスルフィド化した。

水溶液中におけるケラチンの会合体形成を解明するために、小角中性子散乱法を用いた。小角散乱測定は、(a)ケラチン蛋白質の持つ電荷の変化による効果を議論するために pH7 および 6.2 の水溶液について、また、(b)ケラチン蛋白質間に働く静電相互作用の効果を議論するために pH7 の水溶液に 50mMNaCl を添加したものの3つの条件に対して、Type I、Type II および Type I と Type II との等モル混合物について行った。

散乱曲線の両対数プロットを行ったところ、散乱ベクトルの大きさ q に対して散乱強度が q^{-1} 乗に比例する領域が観測された。これは棒状粒子の散乱に特徴的な q 依存性である。また、小角領域では、散乱強度の増大が見られた。このことは、水溶液中に存在するケラチンは、剛体棒としてではなく、屈曲性を有する棒状粒子として存在することを示唆している。屈曲性の効果としてデバイ関数を用いて、円柱の散乱関数と組み合わせたモデル関数を用いて、得られた散乱曲線のフィッティングを行った。フィッティングの結果、実際の散乱曲線と理論散乱曲線はほぼ一致し、水溶液中におけるケラチンの構造を説明するモデルであることが示された。しかし、Type I または Type II 単独では、中角領域($q > 0.07 \text{ \AA}^{-1}$)では、モデル関数よりも実際の散乱曲線の強度が高い領域が存在した。これは、2 種類あるいは 3 種類の太さを持った円柱の存在、もしくは、円柱の横断面が楕円体になっていることを示唆している。

小角散乱理論により、棒状粒子の横断面の半径を見積もる手法として、横断面プロットがよく用いられる。横断面プロットから、Type I または Type II 単独時では、横断面の異なる粒子が存在することを示唆する結果となった。それに対し、等モル混合物では一種類の横断面を有する粒子の存在が示唆された。また、得られた横断面の半径は、試料に限らず 20~30 \AA であったことから、コイルドコイルの半径(約 10 \AA 程度)と比較すると、ケラチンは、水溶液中では、会合体を形成していることが判明した。Type I または Type II 単独

時でも、これまで予想されていたような 1 分子として溶液中に分散するのではなく、会合体を形成していることが初めて実験的に明らかになった。

小角散乱曲線の広角領域($q > 0.1 \text{ \AA}^{-1}$)では、水溶液中で会合したケラチンの内部構造に由来する q 領域に散乱強度の増加が観測された。ガウス関数を用いて散乱強度を計算し、会合体の構造について、前述のモデル関数で得られた会合体の横断面の半径を考慮し、会合体の構造について検討した。半径 10 \AA を持つコイルドコイル 4 本が正方配置で並んでいる時の相関距離から計算した散乱曲線の q 依存性を、等モル混合した試料に対して適用して会合形態について考察した結果、コイルドコイルを形成した二量体を単位として、4 本集合したものであり、規則性の高いことが示唆された。これ以外のモデルを構築し検討したが、散乱曲線の q 依存性は説明できなかった。それに対し、Type I または Type II 単独時では、等モル混合時のようなモデルではなく、1 本のケラチンが 4 または 12 量体の会合体を形成し、集合体の配置に規則性が低いことが示唆された。

これらの結果から、ケラチンの会合について次のようなことが明らかになった。等モル混合時では、Type I と Type II とが対になってコイルドコイルを形成した二量体を単位として 4 本集合する。Type I または Type II 単独時でも、会合体を形成するが、混合時に見られるようなコイルドコイルは形成しない。Type I または Type II 単独時での会合体形成の駆動力は、静電相互作用によるものと考えられ、電荷を打ち消し合うような会合体を形成することから、会合体の半径は一つには決まらず、会合体は比較的揺らぎを有する。等モル混合では、Type I または Type II 単独時と同様に、Type I または Type II 同士の会合体を形成するが、Type I と Type II との二量体形成がより安定であるので、Type I と Type II との二量体が主成分となり会合体は安定化する。本研究は、ケラチン蛋白質の高次構造形成における会合の初期状態を理解する上で新しい知見を与えるものである。

論文の審査結果の要旨

狩野氏は、髪の毛の力学的構造の基本となっている繊維状蛋白質であるケラチン蛋白質が、どのような過程でモノマーの分子鎖からマイクロフィブリルと呼ばれる繊維状の構造を取るに至るのか、中性子小角散乱の手法を使ってその高次構造形成過程の研究を行った。

これまでマイクロフィブリルの構造については、既に出来上がった乾燥状態のものに関して、X線回折あるいは電子顕微鏡での観察等が主であった。その結果から塩基性、酸性である Type-I、Type-II と呼ばれる二つのケラチン蛋白質のモノマー分子同士がコイルドコイル構造を取ったものが 4 対集まり、それがさらに 4 本集まった構造を基本にしていると推測されている。ちなみにケラチン蛋白質は、中央部分は α ヘリックス構造を取り棒状になっており、両端は N 末端、C 末端と呼ばれる電荷を持ったランダムな紐のような構造をとるバリエーション領域と呼ばれる部分になっている。しかしながら、実際に細胞内でどのような過程で高次構造を形成するにいたるかはほとんど分かっていない。溶液中で変性剤を加える等、かなり極端な条件下で、なおかつ、ケラチン蛋白が豊富に持つシスチンが勝手に SS 結合を行ってしまわないように、界面活性剤でシスチンを保護した上で、いわゆる 10nm フィラメントと呼ばれる繊維状の構造を取ることは知られていた。

狩野氏は、遺伝子から発現させた Type-I、Type-II ケラチンを用い、SS 結合を押さえるためにシスチンをカルボキシル化し、細胞内の環境と近い pH7、pH6.2、及び 5mMol の NaCl を加えた条件で高次構造形成を行わせた。実験は、日本原子力研究所の改造 3 号炉に設置された小角散乱装置 (SANS-J) と、高エネルギー加速器研究機構中性子散乱実験施設に設置された、非常に測定運動量空間が広い小・中角回折装置 (WINK) を用い、2 種類のケラチンを等量混合した系と、それぞれが単独の系について行われた。

得られた小角散乱のデータの角度側のデータから、試料は 70Å 程度の太さを持った曲がりくねった繊維状の会合体を作っていることが分かった。また、 Q が $0.1 \sim 0.6 \text{ \AA}^{-1}$ の領域を合わせて解析することにより、混合系では、同種の電荷を持った N 末端同士、C 末端同士が隣り合うようなコイルドコイル構造を基本とし、その次の高次構造として N、C の電荷を打ち消すように 4 本のコイルドコイルが反平行的に 20Å 間隔で並んだ 8mer を形成しているというモデルで説明が出来た。これと対照的に、Type-I のみ、あるいは Type-II のみの溶液では、コイルドコイルは形成されず、15Å 間隔でモノマーが 4 個もしくは 12 個円柱状に、なおかつ電荷を打ち消すように一個置きに反対向きになった構造を取っているというモデルで説明ができた。

このように、細胞中の環境に非常に近い条件で、ケラチン蛋白質溶液中での高次構造形成の初期過程をとらえることが出来たのは初めてである。また、Type-I と Type-II の両方がある初めてコイルドコイル構造を基本とした安定なファイバー構造を取ることを示しており、非常に興味深い結果となっている。以上のような成果は博士論文として十分な内容を持ったものであると判断された。