 MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2019PM2013 実験課題名(Title of experiment) タンパク質の構造転移機構に関する研究 実験責任者名(Name of principal investigator) 高妻孝光 所属(Affiliation) 茨城大学	装置責任者(Name of responsible person) 石垣 徹 装置名(Name of Instrument : BL No.) iMATERIA: BL 20 実施日(Date of Experiment)

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

1. 実験目的(Objectives of experiment)
<p>シトクローム c' は、ヘリックス間の架橋水素結合により、閉じた4本αヘリックスバンドル構造をもつ。pH10では、タンパク質内の水素結合を含む弱い相互作用が変化し、HelixC-HelixD間が開き、pH13では、ヘリックス構造を保持したまま、オープンバンドル構造へと可逆的に転移することをCDスペクトル、ESI-MASスペクトル、および中性子小角散乱により見出している。また、シュウドアズリンもpHに依存して構造が転移し、分光学的性質が変化する。本研究では、iMATERIAで中性子小角散乱実験を行い、酸化状態、pH、リガンド結合がタンパク質構造転移に及ぼす効果についての知見を得て、タンパク質のフォールド/アンフォールド機構、およびタンパク質内での弱い相互作用の情報伝達機構についての構造的知見を得る。</p>
2. 試料及び実験方法
Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
2.1 試料 (sample(s)) シトクローム c' シュウドアズリン 2.2 実験方法(Experimental procedure) 中性子小角散乱

3. 実験結果及び考察（実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。）

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

シトクローム c' は、ビームタイムの制約のため、十分な量を確保できず、試料としてシュウドアズリンのみを用い、中性子小角散乱の実験を BL 20 (iMateria)で行った。シュウドアズリンのアンフォールドを調べるために pD 7.6, 11.1, 12.2, 13.1 で試料を調製し、図1A の小角散乱データを得た。Low-Q 側のデータを用いてギニエ解析(図 1B)を行い、各 pD における慣性半径 R_g を求めた。pD 7.6 でシュウドアズリンの慣性半径は 13.75 Å であったが、アルカリ条件では慣性半径が大きくなり、pD 11.1, 12.2, 13.1 においてそれぞれ 16.87 Å、25.78 Å、31.46 Å であった。pD 13.1 における慣性半径(31.46 Å)は、実験代表者が別装置を用いて求めた pD 2 付近の fully unfold 状態(慣性半径: 32.03 Å)と一致していたことから、pD13.1 においては、pD 2 と似た変性状態を取るものと考えられる。さらに詳細な構造を調べるために、High-Q 側($Q < 0.4 \text{Å}^{-1}$)データを含めて解析を試みた。pD 7.6 における Kratky plot (図 1C)は、リジッドな構造であることを示すベル型の曲線となり、シュウドアズリンの高次構造が保たれているものと考えられる。pD11.1, 12.2, 13.1 の小角散乱データは、バックグラウンドを差し引いた後に High-Q 側の散乱強度が負になっていたため、解析を行うことができなかった。

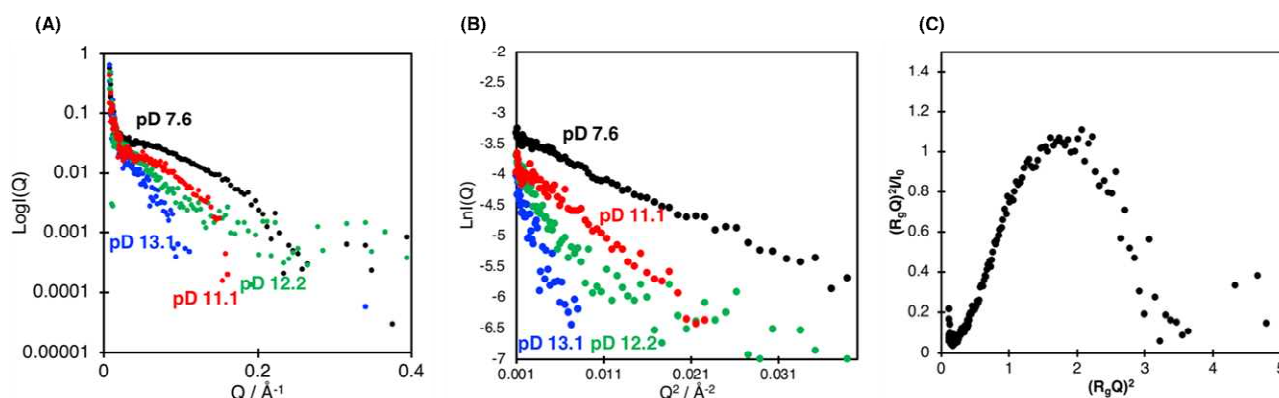


図 1. A: pD 7.6 (黒)、pD 11.1 (赤)、pD 12.2 (緑)、pD 13.1 (青)におけるシュウドアズリンの中性子小角散乱データ、B: Guinier plot、C: Kratky plot

4. 結論(Conclusions)

シュウドアズリンの中性子小角散乱を BL 20 で測定し、pD 7.6 におけるデータを2時間、pD 11.1, 12.2, 13.1 のデータを1時間かけて収集した。Low-Q 側データを用い pD 7.6, 11.1, 12.2, 13.1 における慣性半径を求め、シュウドアズリンの変性状態についての知見を得たが、バックグラウンドの寄与が増える広角側データは解析に用いることができず、今回の計測時間では解析に必要となる十分な精度での計測は行えなかった。