

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 23 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18494

研究課題名(和文) タンパク質の中性子構造解析による重水素化および測定温度の影響評価

研究課題名(英文) Assessment of effects on deuteration and temperature in protein neutron crystallography

研究代表者

平野 優 (Hirano, Yu)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・研究員
(定常)

研究者番号：80710772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高電位鉄硫黄タンパク質の高分解能中性子回折データを用い、回折データ処理方法の検討を行った結果、精度の高い回折データを取得することが可能となった。また、高分解能中性子構造解析の結果、これまで明らかにすることができていなかったタンパク質表面の解離性アミノ酸残基と溶媒の水素原子を含めた構造や、タンパク質内部における水素結合距離による水素原子位置の変化などを捉える事に成功した。このような高精度の構造解析が可能となったことで、測定条件の影響を明らかにすることに繋がるだけでなく、タンパク質の機能や物性の理解に対し重要な情報を提供することができる。

研究成果の概要(英文)：As a result of the investigation of processing of neutron diffraction data, high quality data were obtained with high-resolution data of high-potential iron-sulfur protein. The high-resolution neutron structure revealed the positions of hydrogen atoms in charged amino acids and solvent molecules on the protein surface. The structure also displayed that the positions of hydrogen atoms are changed depending on the hydrogen bond distances. The high resolution structure analysis will clarify effects of the conditions on neutron data collection. In addition, the high resolution analysis is important for understanding the function and properties of proteins.

研究分野：蛋白質結晶学

キーワード：蛋白質 中性子構造

1. 研究開始当初の背景

中性子は水素原子などの軽原子についても比較的大きい散乱能を持つため、中性子結晶構造解析において水素原子の検出は容易である。中性子構造解析においては、X線構造解析と異なる特徴として、結晶の重水溶液環境への置換と室温での回折データ収集が通常行われる。しかし、タンパク質を重水溶液環境に移すことによって、タンパク質の安定性や構造形成に関わる水素結合への影響などが報告されており、タンパク質の水和構造や水素結合の数が変化すると指摘されている[1,2]。また、タンパク質のX線結晶構造解析では、測定温度によってタンパク質周囲の溶媒構造に変化が起こると考えられているが[3]、X線損傷の影響無く構造変化を捉えることは困難となっている。したがって、重水置換や測定温度による影響を評価することは、タンパク質の中性子構造を用いてX線構造との比較やその機能を議論する上で不可欠である。しかし、これまでのタンパク質中性子構造解析では、回折データ収集に必要な結晶サイズや測定時間の制約があり構造解析例は限られており、測定条件による構造変化を明らかにできるような高分解能の回折データが得られていないため、重水置換や測定温度の影響は無視されてきた。

2. 研究の目的

タンパク質やその周囲の溶媒の水素原子まで含めた構造情報を取得しなければ、タンパク質の機能の本質に迫ることは困難である。申請者は、これまで高電位鉄硫黄タンパク質 (HiPIP) を用い、高分解能の中性子構造解析を行い、タンパク質表面の解離性残基のプロトン化状態や水分子の配向を明らかにした。タンパク質の中性子構造を用いその機能を議論する上では、重水置換や測定温度による影響を明らかにすることが重要な課題となっているが、これまでに精密な検証はなされてこなかった。そこで本研究では、電子伝達タンパク質の大型結晶を作成し、軽水環境下または室温において中性子回折データ収集を行うことで、高精度の構造情報を用いて重水置換や測定温度による構造変化を明らかにし、測定条件による影響の実態を解明することを目指す。

3. 研究の方法

大型結晶の作製は、マクロシーディング法およびバッチ法により行った。マクロシーディング法における種結晶作製のため、硫酸アンモニウムとクエン酸ナトリウムバッファーで作製した溶液を用い結晶化を行った。種結晶を成長させるための溶液は、タンパク質溶液と結晶化溶液を混合して作製するが、不均一な結晶成長を抑えるため、結晶化条件のタンパク質濃度、硫酸アンモニウム濃度より低くした。体積 0.02 mm^3 程度の種結晶を、結晶成長溶液で満たした透析ボタンに移して、

20°C で結晶化プレート中に密封保存し成長させた。バッチ法による結晶作製は、結晶の劣化を防ぐため嫌気性チャンバー内の無酸素環境において行った。ポリエチレングリコールとリン酸ナトリウムバッファーで作製した溶液を用い結晶化を行った。

中性子回折データ収集に際しては、バックグラウンドを低減するため、結晶中の約 50% を占める溶媒 (主に水分子) を重水溶液に置換した。重水溶液は重水素化した硫酸アンモニウムとクエン酸バッファーまたは重水溶液に溶解したポリエチレングリコールとリン酸バッファーを使用して作製する。その際、大型結晶の劣化を防ぐため硫酸アンモニウムおよびポリエチレングリコールの濃度を結晶化溶液より高くした。低温での回折データ測定に際しては、氷の生成による結晶の劣化を防ぐため、結晶を抗凍結溶液に浸漬した。大型結晶の抗凍結溶液への置換には、グリセロールを含む抗凍結溶液を用いた。最終的なグリセロール濃度に達するまでに、20 回程度段階的に抗凍結溶液の濃度を上げていき、結晶の劣化を防いだ。

中性子回折実験は、単色中性子を利用できるドイツの中性子回折装置 (FRM-II BioDiff) において行った。低温での測定は、クライオループを用いて取り出した結晶を 100 K の低温窒素気流中で冷却しながら行った。室温での測定は、ガラスキャピラリーに封入した結晶を用いて行った。

大強度陽子加速器施設 J-PARC の生命科学用ビームライン (iBIX) においてこれまでに取得済みの中性子回折データ処理にはプログラム *STAR Gazer* を使用した[4]。回折強度データの補正には自作のプログラムを利用した。またドイツ FRM-II において取得した中性子回折データ処理には、プログラム *Denzo* および *Scalepack* を使用した[5]。中性子構造解析においては、プログラム *Phenix* を使用し、タンパク質の中性子構造解析で適用されている中性子回折データと X 線回折データを同時に利用した構造精密化を行った[6]。また、中性子回折データのみを使用した構造精密化にはプログラム *SHELXL* を用いた[7]。

4. 研究成果

マクロシーディング法による大型結晶の作製においては、体積 0.02 mm^3 程度の小型結晶を種結晶として、タンパク質溶液と沈殿剤溶液からなる結晶成長溶液中で成長させた。1 ヶ月程度の期間静置した結果、体積 1 mm^3 を超える良質な大型結晶を取得することに成功した。またバッチ法による結晶化においては、嫌気性チャンバー内で操作を行うことにより、タンパク質の沈殿や結晶の劣化を抑制することが可能となった。その結果、体積 1 mm^3 を超える良質な大型結晶を取得することに成功した。

大型結晶の重水溶液環境への置換は、マクロシーディング法においては重水素化試薬

を用いて作製した結晶成長溶液を使用することで、結晶の大型化と同時に行った。また、バッチ法における重水溶液環境への置換は、結晶化に用いるポリエチレングリコールとリン酸パーファーを重水溶液に溶解し、結晶化と同時に行った。タンパク質結晶は体積の約 50%を溶媒（主に水分子）が占めるため、結晶の凍結においては氷の生成による結晶の劣化を防ぐため、結晶中や結晶周囲の溶液を抗凍結溶液に置換する必要がある。また、大型結晶は小型結晶に比べ体積が約 100 倍以上となるため、結晶の凍結はより困難となる。そこで、抗凍結剤として重水素化グリセロールを使用し、抗凍結溶液に置換する際には、最終的な抗凍結剤濃度に達するまで 20 段階で徐々に抗凍結溶液を添加することで結晶の劣化を防いだ。実験室 X 線を利用した予備的回折実験の結果、高分解能データ取得可能な大型結晶の冷却条件を決定することができた。

中性子回折データ収集は研究用原子炉 FRM-II の生体高分子用回折装置 BioDiff において室温および低温の条件で行った。波長 2.66 Å の中性子を利用し、各測定条件について 1 時間中性子を照射した。その結果、室温では 2 Å 分解能、低温では 1.5 Å 分解能の高分解能の回折点を観測することに成功した（図 1）。

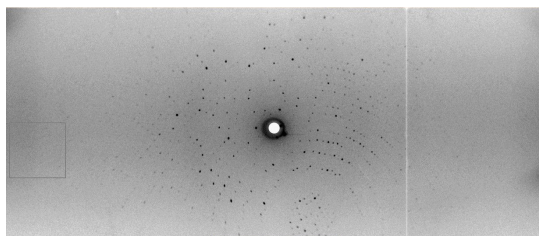


図 1 中性子回折像

また、これまでに J-PARC の iBIX において取得した中性子回折データについては、データ処理法の検討を行った。J-PARC の iBIX においては、白色中性子を利用した Time-of-flight (TOF) Laue 法により回折データ収集を行う。TOF Laue 法により取得した回折データにおいては、回折点強度の平均値を分解能毎にプロットすると高分解能側で強度が増加する傾向が見られることが明らかとなった。一方、単色中性子を利用して取得した回折データにおいては、高分解能側に行くに従って回折点強度の平均値は減少することがわかっている。TOF Laue 法では、波長の短い中性子からの回折点ほど高分解能となるため、波長補正の影響により単色中性子を用いた場合と比べ回折点強度の分布に差が見られるのではないかと考えられた。そこで、回折点強度に対して新たな波長補正法を導入した。その結果、高分解能側で回折点強度の平均値は減少し、単色中性子の回折データと同様の強度分布を示した（図 2）。また、回

折データの精度を示す、等価な回折点強度の一致度についても、10%程度の改善が見られた。

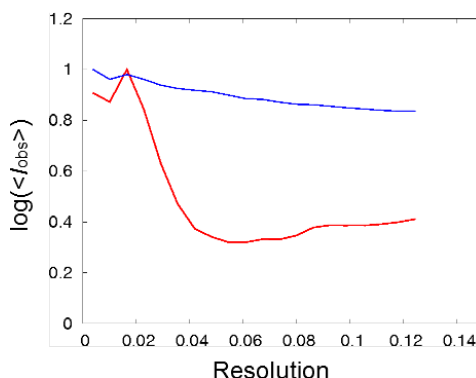


図 2 回折点強度平均値の分解能毎のプロット。赤は波長補正前の強度、青は波長補正後の強度を示す。

中性子回折データは X 線回折データに比べデータ数が少なくなる。そのため水素原子以外の原子は、中性子回折データを取得した同一結晶を用い、X 線回折データ収集を行い、X 線データを利用して立体構造精密化が行われる。立体構造精密化は、まず X 線データのみを用い、水素原子以外の原子座標と原子の揺らぎに対応する温度因子について実施した。その後、中性子データと X 線データを相補的に利用して水素原子を含めた構造精密化を行った。その結果、タンパク質のアミノ酸残基については、全ての水素原子、重水素原子を構造モデルに含めた。また、溶媒分子についても多くの重水素原子を構造モデルに含めて立体構造精密化を行った。タンパク質表面に存在する解離性アミノ酸残基については、Asp11 のカルボキシル基はプロトン化されており負電荷を持つ硫酸イオンと水素結合を形成していた。一方、Glu27 のカルボキシル基は解離状態であり正電荷を持つアンモニウムイオンと水素結合を形成していることが判明した。このように周囲の溶媒の環境によって解離性アミノ酸残基のプロトン化状態が変化することを明らかにした（図 3）。

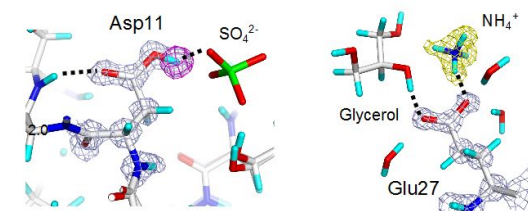


図 3 解離性アミノ酸残基 (Asp11, Glu27) のプロトン化状態。紫色の網は重水素の中性子散乱密度を示している。

タンパク質の中性子構造解析においては、高分解能の回折データを取得することが困

難であり、パラメータに対するデータ数が限られていた。そのため、水素原子と結合する原子間の結合距離、結合角度については、低分子の中性子構造解析で取得された情報を基準値（理想値）とした制約を用いて立体構造精密化が行われてきた。HiPIP においては高分解能の中性子回折データを取得できたことから、制約を緩めた立体構造精密化を実施した。その結果、タンパク質ペプチド結合のアミドプロトンにおいて、結合距離に基準値からのずれを多数観測することができた。アミドプロトンの位置は、水素結合距離が長くなると窒素 - 水素原子間距離は短くなり、水素結合距離が短くなると窒素 - 水素原子間距離が長くなるという傾向を示した(図4)。

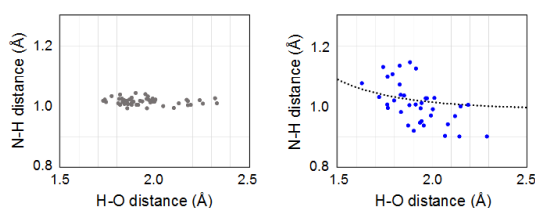


図4 アミドプロトンのH-O距離とN-H距離のプロット。左図は制約を用いた精密化の結果。右図は制約を緩めた精密化の結果を示す。

TOF Laue 法で取得した回折点強度データに対し新たな補正法を導入したことで、これまでより精度の高い回折データを取得することが可能となった。また、高分解能中性子構造解析によって、タンパク質表面の解離性アミノ酸残基のプロトン化状態や溶媒分子の配向などの構造を明らかにすることができた。さらに、低分子の制約を緩めた立体構造精密化を行ったことで、ペプチド結合のアミドプロトンにおいて水素結合により窒素 - 水素原子間距離が変化することを明らかにすることができた。このように、これまで観測できていなかった構造を解明することに成功したことから、今後その他の測定条件についても高分解能の中性子構造解析を行うことで、タンパク質の測定条件による構造変化を捉えることが可能となると期待できる。また、今回のような高分解能のタンパク質中性子構造解析例を増やすことによって、タンパク質中性子構造解析における精密化パラメータなどの新しい基準を確立することができる。と期待できる。

<引用文献>

- G.I. Makhatadze, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, *Nat. Struct. Biol.*, 2, 1995, 852-855.
 B.A. Krantz, A.K. Srivastava, S.N. Nauli, F. et al., *Nat. Struct. Biol.*, 9, 2002, 458-463.
 R.F. Tilton, *Biochemistry*, 31, 1992, 2469-2481.
 T. Ohhara, K. Kusaka, T. Hosoya et al., *Nucl.*

- Instr. & Methods*, 600, 2009, 195-197.
 Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.*, 276, 1997, 307-326.
 P.D. Adams, M. Mustyakimov, P.V. Afonine, P. Langan, *Acta Cryst.*, D65, 2009, 567-573.
 T. Gruene, H.W. Hahn, A.V. Luebben et al., *J. Appl. Cryst.*, 47, 2014, 462-466.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- Yu Hirano, Kazuki Takeda, Kunio Miki, Charge-density analysis of an iron-sulfur protein at an ultra-high resolution of 0.48 Å, *Nature*, 査読有, 534, 2016, 281-284
 doi:10.1038/nature18001
 竹田一旗、三木邦夫、平野優、高電位鉄硫黄タンパク質 HiPIP の超高分解能構造と電荷密度解析、*日本結晶学会誌*、査読有、58、2016、267-272

[学会発表](計 5 件)

- 平野優、玉田太郎、栗原和男、日下勝弘、三木邦夫、高電位鉄硫黄タンパク質の高分解能中性子構造解析、第15回日本蛋白質科学学会、徳島市、2015年6月。
平野優、玉田太郎、栗原和男、日下勝弘、大野拓、竹田一旗、三木邦夫、タンパク質の高分解能中性子構造における水素原子の構造、平成27年度日本結晶学会年会、堺市、2015年10月
平野優、玉田太郎、木村成伸、ブタ肝臓由来シトクロム b5 ヘム結合ドメインの高分解能結晶構造、第16回日本蛋白質科学学会年会、福岡市、2016年6月
平野優、玉田太郎、木村成伸、High-resolution crystal structures of the heme-binding domain of cytochrome b5 from porcine liver、回折構造国際シンポジウム2016、アメリカノックスビル、2016年8月
平野優、福原宏章、有木真吾、上田光宏、玉田太郎、シマミミズ由来α-アミラーゼとβ-マンナーゼの結晶構造解析、平成28年度日本結晶学会年会、水戸市、2016年11月

6. 研究組織

(1)研究代表者

- 平野 優 (Hirano Yu)
 国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター
 研究員(定常)
 研究者番号: 80710772