

令和元年6月11日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05014

研究課題名(和文) 生体分子の水素水和研究に向けた、中性子結晶解析用D/Hコントラスト法の開発

研究課題名(英文) Neutron D/H contrast crystallography for hydrogen and hydration analysis of macromolecules

研究代表者

茶竹 俊行 (Chatake, Toshiyuki)

京都大学・複合原子力科学研究所・准教授

研究者番号：30383475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：中性子結晶解析は水素と水素イオンの検出力に優れており、生体分子の水素水和研究にとって重要な実験法である。中性子線の重水素と軽水素に対する散乱長の違いを利用した重水素/軽水素(D/H)コントラスト法は、中性子結晶解析の性能を飛躍的に向上させることが期待されている。

本研究では、我々が独自に開発した、D/Hコントラストを実空間差分から計算するアルゴリズムを実用化するために、プログラムの開発と最新のTOF型中性子回折計を用いた中性子実験を進めた。前者では、GUIを実装したプログラムの作成と試験に成功した。後者では中性子実験用の巨大結晶の作成に成功し、良好な中性子回折像を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回作成したD/Hコントラスト法のプログラムは、中性子結晶解析の利点である水素原子と水素イオンの検出力を飛躍的に向上させることが期待される。これを利用すれば以下の利点がもたらされる。(1)生体分子内の化学反応に関する官能基のpKaを高精度で決めることができ、生体分子の反応機構の詳細が明らかになる。(2)他の実験法では難しい水和水の詳細な立体構造が決定できる。(3)通常の解析では解析が困難な生体分子でも、コントラストによる検知力の向上により、解析が実現できる。これにより、詳細な構造情報に基づいた酵素や薬剤の分子設計が実現されれば、農学、医学、薬学など大きな波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Neutron protein crystallography has an advantage on detecting hydrogens in protein, hence it is a powerful tool to investigate hydrogen and hydration structures of proteins. The difference of neutron scattering lengths of deuterium and hydrogen provides the high contrast in neutron Fourier map, and this contrast (D/H contrast) is expected to improve the accuracy of neutron protein crystallography.

In the present study, we developed programs and conducted neutron diffraction experiment using the latest neutron TOF diffractometer, in order to put our new D/H contrast algorithm to practical use. The program with graphical user interface has been completed and successfully passed in test runs. In the neutron experiment, good diffraction images have been given using large protein crystals.

研究分野：中性子生物学

キーワード：中性子 水素 水和 結晶学 生体分子 D/Hコントラスト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水素結合は、生体分子の立体構造、分子会合、分子認識における重要な相互作用であり、水素イオンの生体分子への着脱は様々な生体反応に必要不可欠である。さらに、生体分子の周りに存在する水分子は主に水素結合を介して生体分子の構造と機能を巧妙にコントロールしている。このため、生体分子とその水和水の水素原子と水素イオンの観測は生命現象の解明のために必要不可欠である。中性子線は水素に対する散乱能が高いため、構造解析で一般的に用いられる X 線と比べて、水素原子と水素イオンを精度良く観察できる。研究代表者(茶竹)は、10 年以上にわたり、中性子結晶解析について、装置開発(Tanaka, Chatake *et al.* 2002)から解析まで幅広く研究を進め、世界初の DNA の中性子結晶解析(Chatake *et al.* 2005)、水和水のダイナミクスの観測(Chatake *et al.* 2003)、ヘモグロビンの水素イオン状態による酸素結合機構の解明(Chatake *et al.* 2007)など、精力的に生体分子の水素・水和水の構造の研究を進めてきた。

重水素/軽水素コントラスト法(以下 D/H コントラスト法)は中性子の重水素と軽水素に対する散乱長の違いを利用した実験法であり、生体分子の中性子小角散乱で幅広く利用されている。これを中性子結晶解析に応用すればより高精度化の解析が実現できる。この方法では、

- (1) 重水(D₂O)中と軽水(H₂O)中で作成
- (2) 得られた二種類の結晶(D₂O 結晶と H₂O 結晶)の中性子データを測定する。
- (3) フーリエ変換により中性子散乱長密度を計算し、その差分(すなわちコントラスト)を求める。

D₂O 結晶と H₂O 結晶のその中性子散乱長密度図は 1 次元的に表すと図 1(a)と図 1(b)のようになる。この差分(a)-(b)を求めると図 1(c)のように、水素以外の原子の密度は消失して、水素原子の位置により強い散乱強度が観測できる。

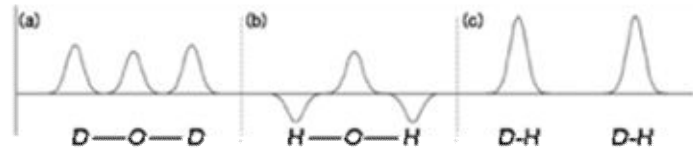


図 1. D/H コントラスト法における水分子の中性子核密度図

しかしながら、D/H コントラスト法の中性子結晶解析への応用は一例しか報告されていなかった(Kossiakoff *et al.* 1985)。Kossiakoff らの方法では D₂O 結晶と H₂O 結晶の差分を逆空間で計算するために、独自かつ複雑な手順を必要とする。これが、International Table for Crystallography に記載されるほど重要視されていたにも関わらず、D/H コントラスト法の実用化が世界中で全く進展していない大きな理由である。研究代表者と研究分担者(藤原)は、差分計算を実空間で行い(実空間 D/H コントラスト法)、計算法を単純化することを考案した。この方法では、コントラスト計算に必要なデータ間のスケールリングと位相の導出が容易であり、これに加えて、全ての中性子データをコントラスト計算に使用することができる。これを実証するために、リボヌクレアーゼ A(RNaseA)の D₂O 結晶と H₂O 結晶を作成して、JAEA の研究炉 JRR-3M の単波長中性子回折計 BIX-3 を用いて中性子実験を行い、実空間コントラスト法を発表していた(Chatake, Fujiwara *et al.*, 2016)。

2. 研究の目的

実空間 D/H コントラスト法による生体分子の中性子結晶解析を確立し、高精度での水素、水和水の構造の観測を実現することを目的として、以下の 4 項目を達成目標にした。

- (1) D/H コントラストによる蛋白質内アミノ酸の pKa の解析法の確立：D/H コントラスト法で可視化した重水素/軽水素コントラストを利用して、蛋白質内の各アミノ酸の水素イオンの着脱状態を観測する。
- (2) D/H コントラストによる水和水の構造の解析法の確立：溶媒領域の重水素/軽水素コントラストをもとに、タンパク質表面の固定された水分子から遠方で自由に振舞うバルク水までの水分子について、その密度とダイナミクスを含めて決定する解析法を開発する。
- (3) D/H コントラスト法の高度化：プログラムの改良や、ユーザーインターフェースの改良を行い、実用化に必要な機能を実装する。
- (4) パルス中性子による D/H コントラスト解析：これまでの研究で用いられてきた中性子データは原子炉の単色中性子で測定されている。一方、これからの中性子生物の中心は J-PARC に代表される大強度パルス中性子による TOF 実験である。大強度パルス中性子と D/H コントラストを組み合わせて、最高精度の生体分子中性子結晶解析を試みる。

3. 研究の方法

(1) 実空間 D/H コントラスト法の概略

申請者達が考案した実空間 D/H コントラスト法の手順を図 2(左)に示す。

A. D₂O 結晶と H₂O 結晶の実空間核密度 ρ_{D2O} 、 ρ_{H2O} を計算し、その比から振幅 $|F_{D2O}|$ と $|F_{H2O}|$ の間のスケール値 k を求める。

B. $k|F_{D2O}|$ と $|F_{H2O}|$ のそれぞれについて、差フーリエマップ ($\Delta\rho_{D2O}$ 、 $\Delta\rho_{H2O}$) を計算する。

C. $\Delta\rho_{D2O}$ と $\Delta\rho_{H2O}$ の差分をとって、D/H コントラスト $\Delta\rho_{D2O/H2O}$ を求める。

RNaseA のデータで計算を行い、図 2(右)に示すように、D₂O 結晶中で D 原子、H₂O 結晶中で H 原子をとる原子(D/H 原子)について明瞭な D/H コントラスト密度の観測に成功している。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

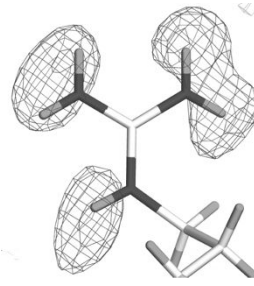
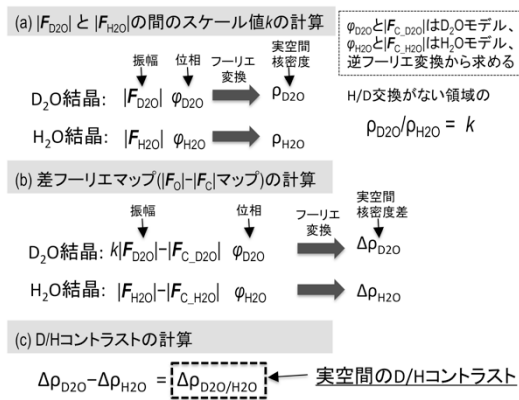


図 2. 実空間 D/H コントラスト法

(左) 計算方法

(右) 観察されたアルギニン側鎖の D/H 原子

(2) 具体的な研究方法

研究目的の(1)-(3)を実現するために、D/H コントラスト解析用プログラムの開発を行った。先行研究ではプログラムを Perl を用いて作成したが、Python3(一部高速化のために GFortran)に言語を変更した。これは、(a) 数値演算のライブラリが充実、(b) プログラムの保守と改良に優れる、(c) グラフィカルユーザーインターフェース(GUI)用のライブラリ tkinter がある、(d) 複数の OS での互換性、が理由である。プログラムは

D/H コントラスト計算用のパッケージ

水和構造解析用のパッケージ

の二種類を作成した。また、先行研究では、中性子散乱密度の計算には X 線結晶解析用プログラム CNS の中性子用改良版である nCNS(Adams *et al.*, 2009)を用いたが、中性子結晶解析プログラムの現在の主流は Phenix である。Phenix に対応できるようにアルゴリズムを変更してプログラムを作成した。

研究目的の(4)については、J-PARC に設置された生物用中性子回折計 iBIX を用いて、D₂O 結晶と H₂O 結晶の回折データを収集して D/H コントラスト法による解析を行うことを目標とした。中性子実験での標準サンプルであるラクトグロブリン、インシュリン、リゾチームについて、それぞれ二種類の結晶(D₂O 結晶と H₂O 結晶)を大型で作成することを進めた。また、応用研究として、研究代表者が継続して研究している納豆由来の生理活性物質(納豆キナーゼや MK-7)についても実験を進めた。

4. 研究成果

(1) プログラムの開発と解析処理

① D/H コントラスト計算用のパッケージ

Phenix では絶対スケールでの $|F_{obs}|$ のフーリエ変換がデフォルトでは行われない。これに対応するために、D₂O 結晶と H₂O 結晶の中性子データからフーリエ変換で求めた中性子散乱長密度 ρ_{D2O} 、 ρ_{H2O} からスケール k を求め、これを直接、散乱長密度に適用して $k\rho_{D2O} - \rho_{H2O}$ を D/H コントラストとするアルゴリズムのプログラムを作成した。すべての処理を一括して行うオートモードとステップごとに行うセミオートモードの両方を備えたプログラムを作成した。完成したプログラムは図 3 に示すように GUI を備えている。このプログラムには、それぞれの原子位置の中性子散乱長密度を積分して求めるルーチンも存在しており、それぞれアミノ酸官能基のプロトン着脱の状態をスカラー値として求めることができる

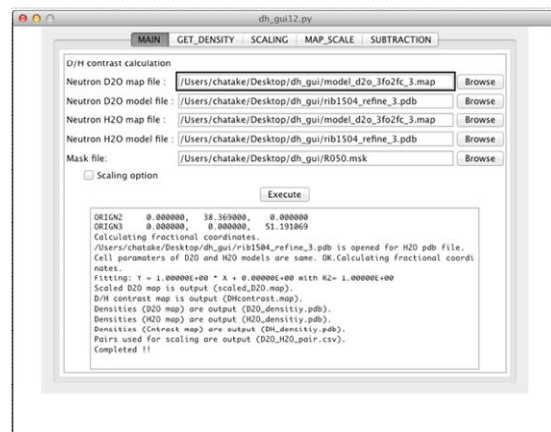


図 3. GUI 版実空間 D/H コントラストプログラム

② D/H コントラスト計算用のパッケージ

こちらは開発が遅れたため、GUI を実装した統合パッケージには至っていない。しかしながら、ステップ毎に複数のプログラムを実行することにより、溶媒領域の中性子散乱長密度を分析することには成功した。図 4(左)に示すような各原子からの van der Waals 表面と、表面からの距離に依存した中性子散乱長密度の分布(図 4(右))を考察した。vDW 表面から 1.0~2.0 離れた領域に散乱長密度のピークが観測される。これは、様々な物理化学測定から言及されている生体分子の第一水和層に対応すると考えられる。さらに、そのピー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

クは表面の原子の種類により表面にちかづく(O原子)もしくは離れる(C,H,N原子)ことも同時に判明した。この違いは、図中で示すような表面原子と水和水との相互作用様式に起因すると推定される。つまり、第一水和層の領域では、水分子の分布状態が表面の影響を強く受けていることを示唆している。これ以遠の領域については、今後より詳細な解析を行う必要があるものの、第一水和層程は表面の影響を受けていないのではと思われる。

以上、(2)項の目的における達成目標 (1),(2),(3)については、ほぼ達成することができた。

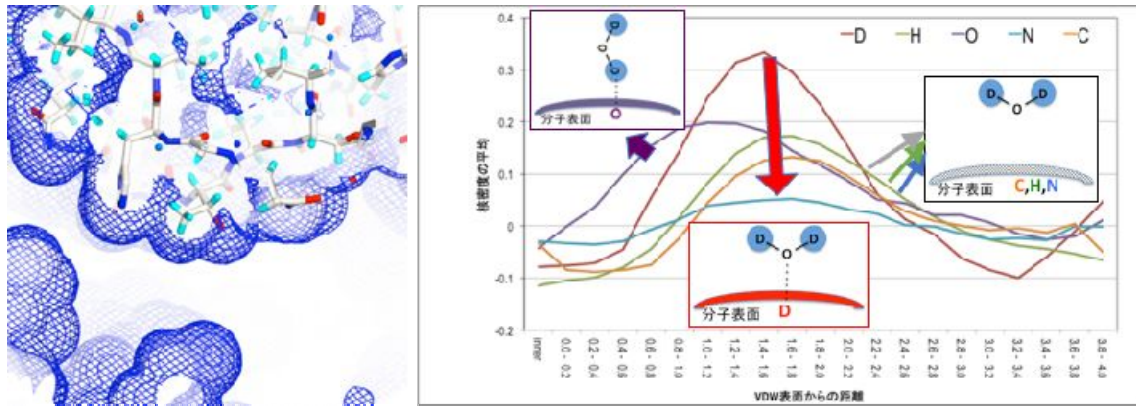


図 4. 計算した vDW 表面(左)と表面からの水和水の中性子散乱長密度の分布(右)

(2) 中性子実験

複数のタンパク質について結晶作成を行い、特にリゾチームについて、Ataka と Katsura が発表した界面拡散法(Ataka, Katsura, 1992)を基にして軽水中で結晶化を行い、最大で約 60 mm³ の単結晶(図 5(左))を得ることに成功した。J-PARC の TOF 型中性子回折計 iBIX を用いて試験測定を行った。試験測定に用いた結晶の大きさは 5~10mm³ 程度である(図 5(右))。その結果、約 5 mm³ の H₂O 結晶、加速器の出力 524 W で、30 min

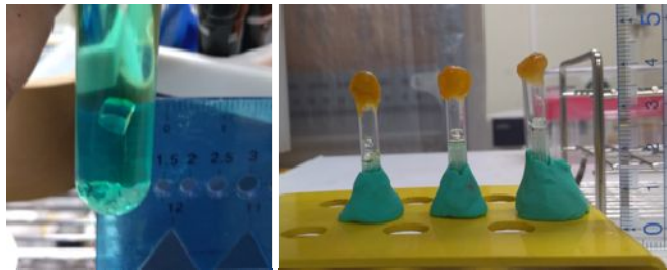


図 5. 得られた最大の結晶(左)と試験測定用にキャピラリーに封入した 3 つの結晶(右)。

の露光時間で最大分解能 2.4 Å の反射が観測された。また、露光時間を 22 h まで延長すると、最大分解能は 1.71 Å に達した。さらに、蒸気置換法を用いて H₂O 結晶から D₂O 結晶の変換を行い、D₂O 結晶と H₂O 結晶を石英キャピラリーに封入して、中性子実験のための結晶準備した。2019.5.16 より、両結晶について J-PARC BL03 に置いて、茨城県プロジェクト革新研究課題で iBIX 回折計を用いて中性子データの収集を開始した。得られた回折データを用いて D/H コントラスト解析が予定されている。

本結果をまとめると、当初の達成目標については概ね達成されたと結論できる

< 引用文献 >

- Kossiakoff AA, The application of neutron crystallography to the study of dynamic and hydration properties of proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1986, 1195–1227.
- Ataka M, Katsura T, The 4th International Conference on Biophysics and Synchrotron Radiation, Tsukuba, Japan. Abstract, 1992, No. 354.
- Tanaka I, Kurihara K, Chatake T, Niimura N, A high-performance neutron diffractometer for biological crystallography (BIX-3), *J. Appl. Cryst.*, 2002, 35, 34–40.
- Chatake T, Ostermann A, Kurihara K, Parak FG, Niimura N, Hydration in proteins observed by high-resolution neutron crystallography, *Proteins*, 2003, 50, 516–523.
- Chatake T, Tanaka I, Umino H, Arai S, Niimura N, The hydration structure of a Z-DNA hexameric duplex determined by a neutron diffraction technique, *Acta Cryst. D*, 2005, 61, 1088–1098.
- Chatake T, Shibayama N, Park SY, Kurihara K, Tamada T, Tanaka I, Niimura N, Kuroki R, Morimoto Y, Protonation states of buried histidine residues in human deoxyhemoglobin revealed by neutron crystallography, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 14840–14841.
- Adams, P. D., Mustyakimov, M, Afonine, P. V. & Langan, P. (2009). *Acta Crystallogr. D* 65, 567–573.
- Chatake T, Fujiwara S, A technique for determining the deuterium/hydrogen contrast map in neutron macromolecular crystallography, *Acta Cryst. D*, 2016, 72, 71–82.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

柳澤泰任、太田さくら、足立達美、内藤佐和、須見洋行、齊藤剛、茶竹俊行、ナットウキナーゼとメナキノンの構造研究、テンペ研究会会誌、査読無、13、2017、7-13.

Morimoto Y., Nagasawa H., Uto Y., Chatake T., Hori H, Structural Insight Into Protein Binding of Boron Tracedrug UTX-97 Revealed by the Co-Crystal Structure With Lysozyme at 1.26 Angstrom Resolution. J. Pharm. Sci., 査読有, 105, 2017, 2298-2301.

DOI: 10.1016/j.xphs.2016.06.005

Fujiwara S., Chatake T., Matsuo T., Kono F., Tominaga T., Shibata K., Sato-Tomita A., Shibayama N., Ligation-Dependent Picosecond Dynamics in Human Hemoglobin As Revealed by Quasielastic Neutron Scattering. J. Phys. Chem. B, 査読有, 121, 2017, 8069-8077.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b05182

Sunami T., Chatake T., Kono H., DNA conformational transitions inferred from re-evaluation of m[Fo]-D[Fc] electron-density maps, Acta Crystallogr. D, 査読有, 73, 2017, 600-608.

DOI: 10.1107/S2059798317007707

Chatake T., Yanagisawa Y., Inoue R., Sugiyama M., Matsuo T., Fujiwara S., Ohsugi T., Sumi H., Purification and structural characterization of water-soluble menaquinone-7 produced by Bacillus subtilis natto, J. Food Biochem., 査読有, 42, 2018, e12630.

DOI: 10.1111/jfbc.12630

茶竹俊行, 齊藤剛, 柳澤泰任、生物物理学的手法を用いた納豆菌の研究 -納豆菌が生産する生理活性物質と納豆菌の放射線耐性-、放射線生物研究、査読有、52、2018、280-290.

[学会発表](計 8件)

茶竹俊行、藤原悟、蛋白質の水和構造解明に向けた D/H コントラスト法の利用、京都大学原子炉実験所第 51 回学術講演会、大阪、2017 年 01 月 26 日。

柳澤泰任、高根光紗、足立達美、茶竹俊行、齊藤剛、井上倫太郎、杉山正明、松尾龍人、藤原悟、大杉忠則、須見洋行、京都大学原子炉実験所第 51 回学術講演会、大阪、2017 年 01 月 26 日。

Naoya Komatsuzaki, Ichiro Tanaka, Takahiro Iwata, Daisuke, Miura, Yoshiyuki Miyachi, Genki Nukazuka, Hiroki Matsuda, Toshiyuki Chatake, Katsuhiko Kusaka, Nobuo Niimura, 中性子タンパク質結晶構造解析での水素高感度検出のための動的核偏極法の予備的結果、日本生物物理学会年会、茨城、2016 年 11 月 26 日。

Satoru Fujiwara, Toshiyuki Chatake, Tatsuhito Matsuo, Fumiaki, Kono, Taiki Tominaga, Kaoru Shibata, Ayana Sato, Naoya Shibayama, 構造状態と関係したヘモグロビンのピコ秒ダイナミクスの変化、日本生物物理学会年会、茨城、2016 年 11 月 27 日。

Tomoko Sunami, Toshiyuki Chatake, Hidetoshi Kono, 結晶構造中で観察される DNA 構造ゆらぎの網羅解析、日本生物物理学会年会、茨城、2016 年 11 月 25 日。

茶竹俊行、藤原悟、実空間 D/H コントラスト法による中性子蛋白質結晶解析、中性子科学会第 17 回年会、福岡、2017 年 12 月 2 日。

藤原悟、松尾龍人、河野史明、高田慎一、杉本泰伸、菊地龍弥、中島健次、茶竹俊行、小角散乱、中性子準弾性散乱、及び中性子結晶学による蛋白質水和水の統一的解析、日本生物物理学会第 55 回年会、2017 年 9 月 19 日-21 日。

角南智子、茶竹俊行、河野秀俊、m[Fo]-D[Fc] map 上に見いだされる DNA の構造変化の網羅的解析、平成 29 年度日本結晶学会年会、広島、2017 年 11 月 23 日-24 日。

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤原 悟

ローマ字氏名：FUJIWARA, Satoru

所属研究機関名：国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

部局名：高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター

職名：上席研究員

研究者番号(8桁)：10354888

(2)研究協力者

研究分担者氏名：田中 伊智朗

ローマ字氏名：TANAKA, Ichiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。