

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510199

研究課題名(和文) 結晶中における生体高分子ダイナミクスの精密計測

研究課題名(英文) Detailed measurements of protein dynamics in crystals

研究代表者

竹田 一旗 (TAKEDA KAZUKI)

京都大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：30332290

研究成果の概要(和文): タンパク質結晶中での構造変化を溶液中のものに対応させて機能に密接に関連した構造変化として議論するために、光学密度の高い結晶試料のスペクトル測定が可能な顕微分光装置を製作した。加えて、各種の色素含有タンパク質について分光測定に都合が良い平板状の結晶作成条件を確立し、可視吸収スペクトルを測定した。これらのタンパク質結晶の X 線結晶構造解析においては、X 線損傷の影響を低減することで詳細な構造変化を捉えることができた。また、光合成に関与する新規な色素含有タンパク質の結晶構造を決定することができた。

研究成果の概要(英文): In order to validate structural changes of proteins in the crystalline state, I constructed a microspectrometer which can measure spectra of crystalline samples with high optical densities. Spectra of various pigment-containing proteins were measured from flat crystals suitable for measurements. Influences of X-rays were precisely estimated in order to derive meaningful information from the crystallographic results. In addition, a novel protein structure involved in the photosynthesis was successfully determined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：タンパク質、結晶、スペクトル

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能発現についての理解を深めるためには、タンパク質の構造変化に関する情報は、構造そのものと同じくらい、あるいはそれ以上に重要である。結晶構造解析と他の測定手法が完全に分離した情報を提供

している現状は、タンパク質の構造活性相関の研究に限界を作り出している。これまでに行ってきたタンパク質の構造解析において、分子運動の重要性を提示すべく、極低温で補足した反応中間状態の構造解析や、変異体を用いて機能に密接に関連した大きな

構造変化の解明を行い、タンパク質結晶構造解析の限界を打ち破る新規な方法論の開発を行ってきた。これらの研究から、タンパク質は結晶中でも反応を起こすが、その反応時間が非常に遅くなっていることや、その構造変化から溶液中での反応が十分に議論できることを明らかにした。これらの成果をさらに発展させ、より機能に密接に関連した分子運動の情報を抽出するためには、結晶中でのタンパク質の状態変化を精密に測定して、結晶中での構造変化を溶液中のものに正確に対応させる必要があると考えた。

2. 研究の目的

従来のタンパク質構造解析研究はフォールドの網羅に大きな労力を注いできた。多くの新規構造の発見などタンパク質の機能解析への影響には大きなものがあつたが、静的な構造情報の限界も認識された。そこで本研究では、X線結晶構造解析と状態変化を解明するために、本研究においては、時間分解顕微分光装置を作成し、結晶中でのタンパク質の状態変化についての基礎データを収集することを目的とした。したがって、従来のタンパク質結晶構造解析が与える静的な構造情報とタンパク質本来の動的な特性の間の溝を埋めることが可能となり、タンパク質をはじめとする生体高分子の構造機能相関の研究に大きく寄与することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 結晶の作成とスペクトル測定

スペクトルの測定には平板状の結晶が適しているため、通常より平板状結晶を与える結晶化条件を最適化していくことで、結晶の厚みを調整した。結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法により行った。スペクトル測定に際してタンパク質結晶の乾燥を防ぐために、結晶を石英セルの内壁に付着させて結晶

母液とともに封入した。スペクトル測定は本研究において作成した顕微分光装置を使用して室温(298 K)で行った。

(2) X線回折データ収集と構造解析

X線回折データの収集は、大型放射光施設SPring-8のビームラインBL41XUで行った。測定中は結晶を窒素あるいはヘリウムの気流を使用して40~100 Kに冷却した。構造解析にはHKL2000、CCP4、CNS、SHELX等のプログラムを使用した。

4. 研究成果

(1) 顕微分光装置

光学密度の高い結晶試料を分光測定するための顕微分光装置を製作した(図1)。アダプターを作成することにより、既存の光学顕微鏡とダブルモノクロ型可視分光装置白色光(日本分光・V660)と石英製光ファイバー(直径1.0mm)とを連結した。これにより、分光した後の単色光を結晶に照射し、照射後の光を再び別の光ファイバーにより分光装置に戻し検出できるようにした。白色光ではなく単色化された光を使用することで、測定光によるタンパク質の損傷や構造変化などの意図しない影響を大幅に回避できるようになった。また、顕微鏡の空間分解能と操作性、分光装置の波長分解能を両立させることが可能となった。



図1. 顕微分光装置

(2) 平板状結晶作成と測定

結晶中ではタンパク質が密に充填され光学密度が高いため、高精度の分光測定に都合が良い平板状の結晶作成条件を確立した(図2)。バクテリオロドプシンや緑色蛍光タンパク質、シトクロム b5 還元酵素、高電位鉄イオウタンパク質、光合成調節因子など各種の色素含有タンパク質についてスペクトル測定を行い、結晶中での状態変化を研究した(図3)。

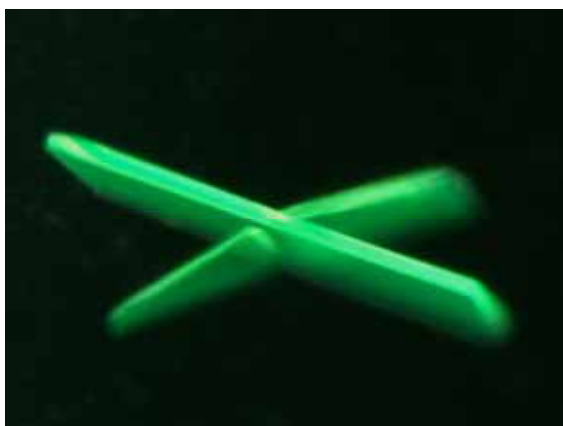


図2．緑色蛍光タンパク質の板状結晶

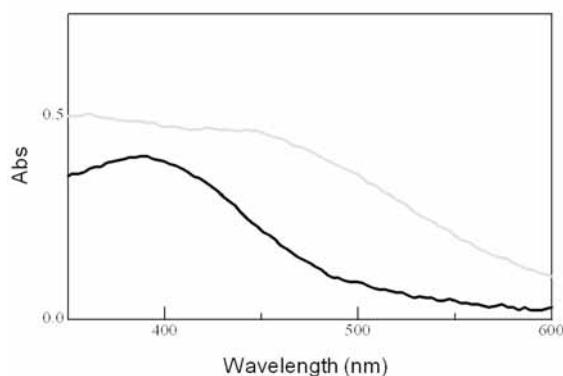


図3．高電位鉄イオウタンパク質における吸収スペクトルの変化

(3) X線損傷の影響評価

生体高分子はX線による損傷を受けやすいため、構造変化と機能との関係を議論するにはX線照射による損傷の影響をできるだけ抑制する必要がある。そこで、X線照射の影響

を詳細に評価し、構造変化解明のために必要な高精度の回折データ収集法の確立を目指した。回折データの相対温度因子や異常分散差パターンマップ、水素原子の見え方といった指標を用いてX線照射の影響を明らかにした。また、1フレームあたりの吸収線量を抑えることで、ほとんどX線による影響の見られない回折データを収集することに成功した(図4)。

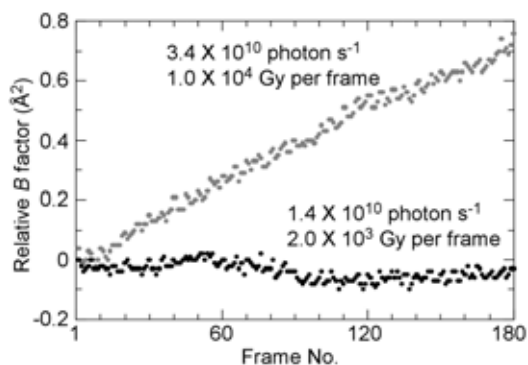


図4．相対温度因子の変化

(4) 構造変化に関する知見

光合成細菌由来高電位鉄イオウタンパク質について、酸化型と還元型の結晶を作り分け、0.7 Å分解能という非常に高い分解能で酸化還元に伴う構造変化を解明した(図5)。このような高精度で構造変化を研究した例はこれまでになく、今後さらに分解能を向上させることで外殻電子密度形状の変化を検出する可能性がある。

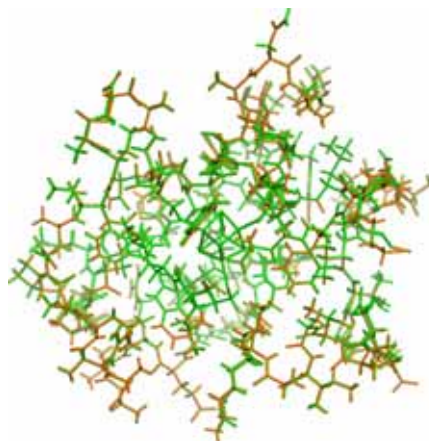


図5．高電位鉄イオウタンパク質の構造変化

(5) 新規な色素含有タンパク質の構造決定
シアノバクテリアの光合成調節に關与する
タンパク質について、1.7 Å の構造解析に成功
し、色素近傍の構造も精密に決定することが
できた(図6)。このタンパク質では、通常
のリスキ型鉄イオウクラスター含有タンパ
ク質には存在する周辺残基との水素結合が
多数欠損しており、このことが酸化還元電位
における特異性をもたらしていると示唆さ
れた。今後、酸化還元による構造変化を研
究することで、光合成能調節機構の解明が
期待できる。

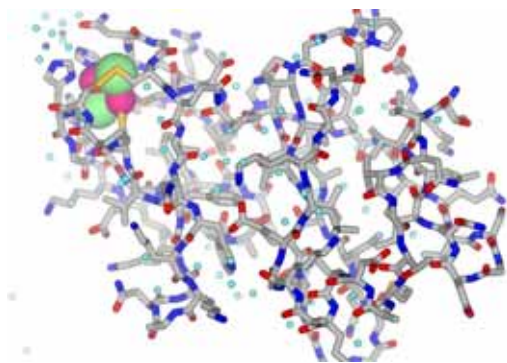


図6 . 光合成調節タンパク質の結晶構造

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5件)

K. Takeda, T. Hayashi, T. Abe, Y. Hirano, Y.
Hanazono, M. Yohda, K. Miki, Dimer structure
and conformational variability in the N-terminal
region of an archeal small heat shock protein. *J.*
Struct. Biol. **174**, 2011, 92-99. (査読有)

竹田一旗、三木邦夫 . 超高分解能・超高
精度のタンパク質結晶構造解析. *生物物理*,
51, 2011, 96-99. (査読無)

K. Takeda, K. Kusumoto, Y. Hirano, K. Miki,
Detailed assessment of X-ray induced structural
perturbation in a crystalline state protein. *J.*
Struct. Biol. **169**, 2010, 135-144. (査読有)

竹田一旗、平野優、三木邦夫 . タンパク

質における超高分解能 X 線結晶構造解析 . *日
本結晶学会誌*, **52**, 2010, 14-18. (査読無)

N. Akiyama, K. Takeda, K. Miki, Crystal
structure of a periplasmic substrate-binding
protein in complex with calcium lactate. *J. Mol.*
Biol. **192**, 2009, 559-565. (査読有)

[学会発表](計2件)

竹田一旗 . タンパク質の価電子を見る . 第
10 回 日本蛋白質科学会年会 , 2010 年 6 月
18 日 , 札幌市 .

竹田一旗 . 超高分解能構造解析 --- タン
パク質における電子軌道形状の可視化をめ
ざして 第 9 回 日本蛋白質科学会年会 2009
年 5 月 29 日 , 熊本市 .

[その他]

ホームページ等

[http://www.kuchem.kyoto-u.ac.jp/organization/m
ember/ktakeda.html](http://www.kuchem.kyoto-u.ac.jp/organization/member/ktakeda.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 一旗 (TAKEDA KAZUKI)

京都大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号 : 30332290