

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20560015
 研究課題名（和文） 湿度・温度に依存した相転移における単結晶構造解析システムの開発
 研究課題名（英文） Development of single crystal structure analysis system for humidity- and temperature-induced phase transition
 研究代表者
 山村 滋典（YAMAMURA SHIGEFUMI）
 北里大学・理学部・講師
 研究者番号：40286373

研究成果の概要（和文）：これまで市販の装置では存在しなかった、任意の温度・湿度条件（温度：5～80℃、相対湿度：0～100%）を連続的に設定可能とする空気吹付型の温度・湿度制御装置を開発するとともに、既存の単結晶X線回折装置に組み込み、核酸の構成単位であるヌクレオチドの水和物やタンパク質といった種々の生体分子に適用し、結晶構造の温度・湿度依存性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Temperature and humidity control device for single crystal structure analysis was newly designed. Temperature- and humidity-dependence of crystal structure for several biomolecules such as nucleotide hydrates which are components of nucleic acid and proteins was revealed using an X-ray diffractometer equipped with the newly developed temperature and humidity controlled air flow device.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,500,000	750,000	3,250,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
22年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：回折結晶学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用物性・結晶工学

キーワード：湿度・温度、構造転移、水和物、結晶構造解析、生体分子、ヌクレオチド、タンパク質、

1. 研究開始当初の背景

水は生体分子にとって不可欠な存在である。例えば、タンパク質では、分子内部、活性部位やその周辺、分子表面に広く水が存在し、それぞれの部位における水の空間的、時間的揺らぎがタンパク質の立体構造の形成や機能発現に密接に関連していると考えられている。また、DNAでは、分子まわりの相

対湿度が高い状態ではB型と呼ばれる構造であるのに対し、相対湿度の低い状態ではA型と呼ばれる構造に変化することが知られており、相対湿度という外場に依存した結晶水の出入りに伴い生体分子の構造変化が引き起こされる。このような水と生体分子の関わりについては、文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究において研究課題「水と生

体分子が織り成す生命現象の化学」(研究期間:平成15~19年度)が選定されるなど、その重要度は十分認知されていた。

一方、報告者らは、DNAやRNA等の核酸の構成単位であるヌクレオシドやヌクレオチドの水和物結晶やタンパク質結晶を対象とし、結晶まわりの相対湿度や温度といった外場に依存した構造変化を伴う系において、水和構造とヌクレオシド・ヌクレオチド分子の構造との相関について研究を進めていた。

これまで単結晶構造解析での相対湿度の設定は、硫酸アンモニウムや臭化ナトリウムなどの無機塩の結晶と飽和水溶液の共存下に解析対象とする結晶を置くことで実現してきた。この方法では、無機塩の種類により異なる相対湿度を実現できるが、設定できる相対湿度が不連続であることおよび相対湿度の緩やかな連続的变化をさせることができないことから単結晶を保持した構造転移の追跡という観点からは問題となっていた。温度に関しては、窒素吹付装置が市販の単結晶構造解析システムの一部として一般的に利用されているが、このシステムでは湿度は常にゼロとなる。このシステムでタンパク質結晶の乾燥過程による相転移を、水を透過できるオイルで結晶を覆うことにより解析した例(Harata & Akiba, Acta Crystallogr., D60, 630 (2004).)はあるが、厳密な相対湿度と生体分子の構造変化との相関や湿潤過程の解析は不可能であった。

そこで、新たに温度・湿度を任意かつ連続的に変更可能な結晶構造解析システムを開発することにより、これまで解析不可能であった湿度・温度条件下でのヌクレオチド、核酸、タンパク質といった生体分子における構造変化の連続的経時変化を追跡することが可能となるため、今まで見逃されていた新規構造の発見も考えられ、「水と生体分子」に関する研究に寄与できるものとして期待された。

2. 研究の目的

湿度・温度を任意かつ連続的に変更可能な単結晶構造解析システムを開発するとともに、相対湿度や温度といった外場による相転移が単結晶状態を保持して進行する生体分子結晶を対象とし、構造変化における結晶水の役割の普遍性を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

温度:5~80°C、相対湿度:0~100%の条件を実現できるように、単結晶構造解析に最適化した、温度・湿度発生システムを製作する。本システムは所属研究室所有のCCD型2次元検出器を備えた単結晶X線回折装置

と組み合わせることで、回折データを収集できるようにする。また、このシステムを用いて、ヌクレオチド水和物やタンパク質等の生体分子結晶の湿度・温度依存性を解析する。

4. 研究成果

(1) 湿度・温度制御空気吹付装置の開発

二温度二圧力方式を採用することで、温度:5~80°C、相対湿度:0~100%の範囲で任意かつ連続的に設定可能な空気吹付装置(最大吹付流量:10L/min)を開発し、既存の単結晶X線回折装置に組み込んだ。なお、本装置はノートPCと接続され、湿度・温度や吹付流量等の条件を容易に設定できるようになっている。

(2) ヌクレオチド水和物結晶の温度・湿度依存性

ウリジン5'-一リン酸のナトリウム塩(Na_2UMP)は、室温(25°C)下、相対湿度50%付近では7水和物として存在し斜方晶系(構造A)であるが、相対湿度を30%程度まで下げると単位格子の一軸が2倍になるとともに単斜晶系(構造B)へと変化した。さらに相対湿度を15%程度まで下げると回折データに変化(構造C)が現れた。構造Aは既に構造解析がなされているが、構造Bは本研究で新たに決定することができた。構造Cは結晶性が悪く、現段階で構造決定には至っていない。

イノシン5'-一リン酸のカルシウム塩(CaIMP)は、室温下、相対湿度30%付近では報告されている6.5水和物であり、相対湿度を0%まで下げると回折データに変化が現れることが明らかになったが、単結晶状態が保持されず構造決定には至っていない。

アデノシン5'-二リン酸のカリウム塩(KADP)は、室温下、相対湿度30%付近では報告されている2水和物であったが、相対湿度を0%まで下げると単結晶状態を維持して無水物に変化した。その無水物について結晶構造を明らかにした。

(3) タンパク質結晶の湿度・温度依存性

①タウマチンは、分子量約22000、アミノ酸207残基からなり、結晶化条件により正方晶、六方晶、斜方晶、単斜晶が得られ、正方晶は湿度依存性が示唆されている。室温(25°C)下、相対湿度(rh)を95%から徐々に下げて格子定数の変化を追跡したところ、60%rh付近でa軸長が約59Åから8%程度減少(c軸長は約152Åから1%程度増加)するとい

う大きな変化が見られ、その後も 40%rh 付近まで徐々に a 軸長のみが減少することを見出した (図 1)。40%rh 以下では結晶性の低下により格子定数の決定には至らなかった。また、結晶の含水量は 95%rh で 59%程度と見積もられ、60%rh では約 14%減少、40%rh ではさらに約 6%減少したと推定された。既に報告されている相転移前の結晶構造では、 c 軸方向にタンパク質分子が蜜に配列しているのに対し、 a 軸方向にはタンパク質分子間に結晶水の領域が見られており、本研究で見出した格子定数の変化を解釈可能であることが分かった。

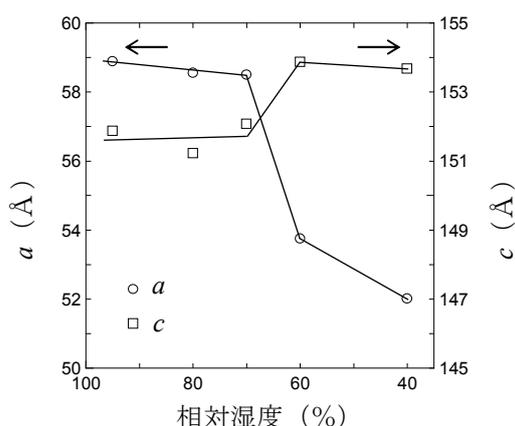


図 1 タウマチンの格子定数の湿度依存性

②トリプシン (分子量 23000、残基数 223) について斜方晶低密度型 (含水量 58%)、斜方晶高密度型 (含水量 47%)、三方晶 (含水量 40%) の 3 晶形、および、キシラナーゼ (分子量 20800、残基数 190) について単斜晶 (分子量 20800、残基数 190、含水量 38%) を用い、振動写真法により湿度依存性を追跡した。トリプシンは、相対湿度を 90% 付近から下げていくと、斜方晶低密度型、高密度型では相対湿度 70% 付近で微結晶化し結晶性が低下した。三方晶では相対湿度 60% 付近で単結晶性は保持しているが回折強度が弱くなり結晶性の低下が見られた。三方晶については、その後相対湿度を 90% に上げたが結晶性は戻らず不可逆な湿度依存性を示した。一方、キシラナーゼは、相対湿度を 95% 付近から下げると、相対湿度 60% 付近で結晶性の低下が見られたが、その後相対湿度を 90% とすると結晶性が回復した。今回対象としたタンパク質は、乾燥により結晶性が失われるものであったが、湿潤に対して不可逆な場合と可逆な場合が存在した。

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)

- ① H. Takusagawa, S. Yamamura, S. Endo, Y. Sugawara, T. Inagaki, M. Nakasako, New monoclinic form of bovine pancreatic ribonuclease A from a salt solution and comparison of intermolecular interactions in ribonucleases A, *J. Cryst. Growth*, **319**, 49-56 (2011). 査読有
- ② H. Komatsu, M. M. Matsushita, S. Yamamura, Y. Sugawara, T. Sugawara, Influence of magnetic field upon the conductance of a unicomponent crystal of tetrathiafulvalene-based nitronyl nitroxide, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 4528-4529 (2010). 査読有

[学会発表] (計 21 件)

- ① 穴井佑弥、山村滋典、菅原洋子、ウリジンスクレオチド水和物結晶における疑似多形の解析、日本化学会第 91 回春季年会、2011 年 3 月 11 日、日本化学会第 91 回春季年会(2011)講演予稿集
- ② 奥田悠介、田草川英昇、山村滋典、猿渡茂、菅原洋子、タンパク質結晶多形における分子間相互作用の解析、日本物理学会第 66 回年次大会、2011 年 3 月 26 日、新潟大学 (新潟県)
- ③ 山村滋典、菅原洋子、日下勝弘、山田太郎、大原高志、田中伊知朗、茨城県生命物質構造解析装置 iBIX によるウリジン 5'-リン酸二ナトリウム七水和物の中性子結晶構造解析、日本中性子科学会第 10 回年会、2010 年 12 月 11 日、東北大学 (宮城県)
- ④ 山村滋典、三浦圭子、菅原洋子、SPring-8/BL19B2 に導入された湿度可変粉末回折装置によるグアノシン水和物の構造転移の観測、日本結晶学会平成 22 年度年会、2010 年 12 月 5 日、大阪大学 (大阪府)
- ⑤ 三浦圭子、大坂恵一、山村滋典、菅原洋子、SPring-8/BL19B2 に導入した粉末回折その場脱水・水和転移実験のための湿度可変装置、日本結晶学会平成 22 年度年会、2010 年 12 月 3 日、大阪大学 (大阪府)
- ⑥ 田草川英昇、山村滋典、猿渡茂、菅原洋子、中迫雅由、RNaseA 新規三斜晶の構造と分子間相互作用の解析、日本結晶学会平成 22 年度年会、2010 年 12 月 3 日、大阪大学 (大阪府)
- ⑦ 高柳敬介、山村滋典、菅原洋子、アデノシ

ン5'-リン酸ナトリウム塩の水和物結晶にみられる結晶多形と相対湿度依存相転移、日本結晶学会平成22年度年会、2010年12月3日、大阪大学（大阪府）

- ⑧ S. Yamamura, A. Ishiguro, M. Ootaki, S. Endo, Y. Sugawara, T. Inagaki, M. Nakasako, Water-mediated crystal transformations of D-xylose isomerase and thaumatin, The 3rd International Symposium on Diffraction Structural Biology, 27 May, 2010, Paris (France)
- ⑨ 菅原洋子、山村滋典、DNA・RNA 構成分子の水和結晶中での水分子のゆらぎの解析、第1回 MLF シンポジウム、2010年3月30日、いばらき量子ビーム研究センター（茨城県）（依頼講演）
- ⑩ 山村滋典、菅原洋子、DNA・RNA 構成分子の水和結晶中で水分子の動きを中性構造解析で見る、茨城県中性子ビームライン成果報告会、2010年2月18日、東京国際展示場（東京都）（依頼講演）
- ⑪ 田草川英昇、山村滋典、猿渡茂、菅原洋子、中迫雅由、新規なRNaseA単斜晶の構造決定と結晶多形の解析、日本結晶学会平成21年度年会、2009年12月6日、関西学院大学（兵庫県）
- ⑫ 長谷川啓太、山村滋典、菅原洋子、ウリジン 5'-リン酸二ナトリウム水和物にみられる構造の乱れと相対湿度に依存した構造転移、日本結晶学会平成21年度年会、2009年12月6日、関西学院大学（兵庫県）
- ⑬ 奥田悠介、山村滋典、菅原洋子、ウシ臍臓由来β-トリプシンの新規菱面体晶の結晶構造解析、日本結晶学会平成21年度年会、2009年12月5-6日、関西学院大学（兵庫県）
- ⑭ 高柳敬介、山村滋典、菅原洋子、アデノシン 5'-リン酸二ナトリウム水和物における温度-湿度依存相転移、日本結晶学会平成21年度年会、2009年12月5-6日、関西学院大学（兵庫県）
- ⑮ 穴井佑弥、山村滋典、菅原洋子、アデノシン 5'-リン酸一カリウム塩における二水和水物-無水物間の相対湿度に依存した可逆的結晶構造転移、日本結晶学会平成21年度年会、2009年12月5-6日、関西学院大学（兵庫県）
- ⑯ 山村滋典、室伏晃空、菅原洋子、グアノシン 5'-リン酸二ナトリウム水和物における湿度に依存した結晶構造変化、第18回有機結晶シンポジウム、2009年11月9日、東京大学（東京都）
- ⑰ S. Yamamura, A. Yamamoto, T. Maruyama, R. Nishi, A. Sugiyama, Y. Sugawara, Polymorphs and humidity-induced transition of a serotonin receptor antagonist, $C_{29}H_{33}N_3O_2 \cdot HCl \cdot xH_2O$, XXI

Congress of the International Union of Crystallography, 28-29 August, 2008, Osaka (Japan)

- ⑱ S. Nishikawa, S. Yamamura, Y. Sugawara, M. M. Matsushita, T. Sugawara, Temperature-dependent disordered structure of $(BEDT-TTF)_3Cl_2 \cdot 5H_2O$, XXI Congress of the International Union of Crystallography, 28-29 August, 2008, Osaka (Japan)
- ⑲ T. Sugawara, M. M. Matsushita, H. Komatsu, S. Yamamura, Y. Sugawara, Genuine organic crystal exhibiting giant negative Magnetoresistance, XXI Congress of the International Union of Crystallography, 26-27 August, 2008, Osaka (Japan)
- ⑳ H. Takusagawa, S. Yamamura, S. Endo, K. Ida, Y. Sugawara, Analysis of crystal growth of trigonal ribonuclease A from bovine pancreas, XXI Congress of the International Union of Crystallography, 24-25 August, 2008, Osaka (Japan)
- ㉑ K. Hasegawa, M. Ootaki, S. Yamamura, Y. Sugawara, Crystal morphology and surface microtopograph of disodium inosine 5'-monophosphate octahydrate, XXI Congress of the International Union of Crystallography, 24-25 August, 2008, Osaka (Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 滋典 (YAMAMURA SHIGEFUMI)
北里大学・理学部・講師
研究者番号：40286373