

機関番号：82110
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700329
 研究課題名(和文) 中性子とX線を相補的に用いた蛋白質水和水の解析法の確立と構造的特徴の解明
 研究課題名(英文) Structural study of hydration water molecules in protein crystals by coupled use of neutron and X-ray structure analysis
 研究代表者
 大原 高志 (OHARA TAKASHI)
 独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員
 研究者番号：60391249

研究成果の概要(和文)：本研究では同一の単結晶からの中性子およびX線回折データを相補的に利用することで、研究者の恣意性を排した蛋白質水和水の構造決定を可能とする手法を開発した。更に、水和水が重要とされる不凍蛋白質の抗凍結活性について、変異体を用いた作用部位の特定と、中性子およびX線を相補的に用いた構造解析により、抗凍結活性に対する水和水の役割の解明に成功した。

研究成果の概要(英文)：The author developed an efficient method to determine the structure of hydration water molecules in protein crystals without arbitrariness by coupled use of single crystal neutron and X-ray structure analysis. In addition, the author successfully clarified the role of hydration water molecules for the anti-freeze activity of an anti-freeze protein by a mutation study and coupled use of neutron and X-ray structure analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：バイオインフォマティクス・中性子構造解析

1. 研究開始当初の背景

蛋白質分子は様々な基質分子を認識し、結合することで機能を発現する。蛋白質水和水に起因する水素結合や双極子モーメント分布は、この蛋白質-基質の結合に伴う脱水和エネルギーに代表される、蛋白質-基質間の結合に係るエネルギーの評価に不可欠である。従って、水素原子を含んだ蛋白質水和水の正確な構造情報は、蛋白質に対する薬剤候補化合物のような基質化合物の結合エネルギーを正確に予測する上で重要であり、蛋白質の構造情報に基づく薬物設計(Structure

Based Drug Design: SBDD)の精度向上といった産業分野への応用に直結する情報である。

蛋白質水和水の構造決定には水素原子の観察が容易な中性子構造解析が強力であり、水分子の原子核密度分布形状から水和水の向きや動的な情報を豊富に得ることができる。しかし、中性子構造解析が手間と時間が掛かる分析法である一方、SBDDで標的となる蛋白質は極めて多く、これらの蛋白質で中性子構造解析の対象とできるのはごく一部である。従って、中性子で得られた水和水の構造情報を統計的に解析し、その向きや動的な

特徴を把握した上で、より簡便な X 線構造解析や MD 計算によって水和水の向きや動的情報を高精度で予想することが、水和水の情報を SBDD に取り込む上で必要不可欠となる。

近年、代表者らは中性子構造解析によって得られた蛋白質水和水についてデータベースを用いた統計的解析を行い、水和水の中に”chelated”、”inverted”という気体状態でしか存在しないとされてきた様式の水素結合が多数存在することを報告した。X 線構造解析や MD 計算から水和水の向きを予測するには、このような蛋白質水和水についての多くの構造的知見を中性子構造解析によって引き出す必要があると言える。しかし、一方で中性子構造解析では統一された水和水の同定法が確立されておらず、加えて実際の解析では水分子と金属イオンの識別が問題となるケースもあることから統計的解析の信頼性が疑問視されることも多く、これまで中性子構造解析で得られた蛋白質水和水の情報は十分に活用されてこなかった。

2. 研究の目的

以上の背景から、蛋白質の機能をその周辺の水和水の役割と合わせて解明していく上で、蛋白質水和水の統一された構造同定法の確立が必要不可欠であった。蛋白質の中性子構造解析では、水和水(重水)はそのダイナミクスの違いにより、様々な形状の原子核密度分布として観察される。一般に、結晶中で固定されている水和水はその分子形状を反映した三角形の原子核密度として観察されて D₂O として同定されるのに対し、自由回転に近い動きを持つ水和水は球状の原子核密度として観察され、0 のみが同定される。しかし、この水和水同定においては、

- 水和水の原子核密度の形状を判別する基準が解析を行った研究者毎に異なる。
- 球状に観察される水和水と金属イオン (Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺等)の識別が不明瞭である。

という 2 つの問題が、蛋白質水和水の構造を統計的に解析する上で大きな障壁となっていた。そこで代表者は一つの蛋白質試料について同一の結晶を用いて中性子と X 線の両回折データを測定し、更に中性子構造解析による原子核密度分布と X 線構造解析による電子密度分布の差分をとった”N-X マップ”を考案した。N-X マップでは各原子の中性子と X 線に対する散乱能の違いが強調されることで原子間の識別が容易となると期待されることから、これによって上述の問題を解決し、恣意性を排した蛋白質水和水の同定法を確立できると期待された。

そこで本研究では、同一結晶を用いて測定した中性子回折と X 線回折のデータを相補的に利用することで蛋白質水和水の向きや動的

挙動を、研究者の恣意性を排して同定する手法を確立することを目的とした。更に、水和水が機能発現に重要な役割を持つと考えられている蛋白質についてこの手法による水和水決定とそれに伴う機能発現機構の解明を達成することで、この手法による水和水決定法の有効性を示すことを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 中性子と X 線を相補的に用いた蛋白質水和水同定法の確立

本研究では、中性子と X 線両方の回折データを相補的に用いることで、蛋白質分子周辺に分布する水和水の金属イオンとの識別、向きや動的挙動の同定を高精度で行うことを目指した。

通常の蛋白質の中性子結晶構造解析では、事前に別の結晶を用いて X 線構造解析を行い、得られた構造を初期モデルとして解析を進める。これに対し、本研究では全く同一の結晶を用いて両方の回折データを測定したため、蛋白質結晶で問題となる結晶間の構造および温度因子の差を無視できる。更に、構造解析用ソフト PHENIX により、中性子と X 線の両方の回折データを同時に用いて 1 つの構造の精密化を行う”N-X 精密化”を行うことで、中性子と X 線の両方の情報を反映した蛋白質の立体構造情報を取得できる。

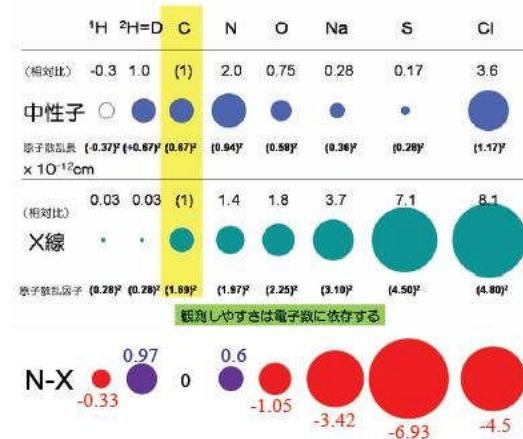


図 1 N-X マップによる原子種の違いの強調

更に得られた結果を用い、代表者が提唱した”中性子-X 線差密度分布 (N-X マップ)”によって、水和水及び金属イオンを正確に分類することを試みた。この N-X マップは、中性子回折で得られる原子核密度分布と X 線回折で得られる電子密度分布を、炭素原子の散乱長で規格化した上で差分をとったマップである(図 1)。N-X マップで蛋白質水和水を観察すると、結晶中で固定されている水分

子(重水素分子)では酸素原子位置の周辺に 2 個の大きな正の密度分布が現れるのに対し、自由回転している水分子は重水素の位置が乱れているために大きな正の密度分布は観測されない。更に、金属イオンを水和水とミスアサインした場合には、酸素原子位置に大きな負の密度分布が現れる。このように、各原子に対する中性子と X 線の散乱長の差を強調できるため、原子間の識別が容易になり、水和水および金属イオンを正確に分類できると期待された(図 2)。

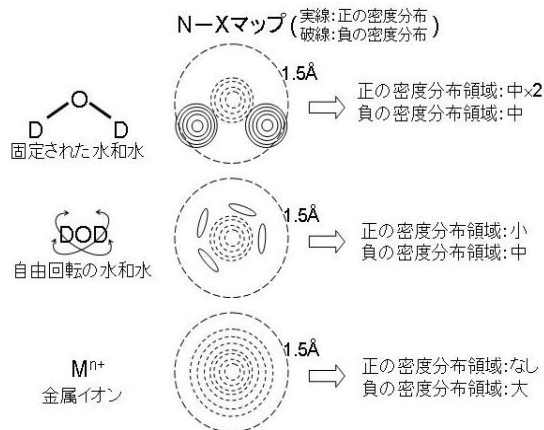


図 2 N-X マップでの見え方の違いによる水和水、金属イオンの分類

(2) 水和水が機能解明の鍵となる蛋白質の構造解析

本研究では上述の蛋白質水和水構造同定法を試み、その有効性を実証するために、水和水が機能解明の鍵となる蛋白質の構造解析を行った。そのターゲットとして代表者が選んだものが、Antifreeze protein (AFP) である。AFP は主に極地に生息する魚類等に含まれ、Ice-binding site (IBS) と呼ばれるサイトで生体内で氷の表面を認識、結合することで氷結晶の成長を抑制し、体液の凝固点を下げる働きを持つ蛋白質である(図 3)。AFP はそれを持つ生物によって幾つもの種類があることが知られているが、我々は北海道沿岸に生息するナガガジの体内で発現する 3 型 AFP (nfeAFP) に注目した。nfeAFP にはアミノ酸配列の異なる複数のアイソフォームが少なくとも 13 種類(nfeAFP1~nfeAFP13)存在することが知られており、これらは SP 型および QAE 型に分類される。これら 2 種類のアイソフォームのうち、SP 型が氷結晶の成長を抑制できないのに対し、QAE 型は高い氷結晶成長抑制活性を有する。そのため、SP 型と QAE 型の活性の違いをもたらすアミノ酸残基を特定し、その周辺の水和水構造を観察することで、AFP の氷結晶成長抑制活性に対する水和水の役割を解明できると期待される。

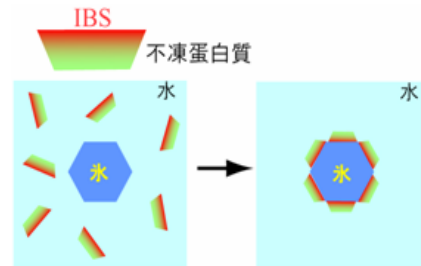


図 3 不凍蛋白質の抗凍結作用。IBS で氷表面に結合することで氷結晶の成長を阻害する。

そこで本研究では SP 型の nfeAFP の一部に QAE 型のアミノ酸配列を導入した変異体の調製を行うことで活性に関与するアミノ酸残基の特定を試みると共に、このアミノ酸残基周辺の水和水の活性に対する役割を明らかにするために、nfeAFP の単結晶中性子および X 線回折測定を行うと共に、N-X 精密化による水和水の構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) 中性子と X 線を相補的に用いた蛋白質水和水同定法の確立

本研究では中性子と X 線を相補的に用いた蛋白質水和水同定法を確立するための試料として、豚膀胱エラスターゼ(PPE)を用いた。この蛋白質については代表者の所属するグループによって日本原子力研究開発機構の JRR-3 原子炉に設置された単結晶中性子回折計 BIX-3 を用いた中性子回折測定が行われ、測定に用いた試料も存在したことから、中性子回折測定と同一結晶、同一条件(室温環境下)での X 線回折測定を Photon Factory の BL6A ビームラインを利用して行った。試料結晶の晶系は斜方晶系で、格子定数は $a=50.9\text{\AA}$ 、 $b=57.5\text{\AA}$ 、 $c=75.2\text{\AA}$ 、回折データの Rmerge は中性子で 0.095、X 線で 0.050、dmin は中性子で 1.75\AA 、X 線で 1.20\AA であった。得られた回折データについては構造解析用ソフト PHENIX で両方の回折データを同時に用いた精密化を行い、結晶構造を得た。両方の回折データに対する R 値は中性子が 0.231、X 線が 0.186、Rfree 値は中性子が 0.268、X 線が 0.190 となった。

また、PPE の構造解析と並行して、3 の(1)で述べた N-X マップを計算するためのソフトウェア“cocktail”を製作した。このソフトは、結晶構造と中性子回折で得られる原子核密度マップ、X 線回折で得られる電子密度マップを入力することで、両方のマップを炭素原子の散乱長で規格化した上で差分をとったマップを出力する。この cocktail を用いて、PPE について N-X マップを計算した。

得られた N-X マップについて、本研究では特に蛋白質分子周辺の水和水のおよび金属イオンの識別に注目した。図 4 にエラスターゼ結晶に含まれる水和水 (DOD10) の電子密度マップ、原子核密度マップ、および N-X マップと、そこから得られる重水分子の向きを示す。図 4(a) の電子密度マップでは重水素原子が見えないため、重水分子の向きはわからない。また、図 4(b) の原子核密度マップでは、酸素原子の左側に密度分布が見られることから、こちらに 1 個の重水素原子があることがわかるが、もう一方の重水素原子については非常に見え難い。これらに対して、図 4(c) の N-X マップでは酸素原子の左側に加えて右側にも分布が見えており、重水分子の 2 個の重水素原子を同定して重水分子の向きを決定することができた。

更に図 4(d) には、PPE 結晶中の Ca^{2+} 結合サイトにおける N マップおよび N-X マップを示す。 Ca^{2+} 原子の位置には、N マップではほとんど分布が観測されないのに対し、N-X マップでは大きな負の分布という、水和水とは異なる形で観測された。これは、中性子と X 線に対する Ca^{2+} イオンの散乱長の大きな違いが、N-X マップによって強調されたことによるものである。

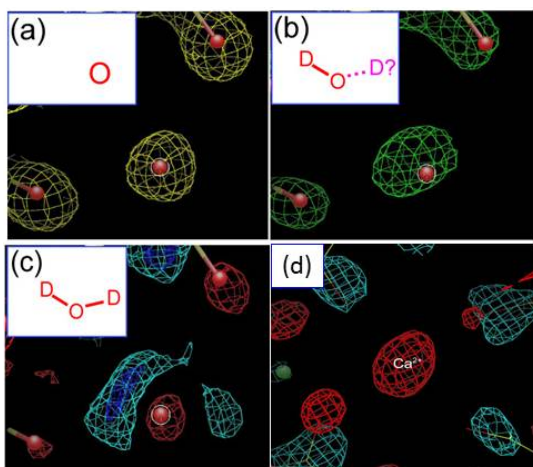


図 4 (a-c) エラスターゼの水和水 (DOD10) 周辺についての (a) 電子密度マップ ($>+2\sigma$)、(b) 原子核密度マップ ($>+2\sigma$)、(c) N-X マップ (青: $>+3\sigma$ 、水色: $>+2\sigma$ 、赤: $<-2\sigma$)、(d) N-X マップで観察したエラスターゼの Ca^{2+} 結合サイト (赤: $<-2\sigma$)

(2) 水和水が機能解明の鍵となる蛋白質の構造解析

本研究では 3 の (2) で述べたとおり、水和水が機能解明の鍵となる蛋白質としてナガガジ由来不凍蛋白質 (nfeAFP) に注目し、中性子と X 線を相補的に用いた構造解析を行うことで、その抗凍結活性に対する水和水の役割を

解明することを試みた。

① 変異体の調製による活性部位の特定

本研究の第 1 段階として、抗凍結活性の小さい SP 型 nfeAFP である nfeAFP6 と抗凍結活性の大きい QAE 型 nfeAFP である nfeAFP8 に注目し、nfeAFP8 のアミノ酸配列の一部を nfeAFP6 に導入した変異体を網羅的に調製することで nfeAFP における抗凍結活性に関与するアミノ酸残基の特定を試みた。図 5 に nfeAFP6 と nfeAFP8 のアミノ酸配列を示す。赤で示した部分が Ice-Binding Site (IBS)、黄色で示した部分が両方で共通の残基である。本研究では nfeAFP6 の配列を nfeAFP8 のものに置換した nfeAFP6 変異体 12 種類を調製して、これら変異体の抗凍結活性を調べた。その結果、驚くべきことに、nfeAFP6 の Ala19 一箇所のみを Val に置換しただけの変異体である nfeAFP6 A19V 変異体が QAE 型と同様の氷結晶成長抑制作用を持つことを見出すことに成功した。

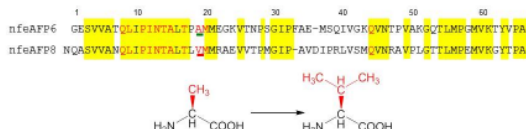


図 5 nfeAFP6 (SP 型) と nfeAFP8 (QAE 型) のアミノ酸配列と、nfeAFP6 の抗凍結活性を向上させた A19V 変異

② 中性子と X 線を相補的に用いた構造解析による、抗凍結活性に対する水和水の役割の解明

nfeAFP の抗凍結活性における活性部位の特定に続き、nfeAFP6 WT および A19V 変異体の両者について結晶化と Photon Factory BL6A における単結晶 X 線回折測定を行った。その結果、それぞれ 1.2\AA 、 1.8\AA 分解能の単結晶 X 線構造解析に成功した。空間群はどちらも $C222_1$ であり、格子定数は前者が $a=75.7\text{\AA}$ 、 $b=108.2\text{\AA}$ 、 $c=38.0\text{\AA}$ 、後者は $a=75.8\text{\AA}$ 、 $b=108.9\text{\AA}$ 、 $c=38.2\text{\AA}$ と同型であった。構造解析の結果、両者はこれまで報告された他の魚類由来の 3 型 AFP と類似の構造であり、変異導入箇所は nfeAFP 分子が氷表面を認識するサイトのエッジ部分に位置していた。両者の構造を比較したところ、氷結晶成長抑制活性の大きな違いにも関わらず、Ala \rightarrow Val の変異導入部位の側鎖を除いた nfeAFP 分子全体の構造はほぼ同じであった。一方、nfeAFP 分子周辺の水和水については変異導入部位以外には大きな違いは見られなかったが、変異を導入した部位の近傍では Val 側鎖のイソプロピル基が張り出した部分の水和水が無くな

っており、氷表面認識部位のエッジにあたるこの部分の水和水が AFP の氷結晶成長抑制能力を大きく左右していることが示唆された(図 6)。

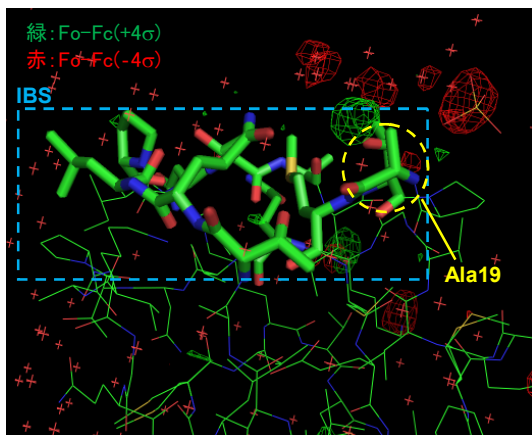


図 6 構造モデルに nfeAFP6 WT、X 線回折データに nfeAFP A19V を用いて計算した Fo-Fc マップ。Ala→Val の変異導入によってその近傍の水和水がなくなっている

そこでこの部分の水和構造を詳細に観察すべく、nfeAFP6 WT の単結晶中性子回折測定を試みた。単結晶中性子回折には巨大な単結晶試料が必要とされるため、結晶化条件の検討を行った。その結果、200mg/ml という非常に高い濃度の nfeAFP WT 溶液を大量(50~100[μ l])に用いて(NH₄)₂SO₄ 存在下で結晶化することで、一辺が 1~2mm あるような巨大単結晶を量産することに成功した。

こうして得られた 2.0x2.0x1.5mm の単結晶を用い、原子力機構の JRR-3 原子炉炉室に設置された BIX-3 回折計にて単結晶中性子回折測定を行った。測定温度は 10°C で、約 40 日の測定により completeness=0.68、Rmerge=0.171、dmin=2.4Å の回折データが得られた。更に同一の結晶を用いて X 線回折データについても測定して N-X 精密化を行ったところ、R=0.166、Rfree=0.234 という結果が得られた。得られた構造の中で Ala→Val への変異導入によって除かれる水和水に注目したところ、酸素原子間を繋ぐ正の原子核密度分布が他の水和水に比べて明瞭に観察できた(図 7)。すなわち、これらの水和水は互いに水素結合で結ばれたネットワークを形成していると考えられる。このことから、nfeAFP6 WT では IBS が氷表面に結合しようとする際にこの水和水ネットワークを除くためのエネルギーが余分に必要となるため、氷結晶表面への結合能力が小さくなると考えられる。このように、nfeAFP の氷結晶成長抑制活性において Ala→Val の違いが大きな役割を果たしていることを特定すると共に、X 線および中性子構造解析によって Ala 近傍に形成される水和水ネットワークが氷結晶表

面に対する nfeAFP の結合能を左右していることを明らかとした。

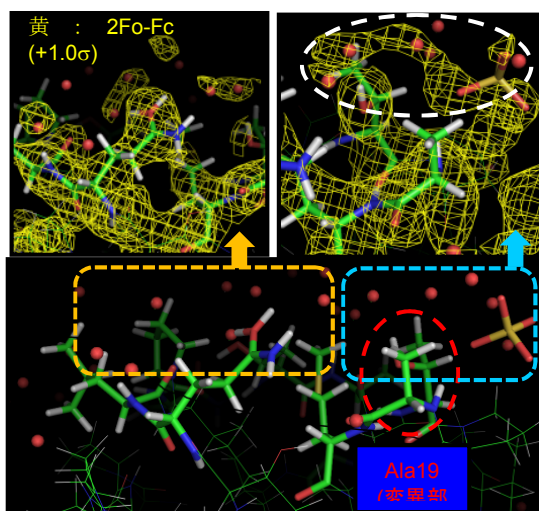


図 7 N-X 同時精密化で得られた IBS 近傍の水和水の原子核密度マップ。変異部位近傍の水和水の酸素原子間の重水素由来の密度分布から、他の領域に比べて強い水素結合ネットワークの存在が示唆される

(3) 本研究の意義と今後の展望

本研究では上述の通り、中性子と X 線を相補的に利用した蛋白質水和水の同定法を提唱し、水和水中の水素原子を強調して可視化することで水和水に同定において問題となる研究者による恣意性を大きく低減することを可能にした。今後、N-X マップのパターンを自動識別するソフトウェアを導入することで研究者による恣意性を完全に排した水和水同定を目指して研究を進めている。

また、この手法を用いた解析を行った不凍蛋白質の一連の研究では、たった 1 つのアミノ酸が抗凍結活性を大きく左右することを初めて明らかにするとともに、このアミノ酸近傍の水和水が抗凍結活性に対して重要な役割を果たしていることを解明した。不凍蛋白質は食品の冷凍技術をはじめとして様々な産業応用が期待されている蛋白質であり、本研究の結果はより産業利用に適した AFP 分子のデザインに繋がると期待できる。

更に、nfeAFP6 については水和水の動的挙動をより詳しく調べるため、近年 J-PARC に設置された単結晶中性子回折計 iBIX を用いて低温条件下での中性子回折測定を実施した、この回折計は飛行時間法(TOF)という原子炉の中性子回折計とは異なる手法を用いているため、データ処理のためのソフトウェアの開発と並行して、現在構造解析を進めている。この構造解析により nfeAFP6 における水和水の動的挙動が活性に果たす役割を詳細に解析できると期待される。

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 9 件)

- ① I. Tanaka, T. Ohhara, 以下 15 名, ④ 番目, Structural Study of Hydrogen and Hydration by the IBARAKI Biological Crystal Diffractometer (iBIX)/Industrial Use, Radioisotopes, 査読有, Vol. 60, 2011, pp.89-97.
- ② Tanaka, T. Ohhara, 以下 8 名, ⑤ 番目, Neutron structure analysis using the IBARAKI biological crystal diffractometer (iBIX) at J-PARC, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 査読有, Vol. 66, 2010, pp.1194-1197.
- ③ R. Kuroki, T. Ohhara, 以下 4 名, ④ 番目, Towards investigation of the inhibitor-recognition mechanisms of drug-target proteins by neutron crystallography, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 査読有, vol.66, 2010, 1126-1130.
- ④ Tanaka, T. Ohhara, 以下 4 名, ④ 番目, Beginning of use of a new biological neutron diffractometer (iBIX) in J-PARC, Yakugaku Zasshi, 査読有, vol.130, 2010, 665-670.
- ⑤ R. Kuroki, T. Ohhara, 以下 3 名, ④ 番目, Collaborative use of neutron and X-ray for determination of drug target proteins, Yakugaku Zasshi, 査読有, vol.130, 2010, 657-664.
- ⑥ M. Tadokoro, T. Ohhara, 以下 11 名, ② 番目, Anomalous Water Molecules and Mechanistic Effects of Water Nanotube Clusters Confined to Molecular Porous Crystals, J. Phys. Chem. B, 査読有, vol.114, 2010, 2091-2099.
- ⑦ 細谷孝明、大原高志, 化学における単結晶中性子構造解析, Radioisotopes, 査読有, vol.59, 2010, 279-287.
- ⑧ T. Tamada, T. Ohhara, 以下 6 名, ⑤ 番目, Combined high-resolution neutron and X-ray analysis of inhibited elastase confirms the active-site oxyanion hole but rules against a low-barrier hydrogen bond, J. Am. Chem. Soc., 査読有, vol.131, 2009, 11033-11040.
- ⑨ M. Adachi, T. Ohhara, 以下 17 名, ② 番目, Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 査読有,

vol.106, 2009, 4641-4646.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 大原高志、不凍タンパク質の構造解析 (招待講演)、第 2 回 MLF シンポジウム、2011 年 1 月 17 日、高エネルギー加速器研究機構(茨城県つくば市)
- ② 大原高志、他 10 名、単結晶回折計 SENJU におけるソフトウェアの開発、平成 22 年度日本中性子科学会年会、2010 年 12 月 9 日、東北大学(仙台市)
- ③ 大原高志、他 7 名、変異導入と結晶構造解析によるナガナジ由来不凍タンパク質の抗凍結機能の解析、平成 22 年度日本結晶学会、2010 年 12 月 3 日、大阪大学(大阪府吹田市)
- ④ T. Ohhara, 他 12 名, Data processing software for a new TOF single crystal neutron diffractometer "iBIX" at J-PARC, 10th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA' 10), 2010 年 11 月 2 日, Busan (Korea).
- ⑤ 大原高志、他 7 名、変異導入と X 線結晶構造解析によるナガガジ由来不凍タンパク質の抗凍結機構の解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010 年 6 月 17 日、札幌コンベンションセンター(札幌市)
- ⑥ 大原高志、茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) の概要について (招待講演)、平成 22 年度第 1 回生命物質構造解析研究会、2010 年 5 月 26 日、いばらき量子ビーム研究センター(茨城県東海村)
- ⑦ 大原高志、茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) におけるデータ処理ソフトの開発 (招待講演)、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(茨城県東海村)
- ⑧ 大原高志、他 8 名、iBIX におけるデータ処理ソフトの開発と標準試料の構造精密化、第 9 回日本中性子科学会年会、2009 年 12 月 10 日、いばらき量子ビーム研究センター(茨城県東海村)
- ⑨ 大原高志、他 6 名、ナガガジ由来不凍タンパク質の結晶化と単結晶中性子回折測定、第 9 回日本蛋白質科学会年会、2009 年 5 月 21 日、熊本全日空ホテルニュースカイ(熊本県熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大原 高志 (OHARA TAKASHI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員

研究者番号：60391249