

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23540478

研究課題名(和文) X線および中性子結晶構造解析による生体分子の水和水の揺らぎの解析

研究課題名(英文) Dynamics of hydration water around biomolecules monitored by x-ray and neutron crystallography

研究代表者

菅原 洋子 (Sugawara, Youko)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：10167455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子の機能発現は、水和構造の揺らぎが深く関わっている。本課題では、タンパク質結晶の含水量に依存した構造転移の解析、および、ヌクレオチド等の高水和物結晶の含水量と温度に依存した構造転移の高分解能の解析をX線および中性子結晶構造解析などの実験的手法と、分子間相互作用に関する計算科学的手法を併用して行い、水の揺らぎと構造転移の相関を明らかにした。タンパク質の水和水の振る舞いについては、中性子非弾性散乱、計算機シミュレーションなどの解析に基づきこれまでに報告されてきた描像と良く対応する結果を得た。一方、核酸の水和水はタンパク質の水和水とは少し異なる性格を持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：Mobile hydration water plays a part of essential role for functions of biomacromolecules. In order to analyze characteristics of hydration water, we carried out X-ray and neutron crystallographic analysis of structure transitions of protein and nucleotide crystals. Theoretical calculations were also performed. Concerning the hydration water around proteins, our results were consistent with the reports using neutron scattering, dielectric spectroscopic, and computer simulation methods. On the other hand, it was revealed that the hydration water around nucleic acids would have some different character compared with that of proteins.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理化学物理

キーワード：水和構造 核酸 タンパク質 構造転移

1. 研究開始当初の背景

水和水は、生体分子の安定な構造を支えている。これと共に、水和水の揺らぎが生体分子の機能発現に不可欠であることが指摘され、中性子非弾性散乱や広帯域誘電分光などの実験的手段からの研究と、分子動力学計算による理論面からの解析が、国内外で進められている。結晶構造解析は、水和水の位置と揺らぎについて、原子分解能での情報を与え、マクロな情報を与える非弾性散乱や広帯域誘電分光とは、相補的な研究手段といえる。特に中性子結晶構造解析は、水素結合にあずかる水素位置の決定が決定でき、水和水の動的構造を知る上で極めて有用である。我々は、これまでにヌクレオチド水和水物結晶について、含水量の変化と関連した構造転移について、X線構造解析 (Y. Sugawara, et al. *J. Phys. Chem. B*, 106, 10363(2002). 他)、格子振動 (H. Urabe et al. *Phys. Rev. B* 51, 5666(1995). 他)、分子動力学計算 (S. Yoneda, et al. *J. Phys. Chem. B* 190, 1304(2005). 他)などを併用して解析を進め、水和水構造の変化とこれと関連して誘起される分子のコンフォメーション、分子集合体構造の変化の詳細を明らかにしてきた。また、水和水状態の解析に欠かせない水素原子の位置情報を得るため、中性子構造解析を遂行し (菅原洋子 *Radioisotopes*, 59, 135(2010). 他)、室温での水分子の揺らぎの描像や、降温に伴う水和水ネットワークの凍結に注目し、原子レベルでの解析を進めてきた。タンパク質結晶についても、結晶成長の研究を基盤に、水分子を含めた分子間相互作用の半定量的解析を進める傍ら、含水量の低下が引き起こす構造変化の解析を進めてきた。

2. 研究の目的

本課題では、含水量の変化と関連し構造変化が誘起されるタンパク質結晶およびオリゴヌクレオチド水和水物結晶等を対象とし、X線および中性子結晶構造解析などの実験的手法と、マクロボンド解析、静電相互作用解析などの分子間相互作用解析に関する計算科学的手法を併用し、水和水構造の揺らぎとこれが生体分子および生体分子集合体に与える効果を原子レベルで検証する。また、降温に伴う水和水の凍結にいたる過程の解析し、水和水構造の温度依存性を明らかにする。本課題で得られる結果を中性子非弾性散乱や広帯域誘電分光法などの手法に基づくマクロな情報、また、分子動力学計算などからの情報と総合し、水和水の特性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) タンパク質結晶の含水量に依存した構造転移における水和水の分布と揺らぎの変化の解析：含水量の変化と関連した結晶構造転移現象を見出したタンパク質結晶 (キシロースイソメラーゼ、タウマチン、シトクロム

c 等) について、高含水量および低含水量条件下でのX線および中性子結晶構造解析を行い、水和水の位置を決定し、水和水の変化がもたらす蛋白質分子の構造変化、隣接する蛋白質分子との相互作用変化等を明らかにする。また、これらの結晶について、計算科学的アプローチを行い、相互作用にもたらす変化を明らかにする。

(2) ヌクレオチド類水和水物結晶における含水量に依存した構造転移の解析：高分解能 (0.7~0.8Å) の解析が可能なヌクレオチド類の水和水物結晶について、X線および中性子結晶構造解析を行い、含水量の変化と関連した構造転移の詳細を明らかにする。また、降温による水和水の凍結に伴う水素結合網および水和水の揺らぎの解析を行い、その温度依存性を原子分解能で明らかにする。

(3) 微視的情報と巨視的情報を総合した水和水効果の解析：結晶構造解析に基づく原子分解能の情報と、非弾性散乱、広帯域誘電分光などのからの巨視的情報を総合して、生体分子に対する水和水の効果とその特性を考察する。

4. 研究成果

(1) タンパク質結晶の含水量に依存した構造転移における水和水の分布と揺らぎの変化の解析：

タンパク質結晶は重量の 50%前後を水が占めており、含水量の減少は、一般には結晶の崩壊をもたらす。我々は、斜方晶キシロースイソメラーゼ、正方晶タウマチン、三方晶シトクロム c において、結晶周りの湿度に依存した含水量の減少が、単結晶性を保持した構造転移を誘起することを見出しており、これらの結晶について水和水構造の変化に留意しながら、転移にともなう構造変化の解析を行った。斜方晶キシロースイソメラーゼでは、高湿度相 (含水量 56%)、中間相 (同 48%)、低湿度相 (同 45%) の 3 形間の転移が、正方晶タウマチンでは高湿度相 (同 58%) と低湿度相 (同 48%)、三方晶シトクロム c では、高湿度相 (同 47%) と低湿度相 A (同 44%)、または低湿度相 B (同 42%) への 2 種の転移が進行する。

含水量の低下は、単に分子が接近するのみならず、分子の回転的変位を誘起し、分子の接触面がスライドすることが見出された。もっとも含水量変化が大きい正方晶タウマチンの高湿度相から低湿度相への変化では、転移に伴い、分子に 6° 程度の回転的変位が起こり、分子の接触部位近傍で主鎖について 1~2.5Å 程度の変位がみられた。計算科学的アプローチより、この変化は、分子の疎水的接触が大きくなる方向に進行していることが示され、脱水により沈殿剤として存在する塩の濃度が上昇したこと由来するとして理解されることが明らかになった。また、室温

でX線結晶構造解析により位置が決まる水和水の総数は高湿度相の方が多いが、蛋白質を架橋する形で分子間相互作用に直接かわる水和水の数は、接触面積との間に正の相関をもち、低湿度相においてむしろ増加した。

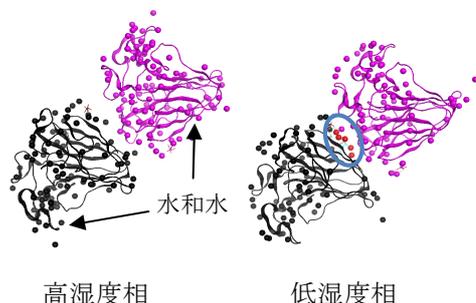


図1 正方晶タウマチンにおける脱水構造転移に伴う水和水構造の変化. 青色楕円内の橙球は転移に伴い新たに生じた両分子を架橋する水和水.

室温における水和水の揺らぎをより詳細に追跡することを目的として、正方晶シトクロム c について、 2mm^3 程度の結晶を得て、大強度陽子加速器施設 (J-PARC) 物質・生命科学実験施設 (MLF) の茨城生命物質構造解析装置 (iBIX) において中性子回折強度データの収集を行った。現時点では、水素位置の詳細を決定するには至っていないが、マキシマムエントロピー法を用いた解析を進めている。

(2) ヌクレオチド類水和物結晶における含水量に依存した構造転移の解析：

核酸の構成単位であるヌクレオチドでは、リン酸基が負電荷を有することから、対イオンも重要な役割をなしていると考えられ、対イオンの揺らぎにも注意を払った解析を進めた。オリゴヌクレオチド水和物に関しては、デオキシシチジリル-(3'-5')-デオキシグアノシン (d(CpG)) (アンモニウム塩) について相対湿度に依存した相転移の解析を行い、3 水和物 - 1 水和物間の可逆的転移が誘起されることを見出した。塩基対間の水素結合は保持されるが、リボースのコンフォメーション変化を伴っているなど、核酸の湿度に依存した構造転移と良い対応がみられた。

モノヌクレオチドの高水和物結晶では、高湿度型と低湿度型の可逆的な構造転移がいくつかの中間相を経て進行する。グアノシン 5' - リン酸二ナトリウム七水和物、ウリジン 5' - リン酸二ナトリウム七水和物等について、中間相の構造決定に成功した。段階的転移の過程においては、格子定数が 2 倍もしくは 3 倍となる長周期構造がしばしば出現、また、水和水の増加過程と、減少過程で異なる中間相を経過する現象が頻出することがあきらかになった。分子集合体の作り出す周

期と、水和した対イオンの作り出す周期の不整合が、長周期構造の出現につながっているとして理解された。この観点にたち、カウンターイオンのサイズを変えることにより、水和水の乱れが押さえられることが明らかになった。

これと並行して、室温において、顕著な乱れのみられるヌクレオチドやクロモリンナトリウム等の水和物結晶について、低温での水の凍結に伴う相転移の解析をおこなった。200K 以下では、結晶の構造単位が長周期へと移行し、これとともに結晶水の乱れが解消した。この結果より、室温での水の位置の乱れは、ローカルミマムとして存在する多数のサイト間の水和水の動的な揺らぎとして説明されることが明らかになった。

一方、中性子回折データから水和水の水素原子の位置情報を得るための解析手法に関して、微結晶しか得られない試料について、粉末中性子解析法の検討を行った。X線結晶構造解析からの情報を併用し、差フーリエ解析法およびマキシマム・エントロピー法 (MEM) を用いて解析する手順を確立した。グアノシン 2 水和物についてこの方法を適用して粉末中性子回折データの解析を行い、相転移実験および分子動力学計算より予測されていた特徴有る水和水の揺らぎの描像を支持する結果を得た。

(3) 微視的情報と巨視的情報を総合した水和水効果の解析：

中性子非弾性散乱や広帯域誘電分光により、水和量と水和水および蛋白質分子の運動性とその温度依存性に注目した解析が行われ (Y. Joti et al., *Biophys. J.* 94 4435(2008). 他)、200K 付近でおこるガラス転移に関連して、含水量が、ガラス点移転より高温側での蛋白質の揺らぎに大きな影響を与えること、低含水状態では、室温でもガラス状態に近い状態にあること等が指摘されている。本研究において観測された、タンパク質結晶における低含水量での分子を架橋する水和水の増加は、中性子非弾性散乱、および分子動力学計算に基づく上記の議論と良い対応を示した。同時に、疎水性表面での接触に注目した解析が必要であることが示された。

DNA については、中性子準弾性散乱などによりガラス転移の存在が指摘されているものの (S.-H. Chen et al. *J. Chem. Phys.* 125, 171103(2006).)、タンパク質と比べ、研究例は少ない。本研究において、ヌクレオチド分子が作り出す周期構造と、対イオン、水和水が作り出す周期構造との不整合が、揺らぎの大きい構造を生み出す原因となることが初めて示された。負に荷電したリン酸基を有し、周期性の高い構造を持つ核酸の水和水の揺らぎは、蛋白質の水和水とは異なる特性を持つといえ、この様な観点からの解析を今後展開することが必要とされる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① 大滝正訓、菅原洋子、相互作用から蛋白質の結晶成長を観る、日本結晶成長学会誌 査読有、40(2)、2013、115-125。(依頼原稿)
- ② M. Ootaki, Y. Nawa, T. Hiroi, H. Matsui and Y. Sugawara, L-Leucylglycylglycine, Acta Crystallogr. 査読有、E69, 2013, o660.
- ③ T. Kiyotani, Y. Sugawara, L-Leucylglycine 0.67-hydrate and [(4S)-2,2-dimethyl-4-(2-methylpropyl)-5-oxoimidazolidin-3-ium-1-yl]acetate, Acta Crystallogr. 査読有、C68, 2012, o498-o501.
- ④ S. Yamamura, Y. Sugawara, Freezing of disordered hydrogen-bonding networks observed in nucleotide hydrates, Acta Crystallogr. 査読無、A67, 2011, C760.
- ⑤ Y. Sugawara, M. Ootaki, S. Yamamura, S. Endo, and M. Nakasakob, Humidity-Induced Phase Transition of Xylose Isomerase, Acta Crystallogr. 査読無、A67, 2011, C523.
- ⑥ T. Kiyotani, T. Ida, S. Yamamura, Y. Sugawara, Crystal structures and humidity-dependent phase transitions of Gly-L-Tyr hydrates, Acta Crystallogr. 査読無、A67, 2011, C272.

〔学会発表〕(計 18 件)

- ① 菅原洋子、量子ビームで水和水の構造、運動、機能を観る、MLF シンポジウム 2014. 3. 19、つくば国際会議場(つくば市)(依頼講演)
- ② 菅原洋子、生体分子関連物質結晶内の水和水の揺らぎと凍結 Workshop: CROSSroads of Users and J-PARC、第8回「ナノ秒ダイナミクス系とその中性子散乱研究の将来」2013. 11. 11、いばらき量子ビーム研究センター(茨城県東海村)(依頼講演)
- ③ 大須賀功、山村滋典、菅原洋子、クロモリンナトリウム水合物における構造の乱れの生成と消滅、日本結晶学会年会、2013. 10. 13、熊本大学(熊本市)
- ④ 坪野谷真朗、山村滋典、菅原洋子、グアノシン 5'-リン酸二ナトリウム水合物における擬多形間の構造転移の解析、日本結晶学年会、2013. 10. 12、熊本大学(熊本市)
- ⑤ S. Yamamura, M. Ootaki, S. Endo, T. Takahashi and Y. Sugawara, Surface polarity and energy analyses of protein-protein interactions in crystals, 4th International Symposium of Diffraction Structural Biology 2013. 5. 27、吹上ホール(名古屋市)

- ⑥ 菅原洋子、山村滋典、星川晃範、石垣徹、神山 崇、粉末中性子回折データに基づくグアノシン水合物結晶中の結晶水の水素位置の解析、日本物理学会第 68 回年次大会、2013. 3. 26、広島大学(広島市)
- ⑦ 菅原洋子、分子動力学計算を併用した水和水結晶にみられる水和水の揺らぎと構造転移へのアプローチ、情報計算化学生物学会研究講演会、東京大学(東京都文京区)、(依頼講演)
- ⑧ 菅原洋子、Neutron analysis of hydrated compounds -Suspicion from proton coordinates in hydrate waters、プロトンイオン研究会、2012. 11. 29、いばらき量子ビーム研究センター(茨城県東海村)
- ⑨ 保住厚兵、山村滋典、菅原洋子、星川晃範、石垣徹、グアノシン二水合物の中性子粉末構造解析、日本結晶学会平成 24 年度年会、2012. 10. 25、東北大学(仙台市)
- ⑩ 佐藤淳美、山村滋典、猿渡茂、菅原洋子、正方晶タウマチンの含水量に依存した結晶構造転移における相互作用解析、日本結晶学会平成 24 年度年会、2012. 10. 25 東北大学(仙台市)
- ⑪ 清谷多美子、菅原洋子、L-ロイシル-グリシンの温度および湿度に依存した構造転移の解析、日本結晶学会平成 24 年度年会、2012. 10. 26、東北大学(仙台市)
- ⑫ 菅原洋子、山村滋典、三浦圭子、水和水結晶多形観測のための高温高湿度下 in-situ 粉末 X 線回折測定技術検証、第 9 回 SPring-8 産業利用報告会、2012. 9. 7 愛知芸術文化センター(名古屋市)
- ⑬ 菅原洋子、山村滋典、星川晃範、石垣徹、粉末中性子回折データによるグアノシン水合物結晶の水素位置の解析、日本物理学会第 67 回年次大会 2012. 3. 25、関西学院大学(西宮市)
- ⑭ 加藤潤、山村滋典、猿渡茂、稲田妙子、菅原洋子、三方晶ウマ心筋由来シトクロム c の分子間相互作用解析、日本物理学会第 67 回年次大会 2012. 3. 25、関西学院大学(西宮市)
- ⑮ 菅原洋子、ヌクレオシド・ヌクレオチド水和水結晶の温度湿度誘起相転移を通して眺めた水和水の揺らぎと移動の解析、平成 23 年度生物構造学研究会、2011. 12. 19、テクノ交流館リコッティ(茨城県東海村)。(依頼講演)
- ⑯ 佐藤淳美、山村滋典、猿渡茂、菅原洋子、中迫雅由、正方晶タウマチンにおける含水量に依存した結晶構造転移の解析、日本結晶学会平成 23 年度年会、2011. 11. 24、北海道大学、(札幌)
- ⑰ 保住厚兵、山村滋典、菅原洋子、三浦圭子、ウリジン 5'-リン酸二ナトリウム水和水低湿度相の構造解析、日本結晶学

会平成 23 年度年会、2011. 11. 24、北海道大学、(札幌)

- ⑱ 菅原洋子、山村滋典、石垣徹、グアノシン水和物における結晶水の動的挙動の解析、日本結晶学会平成 23 年度年会、2011. 11. 25、北海道大学 (札幌)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/buturi/bussei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原洋子 (SUGAWARA, Yoko)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：10167455