

平成 2 6 年 6 月 1 7 日現在

機関番号： 8 4 5 0 2

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2011 ~ 2013

課題番号： 2 3 7 7 0 1 9 5

研究課題名（和文）蛋白質機能可視化のための高精細静電ポテンシャルイメージング法構築

研究課題名（英文）Development of accurate electrostatic potential imaging for visualization of protein function

研究代表者

水野 伸宏（MIZUNO, Nobuhiro）

公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・研究員

研究者番号： 9 0 3 7 8 8 4 4

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円、（間接経費） 1,080,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、より合理的な電子密度を得るために、低分解能領域を損失することなく正確に測定する手法及び、実際の結晶中溶媒構造を可視化することにより、モデルとして誤差の少ない溶媒領域構造を構築し、補正する手法の開発である。今回の研究では、高輝度X線を使用できるSPring-8に低分解能領域を損失することなく正確に測定できる環境を構築し、誤差の少ない精密な低分解能回折データを取得することができた。また、溶媒領域を可視化するための重原子試薬の開発も行い、その導入にも成功した。

研究成果の概要（英文）：In this research, in order to calculate precise electron density, I tried to develop accurate measurement methods of low resolution diffraction data and visualization methods of solvent area structure without error. I constructed a measurement system of precise low resolution data at SPring-8 with high flux X-ray. Los-free diffraction data in low resolution area could be obtained in this system. Heavy atoms, PbEDTA or Xe, for visualization of solvent area could successfully soaked in protein crystal.

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・生物物理学

キーワード： 放射光X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

これまで多くの生体高分子の原子構造が X 線結晶回折研究から明らかになってきており、そうした原子構造から機能の本質に迫る研究が行われてきたが、十分な解明が行われてはいない。これは、生体高分子が行う効率的な反応機構が、電子同士の干渉で作られる水素・配位結合構造ネットワークによるものであり、電子が司る部分を原子構造からでは明らかにすることができないからである。そして、本来 X 線が干渉し、得られるべき電子情報、つまり電子密度を、我々が正確に解析することができていないからである。生体高分子の機能を明らかにするためには、この電子密度構造を正確に導き出す手法を開発する必要がある。

申請者はこれまでに、低分子の精密電子密度解析の分野で成功をおさめているマキシムメントロピー法をタンパク質分子に導入することを目的に、溶媒を含む高分子量な有機分子の解析を行ってきた。その中で、合理的な電子密度を計算する上で問題になったのが、低分解能領域回折データの精密な測定の高難さや結晶中に存在する溶媒領域の正確な構造(位相)を計算することが困難であることであった。

低分解能回折データには、全体的な電子の充填様式が反映されており、この領域のデータを考慮しない電子密度を計算した場合、電子の分布に大きな変化が生じ、電子密度が比較的低い溶媒領域の電子密度に大きな影響がでることが確認できる。しかしながら、現在の結晶回折実験においては、高分解能な構造解析を行うことが重視されており、低分解能領域を正確に測定できる環境が整っていない。これは、高分解能測定で必要となる高輝度な X 線によって発生する空気散乱を低減するために設置している金属製ダイレクトビームストッパーが、低分解能領域の回折光を妨げ、損失させてしまうためである。また、弱い高分解能回折光を得るために、長時間 X 線を露光することによって、低分解能領域の回折強度が 2 次元 X 線検出器の飽和度を超過してしまい、データを損失させてしまうためでもある。こうした問題を解決する精密な低分解能領域測定系の開発が必要となることが分かってきた。

また、タンパク質結晶が持つ規則構造を持たない溶媒領域は、低分解能領域の回折データに大きく寄与している。これまでは、そうした溶媒領域については、水分子によるモデルを構築せず、電子密度が平坦な領域と仮定し、精密化することで低分解能領域データを利用してきた。実際、仮定しない場合に比べ、観測データ(Fobs)との間の誤差が小さくなる。しかし、こうした仮定を用いても低分解能領域の誤差が大きくなる傾向(R 値 = 17%(33-1.6Å)、33%(33-15 Å))がある。これは、仮定する平坦な溶媒構造に誤差が存在す

るからであり、正確な溶媒領域の電子密度が計算できていないことを意味している。そこで、仮定する溶媒構造の誤差を低減するために、結晶中の溶媒構造を直接観察し、その仮定を補正しなくてはならない。

2. 研究の目的

より合理的な電子密度を得るために、低分解能領域を損失することなく正確に測定する手法及び、実際の結晶中溶媒構造を可視化することにより、モデルとして誤差の少ない溶媒領域構造を構築し、補正する手法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、低分解能領域の回折データを正確に測定することが重要な課題であることから、世界でも最高輝度を誇り、トップアップ運転などによる X 線ビームの安定性においても最高性能を持つ SPring-8 による放射光を利用し、フライングビームストッパーと He チャンバーを用いた低分解能領域の精密測定系の開発と、その測定手法の確立をまず行う。また、実際の結晶中溶媒構造を可視化するためには、溶媒自身からの構造因子の寄与を正確に捉える必要があり、溶媒に対する正確な位相を実測から決定しなくてはならない。実測による位相決定のためには、結晶中の溶媒部分が寄与する構造因子に変化を与える必要があることから、結晶中溶媒を密度の違う溶液や異常散乱を伴う金属溶液で置換することで、溶媒に対する寄与の変化を捉えるコントラスト変調法を用い、その位相を決定する。そして、実測による位相を用い、タンパク質結晶中の溶媒構造を可視化し、標準となる溶媒モデルを構築、補正する方法を確立する。最終的には、観測によって得られた溶媒領域の構造情報及び、精密な低分解能領域回折データを用い、より合理的な電子密度解析法を確立し、実測による高精細な静電ポテンシャルを構築する。

4. 研究成果

(1) 低分解能領域の精密測定系の開発

低分解能領域にある回折点を削ってしまう原因であるビームストップを試料位置から遠ざけるためのフライングビームストップ及び He チャンバー(図 1)とデータの完全性を高めるための電動多軸ゴニオアダプタの作成を行った。

当初の予定通り、低角分解 300 を超えるデータを取得することができ、空気散乱も通常のビームストップ程度に抑えることに成功した(図 2)。また、多軸ゴニオアダプタも、予定通り 軸 0~90 度、 軸は 360 度を自由に変更でき、完全性の高いデータを測定でき

る系が完成した。



図1 He チャンバーとフライングビームストップによる測定系

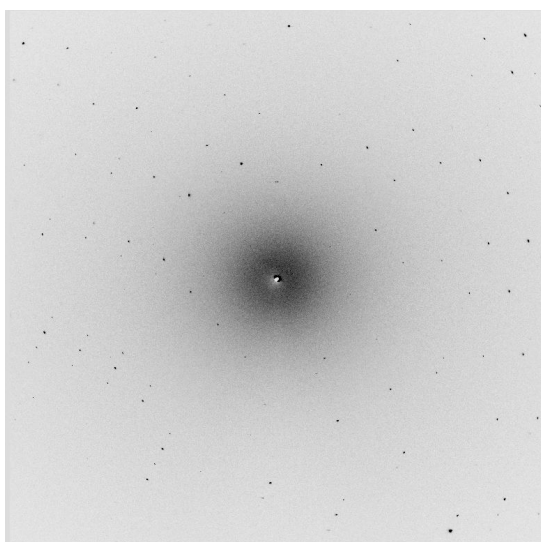


図2 低分解能領域測定系を利用したリゾチームの回折像

(2) タンパク質結晶内溶媒密度調整法の開発

溶媒領域の散乱寄与を変化させる必要があるため、タンパク質結晶中の溶媒領域に重原子を導入するための手法として、鉛金属錯体(PbEDTA)と重原子ガス(Xe か Kr)を用いた。

鉛金属錯体については、Pb 塩に対し、EDTA を混ぜることで作成したが、塩の影響による pH 調整が難しく、時間がたつことで pH が強い酸性へと変化することが確認された。この強い酸性状態の鉛錯体試薬は結晶への影響が強く、結晶の回折能を著しく低下させることが判明した。しかし、中性付近に pH を維持した鉛錯体試薬を標準結晶として用いられるリゾチーム(図3)及びインスリン(図4)に導入することには成功し、タンパク質表面に PbEDTA 由来の電子密度を確認することができた。

また、重原子ガスによる導入法は、リゾチーム結晶に対して Fine-needle ガラスキャピラリーを用いて、Xe ガスの 2MPa 高圧下での

Cryo 凍結法による導入に成功した。リゾチーム分子表面上に 4 つの Xe ガスが結合していることが確認された(図5)。

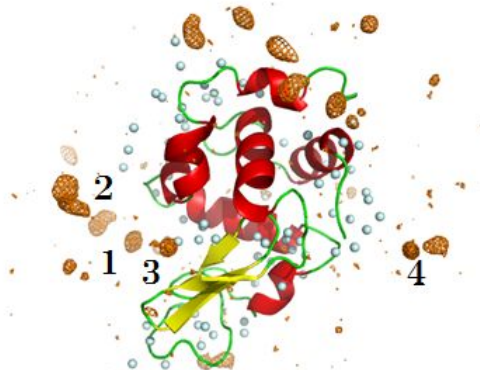


図3 鉛錯体導入後リゾチームの異常散乱分布図。番号は分子表面上の鉛原子

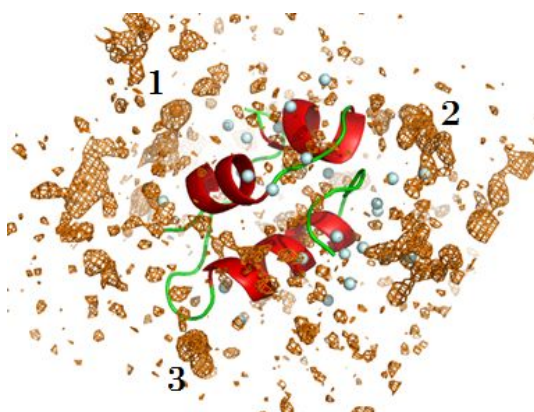


図4 鉛錯体導入後インスリンの異常散乱分布図。番号は分子表面上の鉛原子

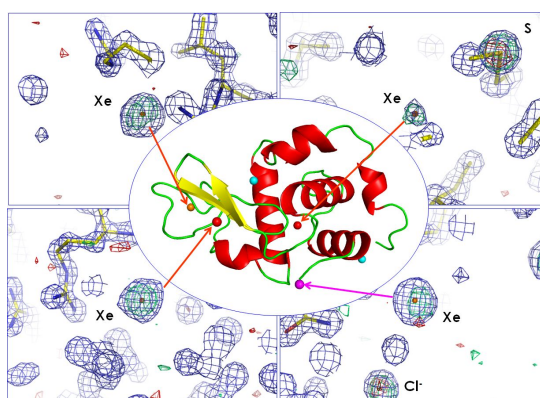


図5 リゾチーム結晶内に導入された Xe 重原子の配置と電子密度分布図

(3) 低分解能領域データ解析

開発した低分解能領域測定系を用いて、リゾチームとサーモリシンの低分解能領域の精密回折データを測定した。これまでビームストップによって遮られていた回折点を正確にとらえることができた。バックグラウンドノイズについても、通常のビームストップ

と同等かそれ以下の状態まで抑えることができ、低角領域の R 値も 4%以下に抑えることができた。

(4) 今後の研究と波及効果

今回の研究により、低分解能に対して 300 程度の分解能まで完全性の高いデータを測定する環境を構築した。また、溶媒領域の寄与を変化させるための手法として、鉛錯体と高圧重原子ガスによる手法を開発した。高圧重原子ガス導入法については、AsCA '13 において口頭発表を行った。今後は、開発した手法を用い、実際に正確に測定したデータを用いて溶媒領域の可視化を目指す。

今回開発した測定系と重原子導入法は、タンパク質 X 線構造解析において重要となる位相決定の精密測定法として応用が可能であり、タンパク質の迅速解析へと発展できる。

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)

[学会発表](計 1 件)

(口頭発表)

Mizuno N, Makino M, Kumasaka T.

Advanced crystal mounting tool for gas pressurization improves efficiency of xenon-derivatization.

The 12th Conference of the Asian Crystallographic Association

2013 年 12 月 8 日 香港

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 伸宏 (MIZUNO, Nobuhiro)

公財)高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・研究員

研究者番号: 90378844