

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510118

研究課題名(和文)中性子構造解析による先駆的なプロトン移動可視化への挑戦

研究課題名(英文) Trailblazing visualization of proton transfer by neutron structure analysis

研究代表者

日下 勝弘 (KUSAKA, KATSUHIRO)

茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・教授

研究者番号：10414591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では中性子構造解析において、水素情報を劣化なく最大限に引き出すデータ処理法を確立することで、これまでに類を見ない先駆的なプロトン情報の獲得を目指した。積分精度を向上する新たな手法として最適化ビンの適応と積分領域最適法の開発に成功した。また、実際に茨城県生命物質構造解析装置を用いて、中性子構造解析データを測定し、開発した手法を適応した。従来法と比べて、統計精度、構造モデルの信頼度に向上がみられ、開発した手法が有用であることを実証した。さらに解析結果から、タンパク質の活性部位におけるプロトン化状態と反応に寄与する新たな水の存在を観測することに成功し、新たな反応機構モデルを提唱するに至った。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed new data reduction method in order to obtain unique and trailblazing information of proton positions in protein structures. I have succeeded two integration method (optimization method of TOF binning and optimization method of 3-dimensional region of diffraction spot for the improvement of accuracy of the TOF diffraction data. I tried to apply these method to the TOF diffraction data set measured by IBARAKI biological crystal diffractometer. In comparison to the results by old method, data statistic and reliability of the structure model were improved. It was demonstrated that these method was useful. From the result of the structure analysis with the data obtained by new method, I could observed protonation states of active site and a water molecule with D atom which is hydrogen bonded to active site. It is assumed that the water contribute to reaction mechanism.

研究分野：中性子構造生物学

キーワード：中性子結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

- (1) 生体物質の生理機能に関わる殆どの反応にタンパク質や基質の水素原子及び水和水が直接関与していることから明らかなように、生命現象の根源的理解には、タンパク質分子中の原子数の約半分を占める全水素原子の位置情報が必須である。その中でもタンパク質における酵素反応のほぼ全てにおいてプロトンの移動が伴っている。X線は電子によって散乱するため、電子を持たないプロトンにX線構造解析により観察することはできない。ゆえに、これまでタンパク質の酵素反応におけるプロトン移動の議論はプロトンの存在が予想される位置の周囲の環境から類推するに留まってきた。水素結合におけるアクセプターとドナーの間にはプロトンの運動を束縛する(プロトンが位置しうる)2つのミニマムポテンシャルが存在し、プロトンはどちらか一方のミニマムポテンシャル(=どちらかの一方の原子に属する形)に存在する。水素結合のアクセプターとドナーの距離が周りの環境により短くなると、2つのミニマムポテンシャル間のポテンシャル障壁が低くなり量子効果によりプロトンが容易にこの障壁を乗り越えて原子間を自由に移動できる(トンネル運動)状態となる。この状態はプロトン移動の様式の一部を担うものであり、この状態を観測することがプロトン移動のプロセスを可視化することにほかならない。実際にトンネル運動の可能性を示唆する低障壁水素結合 Low barrier H-bonds(LBHB)の存在が確認されているが、プロトンを含めた状態の観測はなされていない。そこで、プロトンの位置を見ることができるとして唯一の実験手法である中性子回折法により、プロトンの詳細位置と存在確率を決定することによりプロトン移動のプロセスの可視化を試みる。しかしながら、プロトンの詳細位置と存在確率を高精度に決定するには従来の中性子回折データの精度では十分でなく、飛躍的に高精度な中性子回折データの測定と処理が求められる。茨城県により J-PARC 物質生命科学実験施設 MLF に TOF 型超高性能単結晶回折装置(茨城県生命物質構造解析装置: iBIX)が建設され茨城大学の我々のグループが中心となって運転維持管理の委託を受け供用が開始されており、2010年には初のタンパク質のフルデータ測定を行い、その解析に成功し、高分解能・高精度な中性子回折データの測定が実現可能となっている。ただし、これらの新たな線源・新たな装置から得られる高分解能データから、

水素・水和情報を劣化させることなく最大限に引き出すためには、新たなデータ処理手法の確立が現状では必須である。これまでのデータ測定・処理・構造精密化の結果から以下の二つのデータ処理・解析の手法の導入が精度向上に重要であることが明らかとなっている。ひとつはより強度の弱い反射の精度を向上するために、積分強度算出の際のバックグラウンドの除去方法を高精度に改善することであり、もう一つは測定結晶のモザイク度に起因する結晶構造因子に対する2次消衰効果の補正である。前者のバックグラウンドの除去法については、これまで測定されたタンパク質データの処理の中で、ブラッグ反射の領域を精密に定義し、精度を落とす要因となるバックグラウンド領域を小さくすることが等価反射の強度一致度を大きく左右することが分かっているが、TOF 回折データは一般的な X 線による回折データとは異なり時間方向にも広がりをもつため、新たなデータ処理手法が必要であり、これは現在未開発である。後者の2次消衰効果の補正(3)は iBIX で測定された有機物結晶のデータに対しては極めて有効で、構造因子に対する消衰効果補正係数は測定値を 4.5 倍に補正する値のものもあった。今までのタンパク質回折データにおいては測定試料サイズが大きく結晶性も良質ではないため消衰効果は無視することができたが、iBIX で測定する結晶は小さく良質になると2次消衰効果は無視できない可能性が高く、その補正は必須となる。

2. 研究の目的

- (1) ほぼ全てのタンパク質酵素反応にはプロトン(H⁺)移動が関与しているが、X線構造解析ではH⁺を観察することは出来ないため、この様子は周囲の環境から類推するに留まってきた。本研究ではH⁺観察が可能な中性子構造解析によりH⁺移動のプロセスを可視化することが目的である。実際には水素結合におけるドナー-アクセプター間のポテンシャル障壁を量子効果によりH⁺が乗り越えるトンネル運動状態を、H⁺位置とその存在確率を決定することにより可視化を試みる。H⁺の存在確率を決定するためには、従来より飛躍的に高精度なデータ測定と処理が求められる。これを実現すべく次世代パルス中性子源に設置された茨城県生命物質構造解析装置を用いて、標準的な試料について高分解能・高精度な中性子回

折データを測定し、データが持つ水素・水和情報を劣化させることなく最大限に引き出すデータ処理手法を確立し適応することで、今までに、類を見ない先駆的なプロトン情報の獲得を目指す。

3. 研究の方法

(1) 先駆的なプロトン情報の獲得のための手法確立

次世代パルス中性子源に設置された茨城県生命物質構造解析装置を用いて、測定された高分解能・高精度な中性子回折データからデータが持つ水素・水和情報を劣化させることなく最大限に引き出すデータ処理手法を確立し適応することを目的として、以下の新たな強度積分法およびデータ補正法を開発した。TOF 回折データの高精度積分コンポーネント開発

現在の iBIX の TOF 回折データを処理するソフトウェアは TOF データ特有の時間方向のプロファイル形状の複雑性から積分範囲に余分なバックグラウンド領域を含んでおり、特に弱い反射強度については高精度な積分データを得られていない。この問題を解決し、より高い精度で測定されたデータの精度劣化を最小限におさめるため、iBIX 用の TOF 回折データ処理ソフト "STAR Gazser" の強度積分コンポーネントに対して、積分範囲を最適に定義する方法として、新たなエリプティカルカラム法を考案し、これをコード化し実装した。

また、TOF 回折データは時間方向にプロファイルを持ち、この形状が時間に依存している。現在のデータ処理手法ではこの時間に依存したプロファイルの広がりや考慮されていない。本研究では新たな精度向上手法として、回折強度データの TOF 方向の広がりやの時間依存性を考慮して、時間ピン幅を最適化することで、見かけ上のプロファイル幅を一定に積分する方法を考案した。

中性子構造精密化コンポーネントへの消衰効果補正機能追加

さらに、TOF 回折データに対する消衰効果の補正は、それぞれのブラッグ反射に対して測定された波長と回折角に従った関数として補正されるばかりでなく、構造精密化の中で最適化される補正パラメータと計算された構造因子(F_c)を基にその補正值が決定される。よって構造精密化ソフトウェアシステムに消

衰効果補正のアルゴリズムが組み込まれなければならない。現在、無機・有機分子単結晶を対象とした構造解析ソフトウェアシステムの中には中性子 TOF 回折データについて消衰効果補正が可能なものが存在する(GSAS)が、タンパク質の構造解析システムでは存在していない。本研究では、当初、中性子-X線同時構造解析が可能なソフトウェア PHENIX の構造精密化コンポーネントに対して追加を行うことを予定していたが、既存ソフトへの機能組み込みが困難であると判断したため、積分反射強度データに対して擬似的な 2 次消衰効果補正を行うルーチンを構築した。

(2) 大型結晶育成および TOF 回折データ測定

データが持つ水素・水和情報を劣化させることなく最大限に引き出すデータ処理手法を適応し、その有用性を実証するために用いる TOF 回折データ測定用の標準試料の大型結晶の育成を行った。標準試料としてリボヌクレアーゼ A を用いた。結晶化にあたってはタンパク質濃度、結晶化剤濃度による結晶化相図を作成し、最も最適な条件を見だし、結晶化を実施した。た、中性子回折測定では、水素による非干渉性散乱がバックグラウンドの上昇をもたらすので、作成された大型結晶を重水に浸け、結晶水とタンパク質における水素原子の一部を重水素に置換し、より S/N 比の高いデータが測定を可能とした。作成した大型単結晶試料は母液を注入したキャピラリーに封入し中性子回折データ測定に用いた。J-PARC, MLF に設置の iBIX を用いて構造精密化が可能な中性子回折データを測定した。測定は全て常温で行った。また、中性子-X線の同時構造解析を行うために、中性子回折測定を行ったのと同じ試料を用いて、KEK PF の放射光を用いて X 線回折データセットを測定した。

(3) データ処理・解析(開発コンポーネントの適応)

開発したコンポーネントを用いて、測定した標準試料(リボヌクレアーゼ A)の中性子回折データの高精度積分強度計算および消衰効果補正付き構造精密化を実施した。この結果をもとに開発・追加したコードが正しく動作しているかを検証し、必要に応じてバグの除去を行い正しく動作するように修正した。測定した中性子回折データセットについ

て、検出器感度・入射中性子強度に対する適切な補正を施した後、開発した高精度積分コンポーネントを含むデータ処理ソフトウェアを用いて、ピークサーチ、UB 行列決定、指数付け、強度積分を行い、構造解析用の高精度積分強度データを抽出した。この高精度積分強度データを用いて、同じく構築した擬似的な2次消衰効果補正を適応して構造精密化を行った。これらの結果から統計精度等を従来法と比較し、開発した手法の有用性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 最適化ビンの決定

標準試料を用いて測定した TOF 回折データを基に、iBIX のそれぞれの検出器におけるピークプロファイル幅の TOF (波長) 依存性を計算した(図 1)。

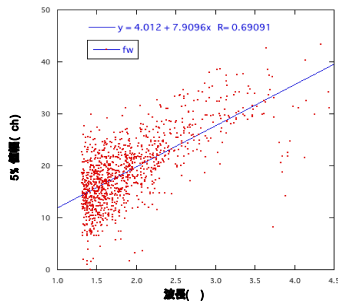


図 1 プロファイル幅の TOF(波長)依存性

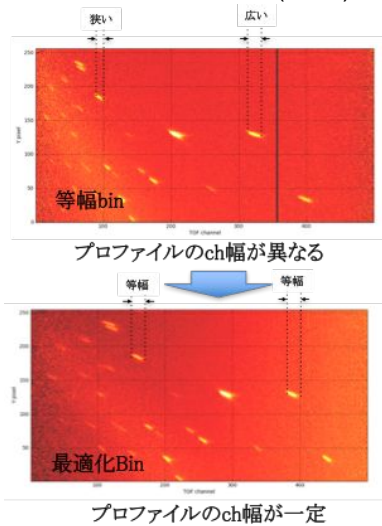


図 2 最適化ビンの適応結果

この依存性の結果を基に、それぞれの検出器における時間ビン幅の最適化を行った。図 2 に代表的な検出器の時間ビン幅最適化を行った結果を示す。等幅ビンのデータでは TOF の値が小さい位置ではプロファイル幅が小さく、TOF の値が大

きい位置ではプロファイル幅が大きくなっているが、最適化ビンを使ったデータは TOF 全体に渡って見かけの幅が同程度になっている。これにより、最適なビン幅を決定することに成功したことが確認された。

(2) エリプティカルカラム法および最適化ビンの適応

積分領域を最適化することができるエリプティカルカラム法と最適化ビンについて、測定した標準試料の TOF 回折データの積分に対して適応した。従来の Box sum 法とそれぞれの方法およびそれらを組み合わせた方法を用いて積分強度抽出を行い、その統計精度 (等価反射の一致度 R_{sym} および $I / (I)$) を計算し比較した。表 1 にその結果を示す。

表 1 統計精度の比較

等価反射の一致度 R_{sym}		
	BOX sum	新積分領域
等幅 bin	11.2%	9.9%
最適化 bin	10.1%	9.5%
$I / (I)$		
	BOX sum	新積分領域
等幅 bin	8.6	10.5
最適化 bin	10.5	13.7

表 1 の結果から、Box sum 法と比べて R_{sym} は新積分法で 1.3%、最適化ビンで 0.9% それらを組み合わせることで 1.7% 向上することに成功した。また、 $I / (I)$ についても、Box sum 法と比べて新積分法で 1.9、最適化ビンで 1.9 それらを組み合わせることで 5.1 向上することに成功した。これにより、本研究で考案し開発した手法が有用であることが実証された。また、これらの積分強度データを用いて構造の精密化を行った。両方の方法を組み合わせて得られた積分強度を用いて積分した結果において、得られた構造モデルの信頼度を表す R_{works} が 1% 向上した。これにより、得られた積分強度データの信頼性が向上したばかりでなく、これを用いた構造解析データにおいても精度が向上したことが確認された。得られた構造モデルから計算した散乱長密度マップにおいても、より精度の高いもの得られた。さらに、この結果から本試料において活性部位におけるプロト

ン状態とともに反応に寄与しうる新たな水の存在を示唆する中性子散乱長密度を観測することに成功し、新たな反応機構モデルを提唱することができた。

今後はこれらの新たに構築した駆動的なプロトン情報の獲得のためのデータ処理システムを活用し、実際に(LBHB)の存在が確認されている試料について中性子構造解析を行い、プロトンの詳細位置と存在確率を決定することによりプロトン移動のプロセスの可視化を進める。

(3) 擬似消衰効果補正の適応

同じく測定した標準試料から得られた積分強度データを用いて、擬似消衰効果補正を適応もしくは、消衰効果の寄与が高い反射を選択的に除去してデータをを用いて構造の精密化を行った。しかしながら、精密化した構造モデルの信頼度を表す R_{works} や得られた散乱長密度マップに大きな改善が見られなかった。これは擬似的な補正では十分ではないことが原因であると予想される。本研究の範疇では本格的な消衰効果の補正を実施することができなかったが、今後、構造精密化ソフトウェアの開発者と連携を取り消衰効果の補正法の適応を進めたいと考えている。

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 0件)

[学会発表](計 4件)

日下勝弘, 山田太郎, 矢野直峰, 細谷孝明, 大原高志, 片桐政樹, 野田幸男, 田中伊知朗, 『J-PARC の中性子源における茨城県生命物質構造解析装置 iBIX の現状』、平成 27 年度日本結晶学会年会、2015.10.17、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府・堺市)

K. Kusaka, T. Yamada, N. Yano, T. Hosoya, T. Ohhara, I. Tanaka, M. Katagiri 『Single crystal neutron diffractometer for Biological macromolecules iBIX at J-PARC』、第 28 回ヨーロッパ結晶学会議、2015.7.25、Palais des congrès de Montréal (クローアチア・ロビニー)

日下勝弘, 山田太郎, 友寄克亮, 細谷孝明, 大原高志, 田中伊知朗, 新村信雄, 『茨城県生命物質構造解析装置 iBIX によるリボヌクレアーゼ A の中性子構

造解析』平成 26 年度日本結晶学会年会、2014.11.1、東京大学農学部(東京都・文京区)

K. Kusaka, T. Yamada, K. Tomoyori, T. Hosoya, T. Ohhara, I. Tanaka, N. Niimura., 『Neutron diffraction study for reaction mechanism of RNase A』、第 23 回国際結晶学会議、2014.8.6、Palais des congrès de Montréal (カナダ・モントリオール)

[その他]

現在なし、今後、ホームページへ成果記載を予定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下 勝弘 (KUSAKA KATSUHIRO)

茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・教授

研究者番号：10414591