

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440020

研究課題名(和文) 超高精度結晶構造解析によるプロトン輸送タンパク質の全水素原子位置決定

研究課題名(英文) Crystallographic analysis of a proton transporting protein at high resolution

研究代表者

竹田 一旗 (Takeda, Kazuki)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30332290

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)：プロトン輸送は光合成や電子伝達、物質輸送などに関与する膜タンパク質に広くみられる現象であり、生命活動のなかで最も重要な素過程のひとつである。そこで、代表的なプロトン輸送タンパク質であるバクテリオロドプシンについて高分解能X線結晶構造解析を実施した。結晶化条件とX線回折条件の最適化を進めることによって、X線損傷のないX線回折データセットを収集することに成功した。この回折データについて解析と構造精密化をおこなったところ、個々の非水素原子の電子密度を分離して観察することができた。また、一部の水素原子に対応する電子密度も確認することができた。

研究成果の概要(英文)：proton transport is mediated by membrane proteins involved in photosynthesis, electron transport, substrate transport and so on. Therefore, it is one of the most important processes in the biological system. I performed a high resolution crystallographic analysis of bacteriorhodopsin, which is the most studied proton transporting protein. According to the optimization of conditions for the crystallization and data collection, we succeeded in collecting a high resolution data set without X-ray damages. Respective non-hydrogen atoms are clearly observed on the electron density map. In addition, electron densities for some hydrogen atoms are observed in the analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質 結晶

## 1. 研究開始当初の背景

プロトン( $H^+$ )は原子核として最軽量であり、量子力学的な波動性も他の原子に比べると顕著である。このため、プロトンの制御は、物性物理学やエネルギー工学における最重要テーマのひとつである。一方、光合成や呼吸鎖における電子伝達はプロトン輸送を駆動し、生体膜をはさんでプロトンの濃度勾配を発生させる。このプロトン濃度勾配はエネルギーの一形態として、ATP合成酵素や各種の物質輸送タンパク質の駆動に利用される。さらには、さまざまな酵素反応にみられる酸化還元においても、電子の授受にプロトンの移動が共役している。したがって、プロトンは生命活動において必要不可欠であり、その濃度勾配形成は最も重要な素過程のひとつと言える。生体膜をはさんでプロトン濃度勾配を作り出しているタンパク質は、生体膜に埋め込まれて存在する膜タンパク質である。プロトンの制御に深く関与しているのは、タンパク質内部に形成された輸送経路の荷電性残基と水分子の解離状態であり、全ての水素原子の位置と物性(分極度や電離度)を決定することは、プロトン輸送機構の解明には必要不可欠であるこれまでの解析分解能(通常1.5~3.0 Å)では、非水素原子の位置などプロトン輸送にとっては間接的な構造情報しか決定できていない。このような従来の構造情報の量と質ではプロトン輸送メカニズムの解明は全く不十分である。一方、申請者は水溶性電子伝達タンパク質の高分解能結晶構造解析をおこない、タンパク質中の全水素原子に加え、水分子の水素原子、さらには外殻電子の形状を決定することに成功している。そして、このような高精度の解析から得られる構造情報の重要性を実感した。

## 2. 研究の目的

代表的なプロトン輸送タンパク質であるバクテリオロドプシンを研究対象とする。バクテリオロドプシン(分子量 26,000)は、高度好

塩菌の細胞膜に存在する、小型の光駆動プロトンポンプである。良質な結晶を作製する方法はいくつか報告されているが、いずれも脂質環境下で結晶化させる方法であり、水溶性タンパク質の結晶化方法とは大きく異なる。脂質は非常に粘性が高いため、核形成の頻度に対して結晶成長が遅く、小さな結晶しか得られない。これまでに報告されているなかでもっとも良質なバクテリオロドプシンの結晶も脂質立方相の中で成長させたものであるが、最長辺が0.1 mm程度しかなく、この小ささが最高分解能を1.55 Åに限定している最大の要因であると考えられた。また、タンパク質中の水素原子を感度よく観察するためには、回折データが単に高分解能であるということだけではなく、その測定精度が極めて高いことが要求される。そこで、測定精度の低下を招くX線損傷の影響を排除することで、高精度の高分解能X線回折データを収集し、水素原子位置を実験的に決定する方法を研究した。

## 3. 研究の方法

### (1) 大型結晶作製

水溶性タンパク質の結晶化においては、沈殿剤以外に化合物を添加することで結晶性の向上と大型化が実現された例が多数見られる。本研究では、脂質立方相を用いた膜タンパク質の結晶化法においても、添加剤によって結晶性の向上や結晶の大型化が可能になるかどうか検討した。脂質立方相はモノオレイン酸と水溶液を、シリンジを組み合わせた特殊な実験器具を用いて均一になるように混合することで作成した。また、添加剤(脂質や界面活性剤、その他の化合物)は、1~20%になるように加えた。そして、X線小角散乱法によって形成された脂質相の種類を決定し、その性質を調べた。さらに添加剤を加えた脂質立方相を用いて結晶化をおこなった。

(2) 高精度X線回折データ収集と構造解析  
X線回折データの測定中は放射光施設でおこなった。その際、結晶を窒素あるいはヘリウム気流を使用して15~100 Kに冷却した。構造解析にはXDS、CCP4、CNS、PHENIX等のプログラムを使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大型結晶作製

いくつかの添加剤で、脂質相の性質及び膜タンパク質結晶の形状に変化が見られた。特にテルペノイドの一種であるスクアレンを脂質立方相に加えると、通常より迅速に均一な脂質立方相が形成されることがわかった。また、この脂質立方相から成長するバクテリオロドプシンの結晶は通常のものより積層する膜が広がる方向により大型化していた。最終的に、最長辺が約0.3 mmの結晶を再現性良く多数作製することができた(図1)。また、結晶を壊さずに脂質相から取り出すために、脂溶性物質を検索した。その結果、脂質相は溶かすが結晶には影響を及ぼさない化合物を見出すことができた。さらには、その化合物をそのまま抗凍結剤として使用することで結晶に操作の際の機械的なダメージを及ぼさずに凍結保存することが可能となった。

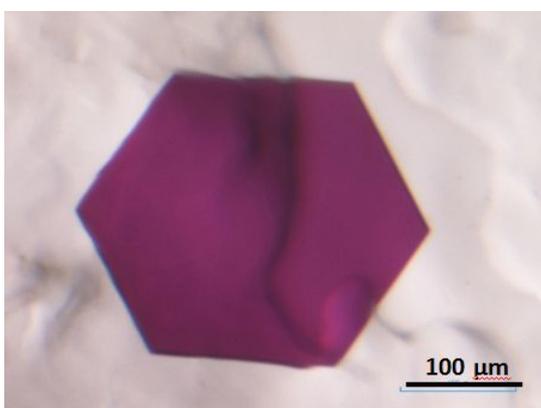


図1. バクテリオロドプシンの結晶。

##### (2) 高精度X線回折データ収集

測定温度や露光時間、照射線量などの最適化をおこなった。また、回折データを解析し、格子定数のバラつきやX線損傷による損傷の進行について研究した。その結果、最高で1.1 Å分解能の回折斑点を記録することに成功した。当初の目標は、測定温度や露光時間、照射線量などの実験条件を最適化して、多数の結晶から高分解能なデータセットの構築をおこなうことであった。しかしながら、結晶ごとの格子定数の差異が大きいことが判明した。とくに、膜に垂直な方向であるc軸のバラつきが非常に顕著であった(図2)。このため、このため、多数の結晶からの回折データをマージすることはできなかった。そこで、単一の結晶から収集したデータのみを使用した。個々の非水素原子が分離して観測することが可能な1.2 Å分解能の回折データセットとして取得することに成功した。これは、これまでに報告されているバクテリオロドプシンのX線回折データの中で最も分解能が高いものである。

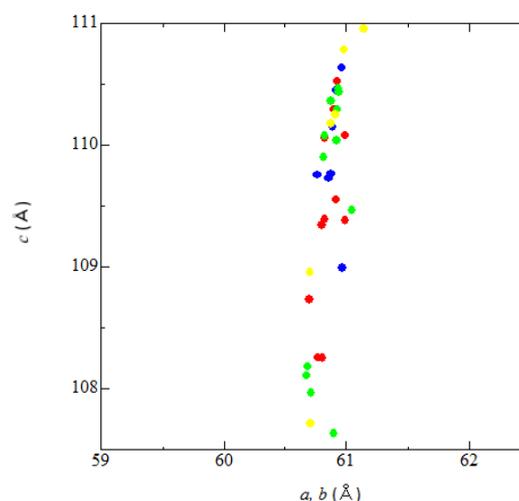


図2. 結晶における格子定数のばらつき。

##### (3) 構造

この回折データについて解析と構造精密化をおこなったところ、個々の非水素原子の電

子密度を分離して観察することができた(図3)。また、一部の水素原子に対応する電子密度も確認することができた。レチナールや機能性残基における結合次数やマルチコンフォメーションに関する情報を得ることができた。また、水素原子に対応する電子密度も分子内部のペプチド鎖部分において確認することができた。

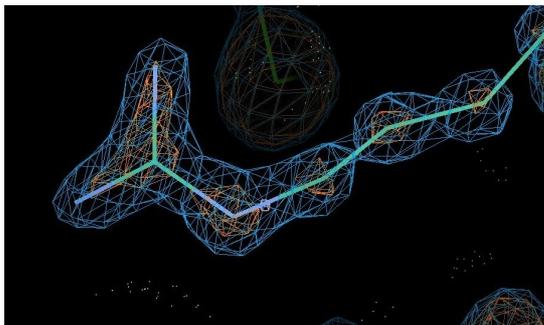


図3 Arg82 側鎖の電子密度( $\sigma_A$ -weighted  $2F_o - F_c$ ) マップ。青:  $2\sigma$ 、オレンジ:  $4\sigma$ 。

#### 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4件)

Crystal structures of chitin binding domains of chitinase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. Hanazono, Y., Takeda, K., Niwa, S., Hibi, M., Takahashi, N., Kanai, K., Atomi, H., and Miki, K. *FEBS lett.*, **590**, 298-304 (2016).

Crystal structure of the LH1-RC complex in bacterial photosynthesis. Takeda, K. and Miki, K. *SPRING-8 research frontiers*, **2014**, 16-17 (2014).

Origin of asymmetry at the inter-subunit interfaces of V1-ATPase from *Thermus thermophilus*. Nagamatsu, Y., Takeda, K., Kuranaga, T., Numoto, N., and Miki, K. *J. Mol. Biol.*, **425**, 2699-2708 (2013).

Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe*. Hanazono, Y., Takeda, K., Oka, T., Abe, T., Tomonari, T., Akiyama, N., Aikawa, Y., Yohda, M. and Miki, K. *Structure*, **21**, 220-228 (2013).

〔学会発表〕(計6件)

超高分解能結晶構造による外殻電子の可視化と化学反応解析. 竹田一旗, 第13回蛋白質科学会, 2013年6月, 鳥取市.

紅色光合成細菌の光合成タンパク質と量子構造生物学. 竹田一旗, 第15回蛋白質科学会年会, 2014年6月, 横浜市.

タンパク質の超高分解能結晶構造解析の現状. 竹田一旗, 第15回蛋白質科学会年会, 2015年6月, 徳島市.

GFPのAおよびB stateにおける高分解能X線結晶構造解析. 高場圭章, 竹田一旗, 三木邦夫, 第53回生物物理学会年会, 2015年9月, 金沢市.

完全重水素化緑色蛍光タンパク質の高分解能X線構造解析. 邨洋, 高場圭章, 花園祐矢, 竹田一旗, 三木邦夫, 日本結晶学会平成27年度年会, 2015年10月, 堺市.

緑色蛍光タンパク質の低損傷高分解能構造解析. 高場圭章, 邨洋, 竹田一旗, 三木邦夫. 日本結晶学会平成27年度年会, 2015年10月, 堺市.

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.kuchem.kyoto-u.ac.jp/organization/member/ktakeda.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者竹田 一旗(TAKEDA KAZUKI)  
京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 30332290