

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82110

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891030

研究課題名(和文)鉄硫黄タンパク質における酸化還元状態安定化機構の解明

研究課題名(英文)Studies of a mechanism in stabilizing the redox states of an iron-sulfur protein.

研究代表者

平野 優 (HIRANO, Yu)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・博士研究員

研究者番号：80710772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：酸化型高電位鉄硫黄タンパク質の大型結晶を作製し、大強度陽子加速器施設J-PARCの生命科学用ビームラインiBIXにおいて100 Kの低温下で中性子回折実験を行った。その結果、タンパク質として世界最高分解能である1.1オングストローム分解能の回折データセットを取得することに成功した。立体構造精密化の結果、タンパク質表面の解離性アミノ酸残基や水分子の水素原子構造を決定した。また、水素原子の結合距離、結合角度の制約を緩めた立体構造精密化を行うことで、理想値からのずれを多数観測することができた。

研究成果の概要(英文)：Large crystals were obtained for the oxidized form of high-potential iron-sulfur protein. Neutron diffraction experiment was carried out at the beamline for life science (iBIX) of Japan Proton Accelerator Research complex J-PARC. A neutron diffraction data set was collected up to 1.1 angstrom resolution that is the highest resolution in the neutron diffraction data of proteins. After structure refinement, structures of hydrogen atoms were determined for ionizable amino acids and water molecules on the surface of the iron-sulfur protein. In addition, many deviations from ideal values were observed in the structure refinement by relaxing the restraints for bond angles and lengths of hydrogen atoms.

研究分野：蛋白質結晶学

キーワード：蛋白質 中性子構造

1. 研究開始当初の背景

鉄硫黄タンパク質の関与する電子伝達反応は、補欠分子族である FeS クラスターを取り巻くタンパク質並びにその周囲の溶媒（主に水分子）の立体構造によって制御されていると考えられている。またその電子伝達は、FeS クラスターの外殻電子を介した一電子授受により行われるものであり、何らかの構造変化を伴うと考えられる。高電位鉄硫黄タンパク質 (HiPIP) は、光合成細菌の電子伝達系でシトクロム *bc₁* 複合体から反応中心複合体への電子伝達に関与しており、電子伝達の過程でタンパク質内部に結合する Fe₄S₄ クラスターにおいて +3/+2 価の酸化還元状態変化が起こる。しかしながらこれまで HiPIP の X 線結晶構造、NMR 構造においては、酸化還元状態間で実験データの精度から有意であると示せるほど大きな構造変化は観測されていない。

2. 研究の目的

鉄硫黄タンパク質において、酸化還元状態の安定化機構を解明することは、生体内で広くみられる電子伝達機構を理解する上で重要な課題とされている。申請者は、これまで HiPIP の X 線構造解析を行ってきたが、酸化型と還元型の高分解能構造においても両者に大きな違いは観測できなかった。しかし、酸化還元状態は一電子の違いではあるが、それを補うために何らかの構造変化は不可欠である。そこで本研究では、タンパク質表面の解離性アミノ酸残基、水分子に着目した。HiPIP の大型結晶を作製し、大強度陽子加速器施設 J-PARC を用いた中性子回折実験を行うことで、これまで解明されていない鉄硫黄タンパク質表面の解離性残基のプロトン化状態、水分子の構造変化を明らかにし、酸化還元状態制御の本質を明らかにする。

3. 研究の方法

酸化型 HiPIP の体積 1 mm³ 程度の大型結晶は、マクロシーディング法により作製した。中性子回折データ収集に際しては、バックグラウンドを低減するため、大型結晶を重水溶液環境に置換した。また、原子の揺らぎを抑えることで高分解能データを取得できると考え、大型結晶を 100 K の低温下で冷却して回折データ収集を行った。その際、氷の生成による結晶の劣化を防ぐため、大型結晶を抗凍結溶液環境に置換した。重水溶液置換、抗凍結溶液置換においては、実験室 X 線を使用して回折能への影響を調べ、最適条件を決定した。

中性子回折データ収集は J-PARC の生命科学用ビームライン (iBIX) において実施した。取得した中性子回折データは、プログラム STAR Gazer を用いて回折点の指数付け、強度積分を行った。中性子回折データを取得した同一の結晶を用い、放射光施設 Photon Factory の BL5A ビームラインにおいて X 線

回折データ収集を行った。中性子データと X 線データを相補的に利用した立体構造精密化は、プログラム Phenix を用いて行った。

4. 研究成果

一般的にタンパク質の小型結晶（体積約 0.01 mm³）は、タンパク質溶液と結晶化を促進する沈殿剤溶液とを混合した数 μl 程度の溶液中で作製される。HiPIP の大型結晶は、体積 0.02 mm³ 程度の小型結晶を種結晶として、タンパク質溶液と沈殿剤溶液からなる結晶成長溶液中で種結晶を成長させるマクロシーディング法により作製した。まず、結晶成長溶液量 4 μl のスモールスケールにおいて、タンパク質濃度と沈殿剤濃度による相図を作成し、結晶の成長する条件を決定した。その後、結晶成長溶液を 300-500 μl と大容量化することで、体積 1 mm³ を超える良質な大型結晶を取得することに成功した（図 1）。

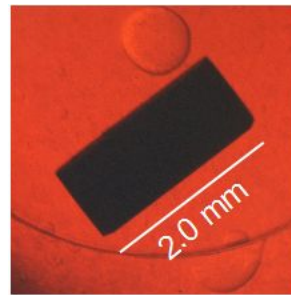


図 1 HiPIP の大型結晶

大型結晶の重水溶液環境への置換は、マクロシーディング時に重水素化試薬を用いて作製した結晶成長溶液を使用することで、結晶の大型化と同時にいった。タンパク質結晶は体積の約 50% を溶媒（主に水分子）が占めるため、結晶の凍結においては氷の生成による結晶の劣化を防ぐため、結晶中や結晶周囲の溶液を抗凍結溶液に置換する必要がある。また、大型結晶は小型結晶に比べ体積が約 100 倍以上となるため、結晶の凍結はより困難となる。そこで、大型結晶の抗凍結溶液環境への置換条件を詳細に検討した。まず、小型結晶の凍結条件を参考に、抗凍結剤として重水素化グリセロールを使用した。抗凍結溶液に置換する際には、最終的な抗凍結剤濃度に達するまで 20 段階で徐々に抗凍結溶液を添加することで結晶の劣化を防いだ。その後、実験室 X 線における回折実験を行い、以上のような重水溶液置換、抗凍結溶液置換条件を用いることで、小型結晶と同程度の回折能が得られることを確認した。

中性子回折データ収集は J-PARC の iBIX において 100 K の低温窒素気流中で結晶を冷却しておこなった。30 台の検出器を使用し、1 データセットあたり 8.5 時間中性子を照射し、結晶の方位を変えて全 28 データセットを 11 日間かけて取得した。その結果、最高で 1.08 Å 分解能の回折点を観測することに

成功した (図 2)。

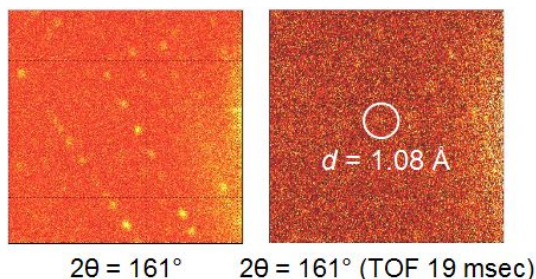


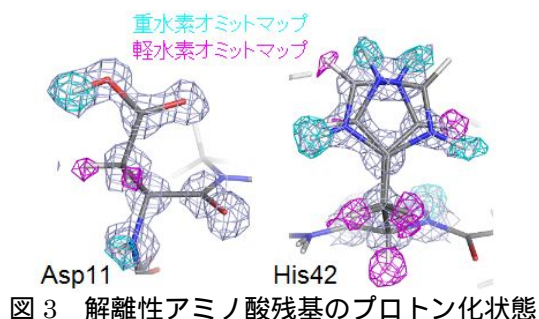
図 2 HiPIP 中性子回折像

回折強度の積分を行う際には、積分領域と分解能範囲を最適化することで、最終的に 1.1 Å 分解能のデータセットとして処理を行うことができた。これは、タンパク質として世界最高分解能の中性子回折データである。また、全分解能範囲におけるデータの完全性は 90% 程度となり、完全性の高いデータセットを取得することができた。

中性子回折データは X 線回折データに比べデータ数が少なくなる。そのため水素原子以外の原子は、中性子回折データを取得した同一結晶を用い、X 線回折データ収集を行い、X 線データを利用して立体構造精密化が行われる。HiPIP においても、中性子回折データを取得した同一結晶を用い、放射光施設 Photon Factory において X 線回折データ収集を行った。その結果、0.66 Å 分解能の超高分解能回折データセットを取得することができた。

立体構造精密化は、まず X 線データのみを用い、水素原子以外の原子座標と原子の揺らぎに対応する温度因子について実施した。その後、中性子データと X 線データを相補的に利用して水素原子を含めた構造精密化を行った。タンパク質のアミノ酸残基については、全ての水素原子、重水素原子を構造モデルに含めた。また、溶媒分子についても多くの重水素原子を構造モデルに含めて立体構造精密化を行った。その結果、データとモデルの一致度を示す R 値は、中性子データについて 18.4% となった。

今回、高分解能の中性子回折データを取得できたことにより、これまで明らかとなっていなかった HiPIP タンパク質表面の解離性アミノ酸残基のプロトン化状態が明らかとなった (図 3)。



これまでタンパク質の中性子構造解析では、マルチコンフォメーションを形成するアミノ酸残基のプロトン化状態を決定することはできていなかった。HiPIP において His42 は、側鎖のイミダゾール環がダブルコンフォメーションを形成しているが、どちらのコンフォメーションについてもプロトン化状態を決定することができた (図 3 右)。さらに HiPIP においては、水分子についてタンパク質と相互作用を形成する分子の重水素原子に加え、タンパク質と直接相互作用を形成しない水分子についても、重水素原子の構造を決定することができた (図 4)。

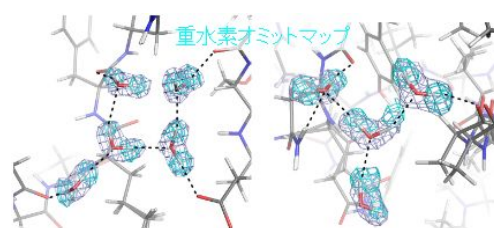


図 4 水分子の構造

タンパク質の中性子構造解析においては、高分解能の回折データを取得することが困難であり、パラメータに対するデータ数が限られていた。そのため、水素原子と結合する原子間の結合距離、結合角度については、低分子の中性子構造解析で取得された情報を基準値 (理想値) としての制約を用いて立体構造精密化が行われてきた。HiPIP においては高分解能の中性子回折データを取得できたことから、制約を緩めた立体構造精密化を実施した。その結果、タンパク質ペプチド結合のアミドプロトンにおいて、結合距離、結合角度に理想値からのずれを多数観測することができた。通常のタンパク質の中性子構造解析では、アミドプロトンは、ペプチド結合の C^α-N-C 原子からなる平面上に位置するように制約がかけられる。HiPIP においては、アミドプロトンが C^α-N-C 原子からなる平面からずれた位置に観測された (図 5)。



図 5 アミドプロトンの平面からのずれ

これまで Fe₄S₄ クラスターの硫黄原子 (S3) と水素結合を形成すると考えられていた Cys75 のアミドプロトンは、硫黄原子から遠ざかる方向に位置していることが明らかとなった (図 5 右)。Cys75 のアミドプロトンと S3 との間の水素結合は、Fe₄S₄ クラスターの電子状態制御に関わっていると考えられてきたが、今回取得した構造から水素結合を

形成していない可能性が示唆された。

アミドプロトンと窒素原子間の結合距離においては、平均値としては理想値付近に収束したが、理想値からずれた結合も多数観測された(図6)。一方、ペプチド結合のC^o原子に結合する水素原子では、平均値は理想値付近に収束し、結合距離の分布は理想値付近で最大となっていた。アミドプロトンは水素結合を形成するため、水素結合によって理想値からずれた結合が観測されたと考えられる。

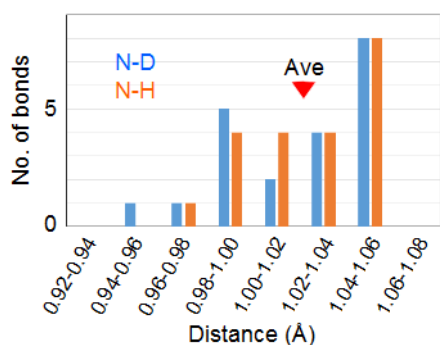


図6 アミドプロトンの結合距離

酸化型 HiPIP の高分解能中性子構造解析を行ったことで、タンパク質表面の解離性アミノ酸残基のプロトン化状態や水分子の構造を明らかにすることができた。また、低分子の制約を緩めた立体構造精密化を行ったことで、ペプチド結合のアミドプロトンにおいて結合距離、結合角度の理想値からのずれを多数観測することができた。これまで観測できていなかった構造を解明することに成功したことから、今後還元型 HiPIP についても高分解能の中性子構造解析を行うことで、鉄硫黄タンパク質の酸化還元状態制御に関する構造変化を捉えることが可能となると期待できる。また、今回のような高分解能のタンパク質中性子構造解析例を増やすことによって、タンパク質中性子構造解析における精密化パラメータなどの新しい基準を確立することができると期待できる。

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 6 件)

平野優 他、電子伝達タンパク質の中性子構造解析、日本中性子科学会第 14 回年会、札幌、2014 年 12 月。

平野優 他、高電位鉄硫黄タンパク質の中性子構造解析、平成 26 年度日本結晶学会年会、東京、2014 年 11 月。

Yu Hirano *et al.*, Ultra-high resolution structure of high-potential iron-sulfur protein, 23rd congress and

general assembly of the international union of crystallography, Montreal, Canada, 2014.8.

Yu Hirano *et al.*, Preliminary neutron diffraction study of high-potential iron-sulfur protein at iBIX, The 2nd international symposium on science at J-PARC, Tsukuba, 2014.7.

平野優 他、電子伝達タンパク質の予備的中性子回折実験、第 14 回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014 年 6 月。

平野優 他、高電位鉄硫黄タンパク質の高分解能中性子回折データ収集条件の検討、平成 25 年度日本結晶学会年会、熊本、2013 年 10 月。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 優 (Hirano Yu)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・博士研究員

研究者番号：80710772