

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03643

研究課題名(和文) 緑色蛍光タンパク質の超精密構造解析

研究課題名(英文) Structural analyses of green fluorescent protein with ultra-high accuracy

研究代表者

竹田 一旗 (Takeda, Kazuki)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30332290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：外殻電子の分布や電荷、水素原子位置は、タンパク質分子の物性や反応性の理解のために重要な情報であるが、これまでに解析例はほとんどない。本研究では、0.78 Åという超高分解能で緑色蛍光タンパク質(GFP)のX線電荷密度解析を実行し、価電子分布や原子電荷を得ることができた。一方、水素原子に関する詳細な情報を得るためには、重水素化タンパク質を用いた中性子回折法が有効である。このため、GFPの重水素化による物性や構造への影響を調査した上で、中性子回折実験をおこなった。一連の研究により、発色団と周辺環境間の比較的弱い相互作用を定量的に得ることができ、GFPの物性を説明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電荷密度解析は電子構造を実験的に決定する手法であり、分子の物性を直接議論することが可能である。本研究では、結合次数や結合エネルギー、非共有結合性の相互作用などを定量的に決定することができた。得られた結果は量子化学計算との比較が可能な精度であるため、理論と実験の相補的な発展を促すものである。一方、タンパク質の構造情報は薬剤開発においても広く利用されている。タンパク質や薬剤候補分子の電荷や価電子の分布は作用機序に深く関与しているが、通常の構造解析からは決定できない。電荷密度解析の汎用化は相互作用予測や評価精度の向上と効率化にもつながるため、将来的には創薬にも応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The charge-density analysis can provide the information about the density distribution of outer shell electrons, the atomic charge and the position of hydrogen atoms, which is essential for understanding the physical and chemical properties. However, few reports are available on the analysis in protein molecules. In this research, we performed the charge density analysis of green fluorescent protein (GFP) at resolution of 0.78 Å. The precise electronic structure gives information about the valence electron distribution, the atomic charge and the weak interaction. Meanwhile, neutron crystallography using perdeuteration protein is effective method for determining the positions of hydrogen atoms. We evaluated the influence of physical properties and structure by perdeuteration and performed the neutron diffraction experiment. A series of studies quantified the weak interactions between the chromophore and the protein environment and enable us to explain the properties of GFP.

研究分野：X線結晶構造解析

キーワード：タンパク質 X線 蛍光

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) が持つ緑色蛍光タンパク質 (GFP) は、238 個のアミノ酸残基から構成される発光タンパク質である。発色団はポリペプチド鎖中の 3 つの残基 (Ser65, Tyr66 および Gly67) から翻訳後の反応によって形成され、紫外線や青色光を吸収して緑色光を発する。GFP 中の発色団のチロシル基には A 型および B 型と呼ばれる二種類のプロトン化状態が存在し、両者は熱平衡状態にある。この二つの状態間では、発色団と周辺残基との間の水素結合ネットワークなどの相互作用の様式が異なっている。こうした相互作用中での周辺残基の役割は、これまでに多くの変異体実験によって調べられてきた。しかしながら、従来報告されていた GFP およびその変異体の X 線構造では、発色団周辺の水素原子の有無及び水素結合におけるプロトン供与体と受容体の関係は不明なままであった。

### 2. 研究の目的

タンパク質 X 線結晶構造解析における分解能は、通常は 3~1.5 Å 程度にとどまっている。この程度の分解能ではタンパク質を構成する原子同士は分離できないため、精密化計算の際に原子同士の結合距離や結合角に強い束縛条件を課す必要がある。このように解析された構造だけでは、原子の化学的特性を議論することはできない。一方で、非常に高分解能な X 線回折データを使用した電荷密度解析からは、物性や反応性に関連した外殻電子分布や電荷についての構造情報を実験的に決定することが可能となる。また、中性子線結晶構造解析からは、プロトンを含む全水素原子位置を精度よく決定することが可能である。光応答タンパク質のひとつである GFP では、水素結合ネットワークや電子構造といった通常の X 線結晶構造解析では捉えられない微細な構造が機能理解のために決定的に重要である。そこで、本研究では GFP について超高分解能 X 線電荷密度解析並びに中性子線解析を実施することにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) GFP 変異体の高分解能 X 線解析

野生型 GFP の発色団は A 型と B 型が熱平衡状態にあるが、GFP 変異体のうち T203I 変異体では発色団は A 型として安定化されている。一方、S65T 変異体と E222Q 変異体では発色団は B 型として安定化されている。そこで、これらの変異体を利用することで発色団における構造多形を解消し、A 型と B 型の構造をそれぞれ精度よく解明することを目指した。また、収量向上のために Cycle3 変異 (F99S/M153T/V163A) を導入した。これにより、収量が野生型と比較して約 2 倍になった。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によって 20°C でおこなった。1 µL の沈殿剤溶液 (20 mM Tris-HCl pH 8.5、25 mM MgCl<sub>2</sub>、20~30% PEG4000) と 1 µL のタンパク質溶液 (15 mg/mL GFP) を混合したドロップから、針状結晶クラスターが得られた。得られた微結晶クラスターを破碎して沈殿剤溶液で希釈したものをマイクロシードとして使用した。析出した単結晶をマクロシードとし、35°C で 1.5 ヶ月程度成長させた。結晶を抗凍結剤溶液 (20 mM Tris-HCl pH 8.5、25 mM MgCl<sub>2</sub>、~40% PEG4000) に浸漬した後に 100 K の窒素ガス気流中で瞬間冷却して、回折実験に使用するまで液体窒素中で保存した。

X 線回折実験は大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU および BL44XU において実施した。X 線による影響を受けずに微細な構造を決定するために、極低温のヘリウム気流による冷却をおこないながら X 線回折データを収集し、X 線損傷に伴う発色団における温度因子上昇についての調査もおこなった。得られたデータセットの解析は異方性温度因子を用いてお

こなつた。さらには、光反応中間体の回折データを収集するために、同様の結晶を用いて青色レーザー ( $\lambda=405$  nm、1 mW) を照射しながら回折データの収集をおこなつた。

## (2) 多極子精密化

E222Q 変異体の X 線回折データの分解能は 0.78 Å と非常に高く、電荷密度解析が可能であつた。このため、多極子原子モデル (Multipolar Atomic Model: MAM) を用いた精密化計算をおこなつた。得られた精密な電子密度をもとに、分子内原子 (atoms-in-molecules: AIM) 理論に基づくトポロジー解析を適用して、発色団と周辺残基について水素結合の検出および解離エネルギーの算定をおこなつた。また、非共有相互作用 (NCI) 分析法によって発色団上の弱い相互作用を調べた。

## (3) 完全重水素化 GFP の中性子線解析

中性子線解析では、軽水素による中性子の吸収および非弾性散乱の影響を避けるために重水素化した試料を使用する必要がある。そこで、重水素化によるタンパク質の物性や構造への影響を調査するために、分光学的研究および X 線結晶構造解析をおこなつた。GFP の完全重水素化体の発現および精製をおこない、高純度かつ重水素化率 95% 以上の試料を得た。この試料から作製した結晶について SPring-8 にて回折データの収集をおこない、非重水素化 GFP と遜色ない 0.9 Å 分解能の回折データを得た。さらに、シーディング法を繰り返すことで大型結晶を作製し、大強度陽子加速器施設 J-PARC の茨城県生命物質構造解析装置 (BL03/iBIX) において中性子回折実験をおこなつた。回折実験の際、結晶を窒素気流で 100 K に冷却しながら、37 の結晶方位からの回折データを収集した。また、中性子線回折実験に使用した結晶を用い、SPring-8 のビームライン BL44XU において X 線回折実験をおこなつて 0.88 Å 分解能の超高分解能回折データを収集した。得られた中性子線と X 線の回折データを同時に使用して構造精密化をおこなつた。

## 4. 研究成果

### (1) GFP 変異体の高分解能 X 線解析

発色団近傍に存在する特に X 線の影響を受けやすい 3 つの原子の温度因子の上昇を観測することで、50 K の測定では 100 K の場合の約 40% に、15 K での測定では 100 K の場合の約 20% に、X 線損傷の影響が抑えられることが判明した (図 1A)。T203I、S65T、E222Q 変異体の結晶について、十分に X 線損傷が抑えられた条件下でそれぞれ 0.94 Å、0.85 Å、0.78 Å のデータセットを構築することができた。得られたデータセットの解析をおこなつたところ、構造中ではほぼ全ての水素原子を観察することができた (図 1B)。また、発色団を構成する Tyr66 や Glu222 のプロトン化状態も明瞭に決定することができた。さらには、B 型発色団が安定化されている S65T 変異体では、His148 がプロトン化されていて正電荷を持っていることが判明した。一方、試行した光照射条件では検出に十分な量の光反応中間体の生成が見られないことも判明した。

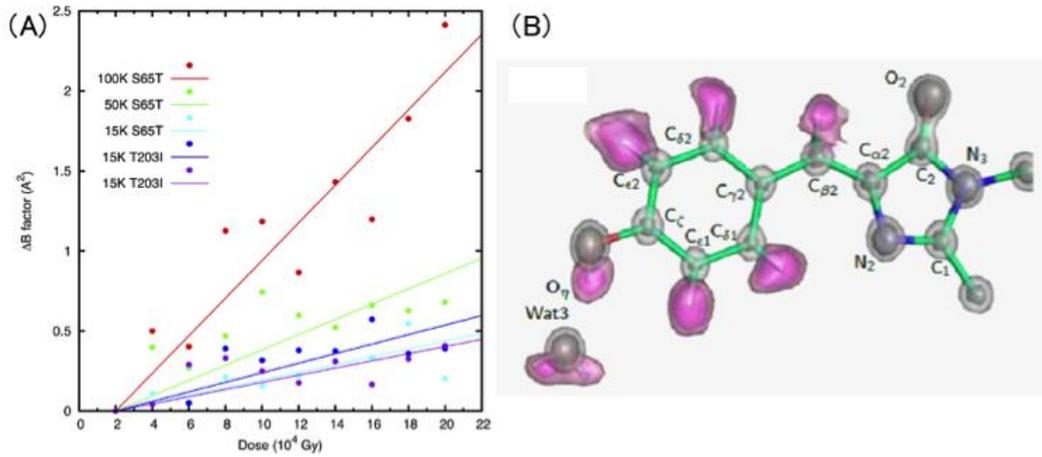


図 1. GFP の高分解能 X 線解析。(A) 測定温度による温度因子の上昇の違い。(B) GFP (T203I 変異体) の電子密度図。この変異体の発色団は A 型のプロトン化状態を持つ。

## (2) 超高分解能電荷密度解析

E222Q 変異体について、AIM 理論に基づくトポロジー解析を適用した結果、発色団と周辺残基について構造式からあらかじめ予想されていた水素結合をすべて検出することができた(図 2A)。また、これらの水素結合について、結合臨界点における電子密度およびその微分量を使用して解離エネルギー $D_e$ を決定することができた(図 2B)。 $O_H$  は Wat3 と His148 への通常の水素結合を形成しており、電子分布に沿って結合経路を描くことが示された。 $O_H$  と Wat 3 の間のより強い相互作用 ( $38 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) は、直線的に整列した孤立電子対と水の H 原子によって実現されている。イミダゾリノン部分の  $O_2$  と Gln94 および Arg96 との相互作用は、 $O_H$  のそれよりもわずかに弱い ( $17$  および  $31 \text{ kJ mol}^{-1}$ )、 $O_2$  との相互作用が Gln94 および Arg96 のペプチド結合を平面から大きく歪ませる原因になっていると推察された。また、 $O_H$  と Tyr145、 $O_2$  と Gln69、およびフェノラート環とイミダゾリノン環との間には非従来型の水素結合 ( $\text{CH}\cdots\text{O/N}$ ) を検出することができた。これらの結合は非常に弱く ( $\sim 5 \text{ kJ mol}^{-1}$ )、容易に解離してしまう程度である。ただし、そのような弱い相互作用であっても、GFP における光誘起電子移動の経路となりうる。2つの環部分間を架橋する非従来型水素結合の  $D_e$  値は  $11 \text{ kJ mol}^{-1}$  であり、2つの環部分の平面性に寄与していることが判明した。

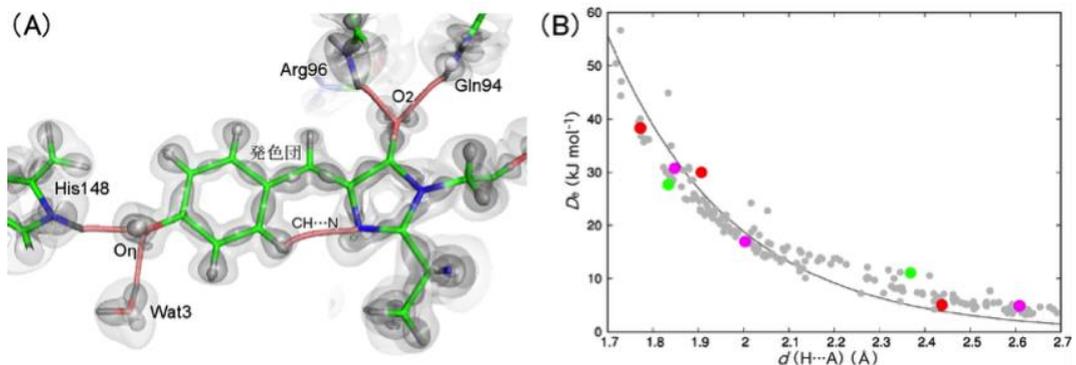


図 2. 電荷密度解析。(A) B 型のプロトン化状態にある発色団を持つ E222Q 変異体における発色団近傍の静的変形マップ。水素結合の結合経路をピンク色の実線で示す。(B) 水素結合の解離エネルギー $D_e$ を水素原子と水素原子受容体間の距離  $d(\text{H}\cdots\text{A})$  に対してプロットしたグラフ。

### (3) 完全重水素化 GFP の中性子線解析

完全重水素化 GFP の結晶について回折実験をおこなった結果、結晶の空間群や格子定数は非重水素化 GFP の結晶とほぼ同じであることがわかった。また、構造精密化の結果、水分子およびタンパク質の重水素化はいずれも GFP の全体構造に影響を与えていないことが明らかになった。しかしながら、ヒスチジン残基のひとつ (His148) におけるプロトン化状態が重水中 (pD 8.5) では軽水中 (pH 8.5) とは異なっていることが確認された。

3000×700×700  $\mu\text{m}^3$  の大型結晶 (図 3A) を使用して、1.8 Å 分解能の中性子線回折データを収集することができた。回折データの  $I/\sigma(I)$  および  $R_{\text{merge}}$  は全分解能範囲 (30~1.80 Å) に対して 2.6 および 35.2%、最外殻 (1.86~1.80 Å) に対して 1.0 および 61.2% であった。中性子線と X 線の同時解析の結果、発色団を構成するアミノ酸残基のひとつである Tyr66 が解離している様子や (図 3B)、発色団に隣接して存在する Glu222 に重水素イオンが結合して中性化されている様子を明瞭に観察することができた (図 3C)。さらには、タンパク質内部のほぼ全ての水分子の水素原子を観察することができたため、水分子の配向に関する知見を得ることができた。

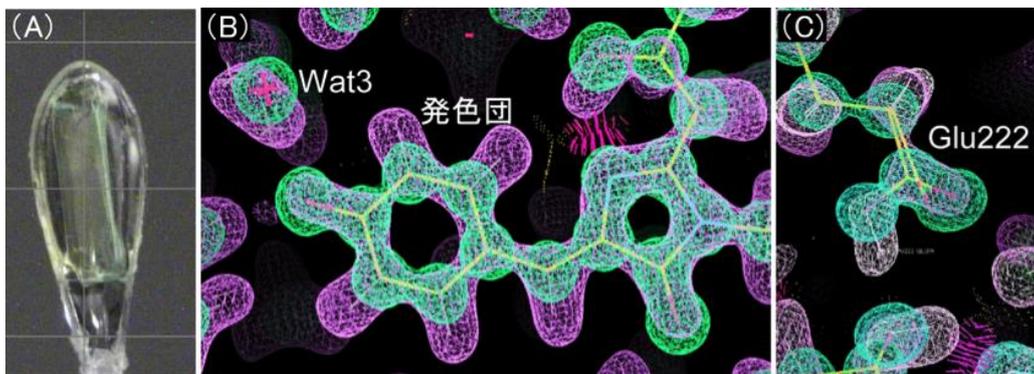


図 3. GFP の中性子線解析。(A) 回折計に取り付けた大型の結晶 (3000×700×700  $\mu\text{m}^3$ )。 (B) 発色団近傍の核密度。(C) Glu222 近傍の核密度。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takaba, K., Tai, Y., Eki, H., Dao, H.A., Hanazono, Y., Hasegawa, K., Miki, K. and Takeda, K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Subatomic resolution X-ray structures of green fluorescent protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUCr J	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S205225251900246X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tai Yang, Takaba Kiyofumi, Hanazono Yuya, Dao Hoang-Anh, Miki Kunio, Takeda Kazuki	4. 巻 75
2. 論文標題 X-ray crystallographic studies on the hydrogen isotope effects of green fluorescent protein at sub- $\mu$ m resolutions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1107/S2059798319014608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 高場圭章、長谷川和也、竹田一旗	4. 巻 62
2. 論文標題 生命科学の飛躍のために一層深まるタンパク質結晶学の役割 - タンパク質の超高分解能電荷密度解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本結晶学会誌	6. 最初と最後の頁 106-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花園祐矢、竹田一旗、平野 優、玉田太郎、日下勝弘、三木邦夫
2. 発表標題 TOF-Laue法中性子線回折データのスケールリング方法の開発
3. 学会等名 日本中性子学会第17回年会（福岡）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 タイ ヨウ、花園祐矢、高場圭章、三木邦夫、竹田一旗
2. 発表標題 完全重水素化GFPのX線結晶構造解析及び中性子線データ測定
3. 学会等名 日本中性子学会第17回年会（福岡）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Dao Hoang Anh, Takaba Kiyofumi, Tai Yang, Hasegawa Nagayuki, Takeda Kazuki
2. 発表標題 Sensitivity to the radiation dose of buried waters in Green Fluorescent Protein
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考