

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20612003

研究課題名(和文) 2つの量子ビームを同時に利用した革新的な水素・水和構造情報獲得への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to obtain the innovative information of hydrogen and hydration with the two kinds quantum beam

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・准教授

研究者番号：10414591

研究成果の概要(和文)：中性子およびX線の回折データを組み合わせて同時に高分子の構造を解析するシステムを導入し、これを J-PARC, MLF に新たに開発した新型回折計で得られる高精度・高分解能データに適応しその有用性を実証した。今後 J-PARC および新型回折計が高度化されれば、タンパク質の機能に深く関わっている水素や水和水の情報を今までに類を見ない精度で獲得できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The crystal structure analysis system by using the both of Neutron and X-ray diffraction data (joint refinement) was established in our laboratory and then we could verified this system with high accurate data obtained from new neutron diffractometer iBIX in J-PARC. We will be able to obtain the innovative information of hydrogen and hydration deeply related to the function of protein when J-PARC power will be increased to 1MW and the diffractometer will be improved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：中性子構造生物学

科研費の分科・細目：量子ビーム科学

キーワード：中性子結晶解析、同時構造解析

1. 研究開始当初の背景

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、生命現象の中で水素原子の果たす役割や生体物質と水との関わりは極めて重要である。また、タンパク質が立体構造形成に際し周囲の環境に適した配置をとることで立体構造の安定化が図られていることから、水素と水和水はタンパク質の立体構造構築原理にも深く関わっていることは明らかである。ゆえに、生命現象を根源的に理解する

ために、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に関する需要が急激に増大している。この水素原子位置や完全な水和構造はX線やNMRでは決定困難であり、多くは骨格構造から水素原子や水分子の配向を類推し、そのふるまいを議論することが多かった。一方、タンパク質やDNA等の全ての水素原子の位置決定を可能にする唯一の実験手法が中性子回折法である。近年、我々のグループが原子力機構3号炉における生物用回折計(BIX-3,4)の開発に成功したことにより、タンパク質内のアルファヘリック

ス中の水素結合の詳細、H/D 交換、水和構造ネットワーク、水和構造ダイナミクス、機能性水素原子等を中性子回折法で直接観察し、大変興味ある結果が提出され、その有意性が実証されてきた。これは非常にユニークなものであり、この分野を世界的にリードしている。しかしながら、関心の高まりつつある産業界の要望には十分応えられず、その一方で生命科学分野における中性子構造生物学の需要も国際的に増大しつつある。そこで現在、茨城県は中性子構造生物学の更なる発展と産業界の要求に応えるべく J-PARC、MLF に TOF 型の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）の開発・建設を進めている。iBIX は茨城大学の我々のグループが中心となって建設し、その後の運用が任せられるもので、従来装置の BIX-3, 4 に比べ、およそ 100 倍以上の測定効率を持つため（3）、タンパク質データ収集の測定時間が、2-3 日で済み、この分野が飛躍的に発展することが見込まれる。これらの新たな線源・新たな装置から得られた高分解能データに対し、より効率のかつ高精度に構造解析可能な新たな次世代構造解析システムの導入が飛躍的に向上した構造情報を取得するために必要となってくる。

今まで高分子の中性子回折実験は巨大結晶の必要性、単位格子体積に対する制限、最大数ヶ月を必要とする測定時間等の理由で、決して利用しやすいものではなく、そのため中性子-X 線同時構造解析の手法は高分子回折データに対して適応が進んでいないのが現状である。次世代の新型回折計の整備に伴い、より詳細な水素・水和構造情報提供の要求が高まることは必至であり、高分子回折データ用の中性子-X 線同時構造解析システムの導入・整備が急がれる。

2. 研究の目的

現在、日本および U. S. A. において次世代パルス中性子源（J-PARC 物質生命実験施設（MLF）、日本、および Spallation Neutron Source (SNS)、U. S. A.）の建設が進められており、これに伴い、それぞれの中性子源で生体高分子用単結晶中性子回折計の設置が計画もしくは進行中である。日本においては我々のグループが代表となって建設を行っている茨城県生命物質構造解析装置（iBIX）が 2008 年度から供用開始を予定している。この新型回折計は従来の最も高性能な回折計（BIX3, 4, JRR-3, JAEA）では測定が不可能であった格子長（最大 150 Å）の試料が測定対象となると共に、100 倍以上の効率で中性子回折測定が可能となるものである。

本研究課題ではこの新型回折計により飛躍的に高速・高精度・高分解能で取得される中性子回折データと放射光による高分解能 X 線回折データを組み合わせて同時に構造解析を行うためのソフトウェアシステムを導入する。この中性子-X 線同時構造解析は中性

子構造解析の得意とする水素・水和構造の決定と X 線構造解析の得意とする分子の骨格構造の決定という互いの有意性を組み合わせることで解析精度を高めることができ、相乗効果による付加構造情報の取得が可能となる手法である。構造精密化に用いる独立なデータ量が増加することで水素原子以外の原子位置・熱振動情報の精度が向上し、結果として水素原子の位置・熱振動情報の精度向上も期待できる。これにより、化学結合に預かる結合電子状態の分離や水素結合におけるアクセプタの電子の結合への寄与の度合いを知ることも等が可能となる。さらに、次世代パルス中性子回折計により得られた生体高分子の高精度・高分解能データをこの解析法に適用することにより、今までに類を見ない革新的な水素・水和構造情報の獲得を目指す。特に医薬品や DNA の分子認識に関与する水和水の水素結合ネットワークの詳細説明等、水素・水和構造の情報取得量および取得精度の両面において革新的なレベルの達成を図る。実際にはシステムの導入に加え、実測データを用いたシステムの検証とその有意性の実証を行う。

3. 研究の方法

現在、いくつかの高分子用単結晶構造解析ソフトウェアシステムが開発・公開されており、タンパク質分子の初期位相の決定から、立体構造精密化までルーチンワーク的に進めることが可能なユーザーフレンドリーなシステムとして整備されている。今後、次世代新型回折計の登場により飛躍的に増える中性子構造解析のニーズに答えるため、中性子-X 線同時構造解析が簡便に行えるシステムを導入する。生体高分子の構造精密化に特有の手法として、1) 剛体近似精密化：分子全体を剛体と見なし、単位法内の位置と方位を精密化し、精密化の初期段階で収斂を図る。2) 立体化学的制限付き最小自乗法による精密化：膨大な生体高分子の原子パラメータを制限を設けることにより効果的に減少させる。3) エネルギー精密化：結合の伸縮、結合角の湾曲、ねじれ角のポテンシャル、van der Waals 相互作用に関する項を含むポテンシャルエネルギー関数とともに構造因子の残差の二乗和を最小にする。4) 分子動力学法：構造モデルが最小自乗法の真の最小点に到達せず、局所極小点に留まることを避ける、等の方法が挙げられる。これらの最新の数学的手法を駆使したシステムを導入・整備する。

その他、データ測定・データ処理・構造解析の一連の流れの効率化を図るために、iBIX のデータ処理システムと構造解析システム間でのデータのやり取りをスムーズに行えるように、データフォーマットの共通化・データ読込支援環境の整備等を行う。また、中性子解析、X 線解析、同時構造解析の解析結果を容易に比較・評価が可能な解析結果出力

環境を整える。

さらに、導入・整備した同時構造解析システムの動作検証およびその評価を含めて、実際の高分子結晶（リボヌクレアーゼ A）の放射光を用いた高分解能 X 線回折データおよび iBIX を用いた高分解能中性子回折データの測定を行い、これを導入したシステムに適應する。X 線回折データのみ・中性子回折データのみ・両データを用いた同時構造解析法で精密化した構造モデルを比較し、水素原子の原子密度マップにおける情報量を評価する。

4. 研究成果

まず始めに、高分解能・高精度に測定された回折データを同時に利用し、革新的な水素・水和構造情報の獲得を目指して、ユーザーフレンドリーな中性子-X 線同時構造解析ソフトウェアシステムの導入を進めた。本解析システムを導入し、十分な処理速度が実現可能な計算機を導入・整備した。本計算機に次世代新型回折計の登場により飛躍的に増える中性子構造解析のニーズに答えることが可能な中性子-X 線同時構造解析ソフトウェアシステムを導入すると共に本ソフトウェアの動作に必要なコンポーネントを合わせて導入した。X 線回折データのみ・中性子回折データのみ・両データを用いた同時構造解析法の 3 つの構造精密化コンポーネントについてこれが正しく動作することをテストデータを用いることにより正しい構造を導きだしているかどうか精度を含めて検証を行った。BIX-4 (JRR-3) を用いてすでに測定されているリボヌクレアーゼ A の中性子回折強度データを用いて構造精密化を実施したところ得られた構造は既知の構造と一致しており、導入したシステムに問題が無いことが実証された。

次に実際の測定データを適應するために標準試料として結晶化のし易さや構造の安定性を考慮してタンパク質リボヌクレアーゼ A を選定した(アミノ酸残基数:124、格子定数: $a=30.4 \text{ \AA}$, $b=38.6 \text{ \AA}$, $c=53.4 \text{ \AA}$, $\beta=105.8^\circ$)。実験室系の X 線回折計によるデータ測定を基に十分な分解能と結晶性を持つ試料の結晶化条件を検索し、最も良い条件で結晶化を試みた。iBIX の現在の出力で測定が可能な大きさである $3\sim 5\text{mm}^3$ の大型結晶を数個作成することに成功した (図 1)。これらを高分子結晶にダメージを与えることのない中性子を用いた実験から開始するために、重水中に 2 週間程度浸し、重水置換を行った。導入した解析システムにより次世代の新型回折計による高精度データを処理することによりより高精度な構造情報の獲得が可能であることを実証するため J-PARC, MLF に我々茨城大学が開発・維持管理を行っている iBIX を用いてリボヌクレアーゼ A 結晶の中性子構造解析が可能なパルス中性子回

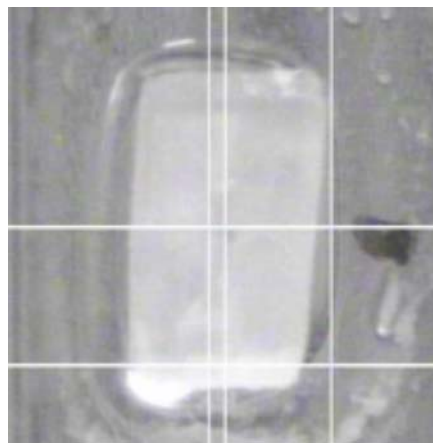


図 1 リボヌクレアーゼ A 単結晶試料

折データのフルデータ測定を実施した(結晶体積: 4.7mm^3 、検出器台数 14 台、加速器出力 120kW 、総測定日数 15.7 日)。TOF 回折データの例を図 2 に示す。

iBIX 用に開発されたデータ処理ソフトウェア“STARGazer”を用いて処理を行い、11787 の独立反射について積分強度を得た(分解能: 1.7 \AA 、収率: 88.8%)。さらに KEK の放射光施設 PF の BL05 において、iBIX で中性子回折データを測定した試料を用いて、X 線回折データセットを測定した。ビームラインに準備されているデータ処理ソフトウェア HKL2000 により回折データから積分強度データ (HKLF) を得た。

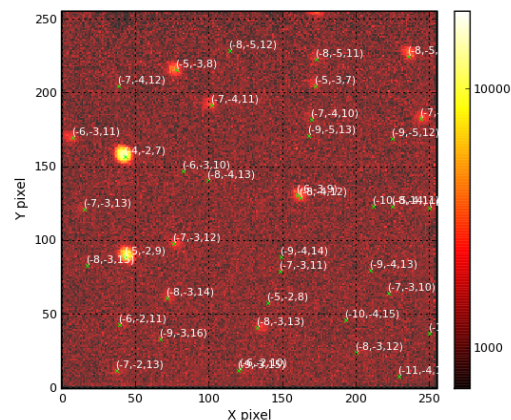


図 2 リボヌクレアーゼ A の TOF 回折データの例

これらの積分強度データを用いて導入した解析システムの構造解析コンポーネントによりタンパク質の水素および重水素原子およびこれに含まれる水分子の水素の原子位置パラメータを含む精密化を試みた。剛体近似精密化、立体化学的制限付き最小自乗法、分子動力学法コンポーネントにより構造精密化を随時行いこれに成功した。結果として、 $R_{\text{cryst}}=23.9\%$ ($R_{\text{free}}=28.2\%$) が得られた。構造

モデル既知構造のものと比較した結果、妥当な構造が得られていることが分かった。さらにタンパク質内の水素原子および置換された重水素原子、タンパク質分子と相互作用している重水分子を多数中性子各密度長マップ内に観測することに成功した(図3)。現状の iBIX による中性子回折データと新たに導入した解析システムにおいて十分な水素および水和構造の情報量を得られることが実証された。

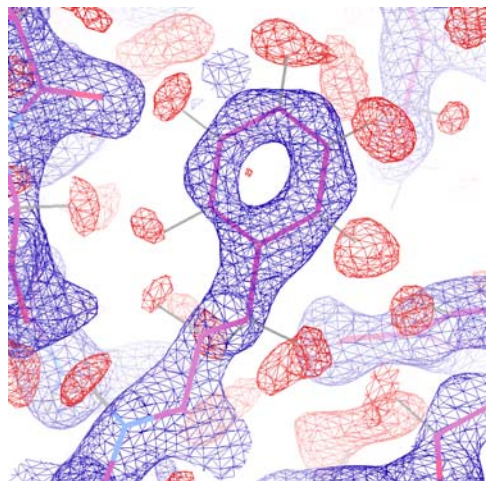


図3 得られたリボヌクレアーゼ A の中性子核散乱長密度マップの例

さらに J-PARC は数年後に加速器出力が 1MW に増強され、iBIX の検出器台数も 30 台に増強されることが決定している。これは本試料については結晶サイズ 1mm³ の試料について 3 日程度で妥当な構造情報が得られるフルデータの測定が可能であることを示しており、現在のデータ処理ソフトの改良により、さらに積分強度データの精度向上が期待できる。よってフルパワーとなった iBIX を用いてより高精度な中性子回折データを測定することができれば、導入した解析システムとの組み合わせで今までに類を見ない革新的な水素・水和構造情報の獲得することが期待できる結果が得られた。特に医薬品や DNA の分子認識に關与する水和水の水素結合ネットワークの詳細解明等、水素・水和構造の情報取得量および取得精度の両面において革新的なレベルの達成が期待できることを実証することが出来た。

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 3 件)

- ① 目下 勝弘, The first neutron structure analysis of biological macromolecule with IBARAKI Biological Crystal Diffractometer -iBIX- in J-PARC, AsCA 2010, 2010 年 11 月 1 日, Pusan, KOREA

- ② 目下 勝弘, Several Examples of Neutron Diffraction Data from IBARAKI Biological Crystal Diffractometer iBIX, Neutron in Biology, 2009 年 10 月 27 日, Santa Fe, USA
- ③ 目下 勝弘, IBARAKI Biological Crystal Diffractometer (iBIX) in J-PARC -Optimization of Design Parameters-, Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 2008 年 8 月 24 日, Osaka, JAPAN

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目下 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・准教授
研究者番号：10414591

(2) 研究分担者

田中 伊知朗 (TANAKA ICHIRO)
茨城大学・工学部・准教授
研究者番号：20354889