

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20612002

研究課題名(和文) 新型パルス中性子回折計を利用した次世代構造生物学

研究課題名(英文) The next generation structural biology using a new pulsed-neutron diffractometer

## 研究代表者

田中 伊知朗 (TANAKA ICHIRO)

茨城大学・工学部・准教授

研究者番号：20354889

研究成果の概要(和文)：J-PARCの次世代中性子源において、新型生体高分子用回折計(iBIX)が完成し、2008年末より稼働が始まった。様々な調整の後、初めてのタンパク質として、リボヌクレアーゼAの測定が、加速器出力120kW、体積約5mm<sup>3</sup>で10日余りでデータ収集できた。構造解析の結果、目的の水素位置および水の向きまで確認できたことから、1mm<sup>3</sup>の結晶があれば、J-PARCが1MW、検出器が予定の30台に整備されたときには3日程度で測定が完了できることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：A new diffractometer for protein crystallography (iBIX) at the next generation pulsed-neutron source at J-PARC, has been completed and operational since the end of 2008. After various commissionings, data collection of ribonuclease A could be done at the accelerator power of 120kW for a crystal of 5 mm<sup>3</sup> in volume for about 10 days as the first protein sample at iBIX. As a result of structural analysis, hydrogen position and orientation of waters for a purpose could be confirmed. According to the result, it turned out that it is possible to collect a full data set of a protein in about 3 days for a crystal of 1 mm<sup>3</sup> in volume when J-PARC accelerator power becomes 1MW and 30 detectors of iBIX are provided as a total as scheduled.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：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：J-PARC、生体高分子用中性子回折計(iBIX)、中性子結晶解析、水素、水素結合、タンパク質、水和水

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質やDNA等の生体高分子は、立体構造を形成して初めて機能を発揮する。また、生理機能に関わるほとんどの反応にタンパク質や基質の水素原子や水和水が直接関

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大変重要である。中性子回折法はタンパク質やDNA等のすべての水素原子位置を決定出来る唯一の実験手法で

あり、すでに世界最高性能の生体物質中性子回折計を原子力機構（JAEA）の JRR-3 に設置し、いくつかの生体高分子の原子レベル立体構造解析が可能となっている。最近、JAEA 内の J-PARC に生体高分子用中性子回折計（iBIX）が我々のチームによって建設中で、2008 年に予定されている。この装置の性能は、従来の JRR-3 の装置に比べ、およそ 100 倍以上の測定効率を持つため、この分野が飛躍的に発展する可能性が高い。

## 2. 研究の目的

J-PARC 物質生命実験施設（MLF）において、現在我々のグループが代表となって建設している生体高分子用中性子回折計（iBIX）が 2008 年度供用開始となる予定である。この新回折計は、従来のもっとも高性能な装置よりも 100 倍以上も測定効率がよいため（MLF 1 MW 時）、2010 年ごろよりかなりの測定スピードで中性子回折測定が可能となる。そこで、既存の中性子装置で測定を進めてインスリン、トリプシンなどの水素位置のデータを増やす一方、iBIX にてリボヌクレアーゼ A など標準タンパク質をきちんと評価した後、中性子では初めてのタンパク質も含め、水素・水和構造を決定し、これまで得られた生体高分子の中性子解析結果等も使用しながら、プロトン化や水素結合の解析を行う。これらの情報を基に、生体高分子の構造安定性や分子認識、構造機能相関といった重要なテーマに対して、水素や水を考慮に入れた新しい構造生物学的体系を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 結晶育成および中性子実験準備

- ①牛すい臓トリプシンは、天然阻害タンパク質の BPTI（牛すい臓トリプシン阻害剤）を基質として与え、複合体しての大型結晶育成を試みた。X 線による結晶品質評価により最適な育成条件を見つけ、中性子回折実験を行う準備を進めた。
- ②ブタインスリン、牛すい臓リボヌクレアーゼ A（RNaseA）は、目的の pH での大型結晶育成条件が分かっているので、それにしたがって結晶育成し、中性子結晶構造解析を試みた。JRR-3 既存の中性子装置だけでなく、J-PARC の iBIX での測定もどちらかは試す準備を進めた。
- ③その他のタンパク質（抗凍結タンパク質 AFP、トロンビン、チトクローム c など）は大型結晶育成のための結晶化相図を作成し、X 線による結晶品質評価結果を援用しながら、条件を大型結晶育成のための条件を絞り込んだ。

### (2) 中性子測定および解析

十分に大きく成長した結晶（目標体積数  $\text{mm}^3$  以上）を重水および目的 pH 溶液にソーキン

グさせ、JRR-3 の BIX-3 または BIX-4 で十分な分解能が観測されることを確認したのち、中性子回折像を収集した。iBIX が使用可能な状態であれば iBIX を積極的に使用した。

### (3) データベース解析

すでにいくつかのタンパク質中性子解析データが、既存のプロテインデータバンク（PDB）に登録されているが、解析が終了したデータは PDB に登録し、合わせて、生体水素水和水データベース（HHDB;

<http://hhdb.jaea.go.jp/hx2/ja/index.htm>）にも登録する予定だったが、2008 年度から現在に至って、上記データベースは仕様が変わったため、茨城大学にある昔の仕様で動く単独データベースをアップデートして今回は使用した。これまでの直線状の水素結合の有無や  $\beta$  ターン部分でとりやすい構造と水素結合の関係、さらに、水和水やプロトネーションの特徴について、統計的な考察を進め、構造生物学的な理解を深めた。

## 4. 研究成果

抗凍結タンパク質（AFP）はフランスのグループから入手して、大型結晶育成のための結晶化相図作成を行った。チトクローム c についても同様に結晶化相図が完成した。

ブタインスリンについては pD6.6 の構造解析が成功し、先に解かれている pD9.0 との比較から、単独アミノ酸の pK 値によらないプロトネーションとそれを安定化させる水の存在が明らかになった（図 1）。

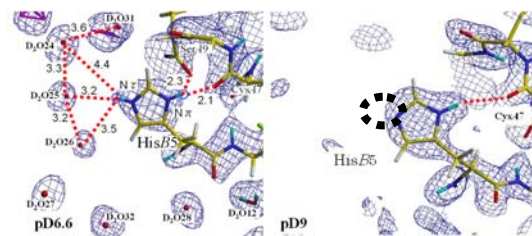


図 1 立方晶ブタインスリンのプロトネーション pD 依存性（左が pD6.6, 右が pD9.0）。ヒスチジン側鎖の pK 値付近の pD6.6 でもしっかりとプロトネーションしていた。

もうひとつのブタインスリン晶系で、亜鉛が配位したすい臓貯蔵型の 6 量体の結晶構造解析にも成功した。6 量体中心部の水素結合ネットワークや水の運動性まで含めた配位の様子、さらには、亜鉛とグルタミン酸との電荷バランスについてもプロトネーションの解析を行うことで明らかになった（図 2）。

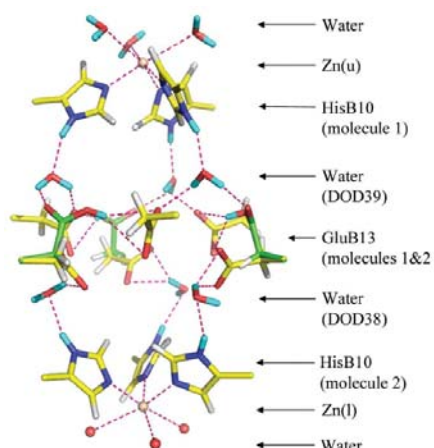


図2 亜鉛配位型ブタインスリン6量体中心部の水素結合ネットワークの様子

すい臓トリプシンは、阻害剤 BPTI との複合体として大型結晶育成を行い、iBIX でのテスト実験および JRR-3 での本格中性子測定を行い、2.0 Å 分解能データが収集完了した。活性部位の水素原子の移動の様子が観測され、酵素反応が何らかの形で進んでいることを示す非常に貴重なデータを示すことができた (図 3)。このほか、H/D 水素の置換率の考察から、これまで観測されなかった水の侵入と酵素反応進行の可能性が示唆できたこと、BPTI は水を介して強固にトリプシンに結合しているのを、阻害剤として働きやすいという重要な考察を導くに至った。

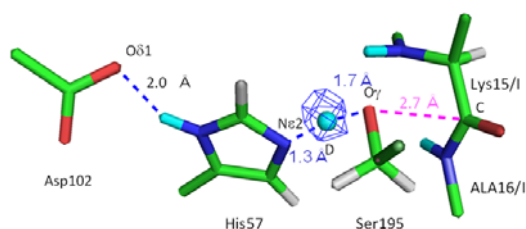


図3 トリプシンと BPTI 複合体の活性部位の特殊な水素結合

牛すい臓 RNaseA については、JRR-3 の従来装置による構造解析が進行でき、完成部位のヒスチジン残基の触媒機構が、水素原子の占有率の違いからプロトネーションの仕方が異なることで説明できることを確認できた。

このほか、トロンビンとその複合体、および *Achromobacter protease I* (API) タンパク質などのセリンプロテアーゼの中性子結晶構造解析も JRR-3 従来型装置で測定完了し、X 線の相補的な解析データとともに構造解析が進められて

いる。

2008 年末、生体高分子用中性子回折計 (iBIX) が完成した (図 4)。先の RNaseA 結晶は、J-PARC が 20kW の低出力運転にもかかわらず、この時の iBIX にて 1.5 Å 付近の反射が確認され、従来の JRR-3 の装置と同程度の分解能を得ることに成功した。

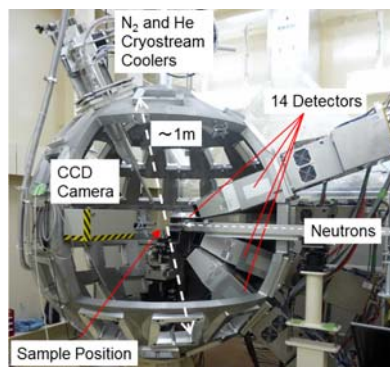


図4 茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX)

その後、J-PARC 物質生命実験施設 (MLF) において我々のグループが建設した生体高分子用中性子回折計 (iBIX) は、2009 年度においては 3 つの有機化合物の全データ測定から、初期の構造解析に成功した。約 80 Å の比較的長めの格子長を持つリゾチームタンパク質によるテスト測定からそのデータ処理にも成功した。2010 年 5 月には、すでに JRR-3 の従来型装置で測定されている RNaseA を標準タンパク質として、iBIX で初めてのタンパク質フルデータ測定として開始された。体積約 5mm<sup>3</sup> で 10 日余の測定で水素位置および水の向きまで確認できた (図 5)。この結果から、1mm<sup>3</sup> の試料結晶体積があれば、J-PARC が 1MW になったときには 3 日程度で測定が完了できるという予想が正しいことが確認できた。

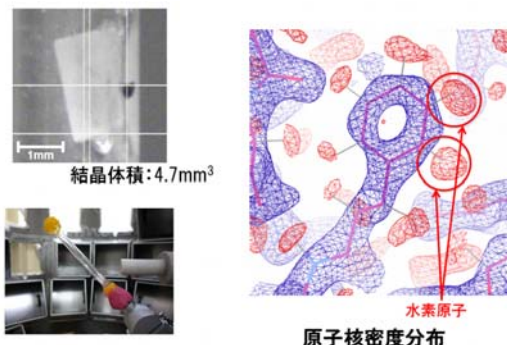


図5 J-PARC iBIX による RNaseA の実験と結果; 結晶 (左上)、回折計へのセット (左下) および解析結果 (右)

このあと J-PARC の出力が徐々に上昇し、

120kW から 220kW になったが、その間、アミロイド病因タンパク質(結晶体積約 2.5 nm<sup>3</sup>)、ヘモグロビンタンパク質(1 辺の格子長約 200 Å) などの中性子では新規タンパク質のフルデータ測定にも成功し、現在解析を進めている。これらは、結晶の大きさ、結晶格子の大きさともに、従来型の中性子装置では測定が困難と思われるクラスにあたり、その測定に成功したことで、新型中性子装置 iBIX の高性能ぶりが確認できたといえる。

さらに、これまで得られた生体高分子の中性子解析結果から、タンパク質におけるヒスチジンのプロトネーションや水和水の水素結合の性質や特徴を統計的に調べることで、タンパク質がいかに巧妙に、分子レベルで機能しているかの知見を得ることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

- ① K. Kawamura, I. Tanaka 他 6 名, X-ray and neutron protein crystallographic analysis of the trypsin-BPTI complex, *Acta Cryst D*, 査読有, vol. 67, 2011, 140-148
- ② 田中伊知朗 他 17 名, 茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) による水素・水和水の構造研究/産業利用, *RADIOISOTOPES*, 査読有, 60 巻, 2011, 89-97
- ③ 田中伊知朗 他 5 名, 供用を開始した J-PARC の新しい生物用中性子回折装置 (iBIX), *薬学雑誌*, 査読有, 130 巻, 2010, 665-670
- ④ I. Tanaka 他 9 名, Neutron Structure Analysis by IBARAKI Biological Crystal Diffractometer (iBIX) in J-PARC, *Acta Cryst D*, 査読有, vol. 66, 2010, 1194-1197
- ⑤ 田中伊知朗、目下勝弘 他 4 名, BL03 茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX), *日本中性子科学会誌「波紋」*, 査読有, 20 巻, 2010, 16-20
- ⑥ D. Yagi, T. Yamada, I. Tanaka 他 6 名, A neutron crystallographic analysis of a 'phosphate-free' ribonuclease A at 1.7 Å resolution, *Acta Cryst D*, 査読有, vol. 65, 2009, 892-899
- ⑦ W. Iwai, T. Yamada, I. Tanaka 他 7 名, A neutron crystallographic analysis of T6 porcine insulin at a 2.1 Å resolution, *Acta Cryst D*, 査読有, vol. 65, 2009, 1042-1050
- ⑧ 田中伊知朗, 生物用単結晶構造解析装置, *日本金属学会誌「まてりあ」*, 査読有, 48 巻, 2009, 369-371
- ⑨ Atsushi Yamaguchi, Ichiro Tanaka 他 2 名, Methyl group conformation and hydrogen bonds in proteins determined by neutron protein crystallography, *Nucl. Instr. Meth. A*, 査読有, vol. 600, 2009, 275-278
- ⑩ Ichiro Tanaka 他 7 名, Overview of a New Biological Neutron Diffractometer (iBIX) in J-PARC, *Nucl. Instr. Meth. A*, 査読有,

vol. 600, 2009, 161-163

- ⑪ Wakari Iwai, Ichiro Tanaka 他 4 名, Crystallization and evaluation of hen egg-white lysozyme crystals for protein pH titration in the crystalline state, *Journal of Synchrotron Radiation*, 査読有, vol. 15, 2008, 312-315
- ⑫ S. C. M. Teixeira, I. Tanaka 他 54 名, New sources and instrumentation for neutrons in biology, *Chemical Physics*, 査読有, vol. 345, 2008, 133-151
- ⑬ Takuya Ishikawa, Ichiro Tanaka 他 5 名, A neutron crystallographic analysis of a cubic porcine insulin at pD6.6, *Chemical Physics*, 査読有, vol. 345, 2008, 152-158

〔学会発表〕(計 49 件)

- ① 目下勝弘, リボヌクレアーゼ A の構造解析, 第 2 回 ML F シンポジウム, 2011. 1. 17 (招待講演), 高エネルギー加速器研究機構 KEK (茨城県つくば市)
- ② 目下勝弘, 茨城県生命物質構造解析装置 iBIX による初タンパク質構造解析, 日本中性子科学会 第 10 回年会, 2010. 12. 9 (招待講演), 東北大学 (宮城県仙台市)
- ③ 目下勝弘, J-PARC 茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) による初のタンパク質中性子構造解析, 平成 22 年度日本結晶学会年会, 2010. 12. 3, (招待講演), 大阪大学 (大阪府吹田市)
- ④ I. Tanaka, Neutrons in diffraction structural biology making the best use of neutrons, 3rd International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB2010), 2010. 5. 28 (招待 (基調) 講演), パリ第 11 大学 (Orsay, France)
- ⑤ 田中伊知朗, 茨城県生命物質構造解析装置 iBIX の概要 2009, 日本中性子科学会第 9 回年会, 2009. 12. 10 (招待講演), 茨城県東海村
- ⑥ I. Tanaka, Overview of IBARAKI Biological Crystal Diffractometer (iBIX), *Neutrons in Biology 2009*, 2009. 10. 26 (invited), Santa Fe, NM, USA
- ⑦ I. Tanaka, Initial Neutron Protein Diffraction Results at iBIX in J-PARC, *International Conference on Neutron Scattering 2009*, 2009. 5. 5 (invited), Knoxville, TN, USA
- ⑧ 田中伊知朗, 供用開始に際した J-PARC の新しい生物用中性子回折装置 (iBIX), 日本薬学会 第 129 年会 (招待講演), 2009 年 3 月 27 日, 京都市
- ⑨ Ichiro Tanaka, Introduction of a New Neutron Diffractometer Installed at J-PARC, *ATI international Forum 2009*, 2009 年 3 月 10 日, 茨城県東海村
- ⑩ Yagi, D., Yamada, T., A Neutron

Crystallographic Analysis of a Bovine Ribonuclease A at 1.4 Å Resolution, ASIA SCIENCE SEMINAR ON "Frontier Science at High-Intensity Proton Accelerators", 2008年10月27日, Beijing, China

⑪ I. Tanaka, A new biological neutron diffractometer (iBIX) in J-PARC, IUCr2008 Osaka (poster) [Acta Cryst. A64, (2008) C184], 2008年8月28-9日, 大阪市

⑫ Tanaka, I., Outline of a New Biological Neutron Diffractometer (iBIX) in J-PARC, IUCr2008 Osaka, Satellite Meeting in Tokai, Ibaraki, Symposium on Neutron Protein Crystallography (NPC), 2008年8月21日, 東海村

[図書] (計1件)

① N. Niimura and A. Podjarny, Oxford University Press, Neutron Protein Crystallography: Hydrogen, Protons, and Hydration in Bio-macromolecules, 2011, 233

[その他]

ホームページ:

<http://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/7/0000696/profile.html>

[http://www.fas.ibaraki.ac.jp/?page\\_id=103](http://www.fas.ibaraki.ac.jp/?page_id=103)

<http://nsb.mat.ibaraki.ac.jp/index.html>

プレス発表:  
茨城県、茨城大学、日本原子力研究開発機構、J-PARC センター、茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) においてタンパク質結晶の構造解析に成功、茨城県政記者クラブにてプレス発表、2010年10月13日、茨城県庁、茨城県水戸市

2010年10月14日 日本経済新聞、茨城新聞、読売新聞の3新聞に10/13プレス発表内容が掲載

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 伊知朗 (TANAKA ICHIRO)

茨城大学・工学部・准教授

研究者番号: 20354889

### (2) 研究分担者

友寄 克亮 (TOMOYORI TOSHIKATSU)

茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・産学官連携研究員

研究者番号: 10455909

山田 太郎 (YAMADA TARO)

茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・助教

研究者番号: 40455910

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

大西 裕季 (OHNISHI YUUKI)

茨城大学・工学部・産学官連携研究員

研究者番号: 50455911

### (3) 連携研究者

新村 信雄 (NIIMURA NOBUO)

茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・特任教授

研究者番号: 50004453