

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20710050
 研究課題名（和文） 複合的解析に基づくタンパク質の放射線損傷メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Mechanism of Radiation damage of protein structure studied by X-ray diffraction and UV-Visible spectroscopy.
 研究代表者
 清水 伸隆 (SHIMIZU NOBUTAKA)
 財団法人 高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門 研究員
 研究者番号：20450934

研究成果の概要（和文）：タンパク質 X 線結晶構造解析において深刻な問題となる X 線によるタンパク質の放射線損傷現象を解析する為に、結晶試料を測定可能な紫外可視分光光度計を開発し、その制御系の改変によって測定の高速度を実現した。この分光光度計を利用して X 線損傷による紫外波長領域での吸収スペクトル変化を世界で初めて観測し、タンパク質分子の損傷による変化を同定した。さらに、放射線損傷の効果が結晶を 100K の低温で測定する為に必要な抗凍結溶剤の種類によって異なることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Radiation damage is the serious problem to obtain a accurate protein structure studied by X-ray crystallography. I had developed the UV-Visible spectrophotometer for a protein crystal to analyze the mechanism of radiation damage. In this study, the speed-up of measurement speed was achieved by modifying the control system of this spectrophotometer. The absorption spectrum change in UV region (250-350nm) due to X-ray damage was observed for the first time in the world, and the change of protein molecule was identified on the spectrum. It was also suggested that the effect of radiation damage depends on the kind of the cryo-protectant molecule for measuring at 100K.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：損傷、X 線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生命を構築し、その生命活動を行う為の基本要素である。各々のタンパク

質は固有の立体構造を持ち、その形は発現する機能に直結している。従って、各タンパク質の機能を理解する為には、そのタンパク質

の立体構造を明らかにする必要がある。放射光源を利用した X 線結晶構造解析法は、タンパク質の立体構造を原子レベルで明らかにする為の最も強力な手法である。しかし、結晶試料に高輝度 X 線を照射させると結晶中のタンパク質は放射線により損傷を受ける為、正確な構造を理解することが出来ない。結晶が放射線損傷を受けると、解析をしても正確な構造が得られないだけでなく、解析自体にも失敗する場合も多い。また、損傷によって生じた変化によって本来の構造状態を正確に議論することが不可能となる。放射線損傷は、結晶に入射した X 線光子と結晶中の電子との相互作用（干渉性散乱、非干渉性散乱、光電効果）によって生じていると考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかになっておらず、生命現象を理解する上で大きな妨げとなっている。

2. 研究の目的

放射線損傷のメカニズムを理解する為には、X 線照射で生じる変化を詳細に解析する必要がある。しかしながら、X 線回折実験中に試料が受けた放射線損傷を得られた回折イメージを基にアミノ酸レベルで理解することは不可能であり、損傷による効果を X 線回折実験とは別の手法でモニターする必要がある。結晶中であるかに関わらず、試料中のタンパク質の状態を知るための手法として、紫外可視分光法が挙げられる。タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸は基本的に紫外領域（100~300nm）の光を吸収する性質を持っている。その中でも芳香族アミノ酸であるトリプトファンとチロシンは、他のアミノ酸が 250nm より短波長領域に吸収を持つものに対して 280nm 付近に吸収極大を持つことが知られている。そこで、本研究では紫外可視分光法を利用して、X 線回折データ収集中に結晶中のタンパク質が受けた損傷の効果を紫外可視吸収スペクトル測定によって観測する。特に、300nm 以下の波長領域で生じるこれらのアミノ酸由来の変化を同定し、結晶構造解析で得られる電子密度変化と対応させて議論することを目指した。

3. 研究の方法

紫外可視吸収スペクトル測定と X 線回折データ収集を交互に実施し、各段階でのスペクトル変化と電子密度変化を評価する。X 線照射条件と試料の特性から吸収線量を計算し、放射線損傷によってタンパク質に生じた変化を吸収線量に基づいて定量的に議論することが可能となる。なお、両測定共に試料は 100K に冷却された低温窒素気流中にて凍結されており、結晶中に含まれる水分子から氷が生成するのを防ぐ目的でグリセロールな

どを抗凍結剤として添加している。

4. 研究成果

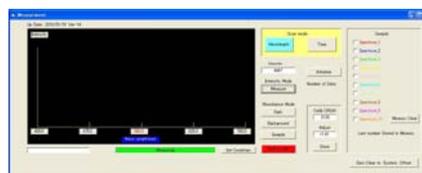
①紫外可視分光光度計の高度化

本件で使用する紫外可視分光光度計（図 1）は SPring-8 の構造生物学ビームライン BL38B1 の X 線回折定盤上に設置可能なように開発されている。しかし、本分光光度計は



（図 1）

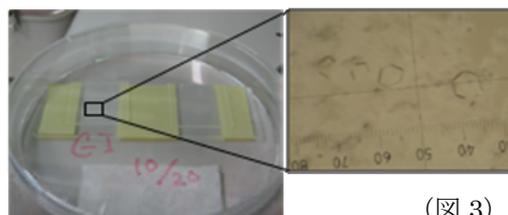
分光器のパルスモーターのステップ駆動に合わせて出力された光電流値を読み取る機構であったため測定スピードが遅く、X 線回折実験と吸収スペクトル測定を交互に行う為には実験効率に大きな問題があった。それを解消するために、測定ソフトウェアと制御系の高度化を行い、微小電流計からの電圧信号とモーターからのトリガパルスを同期させる機構を開発した（図 2）。その結果、これまでは 500~250nm までの波長スキャンに約 7 分要していたが、それを 35 秒で実施可能となった。



（図 2）

②分光測定に適した形状の結晶作成法開発

結晶状態ではタンパク質は非常に高濃度である為、その光学密度を下げる必要がある。そこで、シリコンコートされたスライドガラスに結晶化溶液を滴下した上から同じくシリコンコートされたカバーガラスで蓋をし、そのガラス間で結晶化を行った。なお、スペーサーとして厚み 0.02mm のテープを使用し、結晶の厚みを制御した。

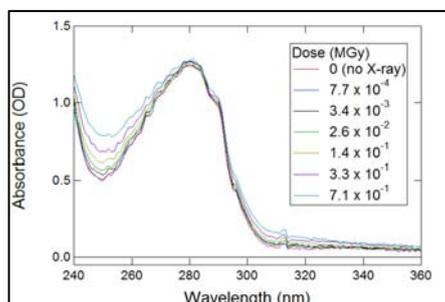


（図 3）

その結果、試料として利用した酵素タンパク質グルコースイソメラーゼでは、直径方向では 0.3mm 以上のサイズを持ち、275nm の吸収極大波長で 1.9OD 程度となる平板結晶を作成することに成功した (図 3)。

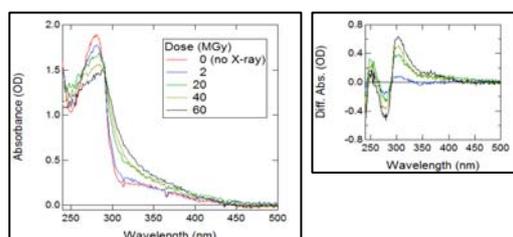
③放射線損傷に伴う紫外波長領域での吸収スペクトル変化及び電子密度変化の観測

グルコースイソメラーゼ結晶を用いて、波長 1.0Å の X 線を段階的に強めながら照射し、吸収スペクトル測定を繰り返し実施した。その結果、 3.4×10^{-3} MGy の X 線照射後から吸光度変化を観測したが、240~360nm の波長範囲全体で吸光度が増加したように見えた (図 4)。



(図 4)

これはすなわち、タンパク質分子だけではなくスペクトルのバックグラウンドとなる溶液に含まれる分子にも放射線損傷による変化があることを示唆していた。そこでタンパク質自体の変化を抽出する為に、結晶無しの溶液試料にも同条件の X 線を照射し、結晶有りの吸収スペクトルとの差を計算した (図 5)。その結果、吸収線量の増加に伴い 279nm の吸光度が減少し、252、305nm の吸光度が増加することが示された。



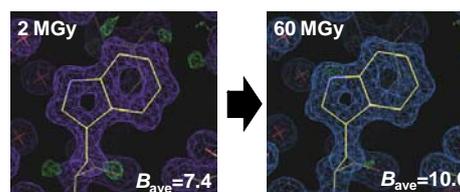
(図 5)

一方、X 線回折データに関しては、吸収線量が増大すると得られる結晶学的統計値、及び分解能等が劣化し、放射線損傷による結晶性の低下を示していた (表 1)。各吸収線量段階での電子密度図を求めた所、タンパク質分子に結合している Mn 原子周辺の電子密度に著しい損傷による変化を観測した。一方、吸収スペクトル上で見られた変化は 280nm 付

Dose (MGy)	2	60
Space Group	I222	
Wavelength (Å)	1.0000	
Cell (Å)	a=92.7, b=97.1, c=102.5	a=92.8, b=97.3, c=102.5
Resolution range (Å)	30.0-1.18 (1.23-1.18)	
R _{merge} (%) (*Outer shell)	4.4 (26.1)	6.4 (95.0)
Average I/ I	47.9 (8.2)	37.6 (2.3)
Wilson B	7.5	11.0
Wilson Scale	359.2	488.8
(Reduction Factor)	1.00	0.73

(表 1)

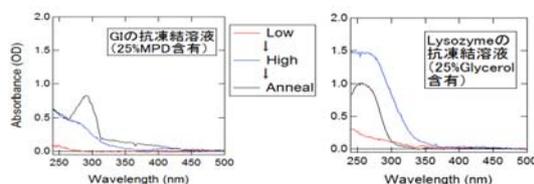
近に吸収を持つチロシンやトリプトファン残基の変化を推測させた。図 6 では一例として 16 番目のトリプトファン残基の電子密度図を示しているが、吸収線量の増加によって水素由来の電子密度が消失していたが、これは得られた分解能が低下したことに起因すると推測された。また、放射線損傷に伴う温度因子 (B factor) の上昇度合いも分子全体の変化とほぼ一致しており (表 1、図 6)、トリプトファン残基特異的な効果も観測できなかった。従って、現状では、これらの残基に関する明確な変化は電子密度上で観測されていないと考える。



(図 6)

④溶媒種に依存した放射線損傷の効果

吸収スペクトルのベースラインとなる溶質分子、特に抗凍結剤として用いている分子の吸収を比較したところ、分子種に応じて放射線損傷による効果が異なることが示された。25%MPD 含有溶液と 25%グリセロール含有溶液に同条件で X 線を照射した所、グリセロールの吸光度変化は MPD の約 2 倍となっていた (図 7)。



(図 7)

さらに、100K で測定した試料を瞬間的に定温まで昇温し再度 100K に瞬間凍結した。その結果、MPD では 291nm に、グリセロール

では 254nm に吸収極大が生成した。これは放射線損傷によって両分子共に異なる構造を持つ分子に変化したことを示している。

本研究によって、放射線損傷に伴うタンパク質試料の紫外領域での吸収スペクトル変化を世界で初めて観測した。特に、ベースとなる溶質分子の変化とタンパク質分子の変化を分離する試みは、得られた差スペクトルが示すとおりに成功したと考えられる。一方、スペクトル変化と電子密度変化を一対一に対応させる試みは、現状では成功していないため、今後は解析方法・評価方法を再検討する必要がある。しかしながら、スペクトル変化は 10^3MGy のオーダーから観測されるなど多くの知見も得られたため、今後 X 線照射条件を議論する上で重要な指針になると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

①熊坂崇、清水伸隆、馬場清喜、長谷川和也、上野剛、山本雅貴
SPring-8 構造生物ビームライン
薬学雑誌、130 (5)、649-655、2010、査読有

②平田邦生、清水伸隆、上野剛、熊坂崇、山本雅貴
蛋白質微小結晶構造解析：その極限で目指すもの、蛋白質・核酸・酵素、54 (12)、1477-1483、2009、査読無し

[学会発表] (計 6 件)

①清水伸隆、河野能頭、牧野正知、長谷川和也、村上博則、上野 剛、馬場清喜、伊藤 廉、二澤宏司、山本雅貴、熊坂 崇
SPring-8 構造生物学 I ビームライン BL41XU の現状 (ポスター) 第 23 回日本放射光学会年会、兵庫県、2010 年 1 月 8 日

②馬場清喜、水野伸宏、星野武司、牧野正知、長谷川和也、清水伸隆、上野 剛、引間孝明、村上博則、山本雅貴、熊坂 崇
SPring-8 構造生物学 III ビームライン BL38B1 の現状 (ポスター) 第 23 回日本放射光学会年会、兵庫県、2010 年 1 月 8 日

③清水伸隆、清水哲哉、馬場清喜、長谷川和也、山本雅貴、熊坂崇
紫外可視分光法によるタンパク質結晶の放射線損傷の評価 (ポスター) 日本結晶学会 2009 年年会、兵庫県、2009 年 12 月 5 日

④清水伸隆、河野能頭、河本正秀、長谷川和也、上野剛、平田邦生、大端通、古川行人、工藤統吾、馬場清喜、清水哲哉、二澤宏司、山本雅貴、熊坂崇

SPring-8 構造生物学 I ビームライン BL41XU の現状 (ポスター) 第 22 回日本放射光学会年会、東京都、2009 年 1 月 11 日

⑤馬場清喜、牧野正知、長谷川和也、清水伸隆、上野剛、村上博則、山本雅貴、熊坂崇
SPring-8 構造生物学 III ビームライン BL38B1 の現状 (ポスター) 第 22 回日本放射光学会年会、東京都、2009 年 1 月 11 日

⑥清水伸隆

タンパク質結晶の放射線損傷とその定量的評価に基づく測定法 (シンポジウム、口頭) 第 46 回日本生物物理学会年会、福岡県、2008 年 12 月 3 日

[その他]

ホームページ等

①SPring-8 JASRI 構造生物グループビームラインのページ
<http://bioxtal.spring8.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 伸隆 (SHIMIZU NOBUTAKA)
財団法人 高輝度光科学研究センター・
利用研究促進部門・研究員
研究者番号：20450934