

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15764

研究課題名(和文)電子線を利用したタンパク質の分子内電荷の決定

研究課題名(英文)Determination of atomic charge in protein molecule by electron diffraction

研究代表者

高場 圭章(Takaba, Kiyofumi)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・特別研究員

研究者番号：80865460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：分子内部の電荷は分子物性を特徴づける重要な構造パラメータであり、分子機能に密接に関係する。本研究ではクライオ電子顕微鏡を使用した電子回折構造解析と、X線自由電子レーザーを使用したX線回折構造解析の両者を実施し、数 $\mu\text{m}$ サイズの微結晶から分子中の電荷分布を可視化する手法の開発を行った。線種の特性に応じて、電荷の可視化には電子線解析が、原子の位置や熱振動の決定にはX線解析がそれぞれ優位に作用することを実験的に明らかにし、目的に応じて両者を使い分け、あるいは組み合わせた解析を実施するための指針を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子内電荷の実験的決定により、電子レベルでの構造情報に基づいた機能性分子の理解と開発がより進展すると期待できる。これまでは電子構造は主としてシミュレーションによって評価されてきたが、実験情報との相互検証によってより高い精度での評価が可能になる。また、得たい情報に基づいた実験手法の使い分けや複合利用を促すことで、電子顕微鏡と放射光X線のそれぞれに期待される装置開発の指針を示すことに繋がる。

研究成果の概要(英文)：Atomic charges in molecules are parameters of importance, characterizing the nature and the function. In this study we aimed to develop a method to visualize the charge distribution on molecules from microcrystals. We performed both electron and X-ray crystallographic analysis for this purpose, with cryo-electron microscopes and X-ray free electron lasers. We experimentally elucidated that electrons are preferred to visualize atomic charges, while X-rays are preferred to decide atomic position and its thermal motion, based on the property of these interaction sources. This will be a guideline to use either or both methods by researchers' purposes.

研究分野：結晶構造化学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 結晶電子回折 放射光X線結晶解析 生体分子構造解析 電荷解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

分子内電荷の分子物性を特徴づける重要な要素であるが、分子構造が複雑になるほどその決定は困難になる。タンパク質ではその3次元構造の構成と機能発現の両方において静電相互作用の寄与は大きい。研究開始までの研究において代表者らはX線構造解析による電荷決定に取り組んできた。しかしながら試料調製・測定精度・解析精度とも高い水準を要求するため、広く一般的に実施可能な手法とすることは困難であった。また他方で、計算化学的にも電荷決定は可能であるが、実験情報の不足から、相互作用評価の妥当性検証自体に問題が生じるというジレンマが生じる。近年電子線回折による3次元結晶構造解析が提案され、これまでX線回折が適用できなかった微結晶からも構造決定が可能になりつつあった。また、電子線散乱は試料の電荷に対する感度が高く、X線回折よりも容易に電荷が決定できることが期待された。

### 2. 研究の目的

本研究は電子線結晶構造解析により、タンパク質の分子内電荷を決定することを目的とした。そのために必要な測定・解析精度を見極めるとともに、それらを満たすための手法基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 電荷決定に必要とされる回折データ要件の洗い出し

収集済みの電子回折像およびX線解析によるものを含めた決定済みの分子構造データをもとに、分子内電荷が復元されるか検証した。評価基準は実空間でのポテンシャル強度とした。すなわち、構造データ上の電荷値を連続的に変化させてポテンシャル強度との差が最小化した点を実験的な電荷値として扱えると想定した。この場合電荷以外の構造パラメータ、すなわち座標および熱振動強度の決定精度が電荷値の分解能に影響を与える。X線回折での知見にもとづき、隣接原子との分離が可能な座標精度および等方性熱振動パラメータの見積りのためには分解能2 Å以上の回折強度データが必要であると見積もった。熱振動パラメータの異方性まで考慮する場合分解能1.3 Åが必要である。

#### (2) 電子線回折実験に使用する結晶試料の調製および回折能の検証

まず、当初の計画どおり緑色蛍光タンパク質(GFP)の既知結晶を用いた電子回折実験を実施した。電子回折実験は加速電圧200 kV機(JEM2100)および300 kV機(cryoARM300)の両方で実施したが、いずれも回折斑点が観測されなかった。これは同結晶が細い長柱状であり、電子線の透過方向に対しては大き過ぎて(>1 μm)透過せず、かつ垂直面内方向については細すぎる(<1 × 5 μm<sup>2</sup>)ために十分な回折体積が得られなかったためと推定した。他のタンパク質結晶に対する回折実験も行った結果、理想的な結晶サイズは厚みが200 nm以下、かつ垂直面での面積が5 × 5 μm<sup>2</sup>以上と見積もった。特に厚みの条件は厳格であり、電子顕微鏡にマウントした試料中の無数の微結晶粒から条件を満たす結晶を効率的に選択する手法の確立が必要と考えられた(図1)。また、この条件に近い場合でも、タンパク質結晶試料から得られた最高分解能は2 Å前後であった(図2)。さらに、試料の回転に応じて電子線の透過距離が回転角度依存的に変化するため、特定の回転角では分解能が著しく低下する。これは(1)で述べた電荷決定要件の充足を阻害する要素であり、さらなる研究の展開による解決が求められる。

これらの状況から、より高い回折分解能が得られる低分子化合物までターゲットを広げて電子線回折実験を行った。この結果、同じく生体分子であるビタミンB12においては分解能1 Åを超える回折データセットが得られ、直接構造決定が可能となった(図3)。

#### (3) 複合解析のためのX線解析法の開発および電子線解析との比較

(1)で述べたとおり、電荷値の決定には電荷以外の構造パラメータの決定精度も密接に影響する。しかしながら、精密

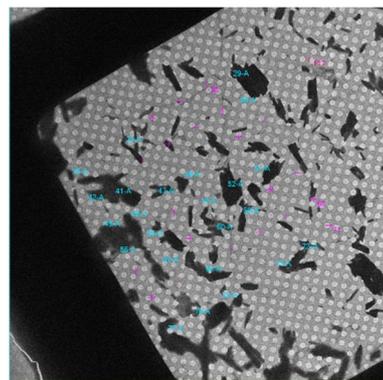


図1 GFP結晶の電子顕微鏡像。無数の結晶片から回折に適するものを適切かつ高速に選択する機構が求められる。

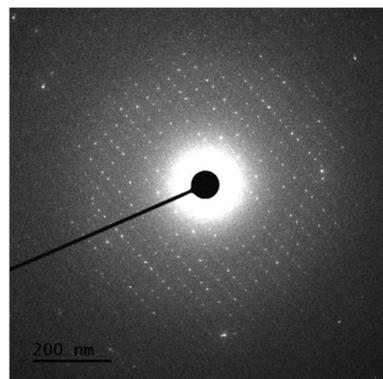


図2 鉄硫黄タンパク質の電子回折像。四隅付近の回折斑点が分解能2 Åの回折位置に相当する。

なパラメータ決定のためには電荷値を含む逆畳み込みが必要であることや、電子回折法では動力的散乱効果が強く反映されるために、X線解析に比べると各パラメータの決定精度自体が低いことが課題として想定された。これを解決するためには、電荷以外の構造パラメータの決定にはX線解析を利用することが有効と考えられる。電子回折強度とX線回折強度の両方を、可能な限り相同と考えられる結晶試料から測定するために、SACLAのX線自由電子レーザー(XFEL)を用いた微結晶構造解析を開発・実施した。電子回折との比較・統合を目的とする場合には、構造解析における実験情報以外の影響が可能な限り排除されることが望ましい。そのためビタミンB12よりもさらに小さな低分子化合物、ローダミン6Gを初期の標準試料として選択した。

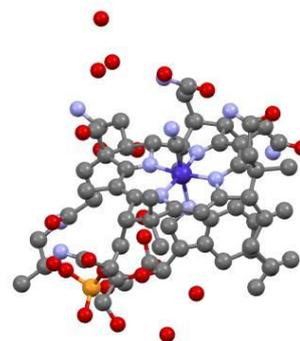


図3 電子線回折で決定したビタミンB12の立体構造。

#### 4. 研究成果

上述3項の(2)および(3)における成果を今後の展望とともに記述する。

(2)- を克服するためには電子顕微鏡の制御を含む撮影プロトコルの最適化、および撮影像に基づく結晶位置の取得、回折能の評価が必要である。これには本研究と並行して開発された半自動撮影・データ処理システム(Takaba, K., Maki-Yonekura, S., Yonekura, K. J. Struct. Biol. 2020)の適用が有効と考えられ、本研究でも同システムの運用によって電子回折像撮影および解析を実施した。またさらに、この後開発された機械学習ベースの結晶位置同定システム(Yonekura K. et al., Commun. Biol. 2021)も試験運用した。これらはタンパク質結晶の回折像撮影のためには、試料の厚みを考慮して拡張・最適化する必要があり、今後も高度化と運用を継続して実施する。これらの成果は(2)に述べたビタミンB12に関する電子線解析と併せて国内学会で報告した。代表者らと同じく日本電子製の電子顕微鏡システムを運用する研究者らや、今後の電子顕微鏡関連の研究開発の基礎技術として参照されることが期待される。(2)- は依然解決すべき課題であり、イオンビームによる試料加工等が解決の指針として挙げられる。これも回折測定同様に、効率的な装置運用・開発と併せて展開していくことが必須である。

(3)においてはXFELによる低分子化合物の構造解析に成功し、電子線解析との詳細な比較を可能にした(Takaba, K., Maki-Yonekura, S. et al., ChemRxiv 2021, 査読付き学術誌において査読中、および放射光利用者向けの国際ミーティングにおいて報告)。ここではローダミン6Gに関して分解能0.9 Åを超える電子回折像が観測されたため、3項(1)で述べた通りに座標と熱振動パラメータを精密に決定することが可能であった。その上で、これらのパラメータの決定精度はXFEL解析で得られた構造よりは劣るが、電荷に対する感度は電子線解析が優位であることを実験的に示した。すなわち、電子回折から得られた電荷分布に基づく、結晶中のローダミン6Gは共役系を介して電荷の偏りを低減しており、単純に構造式では表記しきれない電子分布となる(図4)。この描像をXFEL解析から得ることは不可能であった。また、X線

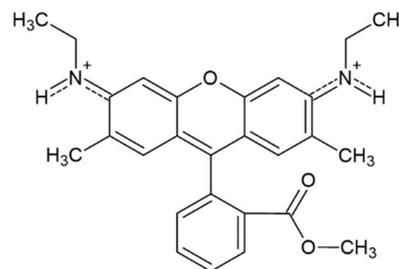


図4 電子回折で決定した電荷に基づくローダミン6Gの構造。1価の陽イオンであるが、正電荷は2箇所のNH基の両方にほぼ等分配されていた。

は試料中の電子のみに、電子線は電荷、すなわち核電荷と電子電荷の両方に影響を受けることから、特に水素原子に関して分極の影響の反映され具合が異なることを指摘した。これはそれぞれの密度マップ上において、水素原子の検出位置に0.1 Å前後の系統的有意差がみられることとして観測した。これは理論的には予測されていたことではあるが、実験的な観測例を初めて提示したことで、分極度を実験的に決定するための測定、解析水準が示された。これらの成果はXFELの低分子解析への利用開拓と、電子線解析の電荷決定への応用事例の両方の側面があり、今後の両手法の使い分けを促す重要な成果である。一方で、本例のように同一試料に対して両手法ともが十分な測定・解析精度を満たす場合は必ずしも多くないと予想される。そのため互いに得られた構造情報を統合して解析する手法の開発を進めている。既に上述のビタミンB12を含む複数種類の結晶試料に関してXFEL、電子線の両方での回折像取得に成功しており、比較および複合解析の結果を発表準備中である。これらの適用事例を拡張していくことにより、本研究開始当初の目標であるタンパク質分子での電荷解析が実現されると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaba Kiyofumi, Maki-Yonekura Saori, Inoue Ichiro, Tono Kensuke, Hamaguchi Tasuku, Kawakami Keisuke, Naitow Hisahi, Ishikawa Tetsuya, Yabashi Makina, Yonekura Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 Hydrogen properties in an organic molecule revealed by XFEL and electron crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemRxiv	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） 10.26434/chemrxiv-2021-jvbf1	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kiyofumi Takaba, Saori Maki-Yonekura, Koji Yonekura
2. 発表標題 Sub-angstrom resolution SACLA-SFX for Organic Chemicals
3. 学会等名 SACLA Users' Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高場 圭章・眞木（米倉） さおり・米倉 功治
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による中低分子の微小結晶構造解析
3. 学会等名 2020 年度構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高場 圭章・眞木（米倉） さおり・米倉 功治
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を利用した3次元微結晶構造解析
3. 学会等名 2020 年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kiyofumi Takaba, Saori Maki-Yonekura, Koji Yonekura
2. 発表標題 High-resolution Structure Determination of Biomolecular Microcrystals by Cryo-Electron Diffraction
3. 学会等名 2020 年度日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------