

早稲田大学 教育・総合科学学術院 生物学教室セミナー

2008年2月18日（月）15:00～16:30

早稲田大学 26号館大隈タワー702教室
（地下鉄東西線早稲田駅下車西早稲田キャンパス大隈講堂脇）
世話人：加藤尚志 e-mail: tkato@waseda.jp

蛋白質分子の機能とかたち：J-PARC がひらく未来研究

日本原子力研究開発機構

量子ビーム応用研究部門 中性子生命科学研究ユニット

黒木 良太 先生

タンパク質の立体構造を知ることによって、その機能を深く理解することができる。また立体構造の具体的なイメージは、タンパク質の高機能化やタンパク質と相互作用する様々な分子の創製に有用な指針を与えてくれる。立体構造を知る方法には様々な方法があるが、その最も効果的な方法の一つはタンパク質を結晶化し X 線の回折を利用して構造解析する方法である。この方法によればタンパク質の立体構造を原子分解能で解析することができる。タンパク質の詳細な構造がわかれば、その機能や安定性を向上させることも可能となってきた。しかしタンパク質を標的として相互作用するリガンド等の低分子の設計は未だに難しい。その一つの理由はタンパク質を構成する水素原子や水和水に関する情報が少ないからであろうと思われる。

タンパク質を構成する水素原子の数は、全原子数の約半分を占める。その多くは理論的に位置を推定することができるかとされている。しかし、タンパク質の分子表面には局所的に異なった環境が存在し、それがタンパク質機能の多様性を高めていることが知られている。このような特殊な環境では、解離性残基が通常とは異なる pKa を示したり、水素結合や共有結合にさえもねじれが生ずる可能性がある。高度な反応触媒機能を発揮する酵素の活性部位はその代表的な例である。このような場所に結合することが期待される酵素阻害剤などの設計には、水素原子位置の確定が効果的である。また水溶液中での

表1. 中性子による各原子の観測の容易さ

	^1H	$^2\text{H}=\text{D}$	C	N	O	Na	S	Cl
(相対比)	-0.3	1.0	(1)	2.0	0.75	0.28	0.17	3.6
中性子	○	●	●	●	●	●	●	●
原子散乱長 $\times 10^{-12}\text{cm}$	(-0.37) ²	(+0.67) ²	(0.67) ²	(0.94) ²	(0.58) ²	(0.36) ²	(0.28) ²	(1.17) ²
(相対比)	0.03	0.03	(1)	1.4	1.8	3.7	7.1	8.1
X線	●	●	●	●	●	●	●	●
原子散乱因子	(0.28) ²	(0.28) ²	(1.69) ²	(1.97) ²	(2.25) ²	(3.10) ²	(4.50) ²	(4.80) ²
観測しやすさは電子数に依存する								

分子間相互作用には脱水和を伴う。リガンド結合がタンパク質のコンフォメーション変化を伴う場合には、構造変化に伴う脱水和の効果が加わり、さらに複雑なものになるが、低分子のリガンドがタンパク質に結合する場合には近似的に局所的な脱水和を考慮すれば良い。このように分子間で相互作用が生じる際の脱水和効果を知ることは大変重要である。

タンパク質やその水和水の水素原子を効果的に観測するには中性子結晶解析が有効である。中性子は原子核との相互作用によって散乱を受けるので、電子による散乱をうける X 線とは異なった性質のプロブである（表 1）。中性子を用いれば水和水の水素原子を観測することができるので、水和水の配向を決定することができる。茶竹ら⁽¹⁾は 1.5~1.6 Å 分解能で決定された中性子結晶構造において、水和水の原子核密度分布が、その動的な特徴を反映して様々な形を示すことを見出した。このような水和水の観測によってタンパク質表面における水分子の挙動がより詳細に明らかになると期待される。

中性子を用いたタンパク質の立体構造解析手順は、X 線結晶構造解析とほぼ同じである。中性子構造解析では、使用されるビームが X 線から中性子に変わっただけであり X 線解析で用いられる各種ツールをわずかなパラメータの変更で用いることができる。回折データの処理方法や分子モデルの組み立ては、X 線結晶構造解析の経験のある研究者なら容易に実施可能である。中性子を用いたタンパク質の立体構造解析には、従来から研究用原子炉で核分裂によって生成される中性子が用いられている。我々はブタ腓臓エラスターゼの大型結晶の作成に成功した⁽²⁾。この結晶をさらに大型化し、ブタ腓臓エラスターゼの中性子構造解析に成功した。図 2 にその立体構造と触媒基である His 残基の水素原子の見え方を示した。この例では軽水素は負の原子核密度分布を、重水素によって置換された水素は正の原子核密度で観測される。このような水素原子固有の性質は、結晶中に存在する原子が水素であることを同定するために使うことができる⁽³⁾。しかしながら中性子のビーム強度はきわめて弱いため、構造解析には通常 5~10mm³ の大きさの結晶が使用されてきた。その体積は放射光による立体構造解析に用いられる結晶体積 (0.001mm³) の 10000 倍に相当する。そのため解析できるタンパク質の例は極めて限定され、タンパク質の立体構造データベースに登録された解析数も 2008 年 1 月現在わずか 21 件に留まっている。

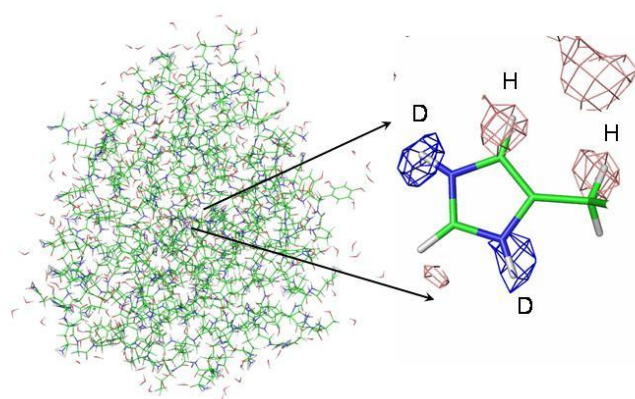


図 1. 1.75 Å 分解能で決定した
ブタ腓臓エラスターゼの中性子結晶構造

現在、茨城県の東海村に建設中の大強度陽子加速器(J-PARC：図 2)には、新しい中性子回折計が設置される。中性子回折データの効果的な収集により、解析に必要な結晶も小さくて済む見込みである。この装置は 2008 年度中に稼働予定であるが、数年間の調整を経

て J-PARC がその最大能力を発揮した場合には、結晶の体積は現状の 1/100 程度で済むとアナウンスされている。この場合、結晶に必要な体積は放射光で用いられる結晶体積の 100 倍程度、すなわち従来の実験室で用いられてきた結晶の大きさで充分解析が可能となる。

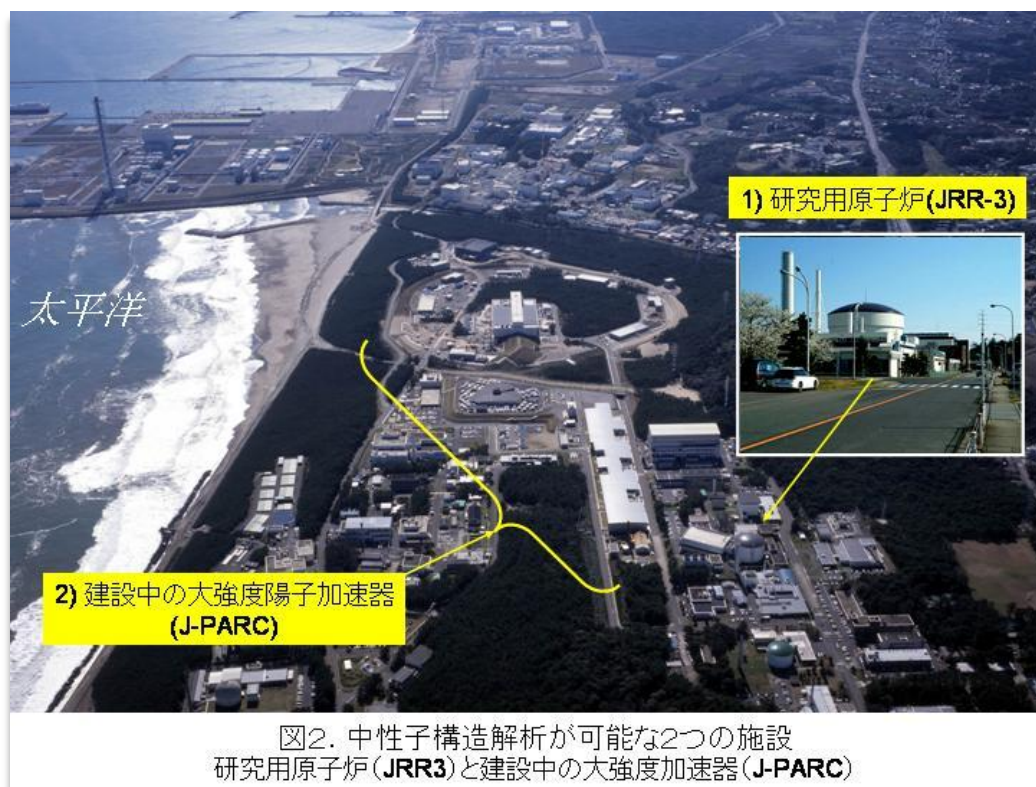


図2. 中性子構造解析が可能な2つの施設
研究用原子炉(JRR3)と建設中の大強度加速器(J-PARC)

一方で、体積の大きな結晶の取得ができれば、それだけ測定も容易になる。結晶の大型化は、単に結晶化母液の容積を大きくするだけでも効果があるが、さらに結晶成長をシーディングを繰り返して促進させる方法が一般的である^[2]。また結晶の成長に偏りがある場合には、タンパク質表面をアミノ酸置換して成長を促進させる方法も検討されている。このようにタンパク質の中性子構造解析を取り巻く環境は、次第に改善されつつあり、中性子を用いたタンパク質の構造研究が一般化するの、もはや遠い将来のことではないように思われる。

References

1. Chatake, et al., "Hydration in proteins observed by high-resolution neutron crystallography." *Proteins*. 50, 516-523. (2003)
2. Kinoshita, et al., "Crystallization of porcine pancreatic elastase and a preliminary neutron diffraction experiment" *Acta Crystallogr. F* 63, 315-317. (2007)
3. Ogo et al., "A dinuclear Ni(μ -H)Ru complex derived from H₂" *Science*. 316, 585-587. (2007)