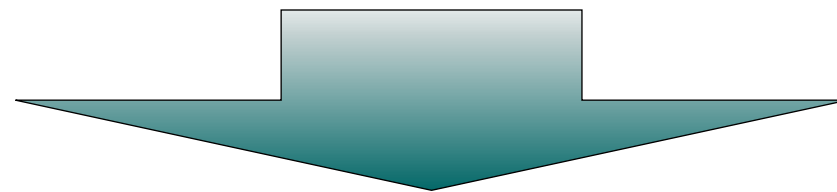


2. 最近の成果事例と中性子の特長を生かした今後の研究テーマ

2-1 iBIXで得られた中性子特有の成果

- 1 世界で最長の結晶格子(133.43 Å³)を持つタンパク質の構造解析に成功
- 2 セルラーゼのAsnのイミド酸型側鎖とカチカチ玉反応機構を発見
- 3 PcyAに結合したビリンのピロール環の4個の水素の存在比とラクタム構造を観測
- 4 α-トロンビンのDer-His-AspのSerのOHはHisと水素結合が形成できない
- 5 RNaseAの活性中心のHis12とHis119の機能の違いの要因



機能性有機分子材料や人工光合成システム, 創薬の開発に貢献

2-2 最近の測定結果一覧(出力300kW)

試料名	格子定数 (Å)	空間群	測定 日数	結晶体積 (mm ³)	分解能 (Å)	温度 (K)	実験者
human FPPS-BP complex	a=111 c=68	$P4_12_12$	12.0	2.5	2.5	RT	富山大・横山
RNaseA (pD=7.5)	a=69.7 b=71.5 c=71.0 $\beta = 100.5^\circ$	$P2_1$	7.0	6.0	1.4	RT	茨城大・日下
PCel45A -C5	a=45.4 b=58.0 c=62.8	$P2_12_12_1$	10.0	6.0	1.5	RT	東大・五十嵐
HiPIP	a=46 b=58 c=23	$P2_12_12_1$	10.0	1.0	1.1	100	京大・三木 JAEA・玉田
b5R	a=48 b=72 c=85	$P2_12_12_1$	10.0	2.0	1.4	100	JAEA・玉田 京大・三木
α -Thrombin -Acetyl hirudin	a=71.4 b=71.2 c=69.9 $\beta = 100.3^\circ$	$C2$	10.5	1.2	2.4	RT	茨城大・山田
Mn catalase	a=133.4	$P2_13$	*12.4	2.0	2.35	RT	茨城大・山田

*加速器出力: 150kW

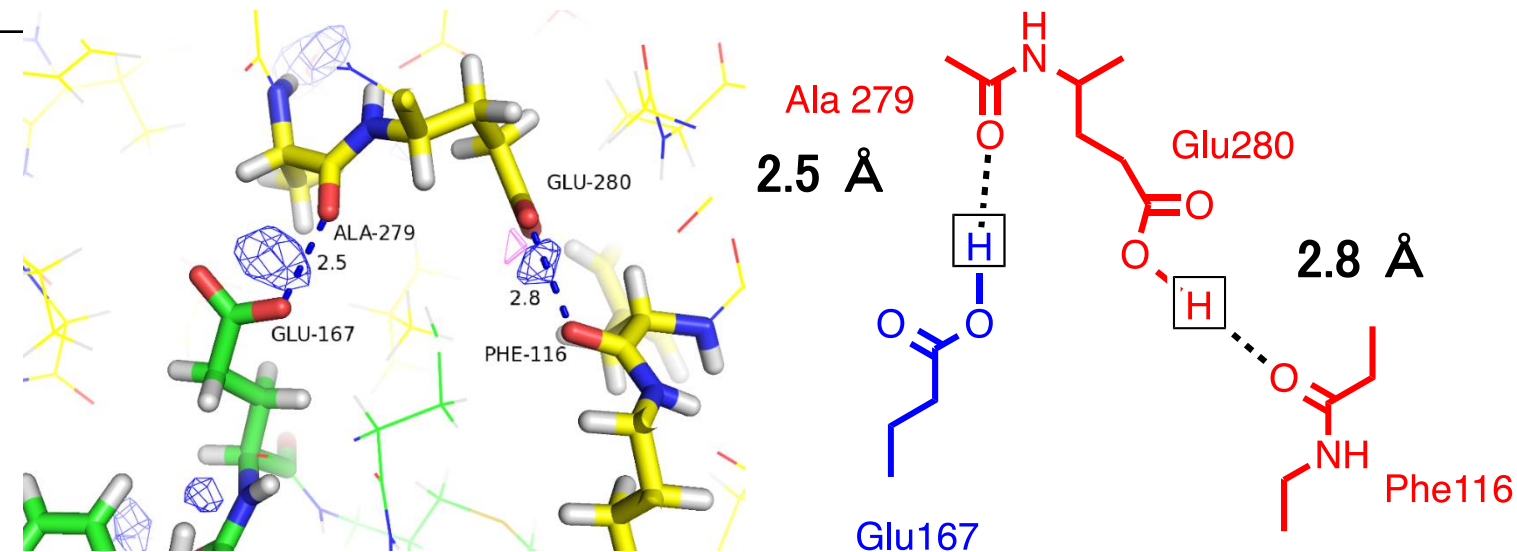
2-3 最近の成果事例

Mnカタラーゼの中性子構造解析

世界で最長の結晶格子(133.4^3 \AA^3)を持つタンパク質の構造解析に成功

Mnカタラーゼ

	X-ray	Neutron
Beam Line	PF BL-17A	J-PARC MLF BL03
Detector	PILATUS 6M	iBIX
Wavelength	0.98 \AA	3 - 6 \AA
Data collection	0.5° rotation,	TOF Laue, 10 set
Space group, unit cell dimensions, Z	$P2_13$, $a = 133.39 \text{ \AA}$, 24	
Resolution	1.40 \AA	2.35 \AA
No. Reflection obs.	1,621,309	167,820
No. Reflection unique	164,892	32,509
completeness	100 %	98 %
Redundancy	9.8	5.2
R_{merge} , R_{pim}	0.92, 0.03	0.32, 0.15
Refinement	Phenix 1.8.1	
R_{work} , R_{free}	0.12, 0.13	0.16, 0.19



2.4 \AA Fo-Fc 中性子散乱長密度図(3 σ)

結晶化条件pD9.6で分子内および分子間のグルタミン酸 COOH - 主鎖C=O間の水素結合を確認

133.4X133.4X133.4 \AA の結晶格子のMnカタラーゼの2.4 \AA 分解能の中性子回折データは、信頼できる水素原子の観測が可能であることを示す

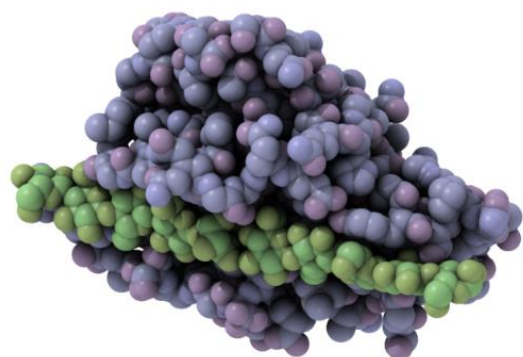
iBIXの設計目標達成(135 \AA^3)を実証

加水分解酵素セルラーゼPcCel45Aの構造解析 Asnのイミド酸型側鎖とカチカチ玉反応機構を発見

加水分解酵素セルラーゼ
の反応機構を解明

茨城県プロジェクト

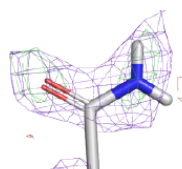
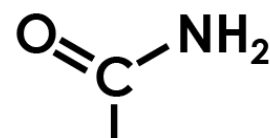
東京大学 五十嵐圭日子准教授



セルラーゼPcCe145Aの分子構造
(紫色:PcCe145A, 緑:セルラーゼ)

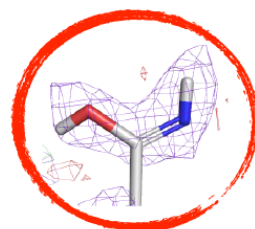
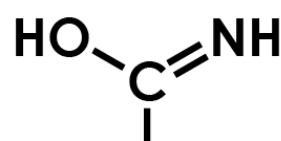
従来のアスパラギン

アミド型



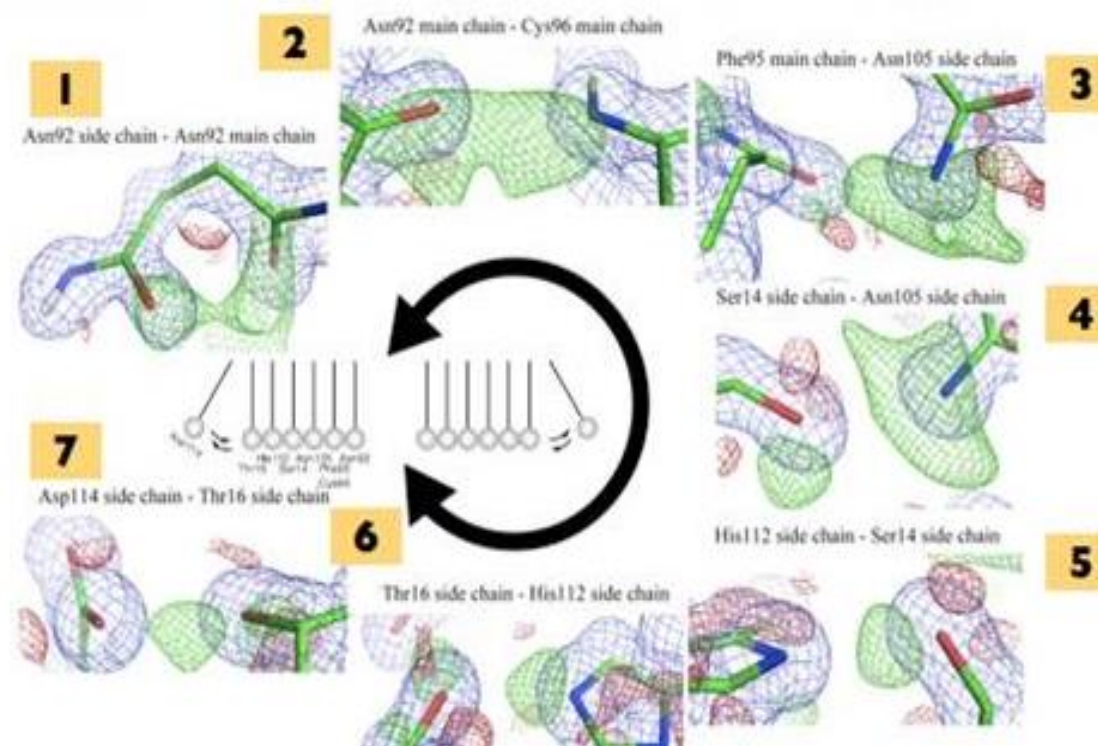
PcCe145Aの活性残基

イミド酸型



PcCe145Aの活性残基がイミド型
であることを解明

活性残基アスパラギンの構造



PcCe145Aにおいて
1→7, 7→1へ水素の玉突きを
起こす、「かちかち玉」のような
機構で反応を繰り返す

高機能性洗剤の開発に貢献

フェレドキシン依存性ビリン還元酵素PcyAの構造解析

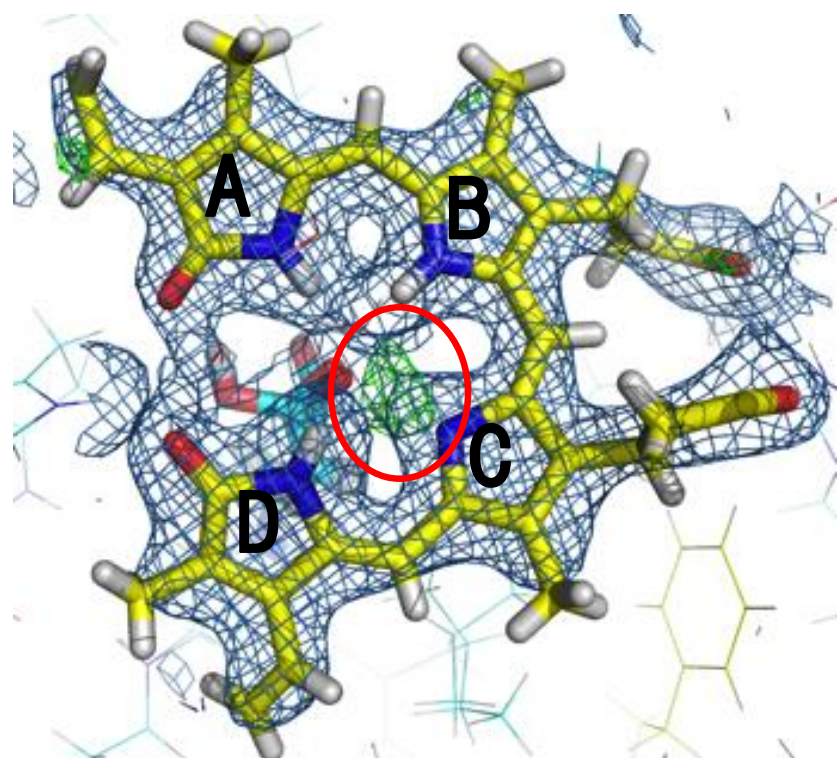
PcyAに結合したビリンのピロール環の4個の水素の存在比とラクタム構造を観測

PcyA:

光合成や光応答の際に活躍するビリンの合成を触媒する還元酵素

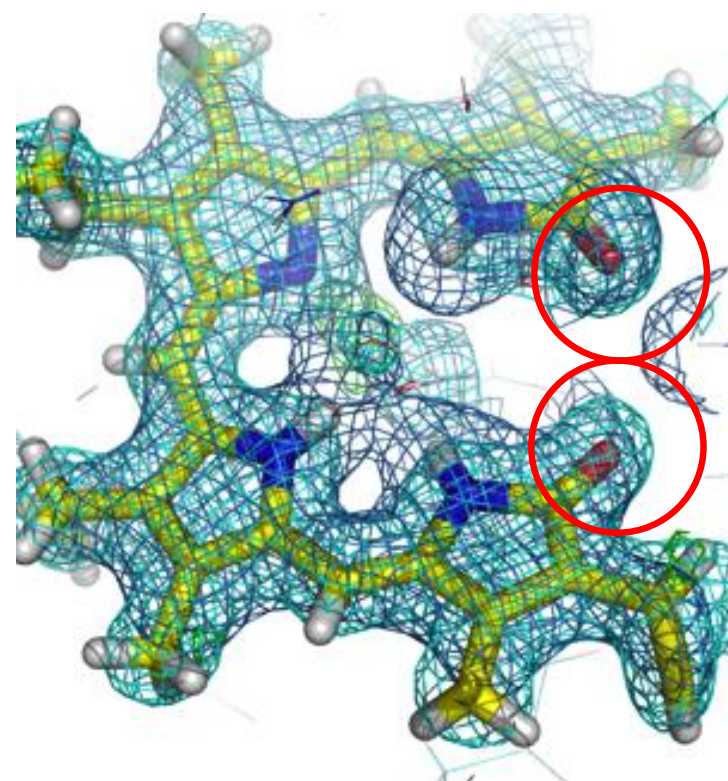
茨城県プロジェクト

茨城大学 海野昌喜教授



Blue: $2F_o-F_c$ neutron map
Green: F_o-F_c neutron map

ピロール環の4つとも水素が結合



Blue: $2F_o-F_c$ neutron map
Cyan: $2F_o-F_c$ X-ray map
Green: F_o-F_c neutron map

ラクチム(C-OH)ではなく
ラクタム構造(C=O)

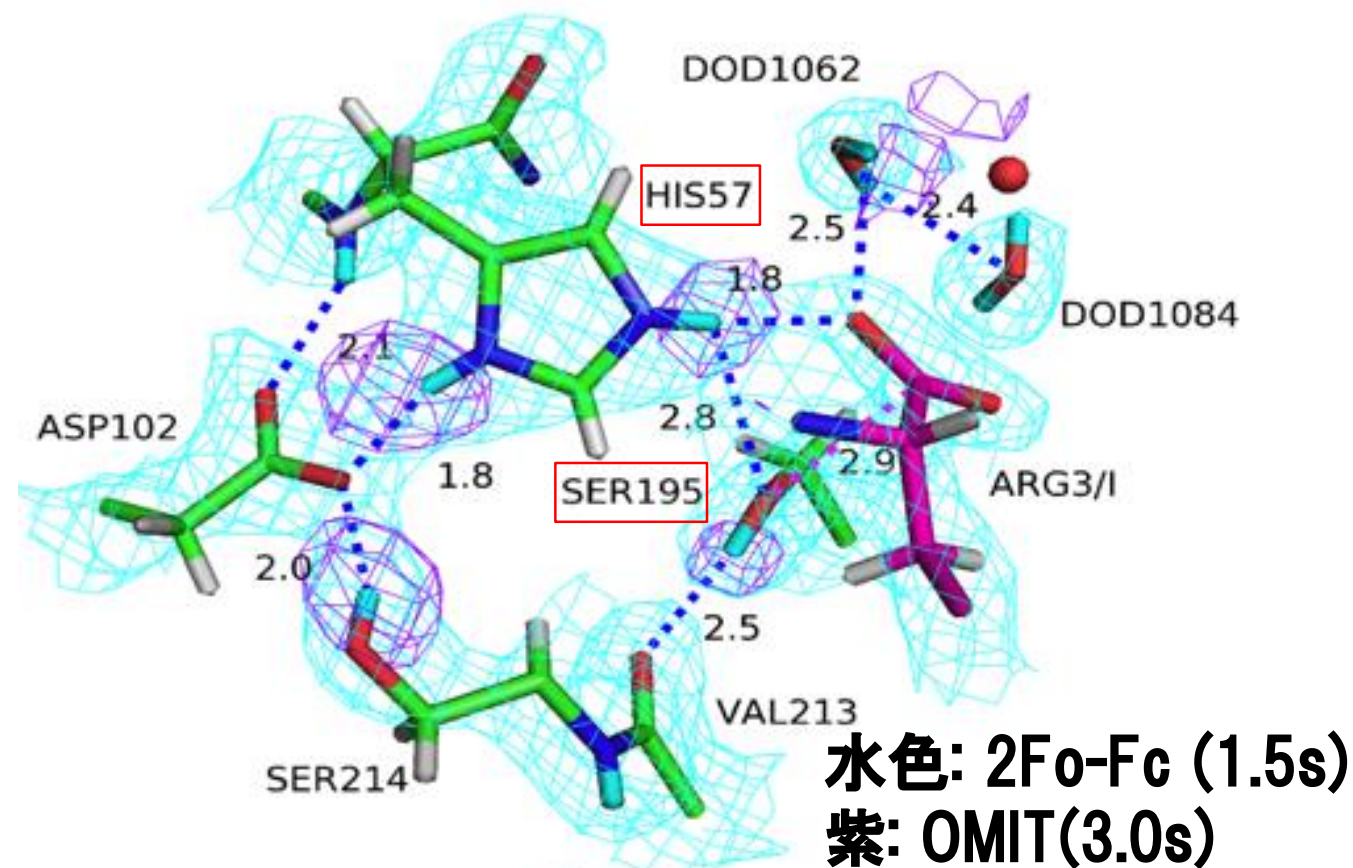
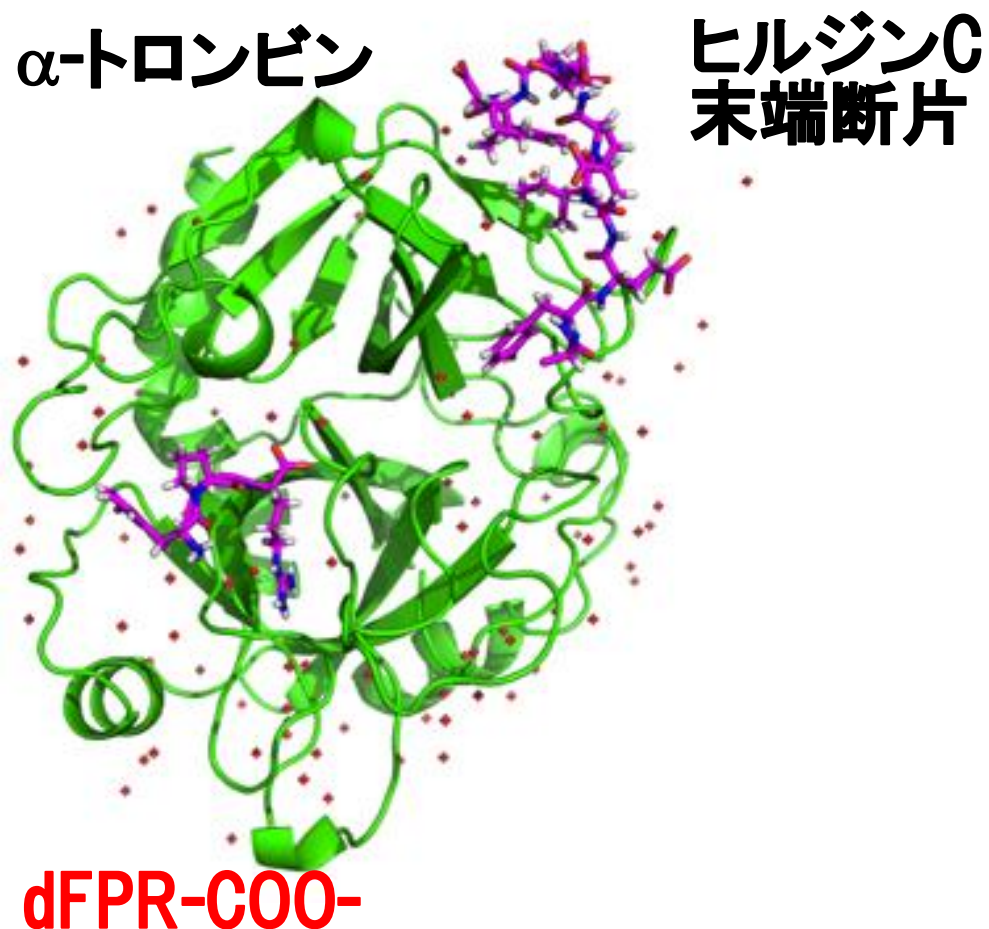
光触媒・人工光合成システムの開発に貢献

2-3 最近の成果事例

α -トロンビン-ビバリルジン複合体

α -トロンビンのDer-His-AspのSerのOHはHisと水素結合が形成できない

茨城大学 山田太郎准教授



pD7.9における活性部位

His57およびSer195の重水素を観測
Ser195のOHの水素がHis57のNでなく
V213のC=O側を向いていることが判明

Ser195がプロトンをHis57に渡す
反応モデルを否定する結果

dFPR-P-GGGG-D⁵³GDFEEIPEEYL⁶⁴
ヒルジン C-末端断片

切断

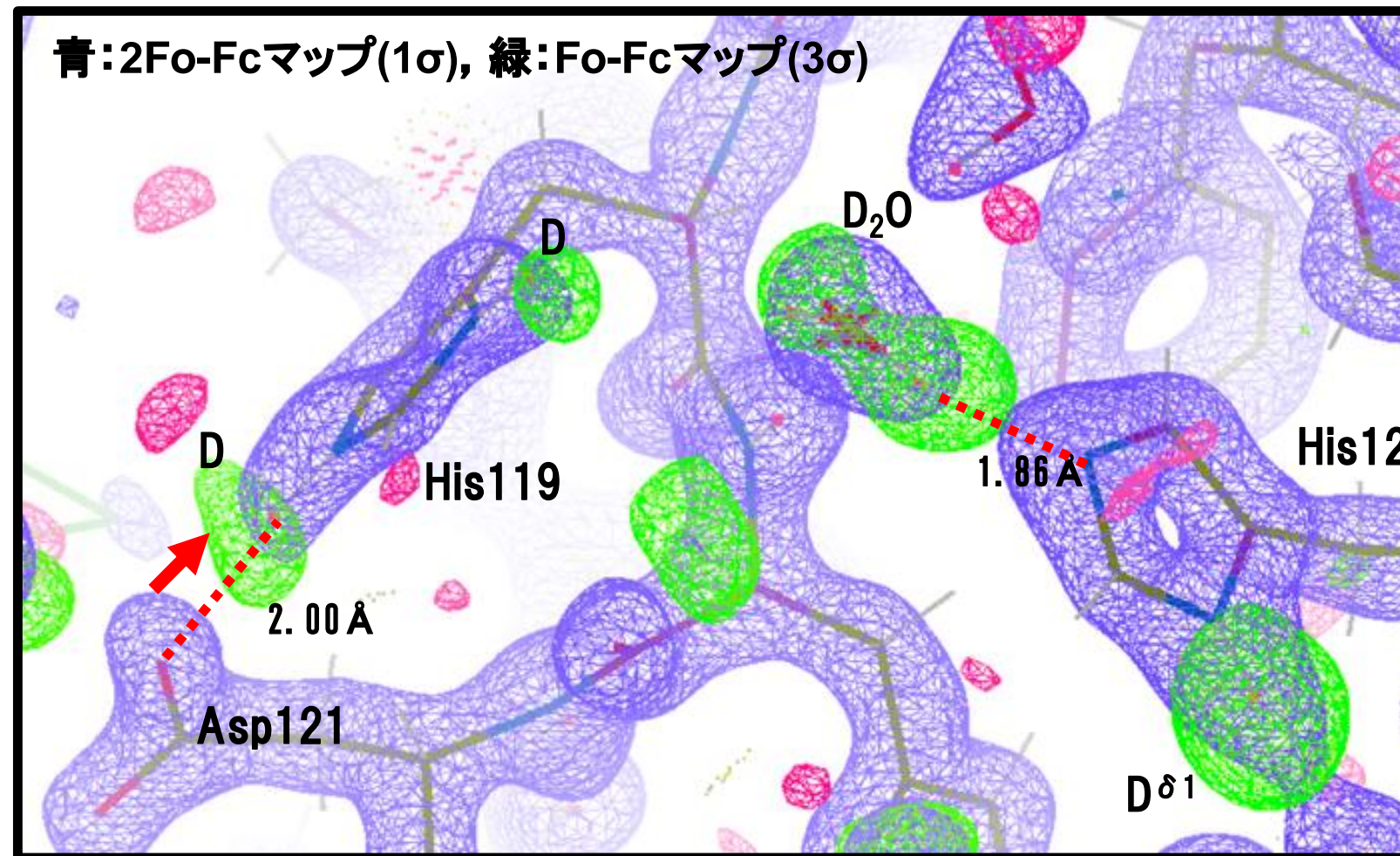
2-3 最近の成果事例

RNase Aの活性中心のHis12とHis119の機能の違いの要因

茨城県プロジェクト

茨城大学 日下勝弘准教授

中性子構造解析から得られた活性部位周辺の原子散乱長密度マップ



Asp121からプロトンを受け取ったHis119がプロトンを与える
His12に水が配位している

2-4 中性子の特長を生かした今後の研究テーマ 2

ケト型-エノール型に代表されるプロトン互変異性の研究

- ・電子密度による散乱のX線ではプロトン位置の決定は困難
- ・NMRはブロードニングを起こし困難

→コンフォメーション変化の要因、酵素の反応過程におけるプロトン、水分子の役割の解明に役立

水素結合を観測する研究

- ・水素結合のあらわな“観測”，占有率による強さの判断
 - ・薬剤のタンパク質への結合の鍵となる水素結合の決定
- 医薬品設計への応用

アスパラギン酸残基やグルタミン酸残基等のカルボキシル基及び基質，補酵素，阻害剤のリン酸基などのプロトン化状態を検討する研究

- ・『イオン化』と『プロトンの乱れ』を区別する

—活性中心に存在する酸性アミノ酸残基の側鎖の状況は反応過程に重要
—ATPあるいは阻害剤のリン酸基の状況は分子間相互作用の考察に重要

アミノ酸残基の側鎖のモデルで決定できる水素以外の水素の位置を決定する研究

- ・水分子が側鎖の配向に与える影響を考察
→計算機科学の基礎データを提供

室温における結晶構造解析の有用性を示す研究

- ・室温と100Kのタンパク質の側鎖の配向の違いの観測
→水溶液における活性領域の側鎖の配向の考察

酸化還元酵素の無損傷構造解析

- ・例PcyAの基質と複合体のX線による結合形成

金属に結合した水素や、金属配位子上の水素などの観測