 茨城県 <small>IBARAKI Prefectural Government</small>	MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
		2018年3月24日
課題番号(Project No.)	2017PX0003/2017PX0021	装置責任者(Name of responsible person)
実験課題名(Title of experiment)	中性子と放射光の連携利用によるタンパク質反応プロセスの解明	日下勝弘
実験責任者名(Name of principal investigator)	三木邦夫	装置名(Name of Instrument : BL No.)
所属(Affiliation)	京都大学大学院理学研究科	BL03
		実施日(Date of Experiment)
		2017年5月25日～6月21日
		2018年1月30日～2月15日

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

1. 実験目的(Objectives of experiment)

生体内化学反応をつかさどるタンパク質の構造と機能を解明することは、生命科学現象の理解を深めるだけでなく、タンパク質そのもののバイオ材料や医薬品としての応用にも貢献する。水素はタンパク質を構成する原子のおよそ半分を占め、その機能や物性に極めて重要であるにもかかわらず、従来のX線構造解析ではその情報を得ることに技術的に容易ではなかった。本研究では、光合成関連の電子伝達タンパク質、緑色蛍光タンパク質、呼吸鎖の酸化還元酵素などを対象に、放射光と中性子を連携利用することで、従来の放射光による結晶構造解析だけでは十分に得られなかった水素原子に関する構造情報を得て、水素原子がかかわる化学反応機構の理解を深める。その結果、学術的ならびに産業的な両面から、新たな視点からの構造生物学の展開が期待される。

2. 試料及び実験方法

Sample(s), chemical compositions and experimental procedure

2.1 試料 (sample(s))

- ・高電位鉄イオウタンパク質：通常試料 (h-HiPIP) および完全重水素化試料 (d-HiPIP)
- ・緑色蛍光タンパク質：通常試料 (h-GFP) および完全重水素化試料 (d-GFP)
- ・アミド基転移酵素 GatCAB 複合体

2.2 実験方法(Experimental procedure)

- ・通常 (非重水素化) および完全重水素化試料から重水中で大型結晶 ($\sim 1 \text{ mm}^3$) を作製
- ・ビーム出力：150kW (2017/5/25～6/21: HiPIP, GFP, GatCAB), 400kW (2018/1/30～2/15: GFP)
- ・測定温度：100K (HiPIP, GFP), 室温 (GatCAB)
- ・測定法：静止写真法
- ・phase delay：-21.9° (HiPIP), -30.5° (GFP), -44.0° (GatCAB)

3. 実験結果及び考察（実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。）

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

・HiPIP：還元型結晶の中性子回折実験を実施。2個の結晶（大きさ：0.8 mm³および0.3 mm³）に各々約2時間照射した結果、いずれの結晶においても2.0Å分解能程度の回折点を確認できた。0.8 mm³の結晶については約11時間照射で異なる方位で2セットのデータを収集した（測定時間の都合上、3セット目の途中で中止）。

・GFP：h-GFPおよび完全重水素化結晶d-GFPの中性子回折実験を実施。1個のh-GFP結晶（大きさ：1.1 mm³）に約16時間、2個のd-GFP（大きさ：0.4 mm³および1.5 mm³）に1.5～3時間照射した結果、いずれの結晶においても2.0Å分解能程度の回折点を確認できたが、2017年1月にテスト測定した結晶（d-GFP）の方がより高分解能の回折を示していたため、そちらの結晶を用いてフルデータを収集した。1セットあたりの照射時間は10時間強、合計38セットの回折データを収集し、1.8 Å分解能のデータセットにすることができた。空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 50.9 \text{ \AA}$, $b = 62.1 \text{ \AA}$, $c = 68.8 \text{ \AA}$ であった。回折データの $I/\sigma(I)$ および R_{merge} は、全分解能範囲（30～1.80 Å）に対して2.6および35.2%、最外殻（1.86～1.80 Å）に対して1.0および61.2%であった。一方、h-GFPは、同じ空間群（ $P2_12_12_1$ ）で格子定数もほぼ同じであり（ $a = 51.0 \text{ \AA}$, $b = 62.1 \text{ \AA}$, $c = 68.8 \text{ \AA}$ ）、合計38セットの回折データを収集した。回折データの $I/\sigma(I)$ および R_{merge} は、全分解能範囲（30～2.00 Å）に対して2.3および41.0%、最外殻（2.07～2.00 Å）に対して1.0および66.3%であった。h-GFPの回折データの分解能と質はd-GFPに比べて低いものであった。結晶サイズや照射した中性子線の数で異なる2つのデータ間で異なるために補正して比較すると、d-GFPバックグラウンドはh-GFPの半分程度である（図1A）。これは、非重水素化タンパク質に含まれているわずかな数の軽水素原子による非干渉性散乱が、中性子線回折データの質に大きな影響を及ぼしていることを示している。同様の傾向はh-HiPIPとd-HiPIPの間にも見られた（図1B）。

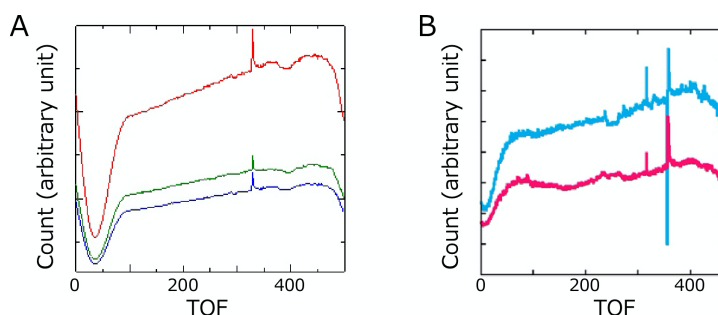


図 1. 完全重水素化試料によるバックグラウンドの低下。(A) h-GFP と d-GFP の回折像におけるバックグラウンドの比較(カウント数). 青線は h-GFP, 緑線は d-GFP, 赤線は結晶サイズや照射した中性子線数を補正した h-GFP. (B) h-HiPIP と d-HiPIP の比較(カウント数). 水色の線は h-HiPIP, 赤線は d-HiPIP.

・GatCAB：グルタミン酸複合体結晶の中性子回折実験を実施。4個の結晶（大きさ：1.5mm³～2.0mm³）に各々約1時間照射した結果、8～9Å分解能程度の回折点を確認できた。回折能が最もよかった結晶に約18時間照射したところ、最高で4.0Å分解能程度の回折点を確認できた。

4. 結論(Conclusions)

通常のタンパク質を重水中で結晶化したものより、完全重水素化タンパク質を重水中で結晶化したものを使用することで、バックグラウンドを半分程度に抑制することができ、より高分解能の中性子線回折データを収集することが可能であった。