

# タンパク質の中性子結晶構造解析

## 量子科学技術研究開発機構 玉田太郎

### 1. Introduction

中性子結晶構造解析は水素原子の直接観察が可能という通常分解能の X 線結晶構造解析では成し得ない特長を有するにもかかわらず、構造生物学分野での利用はまだ限定的である。その要因としては、「通常の X 線結晶構造解析の 1000 倍以上の体積の大型結晶が必要」、「1 データを収集するのに 1 週間～2 週間程度要する」という技術的ハードルの高さがあげられる。これらの技術的ハードルを下げることは一朝一夕では成し得ないが、中性子結晶構造解析のすべての過程（大型結晶作製、中性子回折データ収集および処理、X線回折データを相補的に用いた構造精密化）を幅広く支援することで、構造生物学分野での中性子利用を促進できると考えている。実験責任者らは国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の生命科学・創薬研究支援基盤事業（BINDS）に参画することで、支援体制の確立を目指した。その結果、令和 4 年度から 5 年間、「大規模構造解析施設等を活用したタンパク質等送還構造解析による支援と高度化」課題に、従来の放射光 X 線・NMR・クライオ電顕とともに新たに中性子回折・散乱の参画を果たすことができた。中性子回折実験には、J-PARC/MLF の茨城県生命物質構造解析装置（BL03/iBIX）と JRR-3 の生体高分子用中性子単結晶回折装置 BIX-III,IV（量子科学技術研究開発機構）を供する支援体制を関係者の協力により構築している。

### 2. Experiment

本プログラムの支援受付は 2022 年 8 月から開始しており、中性子結晶構造解析については本課題申請時で 7 件（うち 1 件は産業界ユーザー）の支援要請を受けた。そのうち、中性子回折実験に供する大型結晶を取得できた 1 件（大阪大学福田庸太助教からの支援要請である銅型亜硝酸還元酵素：CuNIR）の中性子回折データ収集を実施した。2022B 期の実験で、CuNIR と基質（亜硝酸イオン）複合体の中性子回折データを収集していたが、この測定は低温下で実施しているため結合モードに対する温度の影響を検証する必要がある。そこで、基質アナログとしてギ酸を用いて複合体状態にし、中性子回折実験を室温下で実施した。計 9 個の結晶を用いた予備的回折実験の結果、 $0.9\text{mm}^3$  程度の結晶を本測定に供した。測定は BL03/iBIX において、1 セットあたり約 6 時間照射（ $T_0=459000$ , 740kW 運転）で空間群  $H3$  として標準である計 40 セット以上を目指し、室温下で収集した。回折データ処理はいずれも解析ソフト STARGazer を用い、データのスケールリングは CCP4 パッケージの SCALA を用いた。

### 3. Results

最終的に計 45 セットの CuNIR/ギ酸複合体結晶の中性子回折データを収集できた。回折点の形状は良好で、 $1.9\text{\AA}$  分解能データとして処理を行った（表）。Photon Factory の BL5A において同一結晶から  $1.2\text{\AA}$  分解能の X 線回折データを収集し、中性子と X 線を相補的に用いた構造精密化を実施した。精密化の結果、室温下でギ酸は  $\kappa 1\text{-O}$  モードで結合していることがわかった（左図）。この結合モードは以前に 100K 下で測定したギ酸複合体 X 線構造で確認されたものと変わりなかった（右図  $\sigma$ ）。この結果は、2022B 期の実験で低温下の中性子構造中で確認した亜硝酸イオンの結合モード（ $\kappa 1\text{-O}$ ）は正確な結合モードで、その後同一結晶から取得した X 線構造において確認された複数の結合モードは X 線照射の影響により生じたものであることを強く示唆するものであった。

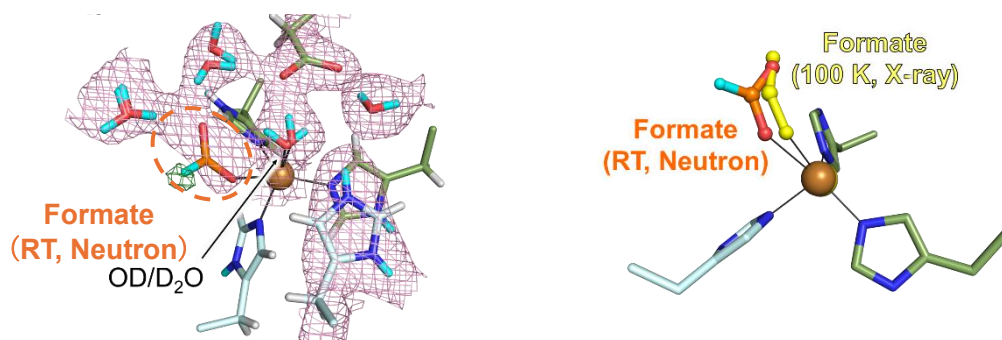


図 CuNIR の活性部位に結合したギ酸（基質アナログ）。左図の網目は原子核散乱長密度（マゼンタ：2Fo-Fc map, +1.3 $\sigma$ ）、緑：Fo-Fc H/D omit map, +2.0 $\sigma$ ）。

表 ギ酸（基質アナログ）結合型の回折データ・構造精密化の統計値

	Neutron	X-ray
<b>Data collection</b>		
Beamline	J-PARC MLF BL03 iBIX	Photon Factory BL5A
Wavelength (Å)	5.28-2.90	1.0
Space group	<i>R</i> 3 ( <i>H</i> 3)	
Unit cell <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	116.2, 116.2, 85.6 ( <i>H</i> 3)	
Resolution range (Å)	20.0-1.90 (1.59-1.90)	43.4-1.20 (1.22-1.20)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	26.4 (89.0)	8.8 (90.0)
<i>R</i> <sub>p.i.m.</sub> (%)	10.8 (42.8)	2.1 (25.3)
Completeness (%)	97.7 (99.5)	4.2 (44.9)
Total reflections	226,653 (25,201)	680,928 (33,514)
Unique reflections	33,212 (4,926)	134,752 (6,689)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	6.5 (1.7)	9.7 (1.7)
<i>CC</i> <sub>1/2</sub>	0.975 (0.527)	(0.701)
Redundancy	6.8 (5.1)	5.1 (5.0)
<b>NX Joint Refinement</b>		
Resolution (Å)	12.9-1.90 (1.94-1.90)	39.4-1.20 (1.21-1.20)
<i>R</i> <sub>work</sub> (%) / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	14.6/18.3 (23.7/25.3)	11.4/11.9 (25.0/26.0)
No. of protein atoms	5033	
No. of ligand atoms/ions	8	
No. of D <sub>2</sub> O	227 (including O and OD types)	
<b>Average B (Å<sup>2</sup>)</b>		
All	30.0	
Protein atoms	28.3	
D <sub>2</sub> O	47.8	
Other atoms	30.8	
<b>Ramachandran plot (%)</b>		
Favored	97.0	
Allowed	3.0	
Outliers	0	

#### 4. Conclusion

今回の解析結果は、中性子から得られる構造が照射還元・損傷を受けない真の結合モードを示すことを改めて示すものであった。これまでの結果とまとめた成果を論文・学会等において広くアピールすることで中性子利用を促進していきたい。なお、ビームタイムを確保できているということもあり、AMED/BINDS への支援要請数は順調に増加している。実験機会を与えていただいたことに感謝したい。