

# 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点で 10 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（茨城大学山口峻英助教からの支援要請であるシュードアズリン Met16Lue 変異体）の中性子回折データ収集を実施した。中性子回折データ収集に先立ち、良質な大型結晶取得の支援として嫌気環境下での結晶化を行い、図 1 に示すようにクラスターの中に良質な大型結晶を取得することに成功した。計 2 個の結晶を用いた予備的回折実験の結果、 $1.7 \text{ mm}^3$  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 5.5 時間照射（ $T_0=459000$ , 880kW 運転）で空間群  $P21$  として標準である計 35 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 を使い、データのスケーリングは CCP4 パッケージの SCALA を用いた。

### 3. Results

最終的に計 45 セットのシュードアズリン M16L 変異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、 $2.2 \text{ \AA}$  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  $1.4 \text{ \AA}$  分解能の X 線回折データを収集したが、このデータを用いた X 線結晶構造解析の結果、変異導入された Leu16 と活性中心の銅イオンに配位した His81 が  $4 \text{ \AA}$  程度の距離で向かい合っていることがわかった（図 2）。中性子結晶構造解析による水素原子の観察が待たれるところであるが、Leu 側鎖のメチル基の水素原子と His 側鎖のイミダゾール環の間に  $\text{CH} \cdots \pi$  相互作用が形成している可能性が考えられる。この  $\text{CH} \cdots \pi$  相互作用が M16L 変異体の安定性維持に寄与し、酸化還元電子の上昇に影響していることが示唆される。

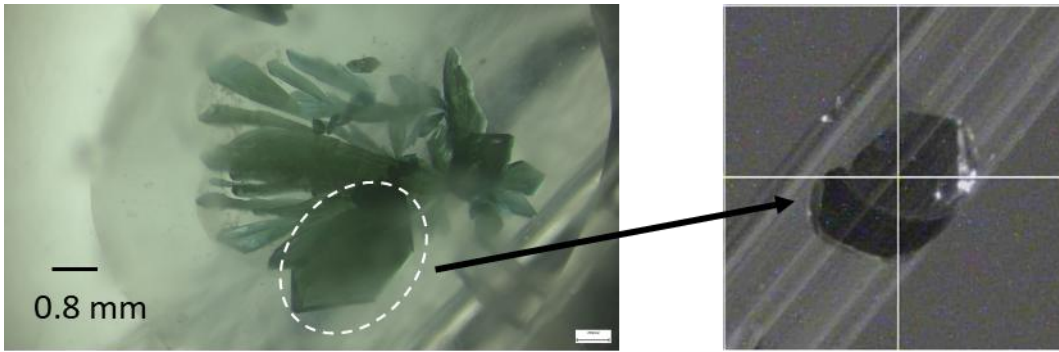


図 1 嫌気環境中で作成したシュードアズリン M16L 変異体の大型結晶（右図はキャピラリーにマウントした状態）

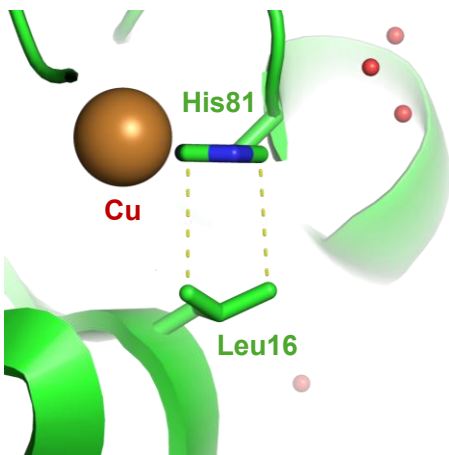


図 2 X線結晶構造解析で確認した His-Leu 間の相互作用

表 シュードアズリン M16L 変異体の回折データ統計値

	X-ray	Neutron
Beamline	KEK PF BL5A	J-PARC BL03
Wavelength/Å	1.0	0.7-4.0
Space group	$P1\ 2_1\ 1$	$P1\ 2_1\ 1$
Unit cell $a, b, c$ / Å	34.821, 61.175, 112.383	34.821, 61.175, 112.383
Unit cell $\alpha, \beta, \gamma$ / °	90, 96.991, 90	90, 96.991, 90
Resolution range / Å	41.22-1.40(1.42-1.40)	19.45-2.20(2.31-2.20)
$R_{\text{merge}}$ (all $I^+$ and $I^-$ )	0.063(2.352)	0.2166(0.8221)
$R_{\text{p.i.m.}}$ (all $I^+$ and $I^-$ )	0.012(0.457)	0.0985(0.3854)
Completeness / %	100(100)	99.0(99.1)
Total reflection	2501694(122622)	190987(17760)
Unique reflection	92235(4530)	33991(3358)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	21.4(2)	10.39(2.08)
CC1/2	0.999(0.785)	0.9868(0.6338)
Redundancy, Multiplicity	27.1(27.1)	5.6188(5.2889)
mosaicity	0.07	

#### 4. Conclusion

今回の解析結果は、嫌気環境を利用した大型結晶作製が良質な中性子回折データ収集に有効であることを示すものであった。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。