

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 11 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結晶を取得できた 1 件（高度化として実施している熱ショックタンパク質 Hsp90 の完全重水素化結晶作製）の中性子回折データ収集を実施した。2021B 期の実験で、Hsp90 と基質（ADP）複合体の中性子回折データを通常の 1/5 程度のサイズ（ 0.22 mm^3 ）の結晶から収集でき、完全重水素化結晶による結晶の小スケール化を実証できた。しかしながら、測定途中に結晶格子長が変化してしまい、さらにその後の X 線回折データ収集の際に再度変化してしまったため、精度良い構造解析に供するデータとはならなかった。そこで、結晶を析出温度（ 10°C ）から測定温度（室温：約 20°C ）に移し、1 カ月以上経過したのちに中性子回折データ収集を行った。使用した結晶は前回とほぼ同サイズ（ 0.23 mm^3 ）で、測定は BL03/iBIX において、1 セットあたり約 6 時間照射（ $T0=510000$, 940kW 運転）で空間群 $P2_1$ 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 を用い、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 Hsp90/ADP 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、前回の測定時にみられた結晶格子長の変化は確認されなかった。最終的に 2.1\AA 分解能データとして処理を行い、Photon Factory の BL5A において同一結晶から 1.4\AA 分解能の X 線回折データを収集し、中子と X 線を相補的に用いた構造精密化を実施した（表）。精密化の結果、アミノ酸残基の非交換性の水素の 98%以上が重水素として観測された。また、以前取得していた Hsp90 単体構造と ADP 複合体構造において、保存されている水和ネットワークが存在することを確認できた（図）。

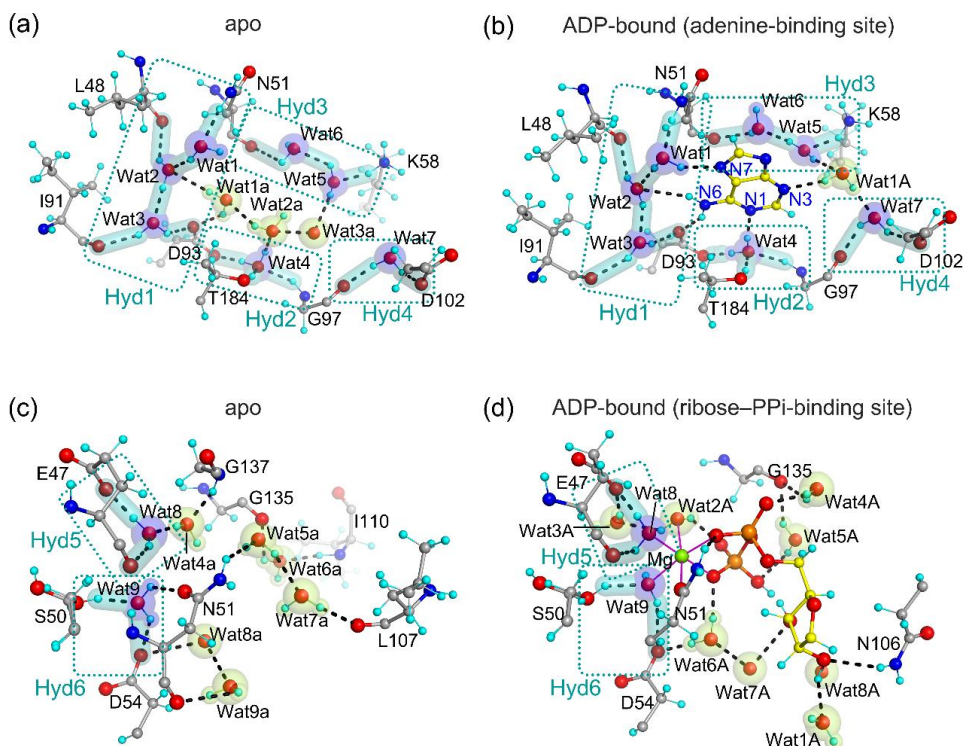


図 Hsp90 で確認された水和ネットワーク。a, b は ADP のアデニン結合部位を単体 (apo) と ADP 複合体で比較、c, d はリボース 2 リン酸部位で各々比較した図。図中の青 (水色点線) が両方で保存された水和ネットワークを示す。

表 ADP 結合型の回折データ・構造精密化の統計値

	Neutron	X-ray
<i>Diffraction data</i>		
Resolution (Å)	21.2-2.1 (2.21-2.10)	48.4-1.4 (1.42-1.40)
Space group	$P2_1$	
Unit cell (Å)	$a = 54.1, b = 42.5, c = 54.9$	
(°)	$\alpha = \gamma = 90, \beta = 116.6$	
Observed reflections	50248 (4313)	888052 (42966)
Unique reflections	12610 (1684)	44131 (2177)
Completeness (%)	95.9 (89.4)	100.0 (100.0)
$I/\sigma(I)$	7.4 (1.5)	39.6 (1.9)
R_{max}^a (%)	16.5 (70.3)	3.3 (195.8)
$R_{\text{p.i.m.}}^b$ (%)	7.8 (39.2)	1.0 (61.4)
$CC_{1/2}$	0.991 (0.627)	1.000 (0.765)
<i>Structural refinement</i>		
Resolution (Å)	21.2-2.1 (2.31-2.10)	
R_{work}^c (%)	18.5 (24.8)	
R_{free}^d (%)	22.6 (30.6)	
R.m.s.d. bonds (Å)	0.012	
R.m.s.d. angles (°)	1.185	
No. of non-H atoms ^e		
Protein	1746	
ADP/Mg	27/1	
Water	115	
No. of H/D atoms		
Protein	1870	
ADP	13	
Water	126	
Average B -factors (Å ²)		
Protein	37.1	
ADP/Mg	24.2/22.1	
Water	39.3	

4. Conclusion

今回の解析結果は、完全重水素化試料を用いることで中性子回折実験に必要な結晶サイズを大幅に下げても高精度な構造解析が可能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。