

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 6 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 2 件（秋田大学松村洋寿准教授からの支援要請であるマクロフェージ遊走阻止因子：MIF、および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。MIF は阻害剤 ISO-1 を浸漬することで複合体状態にし、計 6 個の結晶を用いた予備的回折実験の結果、最も回折が良好であった 2.4mm³ 程度の結晶を回折実験に供した（図 1）。測定は BL03/iBIX において、1 セットあたり約 5 時間照射（T0=447000, 815kW 運転）で空間群 *P3₁21* として標準である計 30 セット以上を目指し、室温下で収集した。CuNIR は基質（亜硝酸イオン）を浸漬することで複合体状態にし、計 6 個の結晶を用いた予備的回折実験の結果、1.8mm³ 程度の結晶を回折実験に供した（図 2）。測定は BL03/iBIX において、1 セットあたり約 6 時間照射（T0=480000, 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、100K 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

MIF については、最終的に計 32 セットを収集できた。回折点の形状は良で、2.05Å 分解能の回折データとして処理を行った（図 1）。Photon Factory の BL5A において同一結晶から 1.45Å 分解能の X 線回折データ収集し ISO-1 の電子密度も明瞭に確認できた（図 1）。現在、中性子と X 線を相補的に用いた構造精密化を実施中である。

CuNIR については、最終的に計 41 セットを収集できた。回折点の形状は良好で、1.40Å 分解能の回折データとして処理を行った（図 2）。Photon Factory の BL5A において同一結晶から 1.00Å 分解能の

X線回折データ収集し、現在両データを用いた構造精密化を実施中であるが、基質である亜硝酸のプロトン化状態と電子の局在化を確認できた（図2）。

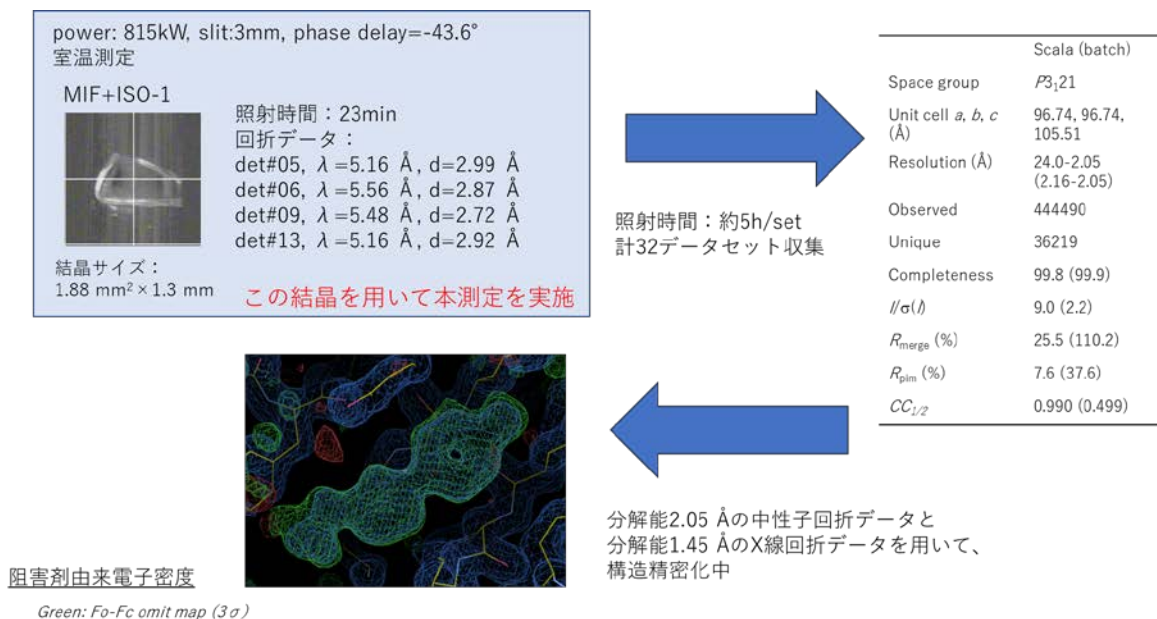


図1 中性子回折実験に供したMIFの結晶（左上）、回折データ統計値（右表）、阻害剤由来電子密度（左下）

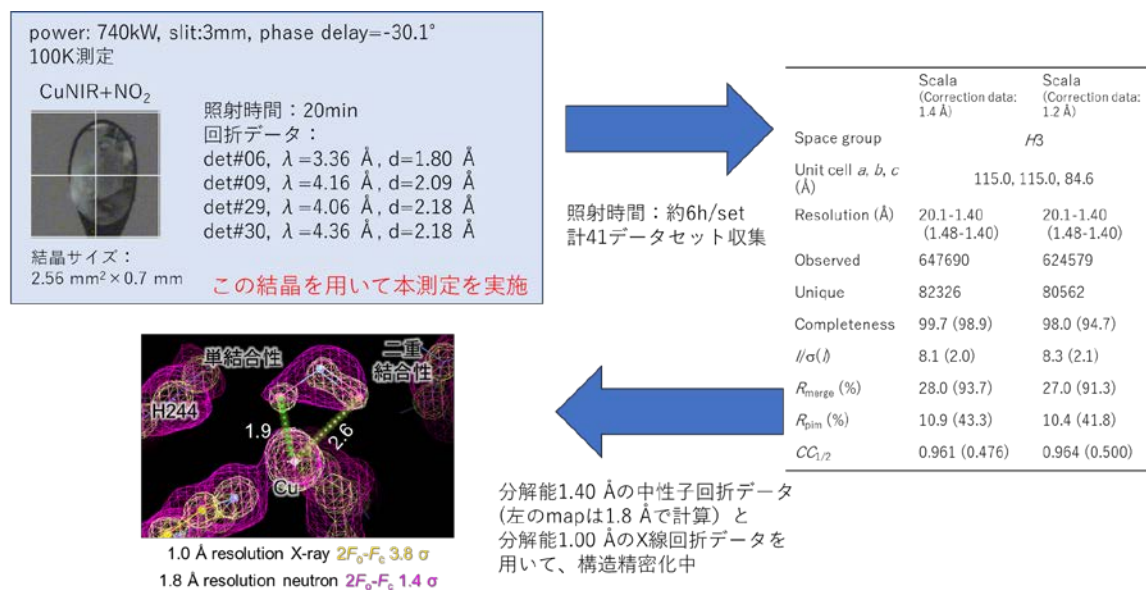


図2 中性子回折実験に供したCuNIRの結晶（左上）、回折データ統計値（右表）、基質由来X-ray/Neutron map（左下）

4. Conclusion

MIF、CuNIRの双方で構造解析可能な回折データ収集に成功した。今後、構造精密化を進め、解析結果を国際誌に発表するとともに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。