

研究報告書

-2015年度研究会活動-

第23回 研究報告会

2016年7月13日



公益財団法人 新世代研究所
FOUNDATION ADVANCED TECHNOLOGY INSTITUTE

水和ナノ構造研究会

中性子回折装置 iBIX が示す新しい構造生物学

委員長 日下 勝弘
茨城大学 准教授

1. 研究構想と概要

サブナノメートルレベルで生体内機能を制御するタンパク質等の周りには、非常に多様な形で水が存在する。あるものは安定に水和し、あるものは運動し、そしてあるものはイオンの形で存在する。タンパク質や核酸 DNA のように特定の大きな構造を持つ生体高分子と比べて、地球上ではありふれた小さな分子である水が、生体高分子とどのように相互作用をして生命活動を成立させているかは、未知な部分が多い。たとえば、タンパク質や DNA が機能する直前の分子認識における水の役割、化学反応中の状態における水の関与したプロトンや水分子自体の授受および水素結合の形成・解消、そして、反応後の水の脱離やタンパク質・DNA分子への再水和・再配置、さらには膜タンパク質のプロトンポンプ機構におけるプロトン等の授受における水の役割のように、生体機能の中において、ナノスケールで絶えず揺らぎながら重要な役割を、黒子のように果たしている。最近では、膜タンパク質などの複雑な系での水の振る舞いなどが注目されており、水素原子位置情報はますます重要視されている。

このような水和ナノ構造の解明には、水素位置決定を得意とする中性子回折法が重要な役割を担い、大強度陽子加速器施設 J-PARC の積極的利用によって加速されることが期待される。現在、生体高分子の中性子構造解析は、米国の中性子源施設 SNS においても、生体高分子解析専用のビームラインが本格的な稼働を開始し成果を出しつつある。また、ヨーロッパにおいても日本、米国に続いて次世代中性子源 ESS の建設が開始され、生体高分子回折装置の設置が最優先の目標の一つとされていることから、その必要性が世界的に認識されていることが伺える。日本の中性子源施設 J-PARC, MLF において、先行して開発・運用されてきた中性子回折計(茨城県生命物質構造解析装置 iBIX)は、今後 1 MW の最高出力を迎え、各種酵素とその基質との複合体や膜タンパク質も含めた水和構造に関して、プロトネーションも含めた機能に直結した水や水素位置構造の解明を目指しており、既に中性子の特徴を生かした成果が出始めている。さらには、生命学のさまざまな場面で用いられる X 線や NMR, 赤外線, 計算科学等との相補的な利用により生命科学分野において重要な知見をもたらすことが期待されている。

本研究会では、上記 iBIX のソフトウェアの改良や必要な大型結晶育成法も含めて、さまざまな実験分野のほか、計算科学研究者にも生体高分子中の水やプロトネーションについて議論を深めてもらい、関連分野の飛躍的な発展を狙う。

本研究会は 2014 年度末で、茨城大学田中教授が委員長の 2 期、計 6 年間の活動期間

が終了し、2015年度から日下が委員長となり、基本的なコンセプトを引き継ぎ、活動を継続している。このため、委員は8名には継続をお願いし、理論計算、ソフト開発、結晶育成の活発な議論を行うことを考慮して7名の方に新規に委員をお願いした。

J-PARC の中性子回折装置 iBIX は 2012 年度に検出器の増強と高度化が行われ、検出器数が 2 倍、検出器感度が 3 倍、加速器出力が 1.5 倍となり、約 1 桁の測定効率向上が実現し、本格的なタンパク質試料への共用を開始した。その直後から東日本大震災、ハドロン実験施設における放射性物質漏洩事故等で何度か運転停止を余儀なくされてきた。しかしながら、少ない運転期間の中で着実に実験を遂行し、タンパク・有機分子での解析例が出、著名な雑誌にも掲載されている。2014 年度には J-APRC の加速器出力が 500kW まで増強され、タンパク質試料の測定の効率の上昇が見込まれたが、その後、中性子源ターゲットの冷却水漏洩とその対応のため現状では 200kW での運転となっている。このように加速器や中性子源の運転は様々なハードルがありながらも、可能な運転時間の中でタンパク質・有機分子結晶共に継続して成果は蓄積されており、2015 年度の初めに 3 つのタンパク質の成果が雑誌に掲載され、そのうち 2 件がプレス発表を行うに至っている。その内容は、中性子の長所を十分に活かし、他の手法（測定条件を含む）ではわからないような水素や水の位置情報が得られており、タンパク質の機能や生体内反応を新たに記述しなおす必要性や創薬に関わるタンパク質の有用な知見が示されている。このように、徐々にではあるが、J-PARC の中性子装置 iBIX が貴重な水素や水の位置情報を提供し始めており、今後、J-PARC の加速器出力が最大となればこの分野の飛躍的な発展が期待できる。

2. 2015 年度の研究活動の概要

水和ナノ構造研究会単独開催の 2 回に加え、生体高分子用中性子回折計 iBIX の運営母体である茨城県が中心となっている中性子産業利用推進協議会が主催する生物構造学研究会および茨城県中性子利用促進研究会が主催する iBIX 研究会との共催の、それぞれ 2 回、4 回も含め、計 8 回の研究会が実施された。

2.1 第 1 回水和ナノ構造研究会

(2015 年 9 月 1 日~2 日 栃木県那須塩原市明賀屋本館)

第 1 回水和ナノ研究会は那須塩原市の温泉地で行われた。外部講師 3 名と委員関係者 10 名合わせて、参加者総計は 14 名であった。本研究会は 2015 年度から日下が委員長となり、基本的なコンセプトを引き継ぎ、活動を継続することとなり、前回から 8 名の委員が継続し、新たに 7 名の委員の方に加わっていただき、新しい体制となったので、第 1 回の研究会は委員の方々にそれぞれの自己紹介と研究発表を行っていただき、それぞれの研究分野を互いに理解し、今後の研究会活動の足がかりとすることとした。



(写真 1) 第 1 回研究会の様子

まず、日下が本研究会の主たるテーマである水和構造の解明に重要な中性子回折計の茨城県生命物質構造解析装置 iBIX の現状について報告した。iBIX は 2012 年度に検出器の増強を終え、測定効率が 1 桁向上し、タンパク質試料への本格的共用が開始された。2015 年度には、「水素原子の観測により、アスパラギン側鎖がイミド酸型として観測される」、「プロトンの授受に関与しうるヒドロニウムイオンが観測される」、「エネルギーの低い中性子を用いることにより天然に近い構造が観測される」等、中性子の特徴を生かした興味深い成果が得られている。現在は、検出器の位置精度向上、積分精度の向上が進められ、より精度の高い構造情報の抽出を試みている。装置グループ員である矢野直峰氏は iBIX における積分精度の向上のため新たにプロファイルフィッティング法を応用した積分法を開発し、積分強度の統計精度向上に成功している。これらの精度向上の状況について、活発な議論が行われ、新たな手法開発について有用な意見が得られた。また、同じく iBIX の装置グループ員である田中伊知朗氏は、

中性子構造解析によって得られるタンパク質分子中の実際のプロトネーション状態が、リガンド・タンパク質間の相互作用、分子認識、立体構造安定性に重要な要因であり、生理的機能を理解する上で重要であることをこれまでの解析例を元に紹介され、その有用性が示された。横山武司氏は iBIX を用いた創薬標的タンパク質の中性子構造解析の成果について紹介された。その詳細は後述の研究成果のトピックスに記載されている。

中性子回折における一つの重要な課題である結晶育成について、高野和文氏は、溶液攪拌技術による結晶の高品質化や大型化技術の開発について発表され、タンパク質結晶の結晶成長において、水の流れや粘性が影響を及ぼすことが示された。山田貢氏は JAXA が実施している高品質タンパク質結晶生成実験について発表された。これまでの 10 年に及ぶ技術開発によって、宇宙実験により高い確率で高品質な結晶を得られるよ

うになっていることが示された。今後は中性子構造解析を見据えた、大型結晶の生成にも取り組むことを予定しているということであるので、我々の研究会としても今後注目すべきであり、共同研究等の方向性を探るべきであると考えられる重要な報告であった。

茶竹俊行氏は単角質結晶学に対して、水素原子の同位体効果を利用した D/H コントラスト法の適用を行った結果を報告された。本方法は結晶成長や装置の高度化とは異なった形でタンパク質の水素原子の情報を増やすことができる手法であり、ある種のタンパク質については非常に有用な手法であることが分かった。今後、iBIX で測定されるデータについても適用を考えるべきものであった。

秋山良氏は、結晶化理論においてマクロアニオン間の実行相互作用を積分方程式理論を用いて計算し、その実行相互作用を用いてマクロアニオンの凝集挙動をモンテカルロシミュレーションを用いて議論し、科学反応が関与した場合の秩序形成崩壊の議論がされた。重田育照氏によりタンパク質の構造予測、酵素反応の解析や pKa の予測を目的とした構造サンプリング手法や酵素反応シミュレーションの研究例が紹介された。今後、どのように中性子から得られた構造情報をシミュレーションに生かして、互いに相補的な情報を与えていくか詳細な議論が必要である。

研究会両日に渡って多彩な研究紹介が行われ、活発な議論の後、閉会した。

2.2 第2回水和ナノ構造研究会 (2016年3月6日～7日 宮城県仙台市華ノ湯)

第2回の水和ナノ研究会は仙台市の秋保温泉にて、「高度なプロトネーション分析が拓く pKa 機能分子科学」というテーマで開催した。

1人目の外部講師は、茨城大学の海野昌喜氏で、「プロトネーションを回折散乱法で見る」というタイトルで、実際には光合成色素合成酵素 PcyA とビリベルジンとの複合体の中性子結晶構造解析を行った結果を中心に発表していただいた。ビリベルジンに水素が一つ余分に付いた状態が混在していること、およびその水素化部位、周囲のアミノ酸の水素化状態を解明し、水素原子の有無により、酵素反応がコントロールされることが分かった。また、これらの結果から初期段階の反応メカニズムの提唱に至った。さらに、X線解析では、エネルギーの高いX線照射で発生する電子により、酵素の構造が本来と違う形に変化することが分かった一方で、エネルギーが低い中性子の利用により、水素を可視化すること以外に、より天然状態に近い酵素の構造を解析することができた。iBIX を用いた中性子構造解析として中性子の特徴を生かした研究成果であり、中性子回折法がタンパク質の機能解明に有効であることを非常によく示す結果をご報告いただいた。

2人目の外部講師は長岡技術科学大学の城所俊一氏で、「生体分子機能とプロトネーションの関係を熱・分光法で解明する」というタイトルで発表いただいた。熱・分光法による新しい測定法により生体分子機能とプロトネーションとの関係を解明することを目指しており、溶液条件下での ATP 加水分解反応のエンタルピーを評価する方法が

確立されている。またこの方法により、pH8.5のATP加水分解全体反応エンタルピーは3~50mMの範囲で大きなMg²⁺濃度依存性を持つことが明らかとなった。また、Mgイオン共存時のピロリン酸加水分解反応に伴う水素イオン放出量を等温滴定型熱量計による測定の結果から評価する手法についても発表された。

3人目の外部講師は九州大学の吉田紀生氏で、「プロトネーションと生体分子機能の予測：理論的アプローチ」というタイトルで発表いただいた。生体内分子のプロトン化状態を記述するためには、生体分子や水、イオンといった環境下での化学反応すなわち電子状態変化を扱う理論が必要となる。量子化学及び統計力学の種々の理論を組み合わせることで、生体分子のプロトン化状態の予測とプロトン化状態変化によって起こる生体分子機能解析に向けた理論開発が行われている。実際にチャンネルロドプシンについて理論計算を行い、理論計算から連続的な水の分布の観測に成功している。

2.3 共催による研究会

その他、共催で開催された6研究会の概要を以下に示す。

2.3.1 茨城県 iBIX 研究会

第9回 iBIX 研究会 平成27年6月5日

新村 信雄氏 (茨城大学)

「中性子タンパク質結晶構造解析の目指す方向」

第10回 iBIX 研究会 平成27年8月18日

神谷 信夫氏 (大阪市立大学)

「ADPRaseの結晶相反応におけるプロトン挙動」

第11回 iBIX 研究会 平成27年10月28日

岡島 俊英氏 (大阪大学) / 村川 武志氏 (大阪医科歯科大学)

「銅含有アミン酸化酵素の反応中間体構造と触媒機構 / 銅含有アミン酸化酵素の大型結晶調製と予備的中性子回折測定」

第12回 iBIX 研究会 平成28年1月27日

千田 美紀氏 (高エネルギー加速器研究機構)

「フェレドキシン還元酵素 BphA4 の酸化還元状態依存的な構造変化と親和性調節機構の解明」

*開催場所はいずれも茨城県東海村いばらき量子ビーム研究センター

2.3.2 中性子産業利用推進協議会 構造生物学研究会

平成27年度第1回生物構造学研究会『分子イメージングとタンパク質結晶成長技術』
(平成26年11月17日, 東京都千代田区エッサム神田ホール, 2F 多目的ホール)

「茨城県生命物質構造解析装置 iBIX の現状」 日下 勝弘 (茨城大学)

- 「光合成色素合成酵素の中性子結晶構造解析」 海野 昌喜 (茨城大学)
「クライオ電子線トモグラフィーによる繊毛・鞭毛の「構造遺伝学」」 吉川 雅英 (東京大学)
「クライオ電子顕微鏡と光学ナノ計測による分子モーターの構造・動態解析」 難波 啓一 (大阪大学)
「X線レーザーによる細胞のナノレベルイメージング」 西野 吉則 (北海道大学)
「「きぼう」を利用する高品質タンパク質結晶生成実験」 朴 三用 (横浜市立大学)
「中性子結晶構造解析に向けたタンパク質結晶成長技術」 千田 美紀 (KEK)

平成 27 年度第 2 回生物構造学研究会『中性子で観る水・生命体のダイナミクス』

(平成 28 年 3 月 10 日, 東京都新宿区研究社英語センター, 大会議室)

- 「たんぱく質の動態を可視化する高速 AFM」 安藤 敏夫 (金沢大学)
「電顕イメージングと計算機シミュレーションによる 2D ハイブリッド解析」 岩崎 憲治 (大阪大学)
「NMR による酵素のダイナミクスとプロトネーション」 池上 貴久 (横浜市立大学)
「酵素によるオリゴ糖合成を目指した立体構造解析」 伏信 進矢 (東京大学)
「たんぱく質結晶の X 線トポグラフィと力学物性」 橘 勝 (横浜市立大学)
「たんぱく質結晶化における新しい技術」 高野 和文 (京都府立大学)

3. 研究成果とトピックスなど

最初の節の概要でも述べたが, J-PARC でのハドロン事故後, 安定して動き出した iBIX で測定したタンパク質の結果が, 2015 年になって 2 つの論文として発表されることになった。これらは, 中性子の長所を十分に活かしたもので, かつ, 希少で新しい構造生物学的な知見が含まれており, トピックスとして取り上げる。

3.1 中性子結晶構造解析によるセルロース分解酵素セルラーゼの加水分解時のアミド-イミド互変異性を伴うプロトンリレーの可視化¹⁾

日下委員長, 新村委員, 田中委員ほか茨城県 BL 関係者が中性子実験の中心的サポートを行ったセルロース分解酵素セルラーゼの基質有無それぞれに対応する 2 つの中性子解析と X 線超高分解能解析についてである。このセルラーゼは逆転型の加水分解を行ってセルロースを分解するものと考えられていたが, 触媒残基に酸性アミノ酸が存在せず, その反応機構が明らかでなかった。今回の中性子解析で, 中性アミノ酸が互変異性化してイミド酸に変化していたことがわかり, かつ, この加水分解反応で移動するプロトンの様子が, ニュートンのゆりかご (カチカチ玉) のように, 分子内部を低密度ながらも通路として捉えることができた。

1) "Newton's cradle" proton relay with amide-imidic acid tautomerization in inverting cellulase

visualized by neutron crystallography

Akihiko Nakamura, Takuya Ishida, Katsuhiko Kusaka, Taro Yamada, Shinya Fushinobu, Ichiro Tanaka, Satoshi Kaneko, Kazunori Ohta, Hiroaki Tanaka, Koji Inaka, Atsushi Nakagawa, Yoshiki Higuchi, Nobuo Niimura, Masahiro Samejima and Kiyohiko Igarashi, *Science Advances* (2015) e1500263.

3.2 PPS-ビスホスホネート複合体におけるプロトン化状態と水和構造²⁾

横山委員, 日下委員長, 新村委員, 田中委員ほかの共同研究として, 骨粗しょう症薬剤ビスホスホネートとその疾患に大きく関わる標的タンパク質であるファルネシル二リン酸合成酵素 (FPPS) 複合体の中性子結晶構造解析を, J-PARC の茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) とドイツのハインツ・マイアー・ライブニッツ中性子源 (FRM II) の中性子回折装置 (BIODIFF) を利用して行った。その結果, ビスホスホネートのリン酸基の水素原子が取れてすべて完全な脱プロトン化状態 (負イオン) となり, 正の電荷を帯びた標的タンパク質の水素や水分子の水素と結合していることを明らかにした。このことは, 水素と親和性の高い部分が豊富な薬剤の方が標的タンパク質阻害剤として効率が良いことを示唆しており, 副作用の少ない薬剤の設計の重要な手掛りとなりうるものである。

2) Protonation State and Hydration of Bisphosphonate Bound to Farnesyl Pyrophosphate Synthase

T. Yokoyama, M. Mizuguchi, A. Ostermann, K. Kusaka, N. Niimura, T. E. Schrader, I. Tanaka *J. Med. Chem.* (2015) 58, 7549-7556

4. 研究会開催記録

【第1回】2015年9月1日(火)～2日(水) 於) 塩原温泉

テーマ:「研究内容の発表と自己紹介」

9月1日(火)

日下 勝弘 (茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター)

田中 伊知朗 (茨城大学工学部生体分子機能工学科)

新村 信雄 (茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター)

大橋 裕二 (東京工業大学)

茶竹 俊行 (京都大学原子炉実験所粒子線基礎物性研究部門)

今野 美智子 (茨城県)

秋山 良 (九州大学大学院理学研究院)

9月2日(水)

高野 和文 (京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

山田 貢 (宇宙航空研究開発機構有人宇宙技術部門)

横山 武司 (富山大学大学院医学薬学研究部)

重田 育照 (筑波大学計算科学研究センター)

富田 賢一 (株式会社ヴィジブルインフォメーションセンター)

矢野 直峰 (茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター)

【第2回】2016年3月6日(日)～7日(月) 於)秋保温泉

テーマ「高度なプロトネーション分析が拓く pKa 機能分子科学」

3月6日(日)

1. 「iBIX 現状説明」

日下 勝弘 (茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター)

2. 「プロトネーション実測方法の基盤技術を開発する」

田中 伊知朗 (茨城大学工学部生体分子機能工学科)

3. 「プロトネーションを回折散乱法で見る」

海野 昌喜 (茨城大学大学院理工学研究科)

4. 「生体分子機能とプロトネーションの関係を熱・分光法で解明する」

城所 俊一 (長岡技術科学大学生物機能工学専攻)

5. 「Future Prospect in Neutron Protein Crystallography(NPC)」

新村 信雄 (茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター)

3月7日(月)

1. 「プロトネーションと生体分子機能の予測:理論的アプローチ」

吉田 紀生 (九州大学大学院理学研究院)

2. 総合討論

矢野 直峰 (茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター)

高野 和文 (京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

秋山 良 (九州大学大学院理学研究院)

ほか全員

水和ナノ構造研究会委員

委員長	日下 勝弘	茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター 准教授
委員	田中 伊知朗	茨城大学工学部生体分子機能工学科 教授
	新村 信雄	茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター 特命研究員
	五十嵐圭日子	東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授
	茶竹 俊行	京都大学原子炉実験所粒子線基礎物性研究部門 准教授
	秋山 良	九州大学大学院理学研究院 准教授
	今野 美智子	茨城県 産業利用コーディネーター
	大橋 裕二	東京工業大学 名誉教授
	矢野 直峰	茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター 産学官連携助教
	横山 武司	富山大学大学院医学薬学研究部 助教
	石北 央	東京大学先端科学技術研究センター 教授
	重田 育照	筑波大学計算科学研究センター 教授
	富田 賢一	株式会社ヴィジブルインフォメーションセンター 主任研究員
	高野 和文	京都府立大学大学院生命環境科学研究科 教授
	山田 貢	宇宙航空研究開発機構有人宇宙技術部門 主任開発員

(2016年3月現在 所属・役職は当時)