# 研　究　報　告　書

## -2016年度研究会活動-

第24回　研究報告会

2017年7月11日

ATI
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

# 単結晶中性子回折装置 iBIX による新たな構造生物学

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 教授

## １．研究構想と概要

サブナノメーター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での水の役割のように、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 の建設が開始しており、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おり、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１MW 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 のソフトウエア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 2015 年度から前研究会の基本的なコンセプトを引き継ぎ、日下が委員長となり活動を継続しており 2016 年度は２年目となる。会員は１名が 2015 年度末に辞退され、それ以外の 14 人は継続している。2015 年度の本研究会において発表をお願いし、活発な議論を行っていただいた茨城大学の海野教授に 2016 年度から新たな会員に加わっていただいた。

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、本格的なタンパク質試料への共用を開始した。しかしながら、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、中性子源ターゲットの冷却水漏洩等で度々運転停止を余儀なくされ、一度は加速器出力 500kW での運転がなされていたが、現在は新たなターゲットの開発・導入までは旧型のターゲットを用いた低出力の 150kW での運転となっている。現状の中性子によるタンパク質の回折実験においては、中性子源の出力が測定効率と直結しており、昨年度からはタンパク質の測定数が制限されている。その数少ない測定数の中でも共用実験は着実に進められており、有効なデータ測定が実施できている。iBIX は計画時の目標として、既存の中性子回折計（BIX-3,4,JRR-3M, JAEA）の 50 倍の測定効率を有し、135X135X135Å$^3$の格子体積のタンパク質結晶の測定が可能であることとしていた。50 倍の測定効率を有することはタンパク質標準試料の測定により 2012 年度に実証済みで、加速器出力 1MW 時には 2mm$^3$ の試料が 2～4 日程度で測定可能であることが分かっていた。2016 年度には、装置グループの一員が、133.3X133.3X133.3Åの格子体積をもつタンパク質試料の大型結晶育成に成功し、iBIX を用いて 2.4Å分解能の中性子回折データを取得し、構造解析まで成功した。これにより、iBIX は測定効率、測定可能格子体積、測定可能分解能について、目標通りの性能を達成していることが実証され、加速器出力が 1MW になれば、世界最高性能の生体高分子用単結晶中性子回折装置となることが分かっている。2017 年度の夏には不具合が修正された新たなターゲットへの交換が予定されており、現在の２倍の 300kW での運転再開が予定されている。さらに、2018 年の 1 月には 500～600kW への出力増強も予定されてる。iBIX 自身の高度化についても、検出器の測定効率を向上させるために、検出器の増強や検出器の感度向上のための開発を進めている。加速器出力の増強と iBIX 自身の高度化が進めば、これまでに中性子では測定対象とはならなかった試料の測定が行える状態に移行することができ、この分野の飛躍的な発展が期待できると考えている。

## ２．2016 年度の研究活動の概要

2016 年度は、水和ナノ構造研究会単独、および水和ナノ構造・バイオ単分子合同研究会を開催した。またこれに加えて、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 研究会との共催がそれぞれ 2 回、4 回あり，合計で 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

（2016 年 10 月 4 日（火），東京 ATI 会議室）

第 1 回水和ナノ研究会は東京都の ATI の会議室にて行われた。外部講師 4 名をお迎えし「生体反応に関わるプロトンを捉える」というテーマで開催した。

1 人目の外部講師は，佐賀大学の海野雅司氏で、「ラマン円偏光二色性分光を用いた光受容タンパク質の構造解析」というタイトルでご講演頂いた。振動分光方法は分子構造や分子の周辺環境に関する有用な情報を与えてくれる。光受容タンパク質のような活性中心として色素分子を含んだタンパク質へも応用可能な視光励起に加え近赤外励起のラマン光学活性分光装置を独自に開発した。バクテリオロドプシン、Photoactive Yellow Protein 等にこの手法が応用され、発色団の面外方向への歪みなどの発色団の構造を捉えることができ、その事例が紹介された。結晶構造解析とは相補的な役割を果たし得る手法として非常に興味深い結果であった。

2 人目の外部講師は京都大学の金賢得氏で、「水素核の量子性を取り入れた量子分子動力学法の構築と、水および水素凝縮相の未知物性の発見と解明」というタイトルで発表いただいた。発表者は、水素の核だけでなく電子も同時に波束化し、クラスターから高圧固体まで幅広い水素凝縮相への適用が可能な量子分子動力学法と呼べる手法を開発した。本発表では、液体水における半量子分子動力学法での経験や、水や水素の凝縮相において、水素核の量子性がどのような役割を果たしているかについて議論がなされた。本研究会ではタンパク質における水素、水、プロトネーションにおける情報について議論を行ってきている。中性子や X 線での実験的手法ばかりでなく、シミュレーションも重要な役割を担うと考えている。発表者が開発された量子分子動力学法のような非常に精密なシミュレーションの知見が、タンパク質などの大きな分子の機能やダイナミクス理解に応用されることが期待される。

3 人目の外部講師は大阪大学の岡島俊英氏で、「銅アミン酸化酵素の反応中間体構造と中性子構造解析の現状」というタイトルで発表いただいた。銅アミン酸化酵素は、各種の一級アミンを酸化的脱アミノ化する酵素である。本酵素のユニークな点は、補酵素 TPQ は特定のチロシン残基から、酵素の自己触媒的な酸化反応によって作り出されていることであり、単一回転の補酵素形成反応と多回転の触媒反応の二機能性酵素であり、二つの解析すべき反応機構がある。両反応に対して、反応中間体構造を決定し、反応速度論的な解析とあわせ、詳細な分子機構を明らかにすることを目指し、補酵素あるいは中間体が、２つのコンフォメーションを切り替えながら効率的に反応を進行させていることが明らかになったと紹介された。また、反応におけるプロトン移

動を可視化するため、茨城県中性子ビームライン iBIX において本酵素の中性子回折にも取り組んでおり、非常に大型で良質な結晶化に成功している。iBIX で参加型 AGAO の中性子構造解析用のデータの測定がすでに行われており、約 1.7Å分解能のデータを取得し構造解析に成功している。中性子回折の特長を活かした解析結果が得られており、今後、中間体構造を含めた中性子構造解析による反応機構の解明が期待される。

iBIX では加速器出力の増強により、より幅広いタンパク質での測定が行われることが予想される。これらが活発に進むためには、大型で良質な結晶の育成が非常に重要である。そこで 4 人目の外部講師として、X 線での良質なタンパク質結晶化について（株）コンフォーカルサイエンスの田仲広明氏に講演をお願いした。「タンパク質結晶化の技術－CS/MF での取り組み―」というタイトルで発表頂いた。結晶化向けのタンパク質試料では、その均一性と結晶生成の成否、あるいは得られた結晶の良否との間には、高い相関があることが経験的にわかっており、SDS-PAGE、Native-PAGE、2 次元電気泳動、高分解能イオン交換クロマト、動的光散乱による試料の評価により、精製過程の見直しや、より分離の良いクロマトによる精製の適用で試料性状を改善することができることが紹介された。タンパク質の結晶化は、タンパク質分子表面への溶媒分子のアクセスが低下することと密接な関係があり、タンパク質の結晶生成では、タンパク質分子が持つ電荷を中和するようなカウンターイオンの存在が重要であることが紹介された。中性子回折に適する分解能の高い大型の単結晶の作成に関しては、現在経験の蓄積を進めているところであるとのことだが、X 線解析向けのタンパク質結晶化に関する知見は大型結晶育成にも非常に有用であり、これらの経験が大型結晶育成に反映され経験が蓄積されていくことが望まれる。

全てのご講演で会員を交えて非常に活発な議論が交わされ有意義な研究会となった。

第 1 回研究会の様子

2.2　水和ナノ構造・バイオ単分子合同研究会

（2017 年 3 月 27 日（月），東京都ソラシティーRoom D）

第２回の水和ナノ構造研究会はバイオ単分子研究会と合同で開催された。場所は東京都ソラシティーで、「タンパク質ダイナミクスへの多角的アプローチ」というテーマで開催した。両研究会で各々２名の外部講師をお招きした。本報告では、本研究会側からお招きしたお二人の講師の発表について報告する。

1 人目の外部講師は，理化学研究所の上坂友洋氏で、「トリプレット DNP ～高温・低磁場での核偏極生成とタンパク質研究における展望～」というタイトルでご講演いただいた。固体中で核偏極を生成する標準的な技術として、電子の熱偏極を原子核に移行する、いわゆる動的核偏極(DNP)法がよく知られている。この手法を応用し、タンパク質内の水素を偏極することで水素の散乱長を増大させ、水素由来のバックグラウンドを低減させることにより水素原子の感度を上げるという手法に iBIX グループは着目してきたが、タンパク質単結晶を極低温かつ高磁場下に置くことは非常にハードルの高いものであると認識していた。発表者のグループはペンタセン分子を用いた新しい DNP 法である「トリプレット DNP 法」を開発している。この手法では、電子の熱偏極を用いず、ペンタセン分子の光励起三重項状態に生じる電子偏極を用いている。この電子偏極が温度にも磁場強度にも依存しないという特徴を活かすと、従来型 DNP 法が苦手としている、常温を含む高温、1 テスラを遥かに下回る低磁場での偏極生成が可能となる。実際には極低温を作る装置が必要なく、液体ヘリウムを必要とせず、生体高分子にやさしい条件で核偏極の増大ができる。まだまだ萌芽的な技術であるとのことであり、ペンタセン分子をタンパク質単結晶内に導入する方法等まだまだ乗り越えるべき壁はあると思われるが、タンパク質の核偏極法を検討する我々にとっては非常に興味深く、新たな可能性を感じる講演であった。

2 人目の外部講師は奈良先端科学技術大学の廣田俊氏で、「金属タンパク質の構造変化：活性部位の構造変化とタンパク質の超分子構造体形成」というタイトルで発表いただいた。自然界には、最も単純な化学反応である水素分子の合成・分解（$2H^+ + 2e^- \leftrightarrows H_2$）を極めて効率的に行う酵素であるヒドロゲナーゼが存在する。[NiFe]ヒドロゲナーゼには様々な状態が存在し、不活性状態と活性状態の 2 状態に大別される。触媒反応が起こる時、水素分子の合成・分解により[NiFe]活性部位の配位構造は 3 つの活性状態を行き来する活性化サイクルを形成することが知られている。本講演では活性化サイクルの新しい中間体の検出と本酵素の光活性化の成功について紹介された。また、新しい生体分子技術の観点から注目されているタンパク質の超分子化について、タンパク質分子間で同一構造領域を交換するドメインスワッピングにより、シトクロム $c$ が多量体を連続的に形成し、ポリマー化する機構を明らかにした例をご紹介頂いた。生体を構成するタンパク質は、有機化合物に比べ高い生体適合性を示すため、タンパク質から成る超分子は新しい生体適合性に優れた機能性材料となりうるものである。

新たな超分子の機能の機構解明に中性子回折が適用される等の今後の相互発展を期待したい。

合同研究会の様子

2.4　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。

2.4.1　平成 28 年度茨城県 iBIX 研究会:

第 1 回 iBIX 研究会　平成 28 年 5 月 20 日

庄村　康人氏（茨城大学）

「L-アミノ酸リガーゼの基質特異性と反応機構の解明」

第 2 回 iBIX 研究会　平成 27 年 8 月 29 日

樋口　芳樹氏（兵庫県立大学）

「[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒反応機構の解明」

第 3 回 iBIX 研究会　　平成 27 年 12 月 7 日

原　利明氏（大阪大学）／杉山　成氏（大阪大学）

「脂肪酸結合タンパク質を用いたタンパク質-リガンド-水の構造機能と相互作用の解明」

第 4 回 iBIX 研究会　平成 28 年 3 月 9 日

山田　太郎（茨城大学）

「セリンタンパク質分解酵素の中性子回折による反応機構の解明」

＊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

2.4.2　中性子産業利用推進協議会　構造生物学研究会:

平成 28 年度第 1 回生物構造学研究会

『構造生命科学の最前線と医薬品産業総合戦略の展望 1』

（平成 28 年 9 月 2 日(金)，研究社英語センター大会議室）

「iBIX の現状と利用成果」　日下 勝弘(茨城大学)

「一本鎖核酸を認識する Toll 様受容体の構造科学的研究」　清水 敏之（東京大学）

「システムズバイオロジーを指向した構造生物学的手法の開発」
上久保 裕生（奈良先端科学技術大学院大学）
「自由電子レーザー SACLA を用いた構造生物学」
岩田 想（京都大学大学院医学研究科）
「インフルエンザウイルスの細胞内増殖機構」野田 岳志（京都大学ウイルス研究所）
「薬剤耐性を克服する抗菌薬創出に向けた結晶構造解析」
山田 雅胤（Meiji Seika ファルマ）
「Unstructured/Structured 相互作用を標的にした創薬」
小路 弘行（㈱PRISM BioLab）
「レニン阻害剤の Structure-based drug design」高橋 瑞稀（第一三共 RD ノバーレ）

平成 28 年度第 2 回生物構造学研究会
『構造生命科学の最前線と医薬品産業総合戦略の展望 2』
（平成 29 年 3 月 29 日(水)，東京都新宿区研究社英語センター、大会議室）

「茨城県生命物質構造解析装置 iBIX の現状と利用成果」　日下 勝弘（茨城大学）
「カルシウムポンプの構造生物学 - 燐脂質との相互作用」　豊島 近（東京大学）
「PF 小角散乱ビームラインにおける BioSAXS 測定解析」　清水 伸隆（KEK/PF）
「生命科学におけるコヒーレントＸ線回折イメージングの展開」
中迫 雅由（慶応大）
「医薬品産業に新風を吹き込むバイオベンチャーの活躍」　松本 正（レクメド）
「臓器線維症に対する siRNAHSP47 を用いた治療法の開発」
新津 洋司郎（札幌医科大学）
「脳梗塞を標的とした DDS 製剤の開発」　奥 直人（静岡県立大学）
「ＤＤＳ技術による創薬：企業的観点から見たその重要性」　菊池 寛（エーザイ）

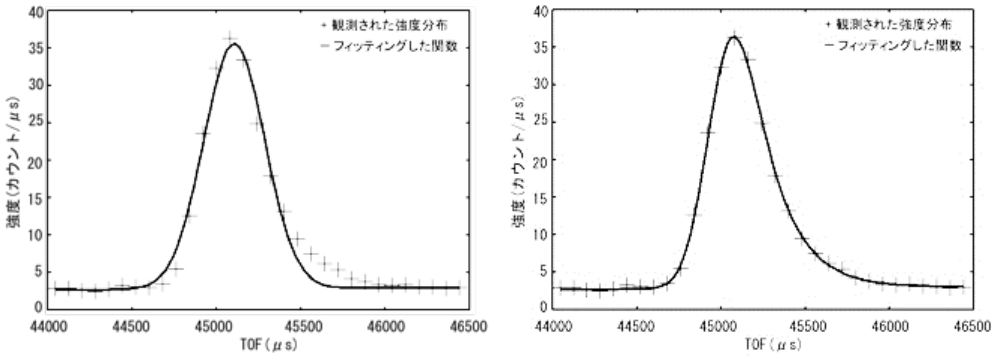
## ３．研究成果とトピックスなど

iBIX は、飛行時間型単結晶中性子回折計であり、白色中性子を用いた測定を行っている。また、タンパク質の非常に弱い中性子回折強度データから可能な限り高い精度で積分強度を抽出する必要があるため、これまでデータ処理法で様々な工夫を行ってきた。その一つとして新たな積分法を開発し高精度な積分を実現することができるようになったので、これをトピックスとして取り上げる。

### 3.1　積分精度の向上–プロファイルフィッティング法の開発

【概要】回折能の低いタンパク質の TOF 回折データから高精度に積分強度を抽出することができるプロファイルフィッティング法を開発し，積分精度及び構造精密化の精度を向上することに成功した。

iBIX は飛行時間法により単結晶中性子回折データを測定する装置である。回折能の低いタンパク質単結晶の中性子回折データから水素原子やプロトンの構造を最大限に引き出すためには，弱い反射の積分強度を高精度に抽出する必要がある。測定した TOF 回折データから，可能な限り精度の高い積分強度データを抽出するためのデータ処理手法としてプロファイルフィッティング法を用いた積分強度抽出法の開発を行った。iBIX はタンパク質の弱い回折強度を測定するためにビーム強度を優先し，結合型減速材のビームラインに設置されており，得られた中性子回折データの TOF 方向の強度分布は非結合型減速材のものと比べて非対称性の高いものである。そこで，iBIX で測定された中性子回折データに対して，既存の非対称な TOF プロファイル関数を複数検索した。粉末結晶用データ処理プログラム GSAS で用いられている指数関数とガウス関数を畳み込んだ関数（図 14 右）が強度分布との一致がよく（対称なガウス関数ではテールが一致しない図 14 左），パラメータ数も少ないため（５個），最も適した関数と判断した。弱い反射の積分強度をプロファイルフィッティング法により求めるアルゴリズムを考案し，プログラムを試作した。タンパク質試料の解説データに対してプロファイルフィッティング法を適用した。従来の Summantion 法と強度データの等価反射の一致度 $R_{merge}$・$R_{pim}$，構造精密化後の信頼度因子 $R_{work}$・$R_{free}$ を比較したところ，高分解能領域で改善がみられた。標準的な試料である，リボヌクレアーゼ A の場合，$R_{merge}$ が最も強度の弱い回折点群で 37.5%から 28.0%と絶対値で 9.5%向上した。開発したプロファイルフィッティング法は回折データ処理ソフト STARGazer に実装され，ユーザーが容易に利用できるようになっており，現在はマニュアルとともにユーザーに対して配布が可能である。本成果はプレス発表を実施している。




横軸 TOF の非対称な強度分布に関数を非線形最小二乗法でフィッティングした結果
左）対称なガウス関数（テールが一致しない）
右）ガウス関数と指数関数を畳込んだ非対称関数

参考文献

″Application of profile fitting method to neutron time-of-flight protein single crystal diffraction data collected at the iBIX“
Naomine Yano, Taro Yamada, Takaaki Hosoya, Takashi Ohhara, Ichiro Tanaka & Katsuhiro Kusaka
Scientific Reports 6, 36628(2016)

## 研究会開催記録

【第 1 回】2016 年 10 月 4 日（火）御茶ノ水

テーマ：　「生体反応に関わるプロトンを捉える」

1.「ラマン円偏光二色性分光を用いた光受容タンパク質の構造解析」
　　海野　雅司（佐賀大学）
2.「水素核の量子性を取り入れた量子分子動力学法の構築と、
　水および水素凝縮相の未知物性の発見と解明」
　　金 賢得（京都大学）
3.「銅アミン酸化酵素の反応中間体構造と中性子構造解析の現状」
　　岡島 俊英（大阪大学産業科学研究所）
4.「タンパク質結晶化の技術　－CS/MF での取り組み―」
　　田仲 広明（(株）コンフォーカルサイエンス）

【第 2 回】2017 年 3 月 27 日（月）御茶ノ水

バイオ単分子研究会との合同研究会

テーマ：　「タンパク質ダイナミクスへの多角的アプローチ」

1.「トリプレット DNP ～高温・低磁場での核偏極生成と
　タンパク質研究における展望～」
　　上坂 友洋（理研仁科加速器研究センター）
2.「金属タンパク質の構造変化 : 活性部位の構造変化とタンパク質の超分子構造体形成」
　　廣田 俊（奈良先端科学技術大学）
3.「X 線溶液散乱と分子動力学計算でみるタンパク質の動的構造と水和構造」
　　佐藤 衛（横浜市立大学）
4.「放射光 X 線と結晶プローブを用いた水溶液中・局所ダイナミクス計測」
　　関口 博史（高輝度光科学研究センター）

## 水和ナノ構造研究会員名簿

| | | |
|---|---|---|
| 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 | 教授<br>研究会委員長 |
| 田中 伊知朗 | 茨城大学 工学部 | 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 | 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 |
| 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 |
| 冨田 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 | 開発員 |
| 海野 昌喜 | 茨城大学大学院 理工学研究科 | 教授 |

2017年3月現在