

研究報告書

-2017年度研究会活動-

第25回 研究報告会

2018年7月10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、ナノスケールレベ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 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

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2017年度は第8期の最終年度となる。委員は14名が2016年度から継続していただいた。

2. 2017年度の研究活動の概要

2017年度は2回の水和ナノ構造研究会を開催した。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 研究会との共催のそれぞれ2回、4回を含め、計8回の研究会を実施した。

2.1 第1回水とナノ構造研究会

(2016年10月11日(水)～12日(木)、山形県米沢市白布温泉)

第1回水とナノ研究会は山形県米沢市白布温泉中屋別館不動閣にて行われた。外部講師4名をお迎えし「中性子タンパク質結晶学における良質大型結晶育成法と赤外分光法について」というテーマで開催した。

1、2人目の外部講師は、株式会社科研試験設計部の伊藤剛士氏と皆川由貴氏で、「相図に基づく結晶育成方法の展開その1、その2」というタイトルでご講演いただいた。中性子結晶構造解析のためにはX線と比べて桁で結晶を大型化する必要がある、タンパク質試料の大量生成の必要性や大型結晶化の条件検討等まだまだ準備には困難が伴っているのが現状である。iBIXの開発により従来より結晶は小型化されつつあるが、それでも実験者にとってはまだまだ準備の負荷を強いることになっており、これが中性子構造解析のタンパク質試料への適用のボトルネックとなっている。本講演においては、膜を介した二室のセルを用い、一方の結晶化セルでは体積を変化させることで C_p を制御し、もう一方の沈殿剤が入ったセルでは C_c 濃度を変化させ、膜を介して結晶化セル側の C_c を制御させる方法について詳細にご紹介頂いた。現行の装置では数少ない結晶核の生成から結晶を成長させる過程の制御が困難であり課題が存在するが、この問題点を乗り越えることで有用な方法となることが期待されるものであった。

3人目の外部講師は北海道大学の真栄城正寿氏で、「マイクロデバイスによるタンパク質の結晶化制御と構造解析への応用」というタイトルで発表いただいた。X線で高分解能データを与えるたんぱく質の単結晶の作製は試行錯誤的な方法や運に依存している。またタンパク質の結晶は脆いため、測定時の結晶のハンドリングには熟練した手技が必要である。本講演では、マイクロデバイスを用いたタンパク質の立体構造解析法についてご紹介頂いた。マイクロデバイスで生成した微小液滴を用いて、系内に単結晶を1個だけ作製する技術が開発され、また、空間サイズを精密に設計することによって、タンパク質の結晶構造解析で重要な課題の1つである多結晶化の制御が可能になっており、測定に適した結晶を作製することに成功している。中性子構造解析

用の大型結晶育成においても、多結晶化を制御し、1個だけの結晶を系内で育成することが理想的である。本方法が多くのタンパク質に適用可能な方法として確立されれば、中性子構造解析用の大型結晶育成に対しての応用が期待できるものであった。

4人目の外部講師として、理科学研究所放射光科学総合研究センターの久保稔氏に講演をお願いした。「XFEL 結晶構造解析と赤外分光法を用いたタンパク質の動的精密構造解析」というタイトルで発表頂いた。タンパク質の機能メカニズムを理解するためには、タンパク質が機能する姿を高分解能で捉えることが必要である。現在、原子分解能かつフェムト秒時間分解能でタンパク質のダイナミクスを可視化できる唯一の手法は、時間分解 X 線結晶構造解析である。本講演では理研播磨の XFEL (施設名 SACLA) を用いて、時間分解 X 線結晶構造解析の装置を開発し、種々のタンパク質に適用した例をご紹介頂いた。特に光駆動プロトンポンプの研究では、機能発現時に現れる 13 の過渡構造を解析し、それらを繋いで分子動画を作成することに成功している。また、タンパク質機能の十分な理解のためには赤外分光法を組み合わせた解析が必要であり、本講演ではフェムト秒赤外レーザーを用いた、独自の高感度時間分解赤外分光装置の開発とタンパク質の機能発現時の過渡的状态解析への適用についてご紹介いただくとともにそれらを相補利用した一酸化窒素還元酵素の反応機構研究についてご紹介いただいた。

すべてのご講演で委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。

2.2 第2回水和ナノ構造研究会

(2018年3月6日(火)~7日(水)、宮城県大崎市鳴子温泉)

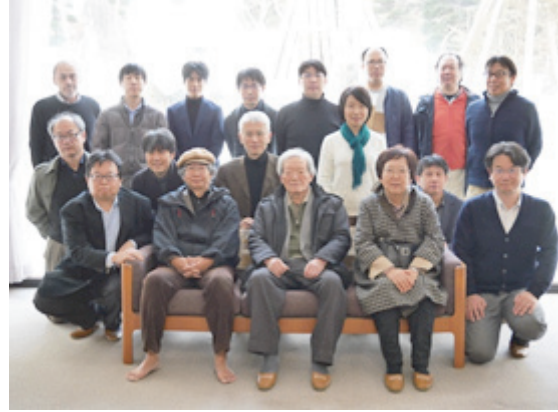
第2回の水和ナノ構造研究会は「中性と相補的な X 線、NMR、極短パルス光がとらえるタンパク質の最新構造情報」というテーマで宮城県大崎市鳴子温泉郷中山平温泉仙庄館にて開催した。3名の外部講師をお招きした。

1人目の外部講師は、首都大学東京の三島正規氏で、「NMR meets Neutron on the cutting edge」というタイトルでご講演いただいた。NMR スペクトルは測定対象となる分子の化学的環境を明敏に反映し、生体分子の立体構造解析を行う際にも、対象分子の性質や複合体形成をモニターすることで、様々な情報を収集し、フィードバックしつつ解析を行うことができる特徴的な構造解析手法である。これらを構造生物学研究へ適応した例として、転写抑制コファクターである SHARP と SMRT 複合体、微小管プラスチン伸長因子 CLIP と α -tubulin 複合体の構造研究について紹介いただいた。また、GDP 型 Ras タンパク質において、GDP のリン酸基と Ras タンパク質の主鎖のアミド基の間に形成される水素結合において、4 Hz 以上という大きなスピン結合が存在することを発見されており、その測定の NMR パルスシーケンスである HNPO 法の開発と最近の水素結合研究についてご報告いただいた。正確な水素の位置が得られる中性子結晶構造解析と、NMR による水素結合を介したスピン結合の観測を合わせた研究の可能性についてもお話があり、

非常に有意義な公演であった。また、タンパク質試料の重水素化についてもNMRでは精力的に行われており、中性子回折におけるタンパク質試料の完全重水素化に対しても適用の可能性があることが分かり、今後の相互発展を期待させるご講演であった。

2人目の外部講師は理化学研究所の倉持光氏で、「極短パルス光を用いた光応答性タンパク質の実時間構造ダイナミクス追跡」というタイトルで発表いただいた。化学反応では結合の開裂・生成を伴って分子の構造が変化するため、その過程で分子内の核配置がどのように変化していくかを知ることが化学反応を理解する上で重要であり、このためには分子構造の変化を高い時間分解能で観測することが必須である。講演では講師が取り組んできた可視6fsパルスを用いた時間分解インパルスブラマン分光装置の開発と、それを用いて明らかにした光応答性タンパク質における超高速構造ダイナミクスについて紹介いただいた。時間分解インパルスブラマン分光装置の詳細な原理から、その適応まで非常に詳細に詳しくご講演いただき、中性子による静的な構造情報とダイナミクス研究との相補的な利用により、反応機構に対するさらなる理解が進むことが期待されるご講演であった。

3人目の外部講師は量子科学技術研究開発機構の玉田太郎氏で、「中性子とX線を相補的に用いたタンパク質の構造解析」というタイトルで発表いただいた。X線回折が原子核を取り巻く電子からの回折現象であるのに対し、中性子回折は原子核そのものから生じる回折現象であり、同じ原子を観測してもその位置や見え方に特徴的な差が生じる。中性子とX線の特徴的な違いをうまく利用した構造解析を行えば、タンパク質が関与するさまざまな生命反応をより深く理解することが可能になると思われる。講演者はこれらの量子ビーム（中性子とX線）の相補的な性質を利用して、医学生物学的に重要なタンパク質の立体構造解析を進めており、本講演ではJRR-3のBIX3で行われた創薬標的タンパク質エラスターゼの構造解析については、中性子の特徴を生かした反応中間体状態における水素結合と酸素陰イオンの状態を解明している。iBIXを用いた電子伝達タンパク質である高電位鉄硫黄タンパク質の構造解析については、非常に高分解能のデータ収集に成功し、高精度なプロトン化状態の観測がなされていた。iBIXにとっては装置性能を示す意味でも非常に良いデータが得られていた。また、J-PARCに設置を検討している新たな回折計についてのご紹介があった。中性子回折の特徴とX線との相補的な利用の有用性について非常にわかりやすくお話しいただき、大型結晶育成の条件や凍結条件の最適化等の試料準備も含めて、非常に有意義な講演であった。



第二回研究会の様子

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 平成29年度茨城県 iBIX 研究会:

第1回 iBIX 研究会 平成29年6月28日

玉田 太郎氏 (量子科学技術研究開発機構)

「電子伝達タンパク質の中性子結晶構造解析」

第2回 iBIX 研究会 平成29年11月16日

片岡 幹雄氏 (熊本大学)

「イエロープロテインの構造と光反応」

第3回 iBIX 研究会 平成30年1月31日

山縣 ゆり子氏 (熊本大学)

「酸化ヌクレチド分解酵素の基質認識と反応過程」

2.3.2 平成29年度 iBIX-JAXA 合同タンパク質研究会

「iBIX の紹介」

日下 勝弘 (茨城大学)

「JAXA 高品質タンパク質結晶生成プロジェクトの紹介」

吉崎 泉 (JAXA)

「良質な結晶育成へ向けた我々の取り組み」

山田 貢 (JAXA)

「iBIX 結晶化の取り組みと結晶化とは」

山田 太郎 (茨城大学)

今野 美智子 (茨城県)

「微小重力下での大型結晶生成にむけた技術開発」

五十嵐 圭日子 (東京大学)

「良質なタンパク質結晶を得るための手法」

千田 美紀 (高エネルギー加速器研究機構)

「宇宙実験での最近の成果」

阪本 泰光 (岩手医科大学)

「中性子構造解析を中心とした手法で解明する」

光合成色素フィコシアノビリンの合成メカニズム」 海野 昌喜（茨城大学）

2.3.3 中性子産業利用推進協議会 構造生物学研究会：

平成 29 年度第 1 回生物構造学研究会

『中性子構造生物学の最前線』

（平成 29 年 9 月 11 日（月）、研究社英語センター大会議室）

- | | |
|--|----------------|
| 「J-PARC MLF の現状と中性子産業利用」 | 富田俊郎（茨城県） |
| 「iBIX の現状」 | 日下勝弘（茨城大学） |
| 「日本の創薬を活性化するために果たすべき AMED の役割」 | 善光龍哉（AMED） |
| 「世界の中性子構造生物学の未来像とそのために
日本の中性子構造生物者が果たすべき役割」 | 杉山正明（京都大学） |
| 「iBIX による長格子カタラーゼの中性子単結晶回折」 | 山田太郎（茨城大学） |
| 「タンパク質単結晶の回折斑点の高精度解析法の開発」 | 矢野直峰（茨城大学） |
| 「高分解能 X 線および中性子構造解析による
酸化型銅アミン酸化酵素の活性中心構造」 | 岡島俊英（大阪大学） |
| 「磁場配向技術の結晶構造解析への応用」 | 坪井千明（旭化成ファーマ） |
| 「ナノ粒子の溶液中での精密構造解析」 | 櫻井和朗（北九州市立大学） |
| 「構造生物学から迫るオートファジーの分子機構」 | 野田展生（微生物化学研究所） |

平成 29 年度第 2 回生物構造学研究会

『新世代中性子構造生物学』

（平成 30 年 3 月 29 日（木）、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） |
| 「J-PARC MLF における生命科学に関わる実験装置の現状と将来」 | 山田 武（CROSS） |
| 「中性子結晶構造解析の可能性ーイエロープロテインの構造と光反応」 | 片岡幹雄（CROSS） |
| 「アカデミアにおける初期創薬イノベーション
ーもと製薬会社研究員の考える化合物探索 ー」 | 阪下日登志（産総研） |
| 「タンパク質を膜透過させるSec タンパク質の構造生物学」 | 塚崎智也（奈良先端大） |
| 「ピロリ菌がんタンパク質CagA の構造・機能とその制御」 | 畠山昌則（東京大学・医学部） |
| 「NMR を用いた膜タンパク質のin situ 機能解明」 | 嶋田一夫（東京大学・薬学部） |
| 「タンパク質の大規模運動を伴った機能発現のシミュレーション研究」 | 木寺詔紀（横浜市立大学） |

3. 第8期活動の総括（成果と今後）

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。しかしながら中性子源ターゲットの冷却水漏洩等により、2017 年度 6 月までは 150kW での運転にとどまってきた。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、iBIX のタンパク質の測定数が制限されてきた。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、中性子の特徴を生かした新たな成果が得られている。iBIX は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、 $135 \times 135 \times 135 \text{ \AA}^3$ の格子体積のタンパク質結晶の測定が可能となるよう設計されている。前者はタンパク質標準試料の測定により 2012 年度に実証済みであり、2016 年度には、 $133.4 \times 133.4 \times 133.4 \text{ \AA}$ 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 2.4 \AA 分解能の中性子回折データを取得し、構造解析の結果、水素原子の観測に成功している。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ている。昨年度には建設から 10 年を迎え、第 1 期の設置契約期間が終了し、2017 年度に J-PARC、MLF への再設置申請を行い、実績評価及び次期計画評価調書を提出、ヒヤリングを経て 2018 年度から 10 年間の再設置が認められた。

本研究会の活動の目的の一つである iBIX におけるソフトウェアの改良については、研究会においてもその進捗や問題点、その解決策等が議論され、現在はユーザーがより簡単にデータ処理が可能にまでユーザビリティを向上することができた。

J-PARC、MLF では 2017 年夏に不具合が修正された新たなターゲットが導入され、2018 年 3 月現在では 400kW での運転がなされており、2018 年 4 月からは 500kW での運転が予定されている。また、2018 年度中には 800kW までの増強が予定されている。iBIX は設計通りの性能が実証され、J-PARC の加速器出力も 2018 年度には最大出力 1MW に近い運転が予定されている。本研究会の今期の活動においては、大型結晶育成法も含めて、実験分野及び計算科学研究者に生体高分子中の水やプロトネーションについて様々な議論を進めていただくことができた。第 2 期（第 9 期）からは、装置自身の高度化を継続しつつ、中性子回折の特徴を生かし産業利用を意識した成果の創出をさらに精力的に進めるべき段階に移行しており、本研究会での活発な議論により中性子利用と関連分野の発展が本格的に加速することを期待するところである。

研究会開催記録

【第1回】2017年10月11日(水)–12日(木) 山形県米沢市白布温泉

テーマ：「中性子タンパク質結晶学における良質大型結晶育成法と赤外分光法について」

1. 「相図に基づく結晶育成方法の展開 その1」
伊藤 剛士 (株式会社化研)
2. 「相図に基づく結晶育成方法の展開 その2」
皆川 由貴 (株式会社化研)
3. 「コメント 『大型高品質タンパク質単結晶と微小重力(宇宙)空間』」
新村 信雄 (茨城大学)
4. 「マイクロデバイスによるタンパク質の結晶化制御と構造解析への応用」
真栄城 正寿 (北海道大学)
5. 「XFEL 結晶構造解析と赤外分光法を用いたタンパク質の動的精密構造解析」
久保 稔 (理化学研究所)

【第2回】2018年3月6日(火)–7日(水) 宮城県大崎市鳴子温泉

テーマ：「中性子と相補的なX線、NMR、極短パルス光がとらえるタンパク質の最新構造情報」

1. 「NMR meets Neutron on the cutting edge」
三島 正規 (首都大学東京)
2. 「極短パルス光を用いた光応答性タンパク質の実時間構造ダイナミクス追跡」
倉持 光 (理化学研究所)
3. 「中性子とX線を相補的に用いたタンパク質の構造解析」
玉田 太郎 (量子科学技術研究開発機構)
4. 「フリーディスカッション」

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 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
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	開発員
海野 昌喜	茨城大学大学院 理工学研究科	教授

2018年3月現在