

2019 年度 iBIX-JAXA-KEK 物構研-QST 合同研究会

テーマ：クライオ EM、X 線、中性子タンパク質構造解析の住み分け

主催：茨城県中性子利用研究会

(国研) 宇宙航空研究開発機構 (JAXA) きぼう利用センター

高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 物質構造科学研究所

(国研) 量子科学技術研究開発機構 (QST) 量子ビーム科学研究部門高崎量子応用研究所

共催：中性子産業利用推進協議会

J-PARC MLF 利用者懇談会

新世代研究所 水和ナノ構造研究会

日時：2019 年 10 月 30 日 (水) 13:00-17:00

※ 開場は、12:45 からとなります。

場所：エッサム神田ホール 1 号館 401 号室

〒101-0045 東京都千代田区神田鍛冶町 3-2-2 TEL 03-3254-8787

参加費：無料

趣旨：

タンパク質立体構造の測定手段であるクライオ電子顕微鏡 EM、X 線構造解析、中性子構造解析は、それぞれ得意な領域がある。

結晶が困難なタンパク質の構造解析の道を開いたことが評価され、2017 年度のノーベル化学賞は、“**developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution**” の功績に対して与えられた。測定手段は、透過電子顕微鏡 TEM であるため装置上の分解能の限界がある。80-300kV の電子線は、分子内の共有結合を破壊するには十分なエネルギーであるためタンパク質の損傷が生じるが、低線量で測定が可能となった。クライオ EM は、結晶化が困難なくつかのユニットから成る巨大な複合タンパク質の構造の研究に威力を発揮している。具体的には、膜蛋白質レセプターの構造の研究で、最近多くの報告がなされている。実際に報告されているデータの大半は 3 Å 付近の分解能である。稀に 2 Å 程度の分解能のデータの報告もある。

X 線結晶構造解析は、結晶の作製がネックであるが、電磁波の X 線は、強力な入射強度を得ることができ、回折の結果生じる干渉像を用いて単体からなるタンパク質について高分解能のデータが観測される。高分解能を得るために、X 線の波長で 1.0 Å を用いると水分子を励起し酸化還元タンパク質に影響する。

JAXA においては、宇宙の微小・無重力空間を利用した結晶の作製方法が蓄積され、地上では起こる対流・沈降がなくなることにより、欠陥の少ない高品質な結晶が得られることを示してきた。その結晶を用いることでより高分解能のデータが得られた例が報告されている。

中性子タンパク質結晶構造解析は、原子核散乱長に対する水素の寄与が大きいことから、タンパク質の水素原子を観測する手段として使われるが、入射強度が X 線強度に比べて凡そ 10^{-5} で極めて弱いため、X 線で観測したときに 1.6 Å 以上の高分解能のデータが得られる固い大きい結晶が要求される。照射される中性子のエネルギー (波長) は低いため共有結合が破壊されず長時間の露光ができる。活性に関与するアミノ酸の水素および水の水素の位置を

確認する手段として使われる。また、中性子の溶液散乱測定は、水溶液のタンパク質の状況を調べる唯一の手段である。

タンパク質の立体構造の研究において、構造解析手法の住み分けを考える時期に来ており、それぞれの手段の長所と限界を示し、議論を通して、タンパク質の研究を一段と進める上で役に立つことを願う。

研究会主査：

今野美智子（茨城県）、吉崎泉（JAXA）、千田俊哉（KEK 物構研）、玉田太郎（QST）
（講演時間は質疑応答時間 10 分を含む）

プログラム

司会 吉崎 泉（JAXA）

13:00 開会挨拶 今野 美智子（茨城県）

13:05-13:35 「きぼう」利用した高品位タンパク質結晶化とオーファンドラッグの分子設計への応用 有竹 浩介（第一薬科大学）

我々は、国際宇宙ステーション「きぼう」内の微小重力空間を利用して、アレルギーや炎症の進展に関与する生理活性脂肪酸のプロスタグランジン D₂ 合成酵素タンパク質と酵素阻害薬との複合体結晶構造を進めてきた。その成果として、基質に競合的な阻害薬が結合する触媒部位では約 1 Å の高分解能の結晶が得られ、更に触媒ポケット内にアポ型と複合体に共通する結晶水も同定することが出来るようになった。これらの成果は、新たな阻害薬を分子設計する上で、結晶水を考慮することが不可欠であることを示す。講演では、水分子を考慮して分子設計された阻害薬とその臨床応用について紹介させていただく。

13:35-14:05 クライオ EM 構造解析の長所と限界

守屋 俊夫（KEK 物構研）

近年、結晶化の難しいタンパク質複合体等を含む生体高分子の構造を近原子分解能で決定することが可能になってきたクライオ電子顕微鏡法が構造生物学で広く用いられるようになってきた。本手法はサンプル精製度や構造多形等の問題を画像処理の段階でも解決できる可能性があるため、生化学的操作が困難である生体高分子も対象に含むことができる。しかし、いまだ発展途上にあり、これまでに 1Å 台の分解能で決定された構造は数少ない。本発表では「分解能革命」をもたらした技術革新について述べた上、現状でのクライオ EM 構造解析の長所と限界を紹介する。最後に、将来の展望についての考察を行う。

14:05-14:50 特別講演

「高速分子動画法」-自由電子レーザーを用いた X 線結晶構造解析-

岩田 想（京都大学）

電子顕微鏡技術の発展により、生体高分子の原子分解能構造が結晶を用いずに得られるようになった。また水素の位置に関しては中性子散乱を用いることにより決定することができる。では X 線を用いた結晶構造解析にはどのような強みがあるのだろうか。この一つの答えが X 線自由電子レーザーを用いた、「高速分子動画法」である。これは 10fs 程度の短くかつ強力なパルス X 線光源を用いて生体高分子の動

きを原子分解能で実時間観察する技術である。fs のスケールの時間分解能でタンパク質中の化学反応を観察することが可能になった。講演ではこれまでの成果と現在の技術的限界、そして幅広い生体高分子に適応するための技術開発について紹介する。

14:50-15:05 休憩

司会 玉田 太郎 (QST)

15:05-15:35 中性子結晶構造解析の長所と限界

今野 美智子 (茨城県)

中性子解析の長所はタンパク質分子の水素が観測できることである。結晶を重水に長時間浸すと、骨格の N-D への置換が、 α ヘリックスの内部の骨格、 β シートの骨格でも起こり、結晶のタンパク質の内部に D の変換に使われる水分子が存在することを示す。反応の活性部位に存在するアミノ酸残基 (Asp、Asn、Glu、Gln、Arg、Lys、His、Ser、Tyr) の側鎖のプロトンの観測は、結合する化合物との水素結合の有無、更に、反応機構を考える上で重要である。これらの興味ある側鎖の D の観測の可能性は、X 線構造解析の結果からある程度予想できる。しかし、現在 PDB に登録されている中性子の構造解析は約 150 個で、格子サイズ 133\AA^3 のカタラーゼで水素が見えるが、限界がある。長所と限界について話す。

15:35-16:05 X 線・中性子散乱による構造・揺らぎ解析の長所と限界

松尾 龍人 (QST)

X 線小角散乱や中性子小角散乱は、生理的環境に近い溶液状態においてタンパク質の構造を解析できる強力な手法である。さらに、両者の併用により、タンパク質機能発現に不可欠な水和水に対して、その構造を反映する密度を求めることもできる。一方、中性子準弾性散乱は、水素原子の運動に敏感であり、タンパク質分子全体の揺らぎや水分子の運動を解析できるユニークな特徴を持つ。従って、種々の散乱法を併用することで構造と揺らぎの両側面からタンパク質の機能発現機構に迫ることができる。本講演では、これらの手法の長所や限界と共に、我々が行ってきた心筋収縮に関わるタンパク質や水和水の構造・揺らぎ研究について発表したい。

16:05-16:50 特別講演

イオンポンプの構造生物学：脂質二重膜からプロトンまで

豊島 近 (東京大学)

イオンポンプ、特に Ca^{2+} -ATPase (SERCA) の作動機構を原子構造に基づいて完全に理解することを目指し、現在、12 の反応中間体の X 線結晶構造解析に、うち 4 つに対しては脂質二重膜の可視化にも成功している。その結果、ポンプ蛋白質は脂質二重膜からプロトンまでを作動機構の重要な一部として組み込んでいることが理解された。本講演では、構造理解の現状とともに、脂質二重膜可視化に用いたコントラスト変調法の中性子線への展開の可能性や、酸性残基の荷電状態の可視化のために開発した電子線回転折法等の技術的問題をも議論したい。

16:50 閉会挨拶 千田 俊哉 (KEK 物構研)

☆交流会：17:20～19:20 @ ワインホール 130

近くのワインホール 130 で交流会を開催します。参加費は 4,000 円です。施設側とユーザーのざっくばらんな意見の交換の場になります。是非ご参加ください。詳細は文末をご参照ください。参加希望者はできるだけ事前に登録してください。当日も受け付けます。会費は当日いただきます。なお、事前に登録されて当日キャンセルされた場合には会費を申し受けません。

<参加申込み先>

参加を希望される方は、令和元年 10 月 25 日（金）までに、下記申込フォームからお申し込みください。

<https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSeAXjyxMTjzNhFEb9Aw1wSWqyiRoZe1pTVzxWOXUBT088WCqA/viewform>

入力いただいたメールアドレスにお申し込み確認のメールが自動的に送信されます。返信がご確認いただけない場合は、メールにてお申し込みください。

メール申し込み先：茨城県中性子利用研究会 事務局 田中志穂

E-mail: tanaka@ibaraki-neutrons.jp

- (1) 名前、(2) 所属、(3) 連絡先(電話番号、E-mail address)
 - (4) 交流会への参加の有無(領収書を発行します)
- をご記入の上、メールにてお申し込みください。

<会場へのアクセス>

<貸し会議室>エッサム神田ホール

東京都千代田区神田鍛冶町 3-2-2

JR 神田駅北口徒歩 1 分

東京メトロ銀座線神田駅 3 出口前

<http://www.essam.co.jp/hall/access/>



