

# ATP結合タンパク質の中性子線構造解析

利用者 齋藤純一、鈴木道彦、島田純一  
 所属 協和発酵工業株式会社

## 【序論】

タンパク質の結晶構造に基づくドラッグデザイン,いわゆる Structure-based Drug Design (SBDD) を行う上で,水素・水和構造を把握することは非常に重要であり,特に,計算化学的手法を用いる場合には,水素情報の有無が計算精度に大きな影響を及ぼすことは周知の事実である.高分解能のX線結晶構造でも一部の水素位置情報を得ることはできるが,水分子を含めた全ての水素を決定することはできない.そこで,水素・水和構造を実験的に決定できる唯一の方法である,中性子線結晶構造解析を行うため,中性子利用技術移転推進プログラム「トライアルユース」課題に応募し,薬剤標的 ATP 結合タンパク質の中性子線回折実験を実施した.

## 【結晶化実験】

中性子線回折実験に適した ATP 結合タンパク質の結晶作製を試みた.中性子線回折実験には,通常,2 mm<sup>3</sup> 以上の大型かつ良質なタンパク質結晶が必要であるが,これは,X線回折実験で一般的に使用されている結晶サイズと比較すると,約1000倍の大きさに相当する.通常のシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行い,比較的大きな結晶が数個だけ析出したバッチを選択し,タンパク質溶液を経時的に追加する方法で結晶を成長させた.その結果,約 2 mm x 1 mm x 0.4 mmの大きさの結晶 (Fig.1) を得ることができたので,これらを中性子線回折実験に供した.

## 【中性子線回折実験】

中性子線回折実験を行うため,ATP 結合タンパク質結晶を重水溶液(結晶化沈澱剤溶液)に一晩浸漬させ,重水素置換を行った.重水素置換後の結晶を石英キャピラリーに封入した後 (Fig.2),研究用原子炉 JRR-3 に設置された生体高分子結晶構造解析用の中性子回折装置 BIX-3 を用いて予備的な回折実験を行った(第6サイクル:10/14 - 10/20).

回折実験(12時間露光)の結果,約 2.7 Å 分解能までの回折能が確認された (Fig.3 矢印).そこで,中性子回折装置 BIX-4 を用いて本測定を行った(第7サイクル:10/30 - 11/20).

マシンタイム(約16日間)の関係上,完全性の高いデータ収集を重視したため,露光時間を予備測定時の12時間から2時間に抑え,測定領域が60°以上になるように条件をシミュレーションし,212 フレーム(トータルの測定領域 63.6°)を測定する条件でデータ収集を試みた.その結果,分解能が約 3 Å,完全性が7割程度,Rmerge が 18% のデータを収集することができた.しかし,水素・水和構造を含めた構造解析を行うためには,最低でも 2 Å 分解能程度のデータが必要であるため,残念ながら,このデータでの水素・水和構造決定は難しいと判断した.

## 【今後の予定】

今回使用した結晶の体積よりも2倍程の結晶を作製する.十分なサイズの結晶が得られ次第,測定条件を十分に検討し,高分解能データ収集を検討する.水素・水和構造を含めた構造解析を実現させる.

## 【謝辞】

中性子線回折実験を行うにあたり,ご協力,ご助言を頂いた 日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門 生体分子構造機能研究グループの黒木良太博士,玉田太郎博士,栗原和男博士に感謝いたします.

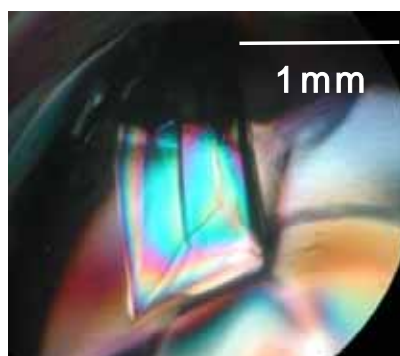


Fig. 1 ATP 結合タンパク質の結晶  
偏光顕微鏡写真

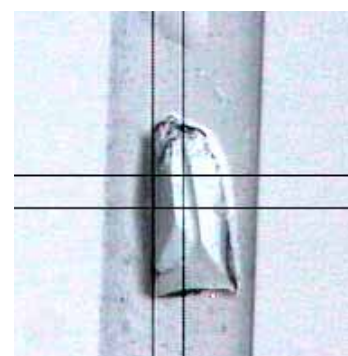


Fig. 2 石英キャピラリーに封入した結晶  
重水素置換後,封入

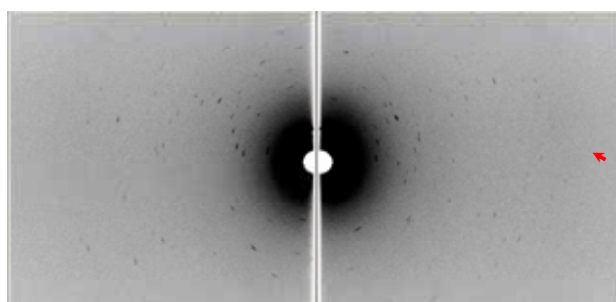


Fig. 3 ATP 結合タンパク質結晶の中性子線回折像  
研究用原子炉 JRR-3 の中性子回折装置 BIX-3 を用いて測定したATP 結合タンパク質結晶の中性子線回折パターン(12時間露光).  
図中の赤色矢印位置は,約 2.7 Å 分解能に相当する回折斑点を示す.

# ATP 結合タンパク質の中性子線構造解析

利用者 齋藤純一、鈴木道彦  
 所属 協和発酵工業(株)

## 【序論】

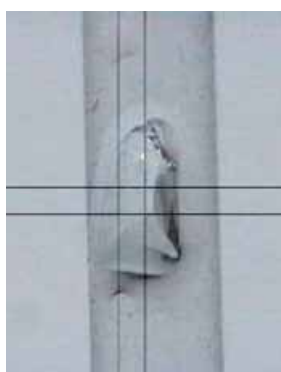
タンパク質構造に基づく薬剤デザイン, Structure-based Drug Design (SBDD) を行う上で, 水素・水和構造を把握することは非常に重要であり, 特に, 計算化学的手法を用いる場合には, 水素情報の有無が計算精度に大きな影響を及ぼすことは周知の事実である. 高分解能のX線結晶構造でも一部の水素位置情報を得ることは可能であるが, 水分子を含めた水素位置を決定することはできない. そこで, 水素・水和構造を実験的に決定できる唯一の方法である, 中性子線結晶構造解析を行うため, 昨年に引き続き, 中性子線利用技術移転推進プログラム「トライアルユース」課題に再度応募し, 薬剤標的 ATP 結合タンパク質について, 構造解析可能な結晶作製とその中性子線回折実験を実施した.

昨年の実験では, 約 2 mm x 0.8 mm x 0.5 mm の大きさの結晶 (Fig.1左) を作製し, 中性子線回折実験に供した. この結晶のサイズは, X線回折実験で一般的に使用されている結晶サイズと比較すると, 500 - 1000倍の大きさに相当する. 中性子線回折実験の結果, 分解能が約 3 Å, 完全性が7割程度,  $R_{\text{merge}}$  が 18% のデータを収集することができたが (Table1), 水素・水和構造を含めた構造解析を行うためには, 2 Å 分解能程度のデータが必要とされているため, 水素・水和構造決定は難しいと判断した. 高分解能データ測定を目指し, まず, 結晶の大型化を試みた.

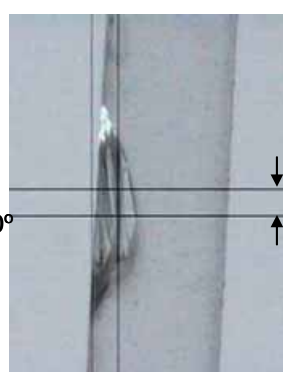
## 【結晶化実験】

ATP 結合タンパク質の結晶化は, 通常のシッティングドロップ蒸気拡散法により行った. この際, 沈澱剤濃度を前回よりも低くし, 結晶成長を遅くすることで結晶の核形成を抑え, 1つ1つの結晶サイズを大型化することとした. 比較的大きな結晶が1, 2個析出したパッチを選択し, タンパク質溶液を経時的に追加する方法で結晶を成長させた. その結果, 前回使用した結晶の約 2.4倍のサイズ (約 2.3 mm x 1.1 mm x 0.8 mm) の結晶 (Fig.1右) が得られた.

2006年

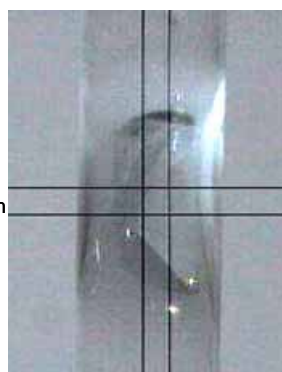


90°



0.36 mm

2007年



90°

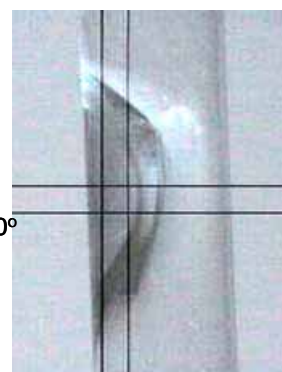


Fig. 1 石英キャピラリーに封入したATP 結合タンパク質の結晶 (左) 前回2006年のトライアルユースでの実験で使用したものの, (右) 今回2007年の実験に使用したものの. サイズはそれぞれ 2.0 x 0.8 x 0.5mm, 2.3 x 1.1 x 0.8mm.

## 【中性子線回折実験】

中性子線回折実験に際し, 重水溶液 (結晶化沈澱剤溶液) に一週間浸漬させ, 重水素置換を行った. この間, 溶液を交換することで, 確実な重水素置換を試みた. ソーキング後の結晶を石英キャピラリーに封入後, 研究用原子炉 JRR-3に設置された生体高分子結晶構造解析用の中性子線回折装置 BIX-3 を用いて回折実験を行った (第5サイクル: 9/5 - 9/14). 完全性の高いデータ収集を重視し, 露光時間を2時間に抑え, 測定領域が 70° 以上になるような条件をシミュレーションし, 244 フレーム (トータルの測定領域 73.2°) を測定する条件でデータ収集を試みた. その結果, 分解能が約 2.8 Å, 完全性が7割弱,  $R_{\text{merge}}$  が 約18% のデータを収集することができた. これは, 前回のデータと比較し, 若干分解能が改善されたものの, 水素・水和構造を含めた構造解析に必要なとされる 2 Å 分解能には到達しなかった.

## 【結論】

水素・水和構造を含めた構造解析を行うため, 可能な限り結晶の大型化を行い, 回折実験を実施したが, 必要な高分解能のデータ測定には至らなかった. 露光時間を数倍にすることで, 強度の弱い反射をデータに含めることができれば, 分解能は若干上がると思われるが, 大幅に測定時間を延長する必要があるため, トライアルユース枠での完全性の高いデータ測定は困難である. 今後, 強力な中性子線を利用することが可能となれば, 今回と同程度のサイズの結晶であっても, 高分解能データ収集, さらに, 水素・水和構造を含めた構造解析が実現できるものと期待される.

謝辞 中性子線回折実験を行うにあたり, ご協力, ご助言を頂いた 日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門 生体分子構造機能研究グループの黒木良太博士, 玉田太郎博士, 栗原和男博士に感謝いたします.

Table 1 測定したデータの統計値の比較

	2006	2007
<b>Data collection</b>		
crystal size	2.0 x 0.8 x 0.5 mm	2.3 x 1.1 x 0.8 mm
detector	BIX4	BIX3
exposure time (hrs.)	2 /frame	2 /frame
range (°)	63.6 (212 frames)	73.2 (244 frames)
<b>Data processing</b>		
resolution (Å)	3.0 (3.11-3.00)	2.8 (2.90-2.80)
$I/\sigma(I)$	4.3 (2.5)	5.4 (3.3)
$R_{\text{merge}}$	0.179 (0.299)	0.184 (0.335)
completeness (%)	74.1 (63.9)	71.7 (61.9)