

## 中性子構造生物の課題

日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門

中性子生命科学研究所ユニット

黒木良太

タンパク質やその水和水の水素原子を効果的に観測するには中性子結晶解析が有効である。中性子は原子核との相互作用によって散乱を受けるので、電子による散乱をうける X 線とは異なった性質のプロブである。中性子を用いれば水和水の水素原子を観測することができるので、水和水の配向を決定することができる。茶竹ら<sup>(1)</sup>は 1.5~1.6Å 分解能で決定された中性子結晶構造において、水和水の原子核密度分布が、その動的な特徴を反映して様々な形を示すことを見出した。このような水和水の観測によってタンパク質表面における水分子の挙動がより詳細に明らかになると期待される。しかしながら中性子のビーム強度はきわめて弱いため、構造解析には通常 5~10mm<sup>3</sup> の大きさの結晶が使用されてきた。その体積は放射光による立体構造解析に用いられる結晶体積(0.001mm<sup>3</sup>)の 10000 倍に相当する。そのため解析できるタンパク質の例は極めて限定され、タンパク質の立体構造データベースに登録された解析数もわずか 19 件に留まっている。

中性子のビーム強度を補うには、試料となるタンパク質結晶の体積を稼ぐことが何よりも重要である。結晶の大型化には、単に結晶化母液の容積を大きくするだけでも効果がある。しかし使用するタンパク質の絶対量が増えるため、まず試料の大量調製が必須となる。使用する試料の量やラベル化を考慮すると、中性子構造解析には大腸菌発現か酵母分泌発現が最適である。試料調製においてタンパク質試料の完全な重水素化ができれば、水素原子由来の非干渉性散乱成分を低減することができ、より高分解能のデータ取得が可能になる。試料の重水素化においては、宿主ベクター系によっては培養中にプラスミドが脱落しやすいものがあるので充分注意が必要である。

原子力機構では通常、マクロシーディングによる結晶の大型化を行っている。通常は結晶核の数が少ない条件を見出しておき、その条件でマクロシーディングを繰り返す<sup>(2)</sup>。また(株)創晶によるフェムト秒レーザー核形成法は、低いタンパク質濃度で効果的に核形成を起こすので、結晶の大型化には理想的である。これらの方法によって結晶をある程度の大きさに成長させた後、結晶化母液に試料溶液を逐次添加する。この方法によれば適切な温度コントロールと組み合わせることによって結晶成長の自動化が可能である。

マクロシーディングと試料逐次添加による ADPRase 結晶の大型化 (例)



0.2mm  
(7 days)

2mm  
(55 days)

中性子構造解析を様々なタンパク質の解析に利用するには、結晶の体積を増やすことが重要である。強度の強いX線では針状や平面状の結晶であっても充分測定が可能であるが、結晶成長に偏りがある場合には、中性子回折では良いデータが取れない。そこでタンパク質表面をアミノ酸置換して成長を促進させる技術を開発中である。一例として酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF) への変異導入例を紹介する。aFGF において結晶成長の遅い方向と、結晶格子内の aFGF の相対配置に相関があることを見出した。この部位に変異導入を行ったところ、結晶の体積を増大させることに成功した。このようにタンパク質の中性子構造解析を取り巻く環境は、次第に改善されつつある。



## References

- (1) Chatake, et al., "Hydration in proteins observed by high-resolution neutron crystallography." *Proteins*. 50, 516-523. (2003)
- (2) Kinoshita, et al., "Crystallization of porcine pancreatic elastase and a preliminary neutron diffraction experiment" *Acta Crystallogr. F* 63, 315-317. (2007)