

X線と中性子を相補的に利用したタンパク質の構造解析

原子力機構 量子ビーム応用研究部門 大原高志

中性子を用いたタンパク質の結晶構造解析は、タンパク質分子中の水素原子に加えて周辺の水和水における水素原子の観察が容易である。このため、タンパク質分子とそれを取り巻く水和水との相互作用による、タンパク質分子周辺の電場、双極子モーメントの分布の解明と、それに伴う Structure Based Drug Design(SBDD)の精度向上に繋がると期待されている。しかし、実際の中性子構造解析においてタンパク質周辺の化学種を取り扱う際には、

- 結晶中で自由回転している蛋白質水和水と金属イオンの識別
- 水和水ネットワーク中の重水素原子と酸素原子の識別

といった識別が難しく、加えてこれらの識別基準が解析を行う研究者毎に異なるという問題があり、中性子回折データからタンパク質周辺分子の情報を十分に取り出すことができていない。

これらの問題を解決するため、我々は中性子と X 線の差分をとった”N-X マップ”に注目した。タンパク質の結晶構造解析において、中性子では原子核散乱長密度マップ(N マップ)が得られる一方、X 線では電子密度マップ(X マップ)が得られる。これに対し、両者の差分をとった N-X マップでは、各原子の中性子と X 線に対する散乱長の違いが強調されるために結晶中の原子種の違いがより明瞭となり、上述の問題の解決に繋がると期待できる(図 1)。そこで本研究では実際にタンパク質結晶で N-X マップを作製し、その有効性の検証を行った。

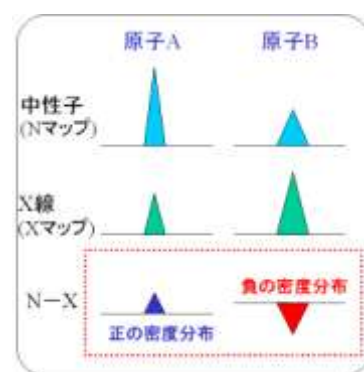


図 1 N-X マップによる原子識別の概念図

タンパク質結晶としては、最近原子力機構で中性子回折測定を行ったブタ膵臓エラスターゼおよび HIV プロテアーゼを対象とし、これらの試料について中性子回折を行ったものと同一の結晶を用いて X 線回折測定を行った。得られたデータについては、中性子と X 線の両方の回折データを同時に用いた構造精密化を行い、N マップおよび X マップを得た。これらのマップについて、タンパク質分子中の炭素原子周辺の密度分布が同じになるように両者のスケールを補正した上で差分を計算し、N-X マップを作製した。なお、この N-X マップの計算は、専用に開発したソフトウェア”cocktail”を用いて行った。

得られた N-X マップについて、本研究では特にタンパク質分子周辺の水和水のおよび金属イオンがどのように見えるかについて注目した。図 2 にエラスターゼ結晶に含まれる水和水(DOD10)の X、N、および N-X マップと、そこから得られる重水分子の向きを示す。図 2(a)の X マップでは重水素原子が見えないため、重水分子の向きはわからない。また、図 2(b)の N マップでは、酸素原子の左側に密度分布が見られることから、こちらに 1 個の重水素原子があることがわかるが、もう一方の重水素原子については非常に見え難い。これらに対して、図 2(c)の N-X マップでは酸素原子の左側に加えて右側にも分布が見えてお

り、重水分子の2個の重水素原子を同定して重水分子の向きを決定することができた。

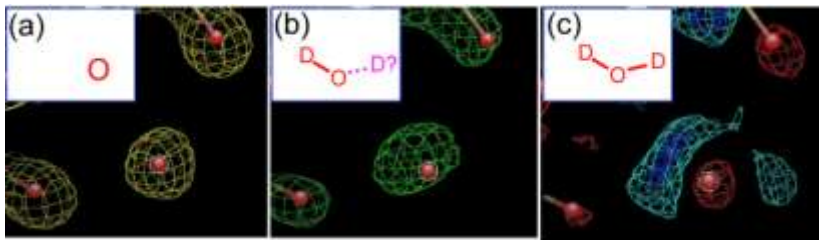


図 2 エラスターゼの水和水 (DOD10) 周辺についての (a) X マップ ($>+2\sigma$) (b) N マップ ($>+2\sigma$) (c) N-X マップ (水色: $>+2\sigma$, 赤: $<-2\sigma$) および、マップから想定される重水分子の向き

また、図 3 には、エラスターゼ結晶中の Ca^{2+} 結合サイトにおける N マップおよび N-X マップを示す。 Ca^{2+} 原子の位置には、N マップではほとんど分布が観測されないのに対し、N-X マップでは大きな負の分布という、水和水とは異なる形で観測された。これは、中性子と X 線に対する Ca^{2+} イオンの散乱長の大きな違いが、N-X マップによって強調されたことによるものである。

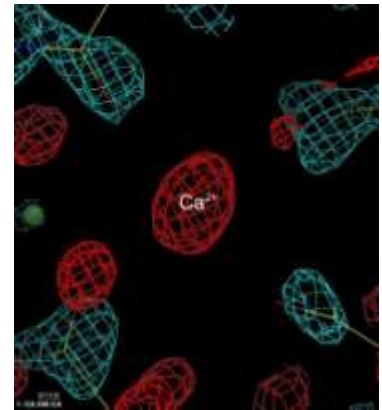


図 3 エラスターゼの Ca^{2+} 結合サイトにおける N マップ (水色: $>+2\sigma$) および N-X マップ (赤: $>+2\sigma$)

加えて、図 4 には、HIV プロテアーゼの酵素活性部位における 2 個のアスパラギン酸のカルボキシル基周辺の X マップおよび N-X マップを示す。この蛋白質は中性子回折データの分解能が 2.3\AA と比較的 low、中性子回折データだけではこれらのカルボキシル基のプロトン化/非プロトン化の判別が難しかった。しかし、N-X マップを用いてこれら活性残基周辺の重水素原子位置を強調することで、Asp25A がプロトン化しているのに対し Asp25B がプロトン化していないことを明示することに成功した。

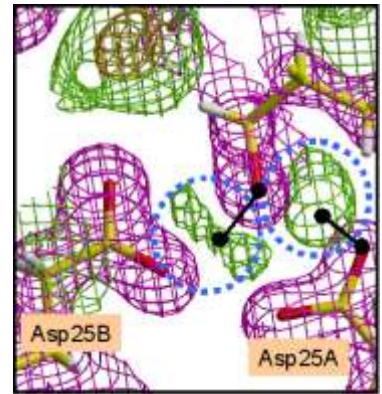


図 4 HIV プロテアーゼ活性部位周辺の X マップ (紫: $>+2\sigma$) および N-X マップ (破線内、緑: $+2\sigma$)

以上のように、本研究では N-X マップによってタンパク質水和水における水素原子や金属原子を強調して観察できることを示したことから、今後、N-X マップを用いてタンパク質周辺の化学種を自動的にアサインする手法の開発に繋がると期待される。また、分解能の低いデータにおける水素原子など、中性子だけでは判別が難しい水素原子の観察においても N-X マップが強力な手法であることを明らかにできたことから、N-X マップを活用することで高分解能の回折データが得られないタンパク質でも中性子構造解析の対象にできると期待される。