

光・量子融合連携研究開発プログラム

シンポジウム

中性子と放射光の連携利用による
タンパク質反応プロセスの解明

京都大学大学院理学研究科

三木 邦夫

2014.12.8 秋葉原コンベンションホール

タンパク質研究の重要性

① タンパク質は、生体反応を担う基本的な分子であり、生命現象の理解に極めて重要である。

- ・タンパク質の構造研究は、その機能解明に直接的な情報を提供できる。
- ・構造・機能研究の成果は、多くのノーベル賞受賞の対象となっている。

② タンパク質は、特許一つで独占できる高価な商品である。

- ・世界的な年間の売り上げは、すでに5兆円規模にもなる。
(一品目あたりの売り上げも、大きいものでは5,000億円に達する)

低分子医薬品：タミフル(75mg) 309円／1錠

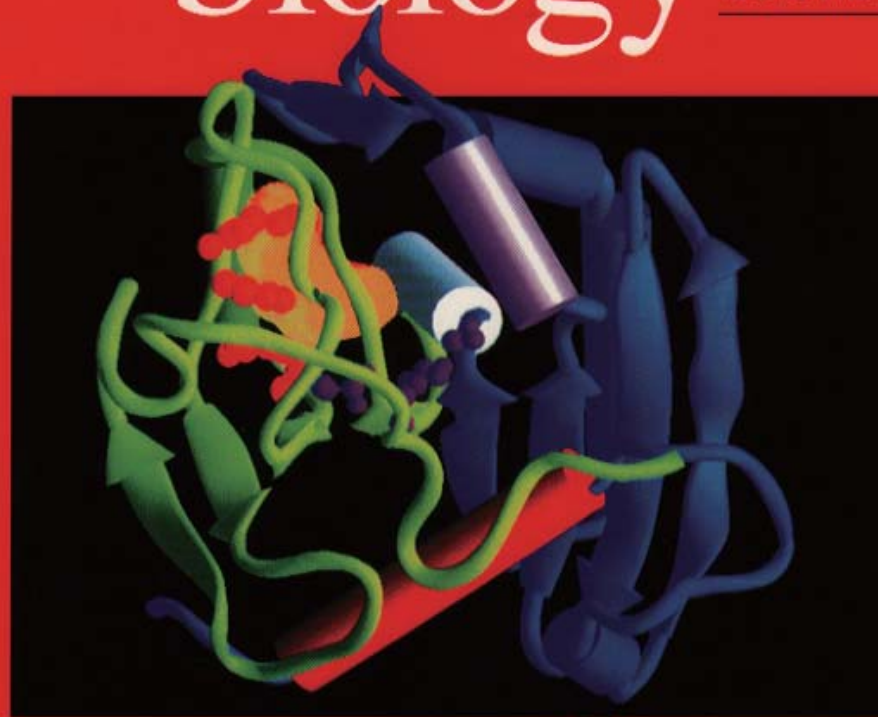
抗体医薬品 30,000~150,000円／100mg

機能メカニズムに迫るには、タンパク質分子の高精度の構造が不可欠であるが、これまでは、十分な高い精度には達しておらず、その結果、構造情報に基づく創薬や生体分子材料の設計には限界が生じている。

タンパク質構造研究の現状

nature Structural biology

january 1994
volume 1 no. 1



Buried polar
cavities in
lipases

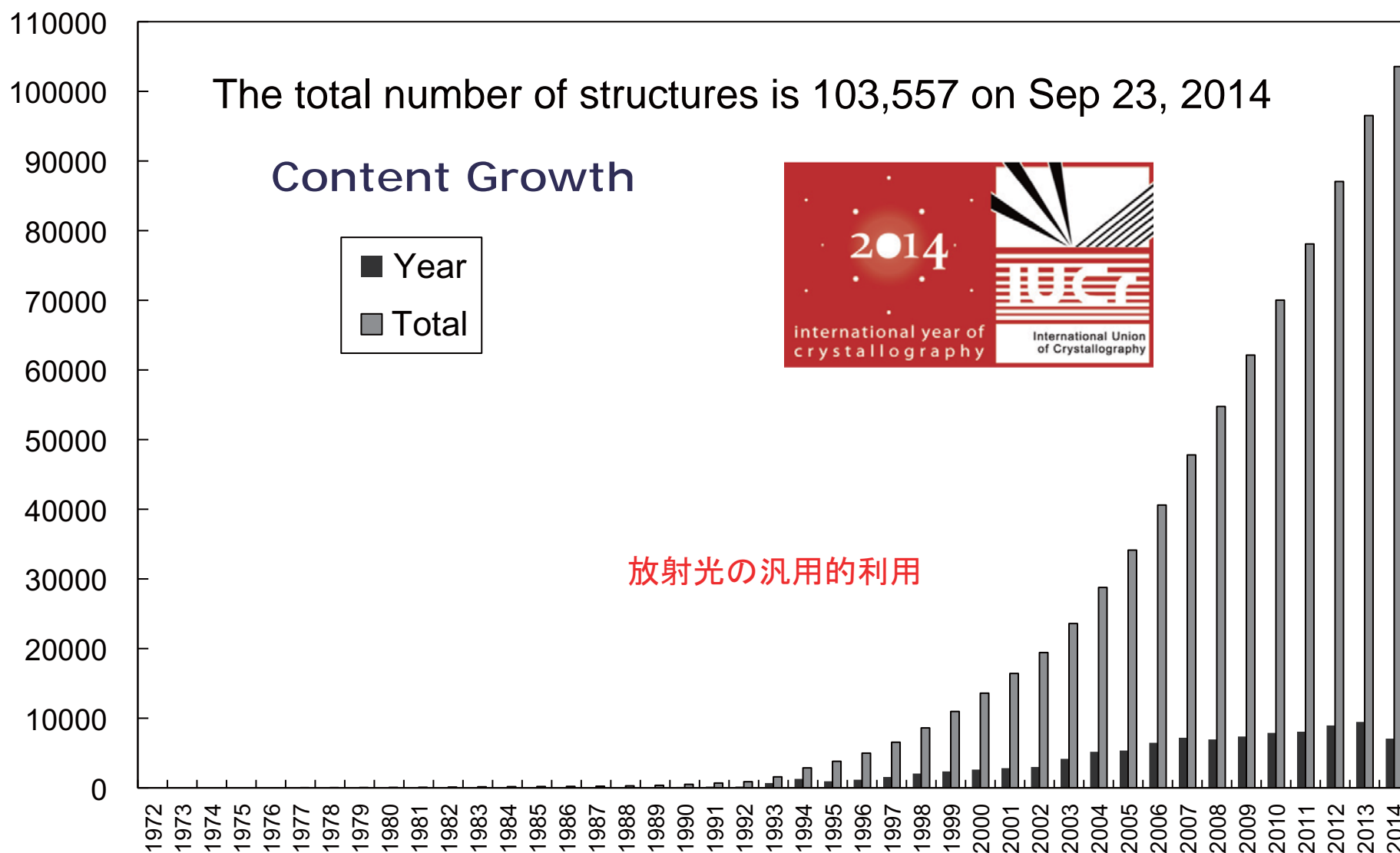
Ribozymes:
getting a grip
on the
substrates

Snapshots
of the
molten
globule

タンパク質構造研究の現状

Protein Data Bank (PDB)

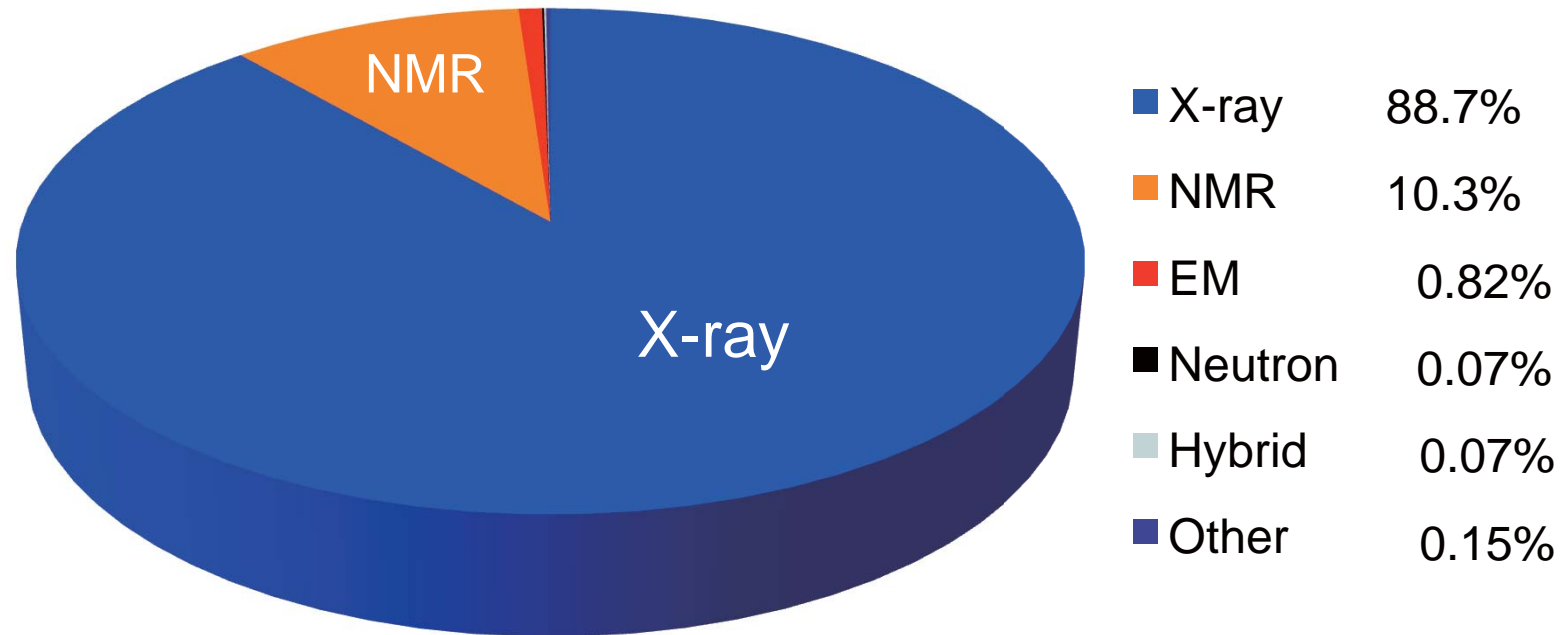
Database for 3D Structures of Biological Macromolecules



タンパク質構造研究の現状

PDBにおける構造決定の方法

There are 103,557 structures

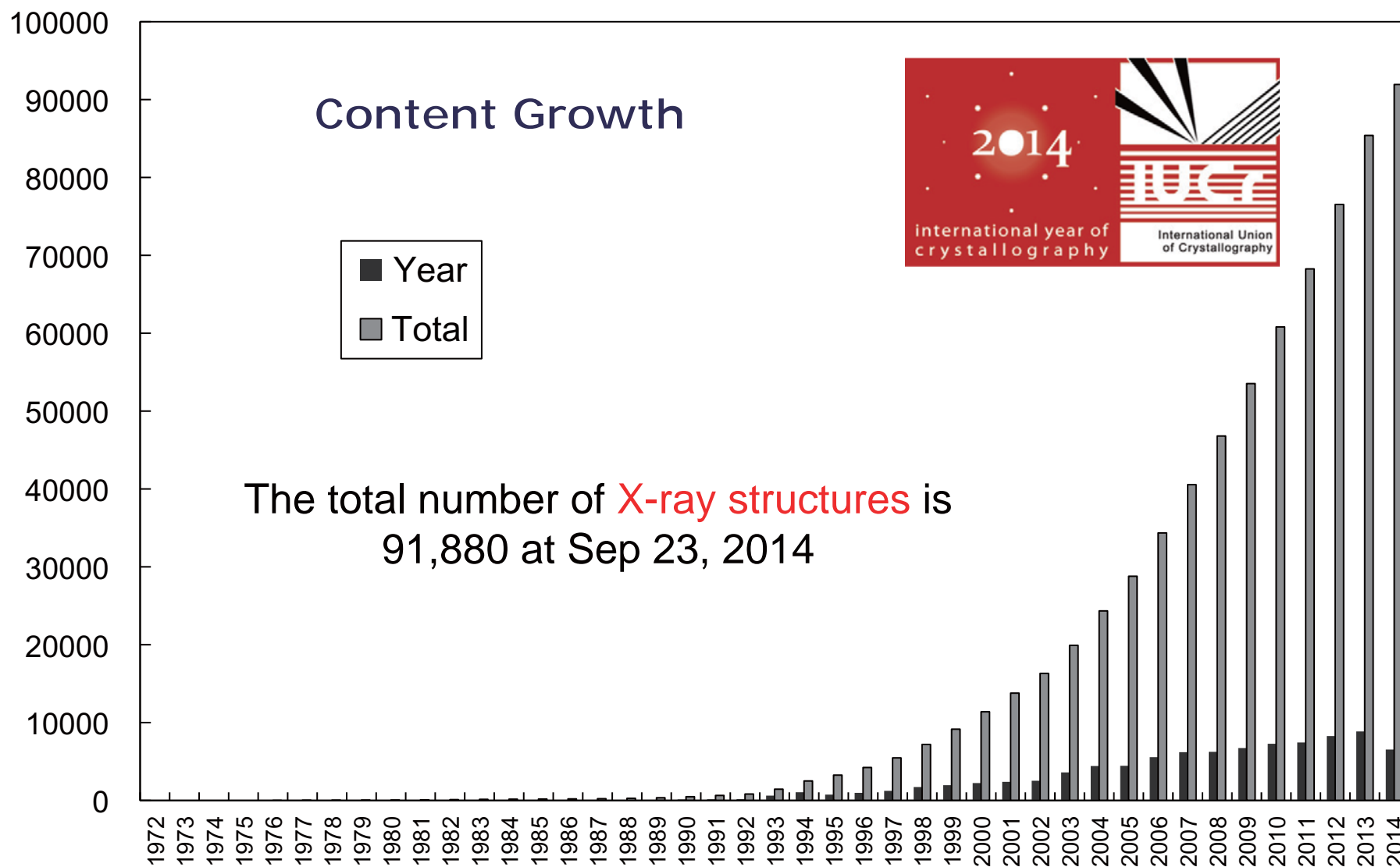


Sep 23, 2014

タンパク質構造研究の現状

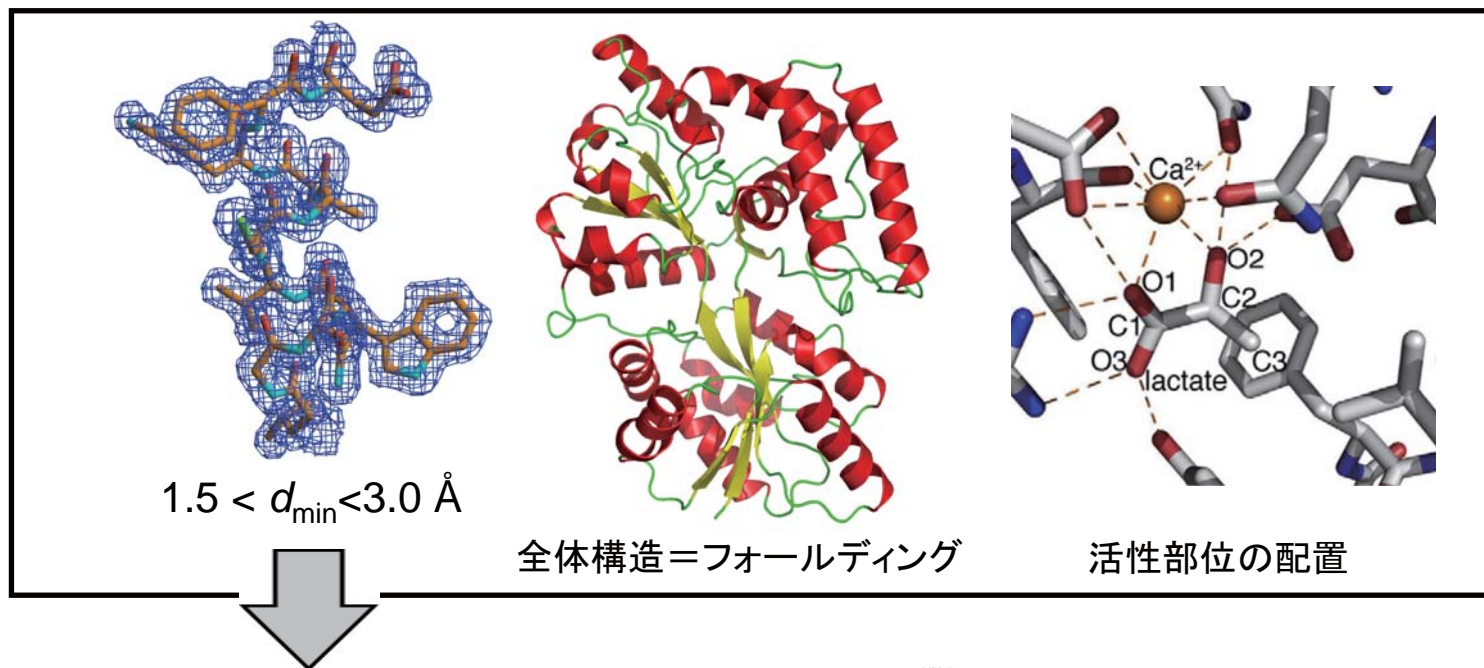
Protein Data Bank (PDB)

Database for 3D Structures of Biological Macromolecules



タンパク質結晶構造解析の現状

- 通常、個々の原子を分離できるほど分解能は高くない。
- アミノ酸の構造を電子密度に当てはめて、全体構造や活性部位の配置を解明。
- 機能を直接議論できるほどの定量性はない。



変異体解析など他の実験

機能の解明

放射光X線利用技術の高度化の結果、分子の化学状態を直接議論できる構造情報を与える「高分解能・高精度構造解析」が可能になりつつある。

タンパク質構造研究の近年の動向

③ 含まれる情報を最大限に引き出す構造解析

【精度】
反応プロセス

近年の技術革新が
新しい方向性を可能に

技術開発の進展

高分解能・高精度構造解析

高い信頼度の結合距離情報
水素原子・水分子の挙動
外殻電子の振舞い
タンパク質の化学反応プロセス

放射光と中性子の連携で可能になる

② 巨大で複雑な複合体の構造解析

タンパク3000 プロジェクト
(構造情報の蓄積)
2002 - 2007

ターゲットタンパク プロジェクト
(難タンパク質への挑戦)
2007-2012

【複雑さ】
巨大分子

① 広範で多様な対象の構造解析

構造ゲノム科学
構造プロテオミクス

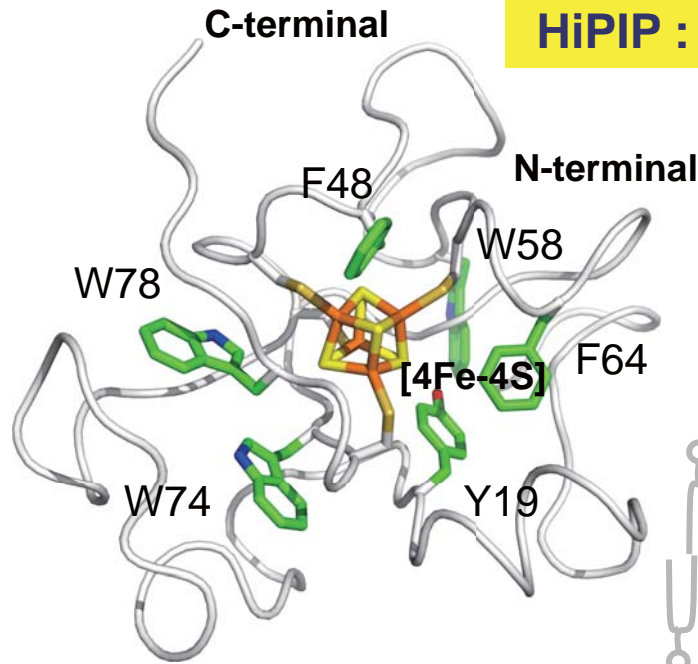
【数】 網羅的解析

超分子複合体
膜タンパク質複合体
タンパク質・核酸複合体
弱い相互作用の複合体

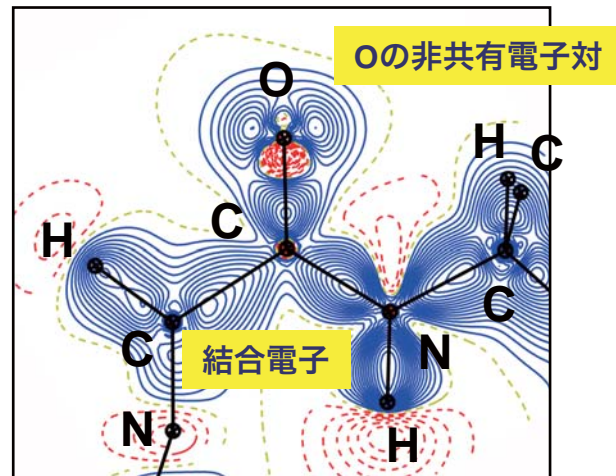
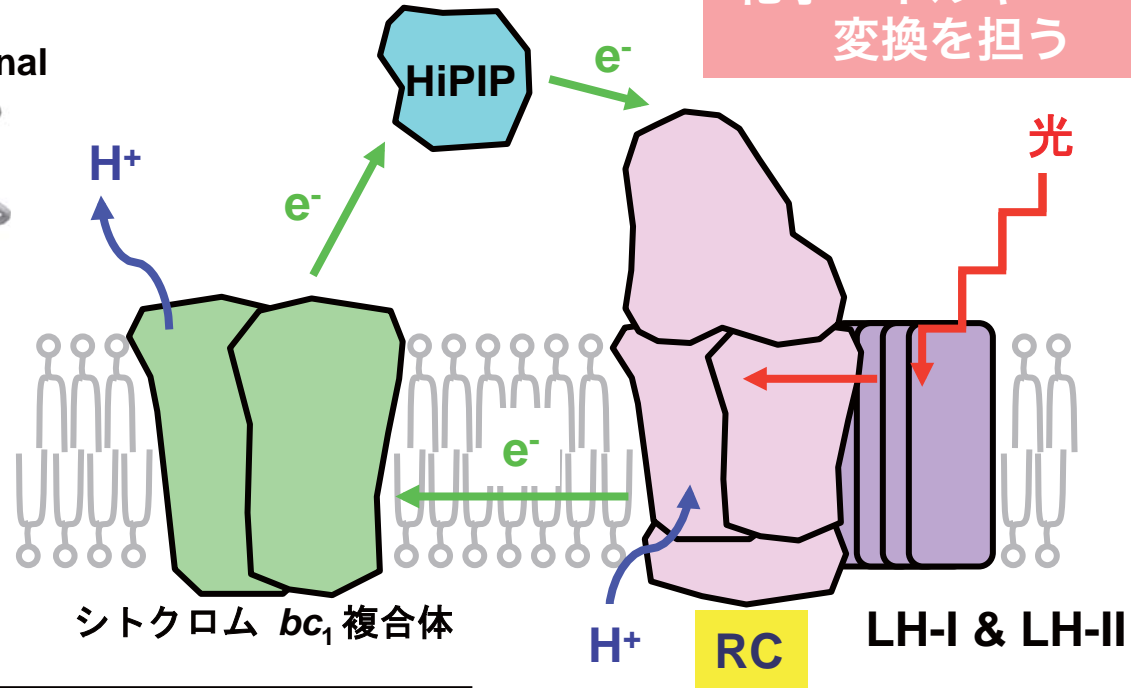
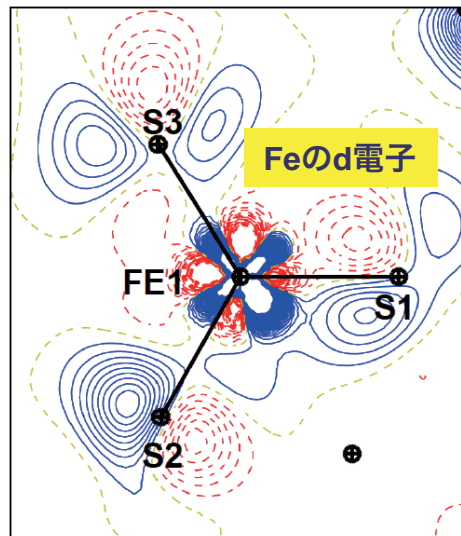
超高分解能X線結晶構造解析

HiPIP : 高電位鉄イオウタンパク質

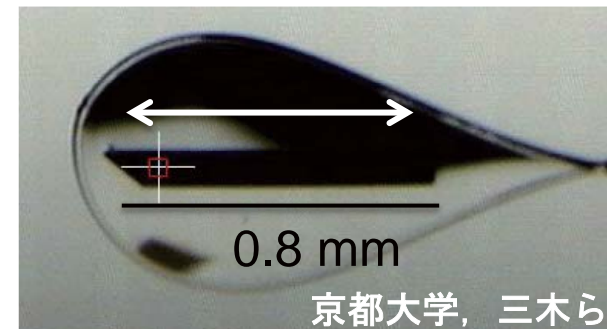
光エネルギーから
化学エネルギーへの変換を担う



超高分解能分解能での構造



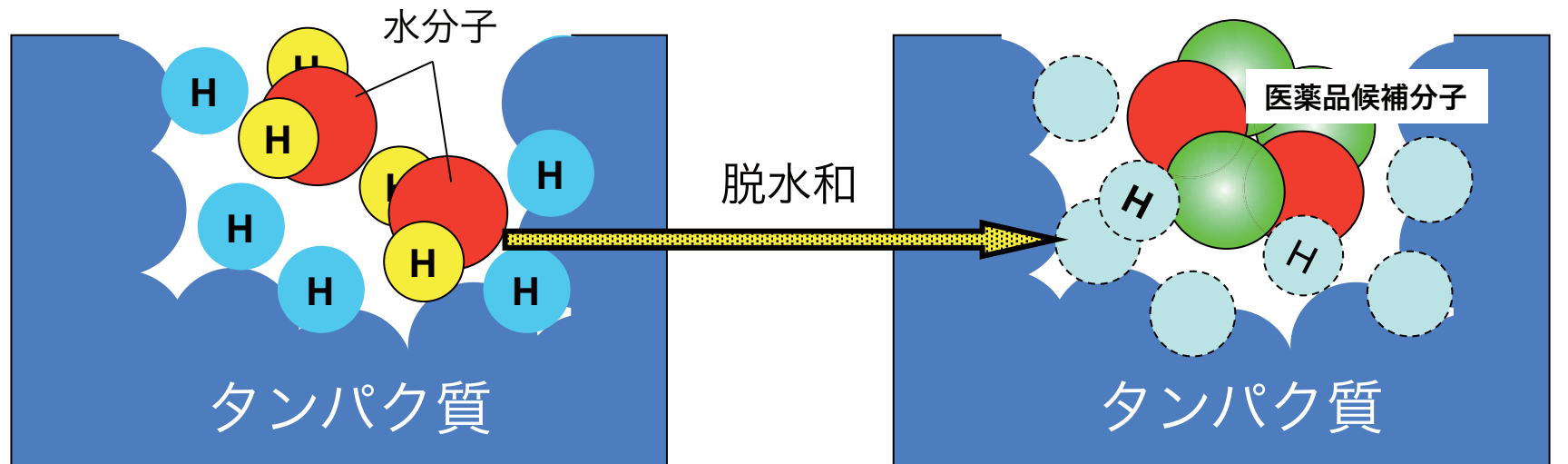
HiPIP の超高分解能の結晶



タンパク質構造研究（創薬）での水素

水素の決定には中性子での解析が不可欠である

- 学術的価値：水素位置や電子状態を把握した機能の解明
- 産業的応用：水素原子や水和水の寄与を考慮した医薬分子設計



これまでタンパク質における水素原子の位置は、決められていない

従来の設計手法には、医薬品結合に伴う水和水の脱水和の効果が考慮されていない

分子設計の高度化に必要な情報

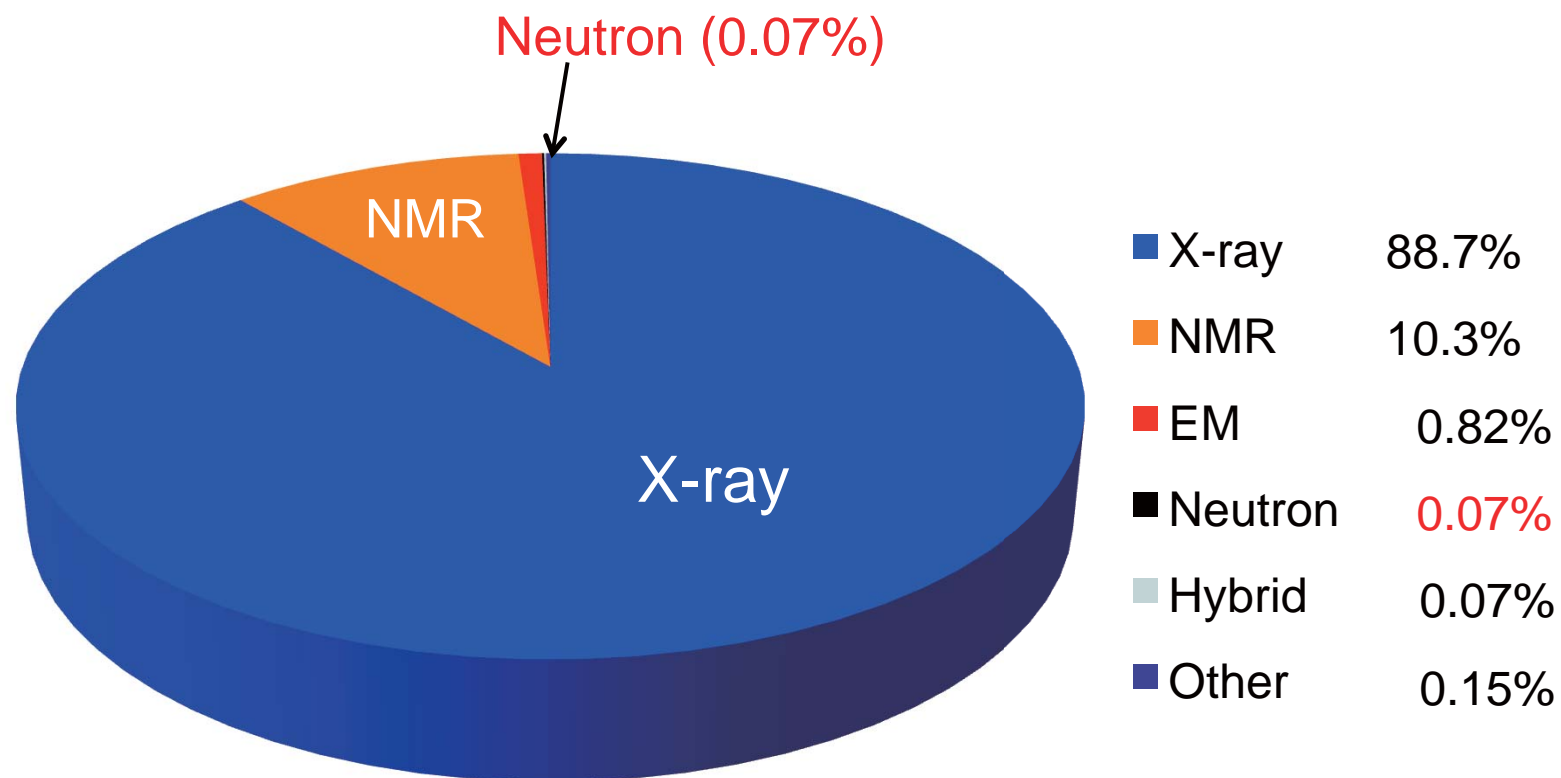
- ・ 水素原子の位置（座標、プロトン化）
- ・ 水和水の向き（水和水構造）
- ・ 医薬品候補分子との相互作用

放射光と中性子の連携で
これらの情報を取得できる

タンパク質構造研究の現状

PDBにおける構造決定の方法

There are 103,557 structures



Sep 23, 2014

研究の目的・方法および期待される成果

量子ビームの連携（放射光・中性子）による新しい構造生物学の創成

- 中性子構造解析の構造生物学分野への普及，汎用化
高分解能X線構造解析による超高精度タンパク質構造の獲得
- ・ 中性子回折による全水素原子の決定
 - ・ 超高分解能放射光構造解析による外殻電子の決定

研究方法

- 量子ビームの連携・相補利用のための技術開発
- ・ 高精度放射光X線／中性子構造解析法のための技術
 - ・ 解析用タンパク質試料の大量作製技術
 - ・ 結晶の大型化／高分解能化技術

期待される成果

- タンパク質の機能を担う水素原子や外殻電子の役割の解明
（新しい構造生物学 → 量子構造生物学）
リガンド結合における水和水の役割の解明（創薬ターゲット）

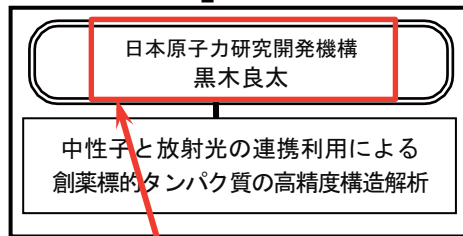
波及効果

- 構造生物学の革新／材料開発・医薬品開発への貢献
生命科学者の構造研究への参加の拡大，若手人材の育成

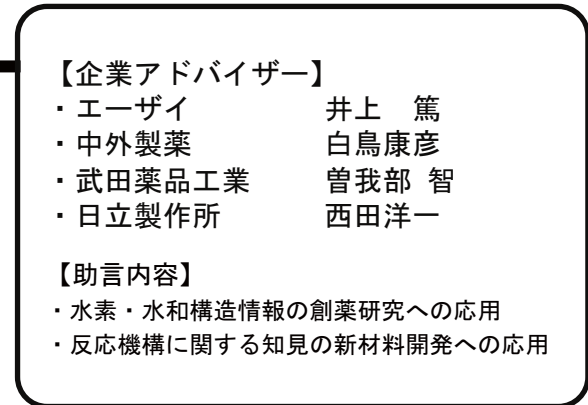
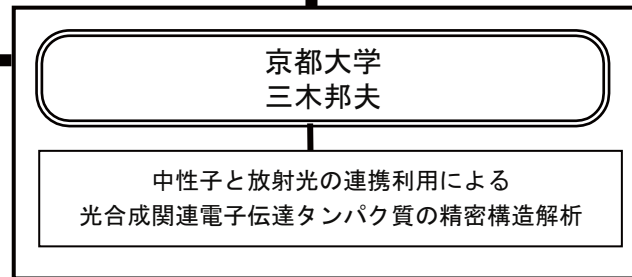
研究組織

「中性子と放射光の連携利用によるタンパク質反応プロセスの解明」
研究開発全体の取りまとめ：京都大学大学院理学研究科・三木邦夫

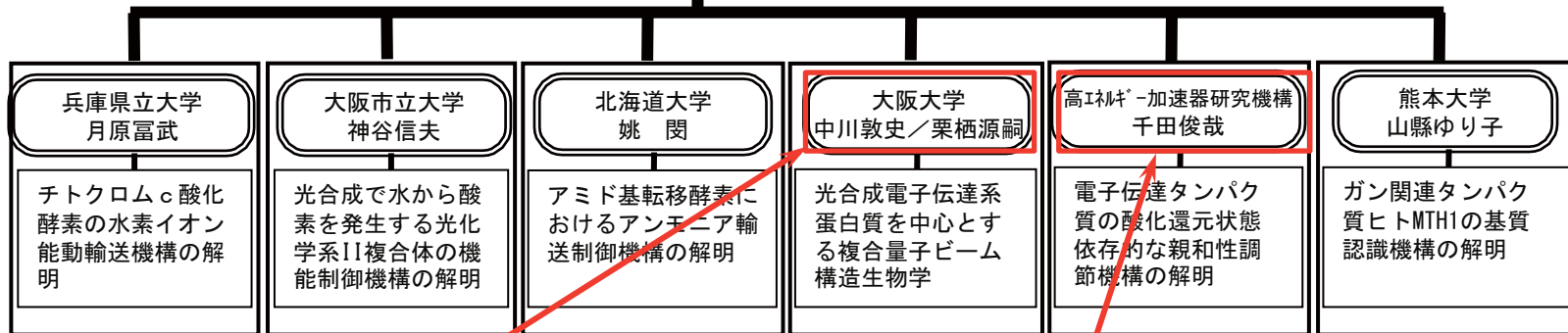
中性子施設



J-PARC など



放射光施設



SPring-8: BL44XU

構造生物学コミュニティー

Photo Factory: BL1A, 5A, 17A, NW12A, NE3A

研究計画

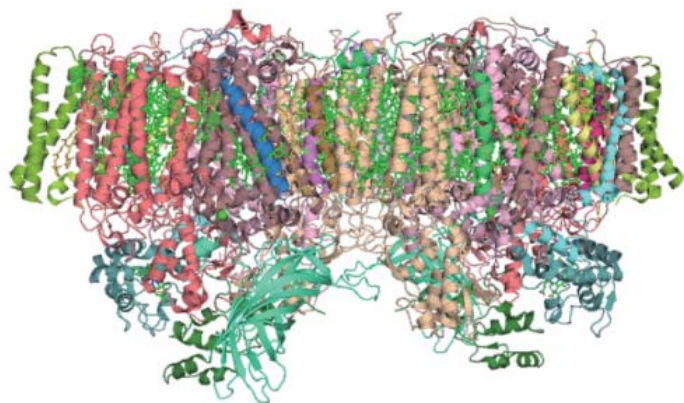
研究開発項目	担当機関	H25	H26	H27	H28	H29
1) 中性子とX線の連携利用による 光合成関連電子伝達タンパク質 の精密構造解析 (相補利用技術の高度化)	京都大学・大学院理学研究科/原子炉実験所	超高分解能X線結晶解析	中性子回折データの収集	中性子・X線同時解析	中性子回折データ収集	連携利用技術の高度化
		相補利用実験用試料作製	相補利用実験用試料作製	外殻電子可視化技術開発		
2) 中性子と放射光の連携利用による 創薬標的タンパク質 の高精度構造解析 (中性子利用技術高度化)	日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門	大型高品質結晶作製	中性子回折データの収集	中性子・X線同時解析	中性子・X線同時解析	中性子・X線同時利用による創薬手法の検討
		試料大量作製技術の高度化	大型結晶作製システム構築	回折データ収集基盤技術整備		
3) チトクロームc酸化酵素 の水素イオン能動輸送機構の解明	兵庫県立大学・大学院生命理学研究科	蛋白質試料の大量作製	大型結晶作製と試料冷却条件の決定	高分解能放射光X線回折データ収集	中性子回折データ収集	中性子・X線同時解析
4) 光合成で水から酸素を発生する 光化学系II複合体 の機能制御機構の解明	大阪市立大学・複合先端研究機構	同上	同上	同上	同上	同上
5) アミド基転移酵素 におけるアンモニア輸送制御機構の解明	北海道大学・先端生命科学研究院	同上	同上	同上	同上	同上
6) 光合成電子伝達系タンパク質 を中心とする複合量子ビーム構造生物学	大阪大学・蛋白質質研究所	大型高品質結晶作製	中性子回折データの収集	中性子・X線同時解析	同上	同上
		回折データ収集技術基盤整備	回折データ収集技術基盤整備	回折データ収集基盤技術整備		
7) 電子伝達タンパク質 の酸化還元状態依存的な親和性調節機構の解明	高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所	蛋白質試料の大量作製	大型結晶作製と試料冷却条件の決定	高分解能放射光X線回折データ収集	同上	同上
8) ガン関連タンパク質 ヒトMTH1の基質認識機構の解明	熊本大学・大学院生命科学研究所	同上	同上	同上	同上	同上

解析対象タンパク質

化学反応プロセス

生命現象の理解に最重要なタンパク質群

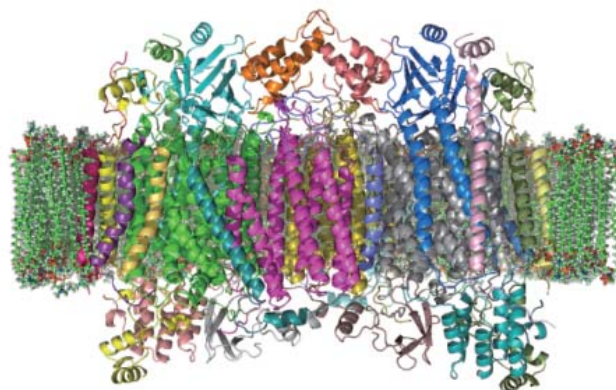
生命現象の鍵を握る分子量をもつ超分子膜タンパク質複合体



シトクロムc酸化酵素

プロトン輸送に関わる荷電性アミノ酸の解離状態, 水分子, 水酸化イオンの正確な配向が重要

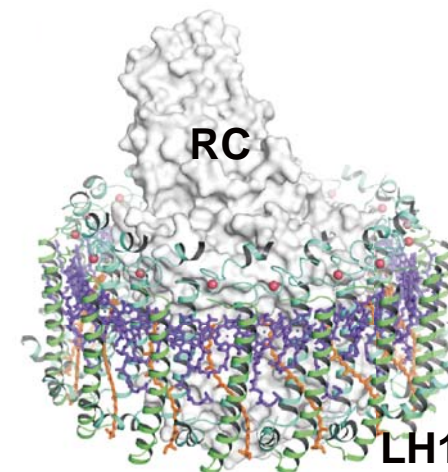
月原ら (兵庫県立大)
Science (1995)
PNAS (2010) 他



光合成PS-II (光化学系 II)

水の分解に関わるMnクラスター周辺での水素位置が酸素発生機構の理解に重要

神谷ら (大阪市立大)
PNAS (2009)
Nature (2011) 他



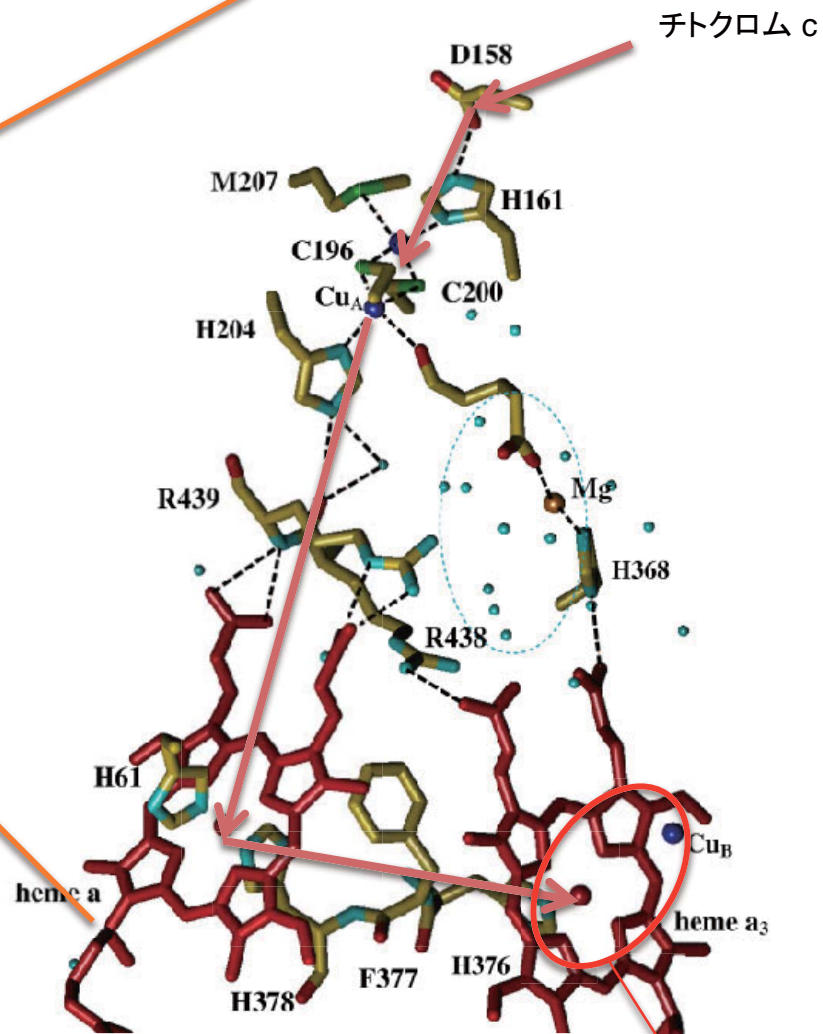
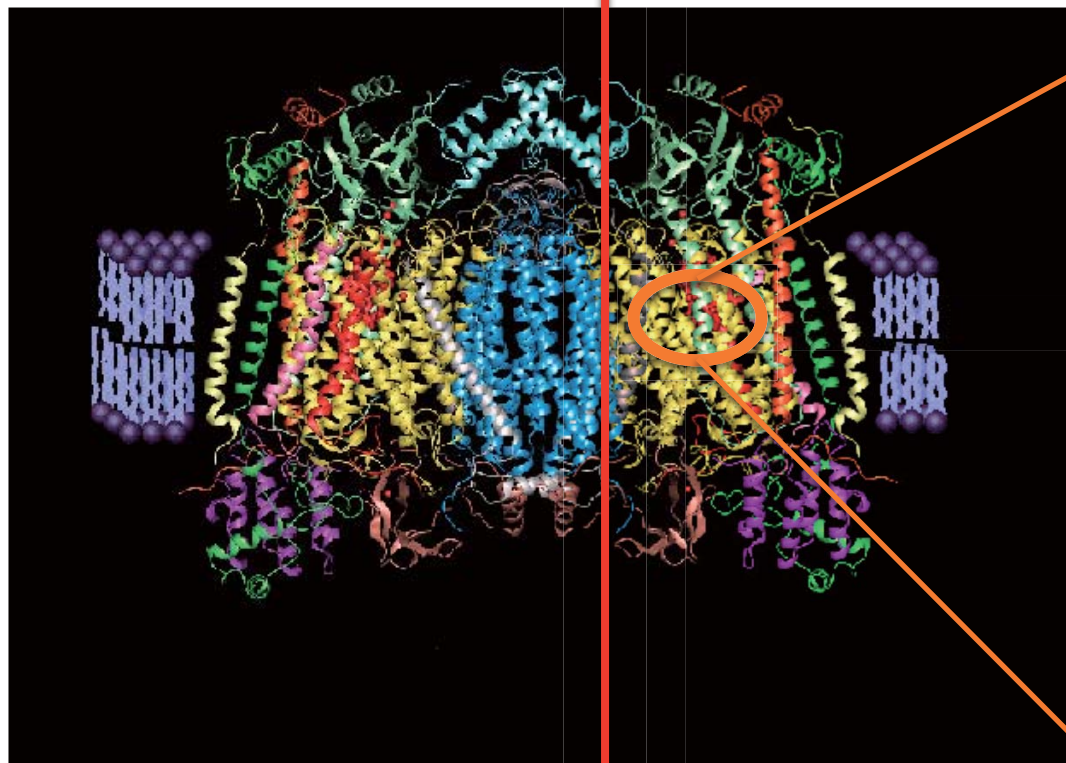
光合成細菌LH1-RC複合体

電荷分離を起こした後のキノンとキノールの交換による電子と水素の移動が重要

三木, 竹田ら (京大)
Nature (2014) 他

シトクロム c 酸化酵素

タンパク質内部にはどのような仕組みがあるのだろうか

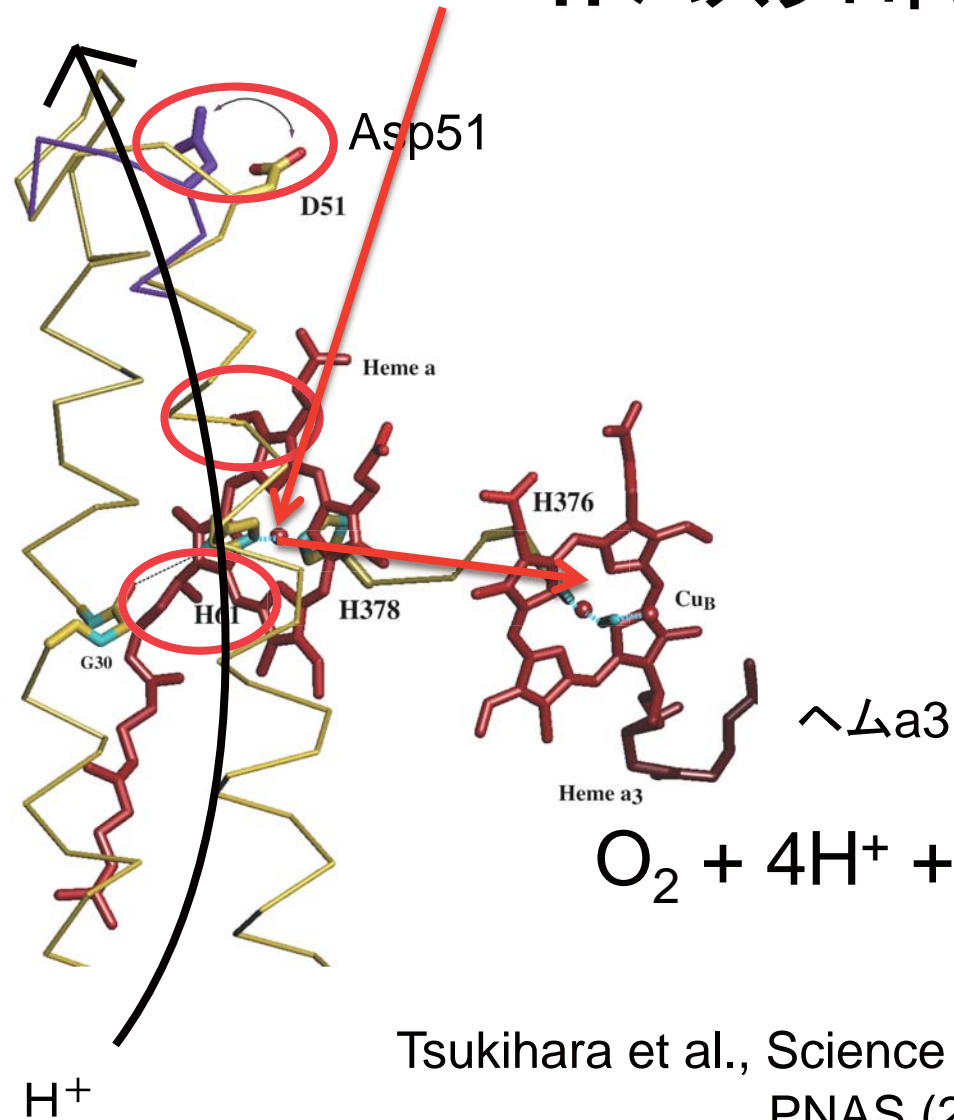


Tsukihara, et al.,
Science (1995), Science(1996)

酸素還元中心

シトクロム c 酸化酵素

H-パスプロトンポンプ説



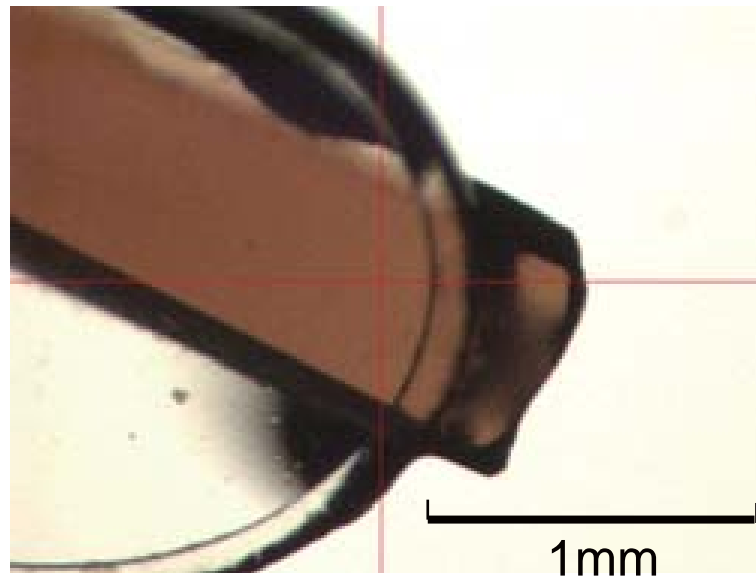
Tsukihara et al., Science (1998)

PNAS (2003), PNAS (2007)

シトクロム c 酸化酵素の大型結晶化

大きい結晶を得るために

結晶核になる蛋白質溶液中の不純物を遠心分離法で取り除く



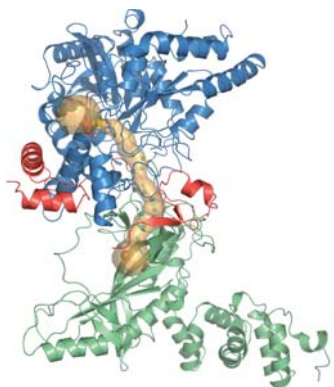
クライオグループに装着したチトクロム酸化酵素の大型結晶

分子量は 210,000 であり, さらに厚さがもっと欲しい

解析対象タンパク質

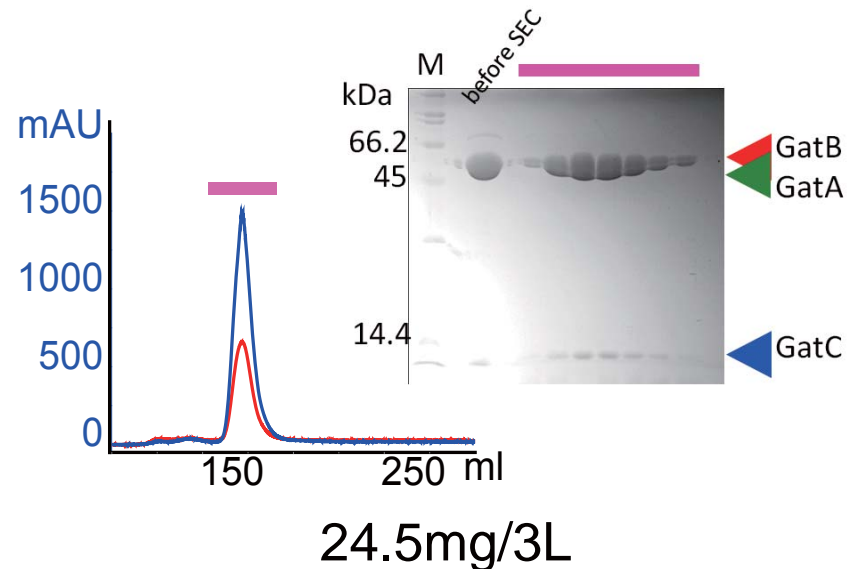
化学反応プロセス

生命現象の理解に重要なタンパク質群

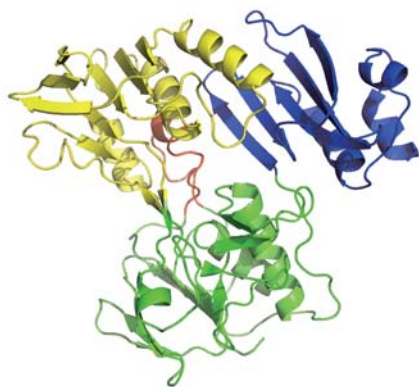


アンモニアチャンネル
内のアンモニア分子
と水分子の水素による
区別が重要

姚ら (北海道大)
Science (2006)
NAR (2010) 他

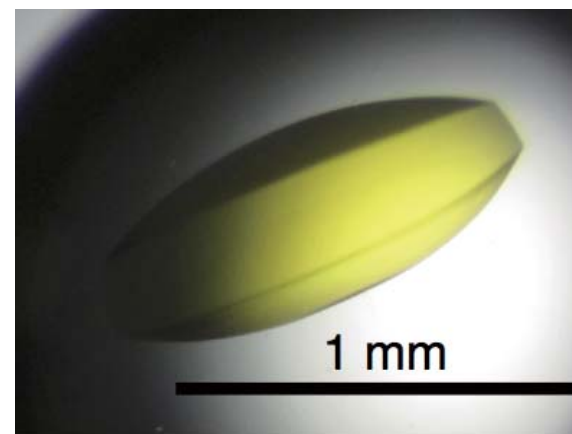


アミド基転移酵素 GatCAB



FADの酸化還元状態を
決定するために水素に
よる区別が重要

千田ら (高エネ機構)
JMB (2000) 他

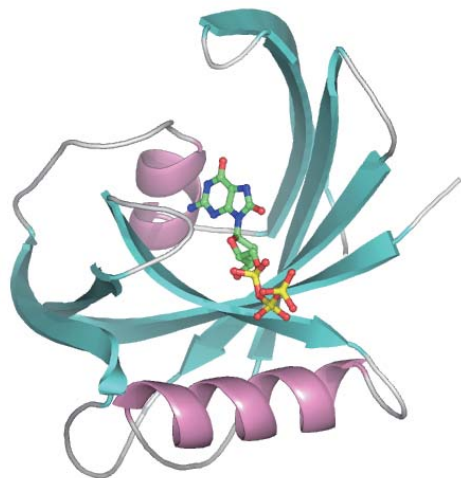


BphA4 (FAD含有フェレドキシン還元酵素)

解析対象タンパク質

分子認識反応プロセス

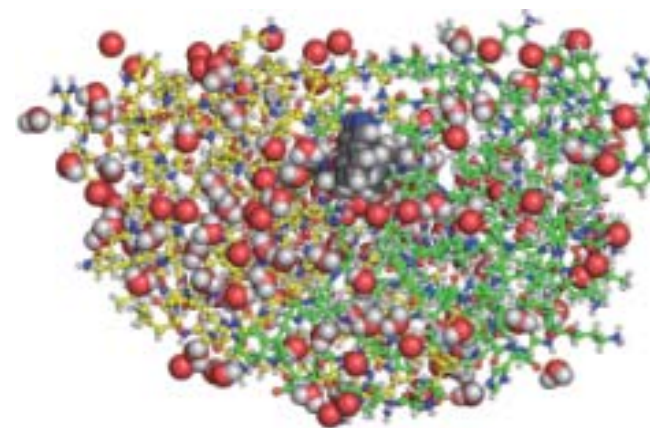
医薬品の標的となるタンパク質群
(創薬標的タンパク質)



がん化に関するヒトMTH1タンパク質

基質認識部位の2つのAsp
残基のプロトン化の有無が
重要

山縣ら (熊本大)
JBC (2010)
Nature (2012) 他



HIV1プロテアーゼ その他

阻害剤結合に伴う水和構造
変化, プロトン解離性アミ
ノ酸残基の構造変化が重要

黒木ら (原子力機構)
PNAS (2009) 他

研究成果（重水素化条件の検討）

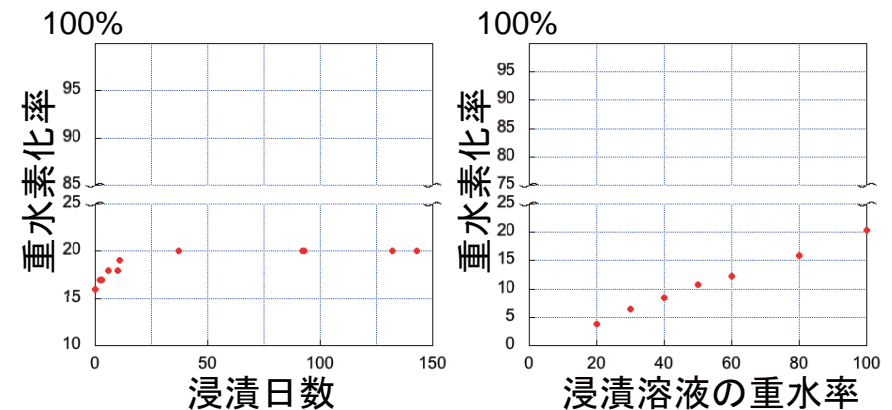
京都大学・原子炉

タンパク質重水素化率の評価の試み

重水素化タンパク質結晶作成方法

	D化率	操作	必要時間	費用
重水での 試料大量発現(作製)	◎	△	○	✖
重水素化試薬で 結晶化	✖	◎	○	○
重水に結晶を浸漬	△	◎	△	△

質量分析法での重水素置換数の評価



タンパク質重水素化の数値化法が未詳
そのために
費用対効果が高い重水素化方法が不明

重水素置換数の数値化により

- ・最適浸漬時間が推定可
- ・浸漬法では重水素化に上限が存在

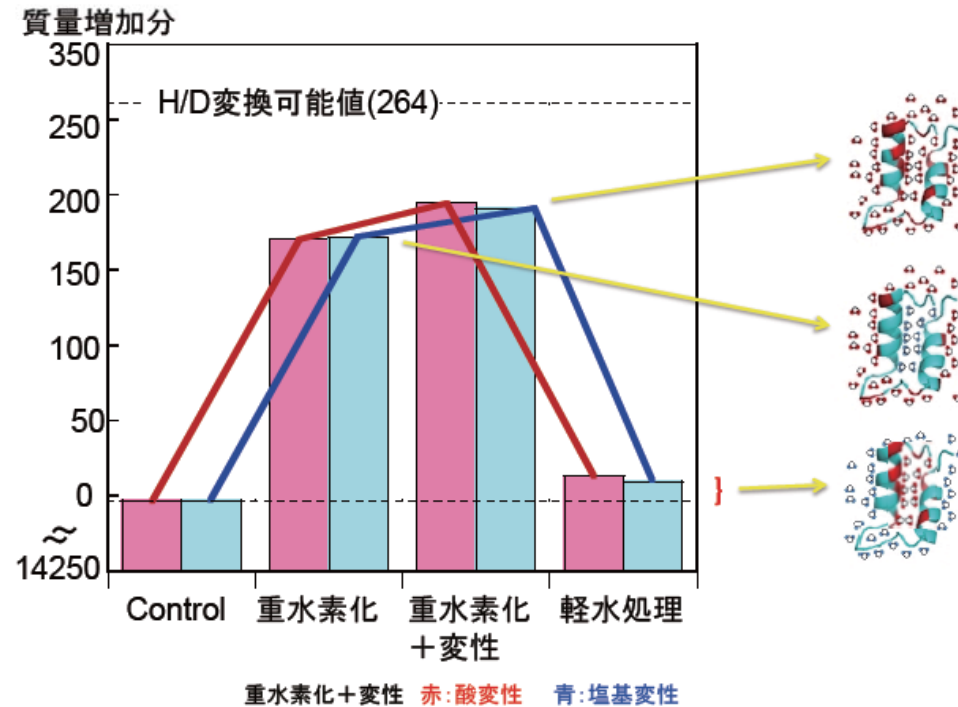
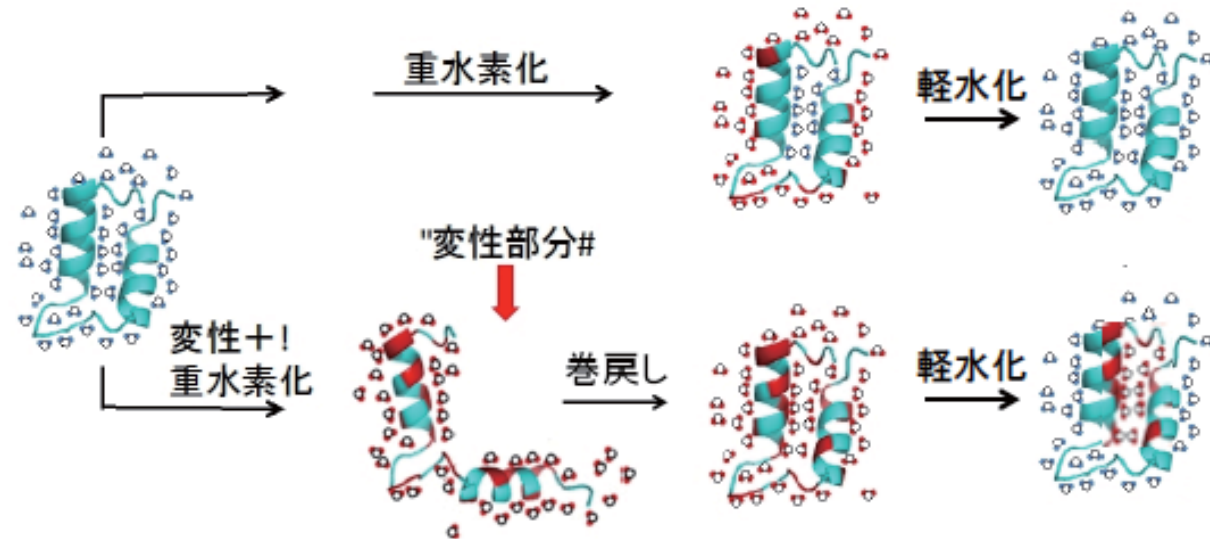
- ・簡便
- ・短時間
- ・微量試料

での、重水素化数評価方法が必要

費用対効果の良い
重水素置換法の開発へ

研究成果 (重水素化条件の検討)

変性状態を利用した
重水素化タンパク質
の作成の試み



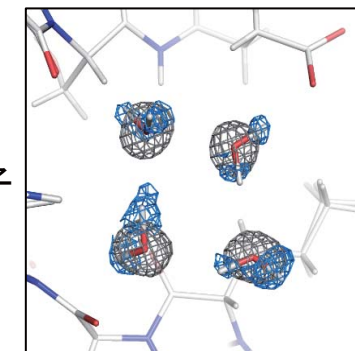
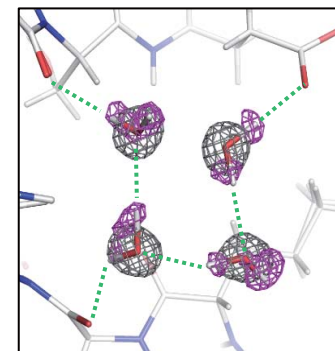
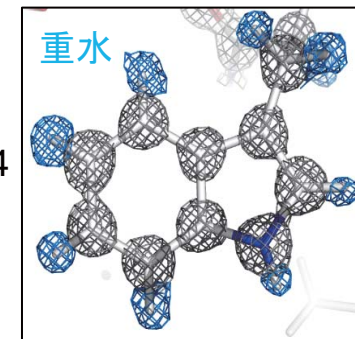
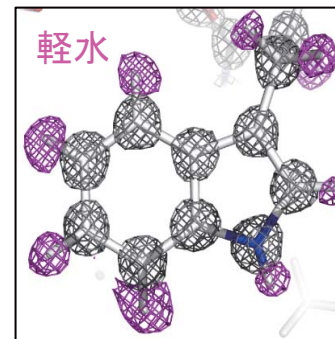
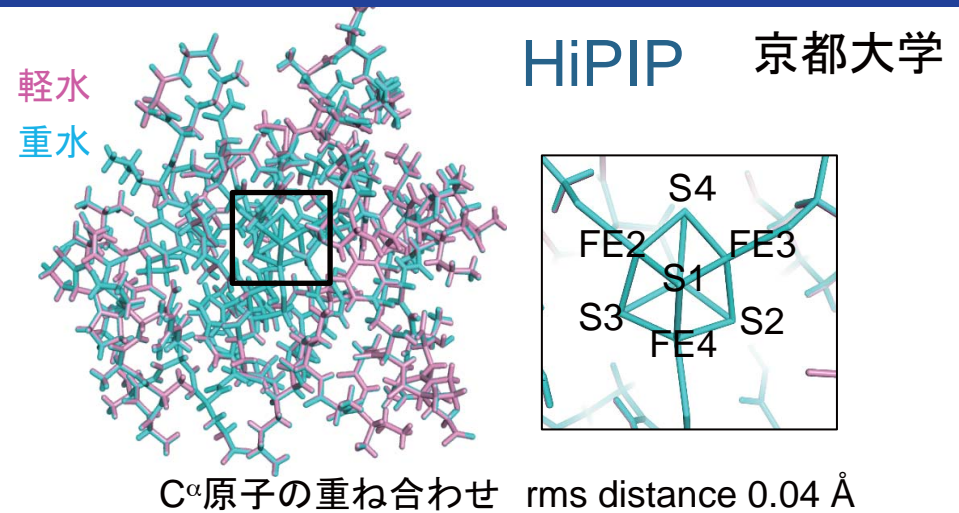
研究成果 (HiPIP 重水素化の影響)

重水置換の超高分解能構造への影響

結晶の重水置換による影響を超高分解能のX線結晶構造を用いて検証した結果、回折データ、構造どちらにおいても影響はほとんど観測されなかった

回折データ、精密化の統計値

	軽水 (H ₂ O)	重水 (D ₂ O)
回折データ		
分解能 (Å)	20-0.48 (0.50-0.48)	20-0.48 (0.50-0.48)
格子定数 a (Å)	46.3	46.3
b (Å)	58.7	58.7
c (Å)	23.5	23.4
精密化		
R _{work} (%), R _{free} (%)	8.06, 8.54	7.99, 8.46
水素原子数		
タンパク質	674	674
水分子	46	46



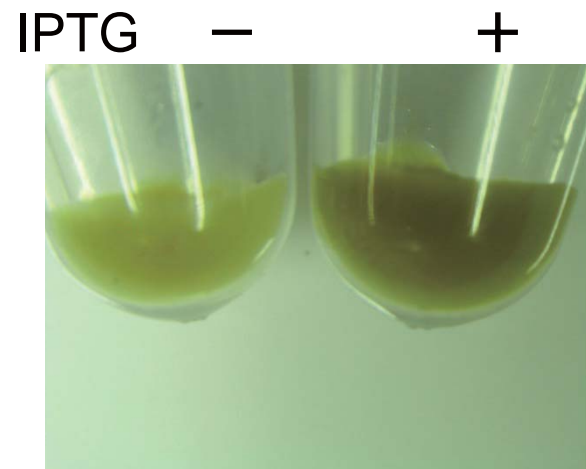
Gray: 2Fo-Fc map (1.5 σ), Pink, Blue: 軽水、重水 水素オミットマップ (2.0 σ)

研究成果 (HiPIP 全重水素化のための発現系)

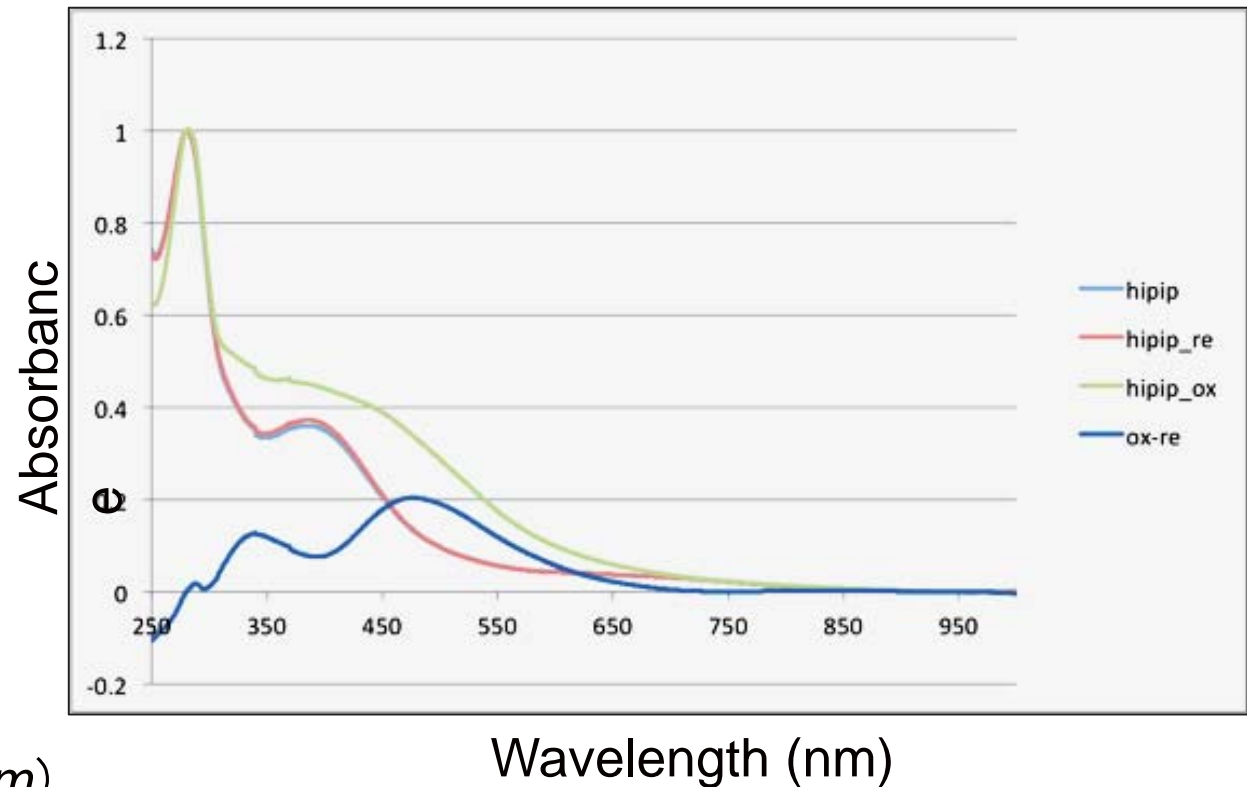
HiPIPの大腸菌発現系構築 (さらなる高分解能解析に向けて)

京都大学

HiPIPの合成遺伝子をpET21aに挿入
大腸菌BL21(DE3)pLysSに形質転換



8.1 mg/L from *E. coli*
(0.8 mg/L from *T. tepidum*)



鉄イオウクラスターを持ち、酸化還元状態変化を起こす

研究成果 (HiPIP 全重水素化のための発現系)

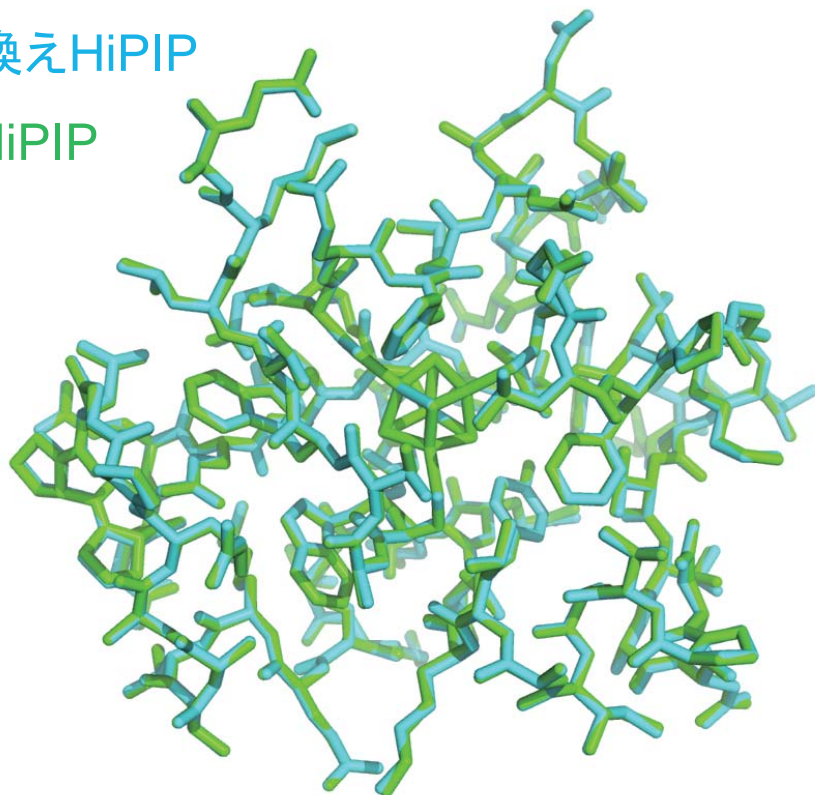
組み換えHiPIPの構造比較

京都大学

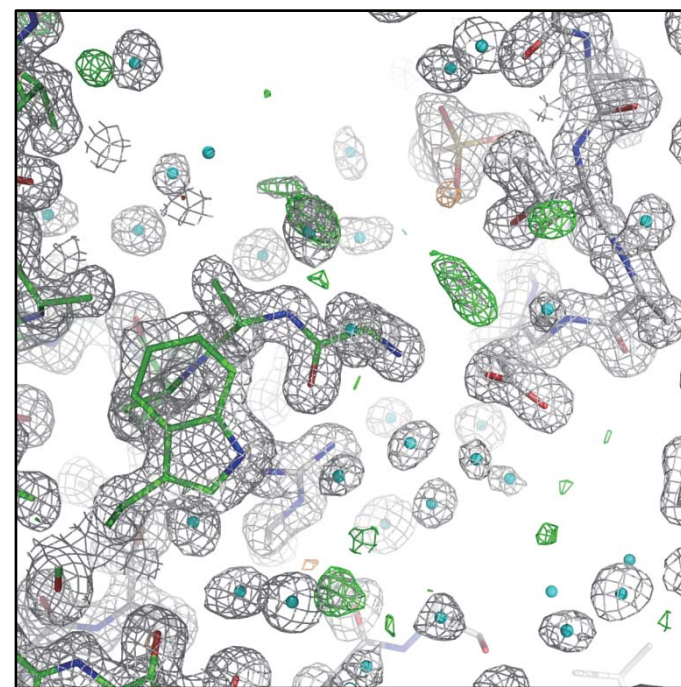
1.6 Å分解能(実験室系X線)

組み換えHiPIP

天然HiPIP



C^α原子の重ね合わせ rmsd 0.08 Å



N末端付近の電子密度

N末端メチオニンの影響はない

研究成果 (HiPIP 中性子回折実験・構造解析)

高電位鉄硫黄タンパク質 (High-Potential Iron-sulfur Protein; HiPIP)

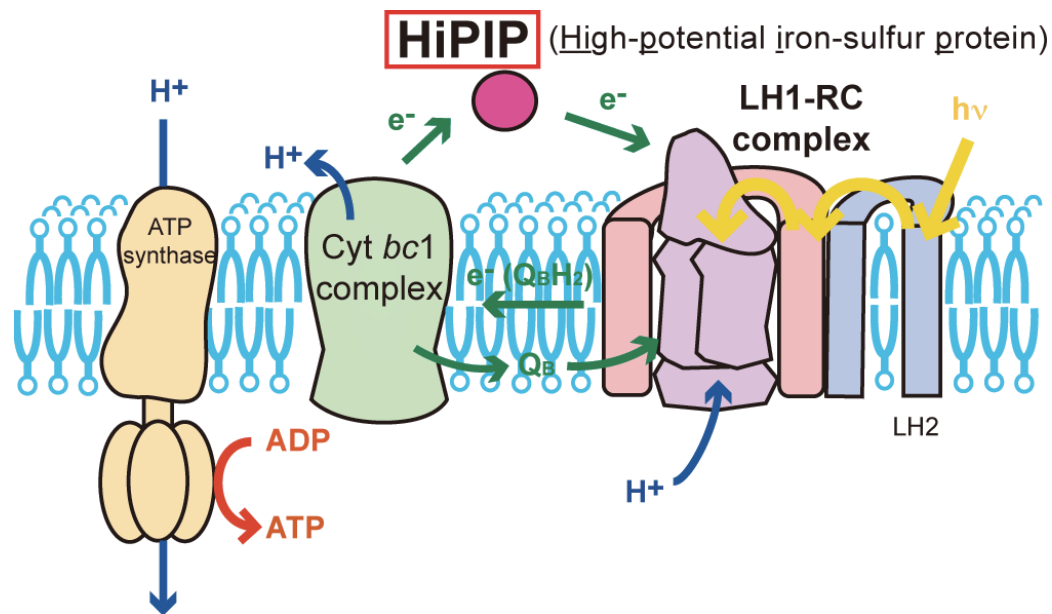
紅色光合成細菌の電子伝達系ではたらく

[Fe₄S₄]クラスターを結合

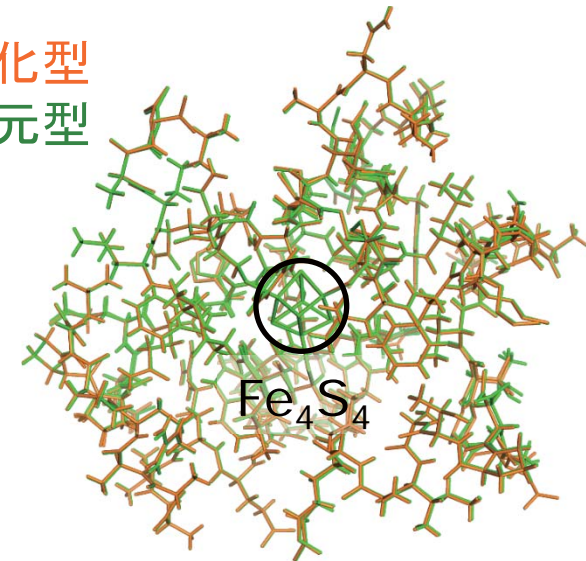
超高分解能X線結晶構造を決定

タンパク質表面の解離性残基のプロトン化状態、溶媒(水分子)の配向変化などが酸化還元状態の安定化に影響

京都大学
原子力機構



酸化型
還元型

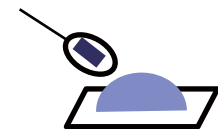


C^α原子の重ね合わせ
rms distance 0.09 Å

研究成果 (HiPIP 中性子回折実験・構造解析)

大型結晶作製・重水溶液および抗凍結溶液置換(HiPIP)

マクロシーディング法の検討により良質な大型結晶を作製



シーディング
は1回のみ

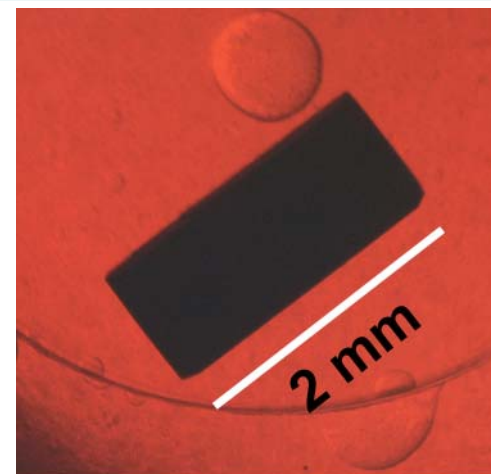
スモールスケールで相図作成
(Drop size = 4 μ l)



大容量の結晶成長溶液を使用
(Drop size = 500 μ l)



結晶成長溶液量
スケールアップ



抗凍結溶液置換

種結晶サイズ:

0.6 × 0.2 × 0.1 mm³ (0.01 mm³)

結晶成長溶液(重水溶液):

9 mg/ml Protein

1.7 M Ammonium Sulfate-D

0.1 M Na-citrate-D pD 4.5

温度: 20°C

インキュベーション期間: 6ヶ月

抗凍結剤として重水素化グリセロールを使用。最終的な抗凍結剤濃度に達するまで、結晶周囲の溶液を20段階、5分間隔で徐々に抗凍結溶液に置換。

原子力機構
京都大学

研究成果 (b5R 中性子回折実験・構造解析)

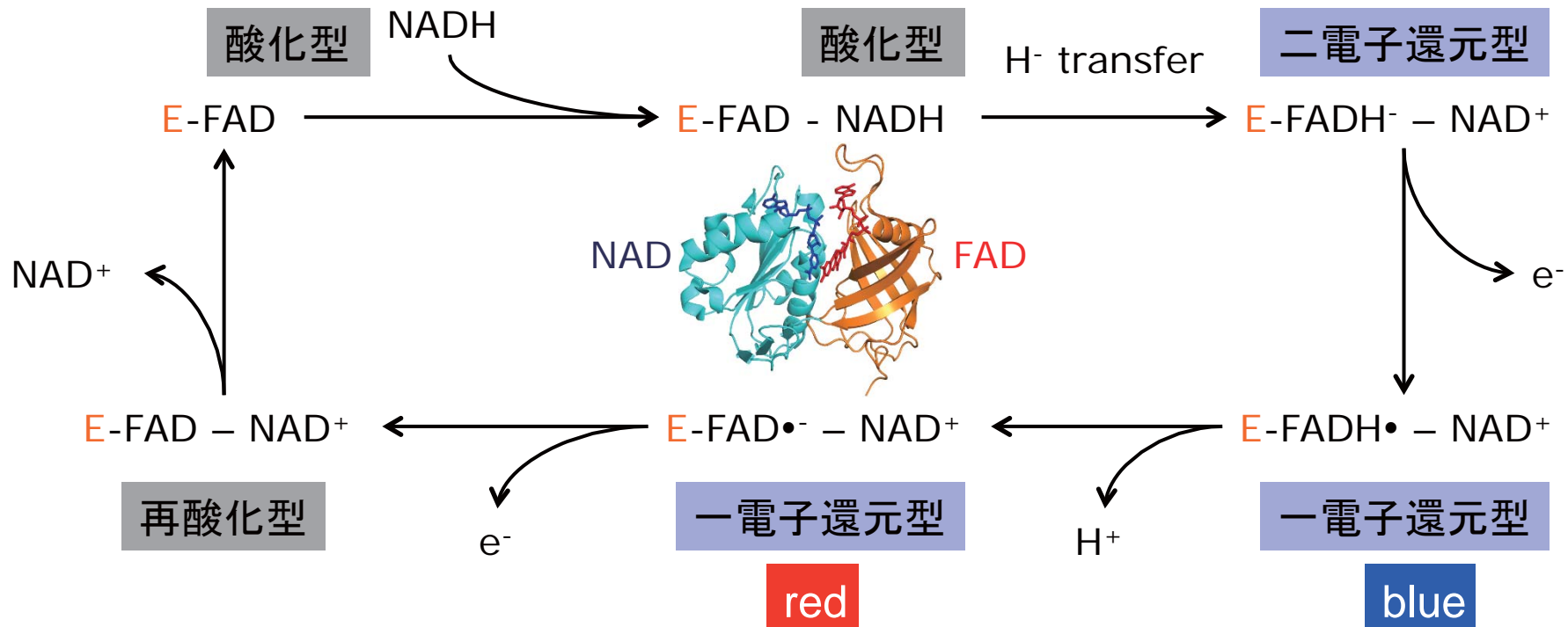
シトクロム b_5 還元酵素 (NADH-Cytochrome b_5 reductase; b5R)

- 小胞体における脂肪酸, コレステロール代謝、生体異物の酸化に関与 原子力機構
- バイオ燃料電池の電極素材としての利用研究が展開中 京都大学

0.78 Å分解能のX線結晶構造(酸化型)および下記サイクルの種々の状態を報告
(山田 *et al.*, JMB 2013)

酸化還元サイクルには水素と電子の移動を伴う

FAD~Thr66~His49間の水素結合がFADからのプロトン引き抜きに関与⇒blueからredへの変換を制御？

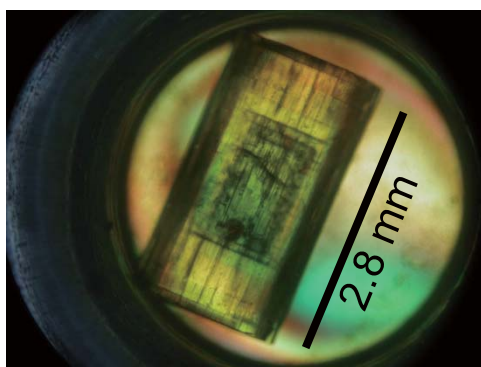


研究成果 (b5R 中性子回折実験・構造解析)

大型結晶作製、重水溶液および抗凍結溶液置換(b5R)

嫌気下でのバッチ法により良質な大型結晶を作製

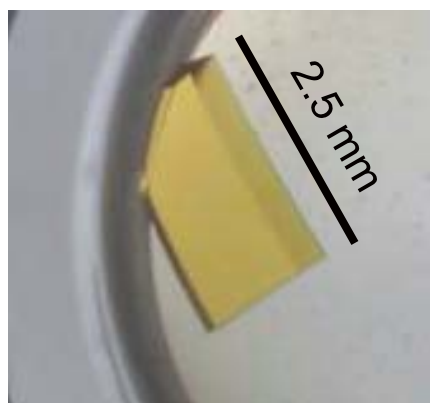
好気化
タンパク質溶液を逐次添加



1ヶ月以上保存すると結晶の劣化が見られた



嫌気化
バッチ法



重水置換

抗凍結溶液置換

抗凍結剤として重水素化グリセロールを使用。最終的な抗凍結剤濃度に達するまで、結晶周囲の溶液を10段階、2分間隔で徐々に抗凍結溶液に置換。

タンパク質溶液:

30 mg/ml Protein

10 mM KPO_4 pH 7.0

1 mM DTT

沈殿剤溶液:

6% (w/v) PEG3350

タンパク質溶液+沈殿剤溶液:

50 μl + 50 μl

温度: 室温

インキュベート期間: 1-2週間

嫌気性チャンバー内で結晶を重水環境に置換し2週間以上保存。重水溶液は、結晶化条件より沈殿時濃度を高くし(10% (w/v) PEG3350)、結晶の劣化を防止。

今後の研究計画

- 大量のタンパク質試料調製のための技術開発
大量発現系の確立など
- 大型結晶化スクリーニングシステムの開発
- 膜タンパク質の大型結晶作製技術の開発
- 重水素置換タンパク質作製法の開発
- 高分解能中性子回折データ測定法の開発
- 高分解能結晶作製技術の開発
- X線損傷の影響を除去する回折データ測定法の開発
- 膜タンパク質の放射光での高精度構造解析
- 中性子構造解析と連携した放射光高分解能解析による
タンパク質の外殻電子密度解析