

## iBIX タンパク質構造研究会 開催案内

テーマ：タンパク質用中性子構造解析装置 iBIX の成果と今後の解明すべき課題

主催：茨城県中性子利用研究会

共催：中性子産業利用推進協議会

J-PARC MLF 利用者懇談会

協賛：総合科学研究機構(CROSS)中性子科学センター

開催日時：2021年8月20日(金) 13:00-17:00

場所：オンライン開催(ウェブ会議システムは後日通知)

参加費：無料

**趣旨**：クライオ電子顕微鏡 EM は、結晶化を必要とせず、水溶液中のタンパク質を凍らせて立体構造を決める。いくつかのユニットから成る巨大な複合タンパク質に威力を発揮し、100 kDa 以上のタンパク質では、2 Å 程度の分解能を切るデータもあり、水素原子も観測される場合もあるが、他方 100kDa を切ると困難となる。X 線結晶構造解析は、現在も結晶化が可能であればタンパク質の構造を決める重要な手段である。では、中性子結晶構造解析の得意な領域、特長はなんなのか。中性子解析は、分子量が 70kDa 以下で、X 線で立体構造が決まったタンパク質を対象とするが、2 Å より高分解能であれば、水素原子を観測出来、しかも、**軽原子 H と重原子 D を区別することができる**。X 線では、超高分解能の結晶で初めて水素原子は観測可能となるが、H と D を区別することは出来ない。

中性子構造解析で注目されるのは、活性領域の酵素反応に関与するあるいは創薬となる可能性のある化合物と相互作用するアミノ酸残基の側鎖と水分子の観測である。中性子回折では、バックグラウンドを低くするため軽水で結晶化したのを重水にソーキングする、あるいは重水で結晶化する。今後注目すべきことは、タンパク質のアミノ酸残基の側鎖の窒素あるいは酸素に結合する H が D に入れ替えられることであり、骨格の N-H が N-D に入れ替えられることである。しかも、早く入れ替えられる部分と入れ替えられない部分がある。溶液中でも結晶中でも重水 D<sub>2</sub>O が来たとき、反応自体は共通である。結晶においては、外側と内側で重水が侵入してくるスピードが異なる。D<sub>2</sub>O 溶液中だとすべてのタンパク質について同じである。水素の H と D を区別し、交換する割合を求めることが可能であり、ゼロから 1 までである。重水で結晶化しても、全然 D に交換しない部分もあるし、交換比率が 1 に満たないところもある。重水ソーキング法でも創薬となる可能性のある化合物との相互作用をする部分も D にある割合で交換される。水素結合を形成する H も D の交換が観測される。交換割合は何で決まるのか、交換機構を考える時期に来ている。交換機構を解くことが結晶中のタンパク質の周囲の水分子の挙動が分かり、化合物の結合には水素結合の寄与もあるが疎水的相互作用が重要であることを示唆しているかもしれない。

中性子構造解析により、プロトン互変異性が観測され、水素原子の存在率、水素結合の有無、金属イオンに配位するヒスチジンのプロトン化の状態等が観測された。今回この研究会

では、これまで中性子結晶解析の結果で何が分かったかを報告して頂き、更に今後の課題を考えて頂く機会にしたいと思う。

幹事 今野 美智子 (茨城県)

## プログラム

司会 田中 伊知朗 (茨城大学)

13:00 開会挨拶 今野 美智子 (茨城県)

### 特長1 プロトン互変異性

13:05~13:30 セルロース分解酵素の中性子構造と古くて新しい加水分解反応メカニズム  
五十嵐 圭日子 (東京大学)

セルロースは植物細胞壁の主成分であることから、その酵素による分解は2050年のカーボンニュートラルを目指す我が国にとって非常に重要な反応である。一方で、セルロースの加水分解という極めて単純に見える反応も、常温常圧で安定な化学結合を切断するためには、極めて強い「酸」と「塩基」のコンビネーションを酵素分子内に作り出すことが必要であるが、その仕組みは未だに理解されていない。本講演では、演者らが近年取り組んでいるセルラーゼの中性子構造から反応メカニズムを考察するとともに、水素結合ネットワークやアミノ酸の互変異性が化学反応に与える影響を考察する。

13:30~13:55 高分解能中性子結晶構造解析に基づく銅含有アミン酸化酵素の触媒機構  
村川 武志 (大阪医科薬科大学)

銅含有アミン酸化酵素は、生物界に広く分布し、種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒する。我々は本酵素について分解能1.72 Åの中性子結晶構造解析に成功した。得られた構造からは、活性中心において“宙に浮いた”プロトンを観測したほか、補酵素トパキノンがエノラート型とケト型の平衡状態として存在していること、さらに、銅イオンに配位したヒスチジン残基のプロトンが解離し、銅イオンとの結合を安定させることなど、水素原子核の位置が精密に決定されることにより初めて解明された重要な知見が得られた。本講演では上記の成果に加え、現在解析を行っている本酵素の反応中間体の中性子結晶構造についても紹介したい。

13:55~14:15 FAP 病因タンパク質 TTR 変異体の安定性変化のメカニズム解明に向けて  
日下 勝弘 (茨城大学)

トランスサイレチン(TTR)は線維化し組織に沈着することでアミロイド病を引き起こす。野生型のアミノ酸残基 Tyr116 を Val に置き換えた変異体はより安定であり、Ser に置き換えた変異体はより不安定で線維化し易く、難病の家族性アミロイド神経症(FAP)を引き起こす。本研究では野生型と安定性の異なる2つの TTR 変異体について中性子構造解析を行い、中性子解析の新たな特長として注目されているプロトン互変異性の有無を含め、側鎖の配向と水分子の配位の状況及び非常に詳細な骨格の脱平面性を観察し、TTR の安定性変化のメカニズム解明を目指している。本講演では、2つの変異体の中性子構造解析の現状について紹介する。

## 水素結合、プロトン

14:15~14:40 中性子回折を用いたマクロファージ遊走阻害因子の精密構造解析

松村 洋寿 (秋田大学)

メトトレキサート(MTX)は、関節リウマチの第一選択薬として広く利用されている免疫抑制剤であるが、その作用機序については不明な点が多い。我々はこれまでに、MTX の新規標的タンパク質としてマクロファージ遊走阻害因子(MIF)を同定し、MTX との相互作用解析を行ってきた。MIF は CD74 受容体を介して働く炎症性サイトカインである。また、炎症性サイトカインとしての働きに加えて、トートメラーゼ活性をもつ多機能性タンパク質である。本発表では、MIF が様々な炎症性疾患に関与する重要因子であることから、(1)トートメラーゼ反応の触媒部位、(2)MTX との結合部位、(3)CD74 との相互作用部位についての精密な MIF の構造データを得ることを目的として、MIF の中性子構造解析を行ったので報告する。

14:40~14:55 休憩

司会 玉田 太郎 (QST)

## 特長 2 重元素の周りの軽元素の観測

14:55~15:15 マンガンカタラーゼの中性子構造解析で観測される H の D への変換

山田 太郎 (茨城大学)

過酸化水素を酸化還元する高度好熱菌 *T. thermophilus* HB27 由来のマンガンカタラーゼ(立方晶系  $P2_13$ 、 $a = 133.4 \text{ \AA}$ )の X 線/iBIX 中性子結晶構造解析を行った。結晶格子はこれまでの中性子結晶構造解析例として最大である。バックグラウンドを低くするため重水で結晶化した。pD8.0 にもかかわらず Glu167、Glu280 の側鎖のカルボキシル基の水素が観測された。アミノ酸残基の側鎖の O-H と N-H は、D の変換が観測されたが、Gln46 と Gln151 の側鎖の NH<sub>2</sub> のみ D の割合はゼロである。また、独立二分子の His150 の CE2 に結合する H について D の割合が 50%と 60%であった。活性部位のマンガン 2 核錯体に配位するアミノ酸残基のプロトン化状態についても詳しく紹介する。

15:15~15:40 [NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶構造解析を目指して

廣本 武史 (QST)

硫酸還元菌 Miyazaki F 株由来の膜結合性ヒドロゲナーゼは、活性部位に Ni-Fe 二核金属錯体を有し、生体内では主に水素分子の分解を担っている。水素分解に伴って生成するプロトンは、活性部位からタンパク質表面へと繋がる水素結合ネットワークを介して移動することが想定されているものの、その経路の特定には至っていない。各種分光法を適用するには経路全体が広範囲であり、また X 線による水素原子の可視化が非常に困難なためである。そこで我々は、水素原子の直接観察に長けた中性子を利用し、実際にプロトンが移動する過程の可視化を試みている。本発表では、中性子回折データ収集における種々の取り組みについて紹介する。

15:40~16:05 中性子線結晶構造解析による銅含有亜硝酸還元酵素の反応機構解明

福田 庸太 (大阪大学)

銅含有亜硝酸還元酵素 (CuNIR) は地球上の窒素循環において、亜硝酸イオンから一酸化窒素への、プロトン移動を伴う一電子還元反応を触媒する酵素である。先頃我々は休止状態における CuNIR の中性子線結晶構造を決定し、触媒残基や溶媒のプロトン化状態を高精度で可視化した。その結果、低 pH 環境下でも水酸化物イオンが触媒中心の銅イオン上に安定して存在することが判明した。現在さらに反応機構を詳しく調べるため、基質の亜硝酸イオンや基質アナログであるギ酸をソーキングした結晶を用いて、反応中間体のプロトン化状態についても解析を進めている。本発表では最新の結果も含め、中性子線解析だからこそ得られた知見を報告する。

### 特長 3 放射線ダメージを与えない測定

16:05~16:25 光合成色素フィコシアノビルリン合成酵素 PcyA の変異による吸収スペクトルの変化と基質色素のプロトン化状態 海野 昌喜 (茨城大学)

PcyA はヘム分解産物のビリベルジン (BV) から光合成色素の一つフィコシアノビルリンを生合成する酵素である。この酵素の基質 BV との複合体の吸収スペクトルは 2 つの吸収極大を有し、BV のプロトン化状態と関連することが示唆されていた。

我々は、BV 近傍にある Asp105 や Ile86 を変異すると PcyA-BV 複合体の吸収スペクトルが著しく変化することを見出した。D105N および I86D の BV 複合体の中性子結晶構造解析の結果、BV が野生型に結合したときはそれぞれ明らかに異なるプロトン化状態をとっていることがわかってきた。本研究では、計算化学的解析と併せて現段階で得られている知見について議論したい。

### 今後の課題 H と D の区別

16:25~16:55 H から D の変換は何を示すのか

今野 美智子 (茨城県)

タンパク質の中性子単結晶構造解析は、水素の H と D を区別し、更に H と D の割合を示す。結晶中に含まれる水分子の軽水素 H によるバックグラウンドを低くするため、中性子用タンパク質は、軽水で結晶化した後、重水に漬けるか、重水で結晶化される。中性子解析によりタンパク質の側鎖の O-H あるいは N-H のほとんどは、D の割合が 0.5 以上である。骨格 N-H は、D の割合がループでは 0.8 以上、2 以下の短いターンや  $\alpha$  ヘリックス、 $\beta$  シートも外側のストランドのほとんどで D の割合が 0.5 以上を示す。骨格 N-D、側鎖の N-D、O-D のほとんどの近傍には固定された水分子は観測されない。しかし、交換が起きている。交換が進行している理由を説明する。

16:55~17:00 閉会挨拶 日下 勝弘 (茨城大学)

### <参加申込み先>

参加を希望される方は下記申込フォームから 8 月 15 日 (日) までにお申し込みください。定員になり次第締め切ります。

[https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSfGr\\_jmN1HZY6Q4B1S6uzpxoKr1k0YsXIvu3TwxFs\\_uPmAmHH\\_Q/viewform](https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSfGr_jmN1HZY6Q4B1S6uzpxoKr1k0YsXIvu3TwxFs_uPmAmHH_Q/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。

申し込み先：茨城県中性子利用研究会事務局 田中志穂 ([tanaka@ibaraki-neutrons.jp](mailto:tanaka@ibaraki-neutrons.jp))

(1)名前、(2)所属、(3)連絡先(E-mail address) をご記入ください。

申し込みした方へは、Zoom 接続に必要な情報 (URL、ログイン ID、パスワード等) を開催前にメールでお知らせします。