慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	湿度制御X線回折実験による蛋白質内部運動と水和構造変化の相関に関する研究
Sub Title	Studies on the correlation between the internal dynamics and hydration of proteins by X-ray crystallography for humidity-controlled protein crystals
Author	中迫, 雅由(NAKASAKO, MASAYOSHI)
Publisher	
Publication year	2009
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2008.)
JaLC DOI	
Abstract	蛋白質結晶周辺の湿度を変化させ、結晶内のバルク水量を非破壊・可逆的に制御可能な装置の開発を進め、湿潤空気流量300～450 ml/min で対湿度20～96%rh の範囲で実験を行うことが可能な装置とその実験手順を確立し各種蛋白質結晶に適用した。サブゼロ温度領域で蛋白質のダイナミクスを探る実験、種々の蛋白質結晶についての構造解析、分子動力学計算を通じた蛋白質の運動と水和構造変化の相関解析も実施した。
Notes	研究種目：基盤研究(A) 研究期間：2007～2008 課題番号：19204042 研究分野：数物科学系 科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19204042seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2007～2008
課題番号：１９２０４０４２
研究課題名（和文）湿度制御 X 線回折実験による蛋白質内部運動と水和構造変化の相関に関する研究
研究課題名（英文）Studies on the correlation between the internal dynamics and hydration of proteins by X-ray crystallography for humidity-controlled protein crystals

研究代表者
中迫　雅由（NAKASAKO MASAYOSHI）
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：30227764

研究成果の概要：
蛋白質結晶周辺の湿度を変化させ、結晶内のバルク水量を非破壊・可逆的に制御可能な装置の開発を進め、湿潤空気流量 300～450 ml/min で相対湿度 20～96%rh の範囲で実験を行うことが可能な装置とその実験手順を確立し各種蛋白質結晶に適用した。サブゼロ温度領域で蛋白質のダイナミクスを探る実験、種々の蛋白質結晶についての構造解析、分子動力学計算を通じた蛋白質の運動と水和構造変化の相関解析も実施した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	20,000,000	6,000,000	26,000,000
2008 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
年度			
総　計	27,700,000	8,310,000	36,010,000

研究分野：数物科学系
科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理
キーワード：生物物理、ナノマシン、表面・界面物性、放射線・X線・粒子線、生体分子

１．研究開始当初の背景

それまでに得られた水和構造解析結果を踏まえながら、蛋白質が生来有する運動の中からどのような運動モードが生じるかは、蛋白質に結合した水和水によって制御されているのではないかとの仮説をもつに至った。この仮説を検証するためには、蛋白質分子が運動できるような環境下で、水和構造の変化と蛋白質自身の構造変化における運動の相関（共分散）を実験的に明らかにしてゆかねばならない。水分子の動きを原子分解能で詳細に調べるためには、X線結晶解析が最適であるが、これまでの技術では、結晶中の蛋白質の運動を制御することが難しかった。

蛋白質結晶周辺の湿度を人為的に制御することで結晶内での分子間相互作用を制御できる可能性が示された。蛋白質結晶体積の３５％～９０％は溶媒で占有されており、蛋白質結晶周辺の湿度を制御することによって蛋白質結晶を非破壊・可逆的に膨張・収縮させ、結晶性の悪い蛋白質結晶の質的改善に利用するという方法である。この技術を逆手にとり、最適な分子間相互作用を有する結晶性の良好な結晶の水和構造を解析し、少しずつ分子間相互作用を緩和すれば、蛋白質の運動をある程度自在に制御できる可能が高い。それゆえ、

複数の湿度環境下でＸ線回折実験を行い、蛋白質の運動の方向性解析と水和構造の変化を相補的に解析することが可能になるのではないかと考えた。

２．研究の目的

本課題では、湿度制御下での蛋白質結晶Ｘ線回折技術の構築とそれを用いた水和構造－蛋白質内部運動の相関解析によって、これまで以上に詳細な蛋白質水和構造の物理化学的洞察を得る事を目的とした。また、湿度制御下での蛋白質結晶Ｘ線回折技術を用いて、膜蛋白質などの難解析結晶の分解能向上を試みる。また、実験に用いるさまざまな蛋白質の結晶構造解析も平行して行うこととした。

３．研究の方法

（１）湿度制御Ｘ線回折実験装置の開発

結晶の湿度制御が可能となる装置群を自作し、Ｘ線回折湿度制御下の蛋白質の溶媒チャンネル体積の可逆的増減についての基本技術を確立する。装置開発においては、湿度制御装置、試料周辺ハウジングの製作、結晶観察のための装置などを購入あるいは自作した。また結晶ハンドリング技術の確立が不可欠となるため、最適なハンドリング装置を自作した。

図１　X線回折実験装置（左）に搭載した湿度制御装置（右）。

この湿度制御装置は、水蒸気発生装置HUM-1（リガク）、水蒸気導入アタッチメント（リガク）、湿度制御用結晶ホルダー（サイニクス特注製作）、X-Y-Z Goniometer Head (Huber)、CCDカメラ（東芝テリー）、USB対応PCカード型データ収集システム（キーエンス）、デジタル温湿度センサSHT75および温湿度アナログ出力モジュール（シスコム）、XYZ軸フラットスチールステージ・クランプ（シグマ光機)、直流安定化電源(アズワン)、７インチ液晶カラーモニター、ヒーター・熱電対、温度調節器、ペルチェモジュール（坂口電熱）、恒温水循環装置ZL-100（タイテック）、電気浸透流ポンプRP3-N2（三陽理化）などで構成される。温度・湿度は装置本体のみならず、その周辺環境や実験室内部でモニターされている。

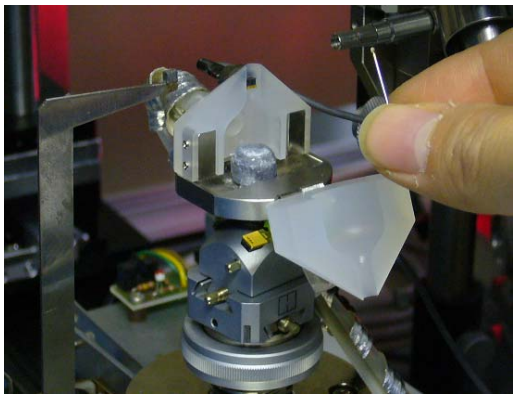

図２　湿度制御用結晶ホルダー

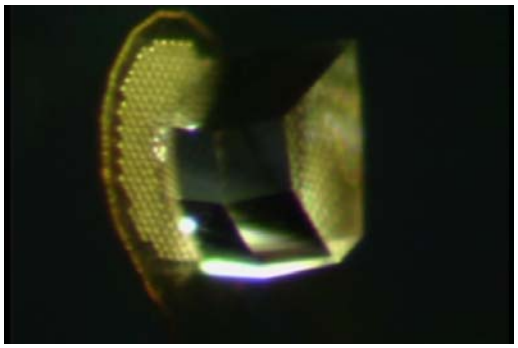

図３　湿度制御中の蛋白質結晶

（２）タンパク質精製・純度検定と結晶化

蛋白質の精製に当たっては、EPGコンボシステム（BioRad）を導入し、標品純度を粒子径･分子量測定装置ゼータサイザーナノS(シスメックス）によって検定した。光受容蛋白質の取り扱いでは、照度計（サカキコーポレーション）を用いて、脱色しないような光環境に配慮した。また、アリールマロン酸脱炭酸酵素の結晶構造解析のために、平成20年度には特任助教１名を雇用した。結晶化のスクリーニングにはハンプトン社結晶化溶媒（リガク）を使用した。

（３）Ｘ線回折・散乱実験および構造解析

Ｘ線回折実験は、現有の回折装置を用いて行った。低温およびサブゼロ温度下実験には、すでに開発した装置を用いた。保守部品としてX線フィラメント（リガク）を、また、温度･湿度制御のためにHeガスや乾燥空気などを購入した。また、高解像度の構造解析では、スプリング８のBL44B2を利用し、メールイン利用器具一式（リガク）を購入してBL26B2のメールインシステムも利用した。構造解析での分子モデル構築では、既設のワークステーシ

ョンに加えて、SGI Fuel V10 800MHz 2GB Memory (SGI)を用いた。

（４）原子間力顕微鏡による結晶表面の観察

グルタミン酸脱水素酵素やヘモグロビン結晶の表面観察では、既設の原子間力顕微鏡を用い、液中観察に特化した自作部品開発によって試料周辺環境を保持した。得られる原子力間顕微鏡画像の解析するためのプログラムコードを開発し、各分子の高さに関する頻度分布を得ることを可能とした。

（５）タンパク質動力学に関する理論的背景と計算科学的アプローチ

散漫散乱解析プログラムの開発、水和構造データベース解析、分子動力学計算解析などの各種プログラムは、理論的背景をよく把握しながら、FORTRAN 言語を用いて自作した。その実行には、通常の PC と既設のクラスター計算機を利用した。また、２７万原子程度を含む系の分子動力学計算は、横浜市立大学にて実施した。

４．研究成果

（１）湿度制御X線回折実験装置の開発

第２の装置（計画・方法の項参照）では、体積の３５％～９０％が溶媒で占有されている蛋白質結晶の周辺湿度を変化させることによって蛋白質分子配列･分子間相互作用を制御することが可能であり、間接的に蛋白質の内部運動を制御できる。様々な独自工夫を凝らしながら開発を行ってきた蛋白質結晶湿度制御装置が順調に稼働を始め、７０－９８％相対湿度範囲を１％以内の精度で制御できるようになった。湿度制御した蛋白質結晶は、低温窒素ガス吹き付け装置で簡便に冷却が可能なように、装置のレイアウトを工夫した。

標準試料リゾチームでは、相対湿度に応じた分解能、結晶格子定数や結晶体積の可逆的変化が精度良く再現された。この装置をグルタミン酸脱水素酵素、シタロン脱水酵素、膜蛋白質アセチルコリン受容体、アリールマロン酸脱炭酸酵素の結晶などに適用し、結晶操作技術の改善を行った。

（２）サブゼロ温度領域における X 線回折実験手法の確立

温度帯２２０－２７０K での X 線結晶構造解析を行うことで、温度変化による蛋白質の構造変化や水和水の変化等を観察することを目的とした。またこれによってこの温度帯における蛋白質ダイナミクスの一端の解明を試みた。この温度帯域での X 線回折実験はあまり例がなく、また測定方法も確立していない。研究室でこの温度領域での X 線回折実験に特化して開発された装置を用い、容易で扱いやすい Trypsin を用いて測定を行った。これらの X 線回折実験を行う上で新たに考案した、蛋白質結晶マウント方法が非常に有効であり、これまで困難であった測定を容易に可能にすることができた。得られた回折データを用いて、複数のサブゼロ温度領域での水和水も含めた立体構造解析を実施したところ、低温でさえも、水分子と硫酸イオンの入れ替えが生じることが明らかとなった。

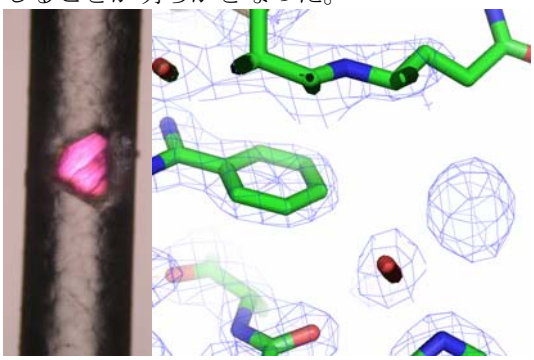

図４　セファデックスとともにキャピラリー内に封じたトリプシン結晶（左）とそのサブゼロ温度での構造解析結果（右）。

（３）蛋白質運動・水和相関の研究

結晶化してもなお、一部のフラグメントやドメインが大きな揺らぎを有すると考えられる蛋白質として、グルタミン酸脱水素酵素、アリールマロン酸脱炭酸酵素（図５）、多重基質アミノ酸転移酵素、シタロン脱水酵素などを取り上げ、それらの結晶構造解析において、蛋白質のダイナミクスと水和構造の相関に関する結晶学的研究を行った。また、多重ドメイン構造が機能と大きく関係すると予想される蛋白質として、フォトトロピンフラグメントのX線結晶構造解析（図６）と結晶化、Protein Disulfide IsomeraseのX線小角散乱実験データの解析を行った。

これまで、長期間に渡って研究対象としてきたグルタミン酸脱水素酵素については、さらに詳細な動力学的アプローチを取り、結晶解析の分解能向上に努めるとともに散漫散乱データの逆空間での再構成を実施し（図７）、基準振動解析、分子動力学計算と原子間力顕微鏡観察から、ドメイン運動の頻度や大きさを考察した。原子力間顕微鏡像解析では、カンチレバーのブラウン運動を考慮し、同酵素のドメイン運動の頻度を見積もることができた。分子動力学計算においては、１ナノ秒のトラジェクトリーの中で検出されたドメインの開閉運動に伴う個々の水分子の運動を追跡可能なプログラムコードを作成

して、運動に伴って、水分子が集団的に活性クレフトに出入りする様子を確認した。

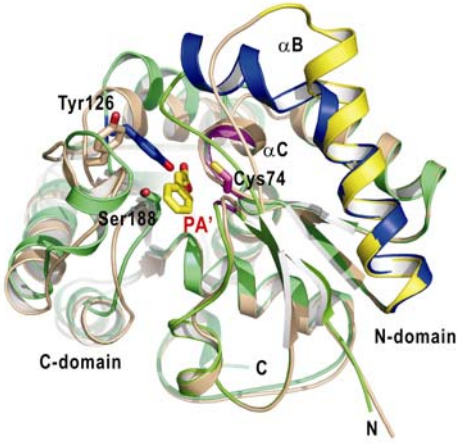

図５　アリールマロン酸脱炭酸酵素の野生型（黄と肌色）と二重変異型リガンド（PA'）結合反応中間状態（緑と青）の結晶構造比較。リガンド結合では、αB が折れ曲がって、活性中心を覆う。野生型は多重同型置換、変異体は分子置換解析によって構造決定した。分解能は、それぞれ 2.1 と 1.45Å であった。

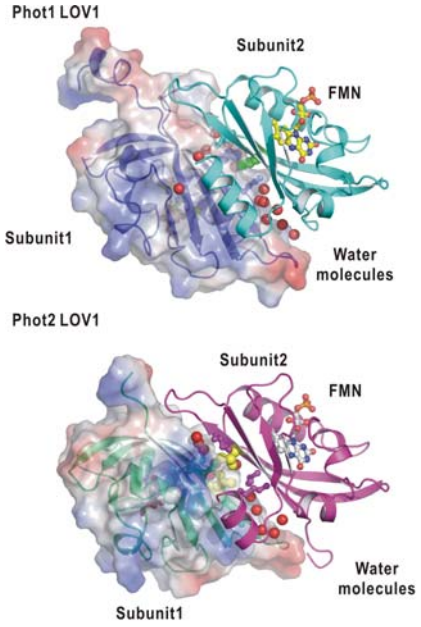

図６　フォトトロピン１および２の光センサードメイン LOV1 のＸ線結晶構造。
特に、phot2LOV1 結晶では、単結晶領域の切り出しが不可能で、BL41XU の 0.03 ㎜径Ｘ線ビームを単結晶性領域にピンポイント照射して回折データを得た。これらの工夫により、結晶学的非対称単位を占有する各 LOV１ドメイン二量体の立体構造を 2.0～2.1Å で決定した。また、現在、光エネルギー－生体内信号変換の分子機構の解明が待たれており、本課題においても、シグナル伝達ドメインを含むフラグメントの結晶化を試みた。

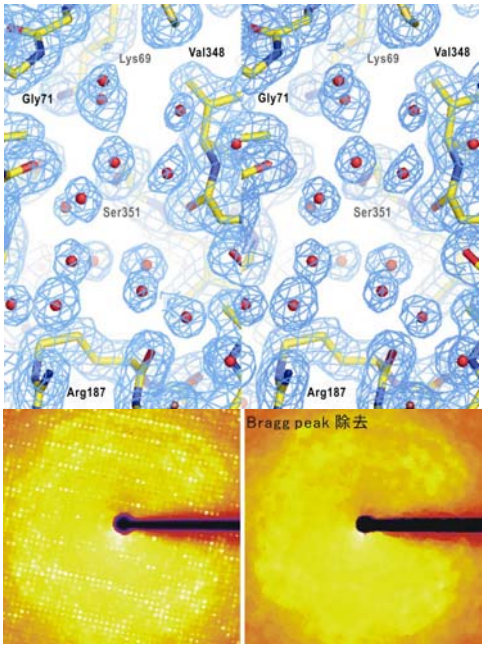

図７　グルタミン酸脱水素酵素に関する構造研。サブユニットの活性クレフト内の水和水分布（前段下）。散漫散乱解析プログラムによって抽出した同酵素の運動を反映した散漫散乱成分（上）。また、補酵素 NAD や補酵素類自体チバクロンブルーなどのリガンドが結合した状態の結晶の作出にも成功した。

（４）<u>データベースを利用した蛋白質水和構造研究</u>

Protein Data Bank には、約 5 万以上の蛋白質立体構造が登録されており、低温 X 線結晶構造解析で決定された立体構造が増加している。低温構造解析では膨大な水分子が蛋白質周辺に見出されるため、蛋白質の極性原子団周辺での水和水確率分布関数を経験的に構築するとともに（図８）、それを用いた蛋白質水和構造予測アルゴリズムを考案して、水溶性蛋白質や膜蛋白質のチャネル領域の水和構造予測を行った（図９）。実験結果との比較のために、結晶構造解析も実施した。

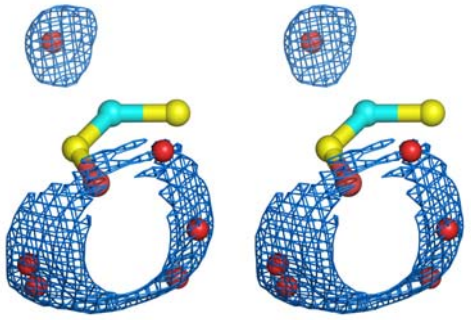

図８　ポリペプチド主鎖周辺の水和水確立分布。約 100 万個の水分子から再構成した。得られた分布をガウス関数で記述し、水和分布の定量的評価を初めて可能にした。

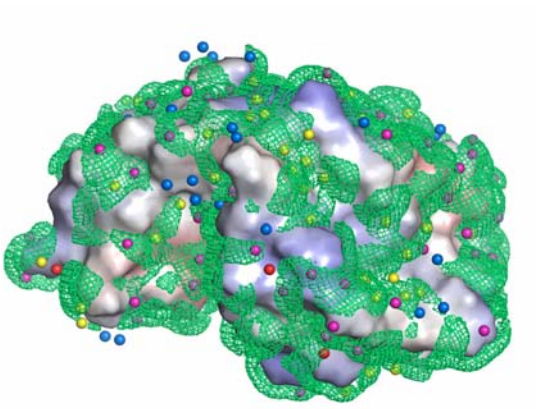

図９　極性原子団周辺の水和水確立分布を用いて予測したヒトリゾチームの水和水分布。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）
〔雑誌論文〕（計７件）

1. 中迫雅由　“タンパク質内部運動に伴う水和構造変化を探る”*日本結晶学会誌* **51**, 37-39 (2008).（解説、査読有、責任著者）
2. Masayoshi Nakasako, Kazunori Zikihara, Daisuke Matsuoka, Hitomi Katsura, Satoru Tokutomi “Structural basis of LOV1-dimerization of Arabidopsis phototropin 1 and 2” *J. Mol. Biol.* **381**, 718-733 (Cover Illustration) (2008).（査読有、責任著者）（科学新聞他掲載）
3. Masayoshi Nakasako, Michihiro Hirata, Nobutaka Shimizu, Syuntaro Hosokawa, DaisukeMatsuoka, Masaki Yamamoto and Satoru Tokutomi “Crystallization and preliminary X-ray diffraction experiments of arylmalonate decarboxylase from Alcaligenes bronchisepticus” *Acta Crystallogra F***64**, 610-613 (2008).（査読有、責任著者）
4. Masayoshi Nakasako, Rika Obata, Ryosuke Okubo, Shyuichi Nakayama, Kenji Miyamoto and Hiromichi Ohta “Crystallization and preliminary X-ray diffraction experiments of LOV1 domains of phototropin 1 and 2 from Arabidopsis thaliana” *Acta Crystallogra F***64**, 617-621 (2008).（査読有、責任著者）
5. 中迫雅由　“タンパク質の水和構造を探る” *Molecular Science Journal* **2**, A0022 (7 pages) (2008).（査読有、責任著者）
6. 城地保昌、中迫雅由、難波啓一“非弾性散乱の生物への応用について”*日本結晶学会誌* **50**, 78-82 (2008).（解説、査読有）
7. Takashi Kumasaka, Masaki Yamamoto, Makio Furuichi, Masayoshi Nakasako, Aik-Hong Teh, Makoto Kimura, Isamu Yamaguchi, Tatzuo Ueki “Crystal Structures of Blasticidin S Deaminase (BSD): Implications for Dynamic Properties of Catalytic Zinc” *J. Biol. Chem.* **228**, 37103-37111 (2007).（査読有）

〔学会発表〕（計 25 件）
○国際会議・国際学会招待講演

1. Masayoshi Nakasako, Tsunero Sato and Mitsunori Ikeguchi “Hydration structure changes around proteins at work” XXI Congress of the International Union of Crystallography, Osaka, 24, August, 2008（要旨査読有、責任著者）
2. Satoru Tokutomi, Daisuke Matsuoka, Kazunori zikihara, Koji Okajima, Hitomi Katsura, Shizue Yoshihara, Masayoshi Nakasako “How blue light regulates kinase activity of phototropin “, 34th American Society for Photobiology Meeting, California, 23,June, 2008
3. Masayoshi Nakasako ”Hydration structure changes around proteins at work” Third Japanese-French seminar on structural dynamics of proteins, Grenoble, France,18,January, 2007

○国内学会招待講演

1. 中迫雅由　“細胞の空間階層Ｘ線イメージングの現在と未来への期待”自然科学研究機構 H20 年度”自然科学における階層と全体シンポジウム″,蒲郡,2008 年 12 月 16 日
2. 中迫雅由　“蛋白質の運動と連動する水和水のコヒーレントな集団運動の探索” 特定領域「高次系分子科学」第 2 回公開シンポジウム,大阪,2008 年 11 月 11 日
3. 松岳大輔、中迫雅由　“データベース解析から予測される膜蛋白質の膜貫通領域における水和構造” 特定領域「高次系分子科学」ミニ公開シンポジウム「プロトンポンプを考える」,大阪,2008 年 8 月 6 日
4. 中迫雅由　“タンパク質の水和構造を探る” 東京工業大学　資源化学研究所　セミナー,横浜,2008 年 6 月 13 日
5. 中迫雅由“Ｘ線溶液散乱で何が分かるのか？なぜ放射光なのか？“第２回Ｘ線溶液散乱研究会―SPring-8 における放射光 X 線溶液散乱 ―,播磨,2007 年 10 月 11 日
6. 中迫雅由“蛋白質表面に吸着した水分子と蛋白質運動の相関について”日本物理学会第 62 回年次大会,札幌,2007 年 9 月 23 日

○国際学会ポスター発表

1. Daisuke Matsuoka, Masayoshi Nakasako

“Prediction of hydration structures around polar protein atoms through a data-base analysis” XXI Congress of the International Union of Crystallography, Osaka, 25, August, 2008 （要旨査読有）

2. Rika Obata, Masayoshi Nakasako, Kenji Miyamoto and Hiromichi Ohta “Structural basis for the enantioselective decarboxylation by arylmalonate decarboxylase” XXI Congress of the International Union of Crystallography, Osaka, 27, August 2008. （要旨査読有）
3. Masayoshi Nakasako, Daisuke, Matsuoka, Kazunori Zikihara, Hitomi Katsura and Satoru Tokutomi “Crystal structures of LOV1 domains of phototropin 1 and 2 from Arabidopsis thaliana” The 5-th open workshop ″Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules”, Nara, 24, January 2008.
4. Masayoshi Nakasako, Rika Obata, Kenji Miyamoto and Hiromichi Ohta “Crystal structure of arylmalonate decarboxylase” The 5-th open workshop ″Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules”, Nara, 24, January 2008.
5. Masashi Miyazawa, Masayoshi Nakasako “Search for determinants regulating the quaternary structures of Fv fragments of antibodies through a database analysis” The 5-th open workshop ″Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules”, Nara, 24, January 2008.
6. Tsuneo Sato, Masayoshi Nakasako ”Surface structure of glutamate dehydrogenase crystal observed by atomic force microscopy” The 5-th open workshop ″Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules”, Nara, 24, January 2008.

○国内学会ポスター発表

1. 高山裕貴,中迫雅由“蛋白質結晶湿度制御装置の開発”第22回日本放射光学会年会,東京,2009年1月12日
2. 松岳大輔、中迫雅由 “データベース解析に基づく蛋白質の水和構造予測” 特定領域「高次系分子科学」第2回公開シンポジウム,大阪,2008年11月11日
3. 中迫雅由“蛋白質の運動と連動する水和水のコヒーレントな集団運動の探索” 特定領域「高次系分子科学」第2回公開シンポジウム,大阪,2008年11月11日（招待講演内容のポスター発表）
4. 松岳大輔,中迫雅由“データベース解析によるタンパク質の水和構造予測”第8回日本蛋白質科学会,東京,2008年6月10日
5. 中迫雅由“蛋白質の運動と連動する水和水のコヒーレントな集団運動の探索”特定領域「高次系分子科学」合同班会議,新潟,2008年5月27日
6. Tsuneo Sato, Masayoshi Nakasako “Observation of the surface of glutamate dehydrogenase crystals by atomic force microscopy”日本生物物理学会第45回年会,横浜,2007年12月23日
7. Masayoshi Nakasako, Daisuke, Matsuoka, Kazunori Zikihara, Hitomi Katsura and Satoru Tokutomi ”Crystal structures of LOV1 domains in Arabidopsis phototropin 1 and 2”日本生物物理学会第45回年会,横浜,2007年12月23日
8. Daisuke Matsuoka, Masayoshi Nakasako “Prediction of Hydration Structures around polar protein atoms through a data-base analysis”日本生物物理学会第45回年会,横浜,2007年12月23日
9. Miyazawa Masashi, Masayoshi Nakasako “Search for determinants regulating the quaternary structures of Fv fragments of antibodies through a database analysis”日本生物物理学会第45回年会,横浜,2007年12月23日
10. Keita Sakamoto, Mitsunori Ikeguchi, Masayoshi Nakasako “Simulation on the X-ray speckle patterns of a hydrated protein molecule with conformational variations”日本生物物理学会第45回年会,横浜,2007年12月23日

６．研究組織

(1)研究代表者
中迫　雅由（NAKASAKO MASAYOSHI）
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：30227764

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし