

## (1) 生体高分子結晶の構造



BIX-3  
生体高分子結晶構造解析中性子回折計 (BIX)

BIX-4

この装置はたんぱく質等の生体高分子単結晶の結晶構造を観るものです。中性子は軽元素検出能力が高いので、X線のそれに比較して、生体物質で重要である水分子の位置を同定することができます。

# 植物の配糖化酵素の精密構造解析

利用者 ○鈴木正彦、柳野利也、管野善明、野田尚信  
 所属 青森県農林総合研究センター・グリーンバイオセンター

## 1. 目的

植物の二次代謝産物の多くは配糖体の形態で存在する。その中には医薬品として重要なステロイドアルカロイド配糖体や花の着色に必要なフラボノイド配糖体が知られている。我々が花色の発現に関与する新規のアントシアニン配糖化酵素を植物（チョウマメ）から単離したところ、アミノ酸配列の相同性は非常に高いが基質特異性の異なる数種の配糖化酵素が存在することが分かった。その様な酵素の基質特異性を解明する上で、高次構造を決定することが必要不可欠である。さらに、活性部位の詳細な水分子の配向やプロトン化の情報を利用し酵素活性や基質特異性を改変することにより、新たな医薬品の創生や、これまでになかった花色を持つ植物の育種が期待できる。そこで本プログラムでは、まず配糖化酵素の大腸菌による組換え大量発現を行い、得られたタンパク質を結晶化しX線さらには中性子による精密構造解析を行うことを目的とする。

## 2. 実施手順

クローニングしたチョウマメ配糖化酵素（Ct3'5'GT、Ct3GT-A、Ct3GT-B）をコードするDNAを挿入した大腸菌発現ベクターはすでに構築済である。大腸菌でそれらが可溶性として大量に発現できることを確認する。発現できたタンパク質を用い結晶化スクリーニングを行い、結晶成長に適した緩衝液、沈殿剤条件を決定する。得られた結晶を用いX線回折実験を行い配糖化酵素の立体構造を決定する。さらに結晶を大型化し、中性子回折実験を行う。ただし、本タンパク質は可溶性発現、結晶化、X線回折実験を成功させた後、中性子回折実験を実施する必要があり、年度のビームタイムまでに中性子回折実験が実施できない可能性があることから、その場合には替わりに大腸菌大量調製、結晶化可能なシアノバクテリア由来光センサータンパク質BLUFについて回折実験を行う。

## 3. 実験結果

前述の3酵素をコードするDNAを発現ベクターそれぞれpGEX、pET28及びpQEに挿入し、大腸菌でさまざまな条件で発現実験を行った。その結果、すべてのタンパク質の発現は確認されたが、フォールディングしていない（機能構造を持たない）不溶性タンパク質として発現した。そこでpQEベクターを用いた20℃での発現を実施したところ、Ct3GT-Aのみ可溶性発現が可能であった。菌体内で発現したCt3GT-Aを精製するため、発現菌体を超音波破碎後、Ni-NTAカラムクロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィー精製を行った。その結果、Ct3GT-Aは均一に精製することができた。回収率は1Lの培養菌体当たり5.5 mgであった。得られたタンパク質を結晶化する条件を調べるため、結晶化スクリーニングキットCrystal Screen（Hampton Research社）、Wizard（Emerald Biosystems社）及びThe Classics Suite（Qiagen社）を用いて1000条件以上スクリーニングを行った。しかしながら結晶が析出する条件を見出すことはできなかった。

配糖化タンパク質について結晶が得られなかったことから、対象をBLUFタンパク質とし、まずBLUFタンパク質を発現した大腸菌体からBLUFタンパク質を精製した。すなわち超音波破碎した菌体抽出液から45%硫酸アンモニウム沈殿画分を回収し、ゲルろ過及び2回の陰イオン交換クロマトグラフィーによりBLUFタンパク質を精製した。培養液1L当たり10 mgのBLUFタンパク質を得ることができた。得られたBLUFタンパク質はCrystal Screen I, II, Lite及び1/2 IIの192条件、タンパク質濃度9、4.5 mg/mlの2条件、トータル384条件で結晶化を試みた。その結果、BLUFタンパク質の結晶が得られた。いずれの条件もpHは4.6であり、PEGやアルコールの沈殿剤でのみ結晶が得られた。BLUFタンパク質の結晶を大型化するため沈殿剤（10% PEG8000、0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.6)、0.2 M酢酸アンモニウム）15 µl、タンパク質溶液15 µlを混合し、結晶化を開始し一晩経過したドロップにマイクロシーディング法で結晶核を添加し、ドロップ中の結晶数が1-2個となるようにシーディングを行った。得られた結晶は1週間後0.8 x 0.6 x 0.6 mm程度まで成長した。

前述の方法で得られた結晶を用いて中性子回折実験を行った。BLUFタンパク質結晶を、重水で調製した14%PEG8000、0.3 M酢酸アンモニウムを含む0.1 M酢酸ナトリウム(pH 4.6)に一晩浸漬した後、結晶をφ1.5 mmのクォーツキャピラリに詰めた（図1）。浸漬後の結晶には見かけ上大きな変化は見られなかった。phi角度0°及び90°に対しそれぞれ6時間中性子を照射した。回折実験では最大で6-8 Åの回折点を確認できたにすぎなかった。この原因の一つはBLUF蛋白質が多量体構造を取り、結晶格子長が極めて大きいことにあると思われる。

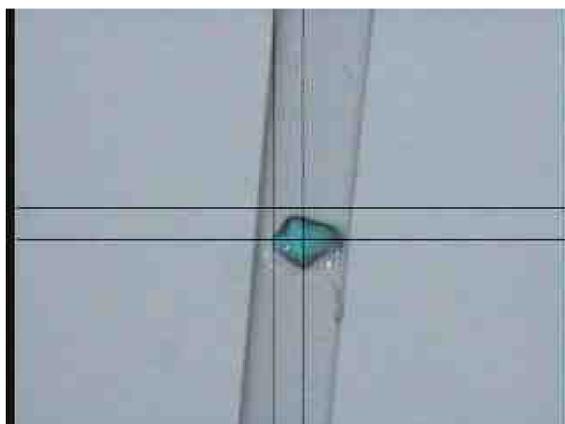


図1 回折実験に用いた結晶

BLUF (Blue-Light Using FAD) No.1 回折像 拡大

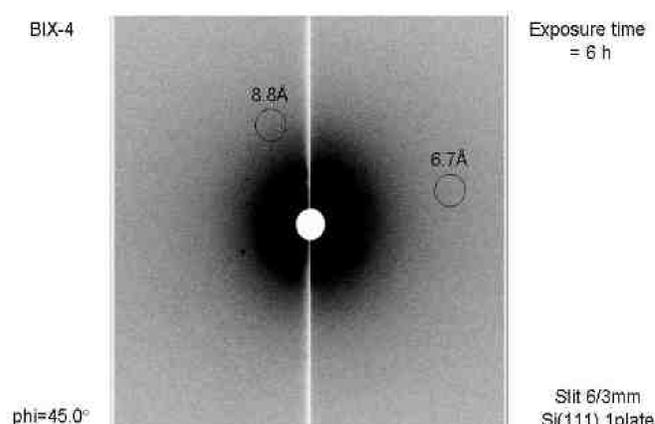


図2 中性子回折像（6時間照射）

# 植物の転移酵素及び光センサータンパク質の精密構造解析

利用者 ○佐々木 秀治

所属 青森県農林総合研究センター・グリーンバイオセンター

## 1. 目的

植物の二次代謝産物の多くは配糖体の形態で存在する。その中には医薬品として重要なステロイドアルカロイド配糖体や花の着色に必要なフラボノイド配糖体が知られている。我々が花色の発現に関与する新規のアントシアニン配糖化酵素を植物（チョウマメ）から単離したところ、アミノ酸配列の相同性は非常に高いが基質特異性の異なる数種の配糖化酵素が存在することが分かった。その様な酵素の基質特異性を解明する上で、高次構造を決定することが必要不可欠である。さらに、活性部位の詳細な水分子の配向やプロトン化の情報を利用し酵素活性や基質特異性を改変することにより、新たな医薬品の創生や、これまでになかった花色を持つ植物の育種が期待できる。そこで本プログラムでは、まず配糖化酵素の大腸菌による組換え大量発現を行い、得られたタンパク質を結晶化しX線さらには中性子による精密構造解析を行うことを目的とする。

## 2. 実施手順

### 図1 Ct3GT-AとFGTのアミノ酸配列の比較及び結晶化促進配列の導入部位

クローニングしたチョウマメ配糖化酵素（Ct3GT-A）は大腸菌で可溶性発現可能であるが、いかなる条件を用いても結晶化ができなかった。これまでに結晶化が困難なタンパク質のヘリックス上に規則的なロイシン（L）残基を導入することで結晶化が可能となることを報告している（*Protein Sci.* 16 1389-1397 2007）ことから、これと同様の試みをCt3GT-Aでも行った。すなわちCt3GT-Aと50%程度のアミノ酸配列相同性があり、すでに構造が報告されているブドウ糖転移酵素（FGT）の立体構造（PDB:2C1Z）から配列導入に適したC末端付近のヘリックスを選択し（図1 立体構造）、分子外側へ向いていると考えられるK409をLに置換したGT-1L、K409/K410をLに置換したGT-2L、K409/K410/D413をLに置換したGT-3L及びK409/K410/D413/K417をLに置換したGT-4Lの調製・結晶化を実施する。ただし、本タンパク質は可溶性発現、結晶化、X線回折実験を成功させた後、中性子回折実験を実施する必要があり、年度のピークタイムまでに中性子回折実験が実施できない可能性があることから、その場合には替わりに大腸菌大量調製、結晶化可能な光センサータンパク質BLUFについて回折実験を行う。

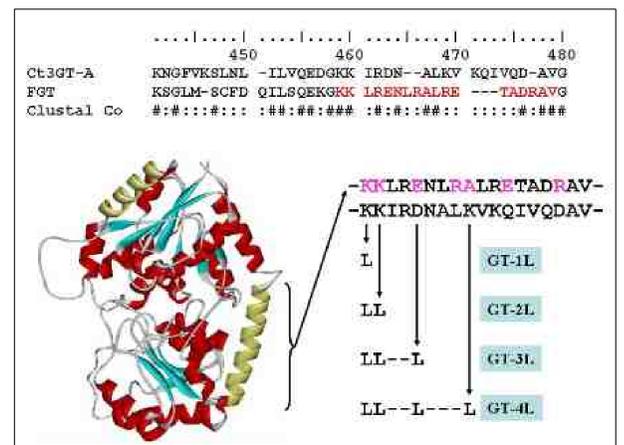


図1 Ct3GT-AとFGTのアミノ酸配列の比較及び結晶化促進配列の導入部位

## 3. 実験結果

**変異体Ct3GT-Aの発現・精製：**ロイシン残基を導入したCt3GT-Aの変異体（4種：GT-1L~4L）の発現・調製を行った。1.2 mM IPTG、18°Cで20時間誘導を行った4リットルの培養液からそれぞれの変異体をHisTrap FFカラム及びResourceQカラムで精製を行った。GT-1Lは培養液1リットル当たり0.85 mgのタンパク質が調製できた。これは野生型Ct3GT-Aの調製量 5 mgの1/6程度であった。一方、GT-4LではCt3GT-AがHisTrapFFカラムの段階でほとんど回収できず調製できなかった。GT-2L、3Lについても同様に精製を行ったところ1リットルの培養液当たりそれぞれ0.6 mg、0.2 mgのタンパク質が調製することができた。

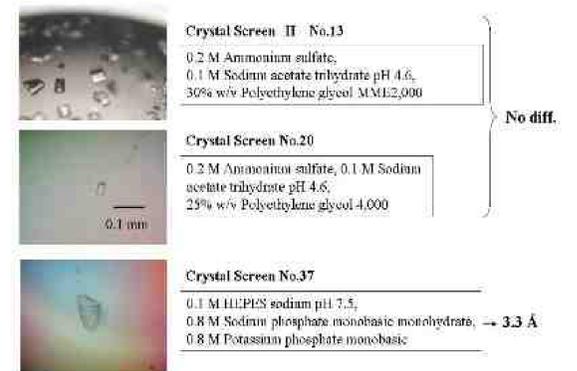


図2 GT-2Lの結晶と結晶化条件

**Ct3GT-A変異体の結晶化、X線回折実験：**調製できた1L、2L及び3L変異体についてCrystal Screen I及びII (Hampton research社)を用いて結晶化条件のスクリーニングを実施した。その結果、2L変異体で図2に示した条件で結晶の成長が見られた。一方、1L及び3L変異体では2ヵ月後においても結晶成長が見られる条件を見出せなかった。得られた結晶についてX線回折実験を行った結果、Crystal Screen No.37の条件で得られて結晶から3.3Å分解能の回折データを得ることができた。空間群はI222、格子定数はa=56, b=119, c=163であり、Ct3GT-Aと44%のアミノ酸配列相同性がある葡萄GTのX線結晶構造を用い分子置換を行ったところ図3 (B)の様に初期位相を決定することができた。

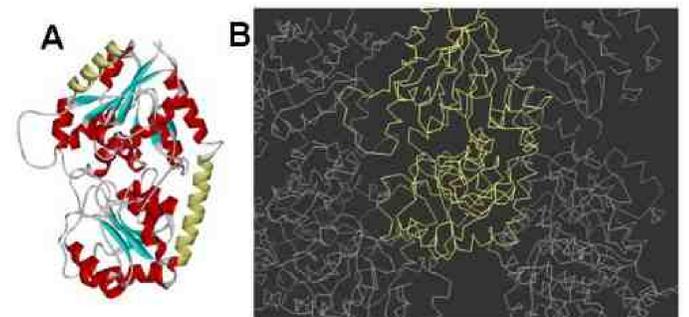


図3 葡萄GT (PDBid:2C1Z) のX線結晶構造とCt3GT-Aの結晶内での配置 (B)

**BLUFタンパク質結晶の中性子回折実験：**BLUFタンパク質結晶を重水で調製した14%PEG8000、0.3 M酢酸アンモニウムを含む0.1 M酢酸ナトリウム(pH 4.6)に浸漬した後、結晶をφ1.5 mmのクォーツキャピラリに詰めた（図2）。浸漬後の結晶には見かけ上大きな変化は見られなかった。phi角度0°及び90°に対しそれぞれ6時間中性子を照射した。その結果、最大で36Å程度の回折点のみが確認できた。Ct3GT-Aに関しては結晶化条件をさらに最適化し、より高分解能のX線回折データを得られる結晶を得る。BLUFタンパク質は昨年度から継続して中性子回折実験を行っているが、良好な結果が得られていないことから、さらに大型の結晶取得を試みると共に、稼働予定のJ-PARC利用を視野に入れた実験を計画する必要がある。

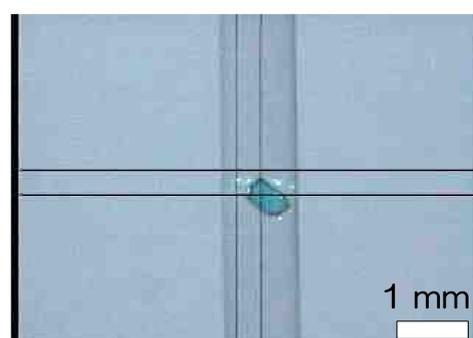


図1 回折実験に用いた結晶

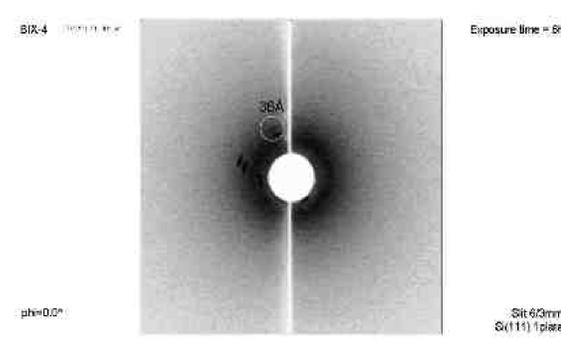


図2 中性子回折像（6時間照射）

# 植物の糖酵素の精密構造解析

利用者 ○佐々木 秀治

所属 青森県農林総合研究センター・グリーンバイオセンター

## 1. 目的

植物の二次代謝産物の多くは配糖体の形態で存在する。その中には医薬品として重要なステロイドアルカロイド配糖体や花の着色に必要なフラボノイド配糖体が知られている。我々が花色の発現に関与する新規のアントシアニン配糖化酵素を植物（チョウマメ）から単離したところ、アミノ酸配列の相同性は非常に高いが基質特異性の異なる数種の配糖化酵素が存在することが分かった。その様な酵素の基質特異性を解明する上で、高次構造を決定することが必要不可欠である。さらに、活性部位の詳細な水分子の配向やプロトン化の情報を利用し酵素活性や基質特異性を改変することにより、新たな医薬品の創生や、これまでになかった花色を持つ植物の育種が期待できる。そこで本プログラムでは、まず配糖化酵素の大腸菌による組換え大量発現を行い、得られたタンパク質を結晶化しX線さらには中性子による精密構造解析を行うことを目的とする。

## 2. 実施手順

**Ct3GT-Aの発現・精製及び結晶化**：発現ベクターpQE31\_Ct3GT-AのDNA塩基配列分析を行ったところCt3GT-AのHisタグはエンテロキナーゼで除去できることが分かった。そこでNiカラム精製後のCt3GT-Aをエンテロキナーゼで処理後、pHを5.0に調整した後、陽イオン交換クロマトグラフィーによりHisタグを除去したCt3GT-Aを精製した。その結果、図1 Aに示すようにCt3GT-Aが単一ピークとして得られ、エンテロキナーゼ処理していないCt3GT-Aよりも分子量が若干小さい単一なバンドとして観察され、Hisタグ領域（20残基：約2kDa）が除去されていることが確認された（図1B）。得られたタンパク質試料について結晶化スクリーニングを実施したところ、4条件で棒状の結晶成長が見られ、いずれも酸性条件化、PEGを沈殿剤とした条件であった（図1C）。

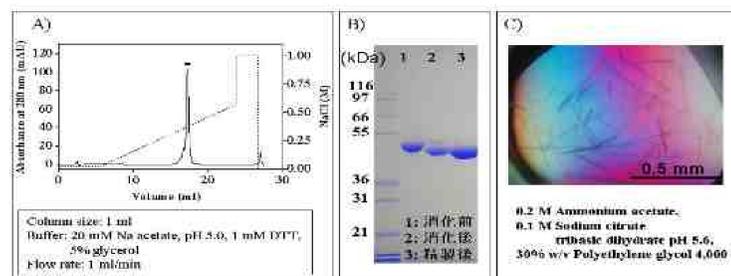


図1 エンテロキナーゼ処理したCt3GT-Aの精製と結晶化  
A) 陽イオン交換クロマトグラム； B) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動； C) エンテロキナーゼ処理したCt3GT-Aの結晶

### Ct3GT-AのX線結晶構造解析

得られた結晶についてPhoton Factory BL6AでX線回折データの収集を行った。その結果、30秒露光で回折データ（0-180°）を収集し1.8Å分解能のデータを得ることができた。回折データから今回得られた結晶は $a=50.2$ 、 $b=55.2$ 、 $c=86.2$ Åの格子長を有することから中性子回折実験向きの結晶であることが分かった（図2）。また、回折データを $R/R_{free}$ 値が18.2/22.6まで精密化を行いCt3GT-Aの1.8Å分解能のモデルを構築した（図2）。

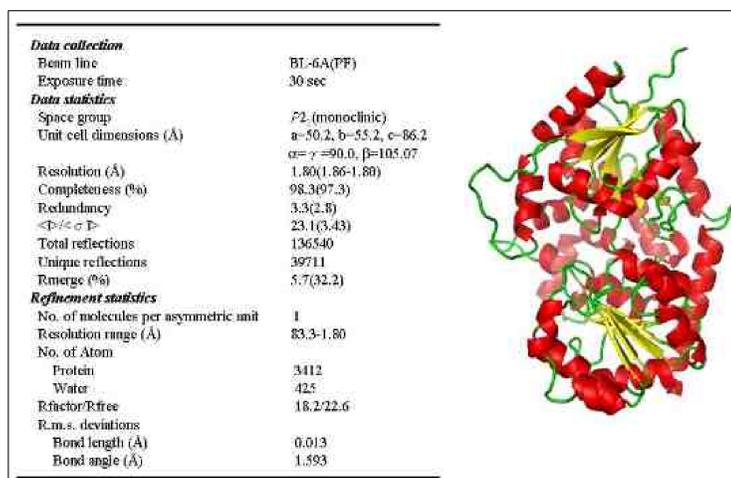


図2 X線結晶構造解析の統計値と1.8Å分解能のCt3GT-Aの結晶構造

### Ct3GT-AのX線結晶構造解析（グルコース受容体・供与体を含む）

中性子結晶構造解析法で酵素の構造機能解析を行う際には基質となる化合物との複合体との水素結合情報を得ることが重要になる。そこでCt3GT-Aの酵素活性でグルコース受容体となるデルフィニジンやケンフェロール、供与体となるUDP-グルコースとの複合体結晶を作成し、その構造解析を実施した。その結果、化合物を含まない結晶と同等のデルフィニジン結晶については2.2Å、その他は1.8Å分解能のデータ得ることができた。今回得られたグルコース受容体の結合状態を以前報告された葡萄由来グルコシルトランスフェラーゼの立体構造と重ね合わせたところ葡萄とチョウマメグルコシルトランスフェラーゼのケンフェロールに対する結合方向が全く異なることが分かった。すなわちグルコースが付加される3-OHは、ほぼ同じ座標に存在するが、両グルコシルトランスフェラーゼ間ではフラボノール骨格がO1-C3を結ぶライン（図4A点線）でほぼ180°対称に結合しており、フラボノールのA-C環の角度は23度異なっていた（図4B）。デルフィニジンの結合状態はケンフェロールよりも1位の酸素原子を中心にB環が右回りにおよそ12度回転しており（図3A-B）、B環の3'(5')及び4'位のOH基がプロリン78主鎖Oと水素結合を形成し安定な状態で結合しているものと考えられた。

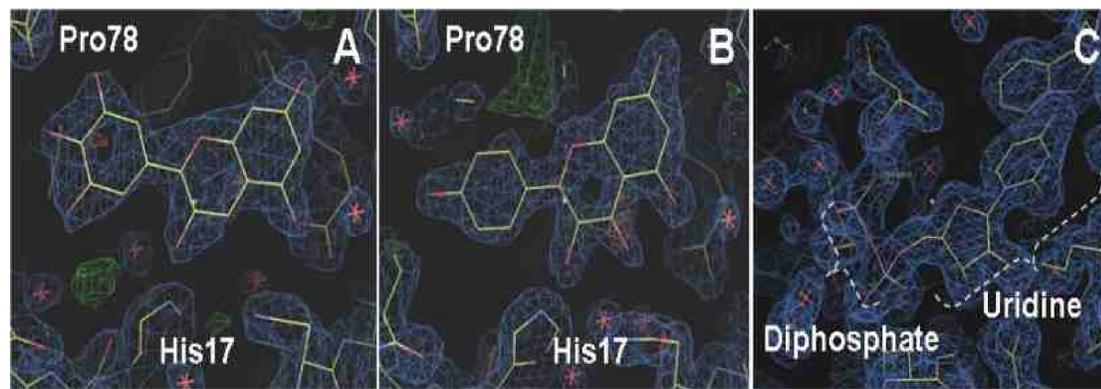


図3 グルコース受容体、デルフィニジン (A)、ケンフェロール (B) 及び供与体UDP-グルコース (C) の2Fo-Fc電子密度マップ

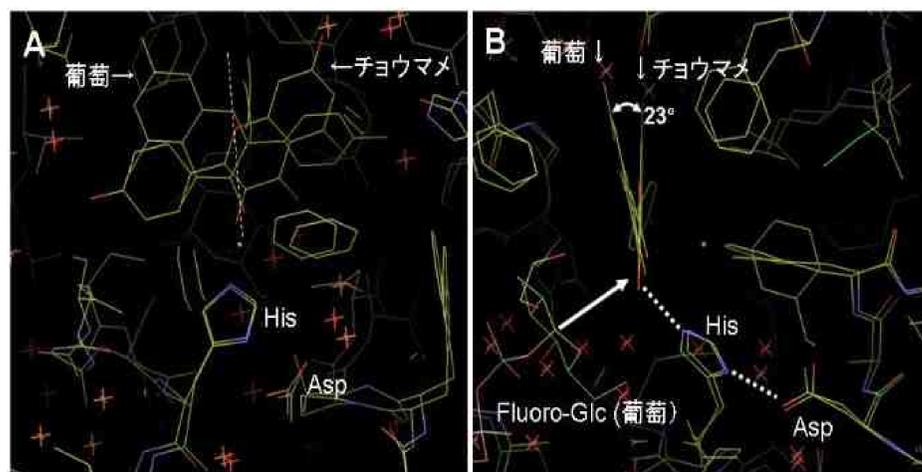


図4 葡萄とチョウマメグルコシルトランスフェラーゼにおけるケンフェロール結合方向の違い (A:フラボノール骨格に対し垂直方向視線 B:水平方向視線)

**Ct3GT-A結晶の中性子回折実験**：先の実験より得られたCt3GT-A結晶の単位格子長は $a=50$ Å、 $b=55$ Å、 $c=86$ Åであり中性子回折実験に適したものであったが、外形が細長い棒状であり、さらに結晶成長もコントロールが難しかったことから $0.05 \times 0.05 \times 0.5$  mm程度の大きさの結晶を用いて中性子回折を試みた。角度を変え12時間及び24時間露光で回折実験を行ったが、いずれも明確な回折点を得ることはできなかった。Ct3GT-Aのフラボノールとアントシアニン認識の違いを知ることができたが、両受容体に対する糖転移の効率の理由を知るためには水素原子を含めた詳細な構造解析が必要であると考えられた。

# Lysylendopeptidase (LEP) の 機能発現機構解明

利用者 ○大西裕季<sup>1</sup>、田中伊知朗<sup>2</sup>、新村信雄<sup>2</sup>、正木武治<sup>2</sup>、崎山文夫<sup>3</sup>、白木賢太郎<sup>4</sup>、  
長南 茂<sup>2</sup>、今瀬 肇<sup>5</sup>

所属 <sup>1</sup>(株)化研、<sup>2</sup>茨城大学、<sup>3</sup>大阪大学、<sup>4</sup>筑波大学、<sup>5</sup>茨城県企画部

Lysylendopeptidase (LEP) は、塩基性アミノ酸特異的トリプシン (TRY) と異なり、高い酵素活性とアルカリ性に広がる活性域をもつリジン残基特異的セリンプロテアーゼである。LEPの活性部位には、水素結合や静電相互作用で結ばれた側鎖ネットワーク、Ser194(触媒基)-His57-Asp113-His210-Trp169およびHis177が存在する。同様の構造はTRYには存在せず、LEPの際立った触媒機能との関連が示唆される。LEPの高い酵素活性は、His57,His210,His177のプロトンの挙動が大きな役割を担っていると考えられる。これらプロトンの観測は中性子構造解析法のみが可能とするので、LEPの大型結晶を育成して中性子回折実験に適用可能かどうかを確認する短時間測定(テスト)実験を実施した。

## 中性子回折実験

中性子回折実験には、X線回折実験とは異なり1ミリ角以上の大型結晶が必要である。そこで、X線構造解析に使われた結晶の結晶化条件(タンパク質濃度:20mg/mL、結晶化剤濃度15-20% PEG6000[1])を基に最適条件を探索して大型結晶育成を行った。今回のトライアルユースでは、マシンタイムとして2日間ということであったため、軽水中の結晶と軽水から重水中へと置換した結晶の2つに対してJRR-3のBIX-3を使って中性子回折実験を行った。

## 測定条件

中性子回折実験の測定条件を表1に示した。

## 実験結果

中性子回折実験に使用したLEP結晶と得られた回折像を図1(軽水)および図2(重水)に示した。軽水中の結晶からは、 $\phi=0^\circ$  露光時間6hの測定条件4にて4.4Åあたりに回折像が観測された。一方、軽水中の結晶と比べて体積が65%程度であるが、重水置換したLEP結晶(軽水中同条件で結晶化を行った後、50% PEG3350重水緩衝溶液に結晶を移して重水置換したもの)からは $\phi=45^\circ$  で2.9Å、 $\phi=0^\circ$  では3.3Å程度までの中性子回折像を与えた。

以上のことから、重水置換されたLEP結晶をより大きくすれば、より高分解能の中性子回折データが取れる可能性があることが示された。今回使用した結晶は、空間群がP1なので、この結晶をそのまま用いて2軸走査(露光時間2時間で $0.3^\circ$  stepずつ $180^\circ$ 測定を2軸分として計算)フルデータを収集すると仮定すると、単純計算で約100日の測定時間となり、このことから、更なる大型結晶が必要であることがわかった。

## まとめ

今回の中性子回折実験により、重水中のLEP結晶が体積として $0.15\text{mm}^3$ と一般に要求される中性子回折実験用結晶サイズと比較すると小型であるものの、中性子構造解析に適用可能であることが示された。しかし、構造解析用のフルデータ測定を行うためには、今回得られた回折像から予想される分解能2.9Åよりもさらに上げることが必要であり、さらに単純計算で100日のマシンタイムが必要であることから、本中性子回折実験に用いた結晶サイズをより大型にするとともに、より良い結晶性のものへと育成することが望ましい。現在さらなる大型結晶の育成を行っており、次のフルデータ測定へと進めていく予定である。

[1]Yutaka Oda, et al. Acta Cryst.(1996). D52, 1027-1029.

表1

軽水中LEP結晶						重水中LEP結晶					
	露光時間	スリット	開始phi	終了phi	phi間隔		露光時間	スリット	開始phi	終了phi	phi間隔
1	5 min.	5/2	$0^\circ$	$0^\circ$	$0^\circ$	1	5 min.	5/2	$0^\circ$	$0^\circ$	$0^\circ$
2	1 h	5/2	$0^\circ$	$0^\circ$	$0^\circ$	2	1 h	5/2	$0^\circ$	$0^\circ$	$0^\circ$
3	5 min.	5/3	$0^\circ$	$0^\circ$	$0^\circ$	3	6 h	5/2	$0^\circ$	$90^\circ$	$45^\circ$
4	6 h	5/3	$0^\circ$	$90^\circ$	$90^\circ$	4	2 h 20 min.	5/2	$135^\circ$	$135^\circ$	$0^\circ$
5	11 h	5/3	$45^\circ$	$45^\circ$	$0^\circ$	5	2 h	5/2	$45^\circ$	$90^\circ$	$45^\circ$

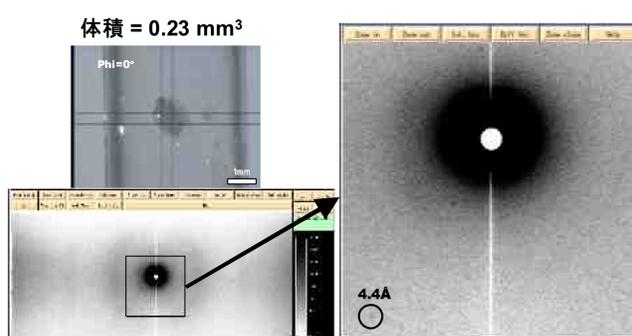


図1:LEP結晶および中性子回折像

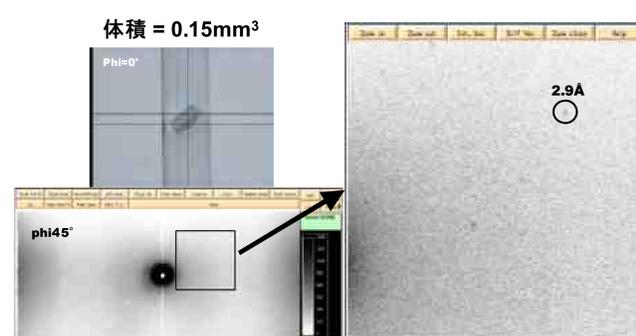


図2:LEP結晶および中性子回折像

# ATP結合タンパク質の中性子線構造解析

利用者 ○齋藤純一、鈴木道彦、島田純一  
所属 協和発酵工業株式会社

## 【序論】

タンパク質の結晶構造に基づくドラッグデザイン、いわゆる Structure-based Drug Design (SBDD) を行う上で、水素・水和構造を把握することは非常に重要であり、特に、計算化学的手法を用いる場合には、水素情報の有無が計算精度に大きな影響を及ぼすことは周知の事実である。高分解能のX線結晶構造でも一部の水素位置情報を得ることはできるが、水分子を含めた全ての水素を決定することはできない。そこで、水素・水和構造を実験的に決定できる唯一の方法である、中性子線結晶構造解析を行うため、中性子利用技術移転推進プログラム「トライアルユース」課題に応募し、薬剤標的 ATP 結合タンパク質の中性子線回折実験を実施した。

## 【結晶化実験】

中性子線回折実験に適した ATP 結合タンパク質の結晶作製を試みた。中性子線回折実験には、通常、 $2\text{ mm}^3$  以上の大型かつ良質なタンパク質結晶が必要であるが、これは、X線回折実験で一般的に使用されている結晶サイズと比較すると、約1000倍の大きさに相当する。通常のシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行い、比較的大きな結晶が数個だけ析出したバッチを選択し、タンパク質溶液を経時的に追加する方法で結晶を成長させた。その結果、約  $2\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 0.4\text{ mm}$  の大きさの結晶 (Fig.1) を得ることができたので、これらの中性子線回折実験に供した。

## 【中性子線回折実験】

中性子線回折実験を行うため、ATP 結合タンパク質結晶を重水溶液（結晶化沈澱剤溶液）に一晩浸漬させ、重水素置換を行った。重水素置換後の結晶を石英キャピラリーに封入した後 (Fig.2)，研究用原子炉 JRR-3 に設置された生体高分子結晶構造解析用の中性子線回折装置 BIX-3 を用いて予備的な回折実験を行った（第6サイクル：10/14 - 10/20）。

回折実験（12時間露光）の結果、約  $2.7\text{ \AA}$  分解能までの回折能が確認された (Fig.3 矢印)。そこで、中性子線回折装置 BIX-4 を用いて本測定を行った（第7サイクル：10/30 - 11/20）。

マシンタイム（約16日間）の関係上、完全性の高いデータ収集を重視したため、露光時間を予備測定時の12時間から2時間に抑え、測定領域が  $60^\circ$  以上になるように条件をシミュレーションし、212 フレーム（トータルの測定領域  $63.6^\circ$ ）を測定する条件でデータ収集を試みた。その結果、分解能が約  $3\text{ \AA}$ 、完全性が7割程度、 $R_{\text{merge}}$  が18%のデータを収集することができた。しかし、水素・水和構造を含めた構造解析を行うためには、最低でも  $2\text{ \AA}$  分解能程度のデータが必要であるため、残念ながら、このデータでの水素・水和構造決定は難しいと判断した。

## 【今後の予定】

今回使用した結晶の体積よりも2倍程の結晶を作製する。十分なサイズの結晶が得られ次第、測定条件を十分に検討し、高分解能データ収集を検討する。水素・水和構造を含めた構造解析を実現させる。

## 【謝辞】

中性子線回折実験を行うにあたり、ご協力、ご助言を頂いた日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門 生体分子構造機能研究グループの黒木良太博士、玉田太郎博士、栗原和男博士に感謝いたします。

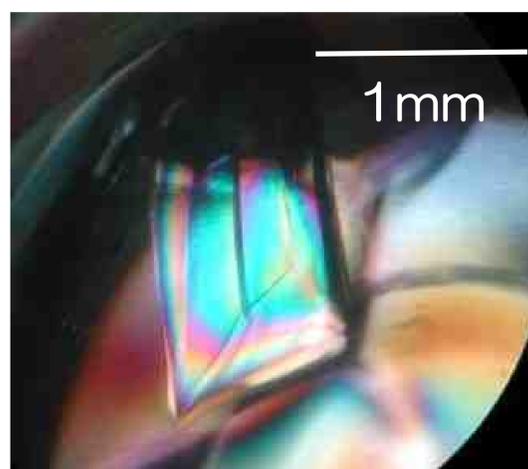


Fig. 1 ATP 結合タンパク質の結晶  
偏光顕微鏡写真

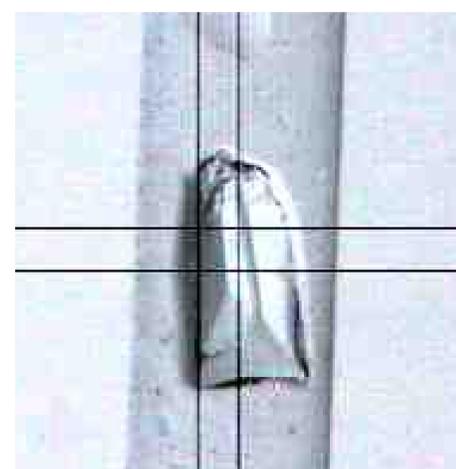


Fig. 2 石英キャピラリーに  
封入した結晶  
重水素置換後、封入

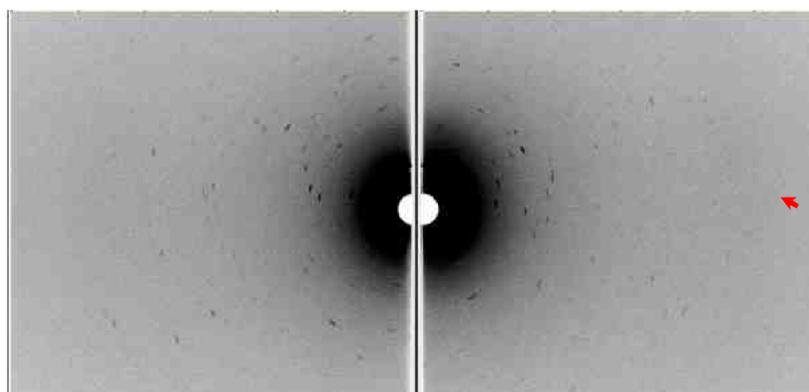


Fig. 3 ATP 結合タンパク質結晶の中性子線回折像  
研究用原子炉 JRR-3 の中性子線回折装置 BIX-3 を  
用いて測定したATP 結合タンパク質結晶の中性子線回  
折パターン（12時間露光）。  
図中の赤色矢印位置は、約  $2.7\text{ \AA}$  分解能に相当する回  
折斑点を示す。

# ATP 結合タンパク質の中性子線構造解析

利用者 ○齋藤純一、鈴木道彦  
 所属 協和発酵工業（株）

## 【序論】

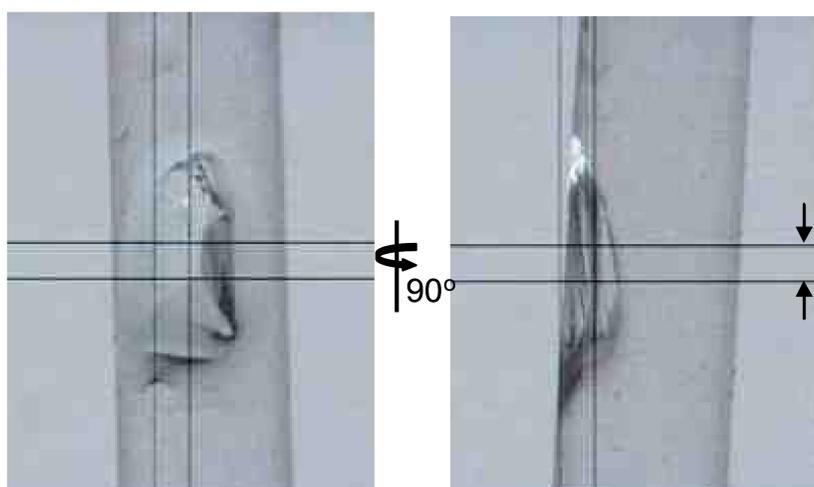
タンパク質構造に基づく薬剤デザイン, Structure-based Drug Design (SBDD) を行う上で, 水素・水和構造を把握することは非常に重要であり, 特に, 計算化学的手法を用いる場合には, 水素情報の有無が計算精度に大きな影響を及ぼすことは周知の事実である. 高分解能のX線結晶構造でも一部の水素位置情報を得ることは可能であるが, 水分子を含めた水素位置を決定することはできない. そこで, 水素・水和構造を実験的に決定できる唯一の方法である, 中性子線結晶構造解析を行うため, 昨年に引き続き, 中性子利用技術移転推進プログラム「トライアルユース」課題に再度応募し, 薬剤標的 ATP 結合タンパク質について, 構造解析可能な結晶作製とその中性子線回折実験を実施した.

昨年の実験では, 約 2 mm x 0.8 mm x 0.5 mm の大きさの結晶 (Fig.1左) を作製し, 中性子線回折実験に供した. この結晶のサイズは, X線回折実験で一般的に使用されている結晶サイズと比較すると, 500 - 1000倍の大きさに相当する. 中性子線回折実験の結果, 分解能が約 3 Å, 完全性が7割程度,  $R_{merge}$  が 18% のデータを収集することができたが (Table1), 水素・水和構造を含めた構造解析を行うためには, 2 Å 分解能程度のデータが必要とされているため, 水素・水和構造決定は難しいと判断した. 高分解能データ測定を目指し, まず, 結晶の大型化を試みた.

## 【結晶化実験】

ATP 結合タンパク質の結晶化は, 通常のシッティングドロップ蒸気拡散法により行った. この際, 沈澱剤濃度を前回よりも低くし, 結晶成長を遅くすることで結晶の核形成を抑え, 1つ1つの結晶サイズを大型化することとした. 比較的大きな結晶が1, 2個析出したバッチを選択し, タンパク質溶液を経時的に追加する方法で結晶を成長させた. その結果, 前回使用した結晶の約 2.4倍のサイズ (約 2.3 mm x 1.1 mm x 0.8 mm) の結晶 (Fig.1右) が得られた.

2006年



2007年

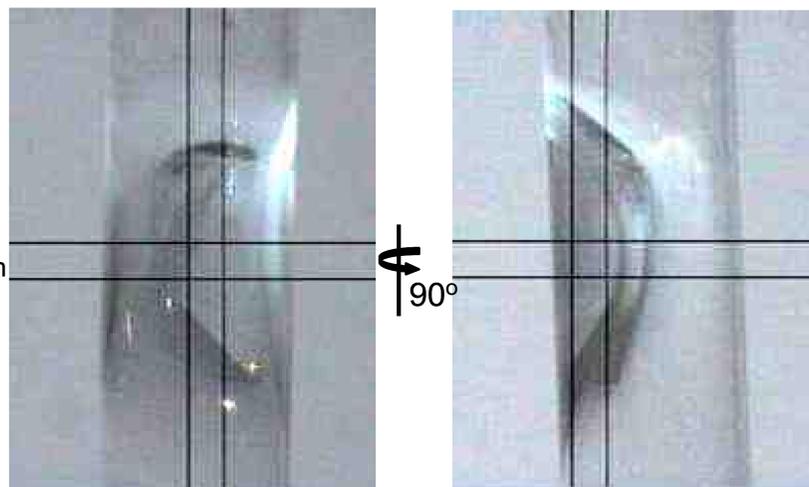


Fig. 1 石英キャピラリーに封入したATP 結合タンパク質の結晶 (左) 前回2006年のトライアルユースでの実験で使用したもの, (右) 今回2007年の実験に使用したもの. サイズはそれぞれ 2.0 x 0.8 x 0.5mm, 2.3 x 1.1 x 0.8mm.

## 【中性子線回折実験】

中性子線回折実験に際し, 重水溶液 (結晶化沈澱剤溶液) に一週間浸漬させ, 重水素置換を行った. この間, 溶液を交換することで, 確実な重水素置換を試みた. ソーキング後の結晶を石英キャピラリーに封入後, 研究用原子炉 JRR-3に設置された生体高分子結晶構造解析用の中性子回折装置 BIX-3 を用いて回折実験を行った (第5サイクル: 9/5 - 9/14). 完全性の高いデータ収集を重視し, 露光時間を2時間に抑え, 測定領域が 70° 以上になるような条件をシミュレーションし, 244 フレーム (トータルの測定領域 73.2°) を測定する条件でデータ収集を試みた. その結果, 分解能が約 2.8 Å, 完全性が7割弱,  $R_{merge}$  が 約18% のデータを収集することができた. これは, 前回のデータと比較し, 若干分解能が改善されたものの, 水素・水和構造を含めた構造解析に必要なとされる2 Å 分解能には到達しなかった.

## 【結論】

水素・水和構造を含めた構造解析を行うため, 可能な限り結晶の大型化を行い, 回折実験を実施したが, 必要な高分解能のデータ測定には至らなかった. 露光時間を数倍にすることで, 強度の弱い反射をデータに含めることができれば, 分解能は若干上がると思われるが, 大幅に測定時間を延長する必要があるため, トライアルユース枠での完全性の高いデータ測定は困難である. 今後, 強力な中性子線を利用することが可能となれば, 今回と同程度のサイズの結晶であっても, 高分解能データ収集, さらに, 水素・水和構造を含めた構造解析が実現できるものと期待される.

謝辞 中性子線回折実験を行うにあたり, ご協力, ご助言を頂いた 日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門 生体分子構造機能研究グループの黒木良太博士, 玉田太郎博士, 栗原和男博士に感謝いたします.

Table 1 測定したデータの統計値の比較

	2006	2007
<b>Data collection</b>		
crystal size	2.0 x 0.8 x 0.5 mm	2.3 x 1.1 x 0.8 mm
detector	BIX4	BIX3
exposure time (hrs.)	2 /frame	2 /frame
range (°)	63.6 (212 frames)	73.2 (244 frames)
<b>Data processing</b>		
resolution (Å)	3.0 (3.11-3.00)	2.8 (2.90-2.80)
$I/\sigma(I)$	4.3 (2.5)	5.4 (3.3)
$R_{merge}$	0.179 (0.299)	0.184 (0.335)
completeness (%)	74.1 (63.9)	71.7 (61.9)

# 中性子構造解析による高耐性4-N,N-dimethylamino-4'-N'-methyl stilbazolium tosylate (DAST) 結晶の評価

利用者 内田 裕久<sup>1</sup>、松尾 弘也<sup>1</sup>、○深作 昇<sup>1</sup>、新村 信雄<sup>2</sup>  
 所属 <sup>1</sup>第一化学薬品株式会社、<sup>2</sup>茨城大学

## 1. 目的および背景

現在、優れた非線形光学定数を有する低分子有機イオン性結晶である4-N,N-dimethylamino-4'-N'-methyl stilbazolium tosylate(DAST)結晶は、テラヘルツ(THz)波発生用の素子として期待が高まっている<sup>1)</sup>。DAST結晶によるTHz波発生では、任意の条件に設定したレーザーを結晶に照射するが、この際に、結晶内部に損傷が生ずる場合があり、結晶の品質が問題となっている<sup>2)</sup>。さらに、損傷の発生パターンには結晶による個体差があり、レーザー照射前に確実に品質を評価する方法の開発が課題となっている。

結晶品質を評価する方法として、我々は結晶構造に着目した。DAST結晶構造は、X線構造解析によって、空間群Cc、格子定数  $a[\text{\AA}] = 10.365$ 、 $b[\text{\AA}] = 11.322$ 、 $c[\text{\AA}] = 17.893$ 、 $\beta[\text{deg.}] = 92.24$ 、 $V[\text{\AA}^3] = 2098.2$ 、 $Z = 4$ と報告されている<sup>3)</sup>。しかし、既存のX線結晶構造解析結果では、品質評価法については報告されていないため、中性子構造解析による水素原子情報に品質評価法構築の可能性がある。

本研究課題では、有機非線形光学結晶であるDAST結晶の実用的な品質と水素原子情報に着目した品質評価法構築の可能性を判断するために、水素原子情報を容易に観測できる中性子構造解析によってどの程度の精度および測定時間で水素原子の構造情報を得られるか確認することを目的とした。

## 文献

1) H.Nakanishi, H.Matsuda, S.Okada and M.Kato: Proc.MRS Int.Meet.Advanced Materials 1 (1989)97.

2) Y. Takahashi, K. Sugiyama, S. Brahadeeswaran, S. Onzuka, T. Kamimura, M. Yoshimura, Y. Mori, K. Yoshida and T. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys. 46 (2007) 318-323

3) S.R.Marder, J.W.Perry and C.P.Yakymyshyn: Chem.Mater.6(1994) 1137.

## 2. 中性子構造解析実験条件および結果

中性子構造解析では、自然核発生法にて育成を行ったDAST結晶を用いた。回折測定に用いた結晶の大きさを表1に示す。中性子回折測定はJRR-3のBIX-3を用いて行った。結晶の方位を手動で変えながら、全部で3通りの方位について、 $1.5^\circ$ の振動写真をそれぞれ120枚、60枚、60枚ずつ測定した。1枚当りの露光時間は10分とし、測定時間は30時間であった。6493個のブラッグ反射を測定し、そのうち独立反射は2023個であった。得られた回折データを元にSHELXLを用いて構造解析を行ったところ、 $R = 10.2\%$ という結果が得られた。

中性子構造解析より得られた結晶構造を図1に示す。本測定より得られた結晶構造パラメーターは、空間群Cc、格子定数 $a[\text{\AA}] = 10.318$ 、 $b[\text{\AA}] = 11.284$ 、 $c[\text{\AA}] = 17.811$ 、 $\beta[\text{deg.}] = 92.25$ 、 $V[\text{\AA}^3] = 2072.11$ 、 $Z = 4$ であった。また、DAST結晶中の水素原子位置を規則構造として特定し、各原子の熱振動を異方性温度因子として求めることができた。

表1. 中性子構造解析用結晶データ

縦(mm)	横(mm)	厚さ(mm)	体積(mm <sup>3</sup> )	晶形
3.19	2.88	0.51	4.69	単結晶

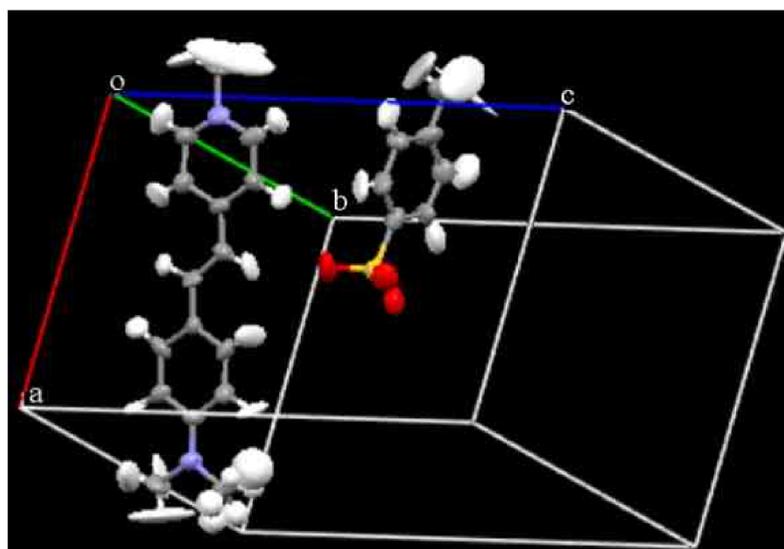


図1. 中性子構造解析によるDAST結晶構造  
 図中の線分oa(赤)はa軸、線分ob(緑)はb軸、線分oc(青)はc軸を示す。

## 3. まとめおよび今後の予定

中性子構造解析により、実用的な測定時間でDAST結晶構造における水素原子の位置を特定することができた。今後は、水素原子情報に着目した詳細な解析および追加の検討実験を行い、DAST結晶の実用的な品質と水素原子情報を結びつけた結晶品質評価法の構築を目指したい。

# 中性子回折による有機化合物結晶の構造解析

利用者 ○後藤田正晴  
所属 エーザイ(株)

## 1. 目的

医薬品原末（以下、原薬）の結晶構造は、安定性・溶解性・体内での吸収効率等と密接に関係している。したがって、より良い医薬品を開発するためには、原薬の結晶構造と固体物性との相関を正確に把握することが極めて重要になる。本課題では、医薬品開発における中性子回折利用の可能性を探ることを目的とし、低分子有機化合物の結晶構造を中性子回折により解析した。

## 2. 実験

（実験装置・実験期間）

単結晶回折：BIX3（2007年4月11～20日）

粉末回折：HRPD（2007年4月13～14日）

（単結晶回折実験）

中性子回折による単結晶構造解析では、大きくかつ質の高い結晶が必要であることから、モデル化合物としてアクリノール（水和物乳酸塩）、メントール、及びシチジンを選択し、結晶化を行った（大きさは結果の項を参照）。これらの結晶を波長1.51 Åにて3° オシレーションで10分露光、 $\omega$ 軸に対して0° と90° の方向から1° オシレーションで25分露光の測定を行い、回折ピークの出方からそれぞれの結晶の質を評価した。最も質がよいと判断したシチジン結晶について、フルデータ測定を実施した。なお、メントールは室温で徐々に揮発するため、結晶表面をコーティングして測定に供した。

（粉末回折実験）

アクリノール粉末結晶2.6 gを試料ホルダーに詰め、波長1.88 Åにて室温で2日間測定した。

## 3. 結果

（単結晶回折実験）

結晶の質を評価した結果を以下にまとめた。

試料	大きさ	回折ピーク	コメント
アクリノール	0.6 x 0.6 x 0.4 mm	×	質が悪いと判断
メントール	1.5 x 1.5 x 4 mm	△	高角のピークの出がよくない
シチジン	0.1 x 0.5 x 20 mm	○	高角までピークが認められた

シチジン結晶を用いてフルデータ測定を行い、 $R_{merge}=8.4\%$ 、 $Completeness=84\%$ のデータを得た。このデータを用いて結晶構造の精密化を行った結果、 $R=13.6\%$ の構造を得ることができた。 $R$ 値が下がらなかった原因として、シチジン分子の30原子のうち異方性温度因子で精密化できたのは11原子のみであったことが考えられる。これは高角のデータ数が不足していたためと考察している。

得られたパッキング図を右図に示す。理想的な位置からずれる水素原子が若干あったが、水素の位置に制限を加えていない精密化の結果としてはリーズナブルであると判断できる。特に末端水酸基の水素がカルボニル酸素と水素結合する位置に存在しており（白丸で示した部分）、水素の位置を精度よく決めることができたと考えられる。

（粉末回折実験）

$2\theta=162.4^\circ$  までの回折データを得ることができたが、バックグラウンドが非常に高くなってしまった（右図）。重水素化を行っていないことと室温で測定したことが原因の一つと考えられる。今後リートベルト法による結晶構造解析を実施する予定である。

## 4. 感想

単結晶中性子回折実験には大きな結晶が必要と言われているが、シチジンのように質のよい結晶を用いることにより、比較的小さな結晶でも解析できるデータ取得が可能であることを実感できた点は大きな収穫であった。現状では測定に長時間かかることが最大のネックであるが、水素原子の位置を精度よく決める必要がある場合には、中性子回折は有用であると思われる。より一般的に中性子回折を利用するためには良質な結晶を作成する技術力向上が不可欠であるので、結晶成長の分野での技術進歩にも期待したい。

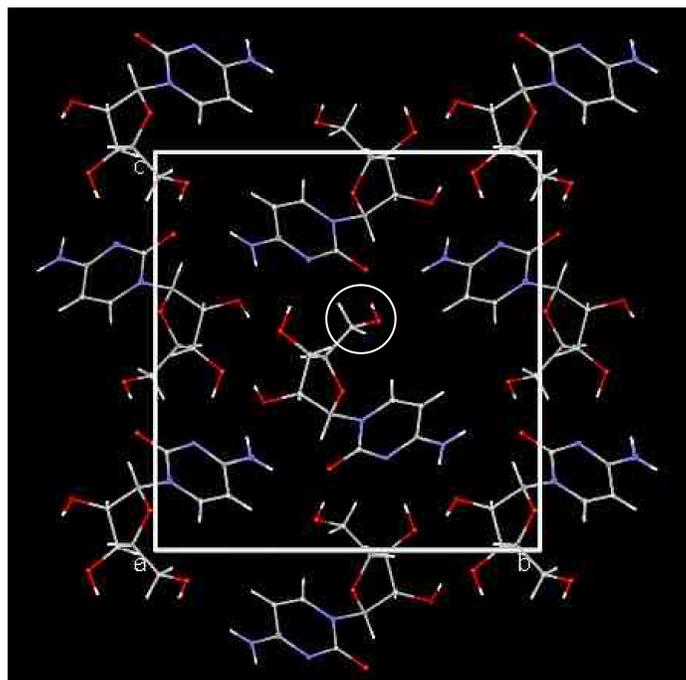


図1 中性子線で解析したシチジンの結晶構造

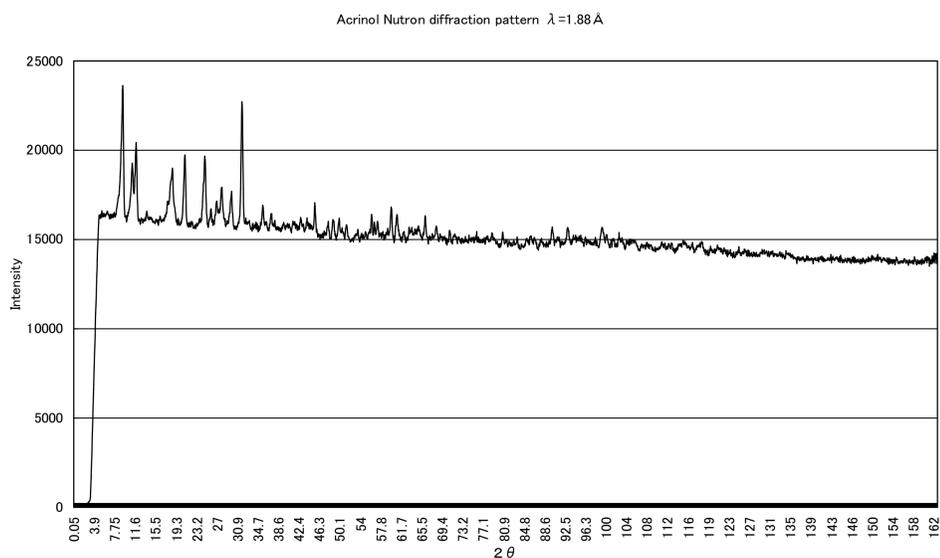


図2 アクリノールの粉末中性子回折パターン

# 創薬標的タンパク質の中性子構造解析

利用者 ○今瀬肇<sup>1</sup>、高野佳樹<sup>1</sup>、木村成伸<sup>2</sup>、木村要<sup>3</sup>、安達宏昭<sup>4</sup>  
 所属 <sup>1</sup>茨城県企画部、<sup>2</sup>茨城大学、<sup>3</sup>キリンビール、<sup>4</sup>(株)創晶

## 1.目的

茨城県は県内の企業や大学機関から構成される新薬創生研究会の要請により、創薬研究に直結する創薬標的タンパク質としてヒト免疫不全ウイルス由来のプロテアーゼ(HIVプロテアーゼ)を選択し、軽水及び完全重水素化したHIVプロテアーゼの中性子構造解析を行う。

## 2.実施手順

- i) 重水素化HIVプロテアーゼの調製及びX線結晶解析： HIVプロテアーゼ発現大腸菌を重水素化培地中で培養し、完全重水素化HIVプロテアーゼを調製する。さらに同試料を用いて結晶化及びX線結晶構造解析を行い、軽水HIVプロテアーゼとの構造比較を行う。
- ii) 軽水HIVプロテアーゼの中性子回折実験： 提案メンバーの(株)創晶が大型化した軽水HIVプロテアーゼについて、JRR3に設置されたBIX4で中性子回折データの収集を行う。

## 3.実施結果

i) 重水素化HIVプロテアーゼの調製及びX線結晶解析： HIV-プロテアーゼの発現ベクターとしてカナマイシン耐性であるpET28aを用い、さらに培養中に鉄イオンを添加することによりHIVプロテアーゼを重水素化培地中で効率良く発現させることに成功した。さらにリフォールディング回収率を向上させるため、発現した封入体の界面活性剤による洗浄を精製工程に加え、さらにリフォールディング条件の検討を行った。リフォールディングpHをこれまでの5.5から7.5に変更することにより1リットルの培養液当たり7.8 mgの重水素化HIVプロテアーゼを調製することに成功した(図1 BSDS-PAGE参照)。これは軽水HIVプロテアーゼと同等の調製効率である。

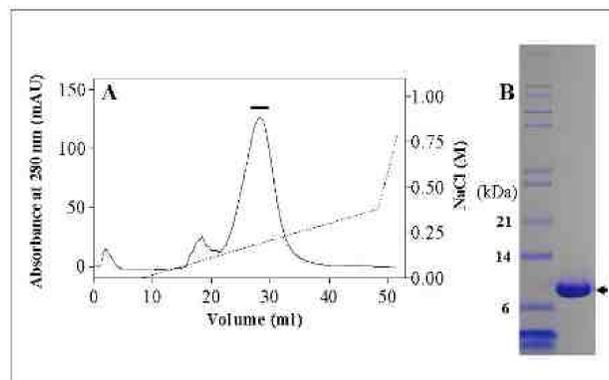


図1 陽イオン交換クロマトグラフィーによる重水素化HIVプロテアーゼの精製 (A) 及び精製されたプロテアーゼのSDS電気泳動分析 (B)

重水素化HIVプロテアーゼを、軽水中で蟻酸を沈殿剤として用い結晶化(図2A)し、X線回折データを収集し構造決定を行った(図2B)。重水素化HIVプロテアーゼの主鎖構造や温度因子は同じ条件で結晶化した軽水HIVプロテアーゼと大きな差は見られなかった。さらに、調製時に添加したHIVプロテアーゼ阻害剤(KNI-272)の電子密度も軽水HIVプロテアーゼ同様に確認できた(図2C)。

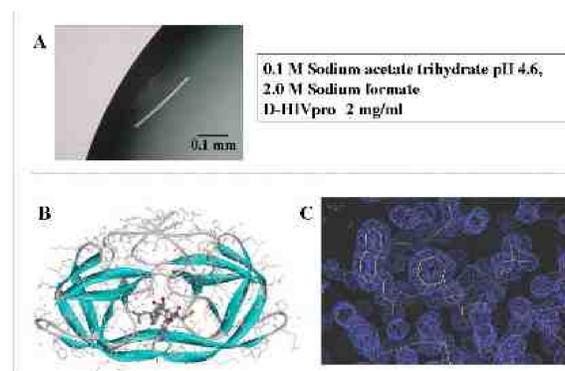


図2 重水素化HIVプロテアーゼの結晶 (A)、1.4 Å分解能のX線結晶構造 (B) 及び活性部位に結合した阻害剤(KNI-272)の電子密度 (C)

ii) 軽水HIVプロテアーゼの中性子回折実験： 原子力機構から提供されたHIV-プロテアーゼ試料に京都薬科大学木曾研究室から提供を受けたHIV-プロテアーゼ阻害剤(KNI-272)を結合させ複合体とした後、(株)創晶で結晶化および大型化を行った(1.9x1.9x0.4 mm、図2)。本結晶を重水で調製した緩衝液に置換し、原子力機構の研究用原子炉JRR3に設置されたBIX4を用いて中性子回折実験を行った。本測定に入る前に露出時間を検討したところ、6時間露光で2.3Åの回折点を確認することができた(図3)。そこで露光時間を6時間とし、第7、第8サイクルのビームタイムを使って、測定領域50.4°でデータ収集を試みた。その結果、分解能が2.3Å、データの完全性が83%、Rmergeが8.1%のデータを収集することができた(表1)。X線結晶構造解析で取得されている構造を初期モデルとして、プログラムCNSによりR値22%、free-R値34%まで精密化した。KNI-272のヒドロキシル基と触媒残基であるアスパラギン酸残基(Asp)の水素結合が観測された(図5)。

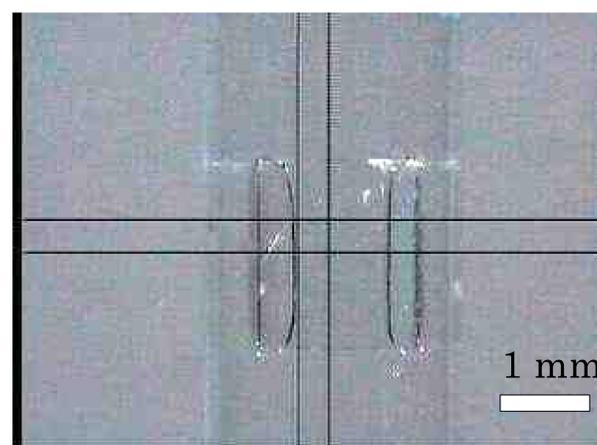


図3 回折実験に用いた結晶

今後、本プログラムで軽水HIVプロテアーゼ結晶の中性子回折データから得られた分子モデルの精密化を行い、水素原子を含めた分子の評価を行う。また、重水素化HIVプロテアーゼについては結晶の大型化を行い、すでに1.0 x 1.0 x 0.1 mm程度の結晶を得ることに成功していることから、来年度も研究会としてビームタイムが確保できれば、さらに高分解能回折データ収集を目指すとともに、タンパク質の完全重水素化の有効性に関しても考察したい。

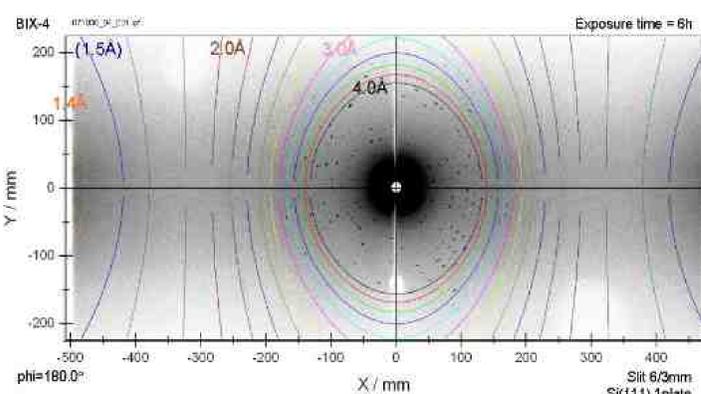


図4 中性子回折像(6時間照射)

表1 HIVプロテアーゼ中性子回折データ収集の統計値

Shell	Lower	Upper	Unique reflections	R <sub>merge</sub> (%)	I <sub>σ(I)</sub>	Completeness (%)	Redundancy
100	4.96	941	3.9	22.4	75.5	2.0	
4.96	3.93	960	4.9	18.5	82.6	1.9	
3.93	3.44	963	5.9	13.4	84.4	1.8	
3.44	3.12	964	8.0	9.0	86.6	1.7	
3.12	2.90	995	10.7	6.8	86.9	1.6	
2.90	2.73	970	15.2	4.5	87.3	1.5	
2.73	2.59	958	17.7	3.7	85.6	1.5	
2.59	2.48	937	20.3	3.4	84.7	1.4	
2.48	2.38	903	23.6	3.0	80.8	1.4	
2.38	2.30	882	26.6	2.5	80.3	1.3	
All hkl		9,473	8.1	7.7	83.4	1.6	

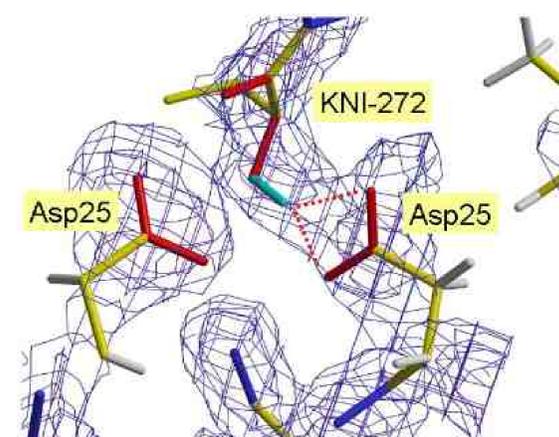


図5 触媒中心の核密度マップとボンドモデル

水色:重水素原子,灰色:水素原子,  
 赤色:酸素原子,青:窒素原子

# 中性子結晶回折法によるタンパク質-医薬品相互作用の解析

利用者 ○今瀬肇<sup>1</sup>、高野佳樹<sup>1</sup>、木村要<sup>2</sup>、安達宏昭<sup>3</sup>  
 所属 <sup>1</sup>茨城県企画部、<sup>2</sup>キリンビール、<sup>3</sup>(株)創晶

## 1.目的

茨城県は県内の企業や大学機関から構成される新薬創生研究会の要請により、創薬研究に直結する創薬標的タンパク質としてヒト免疫不全ウイルス由来のプロテアーゼ(HIVプロテアーゼ)を選択し、軽水及び完全重水素化したHIVプロテアーゼの中性子構造解析を行う。

## 2.実施手順

HIVプロテアーゼ発現大腸菌を重水素化培地中で培養し、完全重水素化HIVプロテアーゼの調製、結晶化及びX線結晶構造解析による軽水HIVプロテアーゼとの構造比較を行った。また大型化した軽水HIVプロテアーゼについては中性子回折データの収集を行った。

## 3.実施結果

完全重水素化HIVプロテアーゼ結晶の大型化及び中性子回折実験： 2.6 mg/ml 完全重水素化HIVプロテアーゼ(+KNI272)を用いて0.1 M 酢酸ナトリウム(pH 4.6)、0.2 M 酢酸アンモニウム、0.95 M 蟻酸ナトリウムを用いて軽水中で結晶の大型化を行った。中性子回折データ収集を行うに当たり、溶媒環境を完全重水へ置換するため、0.2 mg/ml重水素化HIVプロテアーゼ(+KNI272)を含む0.1 M重水素化酢酸ナトリウム(pD 4.2)、0.2 M 重水素化酢酸アンモニウム、1.2 M 重水素化蟻酸ナトリウムを調製し、結晶母液を数日間かけて徐々に置き換えた。それに伴い、リザーバー溶液には重水素化HIVプロテアーゼを含まない前述の溶液に置換した。結晶の右上部には気泡を内包しており(図1)、結晶右中央部には成長方向の異なる結晶(図1 矢印)が付着している。20日以上重水置換した完全重水素化HIVプロテアーゼ結晶(およそ1 mm<sup>3</sup>、図1左)をキャピラリーに封入し、6時間露光で角度を変え回折実験を実施した。しかしながら4Å分解能までの回折点しか観察されず、その数も非常に少なかった(図1右)。また、小さめの予備結晶についても同様に実験を実施したが、良好な結果をえることはできなかった。この原因を確かめるため同結晶のX線による回折点を調べたところ、2Å程度まで回折点は確認できたが、複数の結晶が存在しているかのような回折点が観察され、長期間におよび結晶成長の際に多結晶になってしまったものと考えられた(図3)。

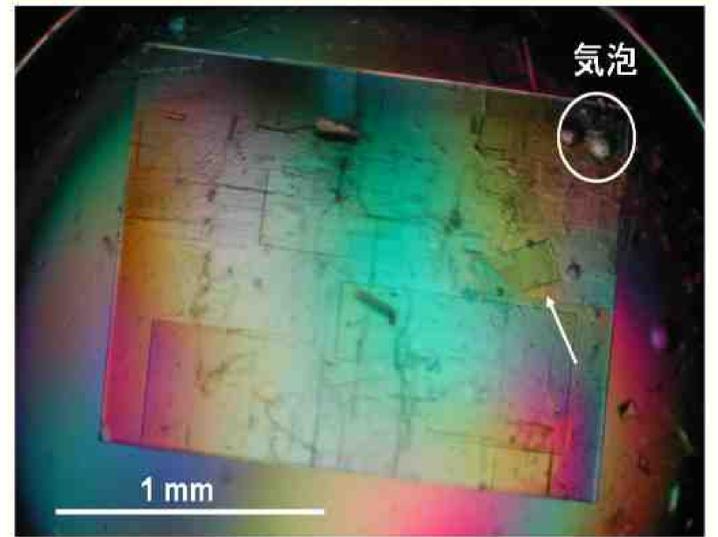


図1 重水置換中のHIVプロテアーゼ結晶

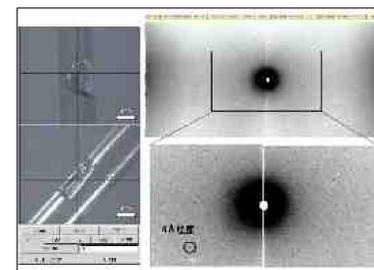


図2 重水素化HIVプロテアーゼ結晶(左)とその中性子回折パターン(右)

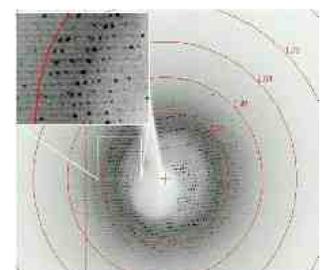


図3 中性子回折実験に用いた結晶のX線回折パターン

軽水素HIVプロテアーゼの中性子回折実験：(株)創晶で昨年度よりもさらに体積で2.6倍(3.7 mm<sup>3</sup>)大型化した軽水HIVプロテアーゼ結晶(4.3 x 2.5 x 0.8 mm、図3左)を重水置換し中性子回折実験を行った。6時間露光では2.0Åを越える回折点を確認することができた(図3)。そこで露光時間を6時間とし測定領域54.3°でデータを収集した。その結果、昨年度とほぼ同じ統計処理をすることにより、昨年度は2.3Å分解能のデータであったが、今回1.9Å分解能までのデータにすることができた(表1)。図3の結晶を回折実験後、X線回折実験を実施し1.4Å分解能のデータを収集し、両回折データを用いてHIVプロテアーゼの水素・水和水を含むモデル構造の精密化を行った。その結果、R/R<sub>free</sub> = 19.3/22.2まで精密化が進み、88個のD<sub>2</sub>O分子、5個のDO分子及び50個のO原子の位置を決定することができた(図4)。

表1 昨年度(左)及び今年度(右) HIVプロテアーゼ中性子回折データの統計値

Shell				
Lower	Upper			
Limit(Å)	limit(Å)	R <sub>merge</sub> (%)	I/σ(I)	Comp.(%)
100	4.96	3.9	22.4	75.5
4.96	3.93	4.9	18.5	82.6
3.93	3.44	5.9	13.4	84.4
3.44	3.12	8.0	9.0	86.6
3.12	2.90	10.7	6.8	86.9
2.90	2.73	15.2	4.5	87.3
2.73	2.59	17.7	3.7	85.6
2.59	2.48	20.3	3.4	84.7
2.48	2.38	23.6	3.0	80.8
2.38	2.30	26.6	2.5	80.3
All hkl		8.1	7.7	83.4

Shell				
Lower	Upper			
Limit(Å)	limit(Å)	R <sub>merge</sub> (%)	I/σ(I)	Comp.(%)
100.00	4.09	3.9	26.5	84.2
4.09	3.25	6.0	17.0	90.0
3.25	2.84	10.2	9.3	91.1
2.84	2.58	15.3	5.4	91.2
2.58	2.39	18.3	4.0	87.0
2.39	2.25	23.0	3.1	86.4
2.25	2.14	29.0	2.7	82.4
2.14	2.05	34.0	1.9	80.0
2.05	1.97	35.8	1.6	75.8
1.97	1.90	36.7	1.7	67.5
All hkl		8.8	7.3	83.6

今後、軽水HIVプロテアーゼ結晶の中性子回折データから得られた分子モデルについて、活性部位付近の水素原子や活性残基アスパラギン酸のプロトン化の様子について評価を行う。

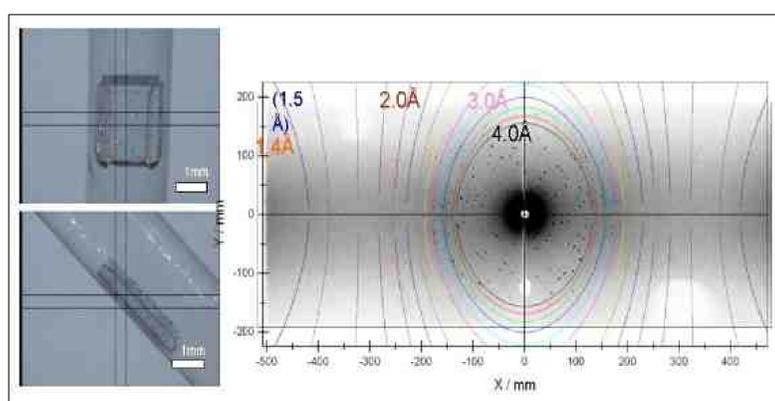


図3 軽水素HIVプロテアーゼの大型結晶(左)と中性子回折パターン(右)

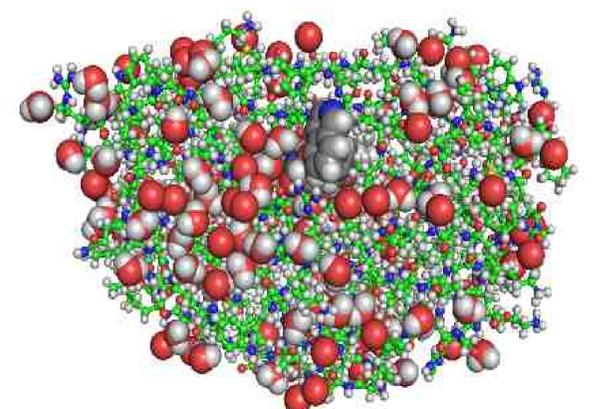


図4 水素・水和水を含むHIVプロテアーゼの構造

# 有機物内包ゼオライト単結晶の中性子構造解析

利用者 ○田島 政弘  
所属 島根県産業技術センター

## 1. はじめに（背景、目的）

島根県産業技術センターでは、数mmサイズのゼオライト巨大結晶（MFI型）（図1）の製造に成功している。ゼオライトは、1nm以下の微小細孔構造を有しており、細孔内に有機分子を複合化することによって、様々な機能性を発揮することが期待されている。我々は、ゼオライト単結晶内にアセチレン、アニリン、フラン等の重合物を複合化した。これらの重合物は、ゼオライト細孔内で、様々な分子量の重合物を形成していると考えられる。本研究では、ゼオライト細孔内に複合化した重合物の構造解析を試みる。X線による単結晶構造解析では、重合物のような、不明瞭な構造の解析は困難であると考えられる。しかし、中性子による構造解析では、水素の位置を特定するため、水素の位置を基に重合物の構造が解析できると考えられる。今後、ゼオライト結晶に限らず、細孔構造を有する巨大結晶における、有機物の位置の特定および構造決定が可能となれば、新規な機能性材料の開発に貢献できると考える。

## 2. 実験方法

### 2.1 測定用サンプルの作成

0.5mm～2mmサイズのゼオライト巨大結晶は、すでに合成済みである。このゼオライト巨大結晶の細孔内には、テトラプロピルアンモニウム水酸化物（TPAOH）がテンプレートとして内包されている。このTPAOHテンプレートを空气中700℃で分解して除去することにより、ゼオライト細孔細孔内を空虚にして、他の有機化合物を導入できるようにした。有機物として、ポリアセチレン、ポリアニリン、ポリチオフェン、ポリフランをゼオライト細孔内に内包した試料を作成し、単結晶X線構造解析および単結晶中性子構造解析用サンプルとした。単結晶X線構造解析には0.5mm角の結晶を、単結晶中性子構造解析には1.5mm角の結晶を使用した。

### 2.2 中性子線回折実験

単結晶中性子構造解析は、結晶に明らかな割れが入っておらず、内部のひびも少ないTPAOHが内包された1.5mm角の結晶（合成したままの状態）を選び、アルミニウムプレートの先端にエポキシ系接着剤で固定して測定した。この試料をJRR-3に設置された中性子回折装置BIX-3を用いて中性子線回折像（図2）を測定した結果、振動角1.0°の振動写真1枚につき30分の露光時間が必要と判断された。全データの測定に400枚程度が必要であり、マシンタイム（10日間）の関係から1試料のみ測定を行った。R因子は、16.4%であった。

## 3. 実験結果

単結晶X線構造解析の結果、ゼオライト巨大結晶は、a軸とb軸が入れ替わったドメインが混在する双晶であることが確認できた。格子定数は、 $a=19.986\text{\AA}$ 、 $b=19.977\text{\AA}$ 、 $c=13.378\text{\AA}$ であった。この構造解析結果をもとに、中性子線回折像データ解析を行った。その結果、ゼオライト細孔内のTPAカチオンのプロピル基が3種類の形態で存在していることが判明した。今までは、2種類の形態があることは知られていたが、3種類目の構造があることが判明したことにより、ゼオライト細孔内でのTPAカチオンの占有状況がより詳細になった。また、TPAカチオンの対イオンである水酸基と思われる酸素原子がゼオライト細孔内に認められた認められたが、水素の位置をはっきり決めることができなかった。この水素については、存在しないか、または、ある程度自由に運動しているため、位置決定ができなかった可能性があるが、水素の問題については今後の研究に期待したい。

## 4. まとめ

今回は、マシンタイムの関係上、1試料のみの測定であった。しかし、10日間の測定で1試料が測定できることが判明し、今後の有機物をゼオライト細孔内に内包したゼオライト巨大結晶の測定に十分に有効な手段であることが確認できた。今後、未測定の有機物を内包したゼオライト巨大結晶の構造解析を行ってゆく予定である。

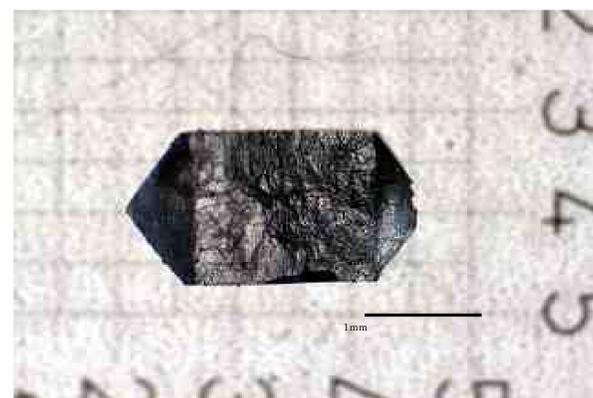


図1 ゼオライト巨大結晶

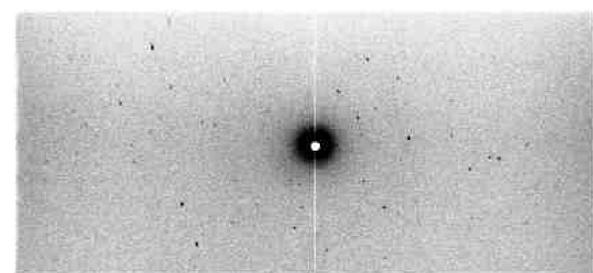


図2 ゼオライト巨大結晶の中性子線回折像（露光時間 30分）

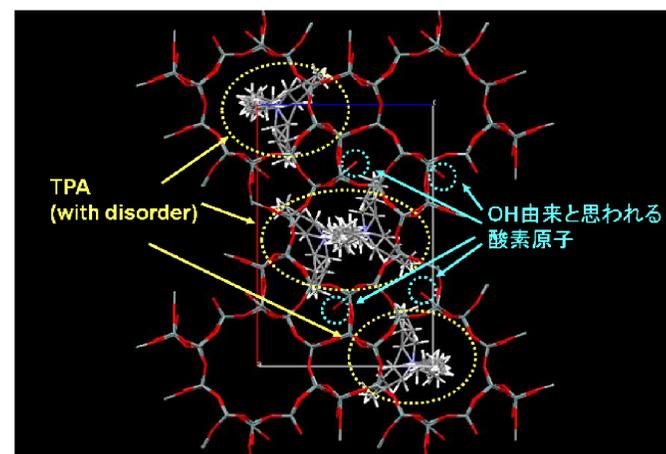


図3 ゼオライト細孔構造とTPAカチオンの配置についての解析結果

# 有機物内包ゼオライト単結晶の中性子構造解析

利用者 ○田島 政弘

所属 島根県産業技術センター

## 1. 概要

ゼオライト単結晶にポリチオフェンを複合化し、中性子単結晶解析により、ゼオライト細孔内のポリチオフェンの構造解析をおこなった。しかし、結晶内の歪みが大きい、ポリチオフェン含有量が1.5wt%と少ない等の問題があり、ゼオライト結晶細孔内のポリチオフェンの構造を確認することは困難であった。

## 2. 実験目的

島根県産業技術センターでは、数mmサイズのゼオライト巨大結晶（MFI型）（図1）の製造に成功している。ゼオライトは、1nm以下の微小細孔構造を有しており、細孔内に有機分子を複合化することによって、様々な機能性を発揮することが期待されている。我々は、ゼオライト単結晶内にチオフェンを吸着後、重合処理をおこなうことでポリチオフェン複合化ゼオライト結晶を作成した。ゼオライト細孔内のポリチオフェンは、様々な分子量の重合物を形成していると考えられる。

本研究では、ゼオライト細孔内に複合化したポリチオフェン化合物について中性子線による構造解析を試みた。

## 3. 実験方法

### 2.1 測定用サンプルの作成

0.5mm～3mmサイズのゼオライト巨大結晶は、水熱合成法で製造した[1]。このゼオライト巨大結晶の細孔内には、テトラプロピルアンモニウム水酸化物(TPAOH)がテンプレートとして内包されている。このTPAOHテンプレートを空气中700℃で分解して除去することにより、ゼオライト細孔内を空虚にして、他の有機化合物を導入できるようにした。

チオフェンモノマーをゼオライト細孔中に吸着し、細孔内部で重合処理をおこなうことにより、ポリチオフェンをゼオライト細孔内に内包した試料を作成した。ポリチオフェン含有量は1.5wt%であった。単結晶中性子構造解析用サンプルには長径3mmの結晶を使用した。

### 2.2 中性子線回折実験

単結晶中性子構造解析は、3mm角の結晶（ポリチオフェン複合化結晶）を選び、アルミニウムプレートの先端にエポキシ系接着剤で固定して測定した。この試料をJRR-3に設置された中性子回折装置BIX-3を用いて中性子線回折像（図2）を測定した。測定条件は、測定波長1.03Å，振動角1°，1枚につき10分の露光時間で367枚測定した。R因子は、24.4%であった。

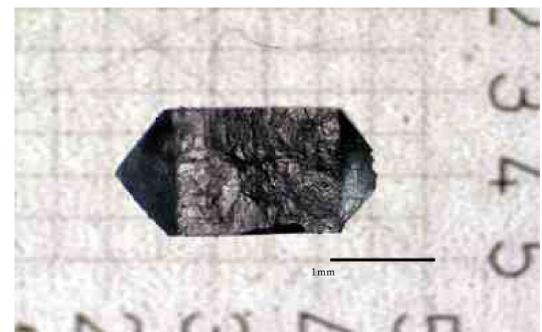


図1 ゼオライト巨大結晶

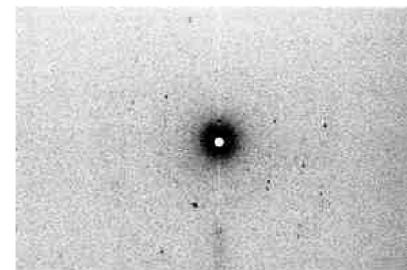


図2 ゼオライト巨大結晶の中性子線回折像

## 4. 研究成果

サンプルは、ゼオライト結晶中のTPAOHを除去後にポリチオフェンを複合化した。MFI型ゼオライト単結晶は、70℃～100℃付近で双晶から単晶に相転移する。そのため、TPAOH除去のための熱処理により、ゼオライト単結晶に相転移による歪みが生じ、部分的に結晶の破壊につながる。熱処理していないTPAOH含有単結晶の測定ではR因子が16.4%と良好であったが、本サンプルでは24.4%と結晶の歪みが大きいことがわかった。また、データ処理結果を表1に示すがR因子の値が全体的に悪く、さらに、I値が高角側で大きくなっており、通常と逆の結果となっている。これは、測定データまたはデータ処理に問題がある可能性がある。

以上の問題点により正確な構造解析は困難であった。そこで、現在までの解析データを基に電子密度状態を解析した結果、図3のようになった。横軸がa軸方向の直線的な細孔を示す。残念ながら、今回のサンプルでは、ポリチオフェン含有量が1.5wt%であり、ポリチオフェン濃度が小さいためにポリチオフェンの構造が確認できなかった。

## 5. 引用(参照)文献等

[1] Takeshi Kadono, Masahiro Tajima, Takanobu Shiomura, Naoto Imawaka, Shuji Noda, Takeshi Kubota, Yasuaki Okamoto, *Microporous and Mesoporous Materials*, 115 (2008) 454–460.

表1 データ処理結果

Shell limit	Lower Angstrom	Upper Angstrom	Average I	Average error	stat.	Norm. Chi <sup>2</sup> *	Linear R-fac	Square R-fac
80.00	1.72	1.72	331.9	48.6	47.2	1.109	0.214	0.190
	1.72	1.37	410.2	75.5	74.3	0.844	0.229	0.251
	1.37	1.20	545.3	100.2	98.8	0.838	0.219	0.246
	1.20	1.09	555.3	121.9	120.7	0.819	0.238	0.295
	1.09	1.01	512.2	140.9	139.9	0.815	0.254	0.330
	1.01	0.95	592.3	221.2	220.6	1.184	0.276	0.398
	0.95	0.90	619.7	232.3	231.7	1.190	0.285	0.436
	0.90	0.86	684.8	257.5	256.9	0.994	0.274	0.388
	0.86	0.83	709.5	275.9	275.2	1.145	0.299	0.421
	0.83	0.80	747.4	279.6	278.9	1.392	0.319	0.512
All reflections			545.9	157.1	156.0	0.931	0.244	0.313

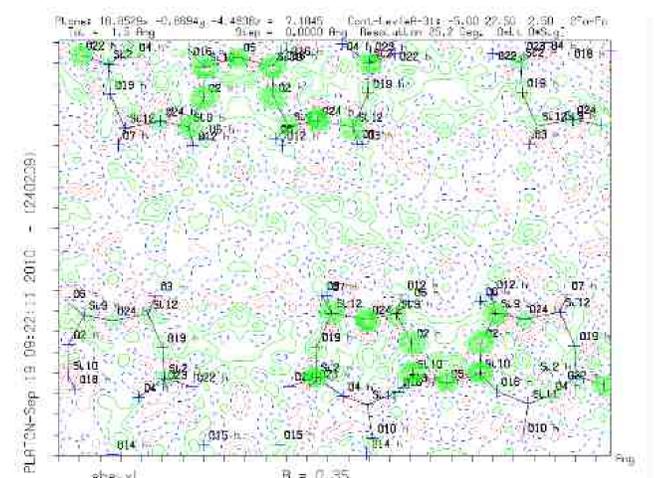


図3 電子密度解析図

# タンパク質における弱い相互作用のダイナミクス

利用者 ○今瀬 肇<sup>1</sup>、高妻孝光<sup>2</sup>、樋口貴之<sup>2</sup>、塩野菜穂子<sup>2</sup>、福島信宏<sup>3</sup>

所属 <sup>1</sup>茨城県企画部、<sup>2</sup>茨城大学、<sup>3</sup>サイエンス・テクノロジーシステムズ（株）

## 1. はじめに

生命現象を理解し、応用する上では、生体分子における弱い化学的相互作用の理解が重要である。弱い化学的相互作用、例えば、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用や、CH- $\pi$ 相互作用、カチオン- $\pi$ 相互作用がタンパク質の構造と機能において重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。しかし、その構造の特異性と機能や物性との相関について、モデル化合物からの知見と併せて、詳細に調べた例は散見される程度である。このような弱い化学的相互作用を系統的に調べ、タンパク質における弱い化学的相互作用の構造と機能との相関を明らかにし、生体分子の構造と機能を応用するための基礎的知見を集積するために、中性子非弾性散乱によるアプローチを試みた。

## 2. 実験方法

本実験においては、老化に関与すると考えられているヒト由来のスーパーオキシドジスムターゼ、ヘモグロビンおよび関連のアミノ酸を用いた。スーパーオキシドジスムターゼについては、粉末試料、重水に分散させた試料を用意した。ヘモグロビンについては、重水に分散させた試料を用いた。アミノ酸については、チロシン、フェニルアラニンについて検討を行った。中性子非弾性散乱の測定は、日本原子力機構で用意された標準的なバナジウム製測定用セル（図1）を用い、3軸型中性子非弾性散乱測定装置(LTAS)によって-0.5~4 meVの範囲を測定した（図2）。測定は、全て室温で行った。



図1 バナジウム製測定セル



図2. 3軸型中性子非弾性散乱装置(LTAS)

## 3. 実験結果

生体分子として、フェニルアラニン、チロシン、タンパク質としてヒト由来スーパーオキシドジスムターゼおよびヘモグロビンの粉末ならびに重水分散試料を用い、-0.5 ~ 4.0 meVの領域で中性子非弾性散乱の測定を行った。図3に示すように、粉末試料では、3.5 meV付近に、ピークが認められたが、スーパーオキシドジスムターゼあるいは、ヘモグロビンを重水に分散した試料では、明確なピークを得ることができなかった。

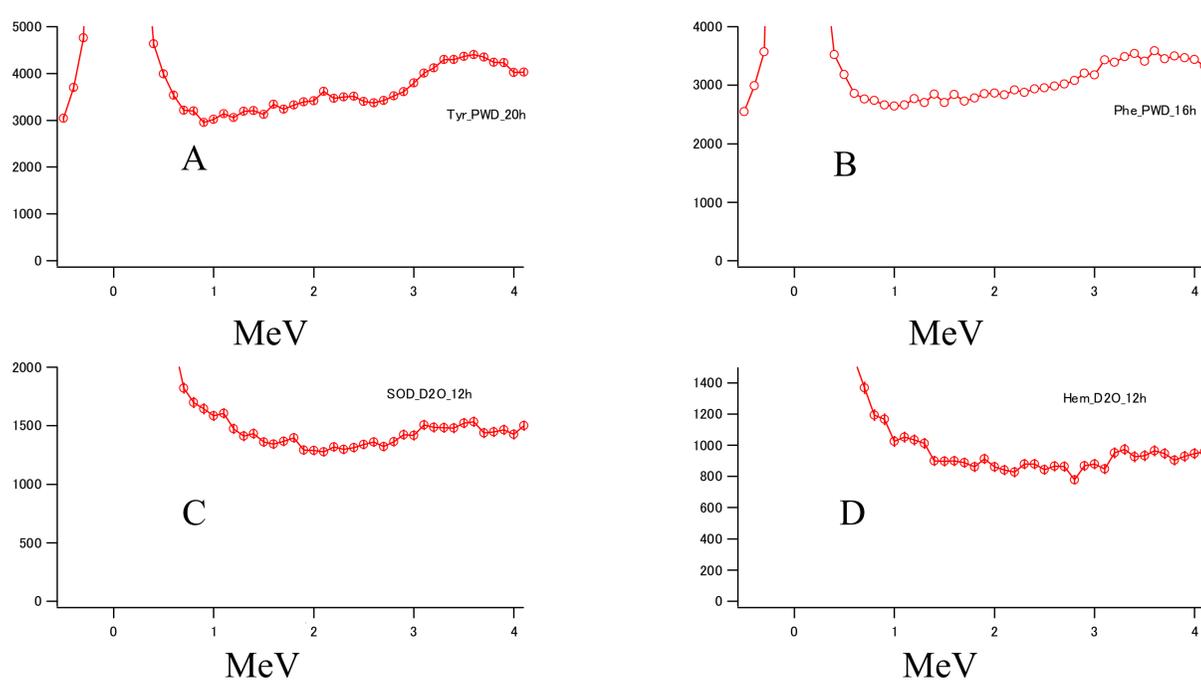


図3 生体分子の中性子非弾性散乱スペクトル。A. チロシン（粉末試料），積算時間20時間，B. フェニルアラニン（粉末試料），積算時間16時間，C. ヒト由来スーパーオキシドジスムターゼ（重水中に分散），積算時間12時間，D. ヘモグロビン（重水中に分散），積算時間12時間

## 4. まとめ

本トライアルユースにおいては、全ての測定を室温で行った。このため、巨大分子であるタンパク質の振動情報を得ることが困難であったが、分子全体の運動に起因すると考えられるスペクトルピークを得ることができた。このことは、生体分子の低振動領域でのダイナミクスを解析するためには、極低温下での測定が重要であることを強く示唆している。また、タンパク質のような生体分子の中性子非弾性散乱を計測するためには、専用のセルの開発も重要要素であることが判明した。現状でのJRR-3における中性子非弾性散乱実験では、粉末試料として数g程度を必要とし、タンパク質などの構造とダイナミクスの相関を調べるには、現実的でない。このため、J-PARC稼働時においては、タンパク質専用セルの開発がユーザーサイドでは重要な要因となる。