

第2回光・量子ビーム研究開発作業部会

大型量子ビーム施設による 生命科学構造研究の現状と将来

京都大学大学院理学研究科

三木邦夫

2012.3.28

大型量子ビーム施設での生命科学構造研究

タンパク質：ほとんどの生体内化学反応の担い手である
タンパク質の構造研究 「構造生物学」

タンパク質の結晶構造解析

- ・ X線（放射光）によるタンパク質の構造：7万を超える
- ・ 中性子回折によるタンパク質の結晶構造：49個

これまで：タンパク質の「かたち」の理解

これから：化学反応プロセスの解明

（タンパク質の細胞内での反応ダイナミクス・電子の振舞いを知る）
「水素原子」や「水分子」の挙動を知ることが重要
（水素や水の解析には「中性子」の利用が不可欠）

これまで希薄だった「放射光」と「中性子」の連携が重要

その連携によって、例えば、

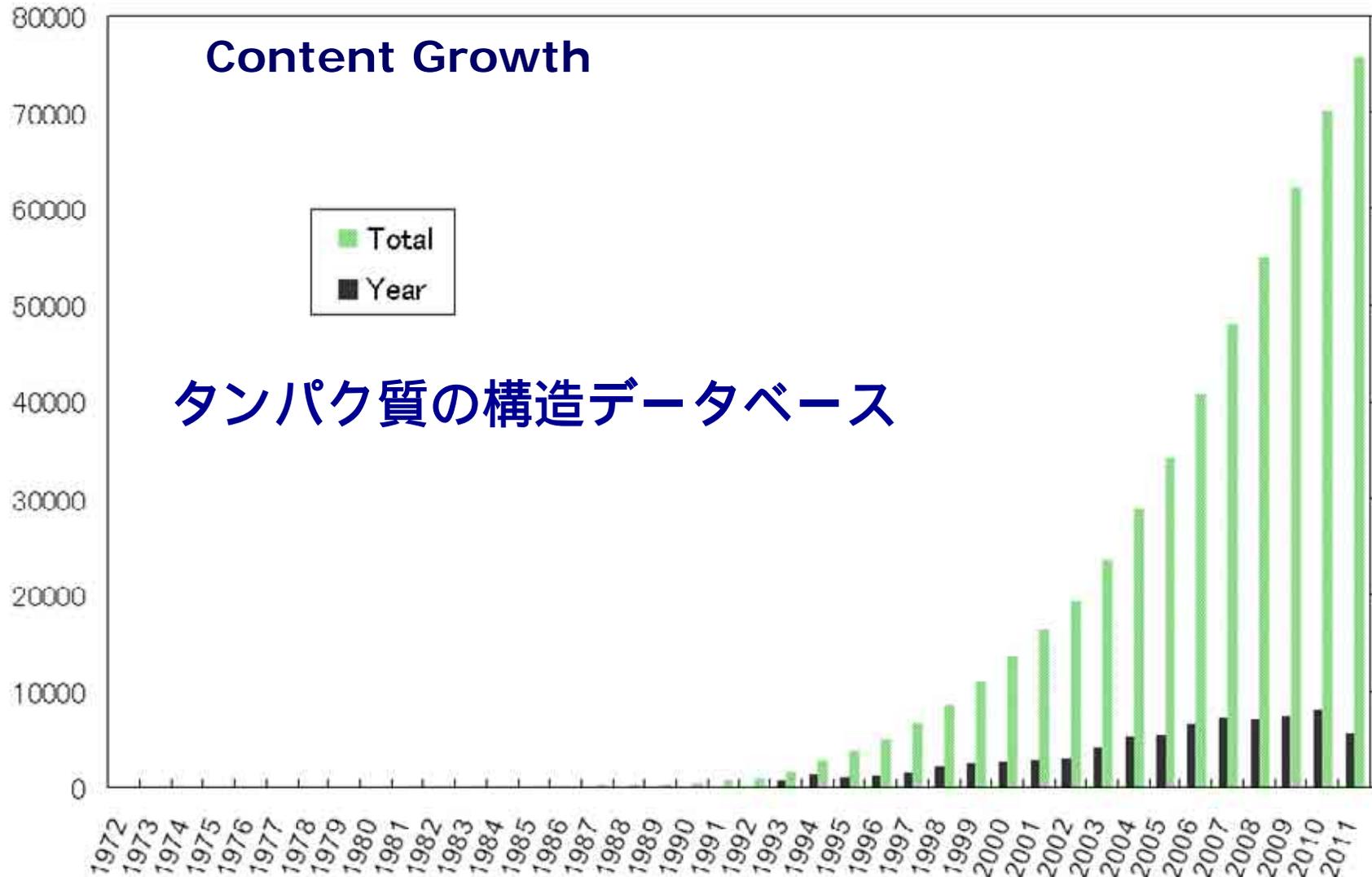
タンパク質への配位子の結合の分子論的理解 より精巧な創薬
光合成の水分解プロセスの化学的解明 人工光合成へのステップ

が可能になる

放射光によるタンパク質の構造研究の現状

Protein Data Bank (PDB)

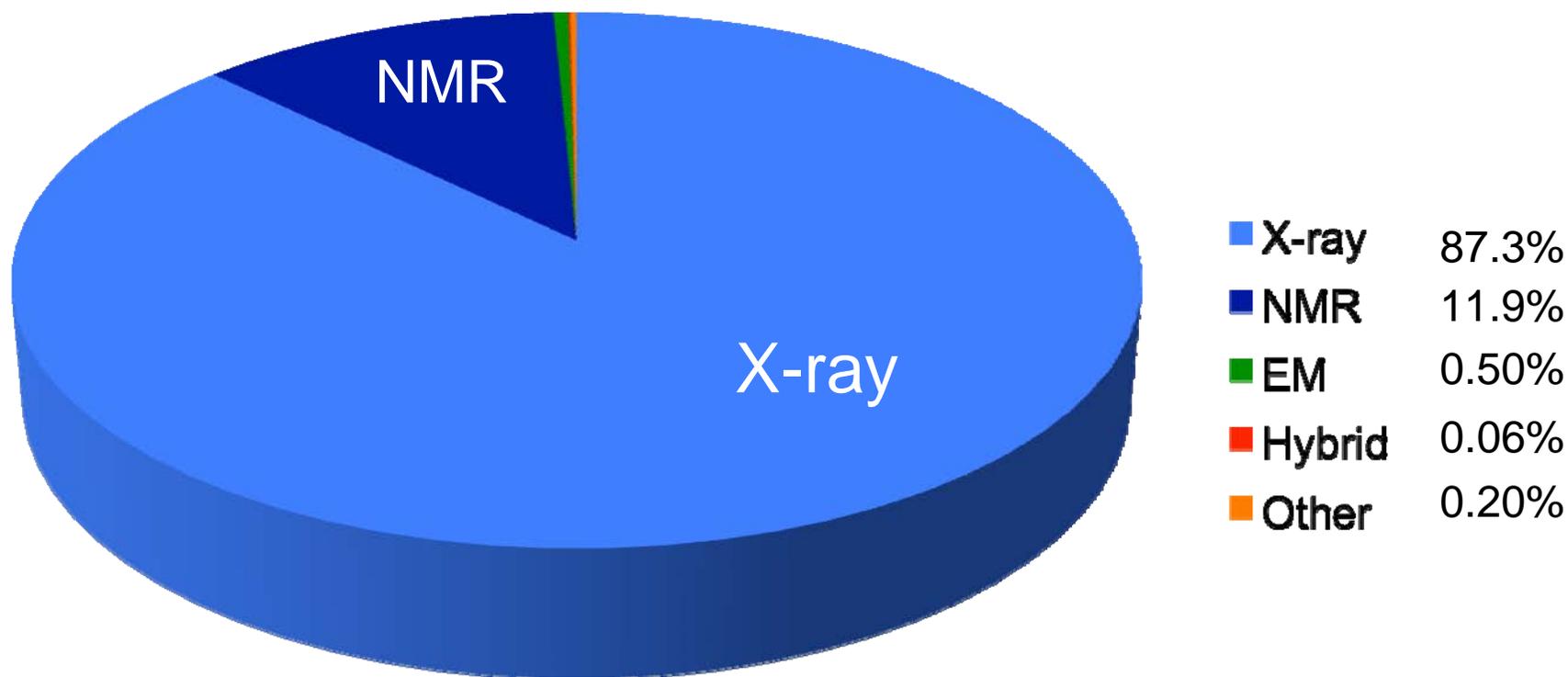
Database for 3D Structures of Biological Macromolecules



PDBに登録されたタンパク質の構造数は現在8万を超えている

PDBにおける構造決定の方法

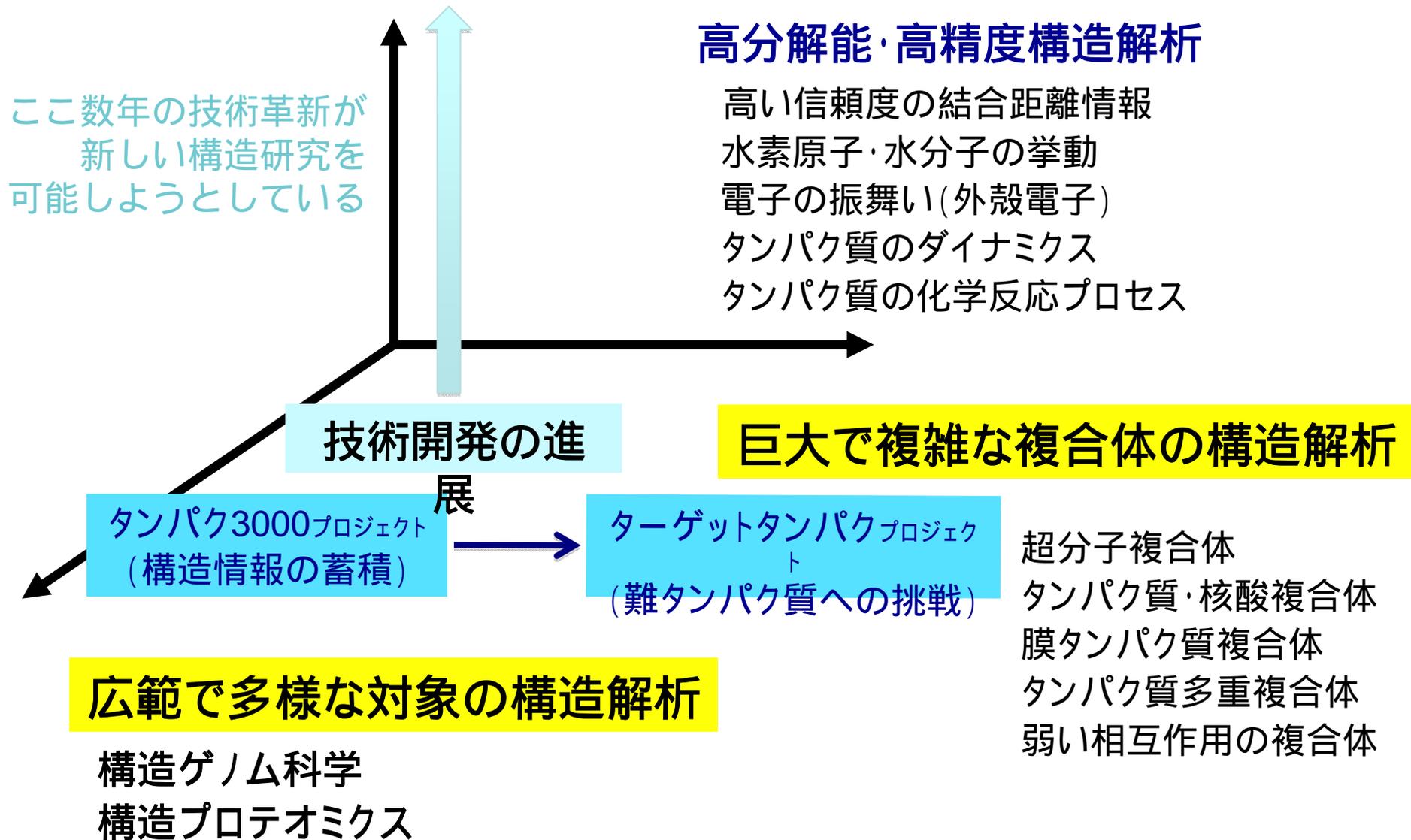
(Methods of PDB entries)



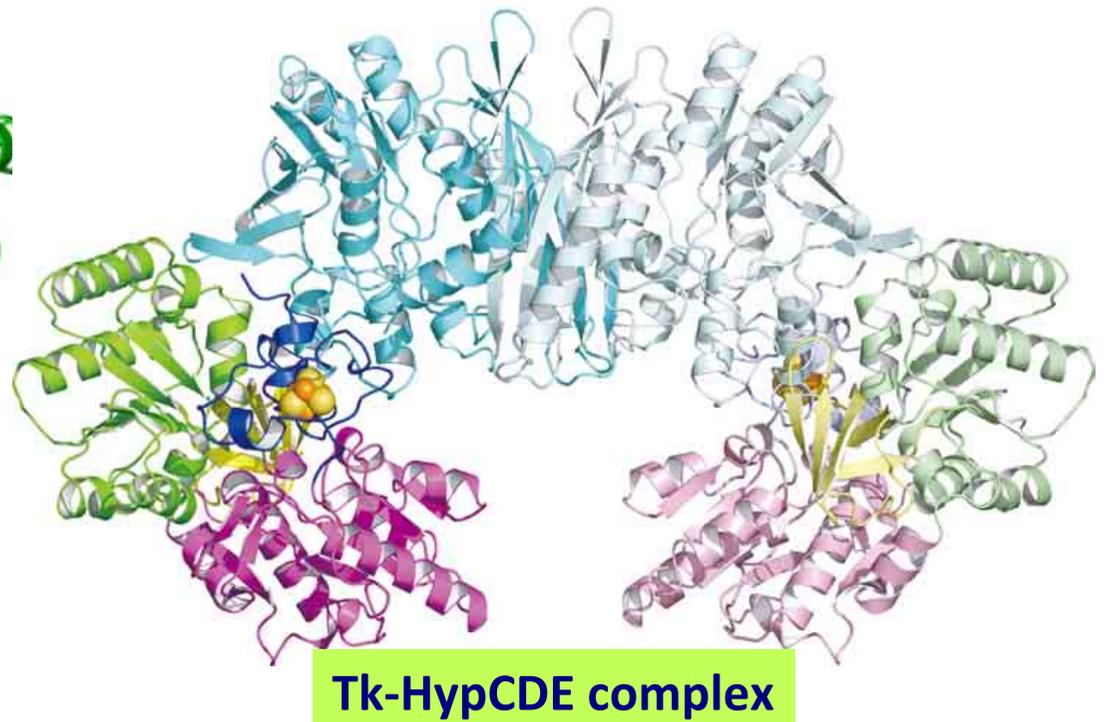
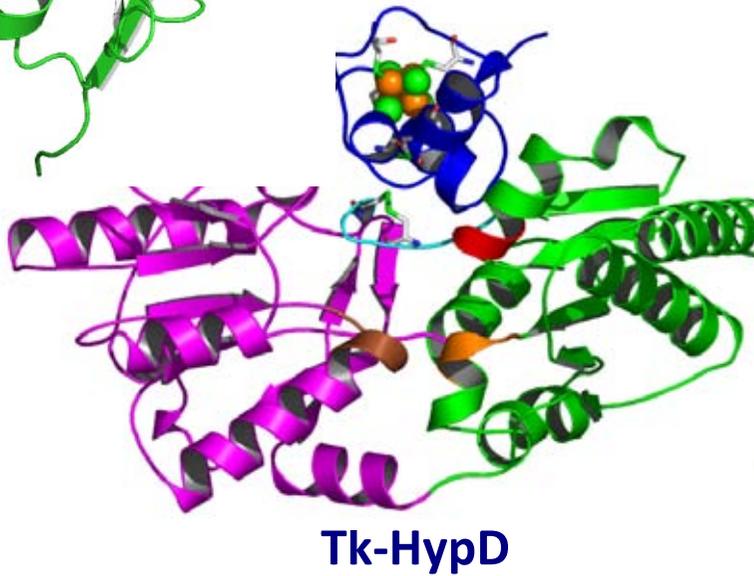
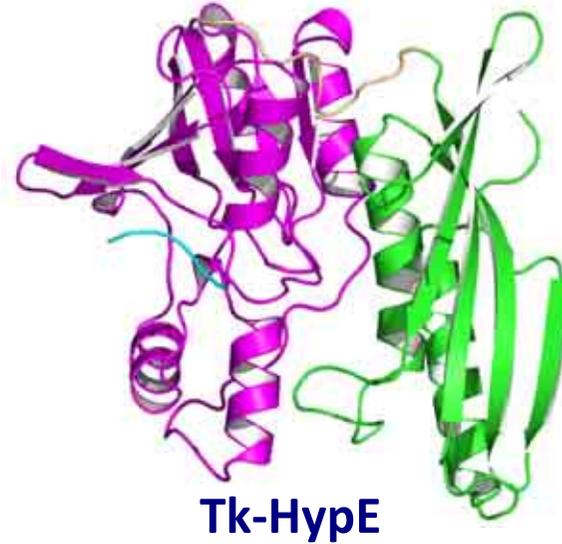
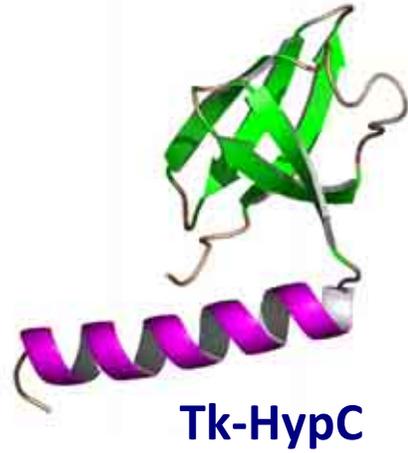
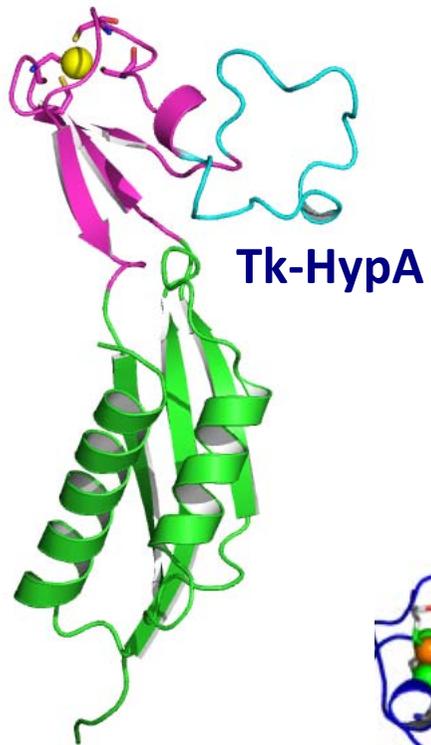
データベースの構造の87%以上がX線で決められている

タンパク質の構造研究の「これまで」と「これから」

含まれる情報を最大限に引き出す構造解析



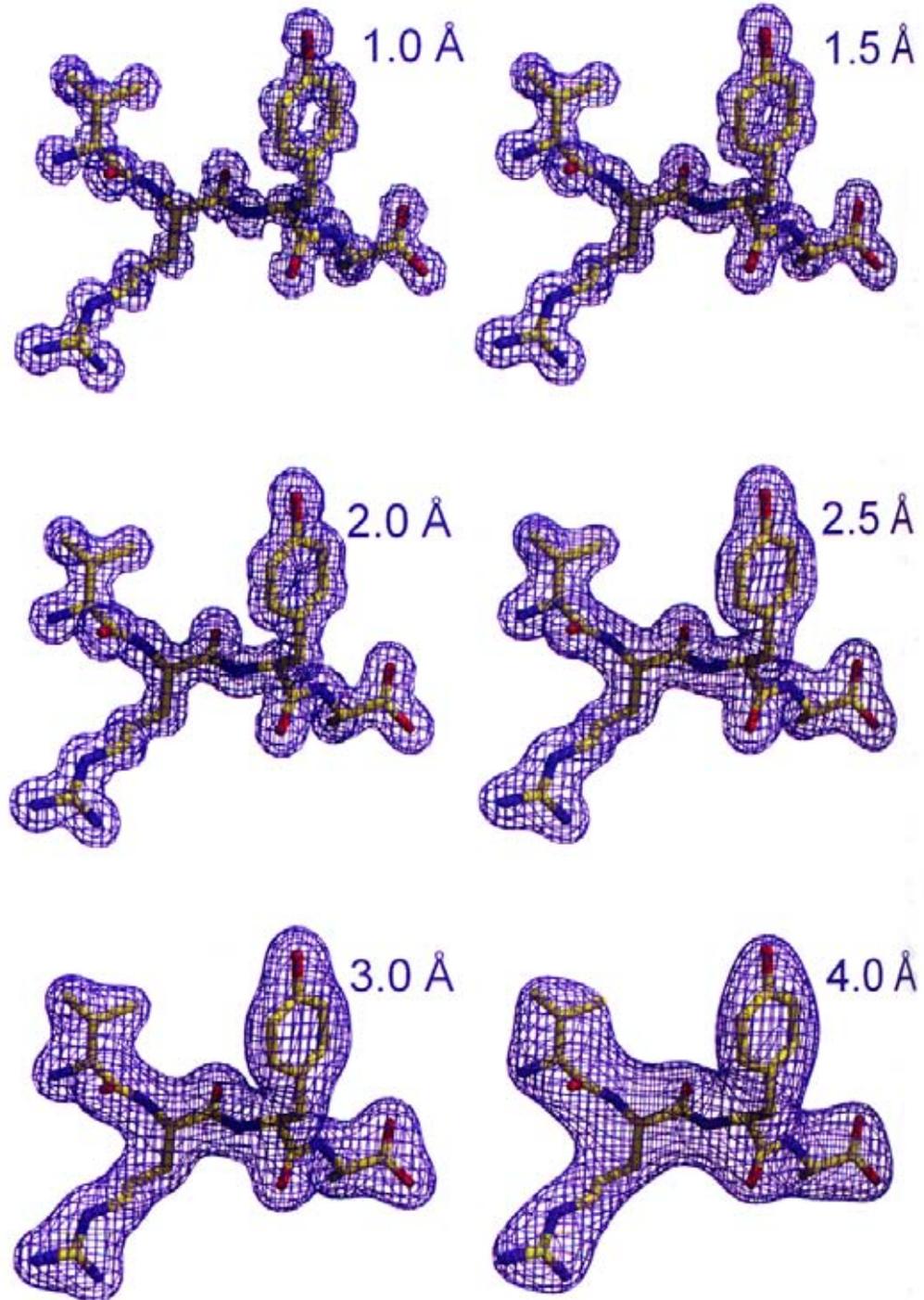
さまざまなタンパク質およびその複合体の結晶構造



分解能が向上すると
原子のすがたがどん
どんよく見えてくる

1Å分解能以下では
電子密度の集まりに
既存の化学構造情報
に基づくモデルを組
み込んで全タンパク
質構造を組み立てる

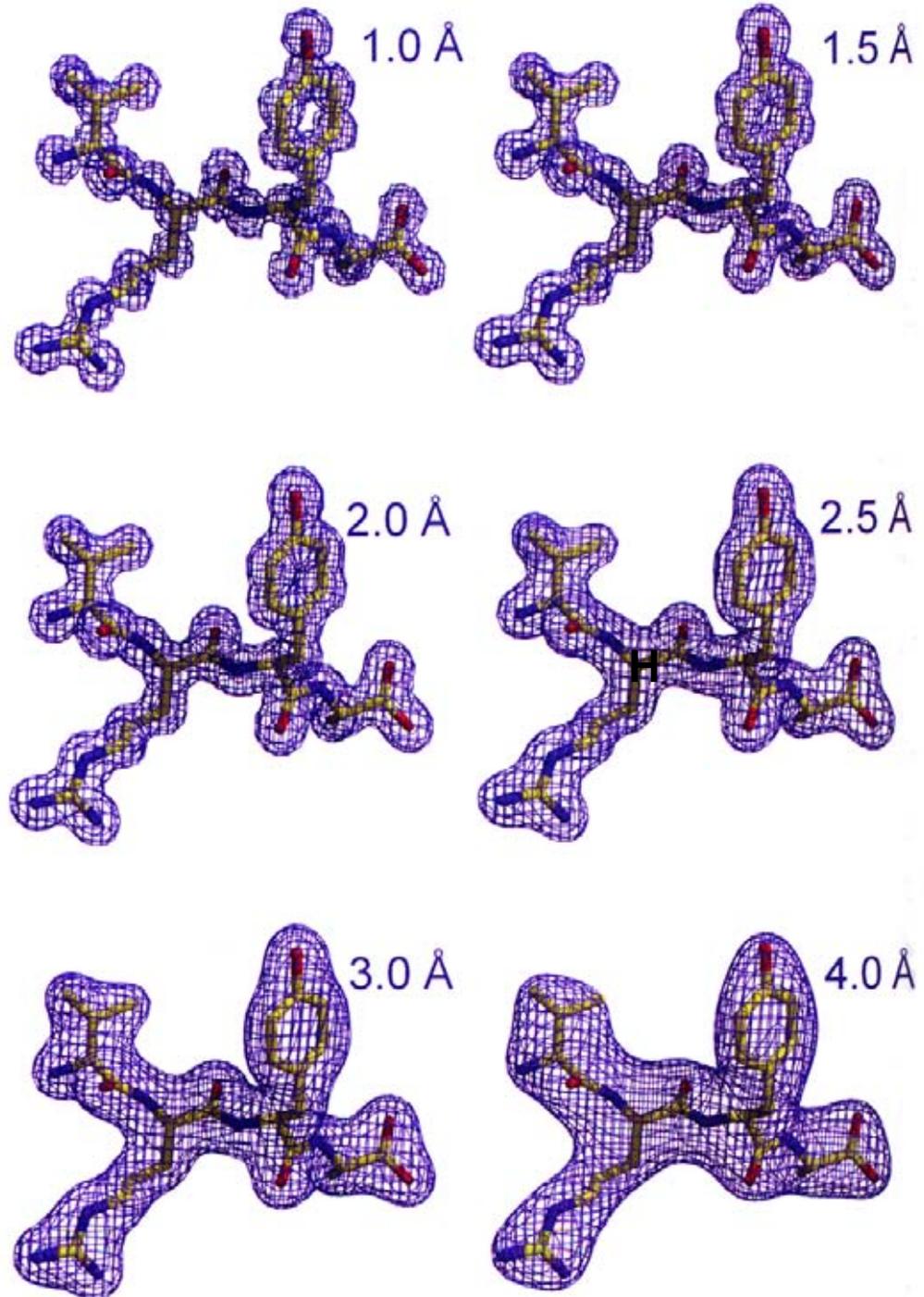
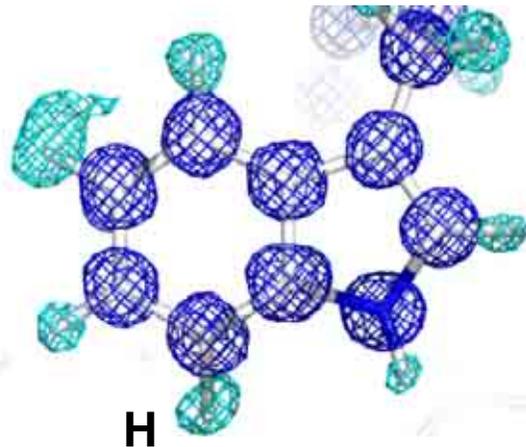
Bernhard Rupp,
"Biomolecular Crystallography"
Garland Science (2009)



分解能が向上すると
原子のすがたがどん
どんよく見えてくる

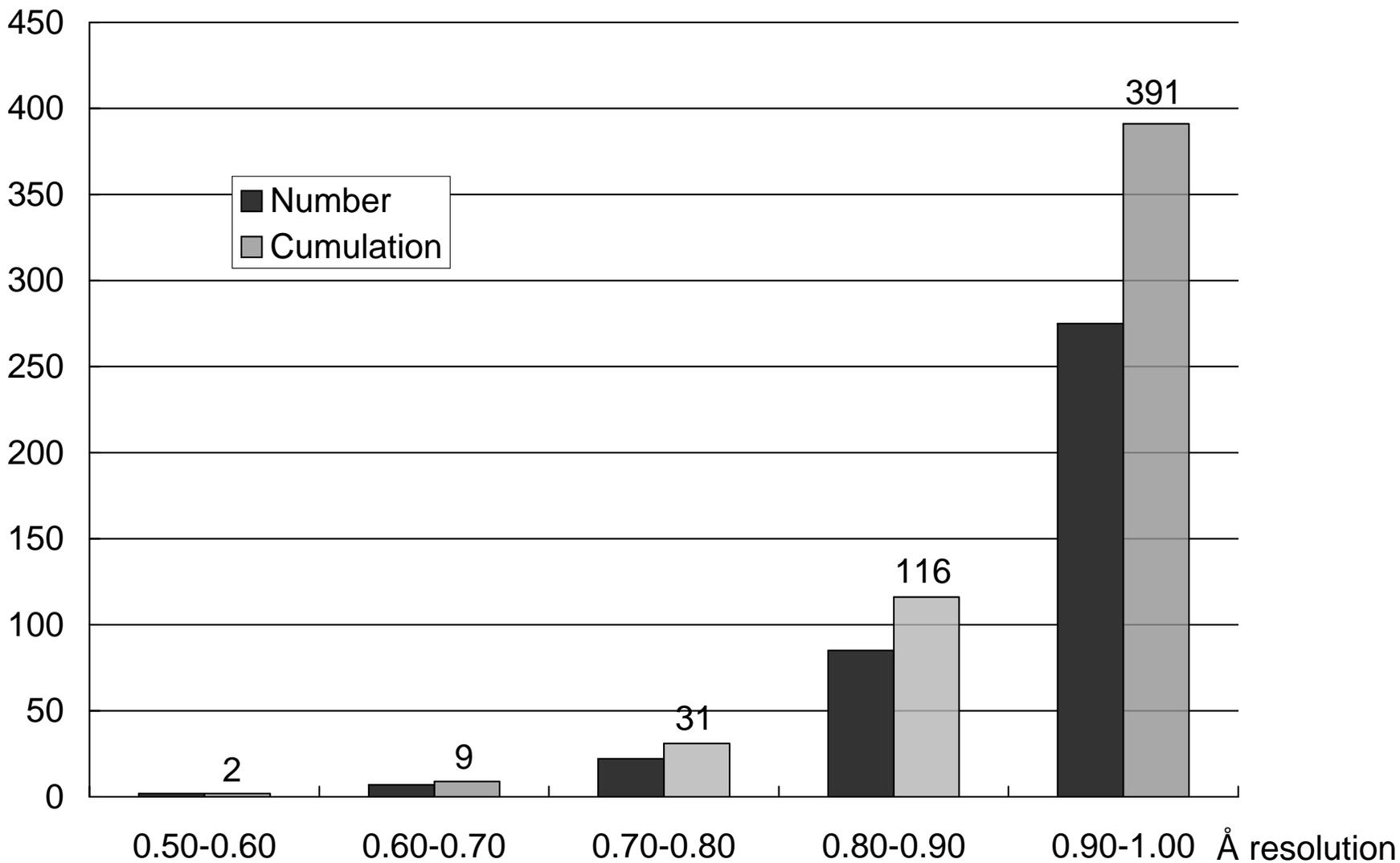
0.8 Å分解能以上

原子が完全に独立な電子密度で表される



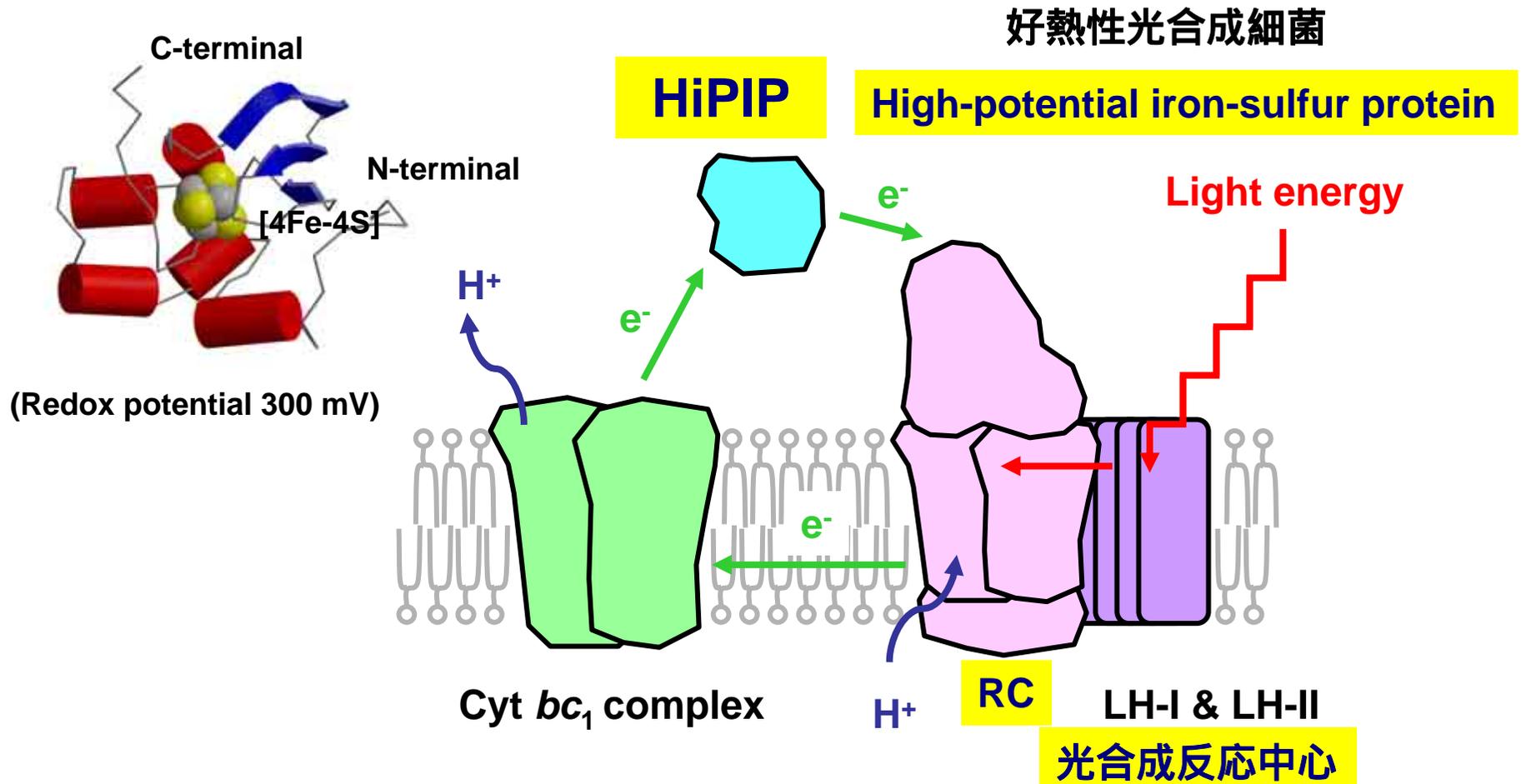
Bernhard Rupp,
"Biomolecular Crystallography"
Garland Science (2009)

Protein Data Bank (PDB)



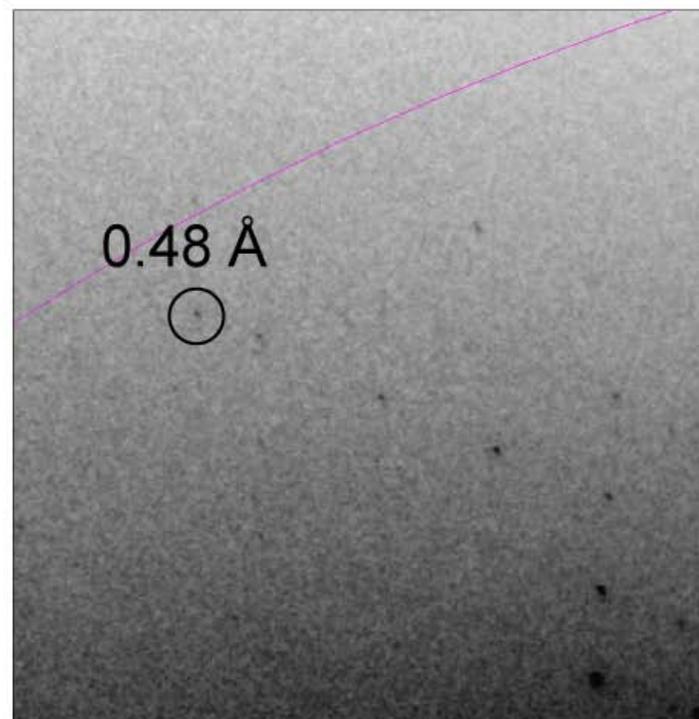
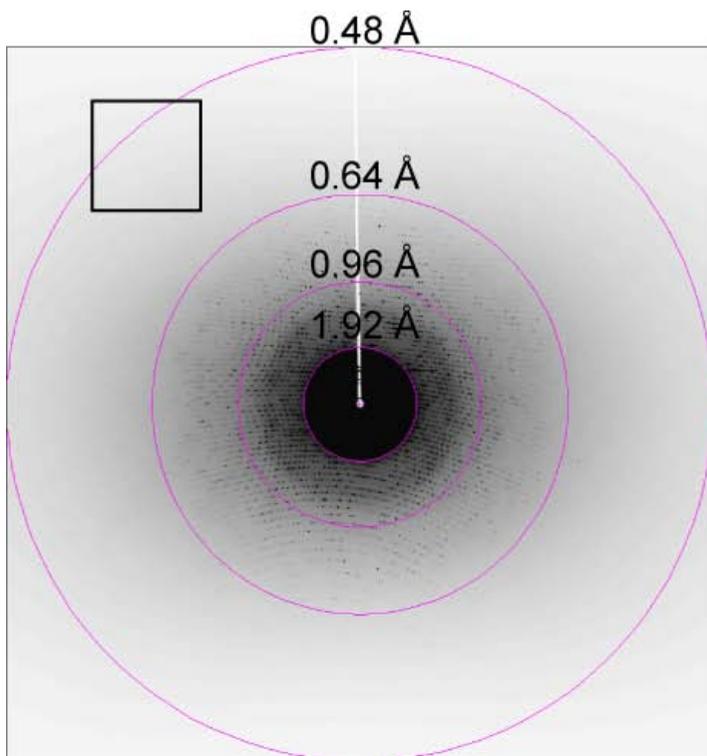
PDBで 1 Å 分解能を超える構造は400個に満たない (全体の0.7%)

光合成の電子伝達

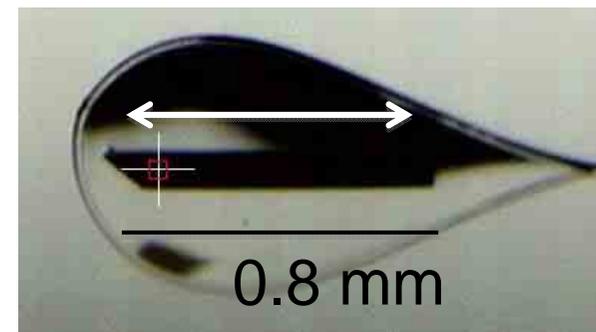


RC	@2.2 (BL-6A, PF)	T.Nogi <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 97,13561-13566 (2000).
HiPIP	@1.5 (BL-6A, PF)	T.Nogi <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 97,13561-13566 (2000).
	@0.8 (BL40B2)	L. Liu <i>et al.</i> , <i>Acta Crystallogr.</i> , D58, 1085-1091 (2002).
	@0.72 (BL41XU)	K. Takeda <i>et al.</i> , <i>J. Struct. Biol.</i> , 169, 135-144 (2011).

HiPIP の 0.48 Å 分解能の X 線回折データ 世界最高分解能

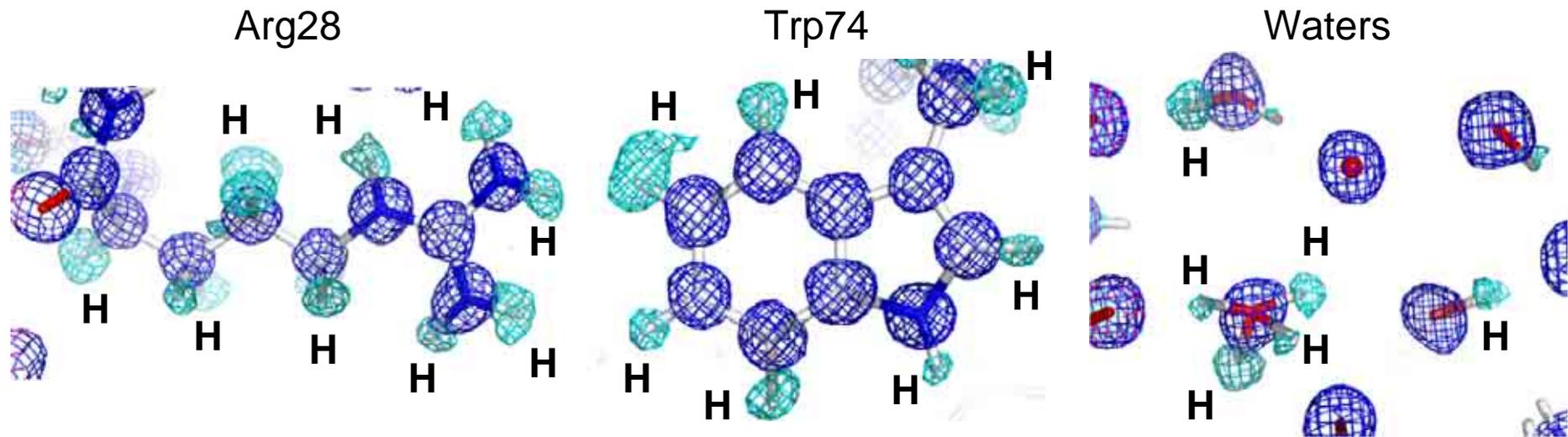


Beamline: BL41XU at SPring-8
Detector: MX225HE detector (Rayonix)
Wavelength: 0.40 Å (31 keV)
Temperature: 100 K (N₂) or 40 K (He)



Reduced form of HiPIP

超高分解能のX線結晶構造では水素も見える



Blue: $2F_o-F_c$ contour 1.5σ ($1.3 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$)

Light blue: F_o-F_c calculated by omitting hydrogen atoms
contour 3.0σ (Arg28, Trp74), 2.5σ (Waters)

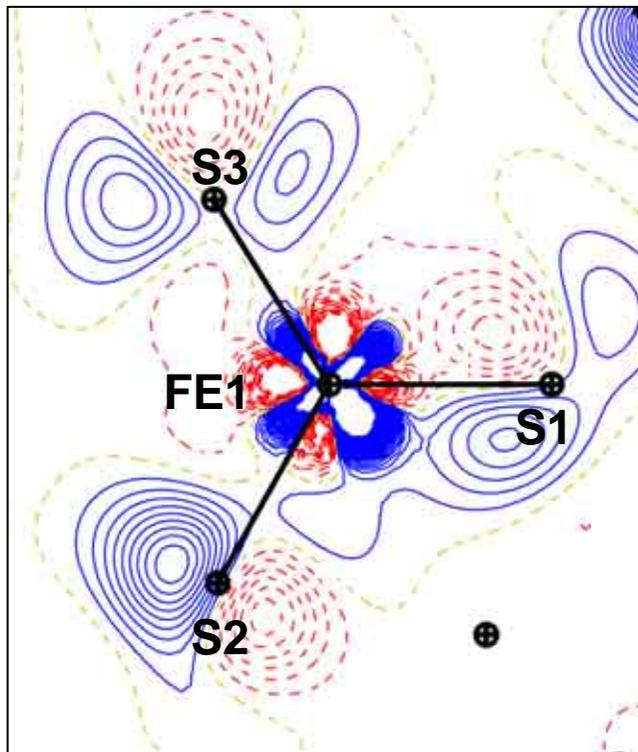


Trp74

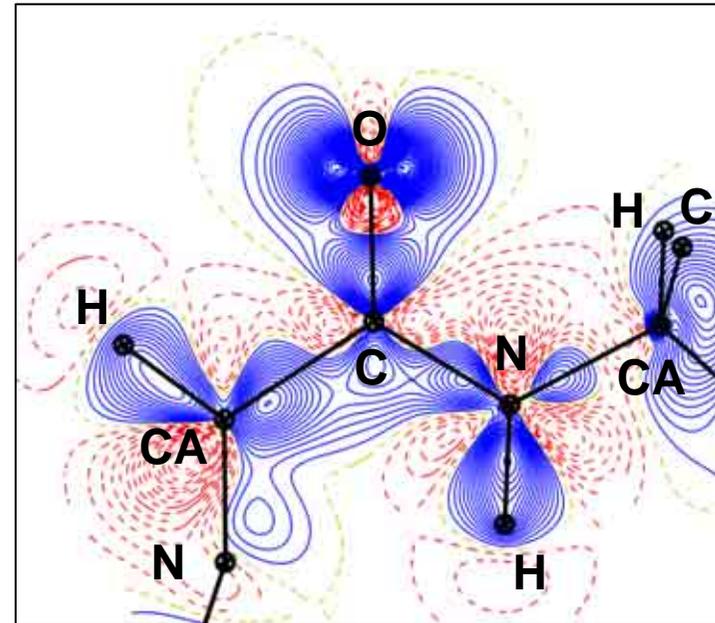
Blue: $2F_o-F_c$ contour 0.8σ ($0.7 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$)

超高分解能のX線結晶構造では
外殻電子（結合電子, d 電子）も
見える

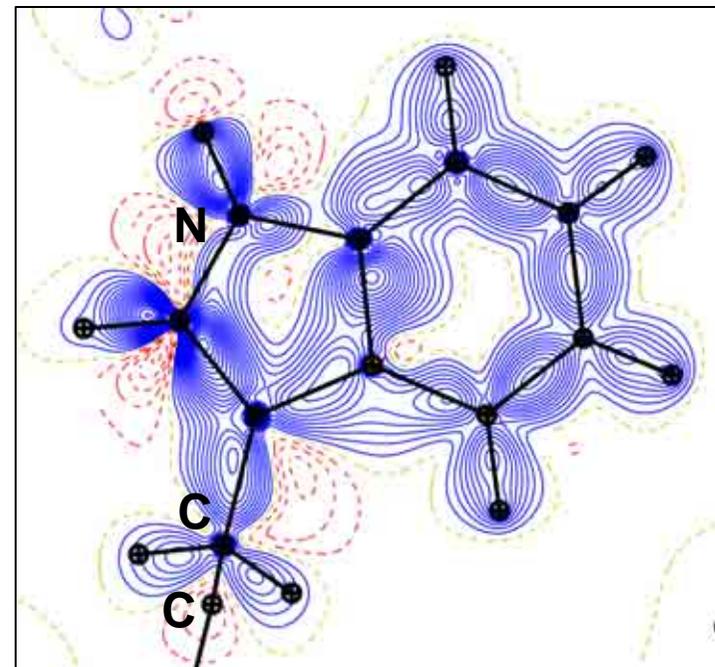
HiPIP



Fe and S atoms of the $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ cluster
(Contour interval $0.1 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$, blue +, red -)

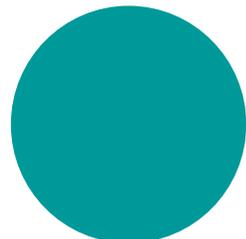
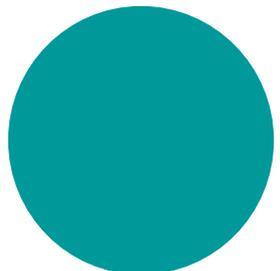


Pro12-Thr13 main chain



Trp74 side chain

中性子による各原子の観測の容易さ

	^1H	$^2\text{H}=\text{D}$	C	N	O	Na	S	Cl	
(相対比)	-0.3	1.0	(1)	2.0	0.75	0.28	0.17	3.6	
中性子									
原子散乱長 $\times 10^{-12}\text{cm}$	$(-0.37)^2$	$(+0.67)^2$	$(0.67)^2$	$(0.94)^2$	$(0.58)^2$	$(0.36)^2$	$(0.28)^2$	$(1.17)^2$	
(相対比)	0.03	0.03	(1)		1.4	1.8	3.7	7.1	8.
X線									
原子散乱因子	$(0.28)^2$	$(0.28)^2$	$(1.69)^2$	$(1.97)^2$	$(2.25)^2$	$(3.10)^2$	$(4.50)^2$	$(4.80)^2$	

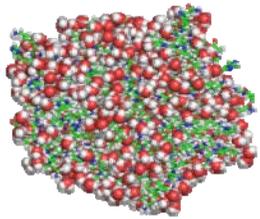
観測しやすさは電子数に依存する

中性子によるタンパク質の構造研究の現状

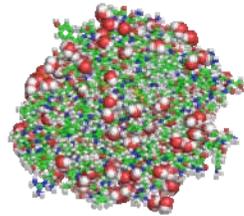
水素原子を決定することの重要性

原子力機構の中性子回折計によるタンパク質の水素原子を含む全原子構造

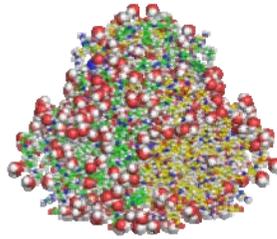
PDBに登録の49個のタンパク質のうち18個を決定(発表準備中4構造を含む)



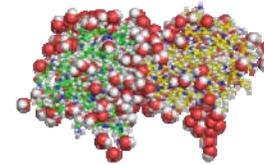
-lactamase TOHO-1
1.5Å



Porcine pancreatic
elastase (pD7.0)
1.9Å



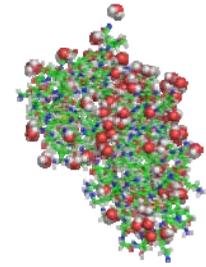
ADP-ribose pyrophosphatase
2.1Å



Anti freeze protein
(nfeAFP6, H₂O)
2.4Å



Trypsin + BPTI
2.15Å, 3OJT



Ribonuclease A
1.7Å, 3A1R

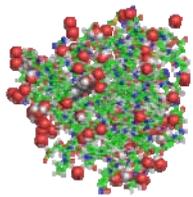
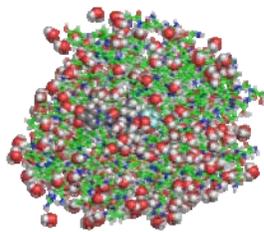
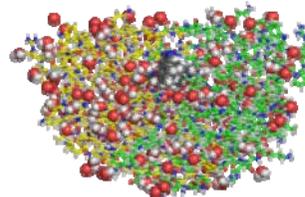


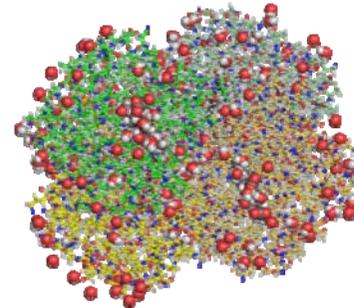
Photo active
yellow protein
1.5Å, 2ZOI



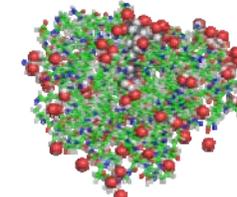
Porcine pancreatic
elastase + Inhibitor
(pD5.5)
1.65Å, 3HGN



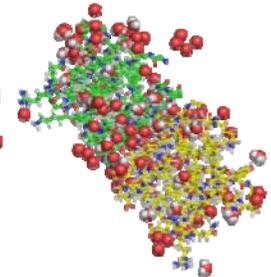
HIV-1 protease + Inhibitor
1.9Å, 2ZYE



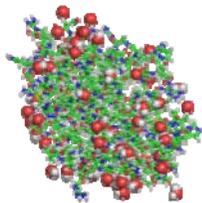
Deoxyhemoglobin
2.1Å, 2DXM



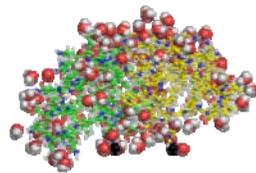
Metmyoglobin
1.5Å, 1L2K



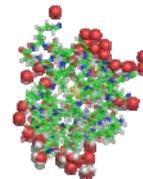
Dissimilatory sulfite
reductase D
2.4Å, 1WQ2



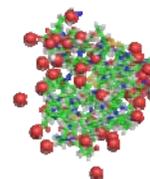
Human lysozyme
1.8Å, 2ZWB



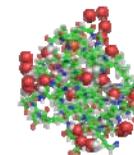
2Zn insulin
2.1Å, 3FHP



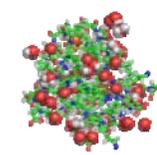
Cubic insulin
(pD6.6)
2.7Å, 2EFA



Cubic insulin
(pD9)
2.5Å, 2ZPP



Rubredoxin
(Wild)
1.5Å, 1VCX



Rubredoxin
(Mutant)
1.6Å, 1IU6

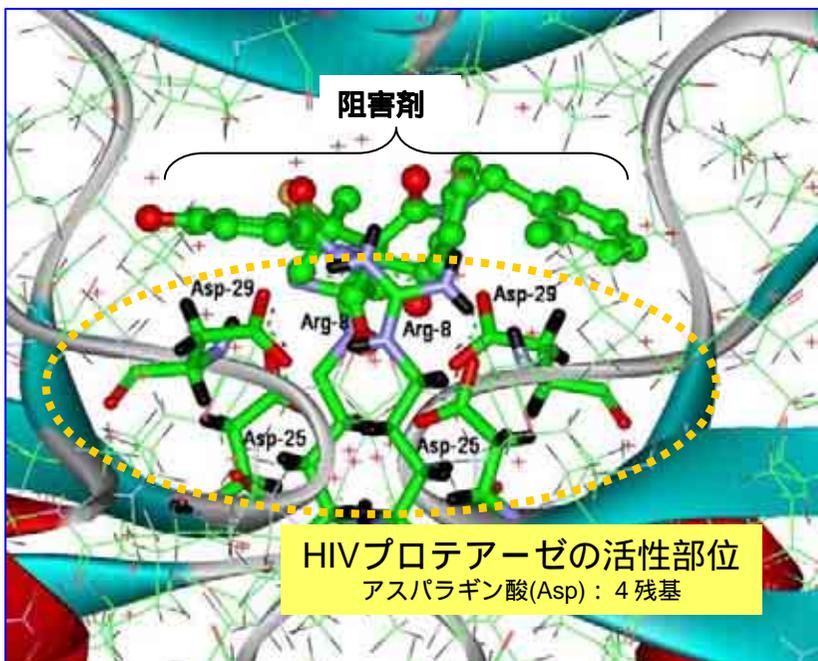
タンパク質の中性子構造解析でわかること

触媒基の解離状態がわかる

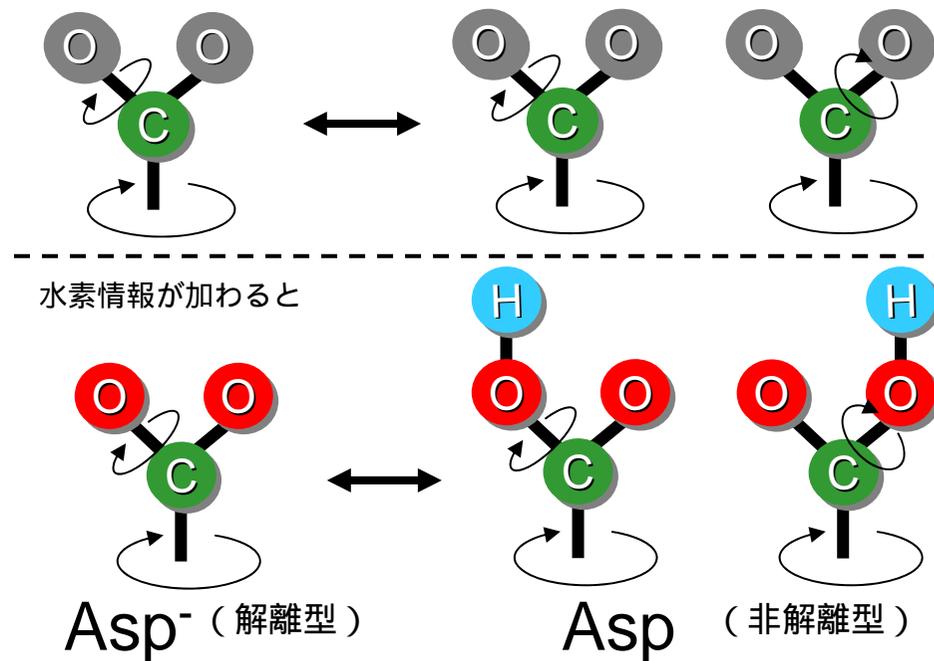
酵素の活性発現に重要な場所 (活性部位解離状態)

酵素	基質結合部位に存在する解離基
ニワトリ卵白リゾチーム	3, Asp(2), Glu(1)
HIV-プロテアーゼ	6, Asp(4)
インフルエンザノイラミニダーゼ	9, Asp(1), Glu(4)

医薬品 = 酵素阻害剤の設計においては、解離基のコンホメーションと解離状態が重要な情報となる。ドラッグデザインでは通常、解離型で処理されている

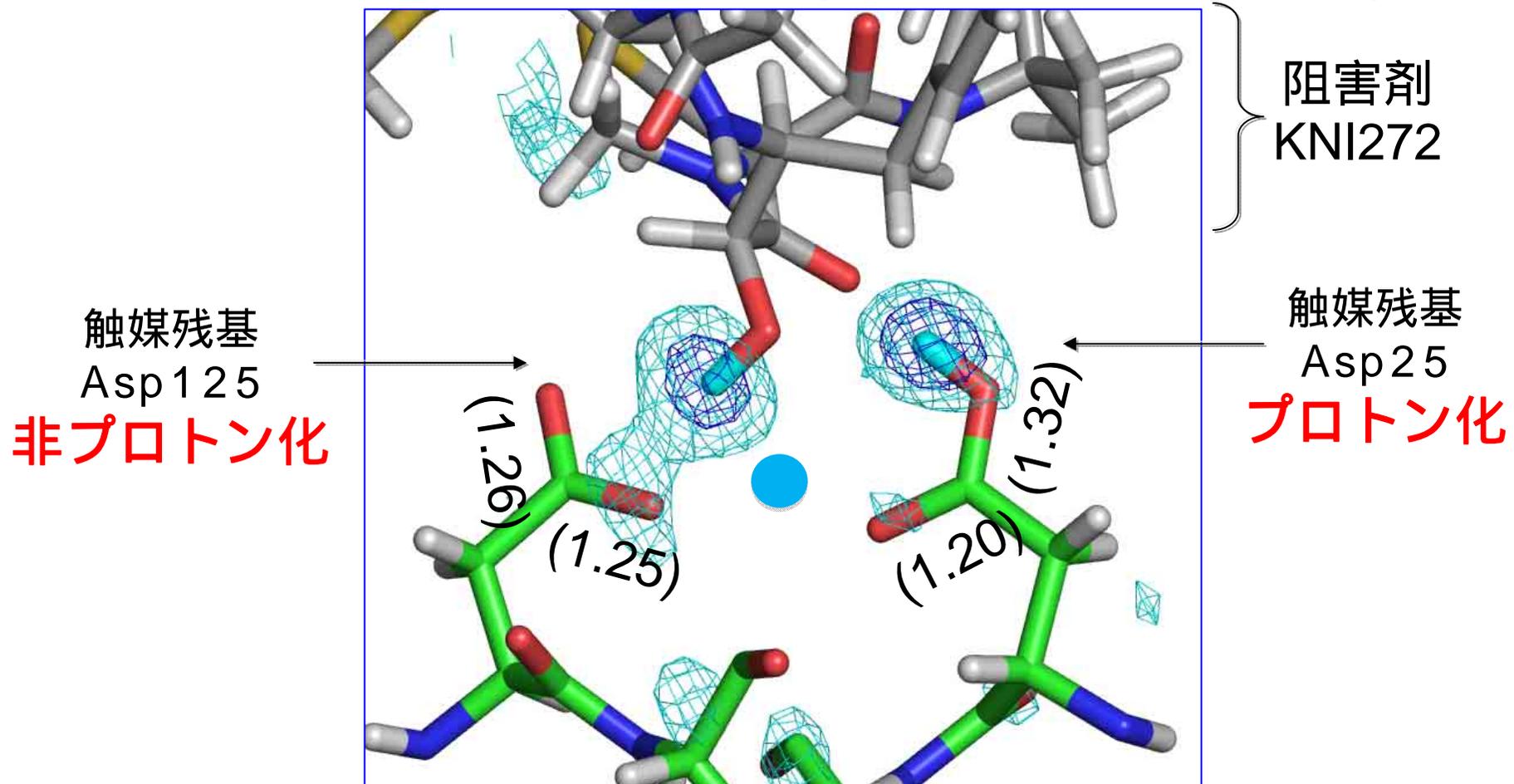


例) 解離性アミノ酸(Asp)側鎖のコンホメーションと水素位置



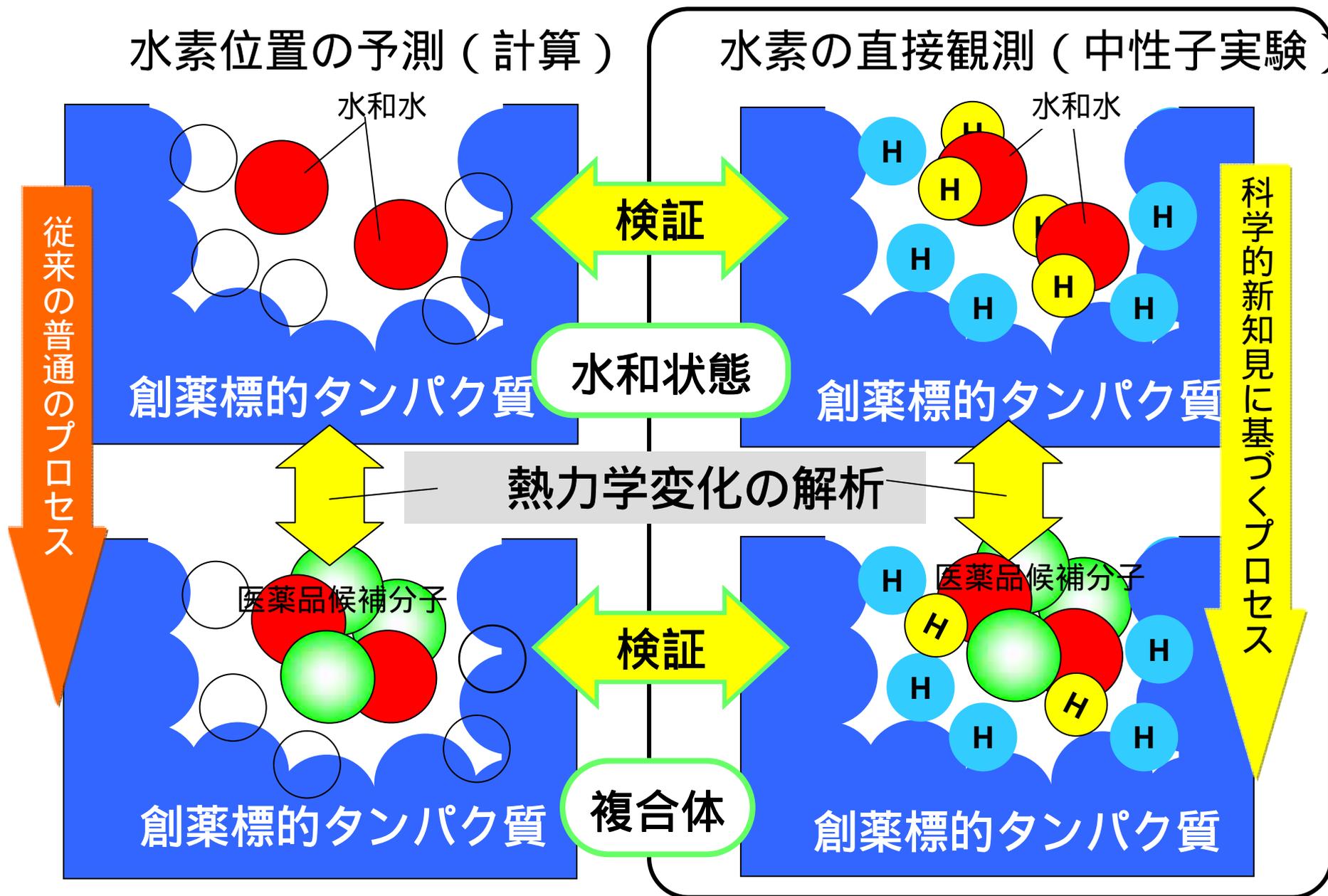
HIV-プロテアーゼの触媒基の解離状態

1.9Å 分解能の中性子構造解析 (0.93Å 分解能X線解析)

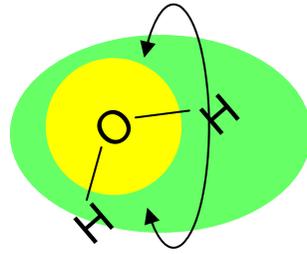
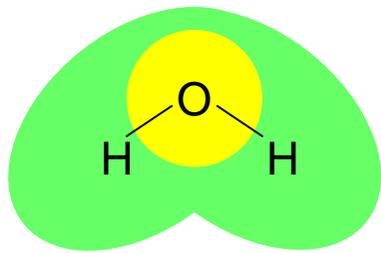


活性部位に存在する2つの水素原子位置を明確に観測でき、
触媒基の解離状態および役割についての知見を得た

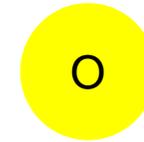
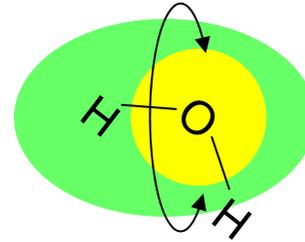
医薬品が結合する前後の水和状態を知る



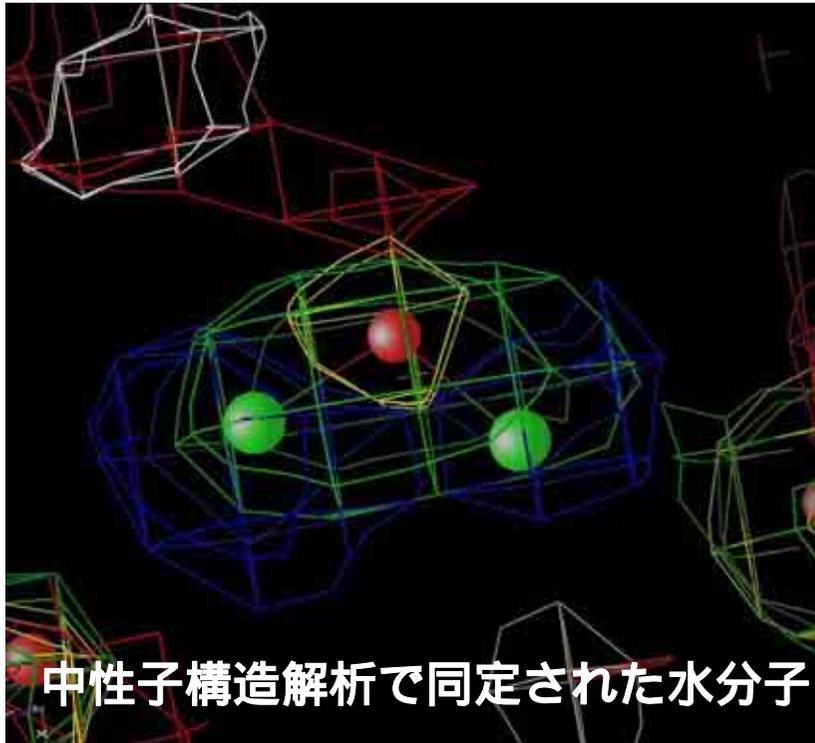
X線と中性子を相補的に利用し，水和水の特徴を把握



中性子で見た水



X線で見た酸素原子



中性子構造解析で同定された水分子

- ・X線で観測した酸素原子位置(黄色)
- ・中性子で観測した水素原子位置(緑色)

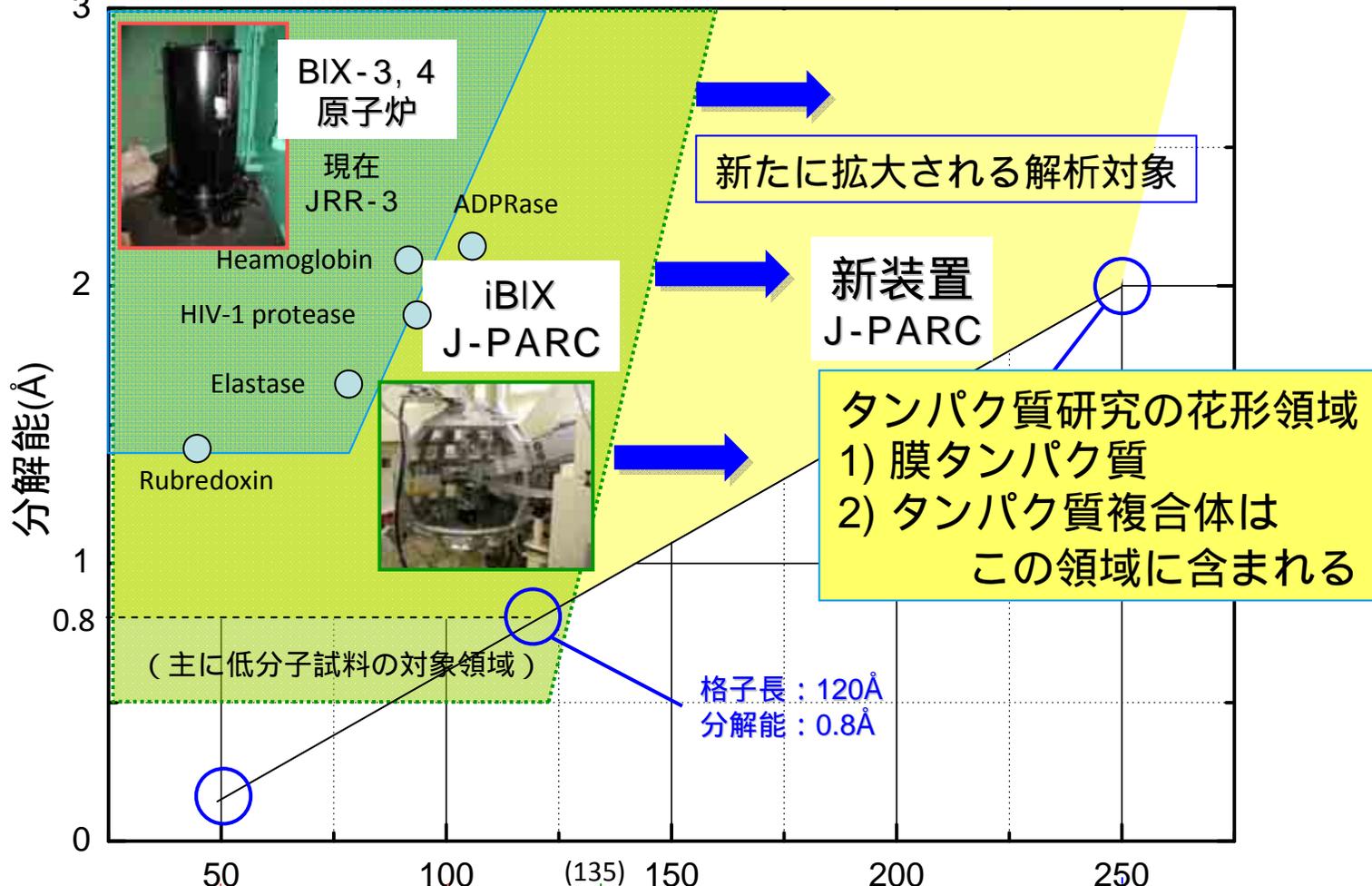
原子核密度(中性子)
- 電子密度(X線)
差分 = (紺色)



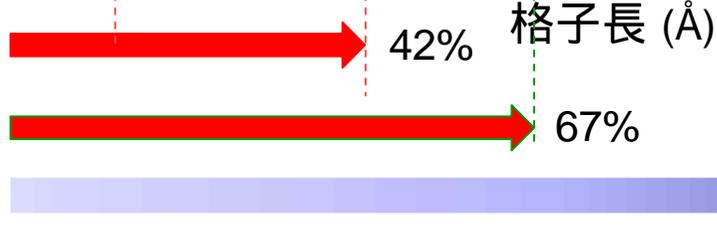
Neutron - X-ray

中性子回折計の種類と性能

L1, L2 距離を長くすることによって、解析対象領域を拡大する



構造既知タンパク質に対するカバー率

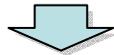


構造生物学コミュニティの強い要望

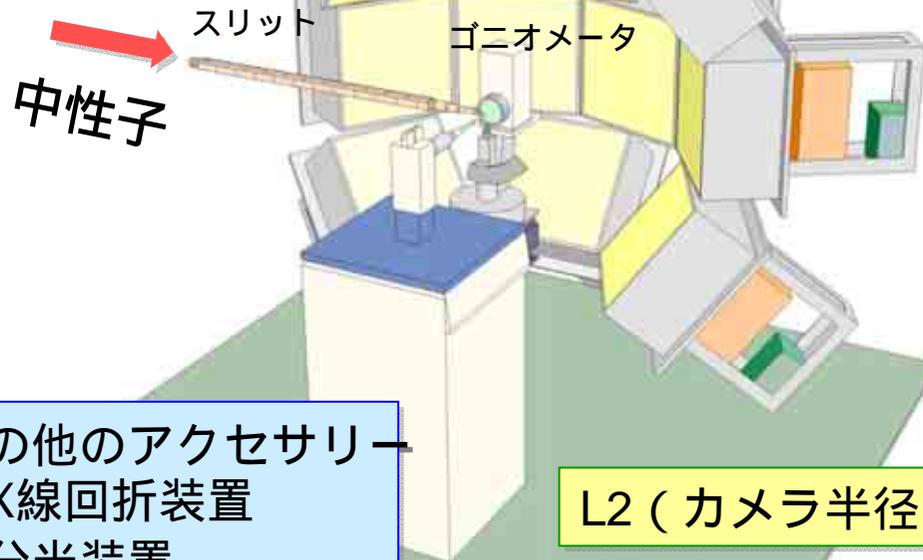
J-PARCに提案している回折装置の本体概念図

大面積検出器

有感面積 = 約500mm × 500mm
 (iBIX検出器面積の約16倍)
 検出器数 = 10台(以上)



立体角カバー率 = 約33%
 (iBIXの約1.5倍)



その他のアクセサリ

- ・ X線回折装置
- ・ 分光装置
- ・ 低温吹付装置

L2 (カメラ半径) = 800mm

* iBIX検出器: L2=490mm
 有感面積 = 133mm × 133mm
 検出器数 = 30台(2012年度予定)

	大型格子用	小型格子用
減速材	非結合型(パラ水素)	
減速材開口サイズ	50 × 50 mm ²	
減速材・試料間 (L1)	33.5 m	25 m
試料・検出器間 (L2)	0.80 m	
ガイド管	0-2Q _C スーパーミラー (曲管+直管)	4Q _C スーパーミラー bender
使用波長	1.4 - 5.2 Å	1.4 - 7.7 Å
d _{min}	0.8Å	
測定対象格子長	最大250 Å	最大120 Å
測定対象結晶サイズ	最小0.5 × 0.5 × 0.5 mm ³	
検出器	波長シフトファイバー型 シンチレーションカウンター (大型検出面)	
検出器位置分解能	1 mm × 1 mm	

高分解能・高精度構造解析

高精度の原子座標

高い信頼度の結合距離情報
原子振動・分子運動の評価
水素原子位置の実験的決定

電子密度解析(結合電子, d 電子)

タンパク質分子での化学結合
論

理論化学との連携

水素原子位置の決定: 中性子線(N)とX線(X)による構造解析

水素の検出能: 水素の原子散乱長(N) / 原子散乱因子(X)
水素原子位置の正確さ: 原子核の位置(N) / 電子密度の中心(X)

量子構造生物学の創成

高精度の構造情報から機能原理を直接導き, タンパク質科学の常識を再構築する

光・量子ビーム研究開発の今後

- ・ 光量子ビーム施設の今後に「施設の相補利用」は重要である
- ・ 「放射光と中性子を相補的に活用する」ことが、これまで議論されてきた
- ・ 現実には、具体的にどのようなターゲットをテーマとするべきか、とくに利用の立場からの議論があまり活発でなかった
- ・ 生命科学（タンパク質構造解析）の分野に限っては、相補利用はあまり進んでいないと思われる
- ・ 施設の技術開発は、この分野の要求に応えられていない
- ・ 昨今の技術等の進歩などから、タンパク質構造解析における「相補利用」として、利用者の立場から新たな側面が提唱されている
- ・ このような新たな取り組みを着実に行うことで「施設の相補利用」が進む