

「生体分子中におけるアミンの量子特性を解明する」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：尾瀬 農之

1. 研究のねらい

一般に、量子特有の現象を直接観測することは、低分子化学では可能であっても、複雑な原子間相互作用からなりたつ高分子では直接観測することは容易ではない。例えば、低分子では種々の分光法を用いエネルギー準位差に従った分裂スペクトルを観測して、量子トンネル効果を論じることができる。しかし同法を生体高分子に適用することは、分子量や安定性の観点から不可能である。本研究を開始するに当たり、水素原子の量子性に対して注目し、将来的に実験および計算の双方から効果的な多面的アプローチをおこなえることを考えた。身近な存在であるはずの生命現象を、量子力学の視点を持って解釈することは、最近になって認知されてきた。例として、光合成、地磁気感知、電子伝達系の蛋白質における量子効果に対する検証が進められている。本研究の研究対象としては、上記のような特殊事例ではなく、蛋白質中に一般に存在する水素原子に対し、量子的に捉えることを考えた。蛋白質を構成する原子の約半数は水素原子であるものの、通常の構造生物学で使用される X 線結晶構造解析やクライオ電顕単粒子解析法ではなかなか水素原子観測可能な分解能に到達しない。また、核磁気共鳴法を使用した場合も議論に必要な情報を取り出すことは困難を伴い、分子量の限界もある。そのため、水素原子の挙動を正確に追跡できる方法論として、理想的には中性子線結晶構造解析が挙げられる。中性子線を利用した構造解析の潜在的な利用価値は、古くから言われてきた。中性子線の回折は、空間的に点と見なせる原子核によりもたらされる。水素原子、重水素原子核の原子散乱長は、生体分子を構成する他の主要原子核(炭素、窒素、酸素)と比較しても遜色なく、結晶回折実験から計算された 2.0Å 程度(中程度)の核密度マップより容易に確認できる。

中性子構造解析を適用する上で最大の障害となるのが、求められる結晶のサイズである。回折強度の S/N 比を上げるためには 0.5mm³ 以上の結晶が必要とされる。これは立方体型の結晶の場合、一辺が 0.8mm もの大きさとなる。最近の X 線結晶回折実験では一辺 0.1mm 以下の結晶で十分な回折をもたらすことを考えると、中性子線回折に供するための結晶を作製するには特別な工夫をしなければならない。そこで、ここでは、より汎用的な中性子線回折用巨大結晶作製法を開発することを目的とした。

2. 研究成果

(1)概要

生体内におけるアミン水素を観測し、水素をプローブとして蛋白質内における反応を解析することを目標としてきた。そのため、まず、汎用的に蛋白質結晶を巨大化できる方法の開発に取り組んできた。具体的には、機能性ポリマーを溶液に混合し、結晶成長技術を確立する目処を立てられた。ポリマーの種類や、結晶化条件を組み合わせる上で、各タンパク質に応

じて最適な条件で結晶成長を試みるが、実際に全ての組み合わせを、結晶成長によって評価することは不可能である。そのため、各条件の溶液を作製して、個別に溶解度曲線を測定して最適条件を設定する方法を考案した。また、一辺 1mm 以上に成長した蛋白質結晶を、成長溶液から取り出して中性子回折測定用の石英キャピラリにマウントするステップは非常に難易度が高く、損傷を与えてしまうことが頻繁にあった。そこで、キャピラリ内に種結晶をセットし、キャピラリ内で結晶成長をおこなう方法を考案した。この方法では、キャピラリ中央にゲルで隔壁を設置し、カウンターデフュージョンにより結晶成長をおこなうものである。ゲルの種類や設置方法を工夫して、再現的に一辺 1mm 以上の結晶を作製できるようになった。

水素原子を観測して、生体分子内における量子特有の効果を考察するための対象を選択した。具体的には実際にアミノ窒素が蛋白質機能に重要な対象蛋白質に対して、結晶成長をおこなった。アミドトランスフェラーゼに関しては、再現的に基質存在下においてキャピラリ一内で長辺 1.8 mm 以上の結晶成長が可能となっている。アミドトランスフェラーゼの中性子線結晶構造は分解能 3.0 オングストロームであり、水とアンモニウムの違いを観測できている。脱アミノ化酵素はシッティングドロップ中において、基質有無のそれぞれ2種の結晶が、長辺 1.1 mm 以上に成長した。また、ウイルス由来プロテアーゼにおいても同様の方法によって、長辺 1.0 mm 以上に成長させることができた。このうち、アミドトランスフェラーゼは格子定数が一辺 183 オングストロームの軸があるため、完全なデータ収集をおこなえる中性子線回折施設が限定される。脱アミノ化酵素やプロテアーゼは、大強度陽子加速器施設 J-PARC において中性子線回折測定をおこなった。それぞれ分解能 4.2 オングストローム、4.6 オングストロームにおける回折点が観測できた。

(2) 詳細

研究テーマ A 中性子線結晶構造解析のための結晶巨大化方法の開発

「原子レベルでの理解が必要」という従来の「構造生物学」は、水素原子の量子性は殆ど対象にせず、非水素原子座標から古典力学を使用して生命現象を説明するものである。水素の量子性を論じる上では、まず蛋白質中の水素原子位置を正確に決定する必要がある。蛋白質の中性子線結晶解析は、これまで約 180 個しか報告されていない。その多くは、結果として水素原子を“可視化”しただけのものであるが、中には、低障壁水素結合など、量子特有の効果に踏み込んだ研究例も見られる。ここではアミンの量子性に注目し、中性子線解析によって実験的に捉えられる現象を用いて、量子効果を議論することを考えた。合成ポリマーの専門家との共同研究により、ポリマー特性と蛋白質結晶成長との相関を調べた研究を進めてきた。その結果、各結晶成長条件の候補と、ポリマーの候補を組み合わせ、相転移温度を分光光度計及び走査型熱量計により計測し、温度上昇時・温度下降時の臨界溶解温度測定が効果的であった。キャピラリ内結晶成長法は、以下研究テーマ 2(ア)で述べる。

研究テーマ B 水素を考察するための、中性子線結晶構造解析

上記 A で開発した「中性子線結晶構造解析のための、結晶巨大化法」を、(ア)アミドラン

スフェラーゼ、(イ)脱アミノ化酵素、(ウ)ウイルスプロテアーゼに適用した。

(ア)アミドトランスフェラーゼ

これまで分解能 3 オングストロームで活性部位に存在するアンモニアが観測できている。アンモニア水素の配向を論じるために、分解能を上げる必要がある。最大 182.5 オングストロームの格子定数を持つため、ミュンヘン工科大学研究用原子炉 FRM II で中性子回折測定をおこなった。キャピラリー内結晶成長方法は確立されている。

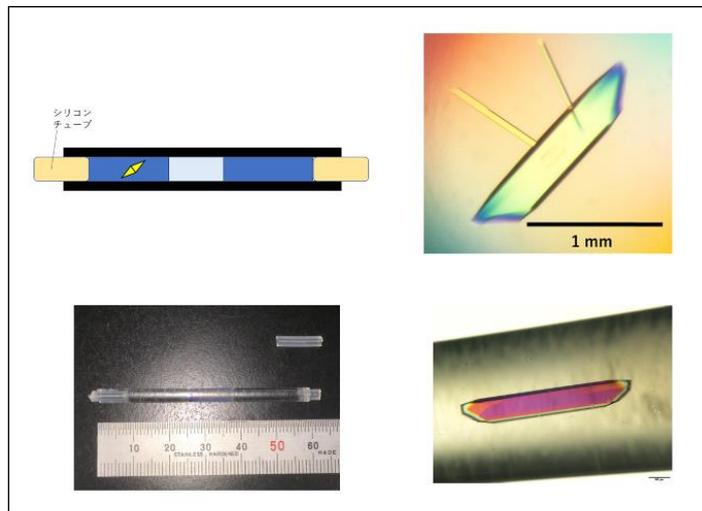


図 1 開発した LCST ポリマー利用結晶成長方法と、キャピラリー内結晶成長法を組み合わせることで巨大化したアミドトランスフェラーゼ結晶

(イ)脱アミノ化酵素

X線結晶構造は、生成物アンモニアが結合した状態を示している。中性子線結晶構造解析のためにポリマー法で同様に結晶成長を試みた。図3のように、基質無し、有り共に巨大結晶成長に成功することができた。

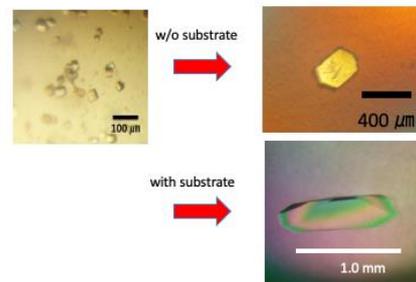


図2 開発したポリマー法によって成長させることのできた脱アミノ化

(ウ)ウイルスプロテアーゼ

pH 7.0 に活性極大を持つ理由や、触媒機構を説明するため、開発した結晶成長法を適用した。図3の通り、10日間程度で中性子回折実験適用なレベルまで、結晶成長をおこなうことができた。この結晶は J-PARC の iBIX 二より中性子線回折測定をおこない、4.6 オングストロームまでの回折データを得ている。また、ケトアミドの阻害剤(2種)との共有結合体の結晶も得られていることから、中性子マシンタイムが得られ次第、回折測定をおこなう。

図2 開発したポリマー法によって成長させることのできた脱アミノ化

3. 今後の展開

汎用的構造生物学の手法であるX線結晶解析、電子顕微鏡解析、NMR 分光法では通常、注目する水素の精密な位置情報を得ることは困難が伴う。水素原子の量子性を論じるためには、精度の高い水素位置実験情報と、量子計算による水素の挙動が一致することが求められる。コロナ禍および、ドイツ国内での燃料輸送の問題から、ミュンヘン工科大学実験用原子炉 FRM2 が稼働できない状態と重なり、本研究対象において 3.0 Å オングストロームでの中性子線結晶構造解析以後のデータ測定ができなかった。2023 年からユーザーへの中性子が提供予定の European

Spallation Source (ESS, Lund, Sweden)では利用できる強度が上昇する。また、日本の研究炉 JRR-3 も再稼働したため、ユーザーへの中性子ビームタイムが拡大される。そのため、本研究により開発した結晶成長法により、今後、難易度の高い蛋白質も解析対象となる。

4. 自己評価

「蛋白質全原子の半数程度を占める水素原子位置が重要」という主張から、水素位置を決定できる中性子線結晶解析の重要性が通常主張される。しかし、これまで中性子線結晶解析は以下の問題点①、②のため、社会要請が少なかった。

- ① 必要な結晶サイズがX線に比べて桁違いに大きく(1mm³程度)、容易に得られない。
- ② 単に水素原子位置の確認にとどまったものが大半である。

水素原子の量子性を論じられる可能性のある対象に対し、巨大結晶を作製できる方法を開発することは、中性子線結晶解析をおこなう意義を拡張する上で、新たな視点を導入できたと考える。これまで結晶巨大成長は、主にバッチ法によるところが大きかった。ここでは、機能性ポリマー法により巨大結晶化できる対象を広げることができた。また、キャピラリー内成長と組合せ、効率化をおこなうこともできた。実際に適応した3種の蛋白質はそれぞれ巨大化することができたが、ビームタイムとのタイミングの問題で中性子線結晶構造解析に至ったのは1つだけであるが、継続的に今後も進めていく。JRR-3 が稼働していた 2011 年まで、全世界で解析された中性子結晶構造のうち、日本発のものは約3割に達していた。JRR-3 は 2021 年に再び稼働され、J-PARC の iBIX と組み合わせて日本のプレゼンスがもう一度上がる土壌が整った。本研究で開発できた方法を進めることで、対象蛋白質を拡げ、中性子線結晶構造解析がもたらす意義を新たに提唱できた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 13件

1. Long Li, Motoyasu Adachi, Jian Yu, Koji Kato, Akira Shinoda, Andreas Ostermann, Tobias E. Schrader, Toyoyuki Ose, and Min Yao
Neutron crystallographic study of heterotrimeric glutamine amidotransferase CAB.
Acta Cryst. F76, 193–196 (2019)

我々の開発した、温度応答性ポリマーを使用した方法が蛋白質結晶大型化に有効であり、中性子線回折により初期解析をおこなった論文。原子が判別できる分解能に到達してはいないが、これまで中性子線により解析された蛋白質と比較して、飛躍的に分子量限界を上げられることがわかったため、本法の将来性を示すことができ、結晶成長が律速段階でないようにすることができた。

(2) 特許出願

準備中 1 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

中性子により生体分子中のアンモニアを可視化する試み

iBIX 将来構想検討会 2018年11月20日(東京)

尾瀬農之(招待講演)

アンモニア可視化は何をもたらすか?

量子生命科学会第1回大会 2019年5月23日(東京)

尾瀬農之(パネリスト)

中性子線結晶構造解析によるタンパク質中のアンモニアの解析

日本結晶学会2020年度大会(オンライン) 2020年11月27・28日(

横溝太一、李龍、梶江啓志、安達基泰、姚閔、尾瀬農之

生体分子中のアンモニアを可視化する試み

量子生命科学会第2回大会 2020年12月23・24日

尾瀬農之(招待講演)

中性子線結晶構造解析による、タンパク質内アンモニアの観測

生物物理学会北海道支部会 2021年3月8日

横溝 太一、梶江 啓志、李 龍、姚 閔、尾瀬 農之