

水素・水和構造を含めた新しい構造生物学の開拓

融合研究機関：農農業生物資源研究所

日本原子力研究所

研究総括責任者：新村 信雄（日本原子力研究所）

I 研究の全体計画

1. 研究の趣旨

タンパク質は3次元立体構造を構築して初めて機能を発揮する。構造生物学は精巧に秩序立てられた酵素反応、情報伝達、構造構築の機構を解明するのに大きく貢献してきた。これらの現象を原子レベルで詳しく調べて行くと、水素原子や水分子が重要な役割を果たしていることが判る。しかし、従来のX線結晶解析法で決定された立体構造には水素原子の位置情報を含んでおらず、現在の構造生物学では、このような水素原子の位置情報を欠いたデータがその基本になっている。そのため、常に水素原子が絡んだ機能解明には何らかの類推が入り、議論をあやふやにしていた嫌いがあった。

一方、中性子回折法はタンパク質やDNA等のすべての水素原子位置を決定出来る唯一の実験手法であるものの、構造決定に至るまでの時間的な効率性や結晶育成技術の高度化の必要性など解決すべき課題も多い。そこで、中性子回折法、並びにX線結晶解析法、NMR分光法の実験科学的手法を組み合わせ、水素を含むタンパク質や核酸等の立体構造を精密に決定する方法を開発し、水素を含む新しいタンパク質や核酸、ウイルスの立体構造の世界を作る。これに基づいて、高度に制御されたタンパク質の構造構築原理、酵素反応機構及び機能発現機構の解明、核酸の立体構造、タンパク質による塩基配列特異的な核酸認識におよぼす水分子及び分子内、分子間水素結合の直接的、間接的関与の解明を行う。さらにこうして得られる基礎研究の成果を食品産業や医療に役立つ薬理活性物質や新機能タンパク質の開発にも活かす。

2. 開放的融合研究の概要

【1】研究の概要

1. タンパク質・核酸の構造構築と制御機構の解明

タンパク質など生体高分子結晶のX線解析及び中性子解析を行い、構造構築と制御機構の解明を行う。前者では、水素原子を除く全原子の立体構造を決定し、さらに、分解能の高い結晶については、一部の水素原子の検出を試みる。また、後者では、中性子測定実験のために作製した完全重水素化タンパク質について、それらの結晶を作製し、タン

パク質の水素原子位置、水和構造を決定する。一方、NMRスペクトロスコピーを利用して、タンパク質の動的構造を明らかにするとともに、計算機を利用してタンパク質の分子動力学計算による動的解析を行う。

(1) 物理学的結晶作製技術の開発

一定の同一タンパク質を使ってタンパク質溶液を（タンパク質濃度； C_p 、結晶化剤濃度； C_c ）空間の任意の位置に持っていきける技術を開発し、確実に溶解度曲線を決定する。これにより、中性子回折用大型タンパク質結晶育成技術を確認するため汎用結晶成長相図作成手法を開発する。

(2) 生化学的結晶作製技術の開発

タンパク質の結晶化に影響する生化学的諸因子（緩衝液、沈殿剤、蛋白濃度、pH）の検討、蒸気拡散法、バッチ法、透析法、最近開発されたGCB法などを使った結晶析出法の検討を行い、サイズが大きく且つ分解能の高い結晶の作製を試みる。一方、*in vitro*タンパク質合成システムその他、培地に重水素を含む系や*Pichia pastris*を利用した系を用いて重水素置換タンパク質の大量発現及び結晶の作製を行い、得られた結晶については中性子回折実験を行う。

(3) 高分解能X線解析

植物由来タンパク質、蛇毒由来タンパク質、糖分解酵素、核酸結合タンパク質、植物ウイルスなど生物学的に興味深いタンパク質・核酸についてX線解析を行い、立体構造を決定する。詳細な構造を解明するため、良質且つ分解能の高い結晶を選択し、X線データは高エネ研フォトンファクトリー、SPring-8のシンクロトロンを利用して測定する。超高分解能データのX線解析から可能な限り水素原子位置の検出を試みる。

(4) 機能解析と分子動力学計算

NMRスペクトロスコピーを利用して、比較的分子量の小さいタンパク質の動的構造を実験的に明らかにする。NMRシグナルの帰属は多核種多次元NMR法を利用して解析する。一方、計算機を利用した動的解析には分子動力学計算により行う。酵素反応機構シミュレーションには、計算センターのOrigin3800及びSX-5マシンなどを使用する。これらにより、動的構造と機能の関係、酵素反応機構の解明を試みる。

2. 中性子回折法によるタンパク質や核酸の水素・水和構造決定手法の開発

(1) 高分子用中性子回折計の設計・製作

すでに建設した高分子用中性子回折計の性能向上を行う。

(2) タンパク質・DNA等の中性子回折実験

基本的なタンパク質（ヒトリゾチーム等）や核酸（オリ

ゴマーDNA) 及び創薬等の産業応用や生物機能解明に重要なタンパク質 (2 Znインスリン, FMN結合タンパク質等) の中性子回折実験を行い, 水素・水和構造の機能発現に及ぼす効果を解明する。

【2】 融合への取り組みの概要

1. 研究総括責任者の指導性

(1) 両機関合同主催の国際シンポジウムを11/19~21に開催する。

外国人12名, 国内から15名, 招待講演を企画している。

(2) 国際Advisory委員会を11/21に行うことを計画している。

(3) 両機関での共通テーマ, 大型結晶育成, 重水素化試料

調整などでの合同検討会を開催する。

2. サブテーマ間の連携

(1) 生物研で調整, 結晶育成した生物学的に興味あるタンパク質 (キシリトール, FMN結合タンパク質, DsrD) の中性子回折実験を原研で行い, データ解析を共同で行う。

3. 融合への取り組み

(1) 大型結晶育成およびそれによる中性子回折実験に関しては生物研の担当研究者が原研に滞在して実施する。

4. 融合研究推進委員会における支援の取り組み

(1) 実験室の拡張等施設面の支援をいただく。

(2) 予算その他事務処理に関する支援をいただく。

3. 年次計画

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度
1. タンパク質・核酸の構造構築と制御機構の解明					
(1) 物理学的結晶作製技術の開発	試料調製系の確立		大型結晶育成技術の開発		大型結晶育成及び技術評価
(2) 生化学的結晶作製技術の開発	結晶化要因解析		in vitro 発現, 結晶化		完全重水素化タンパク質の作成及び技術評価
(3) 高分解能X線解析	データ収集		構造解析		構造解析及び解析結果評価
(4) 機能解析と分子動力学計算	データ収集		動的解析		動的解析及び動的解析評価
2. 中性子回折法によるタンパク質や核酸の水素・水和構造決定手法の開発					
(1) 高分子用中性子回折計の設計・製作	BIX-3の性能向上		BIX-3Mの建設	BIX-3Mの定常運転	
(2) DNA・タンパク質等の中性子回折実験	データ収集・構造解析				
所要経費(合計)	301百万円	300百万円	301百万円	306百万円	298百万円

II 平成15年度における実施体制

研究総括責任者：新村 信雄（日本原子力研究所 グループリーダー）

研究項目	担当機関	研究担当者
<p>1. タンパク質・核酸の構造構築と制御機構の解明</p> <p>(1) 物理学的結晶作製技術の開発</p> <p>(2) 生化学的結晶作製技術の開発</p> <p>(3) 高分解能X線解析</p> <p>(4) 機能解析と分子動力学計算</p> <p>2. 中性子回折法によるタンパク質や核酸の水素・水和構造決定手法の開発サブテーマ・リーダー</p> <p>(1) 高分子用中性子回折計の設計・製作</p> <p>(2) タンパク質・DNA等の中性子回折実験</p>	<p>(株)農業生物資源研究所 日本原子力研究所</p> <p>(株)農業生物資源研究所</p> <p>(株)NECソフト (株)農業生物資源研究所</p> <p>(株)NECソフト 明治薬科大学 山形大学 (株)農業生物資源研究所</p> <p>大阪大学 (株)農業生物資源研究所</p> <p>日本大学 徳島大学 長岡技術科学大学 横浜国立大学 日本原子力研究所</p> <p>日本原子力研究所</p> <p>総合大学院大学 日本原子力研究所</p>	<p>水野 洋 ○新村 信雄 新井 栄揮 茶竹 俊行 鴨志田 薫 前田 満 大西 裕季 徐 新 顔 藤本 瑞 若生 俊行 古市 真木雄 ○高瀬 研二 香川 正行 竹中 康浩 目野 浩二 増田 洋美 森田 隆司 久野 敦 ○水野 洋 門間 充 藤本 瑞 鹿本 康生 堀井 克紀 Thirumananser Kumar 須藤 恭子 Penmecha Kumar 月原 富武 ○山崎 俊正 加藤 悦子 金子 寛生 中馬 寛 城所 俊一 片平 正人 新村 信雄</p> <p>○栗原 和男 田中 伊知朗 大原 高志 ○茶竹 俊行 新井 栄揮 栗原 和男</p>

(注：○はサブテーマ責任者)

Ⅲ 融合研究評価委員会・融合研究推進委員会

(1) 融合研究評価委員会

委 員	所	属
○JhonR. Helliwell	イギリス マンチェスター大学	教授
Eric Westhof	フランス ルイパスツール大学	教授
池原 森 男	大阪大学	名誉教授
大島 泰 郎	東京薬科大学 生命科学部	教授
久保寺 昭 子	東京理科大学 薬学部	教授
郷 信 広	日本原子力研究所 計算科学推進センター	量子生命情報解析グループリーダー
高 良 和 武	筑波研究学園	理事長
田 中 信 夫	東京工業大学 生命理工学部	教授
安 岡 則 武	姫路工業大学 理学部	名誉教授

(注：○は研究評価委員長)

(2) 融合研究推進委員会

委 員	所	属
○田 中 俊 一	日本原子力研究所	理事・東海研究所長
岡 田 漱 平	日本原子力研究所	企画室長
藤 井 保 彦	日本原子力研究所	中性子利用研究センター長
肥 後 健 一	㈱農業生物資源研究所	理事
新 保 博	㈱農業生物資源研究所	企画調整部長
宮 下 清 貴	㈱農業生物資源研究所	研究企画調整官

(注：○は研究推進委員長)