

BL15 におけるタンパク質結晶の長波長 X 線回折実験

河本 正秀

財団法人 高輝度光科学研究センター

様々な生命現象は、生体を構成する分子の相互作用つまり化学反応として理解することができる。タンパク質はこの化学反応に基質や触媒として関与するだけでなく、感覚受容、情報伝達、生体防御機構、運動や構造形成など生命を維持する上で多くの重要な役割を担っている。タンパク質は 20 種類のアミノ酸が鎖状に連なった高分子で、生体中ではその鎖が折れ畳まれた 3 次元構造をとることによって初めて機能を発揮する。よってタンパク質分子の立体構造を原子レベルで知ることが、そのタンパク質の機能およびそれが司る化学反応を理解するうえで不可欠である。またタンパク質の立体構造は、標的タンパク質の立体構造を基に最適な薬剤の設計を行う Structure-Based Drug Design (SBDD) など産業応用の面でも重要度を増している。

現在、タンパク質の立体構造決定には、X 線結晶構造解析が広く用いられている。タンパク質のような原子数の多い分子の場合、結晶構造解析に必要な情報である位相角を直接的に求めることはほぼ不可能である。この「位相問題」を解決するには、結晶中のタンパク質分子を重原子修飾した誘導体結晶を作製し、それを用いて多重同形置換法 (MIR) や多波長異常分散法 (MAD) などの解析手法により位相角の推定を行う。良好な誘導体結晶の作製は、従来では最適な作製条件の検討などに時間と手間のかかる作業であったが、遺伝工学的手法により大腸菌組換えタンパク質を金属セレンで修飾する簡便な方法が開発されている。しかし、生命科学上重要な膜タンパク質やヒト由来のタンパク質では、大腸菌組換えタンパク質の作製が困難である場合も少なくない。そこで近年、天然タンパク質に含まれるシステインやメチオニン残基中のイオウ原子を利用した単波長異常分散法 (SAD) により位相角の推定を行う「Sulfur-SAD (S-SAD)」が注目されている。この手法では誘導体結晶の作製が一切不要となり、また大腸菌組換えのできないタンパク質にも適用可能である。

S-SAD 法では、イオウの X 線吸収端 ($5.0155 \text{ \AA}$) に近い長波長で X 線回折データ収集を行うことが位相決定上有効である。SAGA-LS・BL15 では、他放射光施設のタンパク質結晶構造解析用 BL よりも長波長が利用できる (最長 $5.90 \text{ \AA}$)。そこで、S-SAD 法解析における長波長 X 線利用の可能性を検討するため、SAGA-LS・BL15 にタンパク質結晶用回折装置を設置し、X 線回折実験を行った。

ウシ由来インスリン (分子量 5,751、空間群 $I2_13$) を試料とし、波長 1.5、2.3、2.6、2.9 $\text{\AA}$ で X 線回折データ収集を行った。いずれの波長からも、 R_{merge} が 4 - 7% と他放射光施設のタンパク質結晶構造解析用 BL と遜色ない回折データを得ることができた。また `shelxC/D` と `Solve/Resolve` を用いた S-SAD 法による位相決定では、確かに長波長での回折データほど位相決定力が高いことが確認できた。しかし、ARP/wARP による分子モデルの自動構築では、波長 1.5 $\text{\AA}$ と 2.3 $\text{\AA}$ の回折データからはほぼ全残基を自動構築することができたのに対し、波長 2.6 $\text{\AA}$ と 2.9 $\text{\AA}$ の回折データでは測定分解能不足のためにモデルの自動構築はできなかった。

本発表では実験結果の詳細とともに、SAGA-LS でタンパク質構造解析を行う上での今後の検討課題などについても述べる予定である。

BL15におけるタンパク質結晶の 長波長X線回折実験

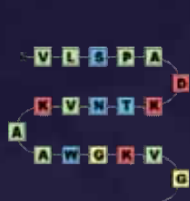
河本 正秀
(財) 高輝度光科学研究センター

2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

タンパク質とは...

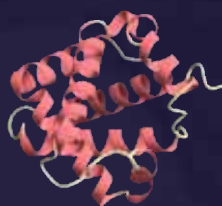
- 様々な生命現象を司る
 - 感覚受容、情報伝達、生体防御機構、運動や構造形成など
- 生体中において、ある特定の立体構造をとる



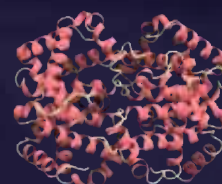
一次構造



二次構造



三次構造



四次構造

- 立体構造はアミノ酸配列に依存する (Anfinsenのドグマ)
- 機能は立体構造と関係する (「鍵と鍵穴」モデル、Induced-fitモデル)

2008-03-11

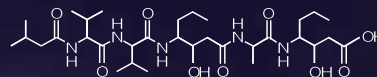
九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

Structure-Based Drug Design

- 抗エイズ剤の事例（抗HIVプロテアーゼ剤）



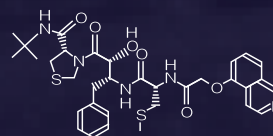
・ Acetyl-pepstatin



この空間に（立体的・電荷結合的・疎水結合的に）納まる化合物をコンピュータスクリーニング



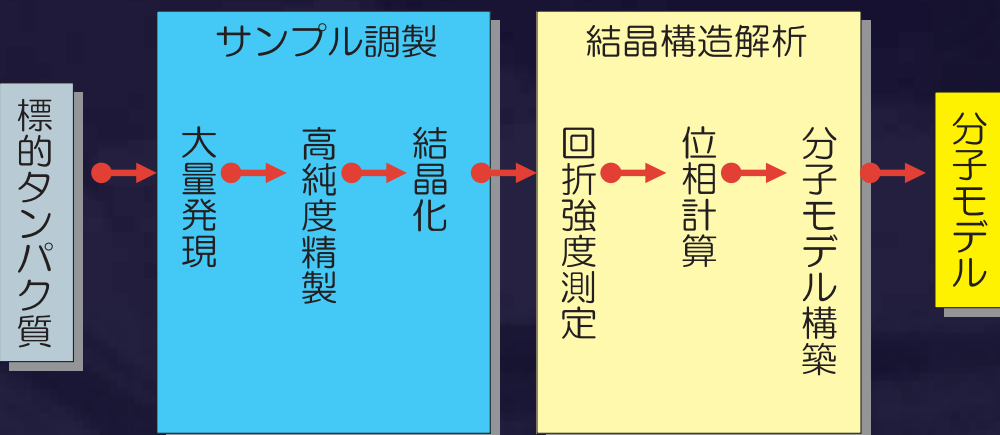
・ KNI-272



2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

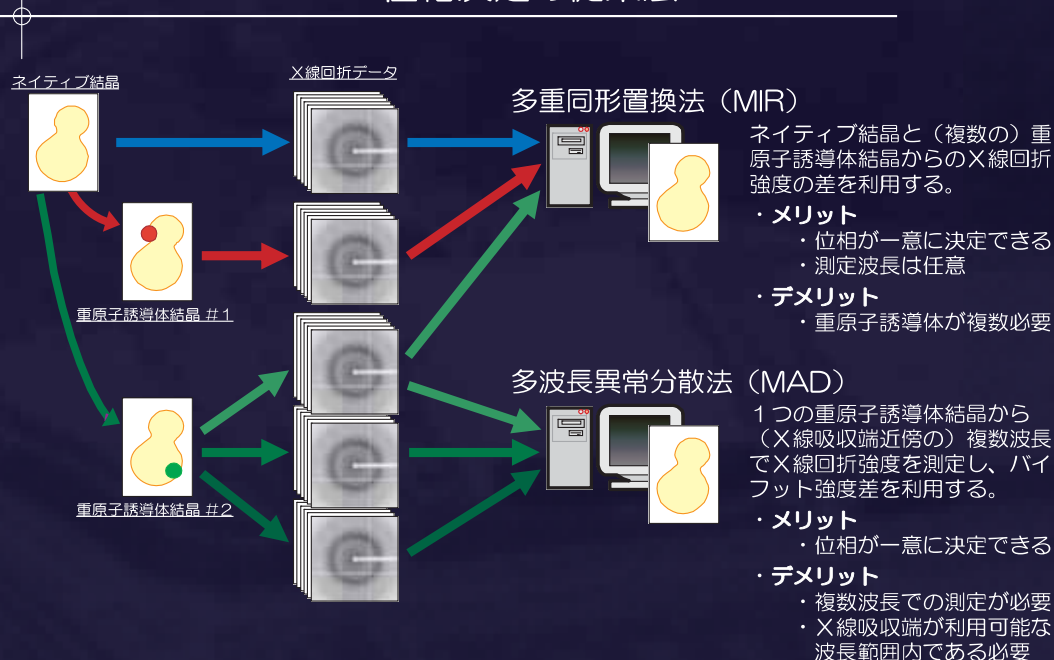
タンパク質のX線結晶構造解析の流れ



2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

位相決定の従来法

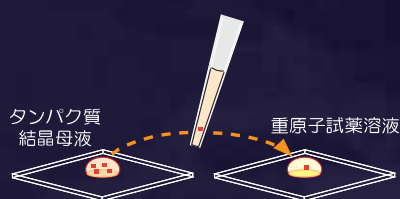


2008-03-11

九州シンクロtron光研究センター研究成果報告会

重原子誘導体の主な調製方法

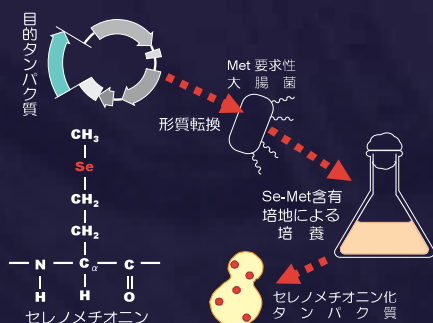
・浸漬 (soaking) 法



タンパク質結晶を重原子試薬溶液に浸漬し、拡散浸透した重原子がタンパク質分子の特定部位に結合する。

- ・メリット
 - ・重原子の結合数・占有率を制御可能
- ・デメリット
 - ・結晶性や回折能、同形性の低下
 - ・結合しているかどうか、回折データ測定まで判別不可能

・セレノメチオニン (Se-Met) 化



目的タンパク質をMet要求性大腸菌に形質転換し、それをセレノメチオニン (Se-Met) を含む培地で培養することで、タンパク質分子をセレン修飾する。

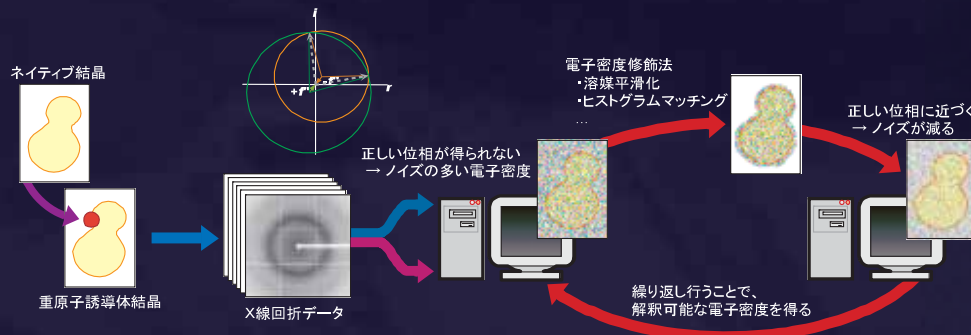
- ・メリット
 - ・重原子置換されたタンパク質が得られる
- ・デメリット
 - ・細胞毒性による菌体増殖の低下、タンパク質発現量の低下、不溶化
 - ・大腸菌発現系以外には現状適用不可

2008-03-11

九州シンクロtron光研究センター研究成果報告会

単波長異常分散（SAD）法

- 1 種類の結晶（重原子誘導体）の 1 波長でのバイフィット強度差を利用 → 電子密度修飾法により位相を改良する



- メリット
 - 異常散乱項 f'' が（観測可能な程度に）大きければ測定波長は問わない
- デメリット
 - 位相を一意に決定できないため、何らかの位相改良が必須
 - 1 組のバイフィット差のみを利用するため、非常に高精度な回折データが必要

2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

イオウを異常分散原子としたSAD法（S-SAD）

• SAD法の特徴

吸収端近傍の波長以外でも
結晶構造解析が可能



利用可能な波長範囲外の
異常分散原子を利用できる



メチオニンやシステイン残基中に含まれる イオウ原子 ($K_{\text{abs}}=2.47\text{keV}$) を
異常分散原子とするSAD法（S-SAD）の可能性

• S-SAD法の展開

天然タンパク質に含まれる
イオウ原子を用いる



重原子誘導体結晶の
調製が不要

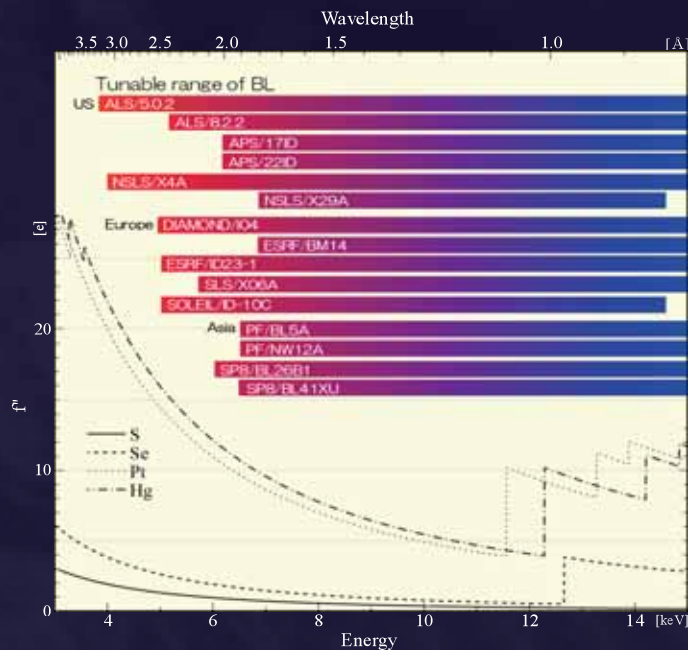


- 天然タンパク質による、より迅速な構造解析が可能
- セレノメチオニン化できないタンパク質にも適用可能
- 極微量しか得られないタンパク質の効率的な構造解析

2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

既存タンパク質結晶用BLの波長範囲



2008-03-11

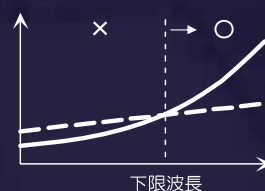
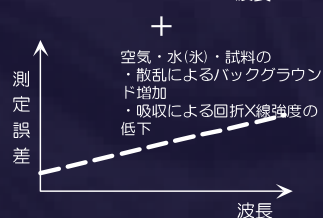
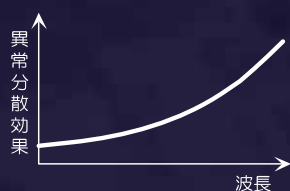
九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

BL15におけるタンパク質結晶の長波長X線回折実験

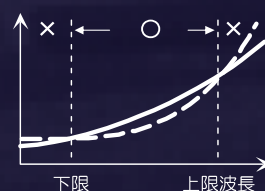
目的

- SAGA-LSでのタンパク質結晶構造解析の実証
- 2.3 Å 超の波長での S-SAD法の実践と評価

⇒ S-SAD法にとって、どこまで長波長は有効か？



下限波長はいくらか？
利用可能波長範囲内か？



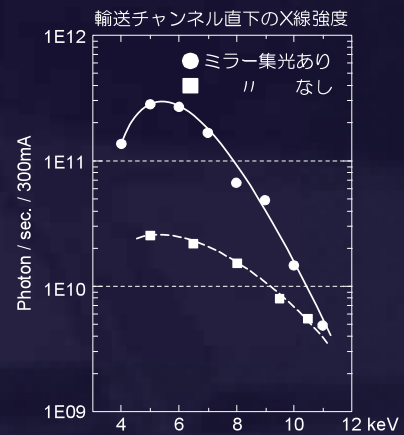
上限波長は存在するのか？
上限波長はいくらか？
利用可能波長範囲内か？

2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

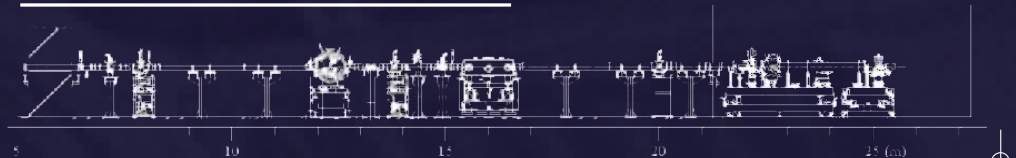
BL15におけるタンパク質結晶の長波長X線回折実験

• SAGA-LS • BL15



光学性能

光源	偏向電磁石
モノクロメータ	Si (111) 二結晶分光器
ミラー	Bent-cylindrical 型 Coat: Rh Incidence angle: 4 mrad
波長範囲	5.9 ~ 0.87 Å (2.1 ~ 14.2 keV)

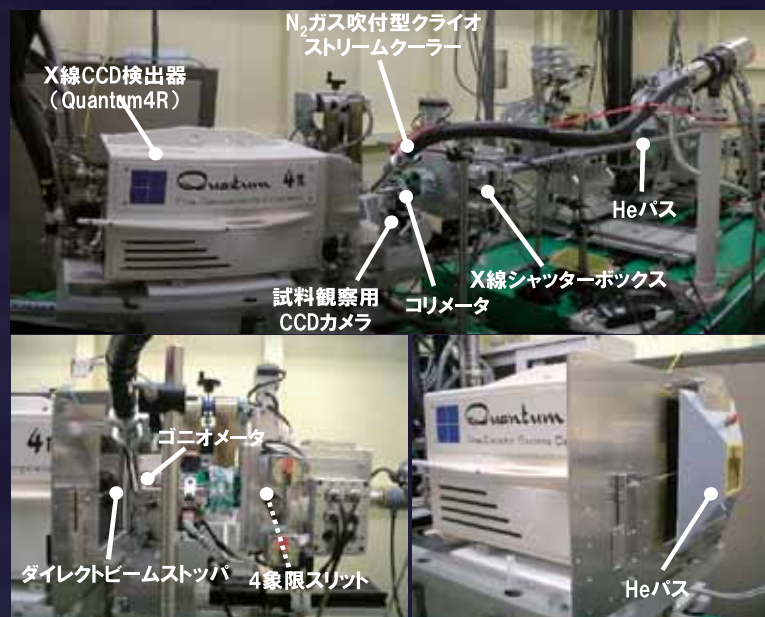


2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

BL15におけるタンパク質結晶の長波長X線回折実験

• 実験装置



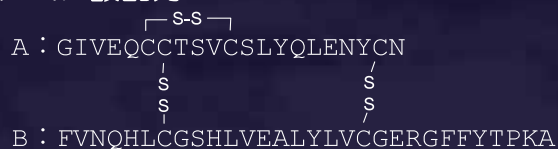
2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

ウシ・インスリン

–分子量：5,751 Da

–アミノ酸配列：



–空間群と格子定数：

$$I2_13, a = b = c = 77.90 \text{ \AA}$$

–溶媒含量：0.64



小さな分子量に3組のS-S結合 ⇨ S-SAD法の標準試料

2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

SAGA-LS/BL15でのインスリンの測定・解析事例

・インスリン（ウシ）のX線回折データ収集

– MOSFLM + SCALA

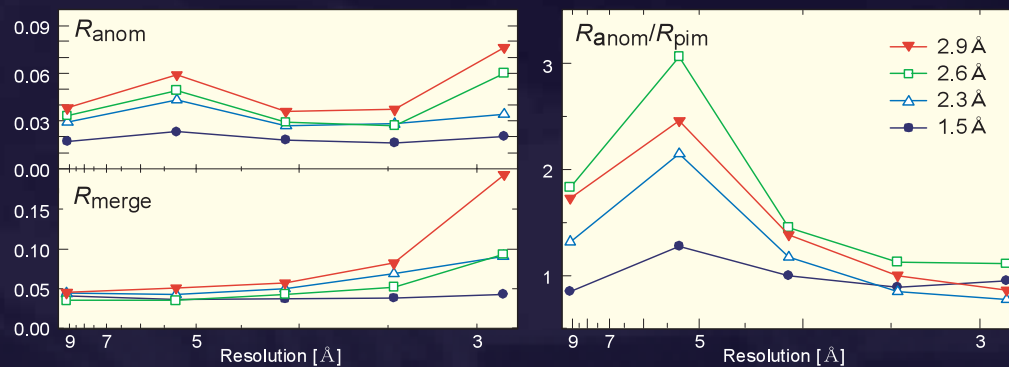
Wavelength [Å]	1.5	2.3	2.6	2.9
Distance [mm] (path)	100 (Air)	85 (He)	85 (He)	50 (Air)
Osc. range / frames	84° / 84 frames	90° / 90 frames	90° / 90 frames	90° / 90 frames
Exp. time [sec.]	60	60	60	60
Space group & cell	$I2_13$ $a=b=c=77.87 \text{ \AA}$	$I2_13$ $a=b=c=78.06 \text{ \AA}$	$I2_13$ $a=b=c=78.50 \text{ \AA}$	$I2_13$ $a=b=c=78.53 \text{ \AA}$
Resol. [Å]: overall	30.00 – 1.80	40.00 – 2.40	55.50 – 2.70	20.00 – 2.90
(inner)	(1.90–1.80)	(2.52–2.40)	(2.84–2.70)	(3.06–2.90)
R_{merge}	0.057 (0.315)	0.066 (0.244)	0.048 (0.376)	0.073 (0.378)
R_{anom}	0.030 (0.262)	0.036 (0.197)	0.038 (0.112)	0.044 (0.073)
R_{pim}	0.029 (0.271)	0.032 (0.236)	0.023 (0.366)	0.034 (0.174)
# ref. meas.(uniq.)	60037(7351)	23561(2938)	16763(2106)	18066(1867)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	24.3	25.7	31.2	25.8
Ano. Compl. [%]	94.3	82.6	84.5	98.4
Ano. Multi.	4.2	4.5	4.4	4.4

2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

SAGA-LS/BL15でのインスリンの測定・解析事例

統計値の比較



- 測定誤差は測定波長が長くなるほど大きくなるが（特に高角領域）、異常分散効果はそれ以上に大きい

2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

SAGA-LS/BL15でのインスリンの測定・解析事例

S-SAD法による解析結果

- shelx C/D + (solve + resolve) + ARP/wARP				
λ	1.5 Å	2.3 Å	2.6 Å	2.9 Å
Resolution	30.00 – 1.80 Å	40.00 – 2.40 Å	55.50 – 2.70 Å	20.00 – 2.90 Å
# of found Sulfur by shelx C/D	4	6	6	6
$\Delta \phi$	65.79°	43.01°	41.73°	41.77°
Seq. Cov.	97 %	97 %	62 %	58 %
R_{work} (R_{free})	21.6 % (25.8 %)	22.9 % (31.1 %)	25.0 % (46.0 %)	24.2 % (42.2 %)

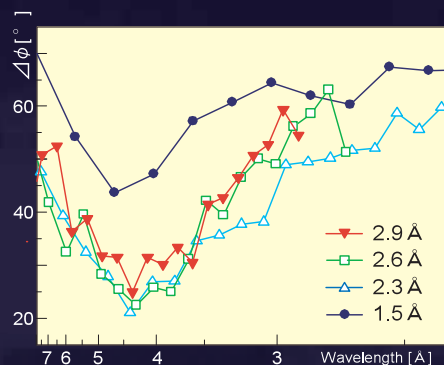
2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

SAGA-LS/BL15でのインスリンの測定・解析事例

・モデル構造との位相角の差の比較

- ・測定波長が長くなるほど、モデル構造との位相角差は少なくなるが、分解能不足のため、自動構築できる残基数は減少する



2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

まとめ

- ・（少なくとも2.9 Åまでの）長波長測定では、異常散乱効果の増加のほうが、測定誤差の上昇より大きい
- ・長波長測定時には、測定分解能不足のため位相改良が上手く行えないことがある（溶媒含量の少ないタンパク質の場合...）
 - ⇒ 検出器のoffset・2θ軸化など高分解能測定への対応が必要
 - ・位相拡張用に中波長で高分解能データを収集する

2008-03-11

九州シンクロトロン光研究センター研究成果報告会

謝 辞

- (財) 高輝度光科学研究センター
－ 熊坂 崇、清水 伸隆、馬場 清喜
- (独) 理化学研究所 播磨研究所
－ 山本 雅貴、清水 哲哉、平田 邦生
- 佐賀県立九州シンクロトロン光研究センター
－ 岡島 敏浩、隅谷 和嗣、石地 耕太郎
- 佐賀大学
－ 渡邊 啓一、本島 浩之

(敬称略・順不同)