構造生物学 X線と中性子の相補性

新村 信雄, 茶竹 俊行

(日本原子力研究所 先端基礎研究センター 中性子構造生物学研究グループ)

Neutron structural biology, complementarity between neutron and X-ray

Nobuo Niimura, Toshiyuki Chatake

Neutron Structural Biology, Advanced Science Research Center, Japan Atomic Energy Research Institute

1. はじめに

構造生物学におけるX線と中性子の相補性については中性子構造生物学を特徴付けるため補足的に書かれる場合が多く、記述は断片的である。ここではX線と中性子の相補性だけに焦点を絞って系統的に書いてみる。まず、プローブ特性の違いからくる実験技術に関係する相違、次に、中性子がX線に比べて最も特徴的なことは水素原子が観測しやすい事であり、X線と中性子で水素原子を観測する際の相違を個別的且つ系統的に議論してみる。

ここでは単結晶構造解析に話を限り、小角散乱および反射率計による構造生物学におけるX線と中性子の相補性は割愛する。また、中性子散乱実験の重要な手法に非弾性散乱や磁気散乱があるが、生体物質のX線非弾性散乱実験や中性子の磁気散乱を利用した構造生物学実験は殆どされていないので触れない。

2. プローブ特性の違いからくる相違

波長 1Å の中性子と X 線のエネルギーはそれぞれ 81 meV, 12.3 keV で、5 桁以上の差があるが、これは結晶中のタンパク質に及ぼす放射線損傷の点で決定的な差である。X 線のエネルギーはタンパク質分子や周囲を取り巻く水分子の原子間化学結合エネルギー(約 10 eV)より高いので、X 線の電離作用でタンパク質が損傷を受ける。特にタンパク質の周囲は水に取り巻かれており、X 線で損傷を受けた水(ラジカル)は結晶中を動きまわり周囲のタンパク質に二次的な損傷を与える。X 線結晶解析では試料の放射線損傷は不可避であったが、最近フラッシュ・クーリングという技術が開発され、結晶を液体窒素で凍らせてラジカル水分子が動きまわらなくして放射線損傷を極力減らすようにしている。但し、余り問題にされていないが、この実験条件ではタンパク質は生理機能を失っている筈であり、最近の殆どの X 線結晶構造解析ではタンパク質の生理機能を凍結させた状態での分子構造を見ていることを指摘しておく。一方、中性子のエネルギーは原子間の化学結合エネルギーより低いのでタンパク質の放射線損傷はなく、中

性子回折実験は原則的に 1 個の結晶で常温で完了できる。そのため、中性子構造生物学ではタンパク質特有の生理機能を失っていない構造を観測していると言える。試料位置での X 線と中性子の強度の差は 7-8 桁違う。これは、回折実験にかかる測定時間だけでなく回折装置の性能に決定的な差である。例えば Spring-8 等の Advanced X-ray source を用いると、結晶サイズは 0.05mm 角が標準であり、完全なデータセットを得るための測定時間も数時間で OK であり、ビームの角度分散を小さくできるので解析可能な格子定数も数 100Å が可能である。一方、中性子回折法での現状は結晶サイズは最低 1mm 角は必要で、格子定数は標準では 100Å 以下で、測定時間も 1.5Å 分解能データ収集を目指すなら約 25 日必要である。最近プロテイン 3000 プロジェクトでハイスループットでの構造解析が求められているが、中性子回折実験はこれには不適である。また、立体構造が未知のタンパク質の構造決定は中性子回折法でも原理的には可能ではあるが殆ど意味をなさない。

3. プローブとの相互作用の違いからくる特徴

3-1 原子形状因子と中性子散乱長

表 1 に生体物質を構成する主な原子の中性子散乱長と X 線原子形状因子を示す。この表から次のことが言える。

表 1 中性子原子散乱長と X 線原子形状因子。

原子種	中性子	X 線
	$b_{\text{coh}}(10^{-12}\text{cm})$	$f_{\text{x-ray}}(10^{-12}\text{cm})$
H	-0.37	0.28
D	0.67	0.28
C	0.67	1.69
N	0.94	1.97
O	0.58	2.25
S	0.29	4.48

1) 原子からの散乱強度は中性子散乱長と X 線原子形状因子の自乗で表わされる。X 線に比べ中性子では水素が他の炭素や酸素と同程度に散乱に寄与していることが明確にわかる。X 線では水素の寄与は酸素の約 1/100 である。

2) 水素と重水素では核構造が異なるため中性子

散乱長が異なる。中性子散乱では、水素を重水素で置換することで強度差が明瞭に生じるので特定の水素位置を同定できることになる。尚、水素の散乱長が負であるのは、中性子が水素原子核に捕獲され位相が 180° ずれた波として再放出されるためである。

実は表 1 だけでは原子形状因子と中性子散乱長の重要な差を示していない。図 1(a)に水素と炭素の原子形状因子と中性子散乱長を $\sin\theta/\lambda$ の関数で表したものを示す。横軸の上側に $\sin\theta/\lambda$ を面間隔 d (以下分解能と呼ぶ) に換算した量を記してある。これは温度因子を含まない場合の図である。

図 1. 水素と炭素の原子形状因子と中性子散乱長。
(図 1(a)は $B=0 \text{ Å}^2$, 図 1(b) は $B=10 \text{ Å}^2$)

図 1(b)に仮に温度因子 $B=10 \text{ Å}^2$ とした場合を示す。分解能 1.5 Å で原子形状因子は中性子散乱長の約 7 分の 1 になり、X 線による水素の寄与は殆どなくなる。原子形状因子は $\sin\theta/\lambda$ に対して指数関数的に減少するのに加え温度因子の寄与も $\sin\theta/\lambda$ に対して指数関数的に減少するので、X 線ブラ格反射強度は散乱角が大きくなるにつれ急激に減少する。そのため、試料結晶の品質に依存して、ある一定の散乱角以上のブラ格反射強度は収集出来にくくなる。この散乱角に相当する面間隔 d をもって分解能と定義し、解析に使用する反射もこの分解能の面間隔 d 以上の反射に限定することがよくなされる。

一方、図 1(a)に示すように中性子散乱長は $B=0 \text{ Å}^2$ では $\sin\theta/\lambda$ に依存せず、温度因子を考慮しても散乱角が大きくなるにつれ中性子ブラ格反射強度の減少の仕方は緩やかである。図 2 に異化型亜硫酸還元酵素 (DsrD) の中性子及び X 線のブラ格反射強度の $\sin\theta/\lambda$ 依存性を示す¹⁾が、X 線では分解能 4 Å から 1.8 Å に至まで急激に減少するが、中性子では 3 Å から 1.8 Å まで横ばいである。

図 2. $\sin\theta/\lambda$ に依存したブラ格反射強度の変化。
(青: DsrD-X 線, 赤: DsrD-中性子)

中性子解析では、これを考慮して高分解能で観測された反射は可能な限り取り込むのが良好な解析結果を生む。図 3 にヒトリゾチームの例を示す²⁾。図 3(a)に各分解能での反射の反射率を示す。分解能 1.8 Å での反射率は 90% で、分解能 1.3 Å で 50% に減少するが、それぞれの反射を用いて Arg119 のフーリエ図を計算すると、明らかに分解能 1.25 Å の方で良好な図が得られる(図 3(b))。

(a)

(b)

図 3. 高分解能ブラ格反射を取り入れた中性子解析例。
(a) ヒトリゾチームの分解能ごとの $I/\sigma(I)$ 。
(b) ヒトリゾチーム Arg119 側鎖のフーリエ図。

同様に図 4 にルブレドキシン変異体のメチル基のフーリエ図を分解能の違うデータを用いて得たものを示してある³⁾が、分解能が上がるにつれ水素原子のピークが明瞭に見えてくる様子が判る。

図4. ルブレドキシン変異体のメチル基のフーリエ図.

3-2 水素、重水素との相互作用

X線では水素原子が見えにくいのだが、高分解能X線結晶解析で水素原子を観測する試みはされている。ところが、図1からも判るようにX線では水素の原子形状因子を見る限りではその構造情報は高分解能データ(例えば1.5Å分解能)に殆ど反映されていないにも拘らず、高分解能X線結晶解析で水素原子が見えるようになるのは、水素原子が結合している炭素等が明瞭に見えるようになった結果であろう。

図5にX線で観測された水素原子の例を示す⁴⁾。炭素原子に結合した水素原子は何とか観測にかかるが、(但し、X線構造解析で水素原子まで含めて精密化した例は殆ど無い。)酸素や窒素に結合している水素を見るのは更に不利になる。それは、酸素や窒素原子は電気陰性度が高いので水素の電子を引きつけ水素の周囲の電子は減少しX線への寄与が減少するからである。

時々、水素原子位置は骨格構造や側鎖の炭素、酸素、窒素、硫黄原子位置が判明すれば、立体化学の知識からそれらに結合する水素原子位置を推測できるので、中性子回折法で水素原子位置を観測するのはそれ程重要でない、という批判を聞く。確かに、いくつかの水素原子、特に炭素原子に結

合した水素原子位置は中性子で得られたものが予測した位置に近い場合が多い。しかし、実験の最大の特徴は観測することであり、中性子回折法で観測された水素原子位置は観測値である。更に、タンパク質を構成する水素原子の中にはその位置を予測不可能なものがある。それらを表2に示す。しかも、これらはX線では観測困難な水素原子であり、タンパク質の機能解析にとり重要な水素原子である場合が多い。

中性子と水素原子の相互作用で水素原子は核スピン(+1/2)を有し、上向き下向きの不規則性に由来する非干渉散乱項が大変大きい。非干渉散乱項は回折実験ではバックグラウンドになり望ましくないので、それを避けるため、タンパク質の結晶化に際して重水を用いる。すると、酸素や窒素原子に結合している水素は重水素に置換し、重水素の中性子散乱長は水素のそれに比べて大きいのでさらに明瞭に見える。

X線では窒素原子と酸素原子の区別は困難であり、例えば Asn, Gln の側鎖末端の窒素と酸素の区別は一般に困難であり、機能解析を誤る可能性が高い。中性子の場合、-NH₂の窒素原子の中性子散乱長が大きいこととそれに結合している水素が重水素に置換して明瞭に見えることで窒素と酸素の区別は容易である(図6)³⁾。

図6. ルブレドキシン変異体 Asn21 のフーリエ図

Asp, Glu, Lys, Arg, His の水素原子位置決定はタンパク質の生理機能解明に決定的に重要である。しかも、これら水素原子は大部分が正に荷電した状態で存在するのが普通でありX線では原則的に観測にかからないが、中性子では明瞭に見える。糖加水分解酵素ニワトリ卵白リゾチームはpH5.0でGlu35の水素原子が機能に関与することが知られ

表2. 様々な官能基に属する水素原子の構造予測の難易度.

種類	化学構造	含まれる残基名	立体化学的な原子位置予想	
			X線から予測可能か	位置の精度
芳香環	φ-H, φ-D	Phe, Tyr, Trp, His	可能	非常に高い
sp ³ 混成のアルキル基(メチル基を除く)	-CH-, -CH ₂ -	全ての残基	可能	高い
主鎖のアミド基および側鎖の-ND基	-ND-	Hisを除く全ての残基	可能	高い
メチル基	-CH ₃	Ala, Ile, Leu, Met, Thr, Val	難しい	低い
プロトン化したアミノ基	-ND ₃	N末端, Lys	難しい	低い
水酸基	-OD	Ser, Thr, Tyr	不可能	-
プロトン化したカルボキシル基	-COOD	C末端, Asp, Glu	不可能	-
アミノ基	-ND ₂	Arg, Asn, Gln	不可能	-
スルフォヒドリル基	-SH	Cys	不可能	-

ているが、その水素原子が中性子回折実験により観測された例を図7に示す⁵⁻⁶⁾。

図7. リゾチームの活性部位 Glu35 のフーリエ図。
(左: pH4.9(活性型), 右: pH7.0 (不活性型))

水素結合は水素原子を介した化学結合のひとつであり、タンパク質の構造と機能を研究するのに重要な役割を演じている。但し、X線結晶構造解析では、水素原子を含まない構造が大部分であるので、水素結合の同定はドナーとアクセプター原子間距離を中心に議論されてきた。しかし、ドナー、水素原子、アクセプターが同一直線上に乗るのは例外的に少ないのでドナーとアクセプター原子間距離だけで水素結合を議論するのは危険である。中性子解析は水素原子を含んだ本質に迫った水素結合の議論が可能になる。図8にルブレドキシンの水素結合の様子を示す³⁾。

図8. 水素結合での水素アクセプターの分布図。
Xはドナー、Yはアクセプター、Dは重水素(稀に軽水素)。

水溶性タンパク質の周囲は水分子に取り巻かれ、水分子のいくつかは水素結合でタンパク質と結合し、タンパク質の立体構造構築の安定性に寄与するだけでなく、タンパク質の機能発現やタンパク質の分子認識に関与している。これら水和構造はタンパク質との間だけでなく隣接の水分子とも水素結合によりネットワークを形成している。水素原子を含んだ水和構造が中性子回折実験で観測されており(図9)、これによりタンパク質周囲の電場の計算が可能となる⁷⁻⁸⁾。

図9. ミオグロビンの分子間領域の中性子フーリエ図。

4. 結語

X線は中性子に比べ強度が強いため、ハイスループットでのタンパク質立体構造決定に適している。一方、中性子は強度が弱い、水素原子を高精度で見ることが可能であるので、タンパク質の精密構造解析に適している。但し、強度が弱い、現時点では扱えるタンパク質分子に限りがある。1日も早い大強度陽子加速器計画(J-PARC)の完成が待たれる。

参考文献

- (1) Chatake T *et al.*, to be submitted.
- (2) Chiba-Kamosida K *et al.*, to be submitted.
- (3) Chatake T *et al.*, to be submitted.
- (4) Bau R. *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.* 3, (1998) 484-493.
- (5) Niimura N. *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 909-914.
- (6) Maeda M. *et al.*, *J. Phys. Soc. Jpn. Suppl.* A70 (2001) 400-402.
- (7) Ostermann A *et al.*, *Biohyphys. Chem.* 95 (2002) 183-193.
- (8) Chatake, T *et al.*, *Proteins*, 50(3), (2003) 516-523.