タンパク質動力学研究における中性子と X 線の役割

中川 洋, 上久保 裕生, 片岡 幹雄
(奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科)

The Role of Neutron and X-ray on the Study of Protein Dynamics

Hiroshi Nakagawa, Hironari Kamikubo and Mikio Kataoka
Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

1. タンパク質の機能と動力学

タンパク質は、生命現象の担い手であり、精密な分子機械であるといわれる。物質的に見れば、タンパク質は 20 種類のアミノ酸が共重合した高分子であり、そのアミノ酸配列は遺伝情報により一意的に規定されている。生理的条件下で、固有のアミノ酸配列を持つ高分子は、自発的に固有の立体構造に折り畳まれ、固有の機能を発揮するようになる。分子機械という言葉から想起されるように、機能は優れて動的な性格を持つ。また、タンパク質は誘導適合といわれる構造変化によって、特異的な分子認識を行なう。分子機械であるタンパク質は、主として水溶液中かつ室温下で作動する。すなわち、この分子機械は熱揺らぎにさらされていることになる。熱揺らぎと機能発現に必要な微小な制御された動きとがどのように識別されているのか？タンパク質構造をめぐる興味は尽きない。これらの事実は、精密な静的構造解析だけではタンパク質の機能のメカニズムを完全に理解できず、タンパク質の動力学構造を調べる必要があることを示している。中性子は、タンパク質動力学を調べるために有効な手段である [1, 2, 3]。また、X 線溶液散乱を用いても動力学についての情報を得ることはできる [4]。

本稿ではタンパク質の中性子による動力学研究のその後の展開と、中性子と X 線の相補性を中心に紹介する。具体例としてタンパク質の動力学転移及びタンパク質表面の水和水の動力学を扱うことにする。

2. タンパク質の動力学構造と動力学転移

タンパク質は比較的小さいものでも数万の分子量を持ち、その構造は一分子で数十 Å の広がりを持つ。また一般の高分子とは異なり、タンパク質の組成は一様でない。従ってタンパク質の多自由度で複雑な動力学構造は、組成が均一である一般の高分子とはその複雑性が異なる。タンパク質の動的性質は、ソフトマターや高分子に共通するものと、タンパク質に固有のものとが混在しているであろう。我々は、タンパク質をタンパク質らしくさせている固有の動的性質に興味がある。

安定状態にあるタンパク質は、唯一のエネルギー極小をもつのではなく、多数の準安定なエネルギー

極小状態を取り得る。タンパク質は十分な低温下にあるとき、エネルギー極小にトラップされて調和振動的に揺らいでいる。しかし、温度上昇と共に構造の熱揺らぎは大きくなり、異なるエネルギー極小状態を移動するような非調和的な運動が活性化される。実際タンパク質は、約 150-180K 付近で非調和的な運動が活性化されることで揺らぎの急激な増加が観測される [5]。この現象を通常、タンパク質のガラス転移もしくは動力学転移と呼んでいる。動力学転移温度以下になると酵素タンパク質が不活性になる [6]、構造変化を伴うような光受容膜タンパク質の光サイクルが完了しない [7] といったことが報告されている。こういったことから、動力学転移温度以上で活性化される運動が、タンパク質の機能に関わっているということが指摘されている。

中性子非干渉性弾性散乱の Q 依存性からは、平均自乗変位を求めることができる。筆者らは球状の水溶性タンパク質である Staphylococcal nuclease の凍結乾燥試料と、それを蒸気圧平衡によって水和させた試料の平均自乗変位の温度依存性を測定している。測定例を図 1 に示す。この図から転移現象が水和依存的に変化し、特に約 240K 以上では水和試料は乾燥試料からの deviation が大きくなることが分かる。このことは水和によりタンパク質の運動状態が変化し、より空間的に大きな運動が活性化されていることを示している。

このような動力学転移は、ミオグロビンについて中性子非干渉性散乱のほか、メスバウアー分光、最近では X 線低温結晶構造解析により詳細に調べられている。X 線結晶構造から得られる個々の原子の温度因子から動力学の情報を抽出する基準振動的因子法が開発された [8]。この方法を、様々な温度で測定したミオグロビンの結晶構造解析に適用してみると、温度依存的な動力学転移が見出されなかった [9]。図 2 には、ミオグロビンの鉄原子に着目したメスバウアー分光と低温 X 線結晶構造解析による平均自乗変位の測定例を示してある。中性子による測定は、メスバウアー分光と定性的に一致している [10]。メスバウアーと中性子は非干渉性、X 線は干渉性の測定という違いがある。また、中性子ではタンパク質を構成する原子 (主に水素) の揺らぎの平均値が求められるのに対し、メスバウアーや X 線は鉄原子の揺らぎを見ている。

図2のような違いが観測される理由は、以下のよう
に解釈されている(図3) [11]. 動力学転移点(T_c)
以下では、それぞれの鉄原子がエネルギー極小状
態にトラップされている。温度因子を揺らぎの指
標とする場合、干渉性散乱では個々の鉄原子の位
置が異なるという静的不均一分布も同時に観測し
てしまうため、一分子の揺らぎよりも大きく見積
もってしまう。それに対し、非干渉性散乱では一分
子の揺らぎのみを見積もることができる。 T_c 以上
になると、それぞれの分子はエネルギー極小間を
移動するような運動をするが、このときは両測定
で見積もられる揺らぎの大きさは同じになる。こ
の結果、平均自乗変位の温度依存性の振る舞いは
異なり、動力学転移は干渉性散乱では観測されな
いが、非干渉性散乱では観測されるという結果を
与えてしまう。このような事実からは、動力学に
関する情報だけを得るには、中性子の方が優れて
いると考えられる。

上述の研究例では、鉄原子についてであったが、
タンパク質を構成する各原子が必ずしも温度に対
して同じ挙動を示すとは限らない。X線結晶構造
解析では部位特異的な温度因子の変化を観測する
ことが可能である [11, 12]. 図4にその一例を示す。
分子内に動力学転移が観測されない部位
(harmonic)と、図3(b)にそのメカニズムが示さ
れるように転移が観測される部位(glassy)がある。
また温度依存的に静的構造が変化することで、温
度が上昇すると温度因子が小さくなる(shifted)
という部位も存在する。

このようにX線には動力学の指標となる温度因
子に、静的構造の不均一性が含まれてしまうとい
う短所があるが、個々の部位による挙動の違いを
解析することができるという特長がある。一般の
高分子を研究する場合、組成が一様でありバルク
の特性として物理量を解釈するため、分子を構成
する原子を区別する必要はない。しかしタンパク
質の場合、観測しているのは大きな構造を持った
一分子であるため、タンパク質分子内部に存在す
る不均一性を解析する必要がある。一方で、X線結
晶構造解析による研究は、結晶で温度を変化させ
る実験は難しいうえに、結晶の晶系が温度依存的

図1. 中性子非干渉性弾性散乱により観測した、
Staphylococcal nuclease の平均自乗変位の温度依存
性。凍結乾燥試料と、その水和試料を示している。

図2. ミオグロビンに存在する鉄原子の平均自
乗変位の温度依存性 [9]. ○: メスバウアー分光 (非
干渉性), □: X線回折による等方的温度因子 (干渉
性), ■: 基準振動動的因子法 (干渉性)

図3. 干渉性散乱と非干渉性散乱で観測される
温度因子の温度依存性。低温で (a) 静的不均一構造
を持つ場合、(b) 静的均一構造を持つ場合。上図及
び中図は、それぞれエネルギー極小間のジャンプ
運動が現れる前後の概略図。下図は実測される温
度因子の温度依存性 [11]。

図4. リゾチーム結晶中での温度因子の温度依存性. 特徴的な3つのパターンを示している. プロットは, タンパク質を構成する各アミノ酸残基の温度因子の一例を示している [11].

に変わる場合があるため, 解析が困難である. 研究の利便性を考えれば, 中性子散乱の方が, 基本的には試料の状態を選ばないうえに, 得られるデータの解析は容易である.

中性子散乱でも部位特異的重水素化を行えば, 観測したい原子の動きを部位特異的に観測できる [13], 特別な場合を除き現実的ではない. X線と中性子の相補的な特徴をうまく利用すれば, 機能に直接関わる活性部位などの局所的な運動の解析をより詳細に行うことが可能になると期待される.

3. 水和水の構造と動力学

タンパク質表面の水分子の動力学は, 古くから研究されており, 生体分子表面の水分子は図5のように3つに分類されている [14]. このうち自由水もしくはバルク水と呼ばれる水は, タンパク質と相互作用をほとんど持たないと考えてよい. タンパク質表面の水分子と言え, 通常第一水和層である束縛水と第二水和層にある結合水のことを言う. これらの水分子はタンパク質の構造安定性や機能に対して何らかの役割を果たしていると考えられてきたが, その実体はよく分かっていなかった.

通常の室温下でのX線結晶構造解析でもタンパク質表面の水分子を観測することができるが, 低温X線結晶構造解析ではより多くの水分子を詳細に観測することが可能になり, タンパク質の水和水について議論されるようになってきた [12, 15]. それによると, タンパク質表面の水分子の配置については, アミノ酸残基の種類に由来する静電ポテンシャルの分布などに依存せず, 表面の凹凸といった形状に依存するということが明らかにされている. またタンパク質表面の水和水は, 水分子同士またはタンパク質の表面に存在する原子と水素結合を介したクラスターを形成している. そういった大小様々なクラスターがタンパク質表面を覆っており, 大きいものではタンパク質表面の約20%近くを覆う. これらのクラスターの存在位置はタンパク質のドメインと関係があり, 例えばタ

図5. 生体表面の水の状態 [9]

ンパク質の活性部位周辺での水分子の存在確率が, 他の部位に比べて高いことが示されている. この存在確率の違いは, 拡散運動といった水分子の動力学特性が異なることを示唆するものである. この違いは活性部位周辺の水分子が他と異なる動きをしており, 水が酵素タンパク質の分子認識に関わっているということを示唆している [16].

X線は, 水分子の動力学の違いを定量的に調べることはできない. タンパク質表面の水の動力学測定は中性子非弾性散乱により行われている. このような研究の実例として, 中性子非干渉性準弾性散乱実験により, タンパク質表面の水分子の拡散運動の拡散係数を測定している例がある [17]. 図6はタンパク質表面の水分子の準弾性散乱スペクトルであり, スペクトルの半値幅から拡散係数がわかる. この研究ではエネルギー分解能が異なる実験を組み合わせることで, 拡散係数の異なる2つの水分子に分けられることが示されている. これら水分子の拡散係数はいずれもバルクの水に比べ5~50倍遅いということが示され, その動力学がタンパク質表面のポテンシャルの影響を受けていることが分かる. またそのうち比較的速い拡散運動をしている水分子は, タンパク質表面に沿った二次元的な拡散運動をしているということが分かってきた. 中性子非干渉性散乱実験からだけでは, 水分子の存在位置とその動力学とを対応付けることはできない. しかしX線結晶構造解析の結果と相補的に考えれば, タンパク質表面のクラスターが2次元的な拡散運動をしており, その拡散係数の違いを反映しているということが推察される. タンパク質表面の中でも特に活性部位周辺の水分子の速い拡散運動は, 生理機能発現の化学反応場であるタンパク質表面において, 代謝産物をすばやく輸送するという生理的メカニズムを説明することができる.

図6. タンパク質表面の水分子の $Q=1.094 \text{ \AA}^{-1}$ における準弾性散乱スペクトル [17].

タンパク質表面に存在する水和水の動力学の研究は、単一の測定方法だけでは詳細な議論は困難である。本稿で紹介した低温 X 線結晶構造解析や中性子非干渉性散乱だけでなく、室温でも水素原子の観測が容易である中性子回折実験や計算機実験を相補的に用いることで、個々の水分子の時間空間的な動力学特性を明らかにすることができる」と期待される。

4. おわりに

生命科学は 21 世紀の科学の中で最も重要な科学と考えられている現在、中性子の生命科学に対する貢献が期待されている。結晶構造解析においては、X 線はタンパク質 3000 プロジェクトを現実としたようにハイスループットの解析の基本となる一方、中性子は機能と密接にかかわる水素の原子位置を精密に決定することができる [18]。動力学研究についても、本稿で紹介したように、中性子は X 線と相補的に利用することで興味深い結果を得ることができるはずである。しかし、少なくともタンパク質動力学の研究においては、入射中性子強度は必ずしも十分ではなく、そのために大量の試料と多大な測定時間が要求される。中性子源が限られている現状では、充当されるマシンタイムは決して満足すべきものではない。したがって、中性子は、一般の生物分野の研究者にとって利用しやすいとは言いがたい。しばしば生物分野にどのような分光器が必要であるのかといった議論がなされるが、既に現存する分光器でも研究は可能である。むしろ中性子の分光器を気軽に利用できるといったようなソフト面での工夫が、生物分野の研究の活性化には必要であろう。もちろん X 線のみならず他の手法で測定できない部分に関して中性子実験を行うといった計画性が重要なことはいままでもない。タンパク質の水素原子の位置の特定や水和構造、または時間軸に沿った分子の動力学構造などは、基本的には X 線では調べることができないため、これらの情報を得る手法として中性子への期待は大きい。我が国では現在、高エネルギー加速器研究機構と日本原子力研究所による大強度陽子加速器施設計画、いわゆる統合計画によって加速器駆動核破砕中性子源が建設中である。生物分野で有効利用される分光器が一台でも多く設置され、この分野の研究が活性化することを期待している。

5. 文献

1. J. C. Smith, *Quat. Rev. Biophys.*, 1991, 24: 227-291.
2. 片岡幹雄, *生物物理*, 1996, 36: 226-230.
3. 片岡幹雄, *波紋*, 1999, 9(3): 19-23.
4. 片岡幹雄, “タンパク質のかたちと物性”, (中村春木, 有坂文雄編), pp. 204-215, 共立出版 (1997).
5. W. Doster, *et al.*, *Nature*, 1989, 337: 754-756.
6. B.F. Rasmussen, *et al.*, *Nature*, 1992, 357: 423-424.
7. U. Lehnert, *et al.*, *Biophys. J.*, 1998, 75: 945-952.
8. 木寺詔紀, “タンパク質のかたちと物性”, (中村春木, 有坂文雄編), pp. 190-203, 共立出版

- (1997).
9. S.H. Chong, *et al.*, *Eur. Biophys. J.*, 2001, 30: 319-329.
10. W. Doster, *Eur. Biophys. J.*, 1989, 17: 217-220.
11. Y. Joti, *et al.*, *Acta Cryst.*, 2002, 58: 1421-1432.
12. 中迫雅由, *日本結晶学会誌*, 1999, 41: 57-65.
13. V. Reat, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 28: 4795-4797.
14. 上平恒, 逢坂昭, “生体系の水”, 講談社 (1989).
15. 中迫雅由, *日本結晶学会誌*, 1998, 40: 107-113.
16. J. Higo, *et al.*, *J. Comput. Chem.*, 2002, 23: 1323-1336.
17. C. Bon, *et al.*, *Biophys. J.*, 2002, 83: 1578-1588.
18. 新村信雄, 茶竹俊行, *波紋*, 2003, 13(1): 47-50.