BL-20B/2017G087

タンパク質結晶の動力学的回折効果の観測
Observation of Dynamical Diffraction Effect in Protein Crystals

鈴木凌 [1], 小泉晴比古 [2], 平野馨一 [3], 熊坂崇 [4], 小島謙一 [5], 橘勝 [1*]
[1] 横浜市立大学, 〒236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 22-2
[2] 名古屋大学, 〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町
[3] 高エネルギー加速器研究機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
[4] 高輝度光科学研究センター, 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
[5] 横浜創英大学, 〒226-0015 神奈川県横浜市緑区三保町 1
Ryo Suzuki[1], Haruhiko Koizumi[2], Keiichi Hirano[3],
Takashi Kumasaka[4], Kenichi Kojima[5] and Masaru Tachibana[1*]
[1]Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-0027, Japan
[2]Nagoya University, Furou-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan
[3]Photon Factory, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan
[4]Japan Synchrotron Radiation Research Institute, 1-1-1 Koto, Sayo-cho, Sayo-gun, 679-5198, Japan
[3]Yokohama Soei University, 1 Miho-cho, Midori-ku, Yokohama, 226-0015, Japan

1 はじめに

少子高齢化社会を迎え、病気の原因解明や新規薬剤の開発などを掲げ、タンパク質の立体構造の解明に関する研究が盛んに行われている。多種多様なタンパク質の構造を理解することは、生命現象を理解することも意味する。

タンパク質の立体構造の多くは、タンパク質の結晶を用いた X 線回折によって解明されている。しかし、その精度は、タンパク質結晶の品質に依存するため、構造が解かれても、創薬に使用できるデータは未だ 9 %ほどであると言われている。より高品質なタンパク質結晶を作製するため、国際宇宙ステーションを利用した微小重力実験をはじめとして、様々な研究が世界中で盛んに行われてきた[1]。

最近では高品質なタンパク質結晶と放射光による高輝度な X 線とを用いて高分解能で高精度な構造解析や電子密度の解析が行われるようになった。特に、電子密度の解析はタンパク質の重要な性質を決めている価電子状態とも深く関係している。しかし、これらの解析では、依然として回折強度の測定値と理論値に大きな違いが見られ、より高精度の解析にはこれらの改善が必要とされている。

結晶による X 線の回折現象は、運動学的回折と動力学的回折の二つに大きく分けられる。前者は、転位などの欠陥を含む一般の多くの結晶で観察される。現在、タンパク質結晶の X 線構造解析では前者の運動学的回折のみを考慮している[2]。一方で、後者の動力学的回折は、半導体結晶のシリコンのような極めて高品質（完全）な結晶でのみ生じる。したがって、動力学的回折の観察は、結晶の完全性の指標にもなる。しかしながら、これまでタンパク質結晶では動力学的回折の明瞭な証拠が得られておらず、その結晶品質が依然としてシリコンなどの高品質な結晶に比べて劣るのか、そもそも観察されないのか、タンパク質結晶で動力学的回折が観察できるかは長年の課題であった。

2 実験

本測定で用いたグルコースイソメラーゼ（Glucose isomerase, GI）結晶は種結晶から成長させる方法を用いて育成した。X 線トポグラフィ測定は PF の BL20B および SPring-8 の BL38B1 で行った。カバーグラス上に育成された GI 結晶をアクリルホルダーにセットし、ポリエチレンフィルムで封をした。ゴニオメーター上にマウントした後、1.2 Å の単色 X 線を入射し、高分解能 X 線 CCD カメラ（Photonic Science X-RAY FDI 1.00:1）を用いて目的の回折に合わせた。その後、結晶を微小回転（~0.0003º/step）させながら回折強度の測定を行った。X 線 CCD カメラでの撮影だけでなく、X 線フィルム（Agfa D2）を用いて回折像の撮影を行った。

3 結果および考察

用いた GI 結晶は、その X 線トポグラフ像より、欠陥がなく、等厚干渉縞の見られる極めて高品質な結晶であることがわかった。

このような結晶を用いて、回折 X 線のロッキングカーブ測定を行ったところ、その回折曲線の振動現象の観察に世界で初めて成功した。この振動現象は半導体結晶のシリコンのような完全結晶（あるいは極めて高品質な結晶）でしか観察されていない[3]。今回、得られた回折強度の振動現象が動力学的回折によるものであることを確かめるため、2 つの依存性を確認した。1 つ目は、入射する X 線の波長における依存性である。得られた回折強度の振動曲線は、波長が大きくなるほど振動の周期が短くなるという

理論から予測されるふるまいと非常に良い一致を示した。

2 つ目は、結晶の厚さにおける依存性である。実験では、結晶の厚さが大きくなるにつれて、回折強度曲線の振動の周期が短くなるふるまいが観測され、こちらも理論から予測されるふるまいと非常に良い一致を示した。

以上より、GI 結晶で観察された回折強度の振動現象は回折物理学に基づく動力学的回折理論と非常に良い一致を示した。これは、タンパク質結晶においても動力学的回折が起こることを示している。

4 まとめ

タンパク質結晶の動力学的回折現象の観測に世界で初めて成功した。本研究は、従来の構造解析では考慮されていない動力学的回折理論を取り入れる必要があることを示している。高品質なタンパク質結晶を用いた立体構造解析において、動力学的回折理論を考慮することで、回折強度の解析精度の改善につながり、より高精度な電子密度の評価、さらには理論化学計算との比較によるタンパク質の性質の原理的な理解が期待される。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費（25420694, 16K06708）および JST 戦略的創造研究推進事業（ACCEL）（JPMJAC1304）の助成を受けたものです。また、X 線トポグラフィ測定は KEK のフォトンファクトリー BL-20B（Proposal Nos. 2014G601, 2015G142, 2017G087）および SPring-8 の BL38B1（Nos. 2014A1850, 2014B1965, 2015A1994, 2015B1979, 2017A2562）にて行われました。

参考文献

[1] N. E. Chayen, J. R. Helliwell and E. H. Snell, *Macromolecular Crystallization and Crystal Perfection* (Oxford University Press, Oxford, 2010).
[2] J. R. Helliwell, *Macromolecular Crystallography with Synchrotron Radiation* (Cambridge University Press, Cambridge, 2005).
[3] W. H. Zachariasen, *Theory of X-ray Diffraction in Crystals* (Dover Publications, Inc., New York, 1945).

成果

1. Ryo Suzuki, Haruhiko Koizumi, Keiichi Hirano, Takashi Kumasaka, Kenichi Kojima and Masaru Tachibana, “Analysis of oscillatory rocking curve by dynamical diffraction in protein crystals”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115, pp.3634–3639 (2018).

* tachiban@yokohama-cu.ac.jp