



# 放射光X線を用いた タンパク質の実時間結晶構造解析

東京工業大学大学院 理工学研究科  
富田 文菜

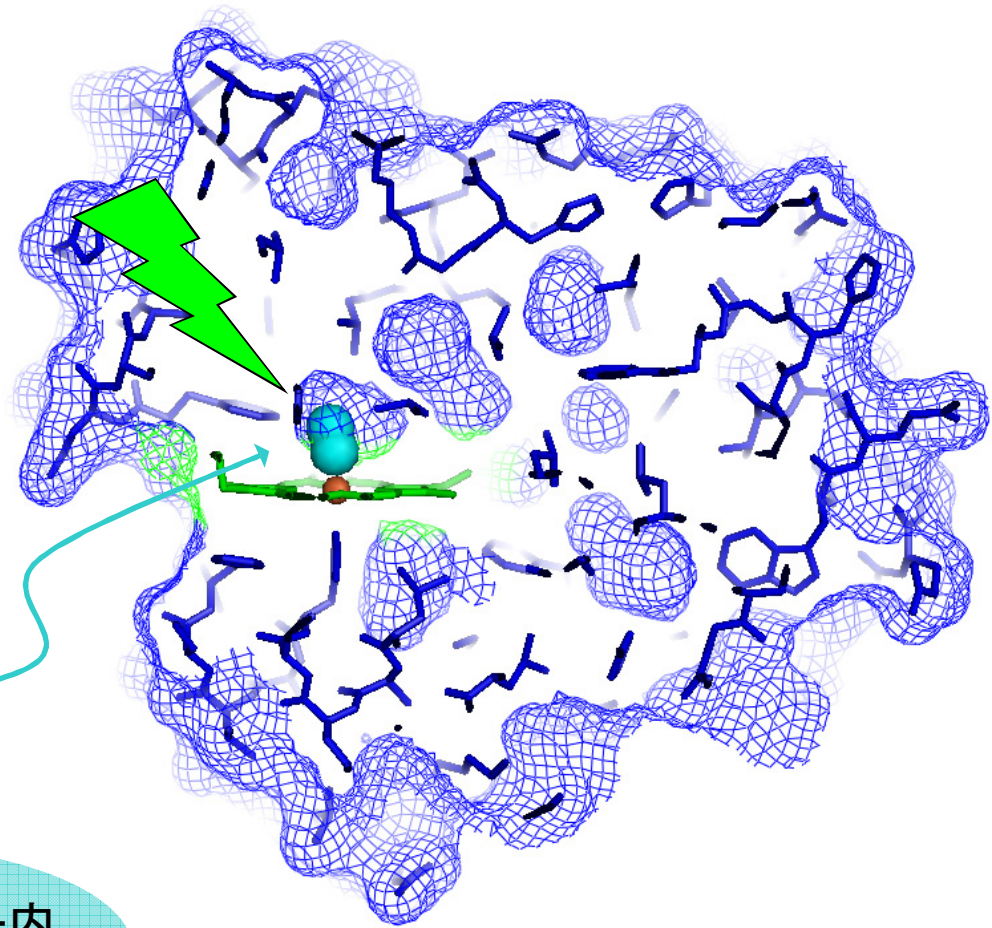


PF研究会 (2010.07.12-13)



# 酸素貯蔵タンパク質・ミオグロビン

- 筋肉中での酸素貯蔵を担うタンパク質
- 分子量 ~ 17,000
- アミノ酸153 個から成る
- 1つのヘムを持つ
- 配位子:  $O_2$ 、 $CO$ 、 $NO$  など
- 光照射により、配位子分子を放出する

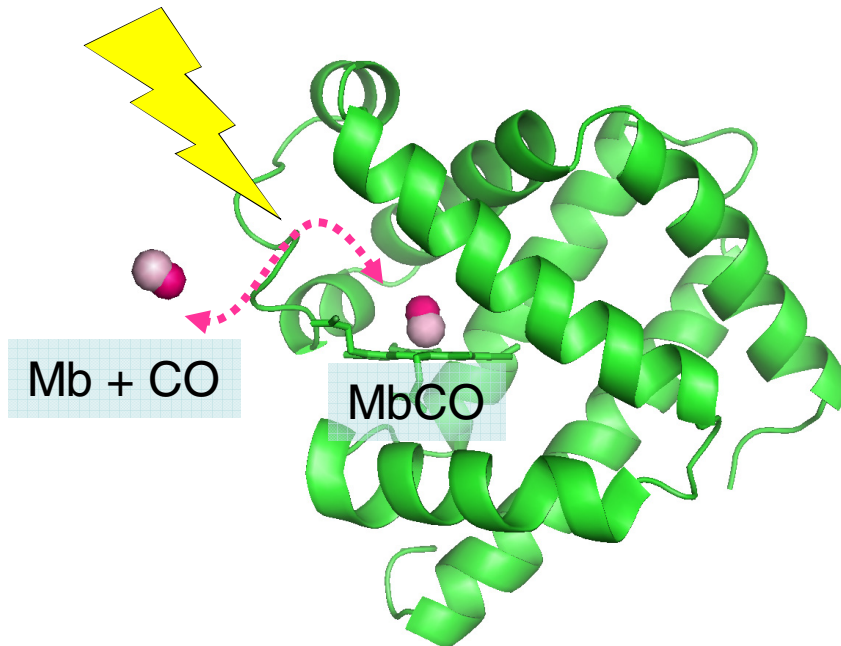


ミオグロビン分子内  
配位子輸送経路？

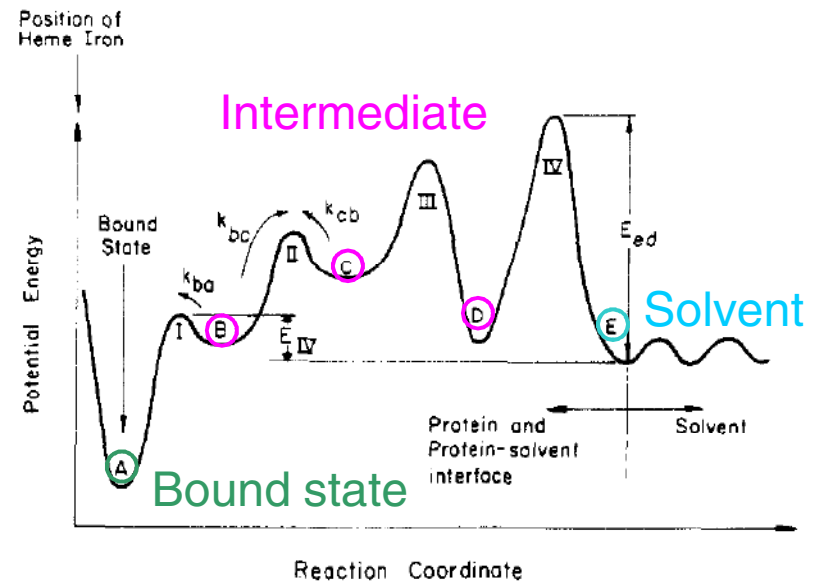


# CO光解離中間狀態

MbCO 光解離·再結合



Energy diagram of migration dynamics



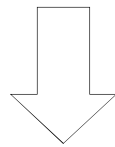
R. H. Austin *et al.*, *Biochemistry*, **14** (1975) 5355.



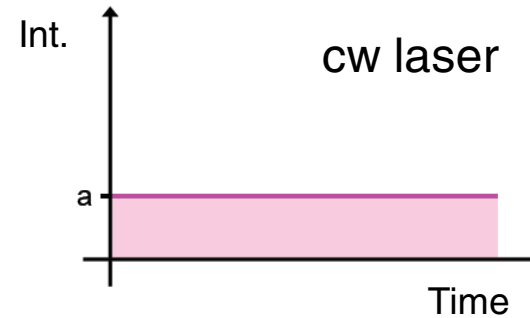
# Novel illumination method

## 低温条件下での光照射実験

主に連続光源が用いられている



a:  $4.6 \text{ mW/mm}^2$



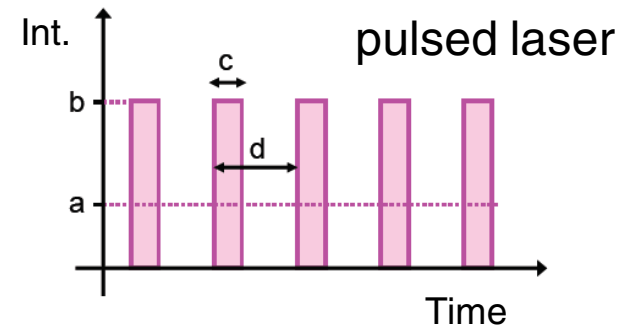
## 低温条件下でのパルスレーザー照射

a:  $4.6 \text{ mW/mm}^2$

b:  $153.3 \text{ W/mm}^2$

c: 2 ns

d: 66  $\mu\text{s}$



高い尖頭値 (b)

→ 励起密度が高く、光解離が進みやすい。

短い照射時間(c)

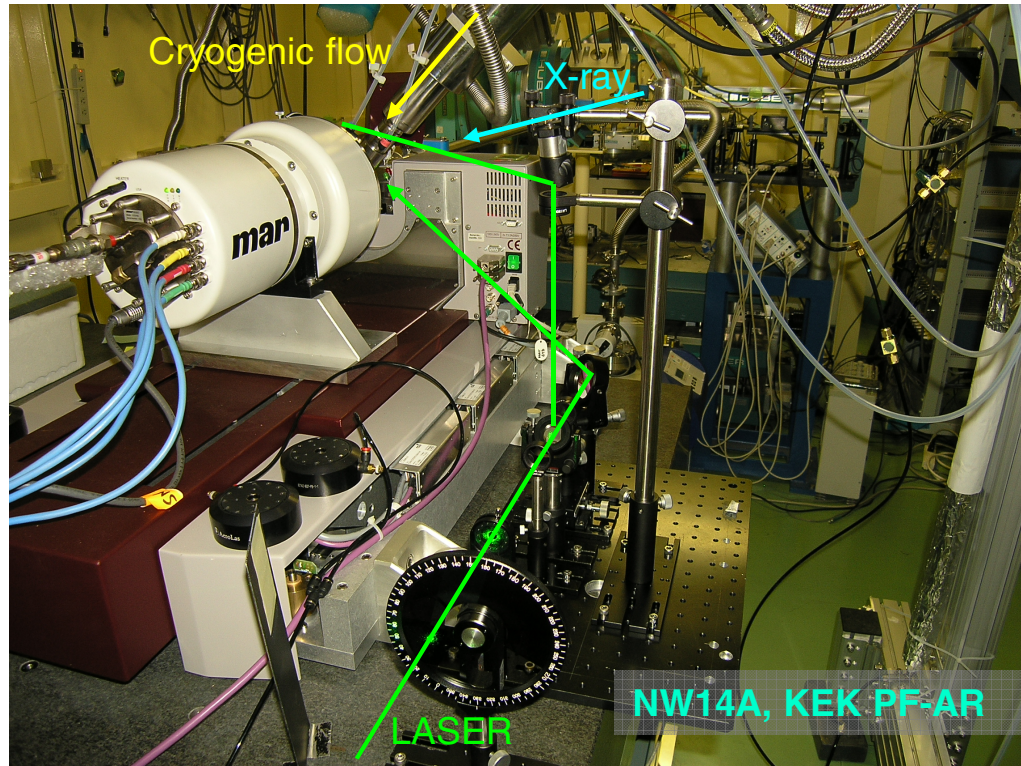
→ 試料の平均温度は低く保たれ、励起状態をホールド可能。

低温での測定

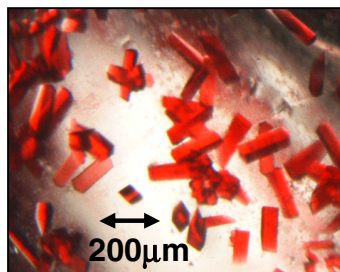
→ 比較的高分解能の測定が可能。



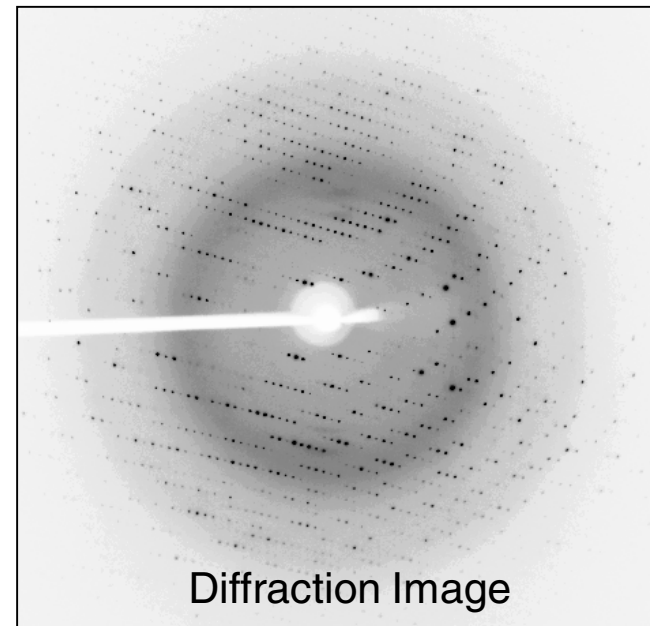
# Experimental Set Up



Sample size:  $200 \times 400 \times 20 \text{ } \mu\text{m}^3$   
X-ray:  $0.827 \text{ } \text{Å}$  (15 keV)  
Laser: YAG SHG (532 nm)  
15 kHz,  $4.6 \text{ mW/mm}^2$   
Detector: marccd165  
Cryogenic equipment :  $\text{N}_2$  flow  
Temperature: 100~140 K



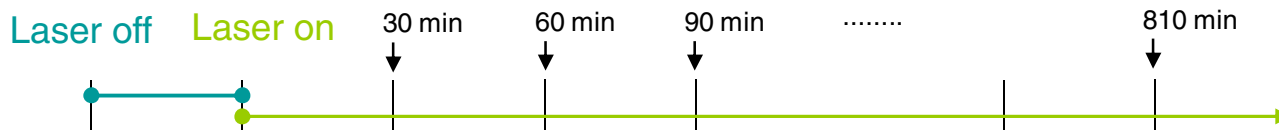
Native sperm whale MbCO  
single crystal



Diffraction Image



# 120 K での測定結果



Statistic	Laser off	810 min
Space group	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1
Cell dimensions a, Å	34.536	34.462
b, Å	30.847	30.714
c, Å	63.897	63.932
$\beta$ , °	105.647	105.617
Wavelength, Å	0.827	0.827
Resolution, Å	50.0–1.22	50.0–1.21
$R_{\text{merge}}$	0.039(0.469)	0.054(0.421)
//sigma	9.5(1.1)	10.6(1.3)
Completeness	0.835(0.377)	0.952(0.586)
Redundancy	3.2(2.0)	3.5(2.0)
No. reflections	33,220	37,777
$R$ factor	0.153	0.146
$R_{\text{free}}$	0.207	0.191
No. atoms	1,438	1,429
Mean $B$ value	15.257	15.139
rmsd bond length, Å	0.027	0.022
rmsd angle, °	2.179	2.015

$R_{\text{merge}}$ : ~5 %  
分解能: 1.2 Å

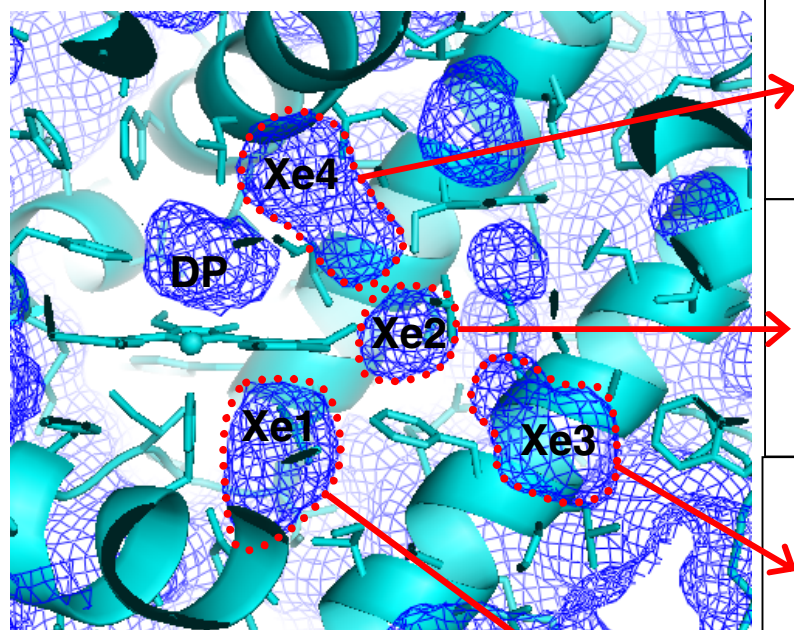
$R_{\text{factor}}$ : ~15 %  
結合長標準偏差: 0.02 Å

Laser off  
30 min  
150 min  
300 min  
450 min  
600 min  
750 min  
810 min

Values in parentheses are for the highest resolution shell (1.25-1.21 Å).



# CO migration at 120 K



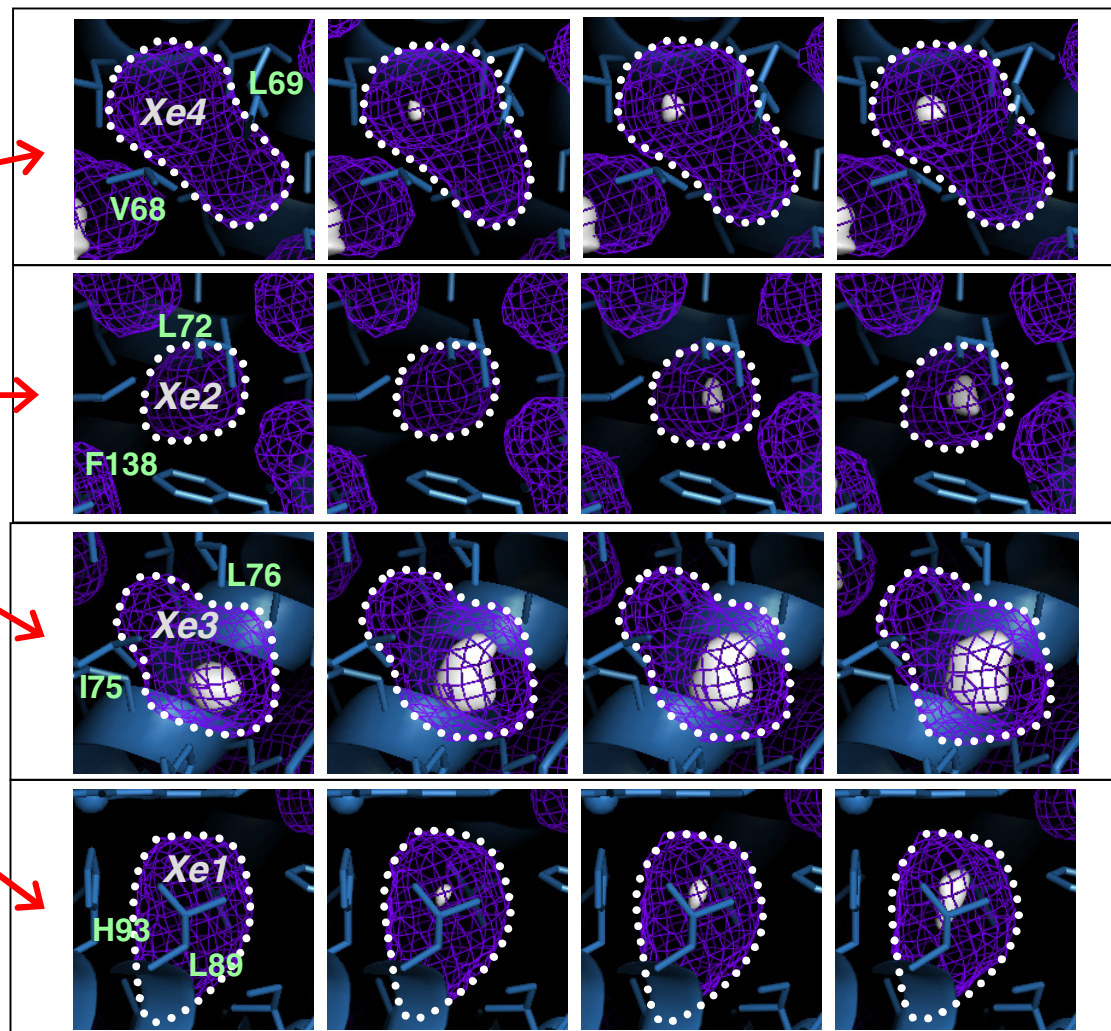
0.3 electron /  $\text{Å}^3$

Laser off

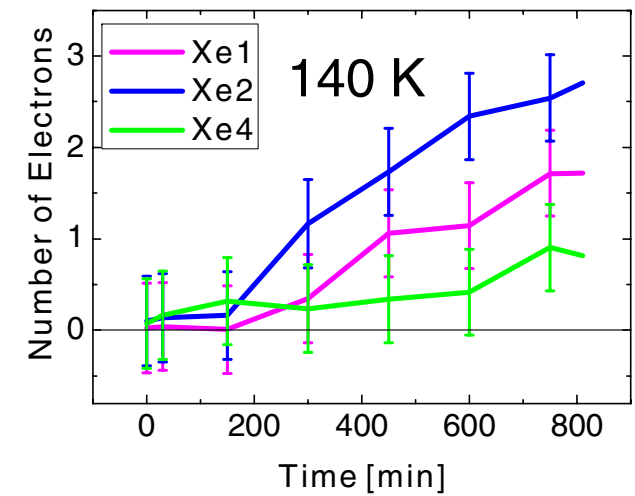
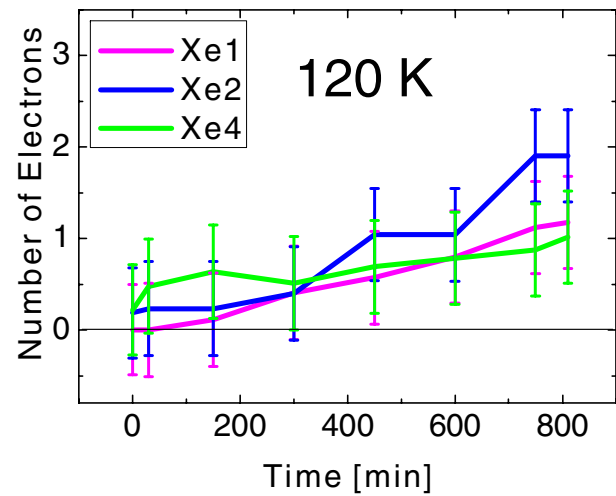
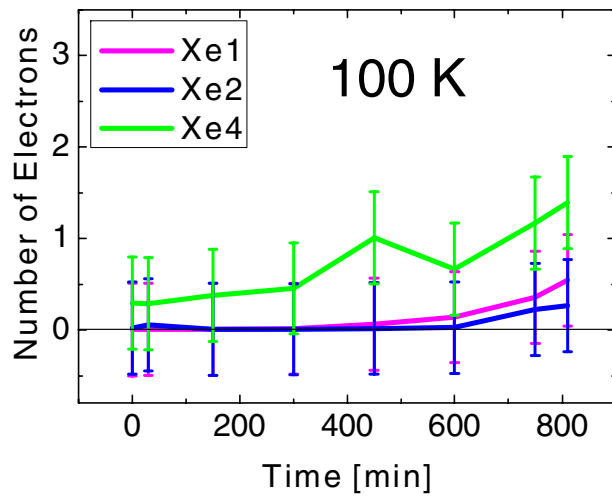
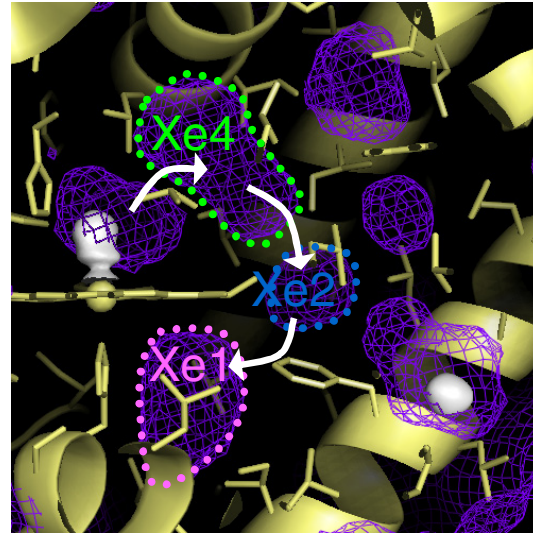
300 min

450 min

810 min

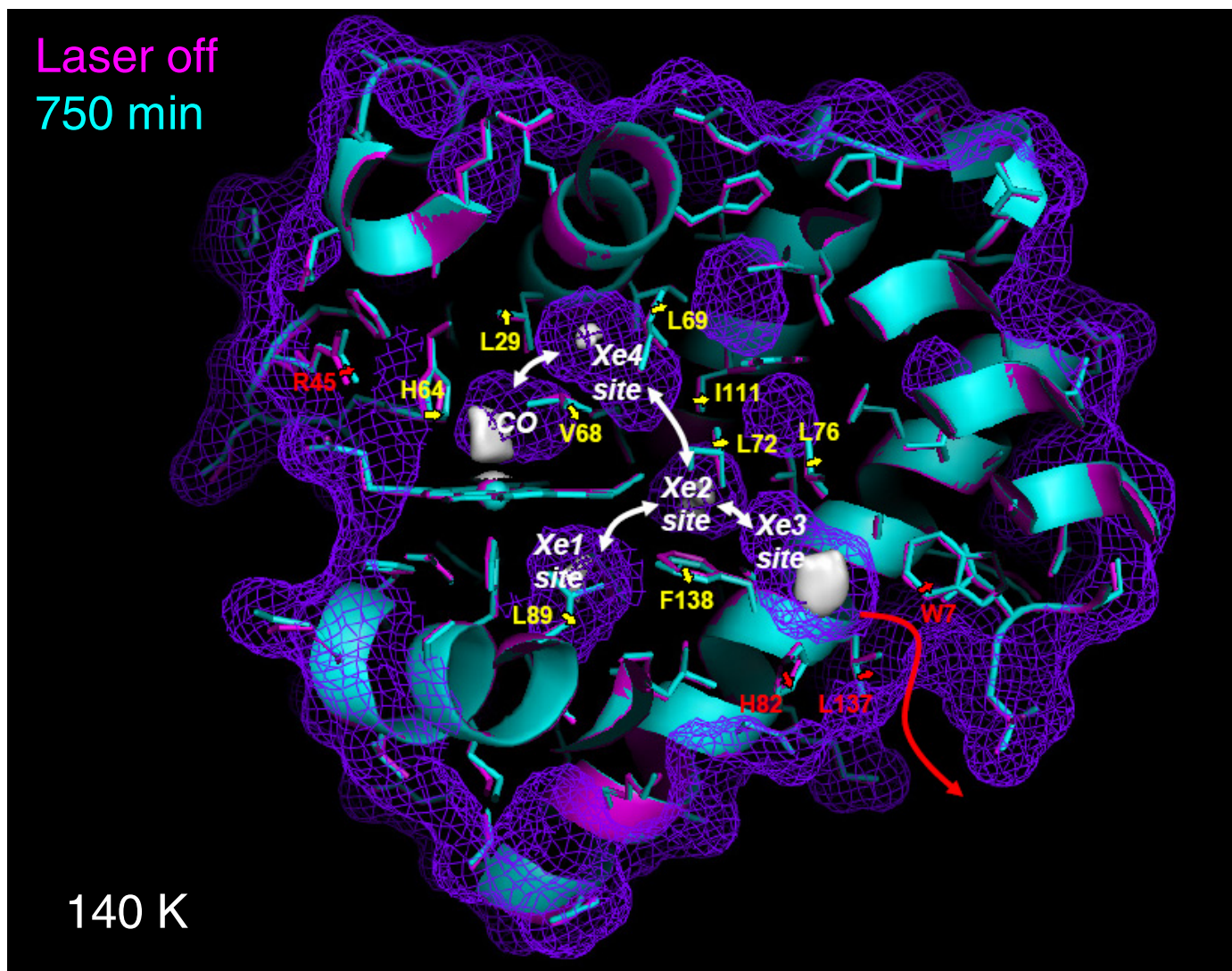


# Time course of Number of Electron in the Cavities



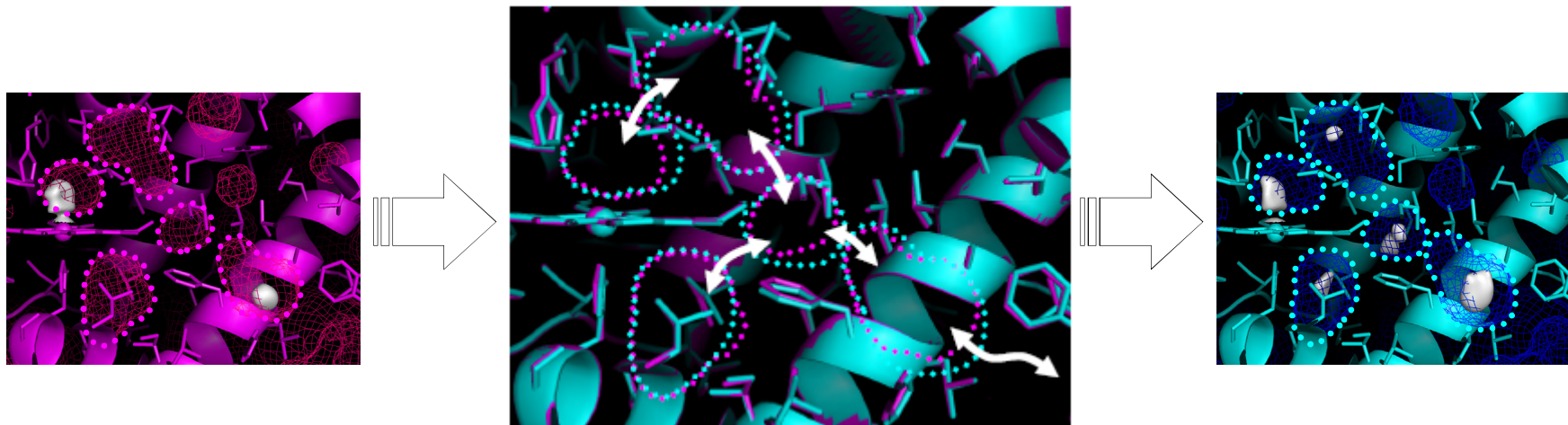


# Migration pathway of Mb



## まとめ

- +
  - +
- 光解離CO輸送過程の直接観測に成功
- CO輸送に伴う分子内空洞の変形を観測



- +
  - +
- 実験から得られた原子座標を用いて、分子動力学(MD)計算を試みている。
- 他の機能タンパク質への適用  
— Hemoglobin, 光合成反応中心 等



## 今後の展望

### ✦ 不可逆反応のダイナミクス測定

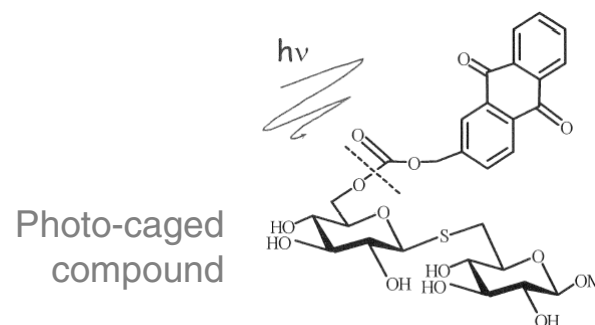
検出器の種類	Read out time:	Dataset 測定 所要時間	ターゲットのダイナミクス
CCD: データ積分型	2.5 s	~20 min	数時間オーダー
Pilatus (Dectris): データフロー型	2.7 ms	~1 min ?	数分~数十分オーダー

### ✦ 結晶中での反応の開始 (光反応以外もターゲットに)

- ・ 抗凍結剤に基質を導入
- ・ Caged 化合物の複合体

### ✦ 反応速度の制御

- ・ 温度制御
- ・ Mutation による活性の抑制



# Acknowledgment



高エネルギー加速器研究機構

佐藤 篤志、一柳 光平、野澤 俊介、足立 伸一



横浜市立大学

河合 文啓、野口 大貴、雲財 悟、朴 三用



名古屋大学

都築 峰幸、倭 剛久



東京工業大学

星野 学、腰原 伸也

(敬称略)

## 関連論文等

[1] A. Tomita *et al.*, “Tracking ligand-migration pathways of carbonmonoxy myoglobin in crystals at cryogenic temperatures”, *Acta Cryst.* **A66**, 220-228 (2010).

[2] 富田文菜 他、「タンパク質分子内にある疎水性キャビティーの『深呼吸』を観る～ 時間分解X線構造解析法によるタンパク質のダイナミクス研究 ～」、*蛋白質 核酸 酵素*、9月号、2009年

[3] A. Tomita *et al.*, “Visualizing Breathing Motion of Internal Cavities in Concert with Ligand Migration in Myoglobin”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **106**, 2612-2616 (2009).

