

新世代中性子構造生物学の開拓

Neutron Structural Biology for New Generation

課題番号：18H05229

杉山 正明 (SUGIYAMA, MASAOKI)

京都大学・複合原子力科学研究所・教授



研究の概要

最新鋭の中性子分光器を用いた測定と試料調製技術・計算科学による解析を駆使し、時間スケールで psec- μ sec、空間スケールで fm- μ m に存在する生体高分子のドメインの運動とそのドメイン間共同運動を解き明かす手法を開発する。この手法を用いて生体高分子の階層間連携ダイナミクスを解明する新世代中性子構造生物学を開拓する。

研究分野：量子ビーム科学

キーワード：中性子溶液散乱、重水素化、MD 計算、蛋白質階層間連携ダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

生命科学においては、1990年代から今日まで X線結晶構造解析・NMR・クライオ電子顕微鏡などを用いて多くの生体高分子の構造が解明されてきた。そこで、これらの成果を踏まえた次の研究目標として、生体高分子の作用機序に直結する「溶液中での生体高分子の動き＝ダイナミクス」が注目されてきた。生体高分子の代表である蛋白質は図1上段に示すように階層構造を持っていることが知られており、実験・計算機の研究からそれぞれの階層の運動は下段に示す時空間マップに示した領域に存在していると考えられている。この中で、ドメインの内部運動がドメイン間の共同運動に階層間をわたって連動していく「ゾーンII」「ゾーンIII」の運動を実験的に測定する手法はほとんど存在していない。したがって、この領域のダイナミクスを計算のみでなく実験面からも解明し、両者を協奏的に用いて研究することの必要性が高まっていた。

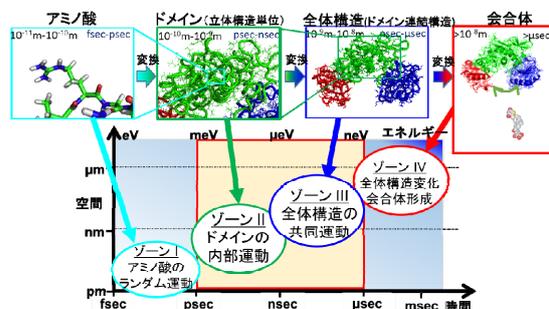


図1：蛋白質の階層構造(上)と各階層の運動(下)。

2. 研究の目的

本研究は、J-PARCをはじめとする世界中において建設・利用されつつある高精度中性子分光器の中で「中性子小角散乱 (SANS)」「中性子準弾性散乱 (QENS)」「中性子スピンエコー (NSE)」を積極的に用いてこの時空領域 (ゾーンII・ゾーンIII) の生体高分子の運動を解明する手法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

構造・機能に特徴を持つ3つの蛋白質 (マルチドメイン蛋白質: MurD 及び Tri-Ub, 天然変性蛋白質 Hef) を用いた。

中性子は散乱プローブとしては高い同位体識別能を持つ。この特長を生かした中性子溶液散乱法 (SANS, QENS, NSE) では「生体高分子のドメインを選択的に重水素化」することで「軽水素-重水素間において著しく大きい同位体効果」を利用して、任意のドメインを不可視化・可視化することが可能となる。そこで、対象とするマルチドメイン蛋白質において任意のドメインを選択的に重水素化する新たな蛋白質調製技術の開発を行う。

上述の新規試料調製技術で調製した試料を用いた SANS・QENS・NSE の測定と分子動力学 (MD) 計算をはじめとする連携解析法を開発し、生体高分子における「階層間連携ダイナミクス」を明らかにする。更に、開発した技術は広く公開し、中性子の生体高分子のダイナミクス研究への利用促進を図るとともに中性子生命科学の発展に貢献する。

4. これまでの成果

試料調製技術開発では、全ての対象試料で重水素化に成功しており、この重水素化技術はマニュアル化してHP上で公開した。

既に対象蛋白質ではH体に関しては測定に必要な量の試料調製が可能となっており、これらを用いたダイナミクス測定を開始している。図2にJ-PARCの中性子準弾性散乱装置(BL02:DNA)での測定結果を示す:時空間マップ(図1下)ではゾーンIIに相当する。試料はHefとMurDというドメイン構造が異なる蛋白質である。天然変性蛋白質であるHefは特定のフォールディング構造を持っていない。一方で、MurDはフォールディングした3つのドメインから構成されている。

QENSによるドメインダイナミクス解析

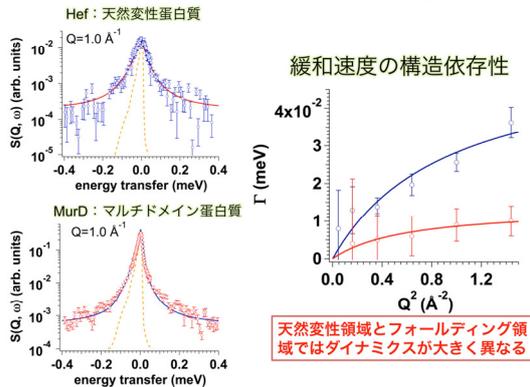


図2: HefとMurDのQENS。(左) $Q=1.0\text{\AA}^{-1}$ でのスペクトル。実線はモデル関数での最小2乗フィッティングの結果。(右)モデル関数のフィッティングより求められた内部運動の Γ の Q 依存性。青: Hef, 赤: MurD。

図2(左)に示すように得られたQENSデータはHef・MurDともに並進・回転拡散運動及びドメインの内部運動成分を加味したモデル関数(実線)で記述できた。このモデル関数から求められた内部運動由来の Γ の Q 依存性を求めると図2(右)となる。両サンプルで明らかに Q 依存性が異なり、特にHefは高い Q で大きな緩和速度(Γ 値)を持つことから、これらの空間スケールでもMurDと比較してより激しく運動していることが分かった。これが天然変性蛋白質の運動の特徴であると示唆される。

5. 今後の計画

試料調製技術開発では、ドメインライゲーション技術の確立を目指す。現状では、Tri-Ubは一つのドメインを重水素化したライゲーション試料の調製に成功しているが、MurD, Hefについてもライゲーション手法・培養手法の検討を行い溶液散乱に利用可能な量の調製を目指す。

散乱測定では、上述のヘテロドメイン重水

素化マルチドメイン蛋白質を用いてゾーンII・ゾーンIIIのダイナミクス測定を進める。

得られたデータのMDとの連携解析を行い階層間連携ダイナミクスの解明を目指す。MD解析では現在、図3に示すような新規MD法であるカスケードMD法による構造解析法の開発を進めており、単純なドメイン構造の蛋白質には適用可能となっている。今後は複雑なマルチドメイン蛋白質にも適用可能となるように開発を進める。

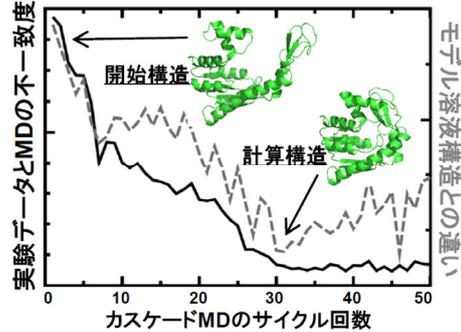


図3. カスケードMD法による溶液散乱データを再現する構造の探索。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. A. Matsumoto[‡], M. Sugiyama[‡], H. Kono, et al., "Structural studies of overlapping di nucleosomes in Solution", *Biophysical J.*, (2020) (in press). [‡]: equal contribution
2. M. Yagi-Utsumi, M. Sugiyama, K. Kato, et al., "Supramolecular tholos-like architecture constituted by archaeal proteins without functional annotation", *Sci. Rep.*, **6** (2020) 1540.
3. 杉山正明、井上倫太郎、中川 洋、斉尾智英、「中性子溶液散乱 — 現在・過去・未来 —」、中性子科学学会誌「波紋」、2020年2月号, 16-25.
4. M. Oide, T. Oroguchi, M. Nakasako, "Energy landscape of domain motion in glutamate dehydrogenase deduced from cryo-electron microscopy", *The FEBS J.*, in press.
5. R. Inoue, M. Yagi-Utsumi, M. Sugiyama, "Newly developed Laboratory-based Size exclusion chromatography Small-angle x-ray scattering System (La-SSS)", *Sci. Rep.*, **9** (2019) 12610.
6. H. Nakagawa, et al., "Universality and structural implications of the Boson peak in proteins", *Biophysical J.*, **117** (2019) 229.
7. S. Yanaka, M. Sugiyama, K. Kato, et al., "Dynamic views of the Fc Region of immunoglobulin G provided by experimental and computational observations", *Antibodies*, **8** (2019) 39.

7. ホームページ等

<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/NSBNG/activity.html>