

IIII 宇宙における高品質タンパク質結晶化技術の伝承と可能性 IIIII
(原著論文)

[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶解析に向けての良質大型単結晶の調製

西川 幸志・樋口 芳樹

Preparation of the Crystals of [NiFe] Hydrogenase Suitable for the Neutron Structure

Koji NISHIKAWA and Yoshiki HIGUCHI

Abstract

X-ray structure analysis method has been widely utilized to solve the structure of biological macromolecules. It is, however, also well known that the hydrogen atoms and protons, which are important to understand the structure-function relationship of them, are hardly visible in the electron density map due to the small atomic scattering factor of hydrogen. To visualize hydrogen species, neutron structure analysis is the most powerful technique, because the nuclear scattering length of hydrogen is comparable to those of other atoms comprising the protein molecules. Though many x-ray crystal structures of [NiFe] hydrogenases were reported so far, the real proton pathway and reaction mechanism at the Ni-Fe active site are still unclear. In this paper, we report how to prepare the high-quality large single crystals by using an improved crystallization phase diagram for [NiFe] hydrogenase.

Keyword(s): [NiFe] Hydrogenase, Neutron structure analysis, Phase diagram.

Received 8 November 2016, Accepted 5 January 2017, Published 31 January 2017

1. はじめに

タンパク質をはじめとする生体高分子の特異的な細胞内「機能」を理解するためには、その「構造」情報は欠かせない。生体高分子の精密な立体構造を知る方法としては、X線結晶解析が最も効果的な方法であることに誰も異論はないであろう。我々は1.0–2.0 Å分解能のX線結晶解析により、炭素、酸素、窒素、硫黄原子等について10⁻² Å程度の精度の結合距離に基づいた構造–機能相関の議論が可能である。しかし、タンパク質の立体構造の維持や機能発現時に起こる構造変化、さらには酵素分子等の活性部位で進む触媒反応には水素結合やプロトン、さらには水素原子の付加・脱離反応が重要な役割を持つことも周知のことである。X線の原子に対する散乱能は原子番号に比例するため、電子を1個しか持たない水素原子をX線結晶解析によって正確に同定することは困難である。一方、中性子散乱強度は、原子番号には関係なく原子種によって決まる。水素あるいはプロトンによる中性子散乱能は、タンパク質を構成する非水素原子による散乱能と同程度であるため、

同程度の精度で水素を同定することが可能となる。しかし、現時点で利用可能な中性子線源の輝度は放射光 X線源に比べて非常に小さいため、高精度の中性子回折像の取得には少なくとも1 mm³の体積を持つ良質のタンパク質巨大単結晶が必要となる。[NiFe]ヒドロゲナーゼは水素の分解・合成を触媒する金属酵素である¹⁾。これまでにいくつかの種類の細菌から見出された酵素が、高分解能でX線結晶解析されており^{2,3)}、基本的な構造基盤は確立されている^{4,5)}。Ni-Fe活性部位はタンパク質分子内部の中心付近に保持され、そこからタンパク質表面まで水素チャネルとプロトン経路（水素結合ネットワーク）が構築されている。他に、触媒（酸化還元）反応に関わる電子の通り道である3個の鉄–硫黄クラスターが、活性部位から分子表面までほぼ一定の距離で直線上に配置されている。ここで、プロトン輸送経路も水素トンネルも複数個同定されており、実際の酵素触媒反応でどれが利用されているのか、あるいは全てが利用されるのかについていまだに推測の域を出ない⁶⁻⁸⁾。ヒドロゲナーゼにおいて、水素チャネルやプロトン経路に

兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1
Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan.
(E-mail: nishikaw@sci.u-hyogo.ac.jp)

おける高効率な物質輸送, さらには触媒反応機構解明のためには水素・プロトンの観測が必要不可欠である。

我々は, 硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (DvMF) 株由来の「NiFe」ヒドロゲナーゼについて上記を完全に理解することを目的にその中性子結晶解析を目指している。そのために 1 mm³以上の体積を持ち, さらに高分解能回折データを与える単結晶の調製に力を注いできた。従来, ヒドロゲナーゼの結晶化は核となる種結晶を結晶化母液にマクロシーディングし, シッティングドロップ蒸気拡散法によって行ってきた。しかし, 結晶化ドロップ中に複数の結晶が析出することが多く, 良質巨大単結晶の調製に成功する確率は低かった。そこで本研究では効率よく良質巨大単結晶を調製する条件を再探索するため, ヒドロゲナーゼ酵素溶液に関して結晶化相図(沈殿曲線・溶解曲線)の作成を行った。その後, 得られた結晶化相図を基に, 微結晶の生成確率が抑制され, 再現性良く良質巨大単結晶が得られる結晶化条件の最適化に成功した。

2. 結晶化相図の作成

溶液中では, タンパク質分子が解離・会合を繰り返す過程で個々の分子間に特異的な相互作用が生じ, 最終的には規則的な会合体を形成する。タンパク質の会合体がある一定の大きさに達すると, 自由エネルギー変化が負となり, 自発的に分子同士の会合が進行する。この過程が核形成であり, 続いて結晶成長が開始され結晶が形成される。

結晶化相図のモデル図を示す (Fig. 1)。結晶化相図では, 溶解領域, 結晶成長領域, 核形成領域, 沈殿領域から成るタンパク質溶液の相変化の様子を, 横軸に沈殿剤濃度を縦軸にタンパク質濃度をプロットしている。溶解曲線より上部にある結晶成長領域, 核形成領域ではタンパク質溶液は過飽和状態にあり, タンパク質の会合が始まる。しかし, 過飽和度の低い結晶成長領域では, 分子の会合が生じて不安定であり, 結晶核を形成する以前に解離してしまう。

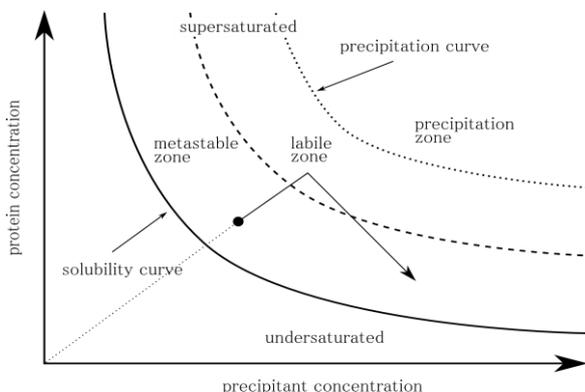


Fig. 1 Schematic phase diagram for crystallization of macromolecules.

また, 過飽和度が高い沈殿領域では, 分子同士の会合が無秩序に進行し, アモルファス状の沈殿物が生じる。一方で, 適度な過飽和度である核形成領域では, タンパク質同士が規則的に会合することで結晶核を形成する。過飽和状態に対して, 溶解曲線より下方の溶解領域を未飽和状態といい, この領域においてタンパク質は溶解する。

中性子結晶構造解析では, 試料の重水素化を行うことが推奨される。中性子散乱現象において, ほとんどの原子では干渉性散乱に対する非干渉性散乱の割合は数%と低い値である。しかし, 水素原子の非干渉性散乱の割合は約 80%と高い。中性子回折実験において, 水素原子に由来する非干渉性散乱は回折像のバックグラウンドを増加させる原因となる。従って, 中性子結晶構造解析では, 水素原子を干渉性散乱が支配的な重水素原子に置換した試料を用いることで, 構造解析に適した回折像の取得が可能となる。理想的にはタンパク質分子中の全ての水素原子を重水素原子に置き換えた試料を用いることが望ましい。しかし, 本研究で対象とする[NiFe]ヒドロゲナーゼの人工発現系をつくることは非常に難しいため, 結晶に含まれる溶媒構成分子(結晶体積の 45 %は溶媒分子が占める)の水素原子のみを重水素原子に置き換えることとした。これにより, できる限り非干渉性散乱を抑えることが可能と考えて, 重水素化緩衝液中での結晶化相図の作成を行った。

2.1 [NiFe]ヒドロゲナーゼの精製と種結晶の調製

菌体の培養および [NiFe]ヒドロゲナーゼの精製は, (Higuchi *et al.*, 1987)⁹⁾に記述されているプロトコールに従って行った。菌体の培養・ヒドロゲナーゼの精製は全て通常の水素原子を含んだ緩衝溶液中で行い, 最終精製標品に対して, 25 mM 重水素化緩衝溶液・D_Trис-DCl (pD7.4)で希釈・濃縮を繰り返すことで緩衝液を置換し, 重水素化試料を調製した。結晶化相図作成に用いる結晶の調製はシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて行い, 0.33 mM [NiFe]ヒドロゲナーゼ, 33 % 重水素化 2-メチル-2,4-ペンタンジオール (D_MPD), 25 mM D_Trис-DCl (pD7.4)となるように調製した結晶化母液を, 50 % MPD, 25 mM D_Trис-DCl (pD7.4)に対して蒸気平衡させて作成した。

2.2 溶解曲線の作成

1.5 mL エッペンドルフチューブ内に, 5 種類の濃度系列 (25.0%, 27.5%, 30.0%, 32.5%, 35.0%) からなる D_MPD, 25 mM D_Trис-DCl (pD7.4) 溶液 20 μ L を調製した後, それぞれの D_MPD 溶液にヒドロゲナーゼ結晶を加え, 10 $^{\circ}$ C で 2 週間静置し結晶を溶解平衡させた。各濃度の D_MPD

溶液中において、400 nm における上清の吸光度を測定し溶液中に溶解したヒドロゲナーゼ濃度を決定した。また、上清の D_MPD 濃度を、400 nm のヒドロゲナーゼの吸光度から(4)式により推定した。

上清に溶け出したヒドロゲナーゼの質量は

$$\frac{(1 - 0.45) \times V_x}{0.73} = 0.753 \times V_x \text{ [mg]} \quad (1)$$

溶液 20 + V_x [μL]にヒドロゲナーゼ 0.753 V_x [mg]が溶解しているので、ヒドロゲナーゼ濃度は

$$\frac{0.753 \times V_x}{(20 + V_x)} = \frac{A_{400}}{47} \times 0.0913 \text{ [mg/μL]} \quad (2)$$

で表され、これを V_x について整理して

$$V_x = \frac{1.826 \times A_{400}/47}{(0.753 - 0.0913 \times A_{400}/47)} \quad (3)$$

溶解結晶体積 V_x [μL]を得た。よって、結晶の溶解が平衡に到達した時のドロップの D_MPD 濃度は

$$C_{\text{MPD,cal}} \text{ [%]} = \frac{(C_{\text{MPD,ini}} \times 20 + 50 \times V_x \times 0.45)}{(20 + V_x)} \quad (4)$$

で計算される。ただし、ヒドロゲナーゼの分子量を 91,300、400 nm におけるヒドロゲナーゼのミリモル吸光係数を 47¹⁰⁾、ヒドロゲナーゼ結晶の溶媒含有率を 45 %、ヒドロゲナーゼの偏比容を 0.73 mL/g、溶解した結晶の体積を V_x (μL)、400 nm での吸光度を A₄₀₀、ヒドロゲナーゼ添加前の D_MPD 初濃度を C_{MPD,ini}、結晶溶解後の D_MPD の推定濃度を C_{MPD,cal} とした。過飽和状態におけるドロップの D_MPD 濃度 (%) -タンパク質濃度 (mM) をプロットし、溶解曲線を作成した。

2.3 沈殿曲線の作成

ガラスプレート上に、6 種類の濃度 (1.2 mM, 1.0 mM, 0.8 mM, 0.6 mM, 0.4 mM, 0.2 mM) からなるヒドロゲナーゼ酵素溶液 10 μL を調製した後、それぞれの酵素溶液に D_MPD を 0.2 μL 添加し、十分に攪拌した。D_MPD 添加によって析出したヒドロゲナーゼの沈殿が攪拌によって溶解しなくなるまで D_MPD の添加を続けた。D_MPD の総添加量からドロップ中の D_MPD 濃度 (%) およびヒドロゲナーゼ酵素濃度 (mM) を求め、沈殿曲線を作成した。

3. 実験結果と考察

3.1 結晶化相図の作成

2.2. 溶解曲線および 2.3. 沈殿曲線作成のための結晶溶解および沈殿生成実験は独立にそれぞれ3回ずつ行い、Fig. 2 の結晶化相図を得た。溶解曲線および沈殿曲線は、プロット領域が比較的狭い領域の区間であるとみなしそれぞれ 1 次の関数として近似、フィッティングを行った。

3.2 結晶化条件の最適化

従来の結晶化条件に従い、角スチロールケース No.1 (W65xD34xH18 mm) に 6 ウェルガラスプレート (W50xD29xH3 mm, φ10 mm) をはめ込んだ特製の結晶化ケースを用いて、0.33 mM [NiFe]ヒドロゲナーゼ、33 % D_MPD, 25 mM D_Trис-DCl (pD7.4)となるように調製した結晶化母液を各ウェルにそれぞれ 30 μL ずつ滴下し、種結晶をシーディングした。5 mL の 50% MPD, 25 mM D_Trис-DCl pD7.4 に対して蒸気平衡させることで、結晶化を行った (Fig. 3 (a))。この条件では、ヒドロゲナーゼの茶色い針状結晶が複数析出したために巨大単結晶が形成される確率が非常に低いものであった (ヒドロゲナーゼ

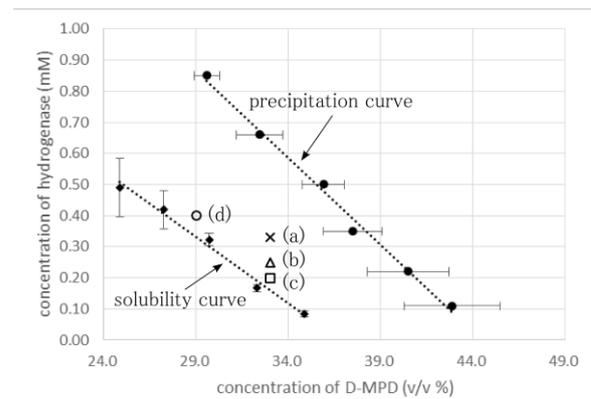


Fig. 2 Crystallization phase diagram of the [NiFe] hydrogenase from DvMF.

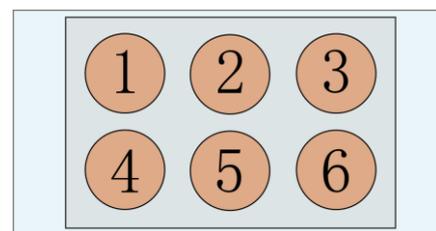


Fig. 3 (a) Illustrative overhead drawing of the crystallization case. Each well are numbered from No. 1 to No. 6.

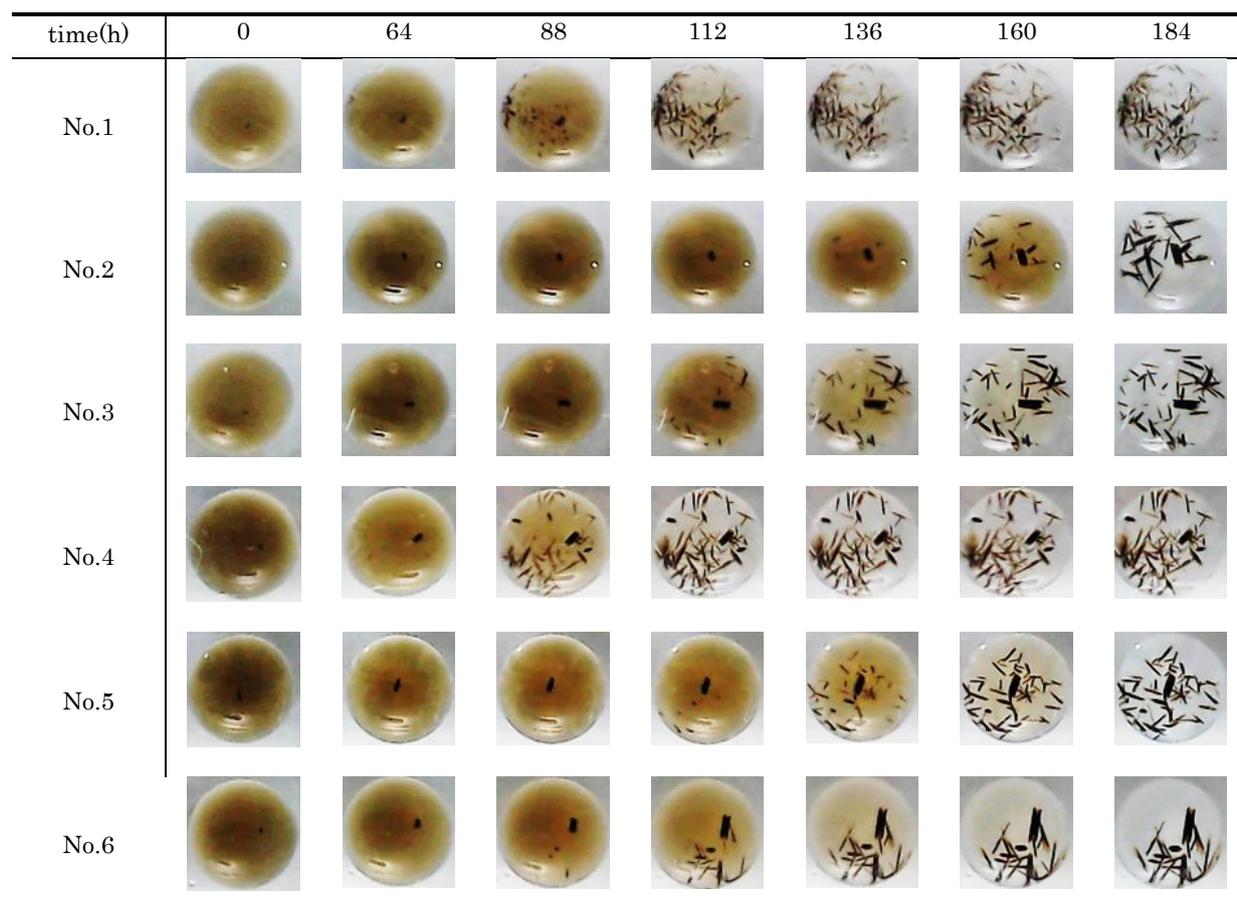


Fig. 3 (b) Crystal growth over the time-course (0-184 h) of the crystallization experiment.

は大サブユニットの活性部位に Ni と Fe を、また小サブユニットには電子伝達体として鉄-硫黄クラスターを持つため可視光を吸収し、茶色を呈する)。No. 1 から No. 6 の各ウェルでの結晶成長の様子を時間毎に観察した結果を Fig. 3 (b) に示す。結晶化開始直後は、シーディングされた種結晶が徐々に成長する。開始からおおよそ 90-110 時間では種結晶の他に核の形成および成長が見られた。蒸気拡散法では、Fig. 1 の●と矢印で示したように結晶化開始後、結晶化母液とリザーバー液の濃度差の駆動力で母液の濃縮が起こり、その後、溶液中の核が成長する。この結晶化条件では、母液の濃縮過程で、移植した種結晶表層から剥離した小片、あるいはドロップ中に新たに形成された微小核も同時に成長していることが考えられた。そこで、リザーバーの沈殿剤濃度を低くしてドロップ内との沈殿剤濃度差を小さくすることで、すなわち蒸気拡散速度（濃縮速度）を落とすことで、剥離片の溶解と微小核の生成を抑制し、種結晶のみが成長するよう試みた (Fig. 2 (a)-(d))。

従来の条件 (Fig. 2(a)) では、移植した種結晶の他に多数の結晶核の析出が確認されたのに対し (Fig. 4 (a)), リ

ザーバーの沈殿剤濃度を固定し、タンパク質濃度を低下させた条件 (Fig. 2(b)および(c)) では新たな核の析出は見られず (Fig. 4(b)および(c)), 巨大単結晶の成長が確認できた。また、溶解曲線に近い条件 (Fig. 2(c)) では、より巨大な結晶を得た (Fig. 4 (c))。結晶化ドロップ中のタンパク質濃度を増加させ、リザーバー溶液の沈殿剤濃度を下げて溶解曲線近傍に位置するようにした条件 (Fig. 2 (d)) では、さらに巨大な単結晶が得られた (Fig. 4 (d))。

4. 結論

結晶化相図をもとに結晶化条件を最適化することで巨大単結晶を得ることに成功した。これには以下の2つが主なる要因と考えられる。

- 1) 結晶が溶解する境界条件（溶解曲線）と試料が沈殿する境界条件（沈殿曲線）を決定した。溶解曲線のプロットでは、溶解した結晶の体積を推定する方程式を導入したことで、より正確な境界条件を得られるようにした。
- 2) 結晶化ドロップとリザーバー液の沈殿剤濃度差を制御することで、種結晶のみが成長できるよう蒸気拡散速度を

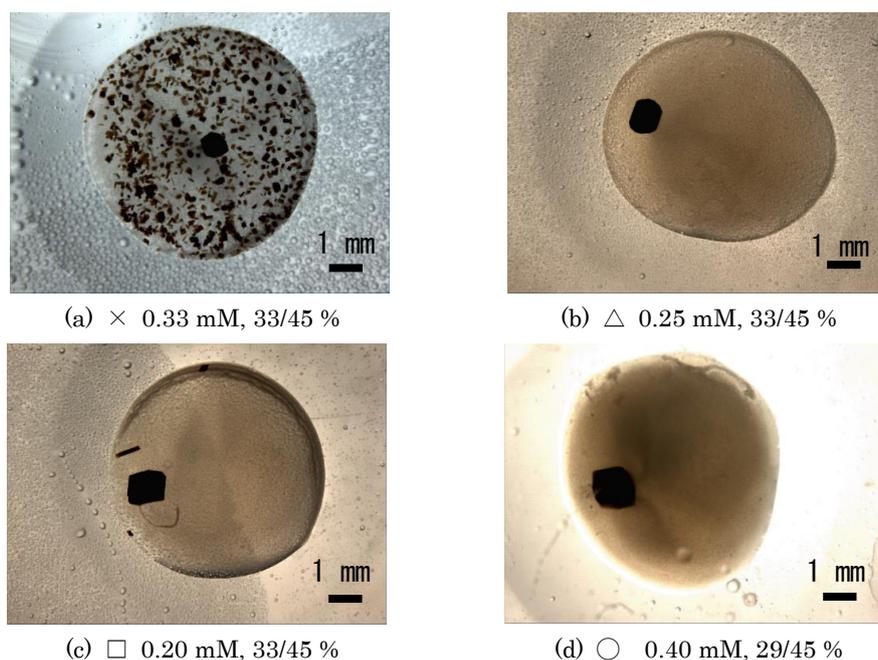


Fig. 4 Effect of the initial concentrations of the protein and precipitant (MPD) for the final results of the crystallization trials. (a) – (d) correspond to the crystallization conditions shown in Fig. 2, each other. Values in mM and % indicate the concentration of the [NiFe] hydrogenase and MPD (droplets and reservoir solution).

制御した。新たな結晶核が形成されることなく、マクロシードの結晶が成長するためには、結晶成長期間に結晶化ドロップがどの相に長く留まるかが重要であると思われる。

謝辞

本研究は日本科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業「構造生命科学」の支援を受けて遂行された。

参考文献

- 1) W. Lubitz, E. Reijerse and M. van Gastel: *Chem. Rev.*, **107**(10) (2007) 4331.
- 2) H. Ogata, S. Hirota, A. Nakahara, H. Komori, N. Shibata, T. Kato, K. Kano and Y. Higuchi: *Structure*, **13**(11) (2005) 1635.
- 3) H. Ogata, K. Nishikawa and W. Lubitz: *Nature*, **520**(7548) (2015) 571.
- 4) W. Lubitz, H. Ogata., O. Rüdiger. and E. Reijerse: *Chem. Rev.*, **114**(8) (2014) 4081.
- 5) T. Krämer, M. Kampa., W. Lubitz, M. van Gastel and F. Neese: *ChemBioChem*, **14** (2013) 1898.
- 6) S. Dementin, B. Burlat, AL. De Lacey, A. Pardo, G. Adryanczyk-Perrier, B. Guigliarelli, VM. Fernandez and M. Rousset: *J. Biol. Chem.*, **279**(11) (2003) 10508.
- 7) VH. Teixeira, CM. Soares and AM. Baptista: *Proteins*, **70**(3) (2008) 1010.
- 8) I. F. Galvan, A. Volbeda, JC. Fontecilla-Camps and MJ. Field: *Proteins*, **73**(1) (2008) 195.
- 9) Y. Higuchi, N. Yasuoka, M. Kakudo, Y. Katsube, T. Yagi and H. Inokuchi: *J. Biol. Chem.*, **262**(6) (1987) 2823.
- 10) T. Yagi, K. Kimura, H. Daidoji, F. Sakai and S. Tamura: *J. Biochem*, **79**(3) (1976) 661.