

# 放射光 X 線によるタンパク質の超高分解能電荷密度解析

竹田一旗

京都大学大学院理学研究科 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

三木邦夫

京都大学大学院理学研究科 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

## 要旨

タンパク質中での個々の原子の電子密度の形状は、その原子の化学的特性と密接に関連している。しかしながら、通常のタンパク質の結晶構造解析では分解能が十分でないために、タンパク質機能に密接に関与する価電子や水素原子の電子を観測することはできない。一方で、分解能が $0.8 \text{ \AA}$ より高い場合には、ほぼ全ての水素原子を観察することができるのに加えて、多極子原子モデルを使用した電荷密度解析が可能となり、タンパク質を構成する原子についての化学状態を実験的に決定することができる。ここでは、われわれが最近報告した高電位鉄イオウタンパク質 (HiPIP) と NADH-シトクロム  $b_5$  還元酵素 (b5R) の電荷密度解析の結果について報告する。

## 1. はじめに

今日のタンパク質の研究において構造情報は必要不可欠なものとなっており、生化学的研究、分光学的研究から理論的研究といった他の研究手法による結果を解釈する際にも利用される。これまでに X 線結晶解析法によって10万件以上のタンパク質構造が決定され、データベース (Protein Data Bank) に登録されている。しかしながら、そのほとんど (約90%) は $1.5 \text{ \AA}$ 程度の分解能にとどまっている。この程度の分解能の電子密度では、タンパク質を構成する原子どうしは分離されずに個々の原子団のかたまりとして観察されるだけである。このため、タンパク質の構造解析においてはアミノ酸配列の情報をもとに各アミノ酸の構造を電子密度中に当てはめていく解析方法がとられる。当然ながら、この方法では価電子や水素原子は判別できない。また、精密化計算の際に、原子どうしの結合距離や結合角に強い束縛条件を課している。したがって、このようにして解析された構造だけでは、原子の化学的特性を議論することはできない。このため、機能部位の化学的性質は、アミノ酸や低分子化合物において得られた知見から推定することになる。このため、最終的には変異体解析により推定の正しさを確認することが現在の定石となっている。しかしながら、このやり方では、機能部位中のある残基の重要性を示すことはできても、タンパク質機能の具体的な仕組みを電子・原子レベルで解明することはできない。

分子中の個々の原子の電子密度の形状は、それぞれの原子の化学的特性によって決定される。逆に言うと、電子密度の形状には分子の性質に関する重要な情報が含まれているわけである。X 線は電子によって散乱されるため、原理的には X 線結晶解析法で各原子の形状を決定し、化学

状態を知ることが可能である。一般的な解析において、構造解析に使用される原子散乱因子は、電子が原子核のまわりに球対称に分布しているという近似のもとで導出されている。しかしながら、実際の原子は、隣接原子との共有結合の形成や、 $p$  軌道や  $d$  軌道などの価電子に由来する異方性を持っている。したがって、これらに起因する非球状成分を解析の際に考慮すれば、構造に取り入れることが可能である<sup>1,2)</sup>。しかしながら、このような解析をおこなうためには最低でも $0.8 \text{ \AA}$ の分解能が必要であり、タンパク質については数例しか報告されていないのが現状である<sup>3-8)</sup>。

われわれは、これまでにさまざまなタンパク質について X 線結晶構造解析をおこなってきたが、いくつかのタンパク質結晶は非常に高い回折能を有していた。高エネルギー鉄イオウタンパク質 (HiPIP) は、光合成細菌の光合成反応中心を再還元するための電子の運搬を担うタンパク質である。好熱性光合成細菌 (*Thermochromatium tepidum*) 由来の HiPIP を用いることで、高分解能の結晶を作製することが可能である<sup>9,10)</sup>。また、NADH-シトクロム  $b_5$  還元酵素 (b5R) はシトクロム  $b_5$  (b5) を還元する酵素であり、動物の肝細胞の小胞体に存在する。b5 は脂肪酸の不飽和化、脂肪酸の炭素鎖の伸長、コレステロール合成、ステロイドホルモンの代謝など多くの代謝反応に関与している。これまでにブタ由来 b5R を使用してさまざまな酸化還元状態の構造を決定している<sup>11,12)</sup>。どちらのタンパク質についても、これまでは一般的な X 線構造解析法によって結晶構造を決定してきた。しかし、酸化還元反応や電子伝達の分子機構を構造情報から直接議論するには、単に原子座標や温度因子の精度を高めるだけではなく、価電子や水素原子を含めた微細な構造的特徴を決定し、原子ごとに化学的な特性を明らかにする必要があっ

た。本稿では、われわれが最近報告した HiPIP<sup>13)</sup> と b5R<sup>14)</sup> の電荷密度解析の結果について紹介する。

## 2. 高エネルギー放射光 X 線を使用した回折データ収集

HiPIP および b5R の結晶はもともと高い分解能を呈していた<sup>10,12)</sup>。そこで、できるだけ高角まで回折反射を測定するために、高エネルギー（短波長）の X 線を利用した回折実験が可能な構造生物学ビームライン（SPring-8 の BL41XU）において測定をおこなった。どちらのタンパク質においても、1 個の大型の結晶から、複数のサブデータセットを取得した。HiPIP の場合は高分解能、中分解能、低分解能の 3 つ、b5R の場合には高分解能、低分解能の 2 つに分割して測定した。高分解能データの測定においては、ヘリカルデータ収集法<sup>15)</sup>により結晶を並進させながら X 線を照射し、照射位置当たりの X 線吸収線量を 10<sup>5</sup> Gy 程度に抑えた。これは通常の構造解析で目安とされる吸収線量限界（~10<sup>7</sup> Gy）と比べると非常に低いが、このような測定条件でも高角までの回折反射を確認することができた。各サブデータセットをマージした結果、HiPIP に関しては 0.48 Å、b5R に関しては 0.78 Å 分解能のデータセットを得ることができた（Table 1）。

## 3. 多極子原子モデルによる電荷密度解析

まず、通常の結晶構造解析で使用される孤立球状原子モデル（Independent spherical atomic model: ISAM）による原子散乱因子を使用して解析をおこなった。異方性温度因子や水素原子の導入後、 $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  マップ中の各原子の近傍に ISAM では説明がつかない残余電子密度が確認できた（Fig. 1）。これらの残余電子密度は、その位置や強さから結合電子や非共有電子対であることが強く示唆された。そこで、これらの残余電子密度を価電子として精密化に取り入れることが可能な多極子原子モデル（Multipolar atomic model: MAM）<sup>16)</sup>による電荷密度解析をおこなった。

MAM 解析では、個々の原子の電子密度  $\rho_{\text{atom}}$  は内殻電子によるものと価電子によるものに分割される。価電子の非球状分布は実数球面調和関数  $y_{lm\pm}$  に展開係数  $P_{lm}$  を掛けて足し合わせることで表現される。

$$\rho_{\text{atom}}(\mathbf{r}) = \rho_{\text{core}}(r) + P_{\text{val}}\kappa^3\rho_{\text{val}}(\kappa r) + \sum_l \kappa'^3 R_l(\kappa' r) \sum_m P_{lm\pm} y_{lm\pm}(\theta, \varphi) \quad (1)$$

$\rho_{\text{core}}$  は球状に近似された内殻電子密度、 $\rho_{\text{val}}$  は価電子の電子密度の球状成分、 $\kappa$  と  $\kappa'$  は電子雲の広がり具合を表す因子、 $R_l(\kappa' r)$  はスレーター型動径関数、 $P_{\text{val}}$  は価電子数を調整する係数である。

今回の MAM による電荷密度解析では、*MoPro* プログ

Table 1 Crystallographic and refinement statistics.

	HiPIP	b5R
Data collection		
Beam line	BL41XU (SPring-8)	BL41XU (SPring-8)
X-ray wavelength (Å)	0.45	0.65
X-ray energy (keV)	27.6	19.1
Detector	MX-225HE (Rayonix)	MX-225HE (Rayonix)
Resolution (Å)	20.0–0.48 (0.50–0.48) <sup>a</sup>	31.9–0.78 (0.79–0.78) <sup>a</sup>
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	46.48, 58.91, 23.44	48.48, 72.11, 84.91
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	5.6 (33.9) <sup>a</sup>	7.1 (118.6) <sup>a</sup>
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	61.1 (2.7) <sup>a</sup>	28.8 (1.1) <sup>a</sup>
Completeness (%)	96.3 (89.0) <sup>a</sup>	99.1 (89.5) <sup>a</sup>
Redundancy	5.4 (3.0) <sup>a</sup>	6.7 (4.7) <sup>a</sup>
Refinement		
Resolution (Å)	20.0–0.48	31.9–0.78
No. reflections	301,119	332,946
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%) (ISAM)	8.24/8.63	12.6/14.4
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%) (MAM)	7.16/7.80	12.2/14.0
No. non-H atoms	1,105	3,088
No. H atoms	862	2,083
PDB-ID	5D8V	5GV8

<sup>a</sup> Highest resolution shell is shown in parentheses.

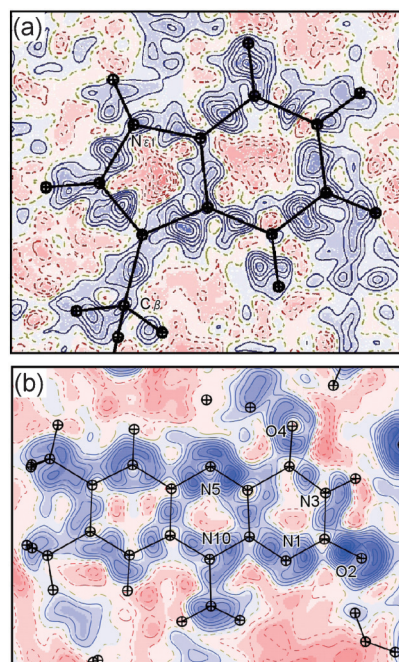


Fig. 1 (Color online) Residual ( $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ ) maps after the ISAM refinement. (a) The side chain of Trp74 in HiPIP. The contour interval is 0.05 e/Å<sup>3</sup>. Positive and negative values are colored in blue and red, respectively. (b) The isoalloxazine ring of FAD in b5R.

ラムを用いた<sup>17)</sup>。まず、価電子の影響を除いて原子座標と温度因子を決定するために、1 Å 分解能より高分解能側のデータのみを用いて精密化した。その後、低分子を用いて決定された多極子パラメータ<sup>18)</sup>を初期値として導入した。HiPIP の鉄イオウクラスター部分では適当な初期値を利用することができなかつたので、初期値として球形の原子を仮定した。多極子パラメータの精密化後、残余電子密度が減少していることや、 $R$  値が下がっていることを確認した (Table 1)。MAM 解析が順調に進行するためには、価電子が残余電子密度として明瞭に観察されるレベルにまで ISAM 解析をおこなっておくことが重要であった。価電子は次式 (2) で計算される Static deformation マップにより可視化した。

$$\Delta\rho_{\text{static}}(\mathbf{r}) = \sum_{j=1}^{N_{\text{atom}}} [\rho_{\text{multi}}(\mathbf{r}-\mathbf{r}_j) - \rho_{\text{ISAM}}(\mathbf{r}-\mathbf{r}_j)] \quad (2)$$

このマップでは、全電子密度から球状成分を差し引くことにより非球状の価電子を強調して表示することができる。

#### 4. トポロジー解析

MAM 精密化による電子密度分布に Atoms-in-molecules (AIM) 理論を適用してトポロジー解析をおこなうことで、各原子の性質や化学結合の性質を定量的に調べることが可能である<sup>19,20)</sup>。本研究におけるトポロジー解析には

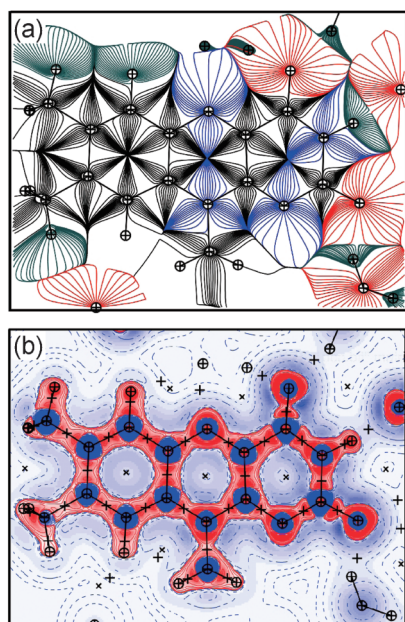


Fig. 2 (Color online) Topological analysis for b5R. (a) The gradient vector field map around the isoalloxazine ring of FAD. (b) The Laplacian  $\nabla^2\rho_{\text{BCP}}$  map. Positive and negative values are colored in blue and red, respectively. Bond critical points (BCPs) and ring critical points (RCPs) are represented as “+” and “x”, respectively.

*VMoPro* プログラム<sup>17)</sup> および *Bader* プログラム<sup>21)</sup> を使用した。勾配ベクトルマップは電子密度の勾配ベクトル ( $\nabla\rho$ ) をつないだ線を表示している (Fig. 2a)。この線量が 0 となる面は原子の境界である。また、結合経路は原子間に連なる電子密度の極大点をつないだものである。結合経路に沿った電子密度の極小点は結合臨界点 (bond critical point : BCP) とよばれ、結合経路に垂直な平面における電子密度の極大点となっている。結合臨界点における電子密度 ( $\rho_{\text{BCP}}$ ) および電子密度のラプラシアン ( $\nabla^2\rho_{\text{BCP}}$ ) (Fig. 2b) には、結合に関する情報が含まれている。この結合臨界点の位置やラプラシアンもトポロジー解析により決定することができる。この結合経路や結合臨界点の解釈は、水素結合についても適用することが可能である。結合経路は僅かに湾曲しており、原子間に引かれた直線から外れる。この現象は水素結合においてより顕著である。各原子の電荷についても、勾配ベクトルマップによって定義された、各原子に属する領域内の電子密度を積分することで算出することが可能である。

#### 5. 解析結果

##### 5.1 ペプチド結合

ペプチド結合の酸素原子の周りには、非共有電子対に対応する電子密度が存在し、アミド水素がこの非共有電子対と相互作用している様子が確認できた (Fig. 3)。また、通常のタンパク質構造解析においては、主鎖のペプチド結合の二面角 ( $\omega$ ) は平面構造 ( $\omega=180^\circ$ ) となるように束縛条件がかけられている<sup>22)</sup>。しかしながら、今回の HiPIP および b5R の構造解析では  $\omega$  角に束縛条件をかけずに精密化することができた。この結果、いずれのタンパク質の構造でも  $10^\circ$  以上のずれを持つペプチド結合が見出された。このようなペプチド結合においては共鳴構造が崩れ、電子構造に影響が現れると考えられる。このねじれたペプチド結合は、どちらのタンパク質についても補因子の周辺に多く見られた。このため、こうしたねじれが電子の移動特性に重要な寄与をしていると考えられる。

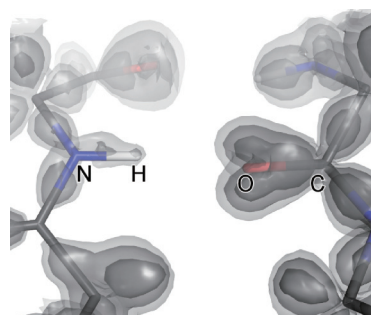


Fig. 3 (Color online) The static deformation map of a peptide bond in HiPIP. The gray surfaces represent electron densities at contour levels of +0.1, +0.2 and +0.4  $e/\text{\AA}^3$ .

## 5.2 側鎖

タンパク質においては20種類のアミノ酸ごとに側鎖の化学構造が異なっており、これらのアミノ酸の組み合わせにより多様なタンパク質の機能が実現されている。したがって、側鎖における水素と価電子分布の構造情報はタンパク質の機能理解にとって非常に重要である。HiPIP および b5R の構造解析においては、ほぼすべての水素原子を可視化することができ、解離性の側鎖におけるプロトン化状態も決定することができた。また、非共有電子対や結合電子に相当する電子密度の分布も確認することができた (Fig. 4)。

## 5.3 補因子

補因子はタンパク質に結合している小分子化合物であり、多くのタンパク質においてアミノ酸だけでは困難な機能の発現を担っている。電子輸送に関与する HiPIP と b5R は、補因子としてそれぞれ  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  型の鉄イオウクラスターとフラビン化合物の一種であるフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を結合している。これらの補因子は酸化還元状態の変化によってタンパク質の電子の貯蔵や受け渡しを実現している。このため、タンパク質中におけるこれらの化合物の電子分布を精密に決定することは電子輸送の理解に極めて重要である。現状では、このような解析がなされた例はほとんどないために、タンパク質に結合した状態での電子構造は非結合状態の場合と同一であるという仮定の下に多くの議論がなされてきた。しかしながら、タンパク質中においては、補因子と周囲のポリペプチド鎖との間に多数の相互作用が存在するため、非結合状態の補因子とは異なる電子構造が安定化されていることも十分に考えられる。

HiPIP 中の鉄イオウクラスターは、4つのシステイン残基の側鎖の  $\text{S}_\gamma$  原子に共有結合し、合わせて  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  ( $\text{Cys-S}_\gamma$ )<sub>4</sub> クラスターを形成している (Fig. 5)。構造解析の結果、鉄原子のまわりには  $3d$  電子の密度を、イオウ原子のまわりには  $3p$  電子に対応する電子密度を観測できた。多極子原子モデルによる精密化をおこない、トポロジー解析を適用することで、各 Fe-S 結合についての結合の強さを考察することができた。通常は結合距離と  $\rho_{\text{BCP}}$  の間に負

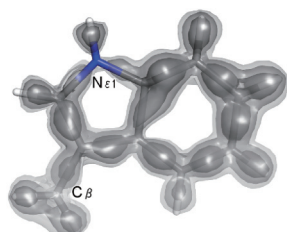


Fig. 4 (Color online) The static deformation map of Trp74 in HiPIP. The gray surfaces represent electron densities at contour levels of +0.1, +0.2 and +0.4  $\text{e}/\text{\AA}^3$ .

の相関がみられるが、FE1-S2 と FE2-S1 の2つの結合においては、結合長から予想される値よりも低い  $\rho_{\text{BCP}}$  を示した。つまり、これらの結合においては、結合長が短いにもかかわらず結合方向の電子的相互作用が弱いことを示している。電荷についてもそれぞれの原子について決定することができたが、鉄原子に関しては+0.9から+1.5、イオウ原子に関しては-1.6から-0.1の値となっており、いずれも形式電荷よりも絶対値が小さくなっていった。最も小さな電荷を持っている FE1 に配位しているイオウ原子 (S2, S3, S4, および Cys43-S<sub>γ</sub>) の電荷の合計値 (-4.1) は、他の鉄原子の場合 (-2.7から-2.6) よりも有意に小さい値となった。この結果は、電子は FE1 とその周りのイオウ原子に貯蔵されていることを示唆している。

b5R の補因子である FAD は、酸化型の状態でタンパク質に結合している。このことは、N1 原子と N5 原子に水素原子が結合していないことから確認することができた。また、酸素原子や窒素原子のまわりに非共有電子対由来の電子密度を観察することができた (Fig. 6a)。これらのうち、N5 原子の非共有電子対の電子分布はイソアロキサジン環平面の上下方向に広がっていた (Fig. 6b)。構造式の上では、N5 原子は  $sp^2$  混成をとると予想されるが、この特徴は  $sp^3$  混成のものである。一方、構造式の上では同じ化学状態にあると考えられる N1 原子では、 $sp^2$  混成の場合の典型的な密度分布を示していた。また、FAD のような、ほぼ炭素、窒素および酸素原子から構成される低分子量の有機化合物については多極子精密化の結果が多数報告されているため、これらの結果を参考にしてトポロジー解析により結合次数  $n_{\text{topo}}$  を見積もることが可能である<sup>23)</sup>。この方法を FAD のイソアロキサジン環部分に適用した結果、リングを構成する C-C 結合については、平均で  $n_{\text{topo}} = 1.39$  となった。これは、共役二重結合としては妥当な値である。一方、C-N 結合については、平均で  $n_{\text{topo}} = 1.15$  となり、C-C 結合の場合と比較すると低い値である。このことから、共役二重結合を構成する C-N 結合

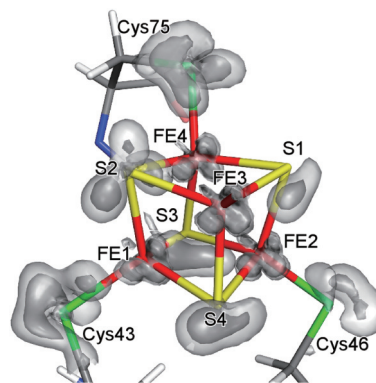


Fig. 5 (Color online) The static deformation map of the  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  ( $\text{Cys-S}_\gamma$ )<sub>4</sub> cluster in HiPIP. The gray surfaces represent electron densities at contour levels of +0.1, +0.2 and +0.4  $\text{e}/\text{\AA}^3$ .

は、単結合に近い性質を持つと言える。

#### 5.4 タンパク質-補因子間の相互作用

HiPIP において、 $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys-S}_\gamma)_4$  クラスターとタンパク質との間の非共有結合性の相互作用における価電子の役割についての知見も得ることができた。たとえば、Cys61 の  $\text{S}_\gamma$  原子の  $3p$  電子が Phe64 の側鎖の水素原子の一つと相互作用している様子を電子密度どうしの相互作用として可視化することができた (Fig. 7)。このような相互作用を各イオウ原子について見ていくと、イオウ原子の  $3p$  電子と相互作用をしている水素原子数とイオウ原子の電荷の値との間に高い相関が存在することが明らかとなった。したがって、 $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys-S}_\gamma)_4$  クラスターのイオウ原子とタン

パク質の水素原子の間の水素結合における共有結合性により電子が分散し、イオウ原子の負電荷が減少している可能性が示唆される。

一方の b5R においては、FAD のイソアロキサジン環は、水素結合でまわりのポリペプチド主鎖と相互作用している。これらの主鎖のペプチド結合は、先にも述べたように  $180^\circ$  から  $10^\circ$  以上ずれていた。そこで、トポロジー解析をおこない、水素結合を結合経路の有無によって確認した。また、それぞれの水素結合の解離エネルギーを次の式 (3) から見積もった<sup>24)</sup>。

$$D_e(\text{J/mol}) = \frac{a_0^3 N_A \hbar}{m_e} \left\{ \frac{3}{10} (3\pi^2)^{\frac{2}{3}} \rho_{\text{BCP}}^{\frac{5}{3}} + \frac{1}{24} \nabla^2 \rho_{\text{BCP}} \right\} \quad (3)$$

ここで、 $a_0$  はボーア半径である。その結果、構造式からあらかじめ予想されていた水素結合をすべて検出することができた。さらに、N5 原子と、Tyr65 の  $\text{C}_\alpha\text{H}$  原子との間に非古典的な CH-N 型の水素結合<sup>25)</sup> の形成が観察された。この水素結合の形成には N5 原子の持つ  $sp^3$  様の電子分布が深く関与していた。この水素結合の解離エネルギーは  $10 \text{ kJ/mol}$  であり、水素結合として標準的な範囲に収まっていた。同様の非古典的な水素結合は、イソアロキサジン環のまわりだけでも FAD の O2 原子と Ile81 の  $\text{C}_\alpha\text{H}$  原子との間や、Tyr65 のカルボニル O 原子と His49 の  $\text{C}_\beta\text{H}$  原子の間でも確認できた。His49 は b5R の電子受容体である b5 の結合部位である。N5 から His49 の側鎖への経路は、古典的な水素結合のみを経由するよりも、これらの非古典的な水素結合を経由することで格段に道筋が短くなる (Fig. 8)。したがって、この結合が実際に電子の移動経路となっていることが示唆される。一方、イソアロキサジン環と水素結合を形成している他の残基のペプチド結合は前述のように共鳴構造が崩れており、そちらの方向への電子の移動は起きにくいような構造になっている。イソアロキサジン環に水素結合している 2 つの水分子は水素原子だけでなく非共有電子対も観測され、電荷密度解析の対象に含めることができた (Fig. 9)。通常の X 線結晶構造解析では水分子中の酸素原子しか解析できないため、水分子の配向や相互作用形式は一義的に決定できないことも多い。し

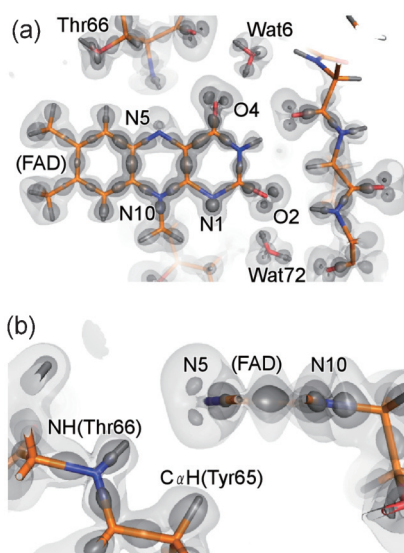


Fig. 6 (Color online) The static deformation map of the isoalloxazine ring of FAD in b5R. The gray surfaces represent electron densities at contour levels of  $+0.01$ ,  $+0.2$  and  $+0.5 \text{ e}/\text{\AA}^3$ .

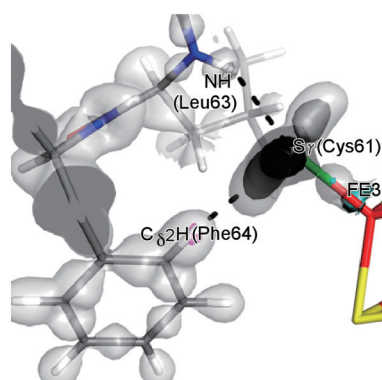


Fig. 7 (Color online) The static deformation map for the interaction between  $\text{S}_\gamma$  of Cys61 in the  $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys-S}_\gamma)_4$  cluster and the side-chain of Phe64 in HiPIP. The gray surfaces represent electron densities at contour levels of  $+0.1$  and  $+0.3 \text{ e}/\text{\AA}^3$ .

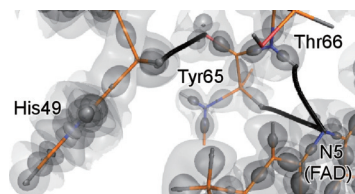
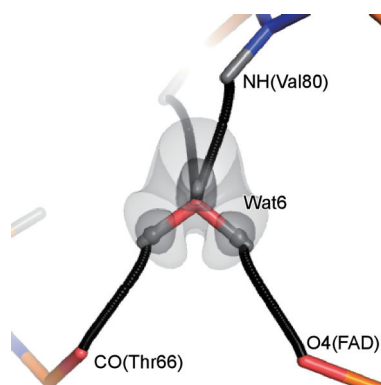


Fig. 8 (Color online) The static deformation map for the possible electron pathway. The gray surfaces represent electron densities at contour levels of  $+0.01$ ,  $+0.2$  and  $+0.5 \text{ e}/\text{\AA}^3$ . Bond paths for hydrogen bonding are represented as black curves.



**Fig. 9** (Color online) The static deformation map for a water molecule bound with FAD in b5R. The gray surfaces represent the electron densities at contour levels of +0.01, +0.2 and +0.5 e/Å<sup>3</sup>. Bond paths for hydrogen bonding are represented as black curves.

たがって、今回の結果は、多くのタンパク質の機能に重要な役割を果たす水分子も含めた電荷密度解析が可能なことを示している。

## 6. おわりに

今回われわれが電荷密度解析に成功した2つのタンパク質はいずれも電子の輸送に関与するものであり、今回得られた電荷密度情報は機能の理解に非常に重要である。解析の結果のなかには、これまで考えられてきた電子構造を支持するものもあるが、いくつかについては予想から外れたものであった。今後はそれぞれのタンパク質について、今回とは異なる酸化還元状態についても同様の解析をおこない、電荷密度の変化を捉えていく予定である。

放射光施設の充実により、タンパク質の電荷密度解析が可能なデータの測定は容易になりつつある。しかしながら、初めてのタンパク質の電荷密度解析の結果<sup>4)</sup>が報告されて15年以上経つにもかかわらず、その後の成功例は極めて僅かである。現状では偶然に非常に高い分解能が得られたものに対象が限定されており、汎用化の用途は立っていない。汎用化が実現できれば、多くのタンパク質について価電子の分布や電荷を決定することが可能となり、さらにはトポロジー解析をおこなうことで結合エネルギーや結合次数、水素結合の形成、水素結合の共有結合性についての情報を得ることが可能となる。これらの情報はタンパク質の物性や反応性を記述する重要なものであるにもかかわらず、これまで他の構造解析手法によって決定することは不可能であった。分解能を向上させる変異体の作製方法を確立し、一方で電荷密度解析が可能な分解能を引き下げることができれば、適用範囲は格段に拡大する。これらが実現できれば、理論的研究の検証や比較が活発におこなわれるようになり、現在は不十分である理論と実験の相補的融合につながっていくことが期待できる。

## 謝辞

本稿で紹介した研究のうち、HiPIPに関する研究は平野優博士（京都大学、現・量研機構）との、b5Rに関する研究は高場圭章修士（京都大学）、小杉正幸修士（京都大学）、玉田太郎博士（量研機構）との共同研究の成果である。SPring-8における回折データ収集においては、多くの学生ならびにビームラインスタッフのご協力をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 竹田一旗, 平野優, 三木邦夫: 日本結晶学会誌 **52**, 14 (2010).
- 2) 竹田一旗, 三木邦夫: 生物物理 **51**, 96 (2011).
- 3) B. Guillot, C. Jelsch, A. Podjarny and C. Lecomte: Acta Cryst. D **64**, 567 (2008).
- 4) C. Jelsch, M. M. Teeter, V. Lamzin, V. Pichon-Pesme, R. H. Blessing and C. Lecomte: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**, 3171 (2000).
- 5) Q. Liu, Q. Huang, M. Teng, C. M. Weeks, C. Jelsch, R. Zhang and L. Niu: J. Biol. Chem. **278**, 41400 (2003).
- 6) A. Schmidt, C. Jelsch, P. Ostergaard, W. Rypniewski and V. Lamzin: J. Biol. Chem. **278**, 43357 (2003).
- 7) B. Zarychta, A. Lyubimov, M. Ahmed, P. Munshi, B. Guillot, A. Vrieling and C. Jelsch: Acta Cryst. D **71**, 954 (2015).
- 8) A. Schmidt, M. Teeter, E. Weckert and V. Lamzin: Acta Cryst. F **67**, 424 (2011).
- 9) L. Liu, T. Nogi, M. Kobayashi, T. Nozawa and K. Miki: Acta Cryst. D **58**, 1085 (2002).
- 10) K. Takeda, K. Kusumoto, Y. Hirano and K. Miki: J. Struct. Biol. **169**, 135 (2010).
- 11) H. Nishida, K. Inaka, M. Yamanaka, S. Kaida, K. Kobayashi and K. Miki: Biochemistry **34**, 2763 (1995).
- 12) M. Yamada, T. Tamada, K. Takeda, F. Matsumoto, H. Ohno, M. Kosugi, K. Takaba, Y. Shoyama, S. Kimura, R. Kuroki and K. Miki: J. Mol. Biol. **425**, 4295 (2013).
- 13) Y. Hirano, K. Takeda and K. Miki: Nature **534**, 281 (2016).
- 14) K. Takaba, K. Takeda, M. Kosugi, T. Tamada and K. Miki: Sci. Rep. **7**, 43162 (2017).
- 15) D. Flot, T. Mairs, T. Giraud, M. Guijarro, M. Lesourd, V. Rey, D. van Brussel, C. Morawe, C. Borel, O. Hignette, J. Chavanne, D. Nurizzo, S. McSweeney and E. Mitchell: J. Synchrotron Rad. **17**, 107 (2010).
- 16) N. K. Hansen and P. Coppens: Acta Cryst. A **34**, 909 (1978).
- 17) B. Guillot, L. Viry, R. Guillot and C. Lecomte: J. Appl. Cryst. **34**, 214 (2001).
- 18) B. Zarychta, V. Pichon-Pesme, B. Guillot, C. Lecomte and C. Jelsch: Acta Cryst. A **63**, 108 (2007).
- 19) R. F. W. Bader: Atoms in Molecules—A Quantum Theory (Oxford University Press, 1990).
- 20) T. S. Koritsanszky and P. Coppens: Chem. Rev. **101**, 1583 (2001).
- 21) M. Yu and D. R. Trinkle: J. Chem. Phys. **134**, 064111 (2011).
- 22) R. A. Engh and R. Huber: Acta Cryst. A **47**, 392 (1991).
- 23) V. Tsirelson, E. Bartashevich, A. Stash and V. Potemkin: Acta Cryst. B **63**, 142 (2007).
- 24) E. Espinosa and E. Molins: J. Chem. Phys. **113**, 5686 (2000).
- 25) G. Desiraju: Acc. Chem. Res. **24**, 290 (1991).

## 著者紹介

**竹田一旗**

京都大学大学院理学研究科化学専攻 准教授

E-mail: ktakeda@kuchem.kyoto-u.ac.jp

専門：生物物理学、タンパク質結晶学

**【略歴】**

2000年名古屋大学大学院理学研究科博士後期課程単位取得退学，博士（理学）。理化学研究所播磨研究所協力研究員，理化学研究所播磨研究所連携研究員，京都大学大学院理学研究科講師を経て，2014年より現職。

**三木邦夫**

京都大学大学院理学研究科化学専攻 教授

E-mail: miki@kuchem.kyoto-u.ac.jp

専門：構造生物学、タンパク質結晶学

**【略歴】**

1978年大阪大学大学院工学研究科後期課程（D1）中途退学，同年大阪大学工学部助手，工学博士（大阪大学，1981年）。1991年東京工業大学資源化学研究所助教授を経て，1994年より現職。

## Charge density analyses of proteins using synchrotron X-ray data at ultra-high resolution

**Kazuki TAKEDA** Graduate School of Science, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

**Kunio MIKI** Graduate School of Science, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

**Abstract** The shape of electron density of each atom in the protein molecules is closely related to the chemical property of the atom. However, hydrogen atoms and valence electrons of proteins, which define the function of the protein, cannot be observed due to the limitation of resolution in crystal structures. At ultra-high resolution higher than 0.8 Å, on the other hand, the charge-density analysis with the multipolar atom model refinement procedure enables us to determine details of electronic structures of proteins. In this review, we will show our recent results for high-potential iron-sulfur protein (HiPIP) and NADH-cytochrome  $b_5$  reductase (b5R).