

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03841

研究課題名(和文) マイクロ流体フロー時分割赤外分光光度計の開発と酵素反応の短寿命中間体の解析

研究課題名(英文) Development of a micro-flow time-resolved IR spectrometer for analyzing short-lived reaction intermediates of enzymes

研究代表者

久保 稔 (Kubo, Minoru)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員

研究者番号：90392878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで困難であった酵素反応の動的構造解析を実現する時分割赤外分光技術を確立した。20 nL単位で送液できる精密フローシステムを開発し、過去に開発したフェムト秒赤外レーザーベースの高感度赤外分光装置に組み込むことで、ケージド基質を用いた酵素反応のマイクロフロー・フラッシュ測定を可能にした。次に応用研究として、地球上の窒素循環を担う一酸化窒素還元酵素の酵素反応を時分割解析し、短寿命のNO結合型中間体の配位様式の解明に成功した。さらに、マイクロフロー・フラッシュ測定法をSACLAでの時分割結晶構造解析にも応用することで、NO結合型中間体の構造の可視化にも成功した。

研究成果の概要(英文)：This project aims to establish a time-resolved IR spectroscopic technique for studying dynamic structures of enzymes. A novel micro flow system has been developed and incorporated into a femtosecond laser-based IR spectrometer, which allows micro flow-flash IR measurements of enzymatic reactions with the minimum sample volume of 20 nL. We applied this measurement system to NO reductase, a heme enzyme that catalyzes the reduction of NO to N₂O in the nitrogen cycle, and succeeded in determining the NO binding mode in the short-lived intermediate. Furthermore, we also used the micro-flow flash method for time-resolved crystallography at SACLA, and succeeded in visualizing the 3D structure of the NO-bound intermediate during the NO reduction reaction.

研究分野：生物物理学

キーワード：時間分解赤外分光 計測 フェムト秒レーザー ケージド化合物 酵素反応 膜タンパク質 一酸化窒素還元酵素 超精密

1. 研究開始当初の背景

生体反応の特異性は、精緻に設計されたタンパク質の構造に基づいている。その設計原理を理解するためには、反応の動的過程において、機能部位の構造や電子状態がどのように制御されているのかを詳しく調べる必要がある。赤外分光法は、機能部位の原子団(官能基)の化学構造や電子状態を明らかにできる強力な手法の一つである。しかし、赤外分光法の酵素反応への応用は、溶媒である水の強い赤外吸収が妨害となるため、まだ非常に限られているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、過去に開発したフェムト秒赤外レーザーベースの高感度赤外分光装置(*J. Biol. Chem.* (2013) 288, 30259)を用いて、酵素反応を解析可能な時分割赤外分光技術を確立する。高輝度のフェムト秒赤外レーザーを使用すれば、酵素水溶液に対しても十分な透過光強度を得ることが可能である。さらに応用研究として、地球上の窒素循環を担っている一酸化窒素還元酵素(NOR)の反応機構解明に取り組む。

3. 研究の方法

ケージド基質を用いたフロー・フラッシュ法により、酵素反応を時分割計測する。ケージド基質とは、励起光照射により基質を放出する化合物である。フロー・フラッシュ測定では、励起光照射による基質放出、分光測定、フローによる試料交換、を行なう。との間の時間間隔(遅延時間 Δt)を変えながら、上記手順を繰り返すことで時分割の分光データが得られる。フロー・フラッシュ測定システムは、時分割可視吸収分光用のものを開発済みである。その測定システムを時分割赤外分光用に改良し、酵素反応の時分割赤外分光を実現する。

4. 研究成果

励起光照射と同期して間欠的に送液するシリジポンプとマイクロ流路を有するフローセルを開発し、赤外分光装置に組み込んだ。この送液システムは、フロー・フラッシュ測定における試料交換を20ナノリットル単位で行えるため、収量の少ない膜タンパク質に対しても適用可能である。

本研究では最初の応用研究として、脱窒菌由来のNOR(cNOR)が触媒するNO還元反応の観測を試みた($2\text{NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$)。UV照射によって μs 以内にNO(基質)を放出するケージドNOを用いた。cNORは、活性部位に鉄二核中心(ヘム鉄と非ヘム鉄)を有する膜内在性金属酵素である。NOの鉄への配位構造は、本酵素反応機構を考える上で鍵となるが、NO結合型は短寿命であり実験的解析が困難なため、長年未解明であった。

我々はまず反応速度論解析を行ない、NO還元反応が3相性(数 μs 、100 μs 、数ms)を

示す事を明らかにした上で、遅延時間 $\Delta t = 10 \mu\text{s}$ の赤外吸収スペクトルを詳細に解析した。ケージド ^{14}NO を用いたスペクトルとケージド ^{15}NO を用いたスペクトルを比較した結果、鉄二核中心に配位したNO由来のNO伸縮振動バンドを検出することに成功した。NO伸縮振動の振動数から、NOはまず非ヘム鉄に配位することが示唆された。生成物 N_2O のNN伸縮振動の時分割観測も試み、 N_2O が第3相(数ms)で生成することも明らかにした。

一方、野生型の反応解析と並行して、プロトン輸送経路上のアミノ酸残基を置換した変異体E57Aの反応解析を行なった。その結果、E57Aでは第3相(数ms)が観測されず、反応は第2相(100 μs)で停止することが分かった。このことは第3相の過程にプロトン移動が関与していることを示している。現在、プロトン移動直前の第2相(100 μs)で生成する反応中間体の解析に取り組んでいる。

また本研究では、脱窒カビ由来のNOR(P450nor)が触媒するNO還元反応の解析も試みた($2\text{NO} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$)。cNORと同様にケージドNOを用いて、NO結合型およびそれに続く反応中間体(NOが2電子還元されたNO活性型)の化学構造の解明に成功した。以上、2種のNORを用いて、本研究で開発したマイクロフロー・フラッシュ時分割赤外分光装置の実用性が示された。

ところでマイクロフロー・フラッシュ法は、分光に限らず汎用的な時分割測定法である。そこで発展研究として、マイクロフロー・フラッシュ法を、時分割X線結晶構造解析に適用し、P450norの反応中間体の構造解析を試みた。高輝度のX線自由電子レーザー(XFEL)を用いれば、微結晶フロー試料のX線結晶構造解析が可能である。そこで、理研播磨のXFEL(SACLA)を用いて、ケージドNOとNADHをP450norの微結晶に浸潤、微結晶フロー、励起光照射によるNO放出、 Δt 後にX線回折像を取得することで、酵素反応の時分割X線結晶構造解析を行なった。その結果、P450norの反応途中のNO結合型構造を2.1 \AA 分解能で決定し、赤外分光データと併せて、NO配位構造を解明する事に成功した。

本研究を通して、ケージド基質を用いて、酵素反応の短寿命中間体を解析する技術が確立された。現在、NOR以外の多くの金属酵素(チトクロム酸化酵素など)の研究に適用している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

[1] Komiya, R., Kimura, T., Nomura, T., **Kubo,**

- M.**, Yan, J. Ultraprecision cutting of single-crystal calcium fluoride for fabricating micro flow cells. (2018) *J. Adv. Mech. Des. Syst. Manuf.* Vol. 12 (1), JAMDSM0021 (13 pages)(査読有).
DOI: 10.1299/jamdsm.2018jamdsm0021
- [2] **Tosha, T.**, Nomura, T., Nishida, T., Saeki, N., Okubayashi, K., Yamagiwa, R., Sugahara, M., Nakane, T., Yamashita, K., Hirata, K., Ueno, G., **Kimura, T.**, Hisano, T., Muramoto, K., Sawai, H., Takeda, H., Mizohata, E., Yamashita, A., Kanematsu, Y., Takano, Y., Nango, E., Tanaka, R., Nureki, O., Shoji, O., Ikemoto, Y., Murakami, H., Owada, S., Tono, K., Yabashi, M., Yamamoto, M., Ago, H., Iwata, S., Sugimoto, H.*, Shiro, Y.*, **Kubo, M.*** Capturing an initial intermediate during the P450_{nor} enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate. (2017) *Nat. Commun.* Vol. 8, 1585 (9 pages)(査読有).
DOI: 10.1038/s41467-017-01702-1
- [3] **Kubo, M.**, Nango, E., Tono, K., **Kimura, T.**, Owada, S., Song, C., Mafuné, F., Miyajima, K., Takeda, Y., Kohno, J., Miyauchi, N., Nakane, T., Tanaka, T., Nomura, T., Davidsson, J., Tanaka, R., Murata, M., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Neutze, R., Yabashi, M., Iwata, S. Nanosecond pump-probe system for time-resolved serial femtosecond crystallography developed at SACLA. (2017) *J. Synchrotron Rad.* Vol. 24, 1086-1091(査読有).
DOI: 10.1107/S160057751701030X
- [4] Shimada, A.†, **Kubo, M.†**, Baba, S.†, Yamashita, K., Hirata, K., Ueno, G., Nomura, T., **Kimura, T.**, Shinzawa-Itoh, K., Baba, J., Hatano, K., Eto, Y., Miyamoto, A., Murakami, H., Kumasaka, T., Owada, S., Tono, K., Yabashi, M., Yamaguchi, Y., Yanagisawa, S., Sakaguchi, M., Ogura, T., Komiya, R., Yan, J., Yamashita, E., Yamamoto, M., Ago, H., Yoshikawa, S., Tsukihara, T. A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome *c* oxidase. (2017) *Sci. Adv.* Vol. 3, e1603042 (12 pages) (†equal contribution)(査読有).
DOI: 10.1126/sciadv.1603042
- [5] Suga, M.†, Akita, F.†, Sugahara, M.†, **Kubo, M.†**, Nakajima, Y.†, Nakane, T., Yamashita, K., Umena, Y., Nakabayashi, M., Yamane, T., Nakano, T., Suzuki, M., Masuda, T., Inoue, S., **Kimura, T.**, Nomura, T., Yonekura, S., Yu, L.-J., Sakamoto, T., Motomura, T., Chen, J.-H., Kato, Y., Noguchi, T., Tono, K., Joti, Y., Kamechima, T., Hatsui, T., Nango, E., Tanaka, R., Naitow, H., Matsuura, Y., Yamashita, A., Yamamoto, M., Nureki, O., Yabashi, M., Ishikawa, T., Iwata, S., Shen, J.-R. Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL. (2017) *Nature* Vol. 543, 131-135 (†equal contribution)(査読有).
DOI: 10.1038/nature21400
- [6] Nango, E., Royant, A.†, **Kubo, M.†**, Nakane, T., **Kimura, T.**, Wickstrand, C., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., Nam, D., Dods, R., Nomura, T., Shimamura, T., Im, D., Fujiwara, T., Yamanaka, Y., Jeon, B., Nishizawa, T., Oda, K., Fukuda, M., Andersson, R., Båth, P., Davidsson, J., Matsuoka, S., Kawatake, S., Murata, M., Nureki, O., Owada, S., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Schertler, G., Yabashi, M., Bondar, A.-N., Standfuss, J., Neutze, R., Iwata, S. A three dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin.

(2016) *Science* Vol. 354, 1552-1557 (equal contribution)(査読有).

DOI: 10.1126/science.aah3497

- [7] Nogly, P., Panneels, V., Nelson, G., Gati, C., Kimura, T., Milne, C., Milathianaki, D., Kubo, M., Wu, W., Conrad, C., Coe, J., Bean, R., Zhao, Y., Bâth, P., Dods, R., Harimoorthy, R., Beyerlein, K. R., Rheinberger, J., James, D., DePonte, D., Li, C., Sala, L., Williams, G., Hunter, M., Koglin, J. E., Berntsen, P., Nango, E., Iwata, S., Chapman, H. N., Fromme, P., Frank, M., Abela, R., Boutet, S., Barty, A., White, T. A., Weierstall, U., Spence, J., Neutze, R., Schertler, G., Standfuss, J. Lipidic cubic phase injector is a viable crystal delivery system for time-resolved serial crystallography. (2016) *Nat. Commun.* Vol. 7, 12314 (9 pages)(査読有).
DOI: 10.1038/ncomms12314
- [8] Otomo, A., Ishikawa, H., Mizuno, M., Kimura, T., Kubo, M., Shiro, Y., Aono, S., Mizutani, Y. A study of the dynamics of the heme pocket and C-helix in CooA upon CO dissociation using time-resolved visible and UV resonance Raman spectroscopy. (2016) *J. Phys. Chem. B* Vol. 120, 7836-7843 (査読有).
DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b05634

〔学会発表〕(計 12 件)

- [1] 久保稔 チトクロム酸化酵素の動的構造解析：リガンド結合と共役した水チャネルの開閉機構．2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), ワークショップ “X線自由電子レーザーが捉えるタンパク質ダイナミクス研究の最前線”, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2017年12月6日 (招待講演).
- [2] 久保稔 Combining XFEL crystallography

and single-crystal spectroscopy for studying reaction dynamics of respiratory metalloenzymes. 日本生物物理学会, 第55回年会シンポジウム “構造生命科学の新しい潮流”, 熊本大学黒髪北地区 (熊本県熊本市), 2017年9月19日 (招待講演).

- [3] Kubo, M., Shimada, A., Baba, S., Yamashita, K., Hirata, K., Yamamoto, M., Shinzawa-Itoh, K., Ago, H., Yoshikawa, S., Tsukihara, T. Time-resolved XFEL crystallography and spectroscopy of cytochrome *c* oxidase. 24th Congress & General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr 2017), Hyderabad International Convention Centre (Hyderabad, India), August 22, 2017 (Selected to Oral).
- [4] Kubo, M., Shimada, A., Baba, S., Yamashita, K., Hirata, K., Yamamoto, M., Shinzawa-Itoh, K., Ago, H., Yoshikawa, S., Tsukihara, T. Observation of water-channel opening of cytochrome *c* oxidase by time-resolved XFEL crystallography. 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress and 11th European Biophysics Congress, Edinburgh International Conference Centre (Edinburgh, UK), July 17, 2017 (Selected to Oral).
- [5] 久保稔 蛋白質の時間分解X線結晶構造解析における分光の役割. 第17回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ “SACLAにおける蛋白質構造科学研究の現状と展望”, 仙台国際センター (宮城県仙台市), 2017年6月22日 (招待講演).
- [6] Kubo, M. Time-resolved crystallography and IR spectroscopy of cytochrome *c* oxidase. The 4th Ringberg Workshop on Structural Biology with FELs, Ringberg Castle (Kreuth, Germany), February 11, 2017 (招待講演).
- [7] 久保稔 SACLAが拓く応用研究：生体分子の動的構造観察. 日本分光学会関西支

部,平成28年度 最近の分光学の進歩に関する講演会“自由電子レーザーの進歩と実用”,大阪電気通信大学駅前キャンパス(大阪府寝屋川市),2016年11月18日(招待講演).

- [8] **Kubo, M.**, Shimada, A., Baba, S., Yamashita, K., Hirata, K., Yamamoto, M., Shinzawa-Itoh, K., Tsukihara, T., Ago, H., Yoshikawa, S. Observation of water channel opening upon CO photolysis in cytochrome *c* oxidase by time-resolved XFEL crystallography and IR spectroscopy. The 42nd Naito Conference "In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences", シャトレーゼガトーキングダム(北海道札幌市), October 5, 2016 (ポスター賞受賞).
- [9] **久保稔** 膜タンパク質の反応解析に向けた赤外分光技術の開発と膜内在性金属酵素への応用. 蛋白研セミナー“膜タンパク質の構造ダイナミクス”, 大阪大学蛋白研(大阪府吹田市), 2016年5月13日(招待講演).
- [10] **久保稔** ダイナミクス研究における未解決問題と振動分光からのアプローチ. 蛋白研セミナー“構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題”, 東京大学先端科学技術研究センター(東京都目黒区), 2016年3月1日(招待講演).
- [11] **久保稔**, 木村哲就, 武田英恵, 石井頌子, 當舎武彦, 城宜嗣 フェムト秒赤外レーザーを用いた生体分子ダイナミクスの観測 分子研研究会"高輝度・高強度赤外光源の現状と展望", 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市), 2016年2月11日.
- [12] **Kubo, M.**, **Kimura, T.**, Yamaguchi, Y., Yanagisawa, S., Komiya, R., Yan, J., Nakashima, S., Ogura, T., Shiro, Y. Development of a highly-sensitive time-resolved IR spectrometer and its

application to high-background aqueous biological samples. *Pacificchem 2015*, Marriott Waikiki Beach (Hawaii, USA), December 18, 2015 (Selected to Oral).

〔図書〕(計1件)

- [1] **久保稔** チトクロム *c* 酸化酵素の分子動画: 水チャネルの動的開閉機構. *週刊医学のあゆみ「生命現象を観る」* 医歯薬出版, (2017) Vol. 262, 413-417.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 稔 (KUBO, Minoru)
国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員
研究者番号: 90392878

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

當舎 武彦 (TOSHA, Takehiko)
国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員
研究者番号: 00548993

木村 哲就 (KIMURA, Tetsunari)
神戸大学・大学院理学研究科・特命講師
研究者番号: 70506906

(4) 研究協力者

なし