

平成30年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18487

研究課題名(和文) 光感受性化学構造をもつ金属蛋白質のX線自由電子レーザーを用いた常温無損傷構造解析

研究課題名(英文) Serial femtosecond X-ray crystallography (SFX) of metalloproteins containing light-sensitive chemical structures

研究代表者

溝端 栄一 (Mizohata, Eiichi)

大阪大学・工学研究科・講師

研究者番号：90571183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：X線自由電子レーザー(XFEL)施設SACLAを利用して、亜硝酸イオン(NO_2^-)から一酸化窒素(NO)への一電子還元反応を触媒するタンパク質、銅含有亜硝酸還元酵素(CuNiR)の完全酸化型の立体構造を、銅原子の異常散乱効果を用いて世界で初めて決定し、CuNiRのプロトン共役電子移動の反応機構を解明することに成功した。これまで、金属タンパク質の真の酸化型構造を知ることは、長い間、不可能とされてきたが、本研究では、SACLAの実験技術の改良を進め、さらに、SACLAと大型放射光施設Spring-8の技術を融合することで、新しい酵素反応機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Copper-containing nitrite reductase (CuNiR) is involved in denitrification of the nitrogen cycle. Synchrotron X-rays rapidly reduce copper sites, induce its catalytic reactions, and decompose the substrate complex structure, which has made crystallographic studies of CuNiR difficult. Using X-ray free electron laser (XFEL) facility, SACLA, we determined intact structures of CuNiR with and without nitrite. Based on the obtained structures, we proposed a redox-coupled proton switch model, which provides a new explanation for proton-coupled electron transfer in CuNiR.

研究分野：構造生物学

キーワード：量子ビーム科学 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

シンクロトン放射光を利用した従来の X 線結晶構造解析では、結晶に照射された X 線が水分子との相互作用により水和電子を発生させ、それが金属タンパク質の活性中心に存在する金属原子を還元してしまう現象 (X 線光還元) を避けることができなかった。また、回折データ測定時に極低温 (-180°C) で結晶を凍結する際に誘起されるタンパク質構造の変位も問題となることがあった。こうした放射線や低温による影響のない構造 (常温無損傷構造) を解明することは、構造生物学における重要な課題のひとつであった。

近年、X 線自由電子レーザー (X-ray Free Electron Laser: XFEL) の登場により、この課題の克服が可能となった。XFEL は超高輝度・フェムト秒パルス・高空間コヒーレンスという特徴を有する。世界初の XFEL 施設 LCLS が米国で 2009 年に建設されたのに続いて、我が国では 2011 年、SACLA が兵庫県播磨科学公園都市に建設された。SACLA が生み出す光の明るさは、SPring-8 が出す光の 10 億倍である。XFEL の光の特性を利用して多数の微結晶からタンパク質構造を解明する新しい測定手法、連続フェムト秒結晶解析法 (Serial Femtosecond Crystallography: SFX) が開発された (図 1)。SFX は、インジェクターから常温下で噴出させた多数の微結晶に対し、XFEL を連続的に照射することで得られた X 線回折画像を収集して構造解析する。SACLA では、1 発の XFEL のパルス光はわずか 2~10 フェムト秒の幅である。これが毎秒 30 発、微結晶の流れに向けて発射される。微結晶にパルス光が当たると、その衝撃で結晶は一瞬で崩壊してしまうが、崩壊過程よりも早く X 線回折画像を記録できるため、構造解析ができる。数万から数十万個の微結晶の X 線回折画像を数時間かけて測定してタンパク質の常温無損傷構造を決定することが可能となった。

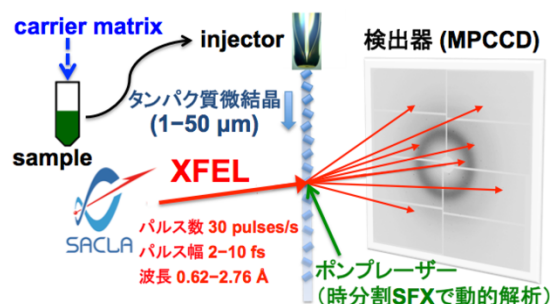


図 1. SFX 測定システム。

2. 研究の目的

生物有機化学上重要であるにも関わらず、光感受性が高いため不安定で、構造解析の難度が極めて高いタンパク質中の分子構造状態を、XFEL を用いて無損傷かつ高分解能で構造決定することを目的とする。具体的には、(SFX) の測定技術を用い、光感受性活性中心をもつ 2 種類の金属タンパク質、銅含有亜

硝酸還元酵素 (CuNiR) とミオグロビンの微結晶の X 線回折像を常温で連続して測定して結晶構造解析を行い、これらの光感受性活性中心の常温無損傷構造を解明する。この際、位相決定は標的タンパク質に含まれる金属について、単波長異常分散法 (SAD 法) 等の実験的位相決定により行い、分子置換法で見られるサーチモデルのバイアスを含まない座標情報を取得する。

3. 研究の方法

SACLA にて、*Alcaligenes faecalis* 由来 CuNiR (AfNiR) の resting state および基質 NO₂ 複合体の SFX データを収集し、結晶構造を決定した。また、SPring-8 にて、AfNiR の resting state および基質 NO₂ 複合体の回折データを収集し、構造決定した。SPring-8 での X 線回折画像の収集時には、銅原子の X 線光還元が速やかに起こることで CuNiR の触媒反応が進行し、基質 NO₂ から生成物 NO や副生成物が生じると考えられる。この反応が進んだ構造を SACLA で解析した反応開始前の真の酸化型構造と比較することで、CuNiR の反応中の構造変化を捉えることを試みた。他方、ミオグロビンおよびコバルト含有改変ミオグロビンの SFX データを取得した。

4. 研究成果

SACLA にて CuNiR の SFX 実験を行い、X 線光還元のない真の酸化型構造を常温 (20°C) 下で捕捉することに成功した。並行して、SPring-8 の放射光 X 線を利用して、CuNiR の触媒反応を X 線光還元により誘発させた構造を極低温 (-180°C) と常温下で決定し、SACLA の構造と比較した。緑色をした酸化型の結晶は、SPring-8 でのデータ測定中の X 線光還元にともない無色に変化してゆく様子が観察された。興味深いことに、SPring-8 で解いた構造は極低温と常温下のいずれも基質 NO₂ がフェイスオン (face-on) 型に近い構造で T2Cu に配位していたのに対し、SACLA の構造では直立 (vertical) 型で配位していた (図 2)。過去に報告された放射光で解かれた NO₂ 複合体構造を調べると、全てフェイスオン型に近い配位様式であった。このことから、反応前の酸化状態で NO₂ は直立型に配位し、反応中の銅原子の還元に依存して配位様式が倒れこむように構造変化すると考えられた。さらに驚いたことに、CuNiR が還元されると、T2Cu に配位する His255 のイミダゾール環が 20°回転する現象が見出された (図 3)。これらの新しい知見を基に、His255 の回転がレドックス依存的にプロトン転移反応を誘発するスイッチの役割をはたす反応機構を提唱した。この一連の成果は、新時代の光 XFEL と従来の放射光 X 線による解析法を併用することにより、未解明であったタンパク質の作用機作の一部を発見した事例として重要である。

一方、ミオグロビンおよびコバルト含有改変ミオグロビンの SFX データを取得し、構造解析に成功した (論文執筆中)。

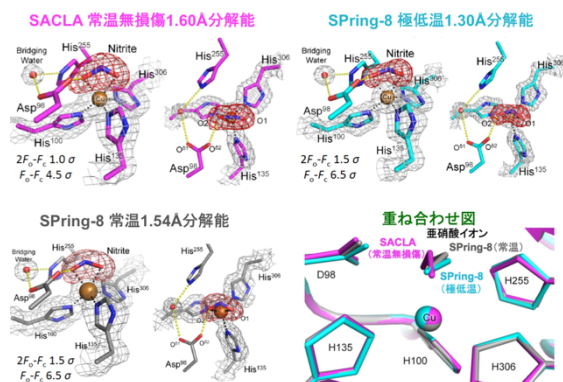


図2. 基質の亜硝酸イオン(NO_2^-)とCuNiRの複合体構造の比較。SACLAにてSFX、SPring-8にて極低温SRXおよび常温SRXで明らかにした構造について、T2Cu活性中心付近の構造を描いている。

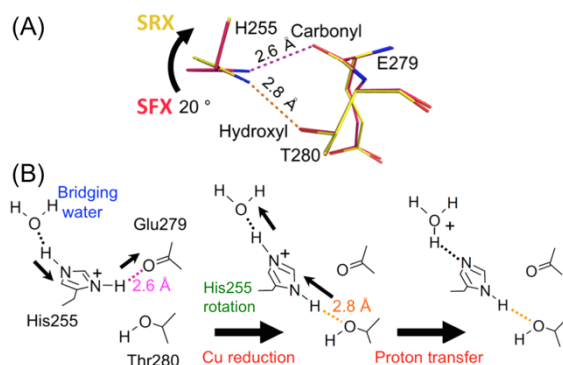


図3. レドックス依存的な His255 の回転とプロトン転移機構。(A) 水素結合パートナーのスイッチング。SFX またはSRXで構造解析したCuNiRの炭素原子を、それぞれ、赤色と黄色のスティックモデルで描いている。(B) 新しく提案した効率的なプロトン転移機構。小さい黒矢印は水素結合の向きを示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計20件)

- ① Serial femtosecond crystallography at the SACLA: breakthrough to dynamic structural biology. Mizohata E*, Nakane T, Fukuda Y, Nango E, Iwata S. *Biophys Rev.* 2018 Apr;10(2):209-218. DOI: 10.1007/s12551-017-0344-9.
- ② X線自由電子レーザーによる膜タンパク質構造決定法, 溝端栄一*, *バイオサイエンスとインダストリー*, 75(5) 415-417, 2017年09月.
- ③ 膜タンパク質の構造決定を加速化する技術の動向, 溝端栄一*, *日本結晶学会誌*, 59(4) 147-148, 2017年08月. DOI:

<http://10.5940/jcrrsj.59.147>

- ④ X線自由電子レーザーによるダメージフリーのタンパク質構造決定法, 中根崇智, 岩田想, 溝端栄一*, *生化学(日本生化学会邦文誌)*, 89(4) 571-576, 2017年08月. DOI: <http://10.14952/SEIKAGAKU.2017.890571>
- ⑤ Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by SPring-8 and SACLA, Eiichi Mizohata*, Yohta Fukuda, and Tsuyoshi Inoue, *SPring-8/SACLA Research Frontiers 2016*, 2017年08月. http://www.spring8.or.jp/pdf/en/res_fro/16/026_027.pdf
- ⑥ 連続フェムト秒結晶構造解析が書き換える銅含有亜硝酸還元酵素の反応機構, 福田庸太, 井上 豪, 溝端栄一, *放射光(放射光学会誌)【表紙掲載】*, 30(2) 53-60, 2017年03月.
- ⑦ 連続フェムト秒解析で観る亜硝酸還元酵素の反応機構, 溝端栄一, *医学のあゆみ: 生命現象を観る(医歯薬出版株式会社)*, 262:407-412, 2017年.
- ⑧ Capturing an initial intermediate during the P450nor enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate. Toshi 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. *Nat Commun.* 2017 Nov 17;8(1):1585. DOI: 10.1038/s41467-017-01702-1
- ⑨ Membrane protein structure determination by SAD, SIR, or SIRAS phasing in serial femtosecond crystallography using an iododetergent. Nakane T, Hanashima S, Suzuki M, Saiki H, Hayashi T, Kakinouchi K, Sugiyama S, Kawatake S, Matsuoka S, Matsumori N, Nango E, Kobayashi J, Shimamura T, Kimura K, Mori C, Kunishima N, Sugahara M, Takakyu Y, Inoue S, Masuda T, Hosaka T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Inoue T, Nureki O, Iwata S, Murata M, Mizohata E*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Nov 15;113(46):13039-13044. DOI: 10.1073/pnas.1602531113
- ⑩ Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography. Fukuda Y, Tse KM, Nakane T, Nakatsu T, Suzuki M, Sugahara M, Inoue S, Masuda T, Yumoto F, Matsugaki N, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Murphy ME, Inoue T, Iwata S, Mizohata E*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Mar 15;113(11):2928-33. DOI: 10.1073/pnas.1517770113

- ⑪ Redox-coupled structural changes in nitrite reductase revealed by serial femtosecond and microfocus crystallography. Fukuda Y, Tse KM, Suzuki M, Diederichs K, Hirata K, Nakane T, Sugahara M, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Matsumura H, Inoue T, Iwata S, Mizohata E*. *J Biochem.* 2016 May;159(5):527-38. doi: 10.1093/jb/mvv133
- ⑫ A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. Nango E, Royant A, Kubo M, Nakane T, Wickstrand C, Kimura T, Tanaka T, Tono K, Song C, Tanaka R, Arima T, Yamashita A, Kobayashi J, Hosaka T, Mizohata E, Nogly P, Sugahara M, Nam D, Nomura T, Shimamura T, Im D, Fujiwara T, Yamanaka Y, Jeon B, Nishizawa T, Oda K, Fukuda M, Andersson R, Båth P, Dods R, Davidsson J, Matsuoka S, Kawatake S, Murata M, Nureki O, Owada S, Kameshima T, Hatsui T, Joti Y, Schertler G, Yabashi M, Bondar AN, Standfuss J, Neutze R, Iwata S. *Science.* 2016 Dec 23;354(6319):1552-1557. DOI: 10.1126/science.aah3497

〔学会発表〕（計 17 件）

- ① 膜蛋白質の構造決定を加速化する技術の動向 ～XFEL を用いた実験的位相決定法～, 溝端栄一, **第31回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム**, つくば国際会議場, 茨城, 2018年01月【招待講演】
- ② Damage-free protein structure determination using X-ray free electron laser at SACLA, Eiichi Mizohata, **Janelia Conference -Challenges in Structural Biology-**, Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, USA, 2017年10月【招待講演】
- ③ Redox-dependent structural change in nitrite reductase visualized by SPring-8 and SACLA, Eiichi Mizohata, **第55回日本生物物理学会年会**, 2017年09月【招待講演】
- ④ Proteins in Serial Femtosecond Crystallography, Eiichi Mizohata, **14th Conference of the Asian Crystallographic Association**, 2016年12月【招待講演】
- ⑤ SACLA が解明した銅含有亜硝酸還元酵素の常温無損傷構造, 溝端栄一, **第16回日本蛋白質科学会年会**, 福岡国際会議場, 福岡, 2016年06月【招待講演】
- ⑥ SACLA が拓く構造生物学の新時代, 溝端栄一, **LSBM Symposium 2016, "超分子構造の計算科学"**, 東京大学先端科学技術研究センター, 東京, 2016年05月【招待講演】
- ⑦ Damage-free structure determination by SFX at SACLA, Eiichi Mizohata, **Workshop on serial femtosecond crystallography, SAXS, & Cryo-EM**. Genentech Hall, Mission Bay Campus, University of California, San Francisco (UCSF), USA, 2015年06月【招

待講演】

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：重原子化合物、膜タンパク質の結晶化を促進するための組成物、および該組成物を用いた膜タンパク質の構造解析方法
発明者：杉山成, 花島慎弥, 溝端栄一, 村田道雄, 井上豪, 斎木悠, 島田真典, 松森信明

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/007540

出願年月日：2017年2月27日

国内外の別：国内外

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?u=2561>

タンパク質の形を迅速に決定する手法で拓く、タンパク質構造ダイナミクス研究の新時代 (Academist Journal) :

<https://academist-cf.com/journal/?p=2958>

阪大など、SACLA と SPring-8 の技術融合で酵素反応の新機構解明 (日経バイオテク) :
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/p1/16/03/01/00308/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝端 栄一 (MIZOHATA, Eiichi)

大阪大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号: 90571183