

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06572

研究課題名（和文）中性子単結晶構造解析によるノイラミニダーゼの強い水素結合の観測と反応機構解明

研究課題名（英文）Observation of strong hydrogen bonds to elucidate the reaction mechanism of neuraminidase using neutron single crystal structure analysis

研究代表者

山田 太郎 (Yamada, Taro)

茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・産学官連携准教授

研究者番号：40455910

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：ネズミチフス菌由来の酵素ノイラミニダーゼのX線・中性子結晶構造を行うことによりその酵素反応に重要な役割を果たすと考えられているアミノ酸残基のプロトン化状態を決定した。フリー状態に近いノイラミニダーゼおよびノイラミニダーゼ・阻害剤複合体中の重要チロシン残基の水酸基はグルタミン酸のカルボキシル基と短めではあるが通常の水素結合を形成していた。このことからチロシン残基の水酸基は反応開始時点で強い活性を有していないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネズミチフス菌由来の酵素ノイラミニダーゼのX線・中性子結晶構造に成功した。これは世界で初めてのノイラミニダーゼ類の中性子構造解析例である。2つの状態のノイラミニダーゼの酵素反応で重要とされる活性部位中のアミノ酸残基のプロトン状態および水素結合ネットワークを決定した。ネズミチフス菌由来のノイラミニダーゼの立体構造はインフルエンザ治療薬の重要なターゲットタンパク質であるヒトインフルエンザウイルス由来ノイラミニダーゼと類似しており、その反応形式も共通すると考えられている。本研究で得られた結果は、今後、ノイラミニダーゼ類の反応機構およびその新規阻害剤をデザインするための重要な知見を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Structures of two states of neuraminidase from *Salmonella Typhimurium* were determined by X-ray-Neutron single crystal structure analysis to examine the protonation states of important amino acid residues for the enzymatic reaction, which is a clue to understand the enzymatic reaction mechanism. The hydrogen atoms in the enzyme were successfully observed for the malonate-HEPES and the inhibitor DANA complexes. For both states, in the active site, the tyrosine residue thought as most important forms a short but ordinal hydrogen bond with a glutamate carboxyl group nearby. The result shows that the tyrosine hydroxyl group is neutral and does not have strong nucleophilicity in the rested state and the inhibitor complex which mimics the intermediate state.

研究分野：構造生物学

キーワード：中性子結晶構造解析 ノイラミニダーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ノイラミニダーゼ (EC 3.2.1.18) は糖鎖や糖脂質末端のノイラミン酸のグリコシド結合を加水分解する酵素である。ノイラミニダーゼはインフルエンザ感染初期の治療薬の重要なターゲット酵素である。ネズミチフス菌 *Salmonella Typhimurium* LT2 由来ノイラミニダーゼはインフルエンザウイルスのそれと活性部位の立体構造が類似しておりそのモデルタンパク質となりうる。

(2) X線結晶構造解析や部位特異的変異導入実験により活性部位に存在するチロシン残基がノイラミニダーゼの酵素活性に必須であるということが知られていた。このチロシン残基の水酸基は近接するグルタミン残基により活性化されると考えられている。実際にすでに報告されていたネズミチフス菌由来ノイラミニダーゼの X線結晶構造解析例ではこの2つのアミノ酸残基が強い水素結合 (O···O 間距離 2.5 Å) を形成する。

(3) ノイラミニダーゼの提唱されている反応機構は  $S_N1$  型と  $S_N2$  型に大別される。1つ目はまずイラミル酸基のグリコシド結合が開裂し、チロシン残基により安定化された中間体が水分子と反応して生成物を生じる反応機構である。2つ目はチロシン残基の水酸基が基質末端のノイラミン酸基の C2 位を  $S_N2$  型で攻撃して共有結合を形成するものである。後者についてはノイラミニダーゼと活性部位の立体構造が類似する *Trypanosoma cruzi* 由来のトランスノイラミニダーゼにおいてチロシン残基がノイラミン酸の C2 位に共有結合する中間体の存在が確認されており、ノイラミニダーゼの反応機構も再考する余地がある。

(4) これまでにノイラミニダーゼ類の中性子結晶構造解析例は存在せず、酵素反応における重要アミノ酸のプロトン化状態は未決定であった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究ではネズミチフス菌 *Salmonella Typhimurium* LT2 由来ノイラミニダーゼのフリー状態および阻害剤複合体の2つの状態について X線・中性子結晶構造解析を行い、その重要アミノ酸のプロトン化状態や水素結合ネットワークを決定する。特に活性部位のチロシン残基に注目してそれが持つ物理化学的な特徴を明らかにしてノイラミニダーゼの反応機構を理解することを目的とした。

(2) ノイラミニダーゼ・阻害剤 DANA 複合体について DANA 分子中の水素/重水素比を X線・中性子結晶構造解析により決定し、DANA が逆反応によりカルボカチオン中間体を経てノイラミン酸に変換される可能性について考察する。

### 3. 研究の方法

(1) 中性子結晶構造解析を行うためには、通常、体積が  $1 \text{ mm}^3$  以上の大型の単結晶が必要である。大型単結晶の作成には大量のタンパク質試料が必要になるため遺伝子組換え大腸菌で大量生産可能である必要がある。大型結晶の育成に適した良好な結晶性と結晶形が必要である。中性子は X線と比べて強度が低いいため X線回折実験でできるだけ高分解能データが得られることが望ましい。これらの条件を全て満たすネズミチフス菌 *Salmonella Typhimurium* LT2 由来ノイラミニダーゼを本研究のターゲットとして選定した。

(2) タンパク質試料は遺伝子組換え大腸菌を使用して生産したのち、細胞から抽出後、クロマトグラフィーシステムを用いて精製を行った。大型結晶の育成は重水結晶化溶液を使用して、自作の結晶観察装置で定期的に観察しながら行った。

(3) 大強度陽子加速器施設 (J-PARC) の物質・生命科学実験施設 (MLF) に設置されている茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) を用いて中性子回折データを取得した。また、高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリー (PF) の構造生物ビームラインを用いて X線回折実験を実施した。二種の回折データを併用する中性子・X線結合構造精密化は構造解析プログラム Phenix を使用して行った。

### 4. 研究成果

(1) 2020 年度にまず薬剤が結合していない状態のノイラミニダーゼについて中性子結晶構造解析を行った。中性子回折実験を実施するために必要な体積が約  $2 \text{ mm}^3$  の単結晶を得ることに成功した。茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) を用いておよそ 10 日間かけて中性子回折データを取得した。その後、中性子回折実験で使用した結晶試料を用いて X線回折データを取得した。この

2つのデータを同時使用した結晶構造解析を実施したところ、中性子回折データを元にノイラミニダーゼ中の水素原子の多くを可視化することに成功した。これは世界で最初のノイラミニダーゼ類の中性子構造解析例となる。当初フリー状態の構造解析を予定していたが、実際には活性部位に結晶化する際に使用した結晶化剤マロン酸と pH 緩衝剤分子 HEPES が結合していることが判明した。ただしこれらは、調査したい重要アミノ酸残基のプロトン化状態に影響しないと判断した。提唱されている反応機構や X 線結晶構造解析結果より強い相互作用が存在すると予想していたチロシン 342 (Tyr342) 側鎖の水酸基とグルタミン酸 231 (Glu231) 側鎖のカルボキシル基の酸素原子間の水素結合距離は 2.6 Å と短めであるものの、Tyr342 の水酸基は中性型 OH となっており、通常の水素結合であることが判明した (図 1)。この水酸基 OH の水素原子の約 90%が重水素置換しており、周囲の水分子などの間で交換があることがわかった。すなわちフリーに近い状態では Tyr342 の水酸基が Glu231 による特別な活性化を受けているという確証は得られなかった。また、Glu231 による水素引き抜きを完全に否定するものではないが、それが安定した状態でないことがこの構造から示された。基質糖鎖からノイラミニダーゼ残基を切り出す際に切断されるグリコシド結合にプロトンを供与すると考えられているアスパラギン酸 62 (Asp62) のカルボキシル基は大部分がイオン化されていると判断されたが、非常に弱い中性子散乱長残密度が観測され、そのごく一部がプロトン化した中性状態である可能性が示唆された。

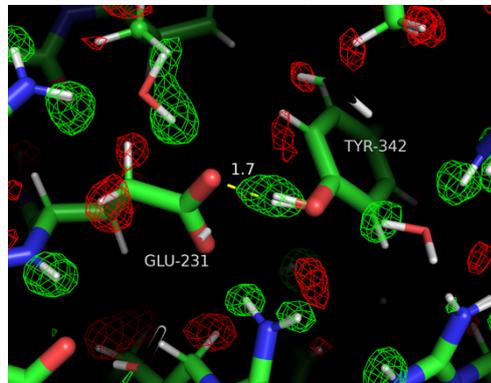


図 1 Tyr342-Glu231 間の水素結合の様子

(2) 2022 年度に前項 (1) で得られたノイラミニダーゼの中性子結晶構造中の Asp62 のプロトン化状態の再評価を行なった。iBIX を使って得られた 10 日間分の中性子回折 Raw データを 1, 2, 4, 6, 8, 10 日分に切断し、それぞれのデータセットを自作プログラムによりデータ処理した後、X 線・中性子結晶構造解析を行った。一部がプロトン化されていると予想した Asp62 のプロトン化状態は 1-4 日間のデータセットを使用した場合は不明瞭であったが、6-8 日分のデータセットを使用した場合、非常に弱いプロトン化状態が再現して確認された (図 2)。このことよりノイラミニダーゼの Asp62 側鎖のカルボキシル基の大部分はプロトン化されていないが、一部がプロトン化された状態となっており、結晶中で Asp62 が Brønsted 酸もしくは塩基の形をとるノイラミニダーゼが実際に存在することが明確となった。

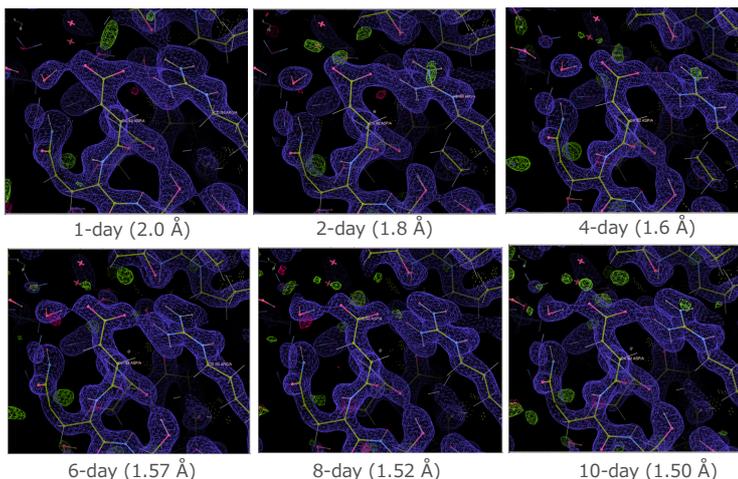


図 2 Asp62 付近の中性子散乱長密度図 (中性子回折データの分解能)

(3) 2021 年度に酵素反応の中間状態を模した阻害剤薬剤 DANA とノイラミニダーゼ複合体の中性子結晶構造解析を予定通り実施した。試料は (1) と同様の方法で体積が 1 mm<sup>3</sup> のフリー型のノイラミニダーゼ結晶を調製したのち阻害剤を含む人工母液に浸透した。X 線と中性子回折データを併用した XN 結合精密化を行ったところ、阻害剤 DANA の結合に関わる全ての水素結合を明瞭に観察することに成功した (図 3)。DANA の C3 位の水素は 100%軽水素であることが判明し、複合体中で DANA がプロトン化をうけて可逆的にカルボカチオン中間体を形成する証拠は見いだされなかった。これは活性部位で DANA が安定状態にあることを示している。また提唱されている反応機構からより強い相互作用が存在すると予想していた Tyr342 側鎖と Glu231 側鎖の酸素原子間の水素結合距離は

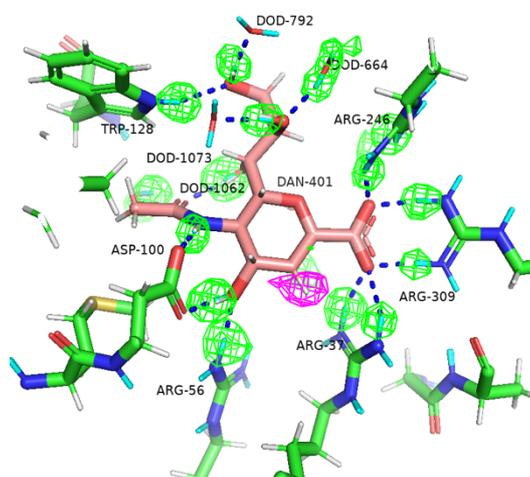


図 3 阻害剤 DANA 周辺の水素結合ネットワーク

HEPES・マロン酸複合体と同様に 2.6 Å と短いものの、Tyr342 の水酸基は中性であり特異なプロトン化状態や水素結合様式は見られなかった。Tyr342 の水酸基は重水素に交換されており Glu231 との間で形成される水素結合も周囲の水分子から遮蔽されていないことが分かった。

(4) HEPES・マロン酸複合体および DANA 複合体のいずれの場合も中性状態の Tyr342 が Glu231 との間で距離は短めではあるものの通常の水素結合を形成していた。また、この水素結合は遮蔽されておらず周囲の水分子と水素交換可能であった。すなわち定常状態では Tyr342 の水酸基が Glu231 によって特別に活性化され求核性が高められているという事実は見出されなかった。DANA 複合体中で DANA からカルボカチオン中間体を形成する確証も中性構造解析からは得られなかった。しかし、この逆反応が起こるためにはまず C3 位にプロトンの付加が必要である。このため今回の結果を持ってカルボカチオン中間体を経る反応機構が否定されるものではない。本来の糖鎖基質がノイラミニダーゼの活性部位に結合したときに Tyr342 の水酸基 OH がノイラミン酸基の C2 位に接近し、C2 位の分子軌道と相互作用して反応が進行すると推測される。これは反応の遷移状態の議論となり中性子結晶構造解析の結果のみで  $S_N1$  型と  $S_N2$  型のどちらの反応が進行するのかを断定することは困難である。今回の高分解能中性子結晶構造解析により Asp62 側鎖のカルボキシル基のごく一部がプロトン化されているものの大部分がイオン化していることが明確になった。つまり Asp62 は Brønsted 酸・塩基の両方として働きうる。基質の加水分解反応が進行する際には、まず Asp62 は基質のグリコシド結合の開裂の際にはグリコシド酸素にプロトンを供与し、水酸基付加の際には水分子からプロトンを受け取る役割を果たすものと考えられることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>山田 太郎、矢野 直峰、日下勝弘           |
| 2. 発表標題<br>細菌由来ノイラミニダーゼ阻害剤複合体の中性子回折実験 |
| 3. 学会等名<br>令和3年(2021年)度 日本結晶学会年会      |
| 4. 発表年<br>2021年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山田 太郎、矢野 直峰、日下勝弘               |
| 2. 発表標題<br>iBIX短時間測定によるタンパク質中性子結晶構造解析の可能性 |
| 3. 学会等名<br>2021年度量子ビームサイエンスフェスタ           |
| 4. 発表年<br>2022年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山田太郎、矢野直峰、日下勝弘                 |
| 2. 発表標題<br>iBIXを用いた細菌由来ノイラミニダーゼの中性子結晶構造解析 |
| 3. 学会等名<br>日本結晶学会2020年度年会                 |
| 4. 発表年<br>2020年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山田太郎、矢野直峰、日下勝弘              |
| 2. 発表標題<br>iBIX により取得したタンパク質回折データの強度補正 |
| 3. 学会等名<br>2020年度量子ビームサイエンスフェスタ        |
| 4. 発表年<br>2021年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山田太郎                                 |
| 2. 発表標題<br>HとDを区別しH/Dの割合を示す中性子タンパク質構造解析から何が分かるか |
| 3. 学会等名<br>令和4年度中性子産業利用報告会（招待講演）                |
| 4. 発表年<br>2022年                                 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |