

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K22642

研究課題名（和文）高分解能X線および中性子線回折による高電位鉄硫黄タンパク質の酸化還元反応の理解

研究課題名（英文）Understanding the Redox Reactions of a High-potential Iron-sulfur Protein through High-Resolution X-ray and Neutron Crystallography

研究代表者

花園 祐矢（Hanazono, Yuya）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：00750465

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：Thermochromatium tepidum由来高電位鉄硫黄タンパク質の0.66 分解能X線回折データと1.2 分解能の中性子回折データを組み合わせて構造解析を行った。タンパク質の構造としては初めて水素原子の座標を束縛なしで精密化することに成功し、ペプチド平面に存在すると考えられているアミドプロトンは、実際には周囲の電子状態の影響を受け、平面性からのずれに多様性が見られることを実験的に示した。また、アミドプロトンの平面からのずれは酸化還元機能にも関与しており、酸化型と還元型における鉄イオウクラスター周辺のペプチド平面の違いが、電荷状態の安定化に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、高電位鉄硫黄タンパク質構造を、X線および中性子線回折データを用いて高精度で解析し、水素原子の位置を含めた詳細な構造を明らかにしました。この成果は、タンパク質の酸化還元反応のメカニズムを明らかにし、新薬開発や生物工学における応用に貢献します。社会的には、これにより病気の治療法の開発や環境に優しいエネルギー生成方法の研究が進む可能性があります。

研究成果の概要（英文）：The structural analysis of high-potential iron-sulfur protein derived from Thermochromatium tepidum was performed by combining 0.66 resolution X-ray diffraction data and 1.2 resolution neutron diffraction data. For the first time, it was successful to refine the coordinates of hydrogen atoms in the protein structure without restraints. Experimentally, it was demonstrated that amide protons, which are thought to exist in the peptide plane, are actually influenced by the surrounding electronic state, showing variability in deviation from planarity. Additionally, the deviation of the amide protons from the plane is also involved in redox functions, suggesting that differences in the peptide planes around the iron-sulfur clusters in oxidized and reduced states contribute to the stabilization of charge states.

研究分野：構造生物学

キーワード：電子伝達タンパク質 精密構造解析 中性子構造解析 X線構造解析

1. 研究開始当初の背景

生体内の酸化還元反応はタンパク質間、あるいはタンパク質-溶媒間の電子伝達によって引き起こされるが、このような反応の詳細を明らかにするためには、化学結合に関わる原子やその原子が持つ外殻電子を含めた電子密度を精密に解析する必要がある。外殻電子(遷移金属のd電子や共役二重結合の π 電子など)の密度形状や電荷、水素原子位置、精密な結合長や結合角などを実験的に決定することによってはじめて酸化還元反応メカニズムの本質をとらえることができる。高電位鉄硫黄タンパク質(HiPIP)は光合成細菌において光合成電子伝達反応の中心を担うタンパク質の1つであり、酸化還元に関わる六面体状の4Fe-4Sクラスターを有する。このクラスターは2つの酸化状態(還元型 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ 、酸化型 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$)を持ち、酸化還元電位は約+300 mVと高い値を示す。4Fe-4Sクラスターとタンパク質間の水素結合の強さが酸化還元電位に影響しており、反応メカニズム解明における水素原子の影響を精密に決定することは非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、水素原子を含めたHiPIPの構造を高分解能X線および中性子線回折データをもとに高精度で決定することを目的とする。タンパク質の構造精密化においては、計算の都合上、結合距離や二面角に対して拘束をかけて精密化させる。反応部位の周辺などでは結合のひずみなどが観測されている例もあるが、これは十分に高分解能データでなければ明らかにすることができない。また、X線と中性子線回折データの同時解析を行うことによって、タンパク質の全水素原子について正確な座標だけではなく、解離状態や分極度などの化学情報を実験的に決定する。電子伝達とそれに共役したプロトン移動を実験結果に基づいて議論することができ、これまでには実験的にはとらえることのできなかつた生体反応を洞察することができるようになる。

3. 研究の方法

HiPIPの酸化型のX線回折データ、中性子回折データを用いてXN同時構造精密化を行った(表1)。回折データ処理はX線回折データに関してはHKL2000、中性子回折データに関してはSTARZerを用いた。初期位相は、酸化型HiPIP(PDB ID:5WQQ)の構造をサーチモデルとして使用し、MOLREPを用いた分子置換法によって決定した。初期のX線データの精密化は、Phenixを使用して1.2 Å分解能で行った。次に、0.66 Å分解能で異方性因子を導入した精密化を、SHELXLを用いて行った。精密化の際には、SHELXL標準値の幾何学的拘束を利用した。タンパク質の水素原子はライディングモデルを用いて導入した。X線データの精密化後、中性子回折データを用いてPhenixを使用して精密化を行った。重原子(C, N, O, S, およびFe)のパラメータは固定して精密化を行った。タンパク質の水素原子および、中性子散乱長密度(核密度)が確認できた溶媒の水素原子に関しては、中性子の標準値を用いて結合長を拘束して精密化を行った。その後、占有率が重水素の0.60以上、または軽水素の0.75以上であるアミドプロトンおよび単一コンフォメーションであった側鎖の重水素原子の座標は、幾何学的拘束なしで精密化を行った。

表 1. 酸化型 HiPIP の回折データ統計値

Data set	Neutron	X-ray
Data collection		
Beamline	J-PARC MLF BL03 iBIX	Photon Factory BL-5A
Wavelength (Å)	2.00–4.40	0.75
Temperature (K)	100	100
Exposure time per frame	8.5 hours	0.5 seconds
No. of frame	28	360
Crystallographic data		
Space group	$P2_12_12_1$	
Cell parameters a (Å)	46.334	
b (Å)	58.855	
c (Å)	23.548	
Resolution range (Å)	20–1.20 (1.24–1.20)	50–0.66 (0.67–0.66)
No. of reflections (total/unique)	94,383/19,669	869,521/117,107
Redundancy	4.8 (2.5)	7.4 (4.8)
Completeness (%)	94.9 (84.4)	96.3 (91.0)
$I/\sigma(I)$	6.0 (2.1)	45.4 (4.5)
R_{merge} (%)	21.0 (40.0)	5.9 (27.2)
$R_{\text{p.i.m.}}$ (%)	10.9 (31.5)	2.2 (12.1)

4. 研究成果

最終的な精密化は R_{work} および R_{free} は、X線データではそれぞれ 7.41% および 8.15%、中性子データではそれぞれ 15.4% および 16.8% まで行った。既存の構造である還元型 HiPIP の 0.48 Å 分解能の X線構造と比較して、主要な構造の違いはなかった (図 1、RMSD=0.62 Å)。鉄硫黄クラスター周辺の強く歪んだペプチド結合に関しても、2つの状態ではほぼ同じ ω 角の値を示した。また、他の高分解能 X線構造で観察されているように、C—N 結合長は C—O 結合長と負の相関を示した。これらの結合長は、ペプチド結合の二重結合性の度合いを示すものである (図 2)。

電子密度および核密度は、水素原子を含む各原子をはっきりと分離して観察することができた。一般に、水素原子の電子密度と核密度の中心は、水素原子が極性を持つために異なる。今回取得した酸化型 HiPIP の中性子回折データは、原子核の座標と電子密度の中心の座標を見分けるのに十分な精度であり、その違いを実験的に観察することができた。X線および中性子構造精密化では、水素原子の結合長および角度は通常、ライディングモデルとして拘束される。今回得られた核密度は、ペプチド平面から明らかに乖離しているものが存在していた。さらに、今回取得した回折データのデータ対パラメータ比は、アミドプロトンや単一コンフォメーションの側鎖の重水素原子の座標を精密化するのに十分であった。そこで、64 個のアミドプロトンと 36 個の側鎖の重水素原子の座標は拘束なしで精密化し、座標決定に成功した (図 3)。

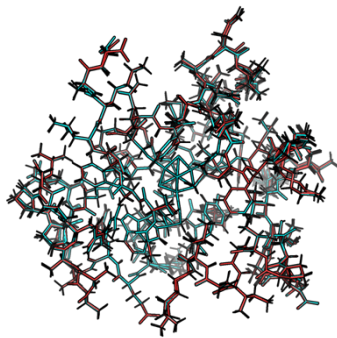


図 1. 酸化型 HiPIP (赤) と還元型 HiPIP (シアン) の構造比較

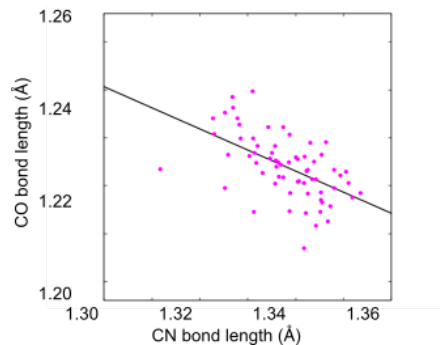


図 2. ペプチド結合内における C—N 結合長と C—O 結合長の相関

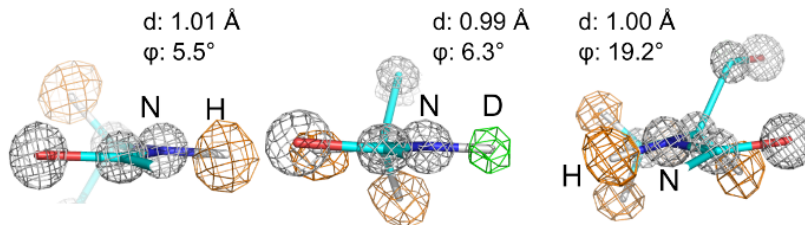


図 3. ペプチド結合内の電子密度図 (2FoFc マップ: 灰色 +4.0 σ) と核密度図 (水素オミットマップ: 緑 +5.0 σ 、橙 -3.0 σ)

水素結合はドナーとアクセプターのペアで構成されるが、その中でも複数のドナー、アクセプターを含む水素結合パターンは分岐型水素結合と呼ばれる。単一アクセプターの水素結合では、ほとんどのドナー—アミドプロトン—アクセプターの角度 ($\angle \text{DH}\cdots\text{A}$) はライディングモデルと比較すると小さな値となっていた。これは、アミドプロトンの原子核の位置がアクセプター原子に向かって静電相互作用によって引き寄せられ移動していることを示している。一方、分岐型水素結合では、静電力によって2方向から引き寄せられていた。鉄硫黄クラスターに共有結合している4つのシステイン残基のうち、3つ (Cys43, Cys61, Cys75) の $\angle \text{DH}\cdots\text{A}$ はライディングモデルから大きく逸脱していた。この値は、鉄硫黄クラスターとシステイン残基間の Fe—S $_{\gamma}$ 結合によって引き起こされる ω 角の歪みと相関していた。ほとんどの N—H 結合長は理想値の 1.02 Å 付近であったが、いくつかの N—H 結合長は理想値から大きく乖離しており、特に、鉄硫黄クラスターに結合しているシステイン残基の S $_{\gamma}$ とアミドプロトンの間の水素結合 (Leu63 および Ser77) は、N—H 結合長が大きく変化していた。

HiPIP の鉄-硫黄クラスターでは、Fe1, Fe2, S3, S4 からなるサブクラスター1 が主に電子の貯蔵を担っていることが報告されている。還元状態と酸化状態の構造を比較すると、S3 原子近くの Cys75 のアミドプロトンの位置が異なっていた。酸化状態では、Trp74—Cys75 のアミドプロトンと酸素原子は、それぞれ C $_{i-1}$ —N $_i$ —C $_{\alpha i}$ 平面から 18.8° および 11.7° 逸脱していた。Cys75 のアミドプロトンは S3 原子に向かっておらず、ペプチド結合の歪みにより Trp74 のインドール環に向かって移動しており、NH- π 相互作用を形成していた。一方、還元状態では Cys75 のアミ

ドプロトンは S3 原子に向かっている。還元状態では、酸化状態よりも鉄硫黄クラスターに1つ多くの電子が存在するため、Cys75 のアミドプロトンはサブクラスター1 の S3 原子によって引き寄せられていると考えられる。

HiPIP は LH1-RC (Light harvesting 1-Reaction center complex) と相互作用し電子伝達を行う。LH1-RC のヘム-1 は HiPIP の Leu63 との相互作用によって歪み、複合体形成によって疎水性環境に埋め込まれる。それにより酸化還元電位が上昇し、HiPIP とのエネルギーギャップが縮小するため、ヘム-1 は HiPIP よりも酸化還元電位が低いにもかかわらず、直接電子を受け取ることができると報告されている。ヘム-1 と直接相互作用する Leu63 の次の残基である Phe64 は、その側鎖を介して Val16 および Tyr19 と相互作用している。結果として、Asn20 のアミドプロトンの位置が変化し、Trp74 の酸素原子の方向に影響を与える。HiPIP と LH1-RC の複合体形成による構造変化の伝播は、おそらく鉄硫黄クラスターの S3 原子と相互作用する Cys75 のアミドプロトンの向きの変化につながると考えられる。結合面の遠位側に位置する S3 原子の電子貯蔵能力の変化は、HiPIP の酸化還元電位を低下させ、HiPIP から LH1-RC への電子移動を促進することが示唆される。

また、今回の中性子回折データは重水置換による回折データ測定であったため、各アミドプロトンの H/D 交換率を精密化している。表面残基のアミドプロトンはほとんど重水素に交換しているのに対し、鉄硫黄クラスター周辺のアミドプロトンはほとんど軽水素のままであった (図4)。この結果は、HiPIP の疎水コアが非常に剛直な構造をしており、溶媒分子が鉄硫黄クラスターにアクセスできないことを示唆している。HiPIP の鉄硫黄クラスターは疎水性残基で完全に囲まれている。対照的に、細菌型フェレドキシンの鉄硫黄クラスターは溶媒に露出しており、酸化還元電位が著しく低くなっている。この領域の疎水性は HiPIP 間で厳密に保存されており、これらの保存された領域は H/D 交換率と強い相関を示した (図5)。これらの結果は、HiPIP の鉄硫黄クラスターが疎水性環境内で強く保持されており、クラスターを囲む疎水性コアの高い剛直性が溶液中での高い酸化還元電位を維持するのに重要な役割を果たしていることを示している。

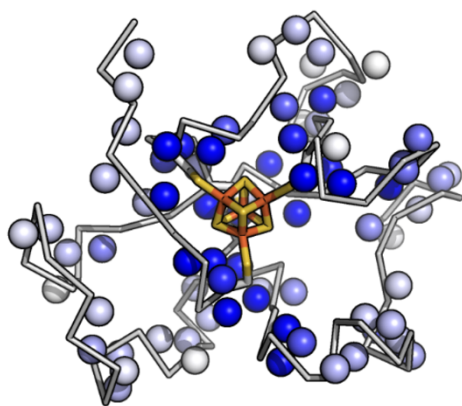


図 4. 酸化型 HiPIP の重水素交換比率 (青: 軽水素率、白: 重水素率が高い)

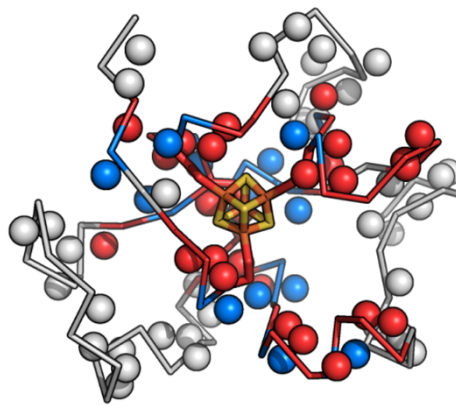


図 5. HiPIP のアミノ酸保存性 (赤: 非常によく保存されている、青: 比較的保存されている)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 HANAZONO Yuya	4. 巻 63
2. 論文標題 Revisiting the Peptide Bond Planarity by High-resolution Neutron Crystallography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 205 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.63.205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hanazono Yuya, Hirano Yu, Tamada Taro, Miki Kunio	4. 巻 20
2. 論文標題 Description of peptide bond planarity from high-resolution neutron crystallography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v20.0035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 HANAZONO Yuya, HIRANO Yu, TAMADA Taro, MIKI Kunio	4. 巻 64
2. 論文標題 New Description of the Peptide Bond in Proteins Revealed by High-Resolution Neutron Crystallography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nihon Kessho Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 207 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5940/jcrsj.64.207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hanazono Yuya, Hirano Yu, Takeda Kazuki, Kusaka Katsuhiko, Tamada Taro, Miki Kunio	4. 巻 8
2. 論文標題 Revisiting the concept of peptide bond planarity in an iron-sulfur protein by neutron structure analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 abn2276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abn2276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 花園祐矢, 平野優, 竹田一旗, 日下勝弘, 玉田太郎, 三木邦夫
2. 発表標題 ペプチド結合の非平面性の解明: 高分解能中性子結晶構造解析による新視点
3. 学会等名 2023年度量子ビームサイエンスフェスタ (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuya Hanazono, Yu Hirano, Nobutoshi Ito, Taro Tamada, Kunio Miki
2. 発表標題 Fine structure analysis of protein: Unraveling molecular details through ultra-high-resolution X-ray and neutron crystallography
3. 学会等名 The 18th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花園祐矢, 平野優, 竹田一旗, 日下勝弘, 玉田太郎, 三木邦夫
2. 発表標題 高分解能立体構造解析から得られたタンパク質中のペプチド結合における新しい描像
3. 学会等名 量子生命科学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花園祐矢, 平野優, 竹田一旗, 日下勝弘, 玉田太郎, 三木邦夫
2. 発表標題 高分解能中性子構造解析により明らかになるペプチド結合の非平面性
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花園祐矢, 平野優, 竹田一旗, 日下勝弘, 玉田太郎, 三木邦夫
2. 発表標題 高分解能中性子構造解析によるペプチド結合の平面性の再検討
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野優, 花園祐矢, 竹田一旗, 日下勝弘, 玉田太郎, 三木邦夫
2. 発表標題 高分解能中性子結晶構造解析によるペプチド結合平面性の再検証
3. 学会等名 第22回日本中性子学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花園祐矢, 平野優, 竹田一旗, 日下勝弘, 玉田太郎, 三木邦夫
2. 発表標題 高分解能中性子構造から明らかになったペプチド結合の非平面性
3. 学会等名 令和4年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuya Hanazono, Yu Hirano, Kazuki Takeda, Katsuhiko Kusaka, Taro Tamada, Kunio Miki
2. 発表標題 High-resolution structure of an electron-transfer protein by neutron crystallography.
3. 学会等名 The 4th International Forum on Quantum Metrology and Sensing (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------