

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440037

研究課題名(和文) 時分割X線および中性子解析によるシトクロムb5還元酵素の触媒機構の全容解明

研究課題名(英文) Elucidation of catalytic mechanism of NADH-cytochrome b5 reductase by time-resolved X-ray and neutron analyses

研究代表者

玉田 太郎 (Tamada, Taro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員(定常)

研究者番号：50391248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：NADHシトクロムb5還元酵素(b5R)が触媒する酸化還元サイクルの原子レベルでの全容解明を目指して、b5Rおよび電子受容体であるシトクロムb5(b5)の高分解能X線結晶構造解析を実施した。b5R酸化型の0.78 分解能でのX線構造解析では、多極子解析を適用することにより価電子分布の視覚化を実現した。また、還元型から再酸化型への時分割解析によって、酸化還元サイクル中の動的変化を捉えることにも成功した。さらに、b5の1₁を上回る高分解能での構造解析に成功し、酸化型と還元型間の微細な構造変化を捉えることができた。b5R酸化型については、中性子回折実験を実施し1.4 分解能の回折データを収集した。

研究成果の概要(英文)：NADH-cytochrome b5 reductase (b5R), a flavoprotein consisting of NADH- and FAD- domains, catalyzes electron transfer from the two-electron carrier NADH to the one-electron carrier cytochrome b5 (b5). We succeeded in structure determination of b5R and b5 at several states during the catalytic cycle by high-resolution X-ray crystallography. In the b5R oxidized (OX) form, valence electrons were clearly visualized and analyzed by multipolar refinement at 0.78 resolution. In the b5R reduced (RD) form, the relative configuration of the two domains was shifted in comparison with the OX form, resulting in the creation of a new hydrogen bonding network around FAD. Time-resolved analysis of b5R suggested that re-oxidation follows a two-step mechanism. We also confirmed the slight structural change, which regulates the catalytic cycle, between the OX and the RD form of b5 above 1.0 resolution. In addition, we collected the neutron diffraction data of the OX form of b5R at 1.4 resolution.

研究分野：構造生物学

キーワード：酸化還元酵素 高分解能X線結晶構造解析 中性子結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

酸化還元酵素は、物質の代謝や光合成系・呼吸鎖に代表されるエネルギー産生など、生物の生存に必須の数多くの反応を触媒する。その重要性から、多くの研究者が構造解析を含む様々な手法で酸化還元酵素の機能解明に挑み、数多くの成果が創出されているが、酸化還元サイクルの全容（反応に伴うタンパク質の一連の構造変化）と電子授受の調節機構（電子受容体との相互作用様式）の双方を構造と機能の両面から明らかにした例は数少なく、断片的な理解しか進んでいないのが現状である。

NADH シトクロム b_5 還元酵素 (b5R) は酸化還元酵素の 1 つで、電子供与体である NADH から電子を 2 つ受け取り、2 つあるドメインの境界に存在する補因子 (FAD) を介して、電子受容体であるシトクロム b_5 (b_5) に 1 つずつ電子を伝える。b5R は生体内において不飽和脂肪酸の合成、薬物代謝、コレステロールの合成、赤血球の維持などに関与しており、b5R の活性部位近傍に変異が生じる場合には重篤な遺伝病（遺伝性メトヘモグロビン血症）が発症し、神経障害、知能遅滞、発育不全などを引き起こし、死に至るケースも報告されている。よって、b5R が触媒する酸化還元サイクルと b_5 への電子伝達機構の詳細を明らかにすることは、酸化還元酵素の機能解明に対し重要な基礎科学的知見を与えるだけでなく、b5R の機能異常による疾病の原因究明を可能にし、治療の扉を開くことが期待されている。

2. 研究の目的

b5R の酸化還元サイクルを

- 顕微分光解析を組み合わせた X 線結晶構造解析により、高分解能かつ経時的に
- 中性子結晶構造解析により、水素原子を含めた全原子レベルで

明らかにする。前者については、酸化還元サイクルにおける b5R 活性中心の動的構造変化、ドメイン配向の動的変化を解明する。また、電子授受に関わる補因子 (FAD) の電子状態を構造及び分光学的に理解する。さらに電子受容体の b_5 についても、酸化還元サイクルの酸化・還元状態の構造を高精度で比較する。後者については、FAD および周辺残基のプロトン化状態を決定する。最終的に、これらの取り組みにより取得した高精度な構造情報に基づいて、b5R 酸化還元サイクルの全容を詳細に理解することを目的とする。

3. 研究の方法

1) b5R 酸化型の高分解能 X 線結晶構造解析

既得の 0.78Å 分解能の回折データに対し、まずプログラム SHELXL により、異方性温度因子を用いた構造精密化を実施した。その際に、結合距離・結合角の束縛を緩めることで、

より正確な構造情報の取得を試みた。さらに、プログラム Mopro により、多極原子モデルを利用した電子密度解析による外殻電子分布の可視化を試みた。

2) b5R 還元型～再酸化型の時分割 X 線結晶構造解析

b5R は確立済みの大腸菌発現系および精製条件を用いて調製した。還元型結晶は、NADH から FAD に受け渡された電子が酸素に漏出しないように、タンパク質試料、結晶化試薬・プレートなども予め十分に脱酸素化した状態で、嫌気チャンパー内で作製および試料凍結まで実施し、凍結結晶を放射光施設まで輸送し回折実験に供した。再酸化型への時分割解析のための結晶は、還元型結晶を好気環境に暴露した後に暴露時間をクライオトラップ法で制御することにより作製した。さらに、SPring-8 の BL38B1 における回折実験の際には on site で顕微分光解析することにより、酸化還元サイクルにおける結晶の状態と X 線照射による状態変化の影響をモニターした。

3) b5R 酸化型の中性子結晶構造解析

中性子回折実験に供する大型結晶は、結晶成長の過程における空気酸化による結晶の劣化を防ぐために、還元型結晶を同様に嫌気チャンパー内で作製した。得られた大型結晶を段階的に重水素および抗凍結溶液に浸漬した後に、100K 下で中性子回折データ収集を実施した。回折実験は大強度陽子加速器施設 J-PARC のパルス中性子源 MLF を用いた TOF-Laue 法、および研究用原子炉 FRMII (ドイツ) の単色法の 2 通りで実施した。いずれの結晶も、中性子回折実験後に同一結晶から X 線回折データを放射光施設において収集し、両データを相補的に用いた構造精密化を実施した。

4) b5 の高分解能 X 線結晶構造解析

b_5 は確立済みの大腸菌発現系および精製条件を用いて調製した。酸化型および還元型の双方とも、異なる pH 条件下で結晶を作製した。なお、還元型結晶の作製の際は、b5R の際と同様に嫌気チャンパーを使用した。X 線回折実験は b5R と同様に放射光施設において実施し、得られた回折データをプログラム SHELXL により、異方性温度因子を用いた構造精密化を実施した。

4. 研究成果

1) b5R 酸化型の高分解能 X 線結晶構造解析

プログラム SHELXL を用いて、0.78Å 分解能において、結晶学的 R 値が 12.3% (free R 値が 14.4%) まで構造精密化を実施した。構造は余剰電子密度より存在が確認できた水素原子を 1724 原子（炭素原子に結合した水素原子および主鎖のアミド水素原子のほとんど、側鎖の水酸基の水素原子も一部）含ん

でいる。異方性温度因子を用いた構造精密化を実施した。この構造から、Thr66 を介した FAD の N5 窒素原子と His49 の水素結合ネットワークの存在が水素原子の位置情報と共に明らかになった (図 1)。Thr66 は変異体を用いた分光学的解析の結果、FAD の N5 窒素原子からのプロトンの引き抜きに参与していると考えられている。また、His49 は FAD 近傍に存在する唯一の極性アミノ酸であるため、図 1b で示した水素結合ネットワークが b5R から b5 への電子伝達を制御していると考えられた。

引き続き、プログラム Mopro を用いた多極子解析により、原子間の結合電子やカルボニル酸素の非共有電子対など、通常の球対称原子モデルでは記述されない情報の精密化を実施した。その結果、結晶学的 R 値は 12.2% (free R 値が 14.0%) と若干向上した。多極子解析の結果、価電子分布を明瞭に視覚化することに成功し (図 2)、FAD の N5 窒素原子が酸化型においても若干負に帯電していることが明らかになった。また、多極子解析の結果、FAD から His49 への酸化状態における電子伝達経路は図 1b に記載した Thr66 側鎖を経る経路では無く、Tyr65 ~ Thr66 主鎖を経る経路 (図 2b 中の緑色の線) であることが新たに判明した。

なお、プログラム SHELXL を用いた b5R 酸化型の精密化の結果は、還元型の構造解析結果と共に 2013 年に Journal of Molecular Biology 誌に、プログラム Mopro を用いた多極子解析の結果は 2017 年に Scientific Reports 誌に掲載された。

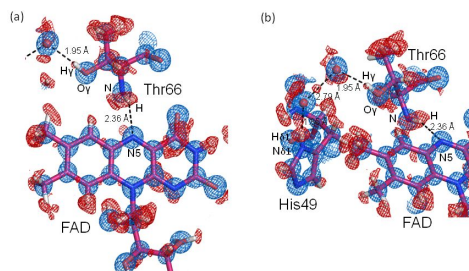


図 1 b5R 酸化型 0.78Å 分解能構造 (プログラム SHELXL により精密化) の活性中心

(a) FAD および Thr66 近傍、(b) Thr66 および His49 近傍の電子密度。青は $2F_o - F_c$ map (3.0σ)、赤は $F_o - F_c$ H-omit map (2.2σ)。

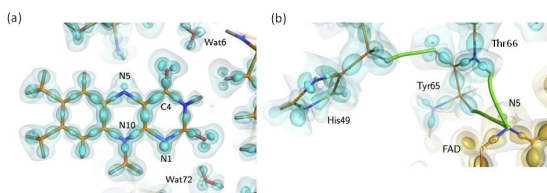


図 2 b5R 酸化型 0.78Å 分解能構造 (プログラム Mopro により精密化) の活性中心

(a) FAD および Thr66 近傍、(b) Thr66 および His49 近傍の電子密度。水色は価電子分布 (濃淡の順に、+0.5, +0.2, +0.01 $e/\text{Å}^3$)。

2) b5R 還元型 ~ 再酸化型の時分割 X 線結晶構造解析

還元型結晶は回折実験前後に顕微分光解析を実施し、作製した結晶が還元状態のスペクトルを示すこと、X 線照射による影響なく還元状態を保持していること、を確認した。1.68Å 分解能で決定した還元型の構造において、2 つのドメインの界面に 2 つの補因子 (FAD と NAD) が各々のドメインに結合した状態で存在していることを明瞭に確認できた。還元型構造と酸化型構造を比較すると、2 つのドメインの相対配置が大きく変化し (図 3)。その結果、還元型では FAD の溶媒露出面積が増大していた。また、生化学的解析から予測されている b5 結合領域 (His49 も含まれる) にも大きな構造変化が確認された。活性中心に存在する FAD のイソアロキサジン環は折れ曲がらずに平面構造を保っており、NAD のニコチンアミド環とスタッキングしていたが、N10 窒素原子は sp^3 型の幾何配置を取っていた (図 4b)。さらに、FAD からのプロトン放出に関わっているとされる Thr66 は、酸化型においては側鎖の水酸基と FAD の N5 窒素原子は相互作用するには遠い配置であったが、還元型においてはドメインの相対配置の変化によって水素結合可能な距離に位置していた (図 4)。

再酸化型への時分割解析のために、還元型結晶を好気環境下で 1, 10, 20, 60 分暴露した後に、液体窒素中にクライオトラップすることで状態を固定した (なお、最長で 9 時間暴露した結晶も作製したが、構造は 60 分暴露の構造と差がなかった)。それぞれの結晶において回折実験前後には顕微分光解析を実施したが、60 分大気暴露した結晶ではスペクトルは酸化型由来のものに完全に变化しており、この状態で再酸化型への変化が完了していることを確認した。ドメインの相対配置は 20 分まではほとんど還元型と同じであるが、60 分では酸化型の相対配置に移行しつつあることが判明した (図 3)。活性中心の構造を確認したところ、60 分の構造では NAD 分子はまだ存在しているものの、ニコチンアミド部分の電子密度は完全に消失し、ADP リボース部分もコンフォメーション変化していることを確認した。

以上の結果から、b5R の酸化還元サイクルにおいて、「ドメインの相対配置の変化によって b5 との相互作用が制御されている機構」、「NAD と FAD 間のスタッキングによる電荷移動によって、還元状態では FAD が陰イオン型 ($FADH^-$) として安定化されている機構」、「再酸化型に至る過程でこの電荷移動が消失することで NAD を放出する機構」が存在することを原子レベルで示唆することが出来た。なお、この成果は、酸化型の構造解析 (プログラム SHELXL を用いた精密化) の結果と併せて、2013 年に Journal of Molecular Biology 誌に掲載された。また、国際学会における発表においても高い評価を得た。

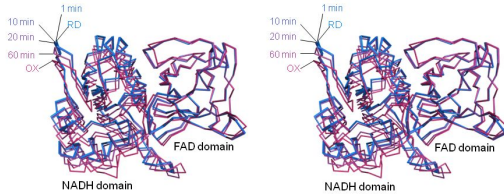


図3 酸化還元サイクルにおける b5R のドメイン相対配置の変化 (ステレオ図)

RD : 還元型、OX : 酸化型、分数は還元型結晶を大気暴露した時間を示す。

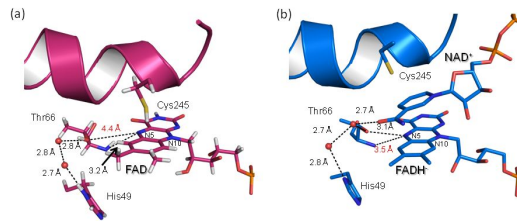


図4 酸化還元サイクルにおける b5R の活性中心の比較

(a) 酸化型 (プログラム SHELXL で精密化) (b) 還元型。点線は水素結合を示す (酸化型の FAD-N5 原子と Thr66 側鎖水酸基間を除く)。

3) b5R 酸化型の中性子結晶構造解析

嫌気チャンパー内においてバッチ法による結晶化を実施することにより、最終的に約 2.0 mm^3 の結晶の取得に成功した (図 5a)。中性子回折実験においては、(軽)水素による非干渉性散乱によってバックグラウンドが上昇するため、溶媒を重水に置き換えることが一般的である。また、同じ波長域において X 線と中性子の持つエネルギーは大きく異なるため照射損傷に留意する必要はないが、原子の揺らぎを抑えることによる分解能向上が期待されるため、低温下での測定を試みた。X 線回折実験に通常用いる結晶では置換溶液に直接浸漬することで問題ないが、中性子回折実験に供するような大型結晶の場合は結晶の劣化、損壊が危惧される。よって、段階的に重水および抗凍結剤の濃度を上げていくことでこれらの問題を解決した。なお、b5R 結晶は好気環境下では結晶の劣化が生じるため、重水溶液への置換は嫌気チャンパー内で約 1 週間程度、抗凍結溶液への置換は測定当日に約 3 時間程度で実施し、その後窒素気流下で凍結した。

中性子回折実験は J-PARC/ MLF の BL03 (iBIX) において TOF-Laue 法により実施した。良好な Laue パターンとして回折像を記録し (図 5b) 最高で 1.38 \AA 分解能の回折点を確認できた (図 5c、回折データとしては 1.40 \AA 分解能として収集)。中性子回折実験後に、同一結晶を用いて放射光施設において X 線回折実験を実施し、 0.88 \AA 分解能の X 線回折データを収集した。現在、両方のデータを相補的に用いた構造精密化を実施中であるが、TOF-Laue 法により収集した中性子回折データの統計値の悪さが問題のため、合わせて

中性子回折データの処理法の見直しも実施中である。TOF-Laue 法との比較のために、FRMII に設置された回折装置 (BIODIFF) において、単色中性子を用いた回折実験も実施した。こちらの回折装置では 1.45 \AA 分解能として回折データを収集した。こちらの結晶についても、同様に放射光施設において相補的の精密化に用いるための X 線回折データを 0.86 \AA 分解能で収集し、構造精密化を実施中である。

構造解析を終了していないため、雑誌論文としての発表はまだないが、中性子構造解析の現状については高い関心を集めており、招待講演を複数依頼された。

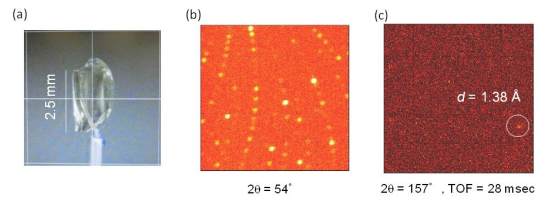


図5 b5R 酸化型の J-PARC/ MLF における中性子回折実験

(a) 回折実験に使用した大型結晶、(b)(c) 中性子回折像。b は中角領域の Laue パターン、c は高角領域のスライス像。

4) b5 の高分解能 X 線結晶構造解析

酸化型、還元型の双方とも、酸性 (pH5.5) およびアルカリ性 (pH7.5) の異なる 2 つの条件下で結晶化を実施した。いずれの結晶においても 1 \AA を上回る分解能で回折データを収集した。構造解析の結果、酸化型、還元型の双方共、いくつかのアミノ酸で水素原子の電子密度を観測することが出来た (図 6)。プログラム SHELXL を用いた原子間の結合距離、角度の制約を外した構造精密化を行ったが、b5 の活性中心に存在するヘム鉄配位子の構造については、酸化型と還元型で有意な差が見られなかった。一方で、ヘムのプロピオン酸部分については、pH 間においてコンフォメーションの差がみられ、pH5.5 の構造においては、7-プロピオン酸のカルボキシル基が酸化型では解離状態なのに対し、還元型ではプロトン化していることが結合長から明らかになった。また、ヘム鉄の軸配位子である His68 の周辺においては、酸化型と還元型の間で水素結合ネットワークが変化することが観測された (図 7)。

以上の記載したとおり、ヘムの酸化還元状態調節に重要だと考えられる微細な構造の変化を 1 \AA を上回る高い分解能での構造解析の結果捉えることに成功した。この成果は、2015 年に Acta Crystallographica Section D 誌に掲載された

今後は、酸化型の中性子構造解析を完成させるとともに、b5R と b5 の複合体状態での構造解析にも取り組み、b5R 酸化還元サイクルの全容解明を実現したいと考えている。

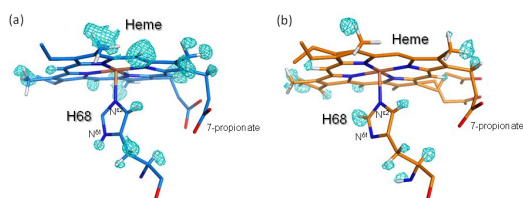


図6 ヘムと軸配位子 His68 近傍の電子密度 (pH7.5 構造)
(a) 酸化型、(b) 還元型。水色は F_o-F_c H-omit map (1.5 σ)。

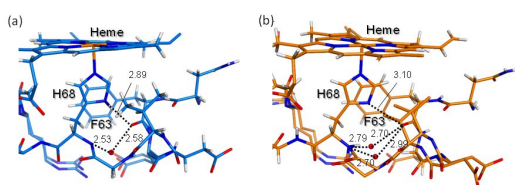


図7 ヘムと軸配位子 His68 近傍の水素結合ネットワーク (pH7.5 構造)
(a) 酸化型、(b) 還元型。点線は水素結合を示す。

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3件)

Takaba, K., Takeda K., Kosugi, M., Tamada, T. and Miki, K. “Distribution of valance electrons of the flavin cofactor in NADH-cytochrome b_5 reductase”, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 2017, 43162
DOI: 10.1038/srep43162

Hirano, Y., Kimura, S. and Tamada, T. “High-resolution crystal structures of the solubilized domain of porcine cytochrome b_5 ”, *Acta Crystallographica section D*, 査読有, 71, 2015 1572-1581
DOI: 10.1107/S1399004715009438

Yamada, M., Tamada, T., Takeda, K., Matsumoto, F., Ohno, H., Kosugi, M., Takaba, K., Shoyama, Y., Kimura, S., Kuroki, R. and Miki, K. “Elucidations of the catalytic cycle of NADH- cytochrome b_5 reductase by X-ray crystallography: New insights into regulation of efficient electron transfer”, *Journal of Molecular Biology*, 査読有, 425, 2013, 4295-4306
DOI: 10.1016/j.jmb.2013.06.010

〔学会発表〕(計13件)

Tamada, T. “Neutron protein crystallography in Japan”, Neutron biology for next generation (国際、招待) 2017年3月22日~23日、茨城量子ビーム研究センター (茨城・東海)

Hirano, Y., Kimura, S. and Tamada, T. “High-resolution crystal structures of the

heme-binding domain of cytochrome b_5 from porcine liver”, 5th international symposium on diffraction structural biology (国際) 2016年8月7日~10日、ノックスビル(米国)

Tamada, T. “High-resolution neutron crystal structural studies of electron transfer proteins”, IPR international symposium, 2016 Taiwan-Japan joint symposium of crystallography (国際) 2016年6月23日~24日、北海道大学 (北海道・札幌)

平野優、木村成伸、玉田太郎、 「ブタ肝臓由来シトクロム b_5 ヘム結合ドメインの高分解能結晶構造」、第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7日~9日、福岡国際会議場 (福岡・福岡)

玉田太郎、平野優、友寄克亮、栗原和男、 「J-PARC を利用したタンパク質中性子結晶構造解析の現状と今後」、平成27年度日本結晶学会年会、2015年10月17日~18日、大阪府立大学 (大阪・堺)

玉田太郎、 「中性子を用いたタンパク質立体構造解析と産業応用」、第5回CSJ化学フェスタ (招待) 2015年10月13日~15日、タワーホール船堀 (東京・江戸川)
玉田太郎、 「中性子を用いたタンパク質結晶構造解析の現状と今後」、ERATO 第25回タンパク質関連情報交換会 (招待) 2015年7月22日、大阪大学 (大阪・豊中)

玉田太郎、 「電子伝達タンパク質の高分解能中性子結晶構造解析」、第15回日本蛋白質科学会年会 (招待) 2015年6月24日~26日、あわぎんホール (徳島・徳島)

平野優、栗原和男、玉田太郎、日下勝弘、三木邦夫、 「電子伝達タンパク質の中性子構造解析」、日本中性子科学会第14回年会 (招待) 2014年12月11日~12日、北海道立道民活動センター (北海道・札幌)

平野優、山田貢、栗原和男、正山祥生、黒木良太、日下勝弘、木村成伸、竹田一旗、三木邦夫、玉田太郎、 「NADH-シトクロム b_5 還元酵素の中性子構造解析」、平成26年度日本結晶学会年会、2014年11月1日~3日、東京大学 (東京・文京)

Hirano, Y., Yamada, M., Kurihara, K., Kusaka, K., Kimura, S., Miki, K. and Tamada, T. “Preliminary neutron diffraction studies of NADH- cytochrome b_5 reductase at J-PARC”, The 2nd international symposium on science (国際) 2014年7月12日~15日、つくば国際会議場 (茨城・つくば)

平野優、木村成伸、玉田太郎、 「ブタ肝臓由来シトクロム b_5 の高分解能結晶構造」、第14回日本蛋白質科学会年会、2014年6月25日~27日、ワークピア横浜/横浜産貿易ホール マリネリア (神奈川・横浜)

Tamada, T., Yamada, M., Takeda, K., Matsumoto, F., Kimura, S., Kuroki, R. and

Miki, K. "Elucidations of the catalytic cycle of NADH-cytochrome *b*₅ reductase by X-ray crystallography", International conference on structural genomics 2013 (国際) 2013年7月29日~8月1日、京王プラザホテル札幌(北海道・札幌)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 太郎 (TAMADA, Taro)

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員

研究者番号：50391248

(2) 研究分担者

平野 優 (HIRANO, Yu)

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員

研究者番号：80710772

山田 貢 (YAMADA, Mitsugu)

独立行政法人 日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・任期付研究員

研究者番号：80510924

(3) 連携研究者

木村 成伸 (KIMURA, Shigenobu)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：90291608