

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24109017

研究課題名（和文）生体酵素系に生成する感応性化学種の同定と機能解明

研究課題名（英文）Identification and Functional Analysis of Stimuli-responsive Chemical Species during Enzyme Reaction

研究代表者

井上 豪（Inoue, Tsuyohi）

大阪大学・工学研究科 教授

研究者番号：20263204

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 64,800,000円

研究成果の概要（和文）：ペルオキシレドキシン（Prx）は活性中心にCys残基を有し、過酸化水素を水に還元する過程で、超原子価硫黄を含むS-OH中間体を経る。S原子上にあるH原子の存在を中性子解析で実証する目的で、3種の超好熱古細菌由来Prx（ApPrx, PhPrx, TkPrx）について大型結晶の育成に取り組んだが、いずれもH原子の存在を実証できる高分解能データの収集には至らなかった。しかし、PhPrxにも同様の中間体が存在し、一般性が実証された。

一方、活性種を研究する手法としてX線自由電子レーザーを用い、亜硝酸還元酵素NIRの完全酸化型の基質の結合様式から酸化還元に伴う構造変化に関する知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Peroxiredoxin (Prx) has a Cys residue at its active site and shows the enzyme activity via S-OH intermediate containing hypervalent sulfur in the process of reducing hydrogen peroxide to water. For uncovering the presence of H atoms on the S atom by neutron analysis, we tried to obtain large crystals of Prx (ApPrx, PhPrx, TkPrx) derived from three types of hyperthermophilic archaea. None of them diffracted up to 3.0Å resolution, and the presence of H atom on the S atom was not proved to date. However, the similar structure of S-OH intermediate existed in PhPrx, demonstrating the generality of the S-OH intermediate.

On the other hand, X-ray free electron laser is superior as a method to investigate stimuli-responsive chemical species. We have acquired a knowledge on structural change accompanying reduction upon X-ray irradiation was obtained from the completely oxidized form of nitrite reductase (NIR).

研究分野：構造生物学、基礎医学、免疫学

 キーワード：チオレドキシンペルオキシダーゼ 還元反応 酵素反応 反応中間体 線構造解析 中性子線解析
線自由電子レーザー SACLA

1. 研究開始当初の背景

生体酵素系などの高次凝縮環境下においては、酵素触媒反応の過程で一過的に感応性化学種が生成し、特異な機能を発揮することがある。

我々は本研究を開始する当初、チオレドキシニペルオキシダーゼ中のチオール残基が過酸化水素と反応し、水分子まで還元する際に生成する中間体の構造を 100K という低温でトラップし、X線回折法で調べたところ、S-OH 中間体の構造であることが判明した。チオール残基の特異な構造を基に分子軌道計算を使って、「超原子価硫原子」を含む構造であることが予想されたが、硫黄原子上に存在する水素原子やローンペアを直接観察したものではなかった (PNAS, 2008)。

一般に、X線回折法では水素などの軽原子の構造を決定するのが不得意で、あくまでも予想構造の域を脱することができず、S-OH 中間体が生成した後の化学特性などは未解明のまま、構造を基にした反応性に関する議論が進まない状態であった。これに対して中性子線回折法は、軽原子の位置を決定する方法としては優れているが、一般に、回折能が弱く、1 mm 以上の大型で良質の結晶が必要である。

一方、播磨大型放射光実験施設におけるX線自由電子レーザーの試験利用が 2012 年頃から開始され、中性子線回折法以外の S-OH 中間体を証明する方法として期待できる状態となった。結晶中の酵素の反応を一斉に同期させる装置が導入されないまま本研究課題が終了したため、ApTPx の反応中間体の構造を時分割で調べることはできなかったが、常温で 10 フェムト秒でデータ収集が可能であり、X線による損傷を受ける前にデータ収集が可能という特長を有していた。

そこで、金属活性中心を有するスーパーオキシドディスムターゼ(ApeSOD)や亜硝酸還元酵素 (NIR) を用い、酸化還元反応過程で生成する感応性化学種の構造を同定する研究に取り組んだ。なお、ApeSOC や NIR など、金属イオンの酸化還元サイクルにともなって反応を行い、前者はスーパーオキシドアニオンラジカル($\cdot\text{O}_2^-$)を過酸化水素(H_2O_2)にまで、後者は亜硝酸イオンを NO ガスにまで還元する反応を触媒する。X線自由電子レーザーの利用により、X線照射による還元反応が起こる前の基質結合状態の構造を解析し、詳細な反応機構の解明のための構造モデルを提供できると考えられた。これによって生体内で生成する新たな感応性化学種の構造を同定し、その化学種が受ける摂動メカニズムの解明によって、合目的な触媒の開発に向けた構造基盤の確立を目指した。

2. 研究の目的

Prx はヒトにも存在し、2 個の活性に必須のシステイン (Cys) 残基を有し、生体中で発生した過酸化水素 1 分子を 2 分子の水に還元

する。

超好熱始原菌 *A. permix* K1 由来 Prx (ApTPx) の場合、1 個目の Cys 残基が過酸化水素を攻撃し、超原子価硫黄原子を含む S-OH 中間体として一過的に発生し、もう 1 個の Cys 残基がこれを攻撃して S-S 結合を形成して、過酸化水素の還元反応が進行する反応メカニズムを提唱していた (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2008)。生体中で超原子価硫黄原子を捕捉した初めての報告例ではあったものの、水素原子も含めた詳細な構造の解析には至っておらず、S-OH 中間体から S-S 中間体へと至る過程の大きな構造変化や、S-OH 中間体が受ける分子の摂動メカニズムについても未解決のままであった。

そこで、S-OH 中間体の構造を、前回と同様に低温でトラップし、中性子構造解析により硫黄原子上の水素原子の存在を直接観察することを 1 つ目の目的とした。そのために、高品質で大型の結晶化に取り組んだ。種結晶化法のほか、申請者らがこれまでに開発したレーザー照射による結晶核の発生技術や攪拌による結晶の高品質化技術なども駆使することによって、ApTPx の大型で高品質の結晶化に取り組んだ。

また、S-OH 中間体の構造の一般性について検証する目的で、超好熱始原菌 *A. permix* K1 由来 Prx (ApTPx) 以外の Prx についても、同様に反応中間体のX線構造解析を行い、チオール残基のもつ特長について議論を行うことを 2 つ目の目的とした。

一方、金属タンパク質であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)における金属とラジカルの反応や、亜硝酸還元酵素 (NIR) における酸化還元に伴う基質結合様式の違いを詳細に解析し、感応性化学種としての生体分子内金属の摂動メカニズムを解明することを 3 つ目の目的とした。特に、ApeSOD の基質結合状態に近似した立体構造を明らかにしたが、より詳細な反応機構の解析のため、基質($\cdot\text{O}_2$)と生成物(H_2O_2 , O_2)の区別をつけるため、ApeSOD の中性子線結晶構造解析を指向した大型結晶の作製に取り組んだ。もう 1 つの NIR についてはX線自由電子レーザーの利用開始に伴い、世界に先駆けてX線による損傷のない状態での構造を解析し、感応性化学種の構造についての議論を深めることとした。

以上のように、活性酸素との反応を手掛かりに、超原子価硫黄や金属イオンの反応機構を詳細に解析し、生体酵素系で生成する感応性化学種としての摂動メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

S-OH 中間体の構造の証明には中性子線構造解析による硫黄原子上にある水素原子の直接観察が必須となる。ApTPx については、従前の 10 量体構造のまま大型結晶の作製を目指すとともに、結晶における対称性の向上

を目的に結晶内のパッキングに関係するところのアミノ酸に変異を加えた新たな結晶作製に関する研究を行い、結晶形の異なる状態で大型結晶を用いた中性子線構造解析を目指した。

また、種の異なる *P. horikoshi* 由来 TPx を用いた場合にも、S-OH 中間体の捕捉を試みて、Cys 残基の反応の一般性について検討すると共に、大型結晶化を行って、中性子回折実験を目指した。

一方、X線自由電子レーザーの利用が可能な SACLA における時分割のX線構造解析についても検討したが、結晶中の全蛋白質の反応を同期させるための装置がビームラインに未導入であったため、常温で、かつ、X線に対する無損傷の状態でのX線構造解析を行い、酸化還元に伴う構造変化などを捉えることによって金属酵素の感応性化学種の同定を目指した。ここでは ApeSOC や NIR について SACLA を用いた構造解析を行い、そのダイナミズムの解明に取り組んだ。

4. 研究成果

1) ApTPx の中性子構造解析

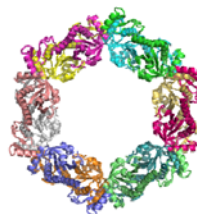
中性子構造解析のためには 1 mm 角を超える大型で高品質の結晶の作製が必須となる。大量精製された ApTPx の結晶化を行い、0.2~0.4mm のサイズの結晶を得て後、これを細かく砕いて種とするマイクロ種結晶化法や、そのまま次のバッチの中に浸漬するマクロ種結晶化法などを駆使したところ、2 mm を超える大型結晶の作製には至ったものの、劈開性のある結晶しか得られず、そのモザイク性を改善するには至らず、3.5Å 分解能以上の回折強度データを収集することができなかった。中性子構造解析による水素原子の同定には至らなかった。

そこで、上記で得られた結晶が ApTPx のダイマーが 5 個、リング状態に並んだ 10 量体を基にして形成されていることに着目し、結晶形の変化を期待して蛋白質同士の相互作用に関わる残基の Mutation 実験を試みた。その結果、結晶の空間群が $P1$ から $P2_1$ に至ったものの、結晶格子の1軸の長さが 170.8 Å とむしろ長くなり、より大型の検出器が必要となるなど、国内の施設では中性子線回折のデータ収集が不可能な状態となった。

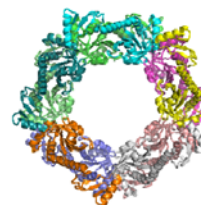
2) S-OH 中間体の一般性について

異なる超好熱始原菌 (*Pyrococcus horikoshi*) 由来 TPx (PhTPx) についても同様に S-OH 中間体を経て反応が進行するものと考え、反応中間体のX線構造解析に取り組んだ。まずは Native の状態で結晶を大量に作製し、1%の過酸化水素を含む結晶化母液に結晶を浸し、30 秒後、60 秒後、90 秒後に反応を停止する目的で 100 K で結晶を凍結し、そのX線構造解析を何度も試みた。その結果、過酸化水素の添加に伴う S-OH 中間体に至るまでの構造変化を捉えることに成功し、PhTPx についても以前と同様に S-OH 中間体を経て反応が進行することが示された。

しかし、一方で、*P. horikoshi* 由来の TPx の結晶は、12 量体がパッキングする形となり、中性子構造解析のための大型結晶の調製には不向きであった。さらに別の 12 量体をとる超好熱古細菌 *T. kodakaraensis* 由来 Prx(TkPrx)についても大量培養・精製を行い、結晶化に取り組んだところ、空間群が $P622$ に属する新たな結晶が得られた。現在、これらの新たな TPx について中性子線回折実験のための大型化に取り組んでいる。



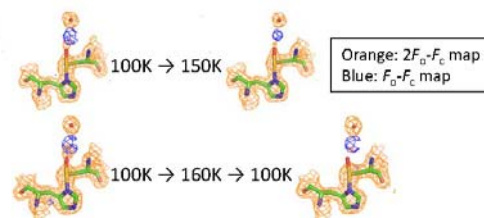
T. kodakaraensis Prx
十二量体
空間群 $P622$
非対称単位に1分子



P. horikoshii Prx
十量体
空間群 $P2_1$
非対称単位に20分子

3) S-OH 中間体に至る過程の可逆性について

S-OH 中間体に至る反応過程が可逆的である可能性が示唆されていたので、その反応過程を温度を変化させた結晶学的研究によって追跡した。すなわち、S-OH に至る1つ手前の構造の pre-oxidation form の結晶を調製し、100K から 150K に昇温した際の電子密度の変化や、100K から 160K に昇温し、再び 100K にした際の電子密度の変化を観察した。その結果、可逆的な超原子価硫黄原子の生成過程を観測することに成功した(下図)。



4) 金属酵素の感応性化学種に関する研究

ApeSOD(Superoxide dismutase from *Aeropyrum pernix*)に関して、基質非存在下でのアポ型(2.3Å 分解能)、および、基質複合体の結晶を作製することに成功し、X線構造解析を行った。現在、反応機構に関する詳細を検討しているところである。

一方、NIR については、X線自由電子レーザーのビームを得ることのできるビームライン SACLA を使い、X線損傷のない完全酸化型の構造解析を行い、基質である亜硝酸イオンの還元に伴う構造変化について議論を深めることができた(PNAS, 2016)。

今後、MD 計算を行うには初期構造の決定が非常に重要となる。感応性化学種の生成に至る反応過程を詳細に検討する際、初期構造を得る手段としては極めて重要であることが判った。

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 17 件)

1.J. Fujita, Y. Maeda, E. Mizohata, T. Inoue, M. Kaul, A.K. Parhi, E.J. LaVoie, D.S. Pilch, H. Matsumura

“Structural flexibility of an inhibitor overcomes drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* FtsZ”, ACS Chem. Biol., in press (2017)

2.J. Fujita, *R. Harada, Y. Maeda, Y. Saito, E. Mizohata, T. Inoue, Y. Shigeta, H. Matsumura

” Identification of the key interactions in structural transition pathway of FtsZ from *Staphylococcus aureus*”, J. Struct. Biol., 198, 65-73 (2017). DOI: 10.1016/j.jsb.2017.04.008

3.T. Kono, S. Mehrotra, C. Endo, N. Kizu, M. Matsuda, H. Kimura, E. Mizohata, T. Inoue, T. Hasunuma, A. Yokota, H. Matsumura, H. Ashida

” A RuBisCO-mediated carbon metabolic pathway in methanogenic archaea”, Nature Commun., 8(14007), 1-12 (2017). DOI: 10.1038/ncomms14007

4.T. Sato, T. Kawasaki, S. Mine, H. Matsumura

” Functional role of the C-terminal amphipathic helix 8 of olfactory receptors and other G protein-coupled receptors”, Int. J. Mol. Sci., 17(11), 1930 (2016). DOI: 10.3390/ijms17111930

5.Y. Tominaga, M. Maruyama, M. Yoshimura, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Tsukamoto, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H. Y. Yoshikawa, Y. Mori

” Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation”, Nature Photonics, 10, 723-726 (2016) DOI:10.1038/nphoton.2016.202

6.M. Maruyama, Y. Hayashi, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, S. Murakami, M. Yoshimura, Y. Mori

” A crystallization technique for obtaining large protein crystals with increased mechanical stability using agarose gel combined with a stirring technique”, J. Crystal Growth, 452 172-178 (2016) DOI:

10.1016/j.jcrysgro.2015.11.008

7.S. Sugiyama, S. Ishikawa, H. Tomitori, M. Niiyama, M. Hirose, Y. Miyazaki, K. Higashi, M. Murata, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, K. Kashiwagi, K. Igarashi, H. Matsumura

” Molecular mechanism underlying promiscuous polyamine recognition by spermidine acetyltransferase”, Int. J. Biochem. Cell Biol., 76, 87-97, (2016) DOI: 10.1016/j.biocel.2016.05.003

8.Nakamura, T., Yonezawa, Y., Tsuchiya, Y., Niiyama, M., Ida, K., Oshima, M., Morita, J., Uegaki, K.

“Substrate recognition of N,N'-diacetylchitobiose deacetylase from *Pyrococcus horikoshii*” J. Struct. Biol. 195, 286-293 (2016). DOI: 10.1016/j.jsb.2016.07.015

9.Nakamura, T., Niiyama, M., Hashimoto, W., Ida, K., Abe, M., Morita, J., and Uegaki, K.

“Multiple crystal forms of N,N'-diacetylchitobiose deacetylase from *Pyrococcus horikoshii*” Acta Crystallogr. F 71, 657-662 (2015). DOI: 10.1107/S2053230X15005695

10.Fukuda Y, Man, T. K., Kado Y, Mizohata E, Matsumura H, Inoue T.

“Insights into unknown foreign ligand in copper nitrite reductase” Biochem. Biophys. Res. Commun., 464(2), 622-628 (2015). DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.025.

11. Fukuda Y, Man T K, Susuki 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

“Redox-coupled structural changes in nitrite reductase revealed by serial femtosecond and microfocus crystallography” J. Biochem., 159(5), 527-538 (2016) DOI: 10.1093/jb/mvv133.

12. Kado Y, Mizohata E, Nagatoishi S, Iijima M, Shinoda K, Miyafusa T, Nakayama T, Yoshizumi T, Sugiyama A, Kawamura T, Lee Y H, Matsumura H, Doi H, Fujitani H, Kodama T, Shibasaki Y, Tsumoto K and Inoue T

“Epipegulin recognition mechanisms by anti-epipegulin antibody 9E5: Structural, functional and molecular dynamics simulation analyses”

J. Biol. Chem., 291: 2319-2330 (2016). DOI: 10.1074/jbc.M115.656009.

13. Fukuda Y, Tse K M, 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 M E P, Inoue T, Iwata S, Mizohata E.

“Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography”

PNAS., 113(11), 2928–2933 (2016) . DOI: 10.1073/pnas.1517770113

14. Kawato T, Mizohata E, Shimizu Y, Meshizuka T, Yamamoto T, Takasu N, Matsuoka M, Matsumura H, Kodama T, Kanai M, Doi H, Inoue T, Sugiyama S.

“Structure-based design and synthesis of a bivalent iminobiotin analogue showing strong affinity toward a low immunogenic streptavidin mutant”

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79(4), 640-642 (2015). DOI: org/10.1080/09168451.2014.991692

15. Mine, S., Niiyama, M., Hashimoto, W., Ikegami, T., Koma, D., Ohmoto, T., Fukuda, Y., Inoue, T., Abe, Y., Ueda, T., Morita, J., Uegaki, K., and Nakamura, T.

“Expression from engineered *Escherichia coli* chromosome and crystallographic study of archaeal N,N'-diacetylchitobiose deacetylase”

FEBS J. 281, 2584-2596 (2014). DOI: 10.1111/febs.12805

16. Mine, S., Nakamura, T., Sato, T., Ikegami, T., and Uegaki, K.

“Solution structure of the chitin-binding domain 1 (ChBD1) of a hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*”

J. Biochem. 155, 115-122 (2014). DOI: 10.1093/jb/mvt104

17. Nakamura, T., Mori, A., Niiyama, M., Matsumura, H., Tokuyama, C., Morita, J., Uegaki, K., and Inoue, T.

“Structure of peroxiredoxin from the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*”

Acta Crystallogr F 69, 719-722 (2013), DOI: 10.1107/S1744309113014036

〔学会発表〕(計 6件)

1. SACLA が解明した銅含有亜硝酸還元酵素の常温無損傷構造 (ワークショップ)

Damage-free, room-temperature structures of copper-containing nitrite reductase revealed by SACLA

○溝端 栄一 (Eiichi Mizohata)

第16回日本蛋白質科学会年会

福岡国際会議場 (福岡)、2016年6月7日～9日

2. エピレギュリン-抗体複合体構造解析に基づく分子認識機構の解明 (ポスター)

Investigation of molecular recognition mechanism based on the structure of epipegulin complexed with antibody

○門 祐示 (Yuji Kado)、溝端 栄一 (Eiichi Mizohata)、長門石 暁 (Satoru Nagatoishi)、飯嶋 真理子 (Mariko Iijima)、篠田 恵子 (Keiko Shinoda)、宮房 孝光 (Takamitsu Miyafusa)、

中山 泰亮 (Taisuke Nakayama)、吉住 拓真 (Takuma Yoshizumi)、杉山 暁 (Akira Sugiyama)、

川村 猛 (Takeshi Kawamura)、Lee Youn-Hun、松村 浩由 (Hiroyoshi Matsumura)、土居 洋文 (Hirofumi Doi)、児玉 龍彦 (Tatsuhiko Kodama)、柴崎 芳一 (Yoshikazu Shibasaki)、津本 浩平 (Kouhei Tsumoto)、井上 豪 (Tsuyoshi Inoue)

第16回日本蛋白質科学会年会

福岡国際会議場 (福岡)、2016年6月7日～9日

3. 親和性向上を目的とした抗ROB01 scFv の変異体解析 (ポスター)

○由井 杏奈、工藤 翔太、秋葉 宏樹、中木 戸 誠、長門石 暁、井上 豪、浜窪 隆雄、津本 浩平

第16回日本蛋白質科学会年会

福岡国際会議場 (福岡)、2016年6月7日～9日

4. 中性子用大型良質タンパク質結晶育成を目指して

(「X線と中性子が拓くこれからのタンパク質結晶学」シンポジウム・講演)

○安達宏昭、岡田詩乃、杉山成、丸山美帆子、高野和文、吉川洋史、村上聡、松村浩由、井上豪、森勇介

日本結晶学会平成28年度年会

茨城県立県民文化センター、2016年11月17日～18日

5. Structural Bioinorganic Chemistry of Copper Enzymes (招待講演)

○Yohta Fukuda, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue

新学術領域「感応性化学種が拓く新物質科学」第4回若手国際シンポジウム

(The 4th International Symposium for Young Chemists on Stimuli-Responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules)

大阪大学吹田キャンパス 工学研究科 C3 棟 5 階 サントリーメモリアルホール、大阪、
2016年12月12日～13日

6. The molecular design of a mutant streptavidin with high specificity for only an artificial biotin derivative (招待講演)

○**Tsuyoshi Inoue**, Tatsuya Kawato, Eiichi Mizohata, Yohei Shimizu, Tomohiro Meshizuka, Tomohiro Yamamoto, Noriaki Takasu, Masahiro Matsuoka, Tatsuhiko Kodama, Motomu Kanai, Hirofumi Doi, Akira Sugiyama

11th Pure and Applied Chemistry International Conference 2017 (PACCON 2017)

CENTRA GOVERNMENT COMPLEX HOTEL & CONVENTION CENTRE CHAENG WATTHANA, Bangkok, Thailand,
2017年2月2日～3日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：N, N'-ジアセチルキトビオースデアセチラーゼ阻害剤及び新規化合物

発明者：中村努、上垣浩一

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2015-015146

出願年月日：2015年1月29日

国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 豪 (Tsuyoshi Inoue)

大阪大学大学院工学研究科・教授

研究者番号：20263201

(2) 研究分担者

中村 努 (Tsutomu Nakamura)

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：10357668

研究分担者

松村 浩由 (Hiroyoshi Matsumura)

立命館大学生命科学部・教授

研究者番号：30324809