

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18493

研究課題名(和文) X線自由電子レーザーを用いた、常温での高分解能無損傷X線結晶構造解析方法の開発

研究課題名(英文) The development of the method for determining damage-free crystal structure at room temperature using X-ray free electron laser

研究代表者

島田 敦広 (SHIMADA, Atsuhiro)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：80723874

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)：チトクロム酸化酵素(Cc0)は呼吸で取り込まれた酸素からエネルギーを生み出すタンパク質であり、生体エネルギー生産の中心である。本酵素の機能解明は学術的に重要なだけでなく、低酸素症治療など臨床への応用も期待されている。本研究では、従来のX線の10億倍の強度と約1000分の1のパルス幅を持つX線自由電子レーザー(XFEL)を用いて、チトクロム酸化酵素の無損傷結晶構造を決定することに成功した。さらに、XFELの極短パルスという特徴を活かし、光照射によって励起したCc0の反応開始後1億から100万分の1秒後の中間体構造をXFELによって精密に決定した。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome c oxidase (Cc0), which generates bioenergy by catalyzing O₂ for maintain biological activity, is one of the most important protein in bioenergetics field. Understanding the reaction mechanism of Cc0 is not academically significant subject but also expected to be useful for caring hypoxic diseases. In this study, I succeeded in determining the damage-free Cc0 crystal structure using X-ray free electron laser which has billion times higher pulse-intensity and one thousandth shorter pulse-width than present X-ray. Furthermore, intermediate structures of Cc0 photoactivated by laser irradiation were determined by utilizing the extremely short pulse-width of XFEL.

研究分野：構造生物学、生化学、生物物理学

キーワード：プロトンポンプ 時分割構造解析 無損傷構造解析 X線自由電子レーザー 膜タンパク質 金属タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質の X 線結晶構造解析によって、生体内の様々な反応に関わる多くの重要なタンパク質の 3 次元構造が決定され、病気の原因やその治療薬の開発に多大な貢献をもたらしてきた。タンパク質の結晶は、約 50%以上が水であることが知られているが、X 線は水に照射されると反応性の高い活性酸素種を発生させる。この活性酸素種によって、X 線回折データの収集中にタンパク質分子中のアミノ酸や配位子は分子間相互作用の破壊などの損傷を受けている (Garman E. F., 2010, *Acta Cryst. D*)。X 線照射時は、液体窒素や液体ヘリウムによって結晶を凍結し、活性酸素種の拡散を抑制することでタンパク質結晶への損傷を軽減する措置がとられるが、完全に損傷を免れることは不可能であり、また凍結操作自体によって結晶が損傷を受けることも多い (Garman E. F., and Schneider T. R., 1997, *J. Appl. Cryst.*)。したがって、凍結操作を必要とせず、X 線照射による損傷も無いタンパク質の X 線結晶構造解析法の開発が求められてきた。

(2) X 線自由電子レーザー (XFEL) は、従来の X 線の約 1000 分の 1 秒 (フェムト秒スケール) のパルスを持ち、X 線照射によってタンパク質へ損傷が生じる前に X 線回折データを得ることが可能である (図 1) (Neutze R., *et al.*, 2000, *Nature*)。さらに、これまで解析が不可能であった、非常に寿命の短い遷移状態などの中間体の構造解析へも利用が期待されている。しかし、結晶中のタンパク質の構造を決定するためには、各指数由来の回折強度を正確に計算し、構造因子を求める必要がある。従来の X 線結晶構造解析では、タンパク質結晶を回転させながら X 線を照射することで、各指数の回折強度を精度良く計算することができた。しかし、XFEL を用いた X 線結晶構造解析では、きわめて短いパルス光のために、結晶を回転させながら回折データを収集することができない (図 1)。そのため、各指数の回折強度を正確に見積もるためには、従来の解析方法とは異なる、XFEL 用の新たなデータ解析方法の開発が必要とされている。

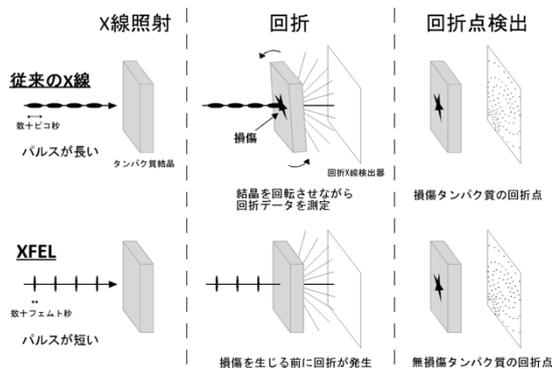


図 1. 従来の X 線と XFEL との違い

2. 研究の目的

本研究では、XFEL をチトクロム酸化酵素 (Cc0) のタンパク質結晶へ照射し、得られた回折データの新規解析方法の開発と、Cc0 の無損傷 3 次元構造の解明を同時に行うことを目的とした。具体的には、研究期間内に以下のことを明らかにすることとした。

(1) Cc0 の結晶に対して XFEL を照射し、得られた回折データから各指数の回折強度を計算する新たなプログラムを作成する。従来の X 線結晶構造解析法によって解かれた Cc0 の構造をリファレンスとして、リファレンスデータと大きく異なる回折強度の見積もられている指数 (質の悪いデータ) について、強度が誤って見積もられる原因を解明する。同時に、質の悪いデータを判断するための指標を決定し、リファレンスデータとの比較がなくても良質な回折データを判断し、構造因子の計算、3 次元立体構造モデルの構築を行えるプログラムを開発する。従来の X 線結晶構造解析法で解かれた構造との統計値の比較を行い、XFEL の回折データから解かれた構造の正確性を判断する。

(2) Cc0 は、ミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖複合体タンパク質の 1 つであり、酸素を水に還元する反応と共役して、ミトコンドリア膜間腔へプロトンを送り出す。X 線は水や酸素と反応してラジカルを発生させるため、Cc0 の酸素還元中心は特に X 線による損傷を受けやすい。これまで決定されてきた Cc0 の 3 次元立体構造と、XFEL による X 線結晶構造解析結果とを比較することで、酸素還元中心の酸素分子の結合状態を正確に把握する。さらに、様々な酸化還元状態の Cc0 の X 線結晶構造解析を行い、各々の酸化還元遷移状態の構造を解明する。

3. 研究の方法

(1) Cc0 の大型結晶へ XFEL を照射して解析に十分な量の回折イメージを収集したのち、指数ごとにデータの質を判断し、質の悪いデータに共通した要素を特定し、電子密度計算に利用するデータを決定するための指標を検証する。

(2) Cc0 の無損傷立体構造モデルを構築し、既知の Cc0 の酸素還元中心の構造と比較を行うことによって、得られた無損傷構造の評価を行う。さらに、XFEL の特徴である極短パルス幅を利用して、Cc0 の短寿命中間体構造を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Cc0 の無損傷データ収集
XFEL を利用して、Cc0 の大型凍結結晶 2,608 個から無損傷データの収集を行った。各 XFEL の照射位置を 50 μ m ずつ離すことで、一つ前の XFEL 照射による結晶へのダメージの影響を受けていないデータの収集に成功した。得られ

たデータ解析方法の開発に関して、回折データを MOSFLM プログラムによって処理し、各指数について回折強度をガウス曲線でフィッティングして各指数の強度をその積分値から直接求めた。各指数強度を、SPring-8 で収集したリファレンスの Cc0 データの対応する各指数強度と比較し、精度の高いデータを複数の判断基準から取捨選択する方法を試みたが、想定していたほどの高い精度でのデータ処理を達成することができなかった。しかし、Uervirojnangkoorn らの開発したプログラム Prime (eLife 2015;4:e05421) を改良することで、高精度での XFEL データの処理が可能でプログラムの開発に成功した。

XFEL を用いた構造決定はソフト面、ハード面両方において開発の進められている分野であり、本研究成果によって確立された回折データ解析方法は今後の XFEL 結晶構造解析において広く応用できる。また、構造決定の難しい巨大膜タンパク質で、かつ X 線照射による損傷を受けやすい金属タンパク質でもある Cc0 に対して XFEL 結晶構造決定法を確立できたことは、他の多くのタンパク質に対しても XFEL の利用を推進する端緒となることが期待できる。

(2) 高分解能 Cc0 の構造決定

結晶の氷晶防止剤処理方法を改良し、さらに、SPring-8 での X 線照射方法も改良したことで、これまでで最高分解能の休止酸化型及び還元型 Cc0 構造を決定することに成功した (1.5/1.6 Å) (図 2)。二状態の Cc0 構造を比較することで、プロトン輸送機構の重要な構造的基盤である Cc0 内部のプロトン貯蔵部位が決定された (雑誌論文⑤)。高分解能の正確な構造は、XFEL によって収集したデータから構造決定を行う際の初期モデルとしても非常に有用であり、あまり分解能の高くないデータであっても詳細な構造的議論を行うことを可能とする。

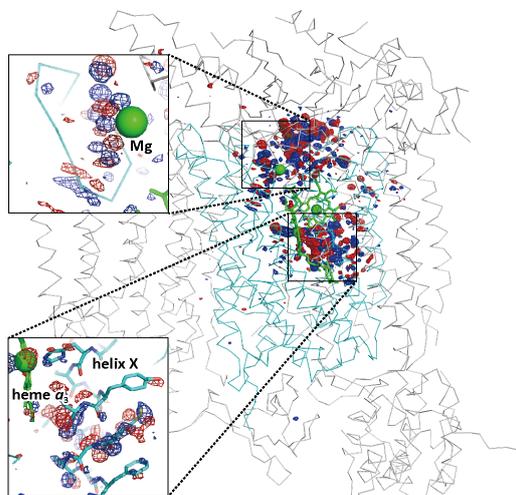


図 2. 休止酸化型と還元型 Cc0 の構造比較
赤と青のメッシュ部分が、休止酸化型と還元型で大きく構造の異なる箇所

(3) Cc0-チトクロム c 複合体構造の決定
Cc0 結晶化時の界面活性剤を従来使用していた化合物から変更することで、これまで不可能であった中性付近での Cc0 結晶化に成功した (雑誌論文①、②)。さらにこの条件下で電子供与体であるチトクロム c との共結晶化にも成功し、Cc0-チトクロム c 複合体の構造を決定した。これによって、チトクロム c から Cc0 の酸素還元中心への電子伝達経路が決定され、Cc0 の機能解明が大きく進展した。また、従来のタンパク質複合体とは異なり、チトクロム c と Cc0 の複合体面には水分子が非常に多く確認されてタンパク質間距離が少し遠いことから、チトクロム c と Cc0 の相互作用様式は非常に弱いことが予想された。すなわち、チトクロム c が Cc0 へ電子を受け渡したら、迅速に Cc0 から解離することを可能にしていると考えられる (雑誌論文④)。このような相互作用様式は珍しく、今後他のタンパク質間相互作用を理解する上でも貴重な知見となる。

(4) 常温での高分解能データ収集法の確立
XFEL の極短パルスを利用してタンパク質の短寿命中間体構造を捉えるということは、結晶中で反応を誘起させてその過程を捉えるということである。従って、結晶を極低温下で凍結させず、非凍結環境下での測定を行う必要がある。非凍結環境下では結晶が乾燥することによる物理的な損傷によって回折能が低下する。そこで、結晶をポリビニルアルコールでコーティングした上で、温度と湿度を調整した気流を吹き付けることで安定に X 線照射位置に維持する方法を採用した。様々なポリビニルアルコール溶液濃度と湿度、温度との相性を検証した結果、Cc0 結晶を 4°C の非凍結環境下で 1 時間以上回折能を低下させることなく維持することに成功した。XFEL を用いた中間体構造解析では常温下での測定が必須であることから、本法での成功例は広く利用されることが期待される。

(5) Cc0 の反応中間体構造の決定

XFEL を用いて短寿命中間体の構造を明らかにするためには、結晶中での反応を均一に (同時に) 誘起する方法が必要である。そこで、光照射をトリガーとした反応誘起法を採用した。一酸化炭素 (CO) の結合した Cc0 へ光を照射することで CO が Cc0 から解離していく過程を XFEL によって追跡し、CO の移動に伴う Cc0 の構造変化をとらえた。CO の光解離 20 ナノ秒後と 100 マイクロ秒後の構造を決定した結果、以下のようなプロトン逆流防止機構を明らかにした (図 3)。まず、CO が Cc0 の酸素還元中心へ結合することで、酸素還元中心を形成する heme a₃ がわずかに平行移動する。この平行移動によって近傍のアミノ酸残基が大きくプロトン輸送経路へせり出すことで輸送経路を閉じ、プロトンの逆流を防いでいる (雑誌論文③)。Cc0 によるプロトン輸送機構の解明は生体エネルギー分野における最重要課題

であり続けており、XFEL を利用することで明らかにできた今回のプロトン逆流防止機構の解明は非常にインパクトの大きい成果である。

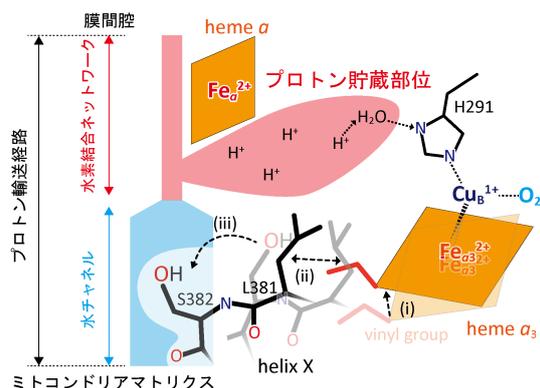


図 3. CcO のプロトン輸送経路閉鎖機構

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Luo Fangjia, 伊藤-新澤恭子, 萩本楓, 島田敦広, 島田悟, 山下栄樹, 吉川信也, 月原富武, Structure of bovine cytochrome c oxidase in the ligand-free reduced state at neutral pH, *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 査読あり, 2018 年, vol. 74, pp. 92-98, doi: 10.1107/S2053230X17018532
- ② Luo Fangjia, 伊藤-新澤恭子, 萩本楓, 島田敦広, 島田悟, 山下栄樹, 吉川信也, 月原富武, Structure of bovine cytochrome c oxidase crystallized at neutral pH using a fluorinated detergent, *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 査読あり, 2017 年, vol. 73, pp. 416-422, doi: 10.1107/S2053230X17008834
- ③ 島田敦広, 久保稔, 馬場清喜, 吾郷日出夫, 吉川信也, 月原富武 (23 名省略, 1 番目), A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase, *Science Advances*, 査読あり, 2017 年, vol. 3, doi: 10.1126/sciadv.1603042
- ④ 島田悟, 伊藤-新澤恭子, 馬場淳平, 吉川信也, 月原富武 (5 名省略, 5 番目), Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode, *EMBO Journal*, 査読あり, 2016 年, vol. 36, pp. 291-300, doi: 10.15252/embj.201695021
- ⑤ 矢野直峰, 村本和優, 島田敦広, 月原富武, 吉川信也 (6 名省略, 3 番), The Mg²⁺-containing water cluster of mammalian cytochrome c oxidase collects four pumping proton equivalents in each catalytic cycle, *The Journal of*

Biological Chemistry, 査読あり, 2016 年, vol. 291, pp. 23882-23894, doi: 10.1074/jbc.M115.711770

[学会発表] (計 28 件)

- ① 島田敦広, 『X線自由電子レーザーを用いたチトクロム酸化酵素の時分割構造解析によって明らかとなった、リガンド結合に伴うプロトンポンプ経路の閉鎖機構』, 第17回日本蛋白質科学会, 2017年
- ② 島田敦広, 『A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase』, 第55回日本生物物理学会, 2017年
- ③ 島田敦広, 『X線自由電子レーザーを用いたチトクロム酸化酵素の時分割構造解析から明らかとなった、銅イオンへの配位子結合によって制御されるプロトンポンプ経路の閉鎖メカニズム』, 第89回日本生化学会, 2016年
- ④ 島田敦広, 『The damage-free crystal structure of cytochrome c oxidase at the resting oxidized state determined using X-ray free electron laser』, EMBO conference, 2016年
- ⑤ 島田敦広, 『Mg²⁺-containing water cluster, collecting four pumping proton equivalents in each catalytic cycle, enable the effective proton-pumping in bovine cytochrome c oxidase』, The 42th NAITO CONFERENCE, 2016年
- ⑥ 島田敦広, 『High resolution crystal structure of cytochrome c oxidase reveals the mechanism of high efficient proton pumping』, 第54回生物物理学会, 2016年
- ⑦ 島田敦広, 『チトクロム酸化酵素の様々な反応中間体及び反応中間体類似物の構造から提唱されるプロトンポンプ機構』, 第16回日本蛋白質科学会, 2016年
- ⑧ 島田敦広, 『チトクロム酸化酵素の高分解能 X線結晶構造解析から明らかとなった、酸素還元反応と共役したプロトン輸送機序』, 第53回日本生物物理学会, 2015年
- ⑨ 島田敦広, 『チトクロム酸化酵素内の Mg を含む水クラスターが酸素取り込み前に4等量のプロトンを蓄積することで、高効率プロトンポンプ反応を可能にする』, 第15回日本蛋白質科学会, 2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 敦広 (SHIMADA Atsuhiro)
 岐阜大学・応用生物科学部・助教
 研究者番号: 80723874