

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B)（特設分野研究）

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0063

研究課題名（和文）中性子ビームを利用した酵素反応中間体の結晶構造解析

研究課題名（英文）Crystal structure analysis for intermediate in enzymatic reaction by using neutron beam

研究代表者

安達 基泰（Adachi, Motoyasu）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・グループリーダー（定常）

研究者番号：60293958

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、中性子ビームを用いた酵素の立体構造解析を通じて、反応中間体等の水素原子や水分子の配向を含む構造を明らかにすることで、酵素の遷移状態の制御をめざした。アミノ酸ラセマーゼの一つであるヒスチジンラセマーゼに関して、世界で初めてX線結晶構造解析に成功した。さらに、結晶化の条件を検討し、最適化を続けることで、1.0 という高い分解能のX線結晶構造解析に成功するとともに、体積約1立方ミリメートル以上の大型の結晶の作製に成功し、中間体の中性子回折データの収集に至った。CK2に関しては、世界で初めて中性子構造解析に成功し、分子を縦断する水素結合のネットワークと、その機能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反応中間体等の解析は、酵素本来の緻密な反応触媒機構を解明することにつながり、例えばCK2の成果は、間接的に活性を調整するようなアロステリック型の阻害剤の開発に貢献する。またラセマーゼに関しては、得られた知見に基づいて、遷移状態あるいは中間状態を制御した酵素の合理的な改変を行うことで、従来と異なる反応生成物を選択的に得ることができると考えられる。新機能酵素による新たな有機分子合成は、独自の化合物スクリーニングライブラリーの拡充や、複雑な官能基を有する医薬品原料素材の供給を可能にし、国内産業の強みである原料素材産業における国際競争力の強化にも貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to realize neutron structural analysis including orientation of hydrogen atoms and water molecules in reaction intermediates for controlling transition states through three-dimensional structural analysis of enzyme. For the histidine racemase, which is one of the amino acid racemases, we succeeded in X-ray crystallography for the first time in the world. Furthermore, by examining crystallization conditions and continuing optimization, we succeeded in X-ray crystal structure analysis to a high resolution of 1.0 angstrom, and in producing large crystals with a volume of above 1 mm cubed. For CK2, we succeeded in neutron structure analysis for the first time in the world, and showed a hydrogen bond network that traverses the molecule and its functionality.

研究分野：タンパク質科学、量子生物学

キーワード：酵素 結晶構造解析 中性子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

構造生物学の発展によって、非常に多くの立体構造解析が実現され、その結果、さまざまな3次元の分子の明確な姿が明らかになっている。それらの情報の活用の可能性は多岐にわたるが、分子の機能をつかさどるメカニズムの解明へとすすむには、さらに踏み込んだ構造解析(変異体や基質、あるいは中間体を含む立体構造解析)が、必須である。本研究では、近年整備が進んでいる中性子ビームを用いた酵素の立体構造解析として、遷移状態の制御を目標に、反応中間体等の水素原子や水分子の配向を含む中性子構造解析を実現することをめざした。それらの不安定ともいえる反応中間体等の解析を行えば、酵素本来の緻密な反応触媒機構の解明につながることを期待できる。また得られた知見に基づいた酵素の合理的な改変により、一定の基質に対して様々な分子を反応させ、従来と異なる反応生成物を選択的に得ることができると考えられる。新機能酵素による新たな有機分子合成は、独自の化合物スクリーニングライブラリーの拡充や、複雑な官能基を有する医薬品原料素材の供給を可能にし、国内産業の強みである原料素材産業における国際競争力の強化にも貢献するものと考えられる。

2. 研究の目的

酵素(タンパク質)は、高度に進化した分子認識能とダイナミクスによって、複雑な骨格や多様な官能基を有する生理活性物質を効果的に合成する分子である。酵素の触媒機構の解明は、生命科学研究の発展と深く関わるだけでなく、複雑な化学構造をもった有用化合物を効率よく合成する産業技術の開発にも繋がる。本提案では、学術・産業の両面から有用な生合成経路を担うモデル酵素を研究対象として選択し、その反応中間体や遷移状態アナログ複合体の中性子結晶構造解析を実施することで、酵素の複雑で巧妙な反応触媒機構を解明することとした。そして、得られた知見を有用化合物の創製に応用することを目的に本研究をすすめた。

3. 研究の方法

近年、整備が進んで、汎用化がすすんだ中性子回折計の利用を想定し、データの収集に必要な大型結晶の作製や解析結果の分析など、中性子利用基盤技術の高度化・標準化を行うとともに、反応機構解明が対象となる複数の酵素の発現系構築およびX線・中性子回折法による立体構造解析を行った。さらに、酵素反応の中間体の捕捉を目指して変異導入を実施した。捕捉した反応中間体のX線結晶構造解析を実施するとともに、結晶の大型化を進めることにより中性子構造解析を実施した。構造解析によって得られる知見と、生物化学的な解析によって得られる知見とを組み合わせ、有用な酵素の触媒機構を解明する。

4. 研究成果

酵素には非常に多くの種類がある中で、本研究グループのこれまでの独自の研究も考慮して、3種の酵素群を研究対象として実施した。本報告では、その中でもっとも成果が上がった(1)アミノ酸ラセマーゼと(2)Ser/Thr キナーゼの成果について以下に概説する。

(1)アミノ酸ラセマーゼは、タンパク質を構成するアミノ酸を基質として、その光学異性を変換する酵素である。例えば、通常のタンパク質は、L-アミノ酸によって構成されているが、アミノ酸の中心に位置する炭素原子(C α 原子)に結合する水素原子を、立体位置の違う場所で付け替えることができる性質をもつ。その特異な性質から、アミノ酸ラセマーゼを使えば、L-アミノ酸をD-アミノ酸に変換し、アミノ酸の光学異性を自然生物界ではあまり利用されていない形に変換することができる。D-アミノ酸は、ペプチドグリカンと言われるような一部の細胞の構成要素の一つとなっているが、通常のL-アミノ酸と異なった性質や立体構造を有することから、食品や創薬等の分野で利用価値が高いものとなっている。

本研究では、食品の生産に存在する微生物由来のヒスチジンラセマーゼを研究対象として取り組んだ。ヒスチジンラセマーゼは、アミノ酸の一つであるヒスチジンの光学異性を変換する酵素であり、本研究の分担者によって、世界で最初に単離された酵素である。多くのラセマーゼは、アラニンを基質としている酵素であるが、ヒスチジンを変換するという特異性が非常にユニークなものである。この研究では、そのヒスチジンラセマーゼに関して、世界で初めてX線結晶構造解析に成功し、論文発表を行った。さらに、結晶化の条件を検討し、最適化を続けることで、1.0Åという高い分解能のX線結晶構造解析に成功するとともに、体積約1立方ミリメートル以上の大型の結晶の作製に成功し、中性子回折データの収集に至った。酵素の反応中間体の補足に関しても、基質であるヒスチジンを結晶の中に浸漬することによって、基質であるヒスチジンが補酵素であるピリドキサルリン酸と共有結合した中間体の構造の解析に成功した。その後、得られた解析データを使って構造を精密化し論文発表の準備をすすめている。ここでは、世界で初めてX線結晶構造解析に成功したヒスチジンラセマーゼの構造を図1に示す。

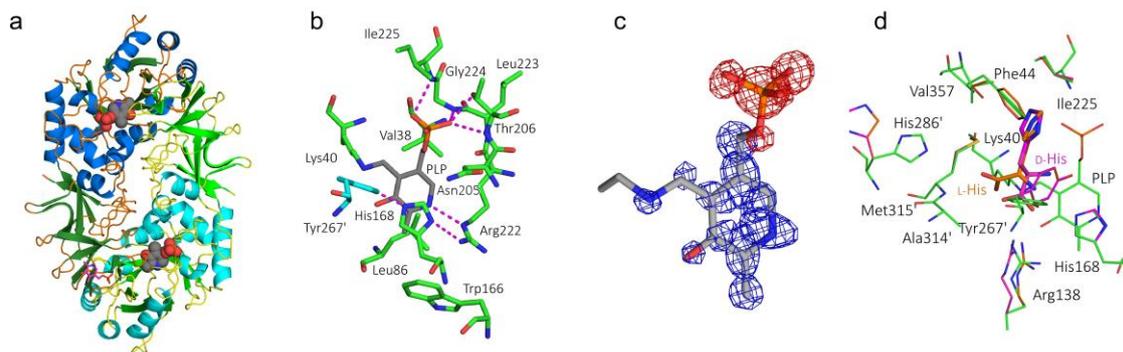


図1 (a) ヒスチジンラセマーゼの全体構造。2量体の構造を形成する。球モデルは、補酵素であるピリドキサルリン酸を表している。(b) 酵素の触媒反応を行う部位の拡大図。中心にピリドキサルリン酸(PLP)が位置しており、それと直接相互作用するアミノ酸を抽出して示している。(c) ピリドキサルリン酸の電子密度マップ(オミットマップ)。(d) 分子ドッキングシミュレーションにより推測した基質であるヒスチジンの結合。L体とD体の2つのアミノ酸の構造を重ねて示している。

図1(a)に示すように、ヒスチジンラセマーゼの全体構造は、他のピリドキサルリン酸を補酵素とするラセマーゼとよく似た全体構造を有していた。今回の解析で、重要な役割を担っているピリドキサルリン酸(補酵素)の構造も明確に示すことができた(図1(b, c))。通常は、活性型の酵素と基質とが結合した複合体の立体構造解析は、非常に難しい。なぜならば、化学反応が進行し、基質が分解されてしまうからである。一方で、中間体の補足を行うには、酵素と基質との複合体の構造が、中間体を安定化する変異導入を考える上で、参考になる。そこで、分子ドッキングシミュレーションにより基質であるヒスチジンの結合を推測した(図1(d))。その結果、ピリドキサルリン酸と Lys40 が形成するシッフ塩基構造の近くに、基質であるヒスチジンが結合するモデルが得られ、しかも、ヒスチジンから触媒反応で引き抜かれる水素原子が、シッフ塩基の活性部位に位置していたのである。逆に、このことはシミュレーションで得られたモデルの妥当性を示すものであり、立体構造が違うL体とD体の2つのアミノ酸がどのように結合するのか、あるいは、どのようにしてヒスチジンのみに特異的に働くのかということの説明する重要な情報が得られた。これらの知見は、本酵素を使って、有用化合物を創製する際に非常に有用なものである。

(2) Ser/Thr キナーゼは、創薬において重要な標的酵素である。アデノシン 3 リン酸を使ってタンパク質の、Ser あるいは Thr をリン酸化し、細胞内の情報をタンパク質の修飾という形にすることで、シグナル伝達作用を発揮している。キナーゼは、がん細胞で高発現が確認されており、その中では、本来の正常な機能が失われ、がん化を促進している。そのため、その異常な作用を阻害剤でコントロールできれば、抗がん剤の開発に繋がる。

本研究では、Ser/Thr キナーゼ Casein kinase 2 (CK2) を研究対象に取り組んだ。CK2 もまた、がん細胞で高発現が確認されている。中性子ビームを使って立体構造を解析することによって、タンパク質を構成する主要元素の一つである水素原子の構造情報が得られるが、創薬において、水素原子の位置を明らかにした例は少ないことから、抗ガン剤となりえる阻害剤を開発するモデル研究をすすめる上で、重要な取り組みとなる。本研究期間では、CK2 の構造解析において、阻害剤が結合した状態 2 種類と、阻害剤が結合していない状態で、あわせて 3 種類について、中性子回折データの収集に成功し、立体構造解析を実施した。そのうち、阻害剤がしていない状態に関して、論文発表を行った。キナーゼは、例えばヒトには 500 種類以上遺伝子が存在していることが知られており、上述のように創薬の観点から非常に重要な酵素であるが、ヒトに限らず生物のキナーゼとして、世界で初めての中性子構造解析として報告することができた。一方で、阻害剤が結合した状態 2 種類に関しては、構造解析を終了した後、量子化学計算によって、理論計算との比較を行い、これまでになく視点で、創薬に貢献できるような解析情報とまとめを行っている。以下では、論文発表を行った、阻害剤が結合していない状態の構造解析結果を報告する。図2に得られた結果を示す。

図2(a)にCK2の分子構造の全体図を示す。本研究で、分子を縦断する特徴的な水素結合のネットワークが示されたので、断面図により、分子内部を示している。今回明らかになった水素結合ネットワークは、中性子を使って水素(重水素)原子の解析を実施したことにより、明白になったものである。その水素結合ネットワークは、CK2の活性部位(Active site)を起点として、Asp156に始まり、7つの水分子と、途中、Asp214とHis148の2つのアミノ酸を介して構成されている。Asp156は、CK2が、転移反応を行う際に、基質となるペプチドに存在するSerある

いは Thr と水素結合を形成して相互作用を作り、Ser あるいは Thr に存在する水酸基を活性化することで、化学反応に必要な求核性を上げる働きがあると考えられている。つまり、ここで明らかにした水素結合ネットワークは、CK2 の触媒反応の進行に重要な役割を担っていることが示唆される。また、水素結合ネットワークには、His148 と Asp214 が仲介し、その2つのアミノ酸は比較的強い水素結合を形成していることが、明らかとなった(図 2(b))。それら2つのアミノ酸は、500 種類以上あるヒトのキナーゼの中で、非常に保存性が高いことから、この分子を縦断する水素結合ネットワークが、キナーゼの機能発揮に必要な要素であると考えられる。本研究では、His148 と Asp214 に着目し、アミノ酸の変異導入を実施した。結果として、Asp214 における変異体は、調製することができなかったが、His148 に関しては、アラニン、セリン、アスパラギンに置換した変異体にて、顕著な活性の低下が認められた。Asp214 における変異体に関して、試料が調製できなかった理由としては、立体構造の保持にも必要なアミノ酸であり、他のアミノ酸では代替できない構造であるからと推測している。さらに、いま一つ着目すべきことを、図 2(c)に示している。そこでは、水分子 DOD718 の重水素原子 D1 に着目する。図では、重水素原子を水色で示しているが、通常モデルの構成と、解析に合わせたモデルの構成と2つ重ねて示している。それら2つを比較すると、通常モデルでは、0.95Åの結合距離で赤色の酸素原子と共有結合しているが、今回の解析では、その場所よりも0.17Å離れた場所に重水素原子の中心が観測された。つまり、水の構造が引き延ばされたような異常な状態が観測されたのである。このことは、His148 と Asp214 のペアや、分子を縦断する水素結合ネットワークによって、タンパク質の内部に特殊な環境がつけられていることを示唆している。CK2 の触媒反応という観点からは、水素原子の非局在化によって、機能性を向上しているとも考えられる。中間体捕捉という観点からは、活性部位その部位の改変より、間接的な調整が可能と考えられ、非常に意味のある知見となる。創薬に関しても、間接的に活性を調整するようなアロステリック型の阻害剤の開発において、有用な知見となる。今回の発見は、これまでに報告例がないものであり、本研究で中性子を使った中間体捕捉というテーマを進める中で、予想以上の成果となった。今後は、同様の機能性が他のタンパク質にも発見され、タンパク質科学の分野を中心に、新たな視点が生まれるきっかけとなるだろうと期待する。

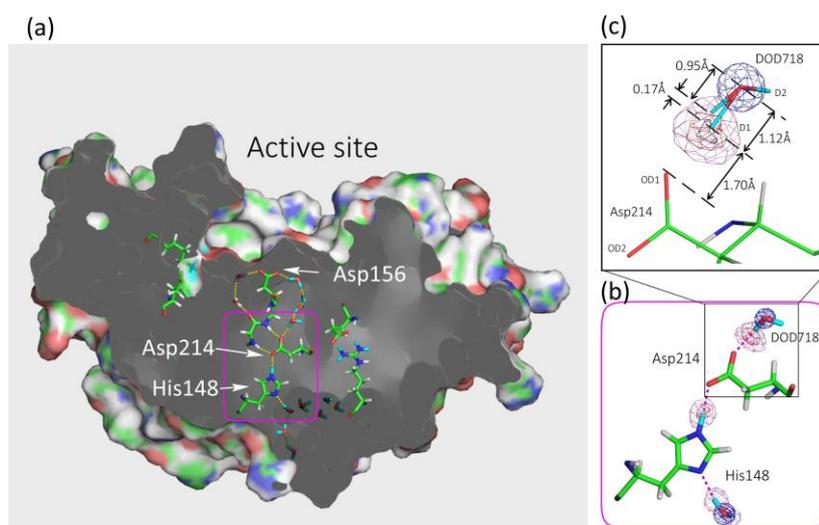


図 2 (a) CK2 の全体構造。灰色で分子の断面を示す。棒モデルは、本研究で着目したアミノ酸を示している。(b) His148 と Asp214 周辺の拡大図。ピンクと赤色のメッシュのマップは、重水素原子の存在を、青色のメッシュのマップは酸素原子の存在を示している。(c) (b) の Asp214 と DOD718(重水)周辺の拡大図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chie Shibazaki, Rumi Shimizu, Yuji Kagotani, Andreas Ostermann, Tobias E. Schrader, Motoyasu Adachi	4. 巻 11
2. 論文標題 Direct Observation of the Protonation States in the Mutant Green Fluorescent Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 492-496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcclett.9b03252	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 該当する
1. 著者名 Chie Shibazaki, Shigeki Arai, Rumi Shimizu, Motoyasu Adachi	4. 巻 36
2. 論文標題 X-Ray diffraction experiments for drug target protein of human casein kinase II	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report 2018	6. 最初と最後の頁 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Shibazaki Chie, Arai Shigeki, Shimizu Rumi, Saeki Morihisa, Kinoshita Takayoshi, Ostermann Andreas, Schrader Tobias E., Kurosaki Yuzuru, Sunami Tomoko, Kuroki Ryota, Adachi Motoyasu	4. 巻 430
2. 論文標題 Hydration Structures of the Human Protein Kinase CK2 Clarified by Joint Neutron and X-ray Crystallography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 5094 ~ 5104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2018.09.018	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 該当する
1. 著者名 Adachi Motoyasu, Shimizu Rumi, Kato Shiro, Oikawa Tadao	4. 巻 51
2. 論文標題 The first identification and characterization of a histidine-specific amino acid racemase, histidine racemase from a lactic acid bacterium, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>sake</i> NBRC 102480	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 331 ~ 343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00726-018-2671-y	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 阿久津 和宏 , 安達 基泰 , 川北 至信	4. 巻 J-PARC 17-06
2. 論文標題 Deuterated Materials Enhancing Neutron Science for Structure Function Applications	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JAEA-Review	6. 最初と最後の頁 i-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Hiromoto Takeshi, Meilleur Flora, Shimizu Rumi, Shibazaki Chie, Adachi Motoyasu, Tamada Taro, Kuroki Ryota	4. 巻 26
2. 論文標題 Neutron structure of the T26H mutant of T4 phage lysozyme provides insight into the catalytic activity of the mutant enzyme and how it differs from that of wild type	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1953 ~ 1963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3230	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 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Motoyasu Adachi
2. 発表標題 Neutron crystal structure analysis of human casein kinase II (CK2)
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry (ISHC) Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoyasu Adachi, Rumi Shimizu, Shiro Kato, Tadao Oikawa
2. 発表標題 A NOVEL PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE-DEPENDENT HISTIDINE RACEMASE FROM LEUCONOSTOC MESENTEROIDES SUBSP. SAKE NBRC 102480: DISCOVERY AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達 基泰
2. 発表標題 タンパク質の中性子結晶構造解析とその未来への展望：ヒト由来プロテインキナーゼCK2の解析から
3. 学会等名 バイオサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達 基泰
2. 発表標題 量子効果と量子ダイナミクス解析によるタンパク質研究の パラダイムシフト
3. 学会等名 次世代放射光超高分解能RIXS ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiduru Watanabe, Kaori Fukuzawa, Yoshio Okiyama, Motoyasu Adachi, Shigenori Tanaka, Teruki Honma
2. 発表標題 Conformation analysis of hydrogen atoms around ligand-binding pocket based on quantum chemical calculation
3. 学会等名 CBI学会2019年大会, 情報計算法学生物学会(CBI学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達 基泰
2. 発表標題 ヒト由来プロテインキナーゼCK2の中性子結晶構造解析
3. 学会等名 CBI学会2019年大会 (第20回FMO研究会 生命現象を量子構造生物学で解き明かす), 情報計算法学生物学会(CBI学会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達 基泰
2. 発表標題 中性子による最近の構造解析研究
3. 学会等名 重水素化薬剤研究会2020横浜 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motoyasu Adachi, Chie Shibazaki, Rumi Shimizu, Shigeki Arai, Andreas Ostermann, Tobias E. Schrader
2. 発表標題 First neutron structural analysis of human casein kinase II
3. 学会等名 The 31st European Crystallographic Meeting (ECM31) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chie Shibazaki, Rumi Shimizu, Shigeki Arai, Motoyasu Adachi
2. 発表標題 Long hydrogen bonding network responsible for catalytic activity of human casein kinase II
3. 学会等名 3rd International Symposium of Quantum Beam Science (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴崎千枝、清水瑠美、新井栄揮、安達基泰、黒木良太
2. 発表標題 ヒトカゼインキナーゼIIの触媒活性に係わる新たな水素結合ネットワークの発見
3. 学会等名 2017年度量子ビームサイエンスフェスタ (第9回MLFシンポジウム・第35回PFシンポジウム)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三上文三、安達基泰、姜有那、水谷公彦
2. 発表標題 非凍結結晶を用いた α -アミラーゼ(E380A)と基質との複合体のpH変化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達基泰
2. 発表標題 HIV-1 プロテアーゼの中性子構造解析
3. 学会等名 第8回東海地区中性子生命科学検討会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Motoyasu Adachi
2. 発表標題 Perdeuteration and protein neutron crystallography (for beginners)
3. 学会等名 J-PARC WORKSHOP Deuterated Materials Enhancing Neutron Science for Structure Function Applications
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Motoyasu Adachi, Ryota Kuroki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 WILEY	5. 総ページ数 17
3. 書名 Structural Biology in Drug Discovery: Methods, Techniques, and Practices	

〔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
研究分担者	森元 聡 (Morimoto Satoshi) (60191045)	九州大学・薬学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	老川 典夫 (Oikawa Tadao) (80233005)	関西大学・化学生命工学部・教授 (34416)	
研究分担者	木下 誉富 (Kinoshita Takayoshi) (90405340)	大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授 (24403)	