

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07325

研究課題名(和文) 高分解能構造解析によるシトクロムb5還元酵素反応系における電子伝達分子機構の解明

研究課題名(英文) High-resolution structural studies of electron transfer reaction mechanism in the redox cycle of NADH-cytochrome b5 reductase

研究代表者

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・量子生命科学領域・主幹研究員(定常)

研究者番号：80710772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の小胞体で脂質合成などに関与するNADH-cytochrome b5還元酵素(b5R)とシトクロムb5(b5)からなる酸化還元反応系を対象として高分解能の結晶構造解析を実施した。b5Rについては、酸化還元反応サイクルにおける複数の状態について高分解能の中性子構造解析およびX線構造解析に成功し、b5Rの酸化還元反応において重要な役割を果たす水素移動反応機構の理解に繋がる立体構造情報を取得することが可能となった。また、b5については良質な大型結晶取得に成功し、酸化還元反応で重要な役割を果たす水素を可視化できる高分解能中性子構造解析につながる成果が得られている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の高分解能構造解析例は限られているが、X線と中性子両方の特徴を生かした高精度構造解析は、酸化還元酵素の機能理解において重要な手法である。本研究によって、b5Rとb5を対象として酸化還元反応系全体に高精度構造解析の領域を拡張でき、これまで断片的な情報に基づき議論されてきた酸化還元反応機構に対し新しい知見を提供できると考えられる。また酸化還元反応機構の詳細理解が進むことで、b5R-b5系の関与する疾患への治療方法開発のみならず、b5R、b5を含む酸化還元酵素を利用したバイオ燃料電池の電極材料開発といった応用研究への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：High-resolution structural analyses were performed for NADH-cytochrome b5 reductase (b5R) and cytochrome b5 (b5) found in mammalian endoplasmic reticulum. The b5R and b5 redox system is involved in some metabolic processes including lipid synthesis. We have successfully determined high-resolution neutron and X-ray crystal structures for several redox states of b5R. The high-resolution structure analyses provide insights for understanding molecular mechanisms of the hydrogen movement that has important roles in the b5R redox cycle. Additionally, we could obtain high quality crystals of b5 with large volumes. Therefore, we will be able to perform high-resolution neutron structure analyses to visualize hydrogen atoms that have key roles in the b5 redox reaction.

研究分野：構造生物学

キーワード：中性子回折 X線回折 酸化還元 高分解能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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・呼吸などにおける生体エネルギー源の産出といった体内の重要な反応に関わるタンパク質である。その機能発現の鍵となる酸化還元状態変化においては、補因子やジスルフィド結合の結合・解離など比較的大きな構造変化を伴う場合がある一方、水素原子や電子の移動など微小な構造変化を伴う場合もある。これまでいくつかの酵素の酸化還元各状態について立体構造解析が実施されてきたが、水素原子を含めた全原子構造情報を用いて酸化還元状態調節機構が議論された例はほとんど無い。また、タンパク質周囲の水分子が調節に重要な役割を果たすという報告もされており[1]、水分子の水素原子を含めた高精度構造情報はその機能を理解する上で必要不可欠である。

申請者は、これまでブタ肝臓由来 NADH シトクロム b_5 還元酵素(b_5R)とシトクロム b_5 (b_5) の 2 つの酸化還元酵素を用い、高分解能 X 線構造解析を行ってきた[2, 3]。 b_5R は酸化型、二電子還元型、一電子還元型の酸化還元状態をとり、電子伝達パートナーである b_5 への電子伝達を行っている。これまで、酸化型 b_5R は 0.78 Å 分解能の超高分解能 X 線構造から、補因子 FAD とタンパク質の一部の水素原子の電子密度が観測されている[2]。また b_5R は FAD と NADH という補因子が結合する 2 つのドメイン構造を持つが、酸化型と二電子還元型では補因子である NAD の結合の有無により 2 つのドメイン間の相対配置に変化が観測された。一方、一電子還元型は安定に保持することが困難であったため、これまで立体構造情報は得られていない。しかしながら、活性部位近傍のアミノ酸残基である Thr を Val に変異した変異体において、一電子還元型を比較的安定に保持できるため[4]、結晶作製も可能な状況となっている。また申請者は、 b_5 の酸化型と還元型について水素原子の電子密度が観測可能な 1 Å 分解能を超える高分解能 X 線構造解析を行った[3]。その結果、酸化還元状態調節に関与すると考えられる補因子ヘム周辺の微小な構造変化を捉えることに成功した。

2. 研究の目的

b_5R と b_5 それぞれの立体構造情報は明らかとなってきたが、水分子の水素原子を含めた全原子構造情報や、電子伝達反応を議論する上で重要な b_5R - b_5 複合体の立体構造情報は得られていない。タンパク質の立体構造解析手法の大多数を占める X 線回折では、小型結晶から高分解能データ取得が可能であるが、X 線が電子と相互作用するため電子数の少ない水素原子の検出は困難である。一方中性子は水素原子のような軽原子についても比較的大きい散乱能を持つため、中性子回折において水素原子の検出は容易である。そこで本研究では、 b_5R と b_5 の酸化還元反応系全体について X 線と中性子それぞれの特徴を生かした高精度構造解析を行い、電子伝達反応の理解に重要な酸化還元調節機構と電子伝達経路の解明を目指す。

3. 研究の方法

b_5R - b_5 の酸化還元反応系の各状態について高分解能の X 線および中性子構造解析を行い、水分子の水素原子を含む全原子構造および b_5R - b_5 複合体構造を明らかにする。取得した高精度の構造情報を利用して酸化還元状態調節機構と電子伝達経路を解明する。 b_5R の二電子還元型、一電子還元型、再酸化型および b_5R - b_5 複合体については、良質な結晶を作製し、放射光施設 (PF および SPring-8) を利用し X 線回折実験を行う。中性子回折データ収集においては、回折強度を増大するため体積 1 mm³ 以上の大型結晶が必要であることが一般的である。そこで b_5R および b_5 の大型結晶を作製し、大強度陽子加速器施設 J-PARC の生命科学用ビームライン iBIX または

海外の実験施設（アメリカ SNS MANDI、ドイツ FRM-II BioDiff など）を利用し中性子回折実験を行う。

4. 研究成果

(1) 酸化型 b5R の中性子構造解析

酸化型 b5R について結晶化条件の最適化を実施し、体積 1 mm^3 を超える大型結晶の作製に成功した。中性子回折実験は、ドイツの研究用原子炉（FRM-II）に設置された生体高分子用回折装置（BioDiff）を利用して実施した。その結果、 1.45 \AA 分解能の高分解能回折データセットを取得することに成功した。中性子構造解析により、アミノ酸残基および補因子 FAD に結合する水素原子だけでなく、約 300 の水分子についても水素原子を含めた立体構造を決定することが可能となった。その結果、補因子 FAD 周囲の水分子の水素原子を含めた水素結合ネットワークの詳細が明らかとなった（図 1 左）。FAD からタンパク質表面につながる水素結合ネットワークが観測され（図 1 右）、酸化還元反応に伴うプロトン移動経路の理解につながる立体構造情報を取得することができた。

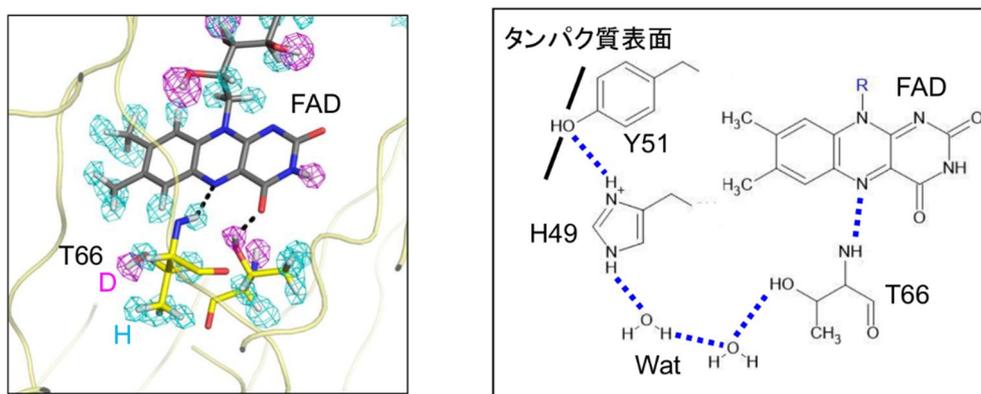


図 1 （左）FAD 周辺の水素（水色）および重水素（ピンク）の中性子散乱密度、（右）FAD からタンパク質表面に繋がる水素結合ネットワークの模式図

(2) 還元型 b5R の X 線構造解析

還元型 b5R については、再結晶化を行うことで純度向上を達成し、良質な結晶を取得する条件を決定した。野生型だけでなく還元型を安定化する変異体（T66V）の結晶も作製した。大型放射光施設 SPring-8 の BL44XU ビームラインにおいて X 線回折実験を行った結果、 1 \AA 分解能を超える高分解能の回折データセットを取得することが可能となった。高分解能の立体構造解析が可能となったことにより、タンパク質のアミノ酸残基の一部とタンパク質に結合する補因子（FAD と NAD）の一部について水素原子由来の電子密度を観測することができた。その結果、野生型は NAD^+ 結合状態、変異体は NADH 結合状態であることが明らかとなった。野生型と変異体の立体構造を比較したところ、全体構造に大きな変化は見られなかったが（図 2 左）FAD および NAD(H) 結合部位周辺において一部構造変化が観測された（図 2 右）。観測された構造変化から、ヒドリド (H^-) およびプロトン (H^+) 移動に重要と考えられるアミノ酸、補因子、水分子の立体構造情報が明らかとなった。

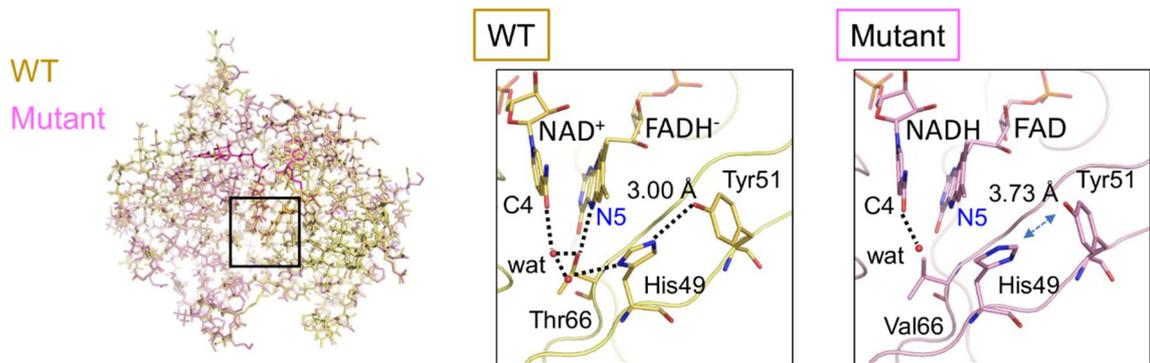


図2 (左) 野生型 (黄色) と T66V 変異体 (ピンク) の全体構造比較。(右) 野生型と変異体における補因子 NAD、FAD 結合部位周辺の比較。

(3) 酸化型 b5 の中性子回折実験

酸化型 b5 について結晶化条件の最適化を実施し、体積 1 mm³ 程度の大型結晶の作製に成功した (図 3 左)。中性子回折実験は、茨城県東海村の大強度陽子加速器施設 (J-PARC) に設置された生体高分子用回折装置 (iBIX) を利用して実施した。その結果、1.5 Å 分解能を超える高分解能の回折点を確認することに成功した (図 3 右)。

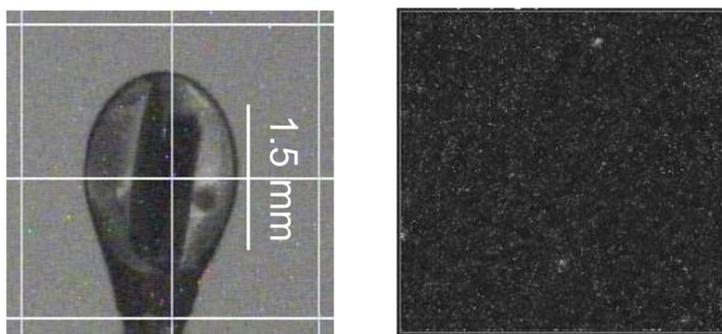


図3 (左) b5 大型結晶の写真。(右) 中性子回折像。

参考文献

- [1] A. Dey, F.E. Jenney Jr., M.W.W. Adams *et al.*, *Science*, 318, 1464-1468 (2007).
- [2] M. Yamada, T. Tamada, K. Takeda *et al.*, *J. Biol. Mol.*, 425, 4295-4306 (2013).
- [3] Y. Hirano, S. Kimura, T. Tamada, *Acta Crystallogr D*, 71, 1572-1581 (2015).
- [4] S. Kimura, M. Kawamura, T. Iyanagi, *J. Biol. Chem.*, 278, 3580-3589 (2003).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 玉田太郎、平野優 | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 量子構造生物学の創成と挑戦 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 月刊オプトロニクス | 6. 最初と最後の頁 92-97 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優 |
| 2. 発表標題 NADH-シトクロムb5還元酵素反応系の高分解能立体構造解析 |
| 3. 学会等名 2020年度第2回iBIX研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 平野優 |
| 2. 発表標題 超高分解能X線構造解析、結合電子密度が見えた |
| 3. 学会等名 第419回CBI学会研究講演（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、Andreas Ostermann、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 量子構造生物学の創成を目指した酸化還元タンパク質の高精度立体構造解析 |
| 3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、Andreas Ostermann、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 NADH-シトクロムb5還元酵素の結晶構造解析 |
| 3. 学会等名 日本結晶学会令和2年度年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優 |
| 2. 発表標題 高電位鉄硫黄タンパク質の高分解能X線構造解析 |
| 3. 学会等名 iBIX-JAXA-KEK物構研-QST合同タンパク質研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、Andreas Ostermann、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 高分解能立体構造解析で迫る酸化還元酵素の反応機構 |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yu Hirano, Kazuo Kurihara, Katsuhiro Kusaka, Andreas Ostermann, Shigenobu Kimura, Kunio Miki, Taro Tamada |
| 2. 発表標題 High-resolution structure analysis of NADH-cytochrome b5 reductase |
| 3. 学会等名 The 20th annual meeting of the Protein Science Society of Japan（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、Andreas Ostermann、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 酸化還元タンパク質の水素原子を含めた立体構造解析 |
| 3. 学会等名 量子生命科学会第1回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、Andreas Ostermann、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 NADHシトクロムb5還元酵素反応系の高分解能構造解析 |
| 3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会、第71回日本細胞生物学大会合同年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、Andreas Ostermann、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 NADHシトクロムb5還元酵素反応系の結晶構造解析 |
| 3. 学会等名 日本結晶学会令和元年度年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yu Hirano, Kazuo Kurihara, Katsuhiro Kusaka, Andreas Ostermann, Shigenobu Kimura, Kunio Miki, Taro Tamada |
| 2. 発表標題 Structural studies of the NADH-cytochrome b5 reductase |
| 3. 学会等名 3rd QST International Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yu Hirano |
| 2. 発表標題 X-ray and neutron structure analyses of redox proteins at high-resolutions |
| 3. 学会等名 3rd International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 酸化型NADHシトクロムb5還元酵素の中性子構造解析 |
| 3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yu Hirano, Kazuo Kurihara, Andreas Ostermann, Katsuhiro Kusaka, Shigenobu Kimura, Kunio Miki, Taro Tamada |
| 2. 発表標題 Neutron structure analysis of NADH cytochrome b5 reductase |
| 3. 学会等名 German Conference for Research with Synchrotron Radiation, Neutrons and Ion Beams at Large Facilities (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、Andreas Ostermann、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 NADHシトクロムb5還元酵素の高分解能構造解析 |
| 3. 学会等名 日本結晶学会2018年度年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平野優 |
| 2. 発表標題 X線と中性子を利用した酸化還元タンパク質の高分解能立体構造解析 |
| 3. 学会等名 2017年度日本生物物理学会北海道支部例会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yu Hirano, Kazuo Kurihara, Andreas Ostermann, Katsuhiko Kusaka, Shigenobu Kimura, Kunio Miki, Taro Tamada |
| 2. 発表標題 Neutron crystal structure studies of the oxidized form of NADH-cytochrome b5 reductase |
| 3. 学会等名 Conference of Asian Crystallographic Association (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 酸化型NADHシトクロムb5還元酵素の中性子構造解析 |
| 3. 学会等名 平成29年度日本結晶学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野優、栗原和男、日下勝弘、木村成伸、三木邦夫、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 NADHシトクロムb5還元酵素の中性子構造解析 |
| 3. 学会等名 日本中性子科学会第17回年会 |
| 4. 発表年 2017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 |
|-------|---------------------------------|-------------------------------|----|
| 研究協力者 | 木村 成伸 (KIMURA Shigenobu) | 茨城大学・理工学研究科・教授 (12101) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|