

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22403

研究課題名（和文）XFELとマイクロ流体技術の融合によるモノオキシゲナーゼの新しい構造解析

研究課題名（英文）Structure analysis of monooxygenase using XFEL and microfluidic device

研究代表者

杉本 宏（Sugimoto, Hiroshi）

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・専任研究員

研究者番号：90344043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：シトクロムP450ファミリーのタンパク質が触媒するモノオキシゲナーゼ反応は、逐次的に電子・酸素・プロトンの供給が必要である。このような多段階の複雑な反応を結晶相で制御するためのデバイスを作成し、X線自由電子レーザー（XFEL）を用いたシリアルX線結晶回折データ測定のために有効なツールとなることを示した。光反応サイクルをもたない一般のタンパク質でも時間分解構造解析の対象にして動的な分子メカニズムを解明する道を拓くものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのシトクロムP450はホルモン合成や薬物代謝に深く関与することから、疾病を防ぐための研究が長年にわたって行われてきた。また、植物や細菌など多くの生物にもシトクロムP450は存在し、植物の農薬への耐性や環境汚染物質の浄化の研究などに用いられている。したがって、本課題が実施したP450の活性部位での多様な基質認識や反応メカニズムの研究は、人間にとって有用な化合物生産のための触媒としてシトクロムP450の反応を利用するための研究開発へと発展すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Monooxygenase reactions catalyzed by cytochrome P450 family require the sequential input of two reducing equivalents (i.e., two electrons and two protons) which activate the oxygen molecule. We developed a prototype of device to control such a multi-step reaction of monooxygenase in crystalline phase. We performed a feasibility study of X-ray diffraction experiments using this device with microcrystals of cytochrome P450 at X-ray free electron laser (XFEL) facility. The result has shown that the device is useful for data collection system of serial crystallography using XFEL and photo-caged reagents, which pave the way to evaluate the dynamic mechanism of proteins by time-resolved crystallography even if their function would not contain a photoreaction.

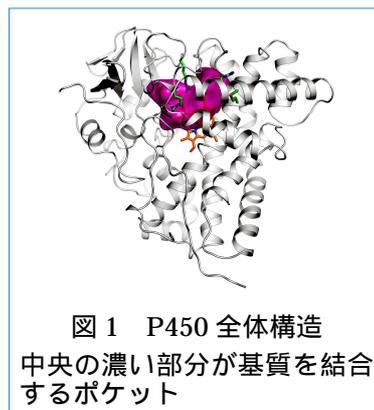
研究分野：構造生物化学

キーワード：ヘム X線結晶構造解析 X線自由電子レーザー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

モノオキシゲナーゼが主な機能であるシトクロム P450 ファミリーのタンパク質(略称:P450)はバクテリアからヒトまで多様な生物に存在し、ヘムを補欠因子として用いることで様々な基質を酸化して生命活動に必要な反応に関与する。この P450 の分子内部では、ヘム鉄の酸化状態変化や配位子の種類によって、基質結合ポケット内の基質が活性中心の鉄イオン側へ引き寄せられることが様々な解析から予測されている。当研究グループが解析を行った P450SU1 や P450BM3 などの結晶構造 [1-3] からは、大きな基質結合ポケット内の基質が活性中心の鉄イオンから離れた位置に結合しているため、何らかの構造変化が関与するメカニズムが示唆された(図 1)。しかし、活性型の酵素は不安定な状態のせい、このような構造変化は直接的には観測されておらず、基質の特異性や位置選択性を制御しているメカニズムが十分に理解されていない。



2. 研究の目的

本研究は、時間分解 X 線構造解析によってタンパク質の基質ポケットの動きを可視化し、触媒反応における動的な分子メカニズムを解明することが最終目標としている。これを達成するためには、X 線自由電子レーザー(XFEL)による測定技術とマイクロ流体技術による反応制御、そして分光技術を駆使した解析を実施する。これらを融合させることで回折データ収集の新しいツールとなるであろう。特に P450 が触媒する反応は複雑で、逐次的に電子・酸素・プロトンの供給が必要である。この多段階の反応を結晶相で制御するのは困難で、従来のシリンジタイプのインジェクターを用いる方法や二液混合装置を組み合わせた方法でも不可能である。本手法を確立することで、光反応サイクルをもたない一般のタンパク質でも時間分解構造解析の対象にできる道を拓くものである。ヒトの P450 はホルモン合成の制御や薬物代謝の予測など、疾病を防ぐための研究が活発に行われてきた。先に述べたように、P450 は植物や細菌など多くの生物に存在し、植物の農薬への耐性や環境汚染物質の浄化の研究に用いられている。細菌由来の P450 は活性が高いだけでなく、水溶性であることから温和な条件での化合物合成のための触媒としての利用を視野に入れた研究も実施されている。したがって、P450 の活性部位に関する構造研究はその多様な基質認識や反応メカニズムの解明に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 微結晶の調製

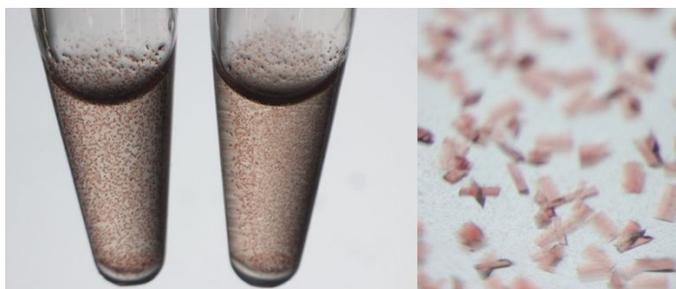


図 2. P450BM3 の微結晶

X 線回折実験のためのタンパク質結晶として P450BM3 と基質アナログ複合体を用いた [4]。従来の Serial Femtosecond X-ray crystallography (SFX)法 [5]のような SACLA のシリンジタイプのインジェクター [6]から試料を吐出するために用いる場合と同様の微小サイズのを想定して

調製を行った。結晶中のすべての分子の反応を同期させるためには、小さくてサイズが揃った結晶を大量調整する必要がある。結晶化は PCR 用の 100 マイクロリットル容量の汎用的な 8 連チューブを用いてバッチ法で行なった。

(2) 流路デバイスの試作

短寿命な活性型の酵素の結晶構造を無損傷で捉えるには、X 線自由電子レーザー (XFEL) による強力な X 線短パルスを微小サイズの結晶に照射する。この実験では 1 ショットごとに結晶を交換しなければならず、1 万枚以上の回折イメージを取得することでデータセットとする。X 線を照射する際には結晶内のタンパク質の酸化還元状態の変化と酸素分子(O_2)の結合といった多段階の反応を制御するしくみが必要である。マイクロ流体技術で製作するデバイスでは、多数の結晶を効率的にうまく固定できるような設計を行った。結晶の固定が必須である理由は、ヘム鉄を化学的に還元するためのジチオナイト ($Na_2S_2O_4$) が直接 O_2 と反応してしまうことが大きな問題となり、嫌気下で結晶から余分な還元剤を洗い流して除去するステップを要するからである。微細加工では流路内に凹凸の形成をデザインできるため、結晶を凹凸に引っ掛けて表面に吸着させる。流路の素材は可視光領域の吸収が小さく、紫外線硬化タイプのシリコンエストラマーである Polydimethylsiloxane (PDMS) を用いた。

4. 研究成果

X 線回折実験に用いるモノオキシゲナーゼ P450BM3 の微結晶の作成にあたり、マイクロシード法による核形成の制御を行った。独自に開発したシード化合物の利用によって、約 50-90 ミクロンのサイズでの調整は再現よくできた [4] (図 2)。XFEL を光源として利用する X 線回折データ収集では、XFEL の強力な短パルスで 1 万個以上のタンパク質の微結晶から回折イメージを 1 枚ずつ連続取得する手法を用いるため、マイクロ流体技術を用いて結晶を連続的に X 線ビームの照射位置に運搬を可能にするデバイスを試作した (図 3)。このデバイスには直径が 200 μm で深さ 120 μm の穴が 200 μm 間隔で配置され、上下面を樹脂シートで密閉している。注入口から微結晶を懸濁した溶液を導入してポリプロピレンシールで密封した。X 線を 1 パルスずつ 30 Hz で照射して位置をずらしていけば、1 枚あたり計 2500 穴の場合には 15 分で照射が完了することになる。SACLA の BL2 においてテスト照射実験を好気的な条件で行った。まず、結晶が流路に吸着しやすいように真空ポンプでデバイスを構成する PDMS 樹脂の脱気を行った上で微結晶懸濁溶液を導入した。そしてデバイス専用の専用治具に挟んでマウントし、高精度試料ステージへ固定した。流路の穴には溶液中の酸化型結晶が隔離されており、SACLA の X 線パルスを照射した (図 4)。そして隣の穴が X 線ビームの照射位置に来るように試料ステージを並進する作業を繰り返した。

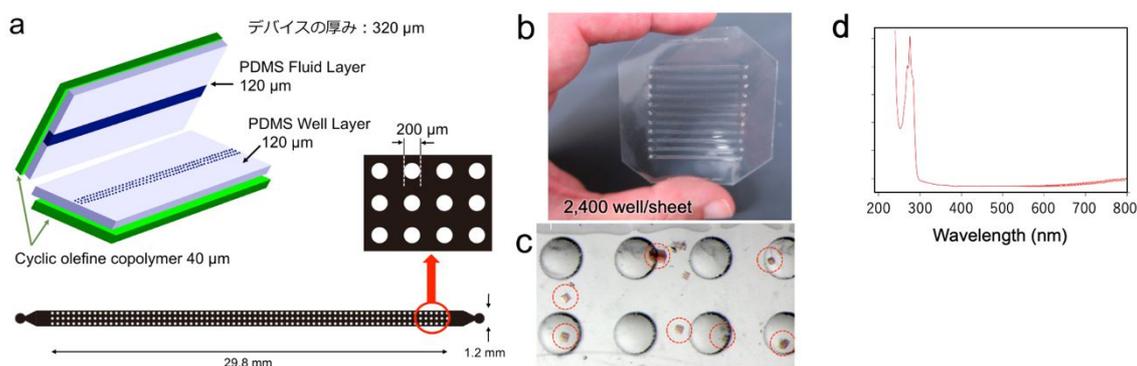


図 3. PDMS を用いた流路デバイスの試作

(a) 設計の概略図, (b) 試作品 (c) 結晶導入時の顕微鏡画像 (d) デバイス単体での可視吸収スペクトル

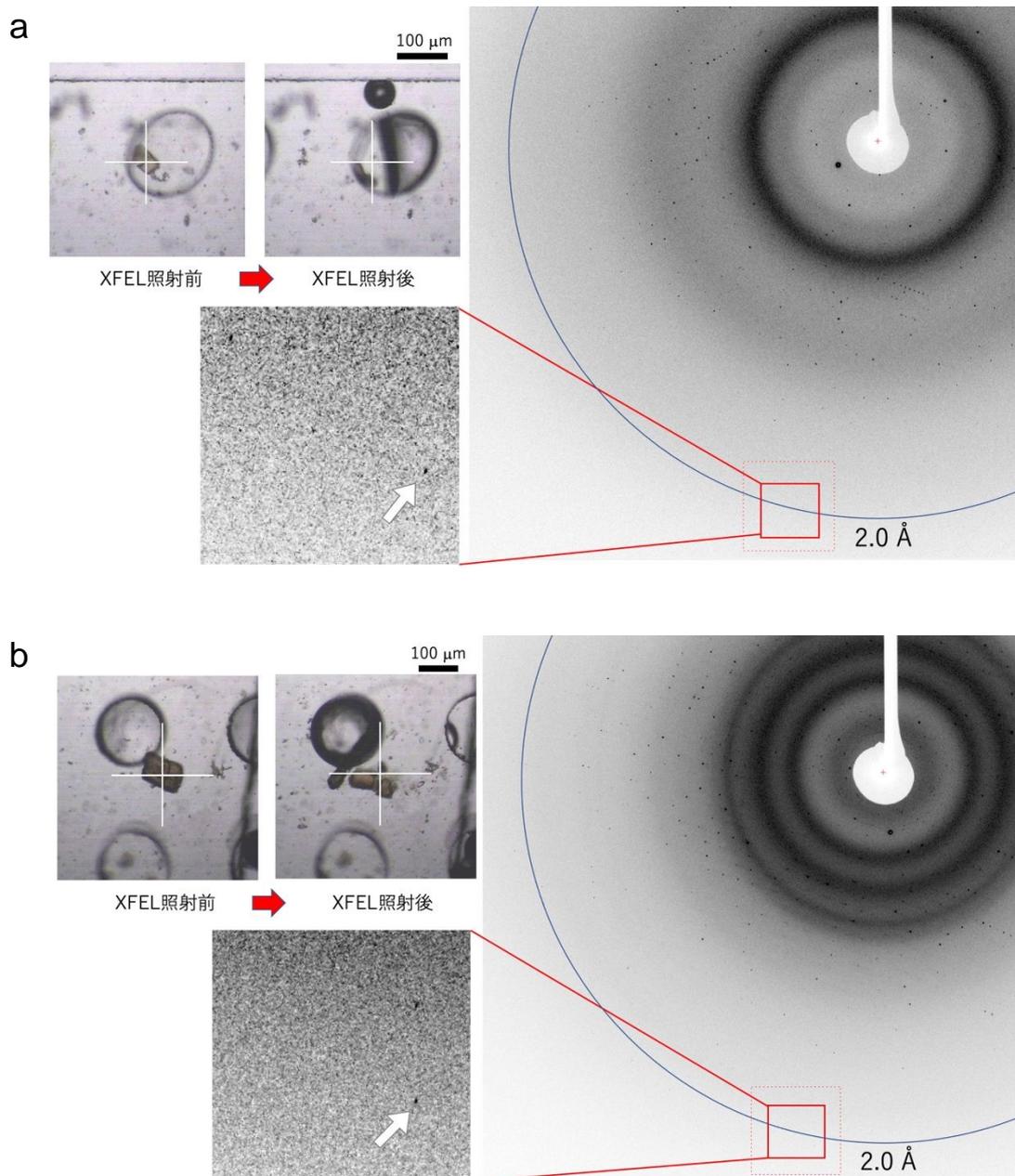


図4 XFEL を用いた回折実験

- (a) 穴の中に吸着した結晶に 1 パルスの XFEL ビームを照射して回折画像を取得した後の結晶は、破壊されて周りに気泡が出現しているが、デバイス本体に損傷は見られなかった。
- (b) 流路中の結晶に XFEL ビームを照射した場合には、120 μm の厚みの PMDS 層の影響で同心円状のバックグラウンドノイズとなる。

XFEL パルスの照射による流体デバイスの破損が懸念されたが、フルフラックスの XFEL ビーム (8×10^{10} photons/pulse, X-ray energy 10 keV, beam size $6.2 \mu\text{m}$ (H) \times $2.5 \mu\text{m}$ (V) at sample position) でも破損は見た目上は全く確認されなかった。結晶が正常に穴に吸着された場合 (図 4a) デバイスからの X 線散乱が及ぼす検出器でのバックグラウンドノイズのレベルは、従来のシリンジタイプの SFX 用インジェクターで用いる高粘度媒体の影響や固定ターゲット法での溶媒由来のバックグラウンドノイズと比較して大きな違いはないことから、データセットの取得の際には許容範囲であると考えられる。また、結晶からは分解能 2.0 \AA を超える X 線回折スポットが確認されたことから (図 5) 結晶の本来の回折能を観測できていた。したがって、本手法が従来の手法と同程度の精度で X 線回折データが取得できると見込まれる。今後の展開としては、タン

パク質結晶のサイズや形状に応じて、流路や穴の形状のデザインの最適化が求められる。さらに、ケージド試薬の反応条件の探索や嫌気的な条件を保持するための樹脂やコーティングの最適化を進める必要があるが、本実験の結果は、このデバイスが XFEL を用いたシリアルデータ測定のために有効なツールとなることを示した。

<引用文献>

- [1] Cong, Z., Shoji, O., Kasai, C., Kawakami, N., Sugimoto, H., Shiro, Y., Watanabe, Y. "Activation of wild-type cytochrome P450BM3 by the next generation of decoy molecules: enhanced hydroxylation of gaseous alkanes and crystallographic evidence". *ACS Catalysis* 5, 150-156 (2015)
- [2] Shoji, O., Yanagisawa, S., Stanfield, J. K., Suzuki, K., Cong, Z., Sugimoto, H., Shiro, Y., Watanabe, Y. "Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol by Cytochrome P450BM3 Triggered by Amino Acid Derivatives". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56, 10324-10329 (2017)
- [3] Sugimoto, H. *et al* "Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃". *Biochemistry* 47, 4017-4027 (2008)
- [4] Stanfield, J. K., Omura, K., Matsumoto, A., Kasai, C., Sugimoto, H., Shiro, Y., Watanabe, Y., Shoji, O. "Crystals in minutes: instant on-site microcrystallisation of various flavours of the CYP102A1 (P450BM3) haem domain". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 59, 7611-7618 (2020)
- [5] Chapman, H. N. *et al* "Femtosecond X-ray protein nanocrystallography". *Nature* 470, 73-77 (2011)
- [6] Tono, K. *et al* "Diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA (DAPHNIS): application to serial protein crystallography using an X-ray free-electron laser". *J. Synchrotron Radiat.* 22, 532-537 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Stanfield, J. K., Omura, K., Matsumoto, A., Kasai, C., Sugimoto, H., Shiro, Y., Watanabe, Y., Shoji, O.	4. 巻 59
2. 論文標題 Crystals in minutes: instant on-site microcrystallisation of various flavours of the CYP102A1 (P450BM3) haem domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 7611 ~ 7618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201913407	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 Suga, M., Shimada, A., Akita, F., Shen, J. R., Tosha, T., Sugimoto, H.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Time-resolved studies of metalloproteins using X-ray free electron laser radiation at SACLA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.	6. 最初と最後の頁 129466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129466	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 -
1. 著者名 T. Moreno-Chicano, A. Ebrahim, D. Axford, M. V. Appleby, J. H. Beale, A. Moreno-Chicano, T., Ebrahim, A., Axford, D., Appleby, M. V., Beale, J. H., Chaplin, A. K., Duyvesteyn, H. M. E., Ghiladi, R. A., Owada, S., Sherrell, D. A., Strange, R. W., Sugimoto, H., Tono, K., Worrall, J. A. R., Owen, R. L., Hough, M. A.	4. 巻 6
2. 論文標題 High-throughput structures of protein-ligand complexes at room temperature using serial femtosecond crystallography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 1074 ~ 1085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252519011655	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
1. 著者名 Ebrahim, A., Moreno-Chicano, T., Appleby, M. V., Chaplin, A. K., Beale, J. H., Sherrell, D. A., Duyvesteyn, H. M. E., Owada, S., Tono, K., Sugimoto, H., Strange, R. W., Worrall, J. A. R., Axford, D., Owen, R. L., Hough, M. A.	4. 巻 6
2. 論文標題 Dose-resolved serial synchrotron and XFEL structures of radiation-sensitive metalloproteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 543 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252519003956	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

1. 著者名 Lucic, M., Svistunenko, D. A., Wilson, M. T., Chaplin, A. K., Davy, B., Ebrahim, A., Axford, D., Tosha, T., Sugimoto, H., Owada, S., Dworkowski, F. S. N., Tews, I., Owen, R. L., Hough, M. A., Worrall, J. A. R.	4. 巻 59
2. 論文標題 Serial Femtosecond Zero Dose Crystallography Captures a Water Free Distal Heme Site in a Dye Decolorising Peroxidase to Reveal a Catalytic Role for an Arginine in Fe(IV)=O Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 21656 ~ 21662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202008622	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

1. 著者名 Maeki Masatoshi, Ito Sho, Takeda Reo, Ueno Go, Ishida Akihiko, Tani Hirofumi, Yamamoto Masaki, Tokeshi Manabu	4. 巻 11
2. 論文標題 Room-temperature crystallography using a microfluidic protein crystal array device and its application to protein-ligand complex structure analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9072 ~ 9087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0sc02117b	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 Nomura, T., Kimura, T., Kanematsu, Y., Yamada, D., Yamashita, K., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Hisano, T., Yamagiwa, R., Takeda, H., Gopalasingam, C., Kousaka, R., Yanagisawa, S., Shoji, O., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Takano, Y., Sugimoto, H., Tosha, T., Kubo, M., Shiro, Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Short-lived intermediate in N2O generation by P450 N0 reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2101481118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2101481118	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 真栄城正寿
2. 発表標題 マイクロデバイスによるタンパク質の立体構造解析
3. 学会等名 PAI-NET マーケットトレンドセミナー 「マイクロフルイディクスの実用化」 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田怜央, 真栄城正寿, 伊藤翔, 上野剛, 石田晃彦, 谷博文, 山本雅貴, 渡慶次学
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いたタンパク質結晶の室温複合体構造解析
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム学会 第42回研究会(CHEMINAS42)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 舟久保智瑛, 真栄城正寿, 伊藤翔, 上野剛, 石田晃彦, 谷博文, 山本雅貴, 渡慶次学
2. 発表標題 常温X線結晶構造解析のためのマイクロデバイスの開発
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020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 分担者	真栄城 正寿 (Maeki Masatoshi) (40744248)	北海道大学・工学研究院・助教 (10101)	

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		
英国	University of Essex	Diamond Light Source	