

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 2月28日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370049

研究課題名（和文）

Ndx ファミリー酵素の加水分解反応に共役するプロトン移動のその場観察

研究課題名（英文）*In situ* observation of proton transfers within hydration reactions of Ndx family enzymes

研究代表者

神谷 信夫 (KAMIYA NOBUO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60152865

研究成果の概要（和文）：

Ndx ファミリーに属する ADP リボースピロリン酸分解酵素を対象に、その加水分解反応過程におけるプロトン移動をその場観察することを目標として、J-PARC の茨城県産業利用ビームラインの中性子回折計 iBIX を利用した中性子回折実験を行い、時間分割解析の目標達成に向けた目処をたてた。

研究成果の概要（英文）：

In order to observe *in situ* the proton transfer in the hydration reaction of ADP ribose pyrophosphatase of the Ndx family, we have shown the possibility of time-resolved neutron diffraction experiment using a neutron diffractometer of Ibaraki prefecture beamline at J-PARC, Tokai, Japan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：中性子回折、4次元構造解析、プロトン移動、加水分解酵素、Ndx ファミリー

1. 研究開始当初の背景

本課題は、兵庫県西播磨の大型放射光施設 SPring-8 の超高輝度 X 線の効率的利用を目指した特定領域研究「シンクロトロン放射光による生物マシーナリーの構造生物学」と、重点領域研究「放射光による蛋白質結晶構造のミリ秒オーダーのダイナミックスの研究」にそれぞれ計画研究として参加した成果、完成した SPring-8 ビームラインを利用して大角度回転結晶法（LOT）による時間分割結晶構造解析を目指した基盤研究(B) (1) 「4次元

結晶構造解析法によるニトリルヒドラーゼの水和反応のその場観察」と、それに続く基盤研究(B) 「新規な pH 温度ジャンプトリガーを利用した Ndx ファミリー酵素の 4 次元構造解析」の成果に基づいて提案された。上記の重点領域研究では、放射光の白色 X 線によりラウエ法による時間分割解析が可能となり、基盤研究(B) (1) では SPring-8 の単色 X 線を利用した LOT 法による時間分割解析が可能となった。またこれに続く基盤研究(B) では、時間分割解析で重要となる反応開始トリ

ガーとして、従来利用されてきた光トリガーの適用範囲の狭さを克服するために、Ndx ファミリー酵素のADPリボースピロリン酸分解酵素 (ADPRase) を対象に、新たに、金属イオンの結晶内へのソーキングにより反応を開始させるトリガーを開発した。本申請では、これまでに SPring-8 を利用して行ったADPRase の4次元結晶構造解析の成果を基礎として、その酵素反応の進行にともなうプロトン移動を、日本原子力研究所に建設されたJ-PARC の中性子結晶構造解析により実証することを目指すこととした。

2. 研究の目的

これまでに Spring-8 を利用して観察されたADPRase の反応過程は、従来から提案されてきた複数の反応機構のいずれとも異なり、4次元構造解析によるその場観察の重要性を改めて再確認する結果となった。しかしながら、研究の進展は新たな問題点をも浮き彫りにした。ADPRase の反応の本質は、(1)酵素により水が活性化されてプロトンと水酸化物イオン(OH⁻)に解離し、(2)このOH⁻がピロリン酸の α リン原子を攻撃してAMPを生じ、また、(3)残りの β リン原子にプロトンが付加してリボース5'リン酸が生じる過程にある。ADPRase の立体構造では、(1)と(3)の反応部位は明確に分離されており、それぞれに関与するプロトンは別物である可能性が高い。すなわちADPRase では、系外から(3)にプロトンを供給する部分、(1)から系外へプロトンを放出する部分も含めて、プロトンを一方向へ運搬するプロトン移動経路が形成されているとみなすことができる。しかしながら、これを4次元X線結晶解析により実証することは容易ではないため本申請では、4次元中性子結晶構造解析法を新たに導入してこの仮説を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

4次元結晶構造解析に関するこれまでの研究成果の蓄積から、金属イオンのソーキングを反応開始トリガーとして酵素反応のその場観察を成功させるために特に重要な点は、以下の3つである。(1)事前に結晶化条件の最適化を十分に行い、可能な限り高分解能の回折点を与える結晶を定常的に得られるようにする。(2)ADPRase の場合、0.01mm³規模の結晶に対しては金属イオンのソーキングは1分程度で完了するため、反応経路を追跡する際の時間間隔は数分から数10分程度までとし、反応が1時間程度で終結するように反応速度を調節した。実験条件の設定に際しては、全反応時間にわたり結晶の状態を定常的に保つことができるよう特に留意する。(3)それぞれの反応時間でクライオトラップした試料に対する結晶構造解析では、各

スナップショットに複数の中間構造が共存する可能性に留意する。SPring-8を利用した4次元解析では、(1)について、まずそれまでの最高分解能1.7Åを1Åまで改善し、(2)については緩衝液濃度、pH、沈殿剤濃度などを検討し、実験室系X線回折装置を利用して、反応開始後1時間以上にわたり結晶の回折分解能を劣化させない実験条件を確立した。(3)については、反応時間の異なる9個のスナップショット構造のすべてについて、反応キャビティ内部の基質(ADPR)にとどまらず、ADPRase 本体のアミノ酸側鎖や酵素をとりまく水分子、キャビティに導入された金属イオンを含め、alternative conformer を詳細に検討した。それぞれのスナップショット構造を時系列に従って検討した結果、ADPRase では、2個の金属イオンが連続して反応キャビティ内に導入されることが判明した。まず第1の金属イオンは、ADPRのコンフォメーションを変化させて反応中間体(ADPR*)を生成する。第2の金属イオンは水を配位させ、近傍のGlu82がこの水からプロトンを引き抜いて水酸化物イオン(OH⁻)を発生させる。2個の金属イオンが連続して導入された結果、OH⁻とADPR*の α リン原子、 α/β リン原子をつなぐ酸素原子が一直線にならぶinline配置が実現され、反応前はsp³混成軌道であった α リン原子が、sp²混成軌道を経て電子を移動させピロリン酸結合の加水分解が進行するという反応の全経路をその場観察することができた。これは従来、実際には加水分解されない基質類似化合物との複合体の構造や、部位特異的変異体の構造に基づいて提案されていた複数の反応機構とは大きく異なるものであった。

本研究では上記の(1)に対応して、まずADPRase の発現規模を従来10倍とし、結晶化法の改良により、大強度陽子加速器施設J-PARC で必要とされる0.1mm³以上の大型でかつ1Åを超える超高分解能の結晶を育成する。SPring-8での4次元構造解析の成功は、2価金属イオンを結晶内にソーキングして反応を開始させるトリガー系の採用による場所が大きい。ソーキングでは、金属イオンが結晶内に均一に分布するまでに一定の時間を要するため、反応速度はこの時間と比較して十分に遅くしなければならない。ADPRase ではこの問題を解決するために、結晶化条件のpHを4.6と低くして、反応速度を1/100程度まで減速した。J-PARC の中性子回折実験に利用する結晶の厚さは0.2mmを超え、ソーキングに要する時間はこれまでより長くなると予想される。上記の(2)については、大型化した結晶でも一辺の長さはたかだか2倍であり、結晶内の反応を従来と同様に制御することは比較的容易であろうと考えている。(3)の問題については、X線、中性子

線を問わず、結晶構造解析上の留意点は同じである。ただし中性子回折データの分解能は、X線回折データよりかなり下回ると予想されるため、alternative conformerの取り扱いにはより一層の注意を要する。

4. 研究成果

(1) 大量発現規模の1桁アップ

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の ADPRase (*TtADPRase*) の発現プラスミドを導入、形質転換した大腸菌では、本研究の前段階で既に、大量培養する際の発現誘導剤 (IPTG) を使用しない条件でも 8 L の液体培地からほぼ 30 g の湿重量で数十 mg の精製 ADPRase を確保できていた。本研究では、IPTG の添加条件を検討して、精製 ADPRase の収量をあげようと試みたが、IPTG 添加による発現量の増大は確認できなかった。以後本研究では、8 L 培養と精製プロセスの回数を増やして大型結晶作成に必要な ADPRase を確保することとした。

(2) 大型結晶の育成

従来 ADPRase の結晶化は通常のハンギングドロップ蒸気拡散法に従い、平均 0.01 mm^3 の大きさの結晶を得ていた。本研究では結晶化ドロップの体積を増やすことにより結晶の大型化を実現する戦略をとり、以下の2段階のレベルアップにより、最終的に 0.6 mm^3 の大型結晶を作成することに成功した。

(i) シッティングドロップ法へ移行

ハンギングドロップ法では結晶化ドロップをカバーガラスにハングする際の安定性を確保するためにドロップの大きさは $20 \mu\text{L}$ 程度に制限される。一方市販のブリッジを利用してのシッティングドロップ法では、ドロップの容量を $100 \mu\text{L}$ にすることができる。その結果、結晶の成長が終了するまでの時間は従来の1週間から1ヶ月程度を要するものの、得られる ADPRase 結晶の体積は 0.3 mm^3 まで改善された (図 1-1 参照)。

(ii) 改良型シッティングドロップ法

ハンギングドロップ法よりシッティングドロップ法の方が、より大型の結晶を調製できることが判明したため、我々は血小板検査用の目皿を購入して、手製のシッティングドロップ法用のセッティングを工夫し、ドロップの容量をさらに $200 \mu\text{L}$ まで拡大したところ、図 1-2 に示すような体積 0.6 mm^3 の大型結晶を析出させることに成功した。

(3) 大型結晶の重水置換

中性子回折実験では軽水素原子は非弾性散乱能が高く回折像のバックグラウンドを増大させ、それにより回折強度データの S/N

図 1-1 シッティングドロップ法により析出した ADPRase 結晶。図中の赤線は 1 mm の長さに対応する。

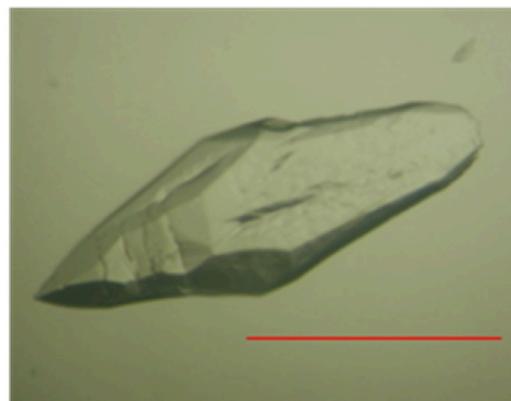


図 1-2 改良型シッティングドロップ法により析出した ADPRase 結晶。図中の赤線は 1 mm の長さに対応する。

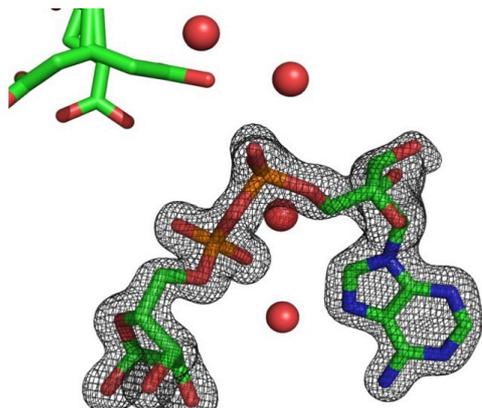


比を劣化させる。一方タンパク質の結晶では一般に 50% 以上の水を含むため、これを重水で置換して回折像のノイズを低減する必要がある。この際、軽水と重水では通常のガラス電極に対する応答の違いから見かけの水素イオン濃度 (pH または pD) に差が生じるため、「 $pD = \text{見かけの pH} + 0.4$ 」の既知の関係式に従って換算した上で、pD4.6 の重水置換緩衝溶液に図 1-2 の結晶を 1 週間浸した。しかしながら結晶にひび割れが生じたため、ADPRase の結晶は pH の低下によりひび割れを生じやすいというこれまでの経験から pD を少しずつ上昇させたところ、最終的に pD5.0 の条件でひび割れを起こさない重水置換条件を見つけることができた。なおこの重水置換にあわせて ADPR を結晶中にソーキングさせ重水置換の ADPR-ADPRase 2 元複合体の結晶を調製した。

(4) 大型結晶に対する反応開始条件の検討
 中性子結晶時間分割解析に向けた試みとして、通常のシッピングドロップ法から得られた体積 0.3 mm^3 の結晶を用い、重水条件下における0分、5分、20分、40分と Mn^{2+} ソーキング時間を変えた ADPRase-ADPR- Mn^{2+} 三元複合体大型結晶を調製し、Spring-8 BL38B1にてX線回折実験によりそれぞれの回折画像データを収集した。HKL2000により回折強度データを得た後、Molrepにより分子置換法を適用して初期位相を得て、Refmac5とCOOTを用いて構造を精密化した。

図2-1は、反応時間0分、すなわちADPRase-ADPR 2元複合体について、反応中心を構成するGlu82(左上で2個のalternative conformerとして描かれている)とその下方にGlu86、ADPR(対応する電子密度を黒色メッシュで重ねている)とこれらの近傍にある水分子を抜き出して描いた。負に帯電したADPRが反応キャビティに侵入することによりGlu82のalternative conformerの占有率はADPRから遠い方が大きかった。

図2-1 ADPRase-ADPR 2元複合体の反応中心まわりの構造。



続いて図2-2は同様にして描いた反応時間5分のADPRase-ADPR- Mn^{2+} 三元複合体の構造である。ADPRとGlu86の間に1個目の Mn^{2+} (紫色)を確認することができ、このMn原子とADPRの α リン原子が配位結合を形成してADPR alternative conformerが出現した。また正に帯電したMn原子が負に帯電したGlu82と相互作用することによりそのalternative conformerの占有率はADPRに近い方が大きかった。

図2-3は反応時間20分のADPRase-ADPR- Mn^{2+} 三元複合体の構造である。ADPRとGlu86の間に2個目の Mn^{2+} (紫色)を確認することができる。ADPRのalternative conformerは解消してADPRの α リン原子は2個目のMn原子により活性化された水、すなわち水酸化物

図2-2 反応時間5分のADPRase-ADPR- Mn^{2+} 三元複合体の反応中心まわりの構造。

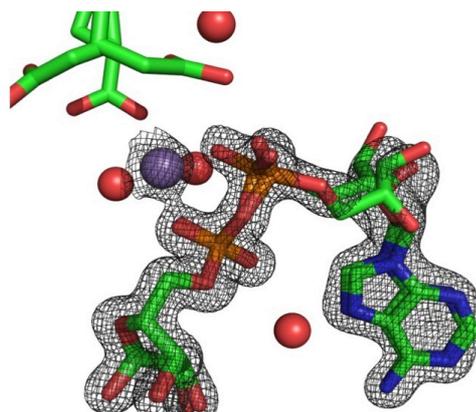
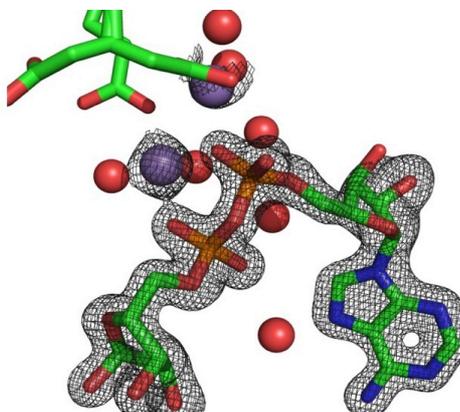


図2-3 反応時間20分のADPRase-ADPR- Mn^{2+} 三元複合体の反応中心まわりの構造。



イオンからのインライン親核攻撃を受ける配置に固定されている。

図2-4はさらに反応時間40分のADPRase-ADPR- Mn^{2+} 三元複合体の構造である。2個目のMn原子の電子密度がやや小さく変化したものの基本的に図2-3と同様の結果であり、反応開始後40分経過してもADPRの加水分解反応はほとんど進行しておらず、体積 0.3 mm^3 の結晶に対して反応のクライマックスを捕えるには1時間程度の反応時間が必要であると結論された。

(5) J-PARCの中性子回折実験

改良型シッピングドロップ法により得られた体積 0.6 mm^3 のADPRase-ADPR 2元複合体の結晶を用いて中性子回折点が観測できるかを確認するため、J-PARCに設置された茨城県産業利用ビームラインの中性子回折計(iBIX、図3-1参照)を用いて中性子回折実験を行った。中性子線はiBIXに対して画面右から左に向かって導入され、画面ほぼ

図 2-4 反応時間 40 分の ADPRase-ADPR-Mn²⁺三元複合体の反応中心まわりの構造。

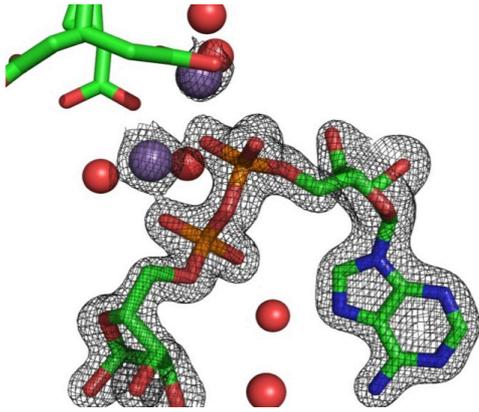
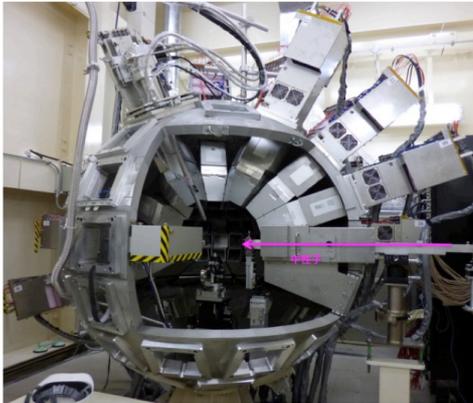


図 3-1 中性子回折計 iBIX の全景。



中央のゴニオメータにマウントされた ADPRase の大型結晶に照射された。結晶からの回折像は、球状の外枠に設置された合計 30 台の 2 次元検出器に記録された (図 3-2 参照)。図 3-3 には今回の中性子回折実験から得られた低分解能側の回折像を示した。加速器の運転出力は 280 kW、中性子線の照射時間は 17 時間であった。回折強度の高い低分解能反射が明瞭に記録されているが、それぞれ同じ方向に弱いストリークを引いていることがわかる。これは今回試料として用いた結晶が体積の大きいものと小さいもの、2 個のドメインからなることを示しており、大型結晶に成長する過程か、または重水置換・ADPR ソーキングの過程で生じた結晶の割れと考えられ、単一ドメインからなる大型試料をいかにして調製するかは今後の課題として残された。

図 3-4 は対応する高分解能側の中性子回折像であり、赤丸で囲んだ回折点は分解能 2.9 に相当し、本結晶により水素原子の同定が可能であることを示している。

図 3-2 iBIX の検出器の配置と対応する番号。中性子線の下流側に配置された検出器は低分解能の、上流側の検出器は高分解能の回折点を計測する。



図 3-3 ADPRase-ADPR 2 元複合体結晶の低分解能側中性子回折画像。

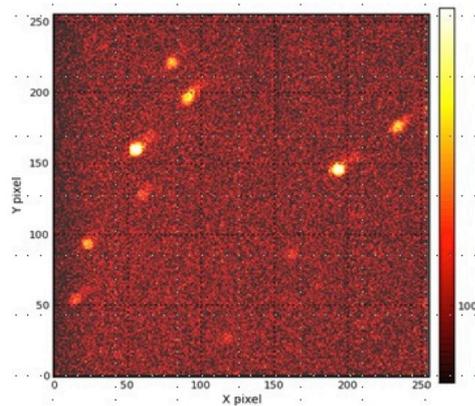
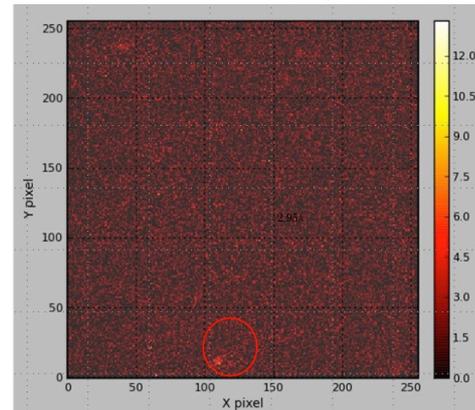


図 3-4 ADPRase-ADPR 2 元複合体結晶の高



(6) 結果のまとめ

本研究では ADPRase の加水分解反応過程に

おけるプロトン移動を4次元中性子結晶構造解析により実証することを目標とした。ほぼ研究計画に従ってADPRaseの大型結晶を調製し、SPring-8を利用して事前にその時間分割反応条件を確立することができたが、東日本大震災によりJ-PARCの運転再開に思わぬ時間を要したこともあり、目標とした実証までには至らなかったものの、その明確な目処を立てることができた。既にJ-PARCの開発課題に申請して今後のマシンタイムを確保しており、後は当初目標に向けて邁進するのみである。

本研究は、研究代表者の研究室の大学院学生であった甲斐健太郎、秋田友加、古池美彦、小松勇介の各氏、学部学生であった秋吉由佳里、天野芳美、中条瑛美の各氏、宮原郁子准教授との共同研究として行われた。

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 1件)

① Nobuo Okazaki, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Kazuo Kurihara, Takushi Ooga, Nobuo Kamiya, Seiki Kuramitsu and Ryota Kuroki, Crystallization and preliminary neutron diffraction studies of ADP-ribose pyrophosphatase-I from *Thermus thermophilus* HB8, *Acta Cryst.*, 査読有, F68, 2012, 49-52.

[学会発表] (計 20件)

① 古池美彦, 秋田友加, 宮原郁子, 神谷信夫, ヌクレオチド α - β リン酸結合の加水分解におけるアトミックダイナミクス, 日本結晶学会年会, 10月25-26日, 2012.

② 小松勇介, 古池美彦, 宮原郁子, 神谷信夫, *TtADPRase* の中性子回折に向けた結晶の大型化と構造解析, 日本結晶学会年会, 10月25-26日, 2012.

③ 古池美彦, 秋田友加, 宮原郁子, 神谷信夫, 糖ヌクレオチド二リン酸結合加水分解酵素が制御する活性中心残基-Mn 錯形成とプロトン移動の動的可視化, 日本化学会第92回春期年会, 3月25-28日, 2012.

④ 岡崎伸生, 安達基泰, 大原高志, 玉田太郎, 栗原和男, 大賀拓史, 神谷信夫, 倉光成紀, 黒木良太, 好熱菌由来ADPリボースピロリン酸分解酵素の中性子結晶構造解析, 日本結晶学会年会, 11月24-25日, 2011.

⑤ Yoshihiko Furuike, Yuka Akita, Ikuko Miyahara, and Nobuo Kamiya, Protonation states of key residues observed during in situ ADPRase reaction, XXII Congress and General Assembly International Union of Crystallography, Madrid, Spain, 22-30 Aug,

2011.

⑥ 神谷信夫, 秋田友加, 神谷敏美, 古池美彦, 宮原郁子, ADPRase の結晶相反応における水素とH⁺のその場観察-2, Zn 反応過程におけるカルボキシル基のプロトン化状態とその変化, 日本結晶学会年会, 12月③-5日, 2010.

⑦ 神谷信夫, 結晶相一過性反応の追跡が酵素学のパンドラの箱を開ける, 第10回蛋白質科学学会年会WS「古くて新しい酵素反応機構研究の進展」, 6月16-18日, 2010.

⑧ 古池美彦, 秋田友加, 秋吉由佳里, 天野芳美, 宮原郁子, 神谷信夫, 高度好熱菌HB8由来ADPRのMn(II)依存性加水分解反応の時間分割X線結晶構造解析, 第10回蛋白質科学学会年会, 6月16-18日, 2010.

⑨ Yoshihiko Furuike, Yuka Akita, Yukari Akiyoshi, Yoshimi Amano, Ikuko Miyahara, and Nobuo Kamiya, Time-Resolved Crystal Structure Analysis of Mn(II) Dependent Hydrolysis Reaction of ADP-Ribose Pyrophosphatase from *Thermus thermophilus* HB8, 3rd International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB 2010), Paris, France, 25-28 May, 2010.

⑩ 秋田友加, 宮原郁子, 神谷信夫, *TtADPRase* の反応過程における水素とプロトンの追跡(1)高分解能X線構造解析と結晶の大型化の試み, 日本結晶学会年会, 12月⑤-6日, 2009.

⑪ 神谷信夫, ADPリボースピロリン酸分解酵素の結晶相反応のその場観察, 2009年度酵素・補酵素研究会, 7月10-11日, 2009.

⑫ 神谷信夫・秋吉由佳里・甲斐健太郎・中川紀子・倉光成紀・宮原郁子, 高度好熱菌由来ADPリボースピロリン酸分解酵素:Mg(II)のソーキングにより開始した結晶相反応のその場観察, 第9回日本蛋白質科学学会年会, 5月20-22日, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 信夫 (KAMIYA NOBUO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 60152865

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし