

# 連続フェムト秒結晶構造解析が書き換える 銅含有亜硝酸還元酵素の反応機構

福田庸太

大阪大学工学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

井上 豪

大阪大学工学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

溝端栄一

大阪大学工学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

## 要旨

われわれはこれまで、亜硝酸イオンを一酸化窒素に一電子還元する銅含有亜硝酸還元酵素 (CuNIR) の構造生物学的研究をおこなってきたが、シンクロトロン X 線を用いた回折強度データ収集では測定中にタンパク質内部の銅中心が迅速に還元され、その周辺構造が変化してしまう問題があった。そこで、X 線自由電子レーザーを用いた連続フェムト秒結晶構造解析により、銅中心の還元反応がおこる前の CuNIR の休止状態および基質結合状態のすがたをとらえることにした。得られた新しい構造に基づき、銅中心の還元反応にともなうプロトン移動機構の詳細なモデルを提案することができただけでなく、酵素反応時の亜硝酸イオンの構造変化に関する知見も得られた。

## 1. はじめに

### 1.1 金属, タンパク質, X 線

金属は、美しい装飾品としてだけでなく、その頑丈さから道具や貨幣、武器の材料にもなる。他の民族が利用できない金属を利用できるようになれば、争いにおいて優位に立つこともできる<sup>1)</sup>。人類の歴史は金属とともにあったと言っても過言ではなからう。自然はしかし、人類が金属の有用性に気づくはるか以前から、それを利用してきた。光合成、呼吸、酵素反応といった、生命を生命たらしめる多くの化学反応は、金属イオンを含むタンパク質 (金属タンパク質) によっておこなわれている。タンパク質はいくつものアミノ酸が連なったもので、多くは独自の決まった立体構造を持ち、その構造と機能は密接に関わっている。金属タンパク質の場合、金属中心周辺の構造はとりわけ、機能の発現にとって重要である。20世紀中頃に John Kendrew と Max Perutz がそれぞれ myoglobin と haemoglobin の X 線結晶構造解析に成功したのを皮切りに、さまざまなタンパク質の構造が明らかにされてきた。初めて構造解析されたタンパク質が鉄を含む金属タンパク質だったことは、偶然ではないかもしれない。生体内で重要な機能を担っている金属タンパク質は、比較的大量に存在し、安定であることが多いため、初期の結晶学の標的としてうってつけであったろう。20世紀後半に放射光の利用が可能になると、金属タンパク質内の精密な配位構造も高分解能で決定することができるようになり、研究は急速に進展した。しかし、そうした放射光を用いた金属タンパク質の

X 線結晶構造解析には、深刻な問題があった。強力な放射光 X 線が結晶中で水和電子を発生させ、これが金属イオンを迅速に還元してしまう現象、X 線光還元 (X-ray photoreduction) が起こるのである<sup>2,3)</sup>。酸化状態と還元状態とで、金属中心の配位構造は異なるため、回折データ収集中の金属周りの構造変化は避けられない。

### 1.2 銅含有亜硝酸還元酵素 (CuNIR) をめぐる問題

大気中の分子状窒素は、窒素固定によりアンモニアやアンモニウムイオンの形で土壌や水中に蓄えられる。これらの化合物が硝化作用によって窒素酸化物へと変換され、さらに脱窒と呼ばれる微生物の働きによって分子状窒素にまで段階的に還元されることで、地球における窒素循環の環は閉じられる。近年、固定された窒素を大気中へ戻す脱窒過程が重要視されつつある、というのは、金属触媒を用いて窒素と水素からアンモニウムを人工的に合成する Haber-Bosch 法の発明以来、固定される窒素量が爆発的に増え、窒素循環のバランスが崩れつつあるためである<sup>4)</sup>。脱窒過程のうち特に注目されているもののひとつは、亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) を反応性の高い有毒な一酸化窒素ガス (NO) に一電子還元する反応 ( $\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + e^- \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$ ) で、異化型の亜硝酸還元酵素 (nitrite reductase: NIR) によって触媒される。NIR はヘム鉄を含むものと、銅を含むものに大別されるが、われわれはこれまで、後者、すなわち銅含有亜硝酸還元酵素 (CuNIR) に着目し、構造生物学的研究をおこなってきた。

CuNIR は分子量37,000程度の同一のサブユニットから

なる3量体構造をとり、各分子に2つの銅結合部位を有している<sup>5)</sup>。われわれが研究に用いた *Alcaligenes faecalis* 由来 CuNIR の構造を Fig. 1 に示す。2つの銅部位は配位構造の違いから明瞭に区別される。外部からの電子受容部位であるタイプ1銅(T1Cu)は、2つのヒスチジン(His)、1つのシステイン(Cys)、1つのメチオニン(Met)が配位している。T1Cuはもういっぽうの銅部位であるタイプ2銅(T2Cu)と、136番目のシステイン(Cys136)と135番目のヒスチジン(His135)の間のペプチド結合を介して直結しており、T1Cuが受け取った電子はここを伝ってT2Cuへと流れる。T2Cuは活性部位で、サブユニットどうしの上に位置し、3つのHisが配位している。T2Cuの上部には、1つの水分子によって架橋された98番目のアスパラギン酸(Asp98)と255番目のヒスチジン(His255)が保存されており、これらの残基は触媒活性、とりわけ基質へのプロトン供給に寄与していることが知られている<sup>6,7)</sup>。

CuNIRは日本のグループによって発見された酵素だが<sup>8)</sup>、最初の結晶構造は海外のグループによって報告された<sup>5)</sup>。その後、海外のグループは基質や生成物との複合体構造をつぎつぎと決定し<sup>9,10)</sup>、CuNIRの反応機構はほとんど解明されたかに思われてきた。しかし実際は、いくつもの疑問が残っている<sup>11)</sup>。(i)変異体を用いた活性測定の結果などから、活性中心に保存されたAspとHisがプロトン移動に関わっていることは明らかだが、その詳細な役割は不明である。(ii)T1CuからT2Cuへの分子内電子移動はプロトン移動と共役している、すなわちプロトン共役電子移動であることが示されており<sup>12,13)</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>がT2Cuに配位すると分子内電子移動が促進されることもよく知られている<sup>13,14)</sup>、その機構は完全に理解されているわけではない。(iii)CuNIRと生成物であるNOとの複合体の結晶構造では、NOのN原子とO原子のどちらもT2Cuに配位したサイドオン型構造が観察されたが<sup>9,10)</sup>、溶液中での

分光学的データや計算化学的データ、モデル錯体の構造はどれも、N原子のみが銅に配位したエンドオン型が中間体であることを強く示唆している<sup>11)</sup>。

多くの結晶構造が決定されているにもかかわらず、なぜ反応機構が完全には解明されていないのだろうか。それにはやはりX線光還元が関わっている。回折データ収集時にCuNIR中の銅サイトでX線光還元が起こることは、顕微分光の結果が示しており<sup>15)</sup>、基質結合型の結晶から回折データを集めている最中にNO<sub>2</sub><sup>-</sup>がNOや副生成物の水分子に変換され、活性中心周りの電子密度の解釈が困難になることもわかっている<sup>15)</sup>。当然、NO結合型構造でも同じ問題があるだろう。したがって、これまでのシンクロトロン結晶構造解析(Synchrotron Radiation Crystallography: SRX)の結果は、酵素本来のすがたを反映しているとは言い難く、それらを基に反応機構を議論することは難しいのである。

## 2. 連続フェムト秒結晶構造解析(SFX)がとらえた無損傷構造

### 2.1 SFXが変えるタンパク質結晶学

X線自由電子レーザー(X-ray Free Electron Laser: XFEL)の登場によって、状況は一変した<sup>16)</sup>。1枚の回折パターン像を得るのに、通常、秒オーダーでX線を照射しなければならないSRXでは、データ収集時間が、化学反応による原子の再配置が起こるよりも有意に長い。強力なシンクロトロンX線の照射によってタンパク質内部の化学結合は容易に開裂したり結合長が変化したりするので、SRXで得られるのは“X線損傷を受けた”構造である。いっぽうXFELが生み出す超高輝度かつフェムト秒オーダーの極短パルスX線を用いれば、原子の再配置が起こる前の、すなわち“無損傷状態”の情報を記録することができる。もちろん、金属中心の還元ともなう構造変化前

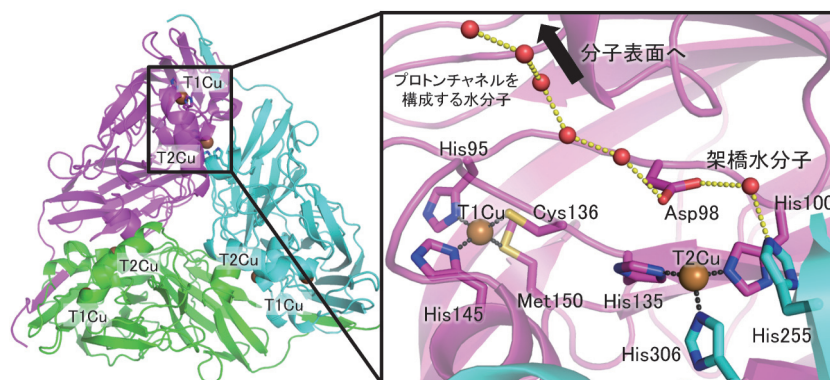


Fig. 1 (Color online) Structural overview of CuNIR (PDB code ID 1AS7, ref 9). The ribbon model of the overall structure is shown on the left side, and the structures around copper atoms (brown spheres) are shown by the stick model on the right side. Water molecules (red spheres) aligned from the catalytic site to the molecular surface are thought to be a proton channel<sup>15)</sup>. Dashed yellow and black lines show hydrogen bonds and coordination bonds, respectively.

の原子の位置情報も得られるから、金属タンパク質の結晶構造解析に新たな道が開かれたことを意味する。既に、クライオルーブに固定した大型結晶を回転させながらXFELビームを十分離れた間隔で多数照射しデータを収集する連続フェムト秒回転結晶構造解析 (Serial Femtosecond Rotational Crystallography: SF-ROX) を用いて、シトクロム *c* 酸化酵素<sup>17)</sup> や光合成系 II<sup>18)</sup> といった金属タンパク質の無損傷構造解析がおこなわれており、XFEL結晶学の威力が示されてきた。XFELビームを用いた他の結晶学的手法としては、多数の微結晶へ連続的にビームを照射してデータを収集する連続フェムト秒結晶構造解析 (Serial Femtosecond Crystallography: SFX) がある<sup>16)</sup>。これは、大きな結晶の作製が困難な膜タンパク質に応用でき<sup>19)</sup>、時分割測定にも適した手法として期待されているのだが<sup>20,21)</sup>、SFXのもうひとつの利点として、常温で測定ができる、ということが挙げられる。SRXでは、X線損傷を低減するために結晶を液体窒素などで凍結させ、100 K程度の極低温で測定をおこなうのが一般的である。しかし、結晶を凍結させる際に、アミノ酸残基の立体配座<sup>22)</sup> や酵素基質複合体における結合様式<sup>23)</sup> が室温での構造から著しく変化する例が報告されている。こうした人工的な構造変化は、誤った反応機構の提唱につながりかねないため<sup>22)</sup>、近年では室温以上の温度での測定がさかんにおこなわれているが、当然ながら放射線損傷が激しく、解析可能なデータを取得するのにいくつもの結晶が必要なことも多い。SFXを使えば、これらの問題を気にすることなく、室温でデータ測定がおこなえるのである。

## 2.2 銅中心の酸化還元状態の変化にともなうプロトン移動機構の解明

われわれは日本のXFEL施設であるSACLAにおいて、2~10フェムト秒のパルスX線を用い、脱窒菌 *A. faecalis* 由来のCuNIRの構造決定をおこなった<sup>24)</sup>。得られた2.0 Å分解能のSFX構造と、SRXによって決定した1.2 Å分解能の構造を比較すると、保存された活性残基であるHis255の構造の違いが明らかになった。つまり、His255のイミダゾール環周りの $2mF_o - DF_c$ マップと呼ばれる電子密度マップが示すように、X線光還元の影響を受けたSRX構造では、SFX構造に比べ、His255のイミダゾール環が20度ほど回転していた (Fig. 2)。なお、 $F_o$ と $F_c$ はそれぞれ、実験データから直接得られた構造因子とモデル構造から計算された構造因子を意味し、 $m$ と $D$ は重みづけのための係数である。観測値 $|F_o|$ ではなく、 $2m|F_o| - D|F_c|$ を係数としてフーリエ合成による電子密度の計算をおこなうと、 $F_c$ の計算に使われた構造モデルには含まれていない (が、実際にはモデルに含まれねばならない) 原子周りの電子密度がよりはっきりとあらわれるため、X線結晶構造解析では $2mF_o - DF_c$ マップに基づいて構造モデルを構築していく。

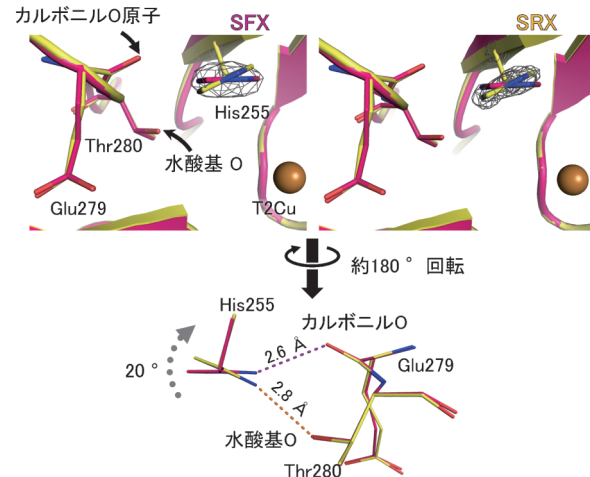


Fig. 2 (Color online) Structural change of His255. Carbon atoms in the SFX structure and the SRX structures are colored magenta and yellow, respectively. Gray meshes are  $2mF_o - DF_c$  maps around His255 at  $3.0 \sigma$  (left: SFX; right: SRX). The lower figure shows switching of hydrogen bonds (dashed lines).

さて、His255のN<sup>δ</sup>原子上のH原子は、銅中心の還元にともない、水素結合の相手を279番目のグルタミン酸 (Glu279) の主鎖カルボニルO原子から280番目のスレオニン (Thr280) の側鎖水酸基O原子へと変えることがわかったわけであるが、この水素結合の組み換えに関わるGlu279 (種によってはグルタミン (Gln) の場合もある) とThr280 (種によってはセリン (Ser) の場合もある) の組は、これまで知られている全てのCuNIRに保存されているだけでなく、*A. faecalis* から系統的に隔たった好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* 由来のCuNIRを用いたSFX構造とSRX構造の比較でも同じようなHisの構造変化を観測できたため<sup>25)</sup>、これはCuNIRに普遍的な現象だと思われる。実のところ、T2Cuが還元されることでHis255が構造変化するという仮説は、電気化学的なデータに基づいて、1999年に大阪大学のグループが提唱していたのだが<sup>14)</sup>、SRXを用いたこれまでの構造解析ではHis255の有意な構造変化が検出されなかったため、長らく顧みられることがなかった。今回の結果は、この仮説を支持するものである。

His255のイミダゾール環の回転が亜硝酸還元反応に重要であることを確かめるため、Thr280をバリン (Val) またはSerに変異させたT280V変異体とT280S変異体を作製した。T280V変異体では、His255が回転して水素結合を組み替えることができない。いっぽうT280S変異体では水素結合のスイッチングはおこなえるものの、Serの水酸基はThrの水酸基よりも可動性が高いため、必ずしも水素結合の受け手になるとは限らない。天然のCuNIRでもThrのかわりにSerを有しているものが存在するが、その結晶構造を見ると、SerがHisと水素結合できな

い構造を取りうるということがわかる<sup>26)</sup>。変異体を用いた亜硝酸還元活性測定の結果、T280V 変異体では野生型の20%、T280S 変異体では野生型の29%の活性しかないことが明らかになり、やはり His255 のイミダゾール環の回転が活性に寄与していることが支持された。

銅中心の還元による His255 のイミダゾール環の回転は、なぜ重要なのだろうか。われわれは、「His255 は銅の還元反応にともなうプロトン移動のスイッチである」という説を新たに提唱したい。カルボニル O 原子に比べると、水酸基 O 原子の電気陰性度は小さいため、銅中心の還元に伴う水素結合相手の交換後、H 原子は N<sup>ε</sup> 原子により引きつけられることになるだろう。そのため、反対に His255 の N<sup>δ</sup> 原子上の H 原子は、His255 と Asp98 の間に存在する架橋水分子へと受け渡されることになり、His255 からのプロトンの放出が促進されるのである (Fig. 3)。そして架橋水分子 (あるいはさらに Asp98) を介して NO<sub>2</sub><sup>-</sup> にプロトンが供給されると考えられる。架橋水分子を介した His255 からのプロトン移動が、近年の密度汎関数法を用いた計算<sup>27,28)</sup>でも支持されているのは興味深い事実である。

### 2.3 亜硝酸イオンは完全酸化型の T2Cu には直立型で配位する

次にわれわれは、CuNIR と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> との複合体の SFX をおこなった。与えられたビームタイムに限りがあり、満足できるデータ収集ができなかった休止状態構造の時とは異なり、複合体構造については十分な量のデータを得られたため、東京大学の中根崇智氏が Cu 原子の異常散乱を利用した単波長異常散乱法 (Single wavelength Anomalous Diffraction: SAD) での位相決定を試みた。今回の CuNIR の結晶は空間群 P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> に属し、結晶学的非対称単位中に 3 量体をひとつ、すなわち銅結合部位を 6 つ有するが、その全ての銅部位が特定され、さらに、全 1026 残基中、838 残基について自動トレースによってポリアラニンモデルが構築できた。これは、SFX で得られたデータを用いた、天然の重原子結合サイトによる SAD での位相決定の最初の例となった。

解析を進めると、T2Cu の上に、おにぎり形の電子密度

が存在することがわかった (Fig. 4a)。さまざまなモデルを検討した結果、占有率 100% の亜硝酸分子をひとつ配置したモデルを用いた場合に  $mF_o - DF_c$  マップと呼ばれる電子密度マップ中の差電子密度が最も少なくなった。 $m|F_o - |D|F_c|$  を係数としてフーリエ合成による電子密度の計算をおこなうと、あるべきモデルがない位置に正の電子密度が、モデルがあるべきでない (が、モデルの置かれている) 位置に負の電子密度が観測される。したがって、差電子密度が最も少ないということは、亜硝酸分子をひとつ配置するモデルが最も妥当だということを示唆しており、われわれは無損傷の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 複合体構造が得られたと判断した。最終的に 1.6 Å 分解能という、配位子の幾何構造を議論するのに十分な高分解能での構造が得られ、この SFX 構造と、われわれが新しく決定した高分解能 (1.3 Å) の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 複合体 SRX 構造 (Fig. 4b) を比較すると、基質の配位構造に違いが見られた。すなわち、SFX 構造では直立型 (vertical mode) で配位していた NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が、SRX 構造では準サイドオン型 (near side-on mode) をとっていた (Fig. 4c)。なお、Fig. 4a と 4b では、亜硝酸の電子密度をはっきりと示すために、亜硝酸分子を除いた構造を用いて計算した  $mF_o - DF_c$  マップを示している。亜硝酸の電子密度が、正の電子密度として  $mF_o - DF_c$  マップに現れている。

上にも述べたが、SRX の低温データ測定では結晶の温度を急激に下げるときに基質の結合状態が変化することがありうる<sup>23)</sup>。そこで念のため、室温でも SRX 構造を決定したが、やはり NO<sub>2</sub><sup>-</sup> は準サイドオン型に近い配位様式を呈していた。また、過去に決定されていた NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 複合体 SRX 構造は全て、準サイドオン型の配位様式であった。このことからわれわれは、銅中心の還元が続いて、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の配位様式が変化するのだと考えた。

では、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が倒れこむように構造変化することでなにが起こるのだろうか。まず、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と T2Cu の軌道の重なりかたが変化し、N-O 結合の開裂を引き起こすのだと考えられる。また、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が構造変化すると His255 に近接するため、イミダゾール環を回転させた構造のほうが、His255 の立体障害は少なくなるだろう。すなわち、既に述べた銅中心の還元にもなう His255 の回転が有利にな

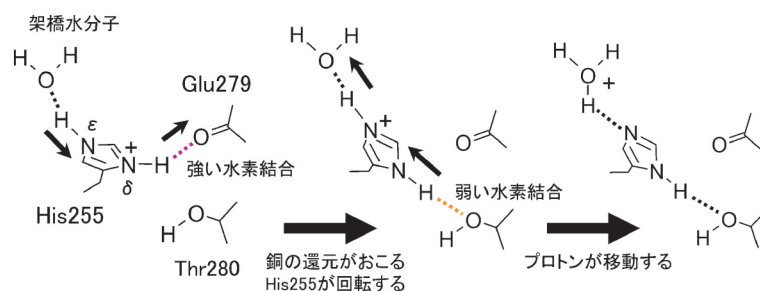
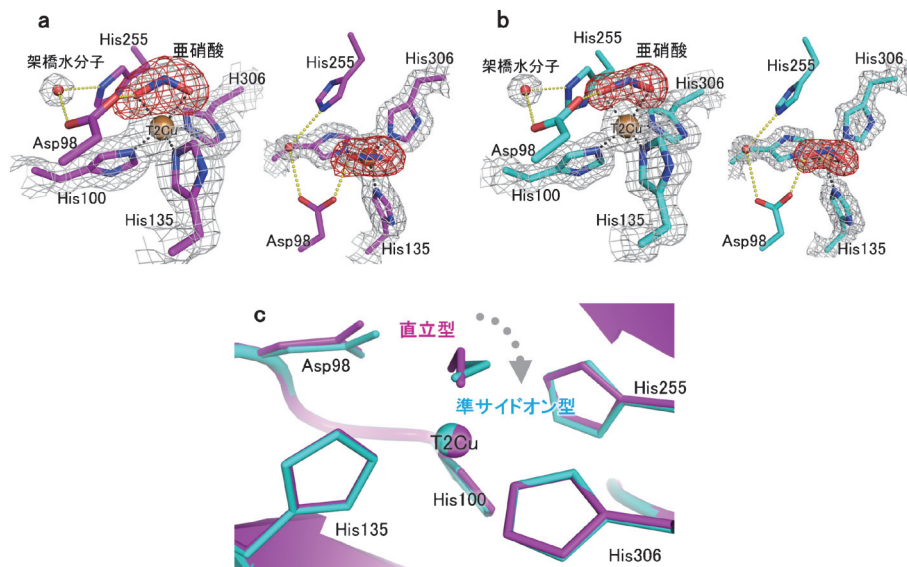


Fig. 3 (Color online) Proposed mechanism of efficient proton transfer driven by His255. Dashed lines represent H-bonds. Thin black arrows illustrate the directions to which H atoms are attracted.



**Fig. 4** (Color online)  $\text{NO}_2^-$  binding modes. (a) Nitrite in the SFX structure. The sigma-A-weighted  $2mF_o - DF_c$  (1.0  $\sigma$ ) and omit  $mF_o - DF_c$  (4.5  $\sigma$ ) maps are shown as gray and red meshes, respectively. H-bonds (yellow) and coordination bonds (black) are represented by dashed lines. Carbon, nitrogen, oxygen and Cu atoms are colored cyan, blue, red and brown. (b) Nitrite in the SRX structure (monomer A).  $2mF_o - DF_c$  (1.5  $\sigma$ ) and omit  $mF_o - DF_c$  (6.5  $\sigma$ ) maps are shown as gray and red meshes, respectively. H-bonds and coordination bonds are represented as in a). Carbon, nitrogen, oxygen and Cu atoms are colored magenta, blue, red and brown. (c) Comparison between the SFX (magenta) and SRX structures.

るということであり、これは、 $\text{NO}_2^-$  が T2Cu に配位したときに分子内電子移動が促進される事実と無関係ではない、とわれわれは考えている。

#### 2.4 Asp98はダイナミックな構造変化をするか？

Samar Hasnain らのグループは、T2Cu 上部に存在する Asp98 が大きく異なる2つの立体配座——近位構造 (Proximal conformation: P 構造) と門番構造 (Gatekeeper conformation: G 構造)——を取り、特に基質が結合したときに G 構造の割合が増えることを、CuNIR の原子分解能構造を決定することで明らかにし<sup>10)</sup>、Asp98 の構造変化は活性に寄与しているという説を提唱してきた。ところが、そのような劇的な構造変化は CuNIR の多くの結晶構造では見られないばかりか、ある種の CuNIR では立体障害的に G 構造を取ることがそもそも不可能ですらある<sup>29)</sup>。Hasnain らの結晶構造でも G 構造は周辺残基と 3 Å 以内の近さにあり、かなり無理のある構造のように思える。今回われわれは、SFX を用いて常温での無損傷構造を決定したわけだが、 $\sigma$  レベルを 0.2 まで下げた  $2mF_o - DF_c$  マップでも、G 構造の電子密度は観察されなかった。したがって、G 構造は X 線損傷や結晶凍結などの人為的操作が生みだしたものの可能性がある。もちろん、酵素反応中に Asp98 が全く動かない、とはわれわれも考えておらず、効率的な触媒作用のためにある程度の動きはあるのだろう。彼らは最新の報告でわれわれの論文を引用してはいるものの<sup>30)</sup>、われわれのデータへの言及はない。

### 3. おわりに これからの課題

今回われわれは、SFX という新たな手法を利用して無損傷構造を決定することで、より詳細な酵素反応機構に迫りうることを示した。今後、時分割 SFX をおこなうことができれば、CuNIR 中での亜硝酸還元反応の全過程を追うことが可能になるかもしれない。生成物である NO の配位構造がサイドオン型なのかエンドオン型なのかについては依然議論が絶えないが、時分割 SFX が答えを与えてくれる可能性はおおいにある。

ところで、金属原子の電子構造は XFEL ビーム照射後数フェムト秒以内に变化するとされており<sup>31)</sup>、タンパク質中の鉄硫黄クラスターについて、照射から数10フェムト秒以内に構造変化の起こる事例が示されている<sup>32)</sup>。また、シミュレーションによれば、XFEL ビーム照射が引き起こすクーロン爆発によって、タンパク質分子内の原子の位置は10フェムト秒程度でも変化する<sup>33)</sup>。したがって、SFX 構造が真に無損傷構造であるかどうかは、今後さらに詳しく検討されねばならないだろう。今一つの問題は、われわれの研究を含め、XFEL を用いたタンパク質結晶学は今のところ、生化学的・分光学的データをもとに予測されたモデルとの辻褄あわせに努めていることである。たしかに、これまで提唱されてきたモデルを構造解析によって可視化し、実証することには重要な意味がある。しかし、XFEL の特性を活かして全く未知の現象を発見できたときこそ、本当に新しい研究の幕開けといえるのではないだ

ろうか。われわれはこの可能性の開拓に向け、日夜研究に勤しんでいるところである。

## 謝辞

本研究は、元大阪大学工学研究科修士課程学生 Tse Ka Man 氏、東京大学の中根崇智氏、井上茂之博士、瀧木理教授、大阪大学蛋白質研究所の鈴木守准教授、理化学研究所の平田邦生博士、菅原道泰博士、南後恵理子博士、岩田想教授、矢橋牧名博士、京都大学の中津亨准教授、榊田哲哉助教、高エネルギー加速器研究機構の湯本史明特任准教授、松垣直宏准教授、浦項工科大学校の Changyong Song 准教授、高輝度光科学研究センターの登野健介博士、城地保昌博士、亀島敬博士、初井宇記博士、University of Konstanz の Kay Diederichs 教授、University of British Columbia の Michael E. P. Murphy 教授との共同研究である。この場を借りてお礼を申し上げる。SFX のデータ収集は SACLA BL3 (課題番号: 2013B8045, 2014B8050, 2015A8026, 2015A8048, 2015A8049 and 2015B8047) で、SRX データの収集は SPring-8 BL26B1/B2, BL38B1, BL32XU および BL44XU にておこなった。これらのビームラインに関わる全てのスタッフとエンジニアの皆様感謝申し上げます。CuNIR の活性測定は University of British Columbia の Angele Arrieta 氏にお世話になった。また、本研究は、文部科学省 X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題「創薬ターゲット蛋白質の迅速構造解析法の開発」および JSPS 科研費 15K18487 の支援を受けて実施した。計算解析は SACLA に併設された HPC システムおよびミニニクススーパーコンピュータシステムを利用して実行した。

## 参考文献

- 1) J. Diamond: *Guns, Germs, and Steel: the Fates of Human Societies*, (W.W. Norton, 1997).
- 2) J. Yano, J. Kern, K. D. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zoumi and V. K. Yachandra: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12047 (2005).
- 3) I. Schlichting, J. Berendzen, K. Chu, A. M. Stock, S. A. Maves, D. E. Benson, R. M. Sweet, D. Ringe, G. A. Petsko and S. G. Sligar: *Science* **287**, 1615 (2000).
- 4) N. Gruber and J. N. Galloway: *Nature* **451**, 293 (2008).
- 5) J. Godden, S. Turley, D. Teller, E. Adman, M. Liu, W. Payne and J. LeGall: *Science* **253**, 438 (1991).
- 6) M. J. Boulanger, M. Kukimoto, M. Nishiyama, S. Horinouchi and M. E. Murphy: *J. Biol. Chem.* **275**, 23957 (2000).
- 7) K. Kataoka, H. Furusawa, K. Takagi, K. Yamaguchi and S. Suzuki: *J. Biochem.* **127**, 345 (2000).
- 8) H. Iwasaki, S. Shidara, H. Suzuki and T. Mori: *J. Biochem.* **53**, 299 (1963).
- 9) E.I. Tocheva, F.I. Rosell, A.G. Mauk and M.E. Murphy: *Science* **304**, 867 (2004).
- 10) S. V. Antonyuk, R. W. Strange, G. Sawers, R. R. Eady and S. S. Hasnain: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12041 (2005).
- 11) A. C. Merkle and N. Lehnert: *Dalton Trans* **41**, 3355 (2012).
- 12) S. Brenner, D. J. Heyes, S. Hay, M. A. Hough, R. R. Eady, S. S. Hasnain and N. S. Scrutton: *J. Biol. Chem.* **284**, 25973 (2009).
- 13) N. G. Leferink, C. Han, S. V. Antonyuk, D. J. Heyes, S. E. Rigby, M. A. Hough, R. R. Eady, N. S. Scrutton and S. S. Hasnain: *Biochemistry* **50**, 4121 (2011).
- 14) K. Kobayashi, S. Tagawa, Deligeer and S. Suzuki: *J. Biochem.* **126**, 408 (1999).
- 15) M. A. Hough, S. V. Antonyuk, R. W. Strange, R. R. Eady and S. S. Hasnain: *J. Mol. Biol.* **378**, 353 (2008).
- 16) H. N. Chapman, P. Fromme, A. Barty, T. A. White, R. A. Kirian and A. Aquila *et al.*: *Nature* **470**, 73 (2011).
- 17) K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato and M. Hatanaka *et al.*: *Nat. Methods* **11**, 734 (2014).
- 18) M. Suga, F. Akita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami and Y. Nakajima *et al.*: *Nature* **517**, 99 (2015).
- 19) W. Liu, D. Wacker, C. Gati, G. W. Han, D. James and D. Wang *et al.*: *Science* **342**, 1521 (2013).
- 20) C. Kupitz, S. Basu, I. Grotjohann, R. Fromme, N. A. Zatsepin and K. N. Rendek *et al.*: *Nature* **513**, 261 (2014).
- 21) J. Tenboer, S. Basu, N. Zatsepin, K. Pande, D. Milathianaki and M. Frank *et al.*: *Science* **346**, 1242 (2014).
- 22) J. S. Fraser, M. W. Clarkson, S. C. Degnan, R. Erion, D. Kern and T. Alber: *Nature* **462**, 669 (2009).
- 23) D. A. Keedy, H. van den Bedem, D. A. Sivak, G. A. Petsko, D. Ringe, M. A. Wilson and J. S. Fraser: *Structure* **22**, 899 (2014).
- 24) Y. Fukuda, K. M. Tse, T. Nakane, T. Nakatsu, M. Suzuki and M. Sugahara *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 2928 (2016).
- 25) Y. Fukuda, K. M. Tse, M. Suzuki, K. Diederichs, K. Hirata and T. Nakane *et al.*: *J. Biochem.* **195**, 527 (2016).
- 26) T. J. Lawton, K. E. Bowen, L. A. Sayavedra-Soto, D. J. Arp and A. C. Rosenzweig: *J. Biol. Chem.* **288**, 25575 (2013).
- 27) Y. Li, M. Hodak and J. Bernholc: *Biochemistry* **54**, 1233 (2015).
- 28) M. Lintuluoto and J. M. Lintuluoto: *Biochemistry* **55**, 4697 (2016).
- 29) Y. Fukuda, K. M. Tse, M. Lintuluoto, Y. Fukunishi, E. Mizohata, H. Matsumura, H. Takami, M. Nojiri and T. Inoue: *J. Biochem.* **155**, 123 (2014).
- 30) S. Horrell, S. V. Antonyuk, R. R. Eady, S. S. Hasnain, M. A. Hough and R. W. Strange: *IUCrJ* **3**, 271 (2016).
- 31) S. K. Son, H. N. Chapman and R. Santra: *Phys. Rev. Lett.* **107**, 218102 (2011).
- 32) K. Nass, L. Foucar, T. R. Barends, E. Hartmann, S. Botha and R. L. Shoeman *et al.*: *J. Synch. Rad.* **22**, 225 (2015).
- 33) R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert and J. Hajdu: *Nature* **406**, 752 (2000).

著者紹介

**福田庸太**

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻  
助教

E-mail: y\_fukuda@chem.eng.osaka-u.  
ac.jp

専門：生物無機化学

**【略歴】**

2014年3月大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了。博士（工学）。2014年4月コロンビア大学ポスドクトラルフェロー。2016年4月より現職。



**井上 豪**

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻  
教授

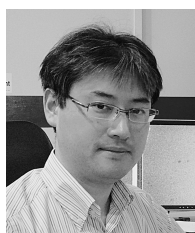
E-mail: inouet@chem.eng.osaka-u.ac.jp

専門：構造生物化学

**【略歴】**

1994年3月大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了。博士（工学）。

1994年同工学部助手，1999年同工学部講師，2002年同工学研究科准教授，2008年より現職。2001-2004 科学技術振興機構さきがけ研究員兼務。



**溝端栄一**

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻  
講師

E-mail: mizohata@chem.eng.osaka-u.  
ac.jp

専門：構造生物学，シリアルフェムト秒結  
晶学

**【略歴】**

2003年3月 大阪大学大学院工学研究科物質化学専攻博士後期課程修了。博士（工学）。

2003年4月 理化学研究所横浜研究所リサーチアソシエイト。

2005年11月 インペリアル・カレッジ・ロンドン客員研究員。

2006年9月 ERATO 岩田ヒト膜受容体プロジェクト英国サイト研究員（兼務）。

2007年7月 ダイヤモンド・ライト・ソース協力研究員（兼務）。

2009年4月 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻助教。

2015年4月より現職。

---

# Serial femtosecond crystallography revises reaction mechanism of copper-containing nitrite reductase

**Yohta FUKUDA** Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

**Tsuyoshi INOUE** Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

**Eiichi MIZOHATA** Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

---

**Abstract** We have studied copper-containing nitrite reductase (CuNIR), which catalyzes one electron reduction of nitrite to nitric oxide, using structural biological techniques; however, copper centers in the enzyme are rapidly reduced by synchrotron X-ray irradiation and easily change their structures. To determine CuNIR structures in resting and substrate-binding states before reduction of copper centers, serial femtosecond crystallography with X-ray free electron lasers was utilized. Not only was a detailed model of redox-coupled proton transfer proposed based on new structures, but insight into a structural change of nitrite in the enzymatic reaction was obtained.