

X線自由電子レーザーで捉えたバクテリオロドプシン構造変化の三次元動画

南後恵理子

理化学研究所放射光科学総合研究センター 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

久保 稔

理化学研究所放射光科学総合研究センター 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

岩田 想

京都大学大学院医学研究科 〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

要旨

タンパク質はその機能を発現する際に三次構造を変えるとされ、“動いている”状態の詳細に興味を持たれてきた。しかし、タンパク質の動きを原子レベルまで解明できる汎用的な手法はなく、タンパク質動的構造解析の新たな手法の確立が期待されていた。今世紀に入って実用化されたX線自由電子レーザー(XFEL)は、非常に強力なX線パルスによって放射線損傷が顕在化するより短い時間(<10 fsec)で回折現象が完結するため、化学変化など物質の極めて速い動きを原子分解能で捉えることが可能な技術である。我々は、XFELを用いたタンパク質結晶構造解析の技術開発に取り組み、タンパク質が機能を発現して動いている段階の構造を捉えるための時間分割実験を行った。照射によってプロトン移動を起こす膜タンパク質であるバクテリオロドプシンを用いて測定を行ったところ、ナノ秒からミリ秒にかけて13点の時間で測定に成功し、プロトン移動における一連の構造変化を動画のように捉えることができた。

1. はじめに

タンパク質の三次構造はその機能と密接に関与することから、機構解明や医薬などの設計などを目的として、多くのタンパク質について三次構造解析が行われている。X線結晶構造解析は、原子分解能での構造情報が得られるため、重要なタンパク質構造解析方法として用いられてきた。今までに10万件以上ものタンパク質構造がX線結晶構造解析によって解明され、protein data bankに登録されている。その一方で、従来のX線結晶構造解析では基本的にタンパク質が働く前か後の“止まった形”を測定しており、“動いている”途中を観測することは非常に困難であった。

一般的に、タンパク質が“働く”際には、三次構造の変化が起こるとされ、機能する前もしくは後の構造とは異なると考えられている。例えば、細胞膜に存在する物質の運搬を担う輸送タンパク質は、イオンなどを細胞外から取り込み、細胞内へと運ぶ際、図のように構造変化を起こす(交互アクセスモデル)と推測されている(Fig. 1)。現在は、“静止”状態の三次構造を基に薬剤など設計を試みたり、どのような機構でその機能を発現するのか推測を行ったりしているが、生体内で重要な役割をしているタンパク質の機能する瞬間を原子レベルで捉えることが可能となると、タンパク質と特異的に作用する分子の結合の様子や

その詳細が明らかとなる。今までに、タンパク質の“動く”状態を捉えるために、白色X線を用いたラウエ法や極低温で中間体を捕捉するクライオトラップ法が検討されてきた。しかし、前者は技術的な困難さがあり、後者は極低温下でも反応が進行する可能性がある。このように、“動的”な構造を原子分解能で決定することは、X線結晶学において長い間試行錯誤されてきた課題であった。これが実現化されると構造生物学のパラダイムの転換とも言うべき進歩と言えよう。

さて、今世紀に入り新たな放射光源であるX線自由電

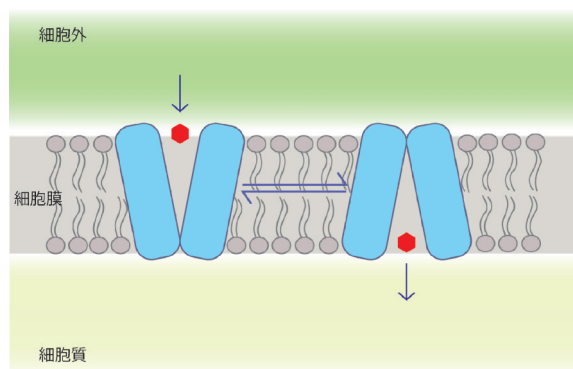


Fig. 1 (Color online) Alternative access model for transporters in membrane.

子レーザー (XFEL) が実用化され、最初に米国の LCLS (Linac Coherent Light Source) で2009年より供用開始となり、続いて日本の SACLA (SPring-8 Angstrom Compact free electron LAser) においては2012年より供用開始となった。XFELの非常に強力なフェムト秒のX線レーザーパルスにより、試料が崩壊して放射線損傷が顕在化する前に回折像を取得すること¹⁾が可能となった。また、その極めて短いX線パルスにより、素早く起きる構造変化を捉えることができることから、タンパク質が動いている姿を原子レベルで捉える手段としても期待されている。

XFELを用いたタンパク質結晶構造解析方法としては、シリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX) が挙げられる (Fig. 2)。これは、微結晶をXFELの照射領域に連続的に送って測定する方法で、XFELによって試料が損傷を受けるために新しい試料を次々に供給して、多数の微

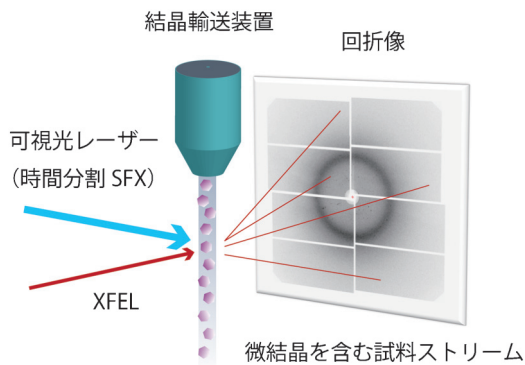


Fig. 2 (Color online) Outline of serial femtosecond crystallography.

結晶からの回折像を記録する。最初の SFX 実験は2009年 LCLSで行われ²⁾、2013年には、光で励起されるタンパク質 (光化学系 II) を用いたポンププローブ型の時間分割 SFX 実験が報告された³⁾。この実験では、空間分解能5.9 Å といった低い分解能での構造決定であったが、その後2014年から2016年にかけて、同様の方法を用いて、photoactive yellow protein (分解能1.6 Å)⁴⁾やミオグロビン (分解能1.8 Å)⁵⁾の時間分割 SFX 実験が LCLSで行なわれ、詳細な構造変化を捉えることに成功している。

SACLA においては、理化学研究所を代表機関とする 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」(代表 岩田想) が採択され、2012年より SFX 法の技術及び装置開発を行ってきた。我々は測定装置の開発⁶⁾や高粘度媒体を用いた結晶送液方法の技術開発⁷⁾などにより SFX の基盤を構築し、2014年からは光によってプロトン移動を行う膜タンパク質であるバクテリオロドプシン (bR) をモデルとして、汎用的な時間分割 SFX 実験装置及び技術開発に取り組んできた。昨年度には、bR が光で励起された後ナノ秒からミリ秒にかけて、構造を変化させながらプロトン移動を行う様子を動画のように捉える実験に成功するに至った (Fig. 3)⁸⁾。

bR は、高度好塩菌の膜に存在する光駆動型プロトンポンプであり、光により細胞質のプロトンを細胞外へと能動的に輸送する。それによりプロトン濃度差が生じ、高度好塩菌は生体エネルギー分子であるアデノシン三リン酸 (ATP) の合成を行っている。bR は様々な研究グループによって長年研究が行われてきたタンパク質で、15年程前にはクライオトラップ法による光中間体構造解析が盛ん

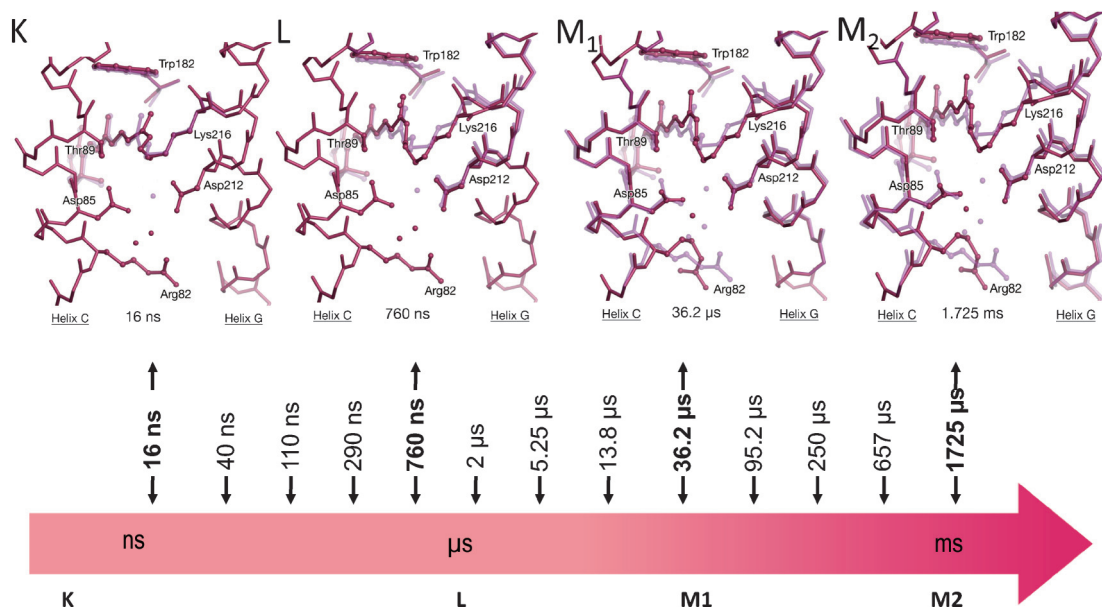


Fig. 3 (Color online) Time-resolved SFX data collection from bR crystals at thirteen time-points from nanoseconds to milliseconds following photo-activation.

に行われた⁹⁾。しかし、放射線損傷を受けやすいこと、極低温では真の中間体構造を捉えるのが難しかったことなどから、反応機構などの議論の終結に至っていなかった。我々は、今回の実験によりプロトン移動の際に起こる一連の構造変化を原子分解能で捉えることができ、bR がどのようにしてプロトンを同一方向に移動させるのか、その巧妙な仕組みの解明に重要な貢献をもたらした。また、本成果のようなナノ秒からミリ秒という長いタイムスケールで、水分子の移動や広い範囲に渡ったタンパク質構造の変化を明らかにした例は今までになく、世界に先駆けて捉えた“タンパク質三次元動画”となった。

2. シリアルフェムト秒結晶構造解析とは

2.1 概要

従来のタンパク質 X 線結晶構造解析では、1つの結晶を固定して、少しずつ回転させながら X 線を照射することによって回折像を得るといった振動写真法が主に用いられてきた。また、X 線による放射線損傷を防ぐために結晶を急速凍結し、極低温で測定するのが一般的である。一方、SFX では、XFEL の非常に強力な X 線レーザーパルスで結晶が照射後に崩壊することから、多数の微結晶 (1~30 μm 程度の大きさ) を結晶化溶液などの溶液と混合した状態で結晶輸送装置 (インジェクター) より流して、異なる配向の多数の微結晶からの回折像を収集する¹⁰⁾。この方法の利点は、1: 試料の放射線損傷が顕在化する前の構造情報が得られる、2: 凍結せずに室温下で測定を行うため、生体内の条件に近い常温構造が得られる、3: 極短 X 線パルス (SACLA では 10 フェムト秒より短い X 線パルス) を用いるため、シンクロトロンバンチ幅よりも短いフェムト秒~ピコ秒といった高い時間分解能が得られる、4: 強力な X 線レーザーのため微結晶 (10 μm 前後) で実験を行うことが可能、などが挙げられる。時間分割実験の観点からは、SFX では微結晶を使うために、反応を開始する際、結晶内の分子を一斉に反応させることが容易であるなどの利点がある。また、光で励起する場合は、大きな結晶に比べて光が透過しやすく、十分に励起しやすい。一般的に結晶内のタンパク質を 100% 励起させることは容易ではなく、励起状態と基底状態の複数構造が観測されることが多いことから、比較的励起させやすい小さな結晶で時間分割実験が行うことができるのは非常に有利である。

2.2 結晶輸送方法

SACLA では、最大 60 Hz で繰り返される XFEL パルスを試料に照射する。そのため、SFX では XFEL 照射領域に連続的に結晶を送ることで、高速で繰り返される X 線パルスに試料が当たるようにしている。SFX 実験用に最初に開発された液体ジェットインジェクターは、緩衝液に懸濁させた結晶を高流速 (流速 10~300 $\mu\text{l}/\text{min}$ 程度) で

吐出する。試料を節約するには流速を下げたいところだが、流速を下げると表面張力の影響で直線状のジェットを維持できず液滴状になってしまう。一方で、集光した XFEL ビーム (SACLA では約 1.5 $\mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$) を試料ストリームに照射して、微結晶と XFEL が“ヒット”するためには、ある程度結晶密度を高くする必要がある。我々は、概ね 10^7 から 10^8 個/mL の結晶密度で実験を行っており、この場合は 20% から 30% 程度の“ヒット”率である。この結晶密度はタンパク質の量としては 1 mL 当たり数 10 mg に相当し、SFX 実験では 1 つのデータセットを得るのに 30 分から 1 時間程度試料を流し続けて測定するために、この輸送方法では必要とされる試料量が非常に多い。

そこで我々は、bR の時間分割 SFX 実験において、試料消費量の低減のために lipidic cubic phase (LCP) を用いた結晶輸送方法を用いることにした。LCP は、モノオレインなどの脂質膜中で結晶化する方法であり、非常に高粘度な溶液の中で比較的小さい結晶が生成される傾向がある¹¹⁾。高粘度溶液を用いる利点は、低流速 (0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$) でも連続した試料ストリームを得ることができることで、結果的に必要試料量を少なくすることができる。液体ジェットインジェクターを用いた場合と比べると概ね千分の一程度まで試料消費量を減らすことができる。LCP 試料の結晶輸送装置としては、2014 年に Weierstall らによって LCP インジェクターが開発されており、これは細いシリンドラの先端に 50-100 μm の細いキャピラリーを、後方にプランジャーを取り付けて、HPLC の水圧によって高粘度の試料を押し出す仕組みとなっている¹²⁾。我々も、このタイプと同様の装置を用いて、bR の時間分割 SFX 実験を行った。

2.3 試料調製方法

LCP による結晶化方法は、液状のモノオレインとタンパク質溶液を混合して LCP を作成し、それをガラス板の上に分注した後に結晶化溶液を滴下し、ガラス板を被せて結晶を作成するのが一般的である。SFX では、LCP 法で作成した結晶を単離して使用するのではなく、脂質も輸送媒体として利用するため、この方式で結晶化すると測定試料の回収とインジェクターへの導入が困難である。SFX に適した LCP 結晶化方法としては、Liu らが報告したシリンジを使った方法が知られている¹³⁾。これは、結晶化溶液の入ったシリンジに、脂質とタンパク質から成る LCP を細い筒状で挿入して結晶化を行う方法で、100 μl のシリンジ一本当たり、5 μl 程度の LCP 結晶しか得られないため多くのシリンジを用意する必要がある。また、試料回収の際、溶液を含みやすく粘度が低下するため、溶解したモノオレインの添加も必要であるなど、試料を調製しにくい点があった。そこで我々は、30 μl ほどの筒状の LCP を作成し、崩れにくいように細い金属ワイヤーを挿入してから、結晶化溶液の入ったチューブに筒状の LCP

を浸漬する方法を開発した。この方法では、多くの器具を必要とせず、LCP結晶の回収も容易であったことから、多くのデータセットを測定する時間分割実験に適していた。

さて、SFX実験における成功の鍵は、如何に試料を一定流速で安定して流せるか、にある。決まったタイミングで励起のための可視光レーザーとXFELが試料ストリームに照射されるため、試料の流れが途中で止まったり、一定流速でなかったりすると損傷や複数回光照射を受けている結晶からの回折像が得られる恐れがある。LCP法で作成したbR結晶をそのままインジェクターから流すと、非常に柔らかいため真っ直ぐに流れず、ノズル付近で玉状になるという問題があった。粘度を上げるために、溶かしたモノオレインを少量加えてからインジェクターより流したが、今度は部分的に粘度のムラがあるためか、真っ直ぐに流れつつも流速は不安定であった。そこで、モノオレインだけでなく様々な添加剤を検討し、一定流速になるように試行錯誤した。しかし、流れが良くなったとしても一方では結晶の質が低下するなどの問題が起り、真っ直ぐに一定流速に流す、ということは意外に難しかった。最終的には少量のパラフィンオイルをLCP結晶に添加すると安定して真っ直ぐに流れ、結晶の質にも影響を与えないことを見出すことができた。

3. バクテリオロドプシン結晶の光反応サイクル

bRは、発色団としてレチナール分子を含んでおり、その構造は、細胞膜を7本のヘリックスによって貫通する形を成している (Fig. 4)。レチナールはリシン残基とシッフ塩基を形成し、レチナール部分が光を吸収すると、トランス体からシス体へと異性化し、プロトン移動を開始する (Fig. 4)。

時間分解SFXを行う前に、結晶パッキングのダイナミクスへの影響を調べるため、bR微結晶の時間分解可視分

光を行なった。溶液中におけるbRの光反応サイクルは、 $K \rightarrow L \rightarrow M \rightarrow N \rightarrow O$ 中間体を経てターンオーバーすることが知られている (Fig. 4)。それらの中間体は、可視波長域にレチナール由来の特徴的な吸収を示すため、時間分解可視分光は中間体の同定に有用である。ただし、微結晶の時分割分光はこれまでに例がないため、測定には自作の顕微装置を用いた。

得られた時間分解スペクトルを Fig. 5 に示す。図には各遅延時間のスペクトルから光反応前 (暗状態) のスペクトルを引いた差スペクトルを示してある。したがって、負の信号は暗状態のbR (λ_{\max} 570 nm) 由来である。Global fitting 解析の結果、時間分解スペクトルは次のように解釈できることがわかった。まず装置の時間分解能 (μs) よりも速く、L中間体 (λ_{\max} 550 nm) が生成する。2.5 μs のスペクトルの負の信号のピークが570 nm よりも長波長側にあるのは、L中間体の吸収のためである。次に

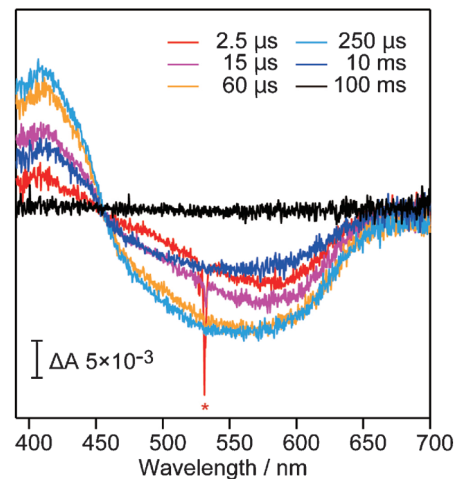


Fig. 5 (Color online) Time-resolved difference absorption spectra recorded from slurries of bR microcrystals. * represents stray light originating from the pump beam at 532 nm.

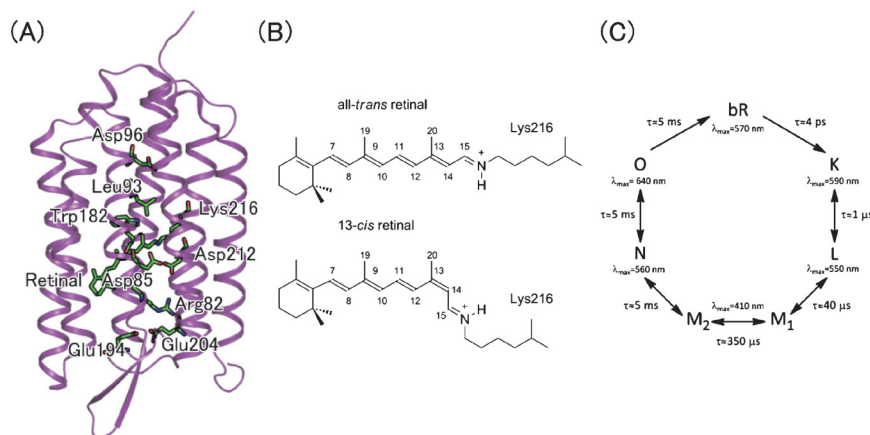


Fig. 4 (Color online) Bacteriorhodopsin. (A) Structure. (B) Photo-isomerization of the retinal. (C) Photocycle.

15(±7)μs の時定数で M 中間体 (λ_{\max} 410 nm) が生成する。410 nm の正の信号の増大は、M 中間体由来である。このとき同時に L 中間体が消失するため、負の信号の中心は短波長側にシフトしている。最後に 8(±3)ms の時定数で M 中間体が消失し、系は光反応前の bR に戻る。以上をまとめると、LCP 微結晶中の bR は、(K)→L→M 中間体を経てターンオーバーすることがわかった (装置の時間分解能の制限のため、我々は K 中間体の観測はしていない)。

結晶中で N, O 中間体が観測されなかった原因は、おそらく結晶コンタクトによりヘリックスの構造変化が制限を受け、それらの中間体が不安定化したためであろう (中間体の分解速度が生成速度を上回ると観測できない)。実際に結晶構造を見てみると、光サイクルの後半で大きく構造変化が起こるとされる E 及び F ヘリックスを繋ぐループが、隣接する分子の C 末端と接していた。bR ではこのように結晶相と溶液相とで遅いダイナミクスに相異が見られたが、レチナルから Asp85 へのプロトン移動は L→M 遷移で起こることがわかっている (M 中間体の吸収極大が 410 nm にまで大きく短波長シフトしているのは、レチナルの脱プロトン化に起因する)。そこで我々はこのプロトン移動機構の解明を目指し、時間分解 SFX において K, L, M 中間体の構造解析を試みた。

4. 時間分割 SFX 実験について

4.1 測定装置開発

SACLA では、SFX 実験のための測定装置として DAPHNIS (diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA) を用いている⁹⁾。この実験プラットフォームは、インジェクター取り付け部分を含むヘリウムチャンバー、試料やインジェクターノズルの位置確認のためのカメラ、検出器などから構成されており、各種インジェクターを取り付けることができるなど汎用的な設計となっている。しかし、時間分割 SFX 実験を行うにあたっては、光励起を行うための可視光レーザーを導入する必要があり、新たに測定装置を準備する必要があった。

まず、使用する可視光レーザーについては、532 nm のナノ秒パルスレーザーを用いることとした。これは、結晶分光から bR の構造変化を少なくともナノ秒〜ミリ秒まで追うことが予想されており、このような長いタイムスケールで様々な時点で測定するには、ナノ秒レーザーの方が調整や取り扱いが容易であったためである。この研究を始めた 2014 年頃は、LCLS 及び SACLA に設置されている可視光レーザーはフェムト秒レーザーでありこちらを使うのが一般的であったが、一般的にタンパク質の構造変化が起こる時間スケールはマイクロ秒以降であるため、汎用性も考慮してナノ秒レーザーの導入を決めた。また、bR 結晶の励起効率を上げるために、可視光レーザーは二方向

(すなわち結晶の表面と裏面) から照射できるように設計し、結晶中で起こるわずかな構造変化を捉えやすくする工夫も行った。

ところが、二方向励起を導入したために、ヘリウムチャンバーを設置することが非常に困難となった。従来、空気散乱によるバックグラウンドノイズを低下させるためにヘリウムチャンバーを使用してきたが、時間分割 SFX 実験では、インジェクター付近にはレーザーの焦点径を絞るための対物レンズやそれにつながる光ファイバーなどの光学素子が並び、これらを覆うようなチャンバーを置くと、今度はレーザー調整やインジェクターの試料交換が難しくなることが考えられた。そこで、チャンバーは設置せず、バックグラウンドノイズ低下のために試料付近までヘリウムパスを設置して対応した。インジェクターや各光学素子などはすべて XYZ ステージで調整できるようになっており、75 μm 径の細さで流れる試料と、1.5 μm 径の XFEL, 40 μm (半値全幅として) 径の可視光レーザーが空間的に高精度で重なり合うことを可能にした (Fig. 6)¹⁴⁾。

4.2 時間分割 SFX 実験

我々は、2014 年 4 月から結晶化、結晶分光、装置開発といった準備を進め、2015 年 1 月に最初の実験を SACLA で行った。bR の構造変化は、光照射後の構造と暗状態の構造との差フーリエ電子密度マップで高感度に捉えることができる。そこで光照射後の回折測定と暗状態での回折測定を交互に行なうことで (可視光レーザー 15 Hz, XFEL 30 Hz), 両測定条件をできるだけ同一にした (Fig. 7)。つまり、光照射を行ってから設定した遅延時間後に XFEL の照射を行い (light), 次に光照射なしで XFEL 照射 (dark) を行い、指数付け可能な回折像が 15000 枚得られるまで同じ遅延時間での測定を続けた。可視光レーザーの照射範囲は、試料ストリームの幅とほぼ同じ大きさに絞ってあるが、結晶を含む媒体 (脂質) がまるで光ファイバー

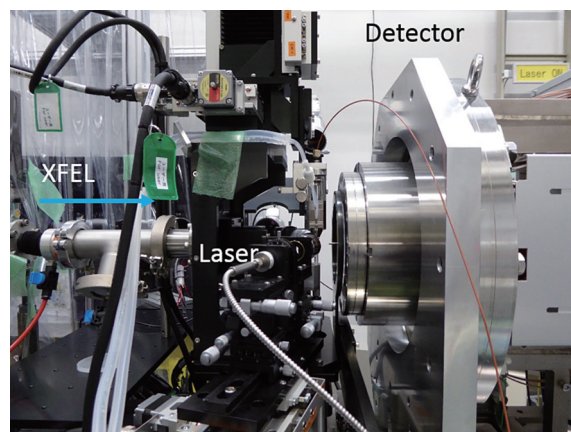


Fig. 6 (Color online) Set-up for the time-resolved SFX experiment.

のように光を試料ストリームの軸に沿って（上流方向に）散乱する傾向がある。そこで、交互に測定された暗状態の構造に励起光の散乱の影響がないかを、完全な暗状態の構造と比較することで確認した。その結果、流速を通常のSFX実験の10倍にあたる $2.5 \mu\text{L}/\text{min}$ にまで上げて測定する必要があることがわかった。

さて、SFX実験では、膨大な枚数の回折像からデータセットを構築している。SACLAで30 Hzのデータ測定を行うと、データレートは毎秒120 MBにも及び、その中には、結晶からの回折を含むヒット画像と結晶にXFELが当たらなかった外れ画像が混ざっているため、ヒット画像だけを選別して処理する必要がある。また、各回折像は別々の結晶に由来するため、数枚の回折像を見て分解能など結晶の質を判断することは困難であり、データセット全体における分布を考慮する必要がある。これらの情報をビームタイム中に迅速に得るために、SACLAでは2014年後期よりSACLA向けに修正されたCheetahによるデータ処理パイプラインを使用している¹⁵⁾。パイプラインは、オンライン系とオフライン系の二段階からなり、前者では検出器で取得された画像がほぼリアルタイムで解析され、ヒット率や飽和した回折点の数、空間分解能の見積もりが表示される。後者のオフライン系ではヒット画像だけを選別してHDF5形式のファイルに書き出し、CrystFELによって指数付けと積分を行っている。我々が行った時間分割実験では、励起レーザー照射の有無をフォトダイオードの出力によって分類する機能を新たに導入し、光照射と暗状態を交互に測定すると同時にこれらのデータの分類を可能とした。

このように様々な準備や検討を経て最初の実験を行った我々であったが、その時に調製された結晶は反射が出ないトラブルに見舞われ、実験続行が困難かと思われた。しかし、数ヶ月前に作成して保管しておいた結晶で良好な反射を示し、なんとか実験装置の検証を達成した。その後、時間分割SFX実験に適した試料調製、結晶導入方法の技術開発に取り組み、2015年7月にはナノ秒からミリ秒にかけての4つのタイムポイントでのデータ取得に成功し、最終的には三回目の実験である2016年2月に、光照射後

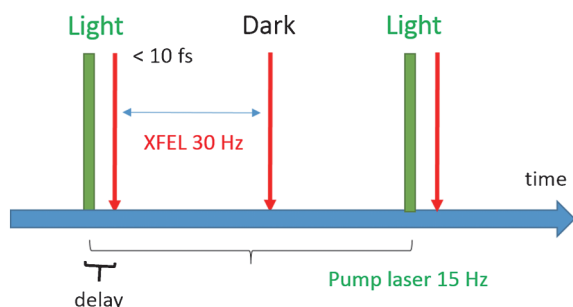


Fig. 7 (Color online) Data collection sequence of the time-resolved SFX experiment.

16ナノ秒から1.7ミリ秒の時間スケールにおける13タイムポイント（16 ns, 40 ns, 110 ns, 290 ns, 760 ns, $2 \mu\text{s}$, $5.25 \mu\text{s}$, $13.8 \mu\text{s}$, $36.2 \mu\text{s}$, $95.2 \mu\text{s}$, $250 \mu\text{s}$, $657 \mu\text{s}$, 1.725ms ）での測定を成功するに至った。この13種の間mediateデータについて、差フーリエ電子密度マップを基にモデル構築を行った。これらの構造はすべて基底状態の構造とintermediate構造の混ざった状態であり、intermediateの平均占有率はおよそ20から30%程度であった。Phenixを用いて構造精密化を行い、最終的に 2.1 \AA の空間分解能でそれぞれの構造を決定することができた。

5. bRの構造変化とプロトン移動の機構

bRにおける最初のプロトン移動は、レチナル上のシッフ塩基から 4 \AA ほど離れた細胞外側にあるAsp85に移動することによって始まる。不思議なことに、シッフ塩基のプロトンは、光照射前は細胞外の方向を向いているが、光異性化によってシス型に変化した時には、移動する方向とは逆の細胞内側へと方向を変える。これは一見不利な状況にも思えるため、どのようにして最初のプロトン移動が行われているのか、また、何故いつも同じ方向に移動するのか長い間興味を持たれてきた。

光が照射される前の基底状態のbR構造を見てみると、レチナル上のシッフ塩基とAsp85の間、すなわちプロトンが移動する領域に複数の水分子が存在して、強力な水素結合を形成している（Fig. 8）。これらの配置が、シッフ塩基（ pK_a 13.3）とAsp85（ pK_a 2.2）の酸解離定数の大きな差を生じ、基底状態ではプロトン移動が起きにくい仕組みを形成している。

時間分割SFX実験で得られた構造を時間経過ごとに見ていこう。光励起から最も早い遅延時間である16ナノ秒後の構造変化を見てみると、この時間での構造変化は、レチナル付近にのみ観察された。また、光によりシス体へと異性化したレチナルが、平面構造ではなく捻じれた構

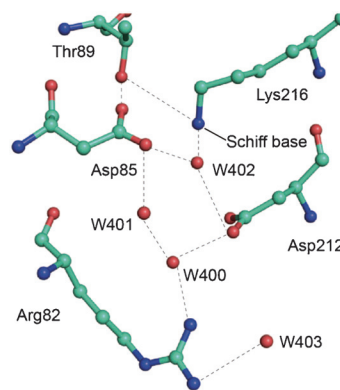


Fig. 8 (Color online) Hydrogen-bond networks around the Schiff-base in the ground state structure of bR.

造をしていることがわかり、シッフ塩基と水素結合していた水分子が消失していることも明らかとなった。次に、290ナノ秒後の変化を見ると、今度はレチナールが共役二重結合のとるべき平面構造になっていた。更に、20位のメチル基が細胞質側にシフトすることにより、その近傍に存在する Trp182が細胞質側へと押し上げられていた (Fig. 9)。

光照射から760ナノ秒程度経過すると、今度はレチナール付近の Trp182だけでなく、Leu93の側鎖が細胞質側へと向きを変えていた。興味深いことに、Leu93の側鎖が動いて生じた空間には、水分子と考えられる電子密度が現れることがわかった (Fig. 10)。この水分子は、シッフ塩基及び Thr89と水素結合しており、シッフ塩基上のプロトンが Asp85へと移動するのに重要な役割をしていると考えられた。また、この水分子は光照射後40ナノ秒から10マイクロ秒の間に観測されその後消失していた。ちょうどこの時間スケールは、bR 結晶を用いた可視吸収分光測定により L 中間体から M 中間体へと移り変わる過程と一致していた。L から M 中間体へと遷移する時にプロトン移動が行われることが知られていることから、この水分子はプロトン移動の時だけ現れることが今回初めて明らかとなった。今まで、レチナールが光異性化する際、シッフ塩基上のプロトンは細胞質側へと向きを変えるため、移動すべき方向とは逆向きに動くことが謎であった。今回の結果

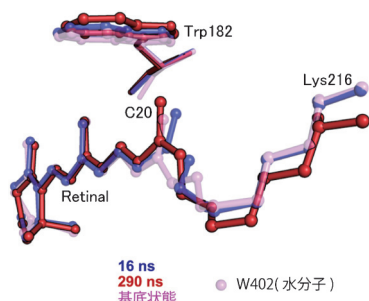


Fig. 9 (Color online) Early structural changes in the photo-cycle.

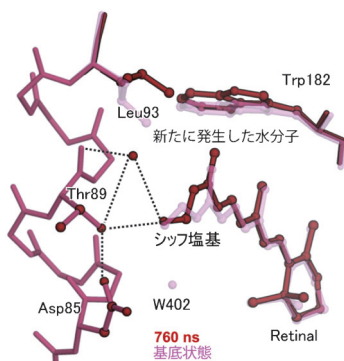


Fig. 10 (Color online) Pathway for proton transfer from the Schiff-base to Asp85.

により、シッフ塩基上のプロトンは逆方向を向くものの、この水分子が現れ、Asp85へのプロトン受け渡しを媒介してその移動を達成するという bR の巧みな仕組みが突き止められた。また、最初のプロトン移動が完結するまでには、光照射から10マイクロ秒程度の比較的長い時間がかかっていたが、この間にヘリックスの大きな動きを伴う変化が起こっていることが明らかとなった。

さて、シッフ塩基から Asp85へのプロトン移動が終わると、今度は一過性的な水分子が消えるだけでなく、Asp85と Thr89の水素結合もやがて消失していく (~250マイクロ秒以降)。それまでは、シッフ塩基と Asp85の間は水分子も含めた強力な水素結合ネットワークを形成していたが、250マイクロ秒後はシッフ塩基と Asp85は断絶された状態になり、プロトンの逆流が起こりにくくなる (Fig. 11)。この観察結果から、bR が細胞質側から細胞外へと同じ方向にプロトンを輸送する機構はこの一連の構造変化に起因すると考えられる。

今回我々が行った時間分割 SFX 実験により、ナノ秒からミリ秒にかけたまさに“動画”のような bR の構造変化を追跡することができた。光照射から16ナノ秒後は、中心に存在するレチナールの光異性化やその近傍の小さな構造変化であったのが、時間経過につれて構造変化が外側へと広がっていく様子が観測された。bR におけるプロトン移動のきっかけは、レチナールのトランスからシス体への光異性化であるが、これ自体はナノ秒以前の非常に早い時間スケール (フェムト秒からピコ秒) で起こっている。一方、プロトン移動は10マイクロ秒程度かけて、ヘリックスなど大きな構造変化を伴いながら起こっている。これは、bR がプロトンを逆流させることなく、毎回同じ方向へと移動させるために必要な構造変化と思われる。このように、bR がプロトンを移動するために構造を様々に変化させている様子を目の当たりにすると、タンパク質が起こす反応の仕組みの巧妙さに感嘆させられる。

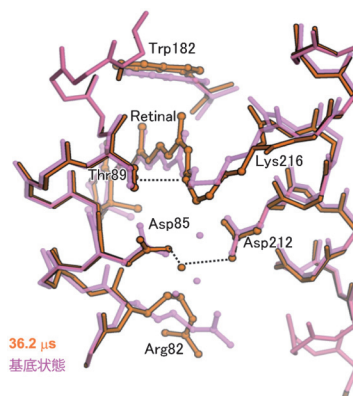


Fig. 11 (Color online) Superimposition of the structural model for $\Delta t = 36.2 \mu s$ and the ground state structure.

6. 終わりに

我々が開発した時間分割 SFX 実験装置は現在 SACLA で供用装置として使用されており、光で反応する様々なタンパク質の動的構造解析に利用されている。最近の成果としては、光合成に関与する光化学系 II の時間分割実験結果が報告された¹⁶⁾。今後、光で反応を開始する様々なタイプのタンパク質反応機構の解明が成されると期待される。

一方、光ではなく基質やリガンドなどの低分子と反応するタンパク質（酵素や受容体等）においても、時間分割 SFX 実験が展開されている。2016年末に、結晶溶液とリガンドの二つの溶液を混合して直ちに XFEL による測定が可能な mixing jet インジェクターを用いた実験が LCLS で行われた¹⁷⁾。この結果では秒以降の遅い反応を観測していたが、今後は数10ミリ秒といった混合直後のタンパク質変化を追跡できるようになると思われる。このように様々な進展を遂げている XFEL を用いたタンパク質構造解析は、将来的に、タンパク質の動きを詳細に捉える重要なツールとなっていくであろう。

ただし、時間分割実験を行なうに当たっては、実際に結晶中で起こっていることを分光法でモニターし、機能研究と結び付けながら進めることが重要である。今回の bR の時間分割 SFX 研究では、実際に測定する結晶での時間分解可視分光を行い、どのような時間スケールにどの中間体が生成するかを予め知っていたことが、実験の成功を導いた。また、中間体構造は基底状態との混合状態で観測されることが多いため、構造変化は差フーリエ電子密度マップでの解釈が主となるが、時にそれは非常に弱く曖昧なマップとなることもある。主観的な解釈を避け、観測された構造を正確に意味づけするためにも、他の手法による解析との組み合わせが今後ますます重要になるであろう。

謝辞

本研究は2012年度より文部科学省 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」(研究代表者: 岩田想) 等の支援を受けて、理化学研究所、高輝度光科学研究センター、東京大学、京都大学、大阪大学、兵庫県立大学、高エネルギー加速研究機構の共同で実施された成果の一部である。特に、装置開発では、登野健介博士、城地保昌博士、亀島敬博士(以上、高輝度光科学研究センター)、大和田成起博士、初井宇記博士、矢橋牧名博士、エンジニアリングチーム(以上、理化学研究所)の皆様をはじめとする関係各位に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert and J. Hajdu: *Nature* **406**, 752 (2000).
- 2) H. Chapman, P. Fromme, A. Barty, T. A. White, R. A. Kirian, A. Aquila, M. S. Hunter, J. Schulz, D. P. DePonte, U. Weierstall, R. B. Doak, F. R. N. C. Maia, A. V. Martin, I. Schlichting, L. Lomb, N. Coppola, R. L. Shoeman, S. W. Epp, R. Hartmann, D. Rolles, A. Rudenko, L. Foucar, N. Kimmel, G. Weidenspointner, P. Holl, M. Liang, M. Barthelmess, C. Caleman, S. Boutet, M. J. Bogan, J. Krzywinski, C. Bostedt, S. Bajt, L. Gumprecht, B. Rudek, B. Erk, C. Schmidt, A. Hömke, C. Reich, D. Pietschner, L. Strüder, G. Hauser, H. Gorke, J. Ullrich, S. Herrmann, G. Schaller, F. Schopper, H. Soltau, K.-U. Kühnel, M. Messerschmidt, J. D. Bozek, S. P. Hau-Riege, M. Frank, C. Y. Hampton, R. G. Sierra, D. Starodub, G. J. Williams, J. Hajdu, N. Timneanu, M. M. Seibert, J. Andreasson, A. Rocker, O. Jönsson, M. Svenda, S. Stern, K. Nass, R. Andritschke, C.-D. Schröter, F. Krasniqi, M. Bott, K. E. Schmidt, X. Wang, I. Grotjohann, J. M. Holton, T. R. M. Barends, R. Neutze, S. Marchesini, R. Fromme, S. Schorb, D. Rupp, M. Adolph, T. Gorkhober, I. Andersson, H. Hirsemann, G. Potdevin, H. Graafsma, B. Nilsson and J. C. H. Spence: *Nature* **470**, 73 (2011).
- 3) J. Kern, R. Alonso-Mori, R. Tran, J. Hattne, R. J. Gildea, N. Echols, C. Glöckner, J. Hellmich, H. Laksmono, R. G. Sierra, B. Lassalle-Kaiser, S. Koroidov, A. Lampe, G. Han, S. Gul, D. Difiore, D. Milathianaki, A. R. Fry, A. Miahnahri, D. W. Schafer, M. Messerschmidt, M. M. Seibert, J. E. Koglin, D. Sokaras, T.-C. Weng, J. Sellberg, M. J. Latimer, R. W. Grosse-Kunstleve, P. H. Zwart, W. E. White, P. Glatzel, P. D. Adams, M. J. Bogan, G. J. Williams, S. Boutet, J. Messinger, A. Zouni, N. K. Sauter, V. K. Yachandra, U. Bergmann and J. Yano: *Science* **340**, 491 (2013).
- 4) J. Tenboer, S. Basu, N. Zatsepin, K. Pande, D. Milathianaki, M. Frank, M. Hunter, S. Boutet, G. J. Williams, J. E. Koglin, D. Oberthuer, M. Heymann, C. Kupitz, C. Conrad, J. Coe, S. Roy-Chowdhury, U. Weierstall, D. James, D. Wang, T. Grant, A. Barty, O. Yefanov, J. Scales, C. Gati, C. Seuring, V. Srajer, R. Henning, P. Schwander, R. Fromme, A. Ourmazd, K. Moffat, J. J. Van Thor, J. C. Spence, P. Fromme, H. N. Chapman and M. Schmidt: *Science* **346**, 1242 (2014).
- 5) T. R. M. Barends, L. Foucar, A. Ardevol, K. Nass, A. Aquila, S. Botha, R. B. Doak, K. Falahati, E. Hartmann, M. Hilpert, M. Heinz, M. C. Hoffmann, J. Kofinger, J. E. Koglin, G. Kovacsova, M. Liang, D. Milathianaki, H. T. Lemke, J. Reinstein, C. M. Roome, R. L. Shoeman, G. J. Williams, I. Burghardt, G. Hummer, S. Boutet and I. Schlichting: *Science* **350**, 445 (2015).
- 6) K. Tono, E. Nango, M. Sugahara, C. Song, J. Park, T. Tanaka, R. Tanaka, Y. Joti, T. Kameshima, S. Ono, T. Hatsui, E. Mizohata, M. Suzuki, T. Shimamura, Y. Tanaka, S. Iwata and M. Yabashi: *J. Synchrotron Radiat.* **22**, 532 (2015).
- 7) M. Sugahara, E. Mizohata, E. Nango, M. Suzuki, T. Tanaka, T. Masuda, R. Tanaka, T. Shimamura, Y. Tanaka, C. Suno, K. Ihara, D. Pan, K. Kakinouchi, S. Sugiyama, M. Murata, T. Inoue, K. Tono, C. Song, J. Park, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, M. Yabashi and S. Iwata.: *Nat. Methods* **12**, 61 (2015).
- 8) E. Nango, A. Royant, M. Kubo, T. Nakane, C. Wickstrand, T. Kimura, T. Tanaka, K. Tono, C. Song, R. Tanaka, T. Arima, A. Yamashita, J. Kobayashi, T. Hosaka, E. Mizohata, P. Nogly, M. Sugahara, D. Nam, T. Nomura, T. Shimamura, D. Im, T. Fujiwara, Y. Yamanaka, B. Jeon, T. Nishizawa, K. Oda, M. Fukuda, R. Andersson, P. Bath, R. Dods, J. Davidsson, S. Matsuoka, S. Kawatake, M. Murata, O. Nureki, S. Owada, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, G. Schertler, M. Yabashi, A. N. Bondar, J. Standfuss, R. Neutze and S. Iwata: *Science* **354**, 1552 (2016).

- 9) C. Wickstrand, R. Dods, A. Royant and R. Neutze: *Biochim. Biophys. Acta.* **1850**, 536 (2014).
- 10) S. Boutet, L. Lomb, G. J. Williams, T. R. Barends, A. Aquila, R. B. Doak, U. Weierstall, D. P. DePonte, J. Steinbrener, R. L. Shoeman, M. Messerschmidt, A. Barty, T. A. White, S. Kassemeyer, R. A. Kirian, M. M. Seibert, P. A. Montanez, C. Kenney, R. Herbst, P. Hart, J. Pines, G. Haller, S. M. Gruner, H. T. Philipp, M. W. Tate, M. Hromalik, L. J. Koerner, N. van Bakel, J. Morse, W. Ghonsalves, D. Arnlund, M. J. Bogan, C. Caleman, R. Fromme, C. Y. Hampton, M. S. Hunter, L. C. Johansson, G. Katona, C. Kupitz, M. Liang, A. V. Martin, K. Nass, L. Redecke, F. Stellato, N. Timneanu, D. Wang, N. A. Zatsepin, D. Schafer, J. Defever, R. Neutze, P. Fromme, J. C. Spence, H. N. Chapman and I. Schlichting: *Science* **337**, 362 (2012).
- 11) E. M. Landau and J. P. Rosenbusch: *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14532 (1996).
- 12) U. Weierstall, D. James, C. Wang, T. A. White, D. Wang, W. Liu, J. C. Spence, R. Bruce Doak, G. Nelson, P. Fromme, R. Fromme, I. Grotjohann, C. Kupitz, N. A. Zatsepin, H. Liu, S. Basu, D. Wacker, G. W. Han, V. Katritch, S. Boutet, M. Messerschmidt, G. J. Williams, J. E. Koglin, M. Marvin Seibert, M. Klinker, C. Gati, R. L. Shoeman, A. Barty, H. N. Chapman, R. A. Kirian, K. R. Beyerlein, R. C. Stevens, D. Li, S. T. Shah, N. Howe, M. Caffrey and V. Cherezov: *Nat. Commun.* **5**, 330913 (2014).
- 13) W. Liu, A. Ishchenko and V. Cherezov: *Nat. Protoc.* **9**, 2123 (2014).
- 14) M. Kubo, E. Nango, K. Tono, T. Kimura, S. Owada, C. Song, F. Mafuné, K. Miyajima, Y. Takeda, J. Kohno, N. Miyauchi, T. Nakane, T. Tanaka, T. Nomura, J. Davidsson, R. Tanaka, M. Murata, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, R. Neutze, M. Yabashi and S. Iwata: *J. Synchrotron Radiat.* **24**, 1086 (2017).
- 15) T. Nakane, Y. Joti, K. Tono, M. Yabashi, E. Nango, S. Iwata, R. Ishitani and O. Nureki: *J. Appl. Crystallogr.* **49**, 1035 (2016).
- 16) M. Suga, F. Akita, M. Sugahara, M. Kubo, Y. Nakajima, T. Nakane, K. Yamashita, Y. Umena, M. Nakabayashi, T. Yamane, T. Nakano, M. Suzuki, T. Masuda, S. Inoue, T. Kimura, T. Nomura, S. Yonekura, L.-J. Yu, T. Sakamoto, T. Motomura, J.-H. Chen, Y. Kato, T. Noguchi, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, T. Hatsui, E. Nango, R. Tanaka, H. Naitow, Y. Matsuura, A. Yamashita, M. Yamamoto, O. Nureki, M. Yabashi, T. Ishikawa, S. Iwata and J.-R. Shen: *Nature* **543**, 131 (2017).
- 17) J. R. Stagno, Y. Liu, Y. R. Bhandari, C. E. Conrad, S. Panja, M. Swain, L. Fan, G. Nelson, C. Li, D. R. Wendel, T. A. White, J. D. Coe, M. O. Wiedorn, J. Knoska, D. Oberthuer, R. A. Tuckey, P. Yu, M. Dyba, S. G. Tarasov, U. Weierstall, T. D. Grant, C. D. Schwieters, J. Zhang, A. R. Ferré-D'Amaré, P. Fromme, D. E. Draper, M. Liang, M. S. Hunter, S. Boutet, K. Tan, X. Zuo, X. Ji, A. Barty, N. A. Zatsepin, H. N. Chapman, J. C. H. Spence, S. A. Woodson and Y. X. Wang: *Nature* **541**, 242 (2016).

著者紹介



南後恵理子

理化学研究所放射光科学総合研究センター
研究員

E-mail: nango@spring8.or.jp

専門：構造生物学、生物有機化学

【略歴】

2004年3月東京工業大学大学院理工学研究科博士課程満期退学。博士（理学）。
2004年4月東京工業大学助手（2007年4月より助教）、2013年より現職。



久保 稔

理化学研究所放射光科学総合研究センター
専任研究員

E-mail: minoru.kubo@riken.jp

専門：時間分解振動分光、生体分子のダイナミクスを見るための手法開発

【略歴】

2003年北海道大学大学院理学研究科修了、博士（理学）。岡崎統合バイオサイエンスセンターIMSフェロー、JSPS 海外特別研究員（ノースイースタン大学）、兵庫県立大学特任准教授などを経て、2014年4月より現職。



岩田 想

理化学研究所放射光科学総合研究センター
グループディレクター

京都大学大学院医学研究科 教授

E-mail: s.iwata@mfour.med.kyoto-u.ac.jp

専門：膜タンパク質の構造生物学、X線結晶学

【略歴】

1991年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了、博士（農学）。インペリアルカレッジロンドン生命科学科（イギリス）教授、ダイヤモンド放射光実験施設（イギリス）ダイヤモンドフェローなどを経て、2007年3月より京都大学大学院医学研究科教授。2012年6月より理化学研究所放射光科学総合研究センターグループディレクター兼任。

A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin captured by X-ray free electron lasers

Eriko NANGO RIKEN SPring-8 Center, Hyogo 679-5148, Japan

Minoru KUBO RIKEN SPring-8 Center, Hyogo 679-5148, Japan

So IWATA Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

Abstract The recent advent of time-resolved serial femtosecond crystallography at X-ray free-electron lasers enables to measure ultra-fast reactions in proteins. We observed conformational changes in bacteriorhodopsin known as a light-driven proton pump at thirteen time-points from nanoseconds to milliseconds following photo-activation at 2.1 Å resolution using time-resolved serial femtosecond crystallography at SACLA. The resulting cascade of structural changes throughout the protein provided unprecedented insight into how structural changes in bacteriorhodopsin conspire to achieve unidirectional proton transport.