

中性子結晶構造解析による銅含有亜硝酸還元酵素の反応機構解明

福田庸太

大阪大学大学院薬学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6

平野 優

量子科学技術研究開発機構量子生命科学研究所 〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 2-4

日下勝弘

茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター 〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方162-1

井上 豪

大阪大学大学院薬学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6

玉田太郎

量子科学技術研究開発機構量子生命科学研究所 〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 2-4

要旨

銅含有亜硝酸還元酵素 (CuNIR) は、地球上の脱窒過程において重要な亜硝酸イオンから一酸化窒素への1電子還元反応を触媒する酵素であるが、X線結晶構造解析から提唱された反応機構モデルは量子化学計算結果とは矛盾する状態が続いていた。われわれは、CuNIRの中性子結晶構造解析によって反応に関与する水素原子を可視化することで、その解決を目指した。高分解能中性子結晶構造解析の結果、活性中心に位置する銅イオンに水酸化物イオンが結合していることを観測し、量子化学計算のモデルを支持する結果を得た。2つの銅イオン間の電子移動経路として適した強固な水素結合を形成することも明らかにした。

1. はじめに

生体内における多くの重要な化学反応では、タンパク質からなる酵素が利用されている。酵素の機能はその立体構造と直結しているため、酵素の立体構造決定は生命科学を遂行する上で欠かせない。立体構造情報に基づいて生体分子の機能を調べる学問は構造生物学と呼ばれる。構造生物学的手法のなかでも単結晶構造解析は、十分な回折能を示す結晶さえあれば、短いペプチドからウイルスのような巨大複合体まで多種多様なスケールの生体高分子について迅速に立体構造決定が可能な、汎用的かつスループットに優れた手法である。そのような生体高分子の単結晶構造解析ではシンクトロトロン放射光 (X線) が一般的に利用されている。現在では回折実験から構造決定まで一連の流れの高速化・自動化が達成されるなど、実験環境や解析手法が整備されており、構造生物学を専門としない生命科学研究者にもX線結晶構造解析は日常的に利用されている。

しかし、酵素反応を研究する場合、X線の使用には問題もある。1点目は、X線ではそもそもプロトンを観測することができず、水素原子の可視化もX線は不向きという点である。酵素反応を真の意味で「原子構造」から理解したいとき、通常の解析では取得が難しい高精度かつ超

高分解能のデータを用いない限り水素が観測にかからないことは深刻であろう。酵素反応には多くの場合、プロトンや水素原子が直接関与するからである。X線は電子との相互作用によって回折されるため、原子番号に従って散乱強度が増す。言い換えると、水素原子からの散乱は弱い。したがって、タンパク質を構成する原子の約半数は水素であるが、そのシグナルは隣接する炭素や酸素、窒素のシグナルに埋もれてしまう。このため、sub-atomic resolution と呼ばれる1 Åを超える高分解能データを用いてさえ、触媒反応に寄与するような移動性の水素原子の直接観測は極めて困難である¹⁾。2点目の問題はとりわけ放射光X線の利用時に関係するもので、X線照射によってタンパク質が少なからず損傷を受けることである。とくに、遷移金属イオンのような酸化還元中心を含むタンパク質は、X線照射によって結晶内で発生した水和電子がその反応中心を迅速に還元し、それに伴うタンパク質構造の変化が誘起される²⁾。この場合、決定される構造は artifact であると言える。データの解釈が複雑化する。とはいえこの問題は、X線自由電子レーザーの生み出すフェムト秒オーダーのパルスX線の登場で、放射線損傷を気にすることなくデータ収集ができるようになったと考えられている³⁾。一方、1点目の水素の観測に関する問題は、X線以外のプ

ローブを用いることが有効な解決策となる。そこで活躍するのが、中性子結晶構造解析である。中性子は原子核により散乱され、散乱振幅が原子番号とは無関係に変化するため、軽元素の観察に長けている。また、後で述べるように軽水素 (^1H) と重水素 (^2H) との区別が可能であり、ある原子上に存在する水素同位体の存在割合を見積もることができる。さらに、中性子構造解析では放射線損傷が無視できるほど少なく、室温でのデータ測定が可能であるという利点もある。これは、タンパク質の X 線結晶構造解析に使われる波長 (通常およそ 1 \AA 程度) で比較すると、中性子では 6 桁程度エネルギーが低いためである。しかし、中性子は X 線に比べ散乱能が低いため、中性子結晶構造解析では X 線結晶構造解析に用いられる体積の 1 万倍程度大きいタンパク質結晶を必要とする。これが中性子結晶構造解析を遂行する上での一番の壁となっている。本稿では、われわれの最近の研究を例に、中性子結晶構造解析を達成するためのサンプル調製法から実際の解析結果⁴⁾までの詳細を述べたい。

2. 銅含有亜硝酸還元酵素の中性子結晶構造解析にむけた取り組み

19世紀までの人類史では、農業は主に有機質肥料のみによって支えられており、とめどない人口増加により人類は貧困と飢餓に悩まされ続けると言われていた。しかし20世紀に入り、大気中の分子状窒素をアンモニアへ変換できる Haber-Bosch 法が開発され、化学肥料が安定的に供給できるようになったことで、上記の問題は解決された。その後現在に至るまで人類は工業的窒素固定の恩恵を受け続けているわけであるが、そうして大量合成された窒素肥料は窒素酸化物として土壌や水中に過剰流入し、地球上の窒素循環の均衡を脅かしているという負の側面もある。こうした背景から地球環境制御の鍵を握るものとして

注目されているのが、窒素酸化物を還元し再び大気中へと戻す反応である。この過程は脱窒と呼ばれ、主に脱窒菌と呼ばれる微生物が窒素酸化物を分子状窒素にまで段階的に還元することで達成されている。なかでも亜硝酸イオン (NO_2^-) から一酸化窒素 (NO) への 1 電子還元反応は、イオンが気体へと変換されて窒素酸化物が土壌を去るステップであること、生成する NO が温室効果を持つ N_2O の前駆体であることなどから、脱窒過程のなかでもとりわけ重要である。本反応を触媒する酵素を異化型亜硝酸還元酵素 (Dissimilatory Nitrite Reductase: NIR) と呼ぶ。われわれは NIR のなかでも、活性中心に銅イオンを含む銅含有亜硝酸還元酵素 (Copper-containing NIR: CuNIR; 図 1A) を研究対象としている。CuNIR の立体構造は X 線結晶構造解析によって 1991 年に初めて明らかにされた⁵⁾。基質⁶⁾ や生成物⁷⁾ との複合体構造も 2004 年までには出そろい、酵素反応の各段階が構造的に同定されたため、反応機構は完全解明された、かに思われたのだが、様々な疑義が持ち上がっている。例えば、生成物である NO との複合体結晶構造が得られたことから「 NO_2^- に水素イオンが 2 つ供給されて水が解離することで NO の結合した銅イオンが活性中心に残される」という反応機構が提唱されている⁷⁾。しかし分光学的データは結晶構造で観察された NO 複合体を必ずしも支持するものではなく⁸⁾、量子化学計算の結果は「 NO_2^- が水素イオンを 1 つ得た後に NO がまず解離し、水酸化物イオンの結合した銅イオンが活性中心に残る」という反応経路がエネルギー的に有利であることを示していた (Fig. 1B)⁹⁾。われわれは、いまだ議論の絶えない CuNIR の反応機構に構造生物学の立場からこれまで以上に詳しく迫るべく、化学反応に関わる水素原子を可視化できる中性子結晶構造解析を利用することを着想した。

先述のように、中性子結晶構造解析には大型で良質な結晶が必要である。タンパク質の大型結晶作製は、通常の結晶化と同様に個々のタンパク質に応じて試行錯誤を伴うた

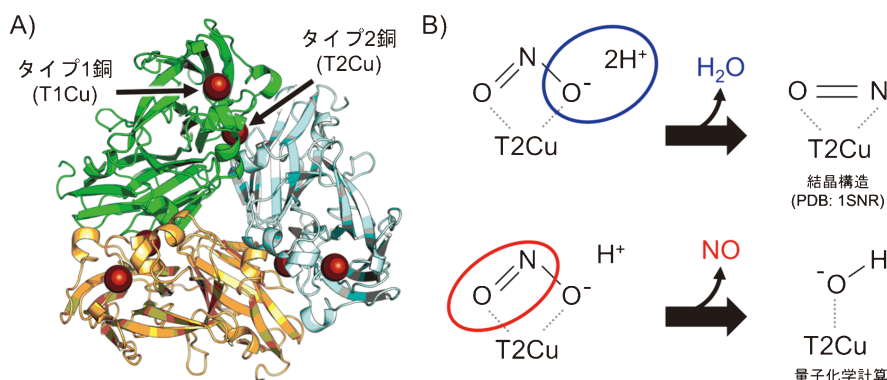


Fig. 1 (Color online) Structure of copper-containing nitrite reductase (CuNIR) and proposed reaction mechanisms of CuNIR. A) Trimeric structure of CuNIR. Each monomer contains one type-1 copper (T1Cu) site and one type-2 copper (T2Cu) site. T1Cu receives an electron required for the chemical reaction. The electron is transferred to catalytic T2Cu where the nitrite reduction reaction occurs. B) A mechanism proposed from X-ray crystal structures (upper) and a mechanism suggested by the results of quantum chemical calculations (lower).

め、以下に述べるのは我々が用いたタンパク質に限った話であるが、他のタンパク質に適用できる部分もあると考える。安定性の高いタンパク質は良好な結晶性を保ったまま大型結晶になることが多いため、まずそのようなタンパク質を有する好熱菌に目をつけた。好熱菌由来の CuNIR を大腸菌内で大量発現させ、熱処理などのステップを経て高純度に精製し、結晶化をおこない、X線結晶構造解析に成功したが、このとき得られていた結晶の回折能の再現性は低く、ほとんどの場合、2 Å 分解能程度にとどまっていた。通常の X線結晶構造解析であれば 2 Å 分解能は十分すぎるほどだが、散乱能の低い中性子を用いて回折データ収集を行うと X線回折データの分解能を大きく下回ることが一般的であるため、水素の明瞭な観測が可能で 2.0 Å 前半台の分解能を中性子実験で得ようとするには、X線回折実験で非常に高分解能（例えば 1 Å 分解能程度）のデータが再現性高く取得できる結晶の方が望ましい。そのような高品質な結晶であれば、より小型の結晶でも高分解能の中性子回折データ収集が可能になるというメリットもある。我々のケースでは分解能が伸び悩んでいたことに加え、得られる結晶が脆いことも問題であった。中性子回折実験では、強い非干渉性散乱のためにバックグラウンドが高い軽水素を非干渉性散乱断面積の小さな重水素に可能な

限り置換することが望ましく、タンパク質中のすべての軽水素を重水素化した試料を用いた結晶化も行われる。われわれは通常の軽水素サンプルを用いて得られた大型結晶を、重水素置換溶液に浸漬することで重水素置換の手法を採用した。しかし、数か月かけて成長させた CuNIR 結晶はその脆さのために、重水素置換溶液に浸すと多くが崩壊してしまい、蒸気拡散法により作製した大型結晶を取り出す際、カバーガラスを開けたとたんに蒸気平衡が崩れて結晶にヒビが入ることもしばしばであった。結晶作製時の添加剤の検討もおこなったものの、結晶の質の根本的な改善には至らなかった。当初の結晶化条件には硫酸亜鉛が必須要素として含まれており、結晶構造を観察すると亜鉛は CuNIR 表面で CuNIR 分子同士をつなぎとめ、結晶化を促進する役割を担っていた。亜鉛と銅はイオン半径など化学的性質が互いに似た元素であるため、数 mM という高濃度の亜鉛存在下では、CuNIR 中の銅サイトが亜鉛に置換されてしまうおそれがあり、結晶構造中で亜鉛と銅とを区別するためには各原子由来の異常散乱の測定なども必要であると思われた。そのような煩わしさを排除したいという理由で、硫酸亜鉛の代わりに硫酸銅を用いたところ、数十 mM という高濃度の銅存在下において結晶成長が見られた。ただ、高濃度の銅存在下では結晶はタンパク質の沈

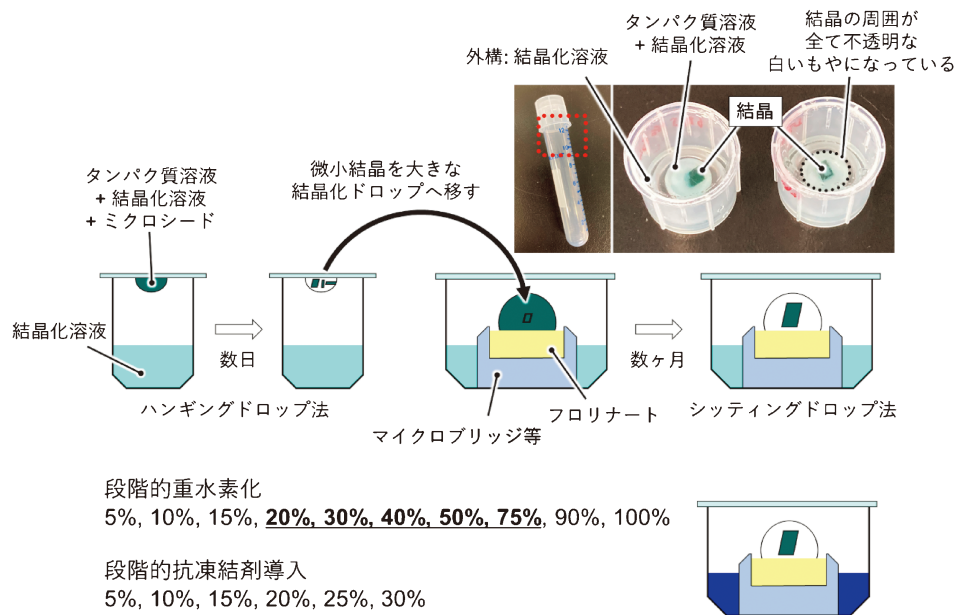


Fig. 2 (Color online) How to prepare large crystals of CuNIR. First, very small crystals are obtained by a microseeding method (left) and they are used for a macroseeding method (right). While small crystals are grown by a hanging drop vapor diffusion method (drop volume: 1–2 μL), macroseeding is performed with a sitting drop vapor diffusion method to setup larger crystallization drops (drop volume: several hundred μL). Vapor diffusion of sitting drops should be progressed to some extent prior to transferring small crystals into them. Several methods are known to prepare large sitting drops. We often use a snap cap of a 14 mL polypropylene round-bottom tube, which we usually use for *E. coli* cultivation. This cap has an inner dent and an outer moat and can be sealed by a 22 mm \times 0.22 mm circle cover slide. The inner dent is half-filled with fluorinert to prevent grown crystals from sticking to the bottom. Because CuNIR crystals can be easily damaged at the deuterium content rates of 20–75%, each step should take more than one day to wait until the crystals are stabilized in new solutions. Cryo-protectants are introduced at the same time as the deuteration process, but non-deuterated cryo-protectants are used up to the deuterium content rate of 75% because the deuterated reagent is expensive.

殿でできた「もや」(Fig. 2 写真中結晶周囲の白い部分)の中で成長しており、こうした「もや」は回折データ収集時のバックグラウンドを高めてしまう。そこで結晶に貼りついた「もや」を丁寧に取り除くことを考えるわけであるが、その際、この結晶が亜鉛存在下で得られたものと比べ、理由は不明だがはるかに物理的に安定なことが判明した。既に亜鉛存在下での大型結晶作製条件を検討していたため、銅存在下での大型結晶作製はすぐに達成できた。一度結晶が得られると、成長した溶液から別の溶液に結晶を浸漬する際には銅イオンを添加せずとも結晶が壊れないことも判明し、重水素化などのソーキング操作も容易におこなえた。実際の手順としては Fig. 2 に示すとおり、顕微鏡下でさえ見えないような微結晶を結晶核として用いるマイクロシーディングと、ある程度成長した結晶をさらに大型化させるために新たな結晶成長溶液へ移すマクロシーディングを組み合わせて、重水素化では段階的に重水素の割合を増やしていった。なお、良質な単結晶が常に成長するかどうかはサンプルにも依存するので、大量にセットアップして良質な結晶を選別することが重要であろう。得られた結晶を用いて回折実験をおこなうことにしたが、原子の熱振動を抑えることで高精度のデータを得るべく、低温下(100 K)での測定を選択した。低温測定のためには氷晶生成を抑制するための抗凍結剤の導入操作が必要となる。これは、タンパク質結晶の溶媒含有率が高いことや、回折データ収集時に結晶周囲にも溶液が存在した状態を保つ必要があることから、タンパク質結晶をそのまま凍結すると氷晶生成により結晶が劣化する可能性があるからである。また、氷晶由来のアイスリングと呼ばれる回折像はデータ精度を低下させる原因にもなる。抗凍結剤の導入は結晶の重水素化と同時に、また段階的におこなった。凍結操作時には結晶性が損なわれて回折能が低下することが多いため、さまざまな方法で大型結晶を凍結し中性子回折能を確かめるといった条件検討もおこなった。その結果、結晶を液体窒素に浸ける手法では回折能が低下し、低温窒素気流(クライオストリーム)下で凍らせる手法では回折能を保てること became clear. われわれが用いた CuNIR 大型結晶の場合、X 線回折実験においても、液体窒素で凍結した結晶では 0.9 Å 分解能程度の回折データが得られるが、クライオストリームによる凍結をおこなうことで 0.7 Å 台まで回折能が向上した。

3. 銅含有亜硝酸還元酵素の中性子結晶構造解析

2 で述べた種々の検討の結果、十分な回折能を示す大型の結晶(結晶の写真から体積を推定すると 3.4 mm³ 程度)を取得できた。この結晶を用いて大強度陽子加速器施設 J-PARC の物質・生命科学実験施設(MLF)にある茨城県生命物質構造解析装置(iBIX)において、回折実験を

おこなった(Fig. 3)。MLF では、加速器から導かれた大強度の陽子を水銀ターゲットに照射し核破砕をおこなうことで中性子を得るパルス中性子源が利用されている。iBIX における中性子回折データ収集には飛行時間法[time of flight (TOF) 法]が用いられている。TOF 法は様々な波長幅の中性子を同時にサンプルに照射する白色ラウエ法に類似しているが、中性子がパルス源から到達する時間によって波長の弁別をおこなう点で異なる。パルス毎に波長弁別をおこなったうえで回折強度を積算することで、多波長で同時に単色法をおこなったようなデータが得られるため、測定効率が良いという利点がある。

われわれは 1 データセットあたり 6.9 時間中性子照射をおこなって、結晶の方位を変えながら計 40 データセットを取得し、最終的に 1.5 Å 分解能(最高分解能シエルの CC_{1/2} は 0.782)の中性子回折データを得た。データの完全性は 99.7% (最高分解能シエルの完全性も 99.7%)であった。上記の分解能は、Protein Data Bank (<https://pdj.org/>)に登録されているタンパク質の中性子結晶構造の中で、サブユニットあたりの分子質量が 30 kDa 以上あるものとしては世界最高分解能である(2022年1月時点)。中性子回折データを取得したのと同じ結晶を用い、Photon Factory AR-NE3AにてX線回折データ収集も行い、1.03 Å 分解能(最高分解能シエルの CC_{1/2} は 0.907)までのデータセットを得た。これは構造精密化を遂行する際に、同一結晶(場合によっては同型の結晶を用いることもある)から得たX線回折データを利用した中性子/X線ジョイント精密化(NX joint refinement)¹⁰⁾をおこなうためである。高分解能X線データに基づく精密な原子位置情報を利用できるNX joint refinementでは、中性子データ単独での精密化よりも結晶学的なR値(低いほど良好)が低下するとされており、近年の中性子結晶構造解析で

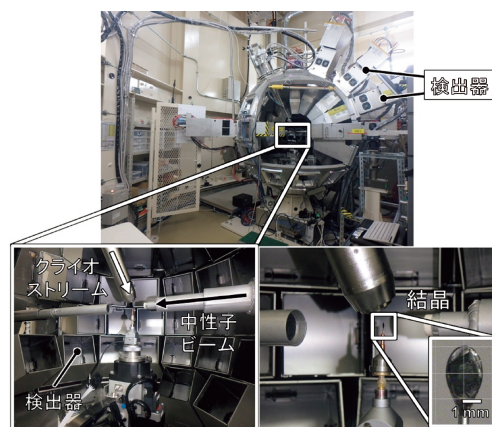


Fig. 3 (Color online) IBARAKI Biological Crystal Diffractometer (iBIX). About 30 detectors are arranged in a spherical shape around the goniometer where the sample is placed. They are two-dimensional scintillation detectors that can perform time-resolved data collection.

は採用されることが一般的である。なお、中性子データとX線データの分解能に隔たりがあると、NX joint refinementの際に結晶学的R値がうまく下がらないことがしばしばあるようである。われわれの場合も、はじめは1.03 Å分解能までのX線データを使用していたが、1.3 Å分解能までのX線データを使用することで、より小さな結晶学的R値を得ることができた。先述の通り、放射光を利用したX線回折実験では放射線損傷が無視できないため、NX joint refinementの際にX線データ由来のモデルバイアスが生じる可能性は当然ながらある。ゆえに、得られたモデルを鵜呑みにするのではなく、電子密度マップと中性子散乱長密度マップを丁寧に見比べながら構造精密化をおこなうべきである。中性子回折実験は室温でおこなうことも多く、その後のX線回折実験も室温で実施する場合には放射線損傷は大きな問題となる。そこで、NX joint refinement用のX線回折データ収集時に、中性子実験用の結晶が大型であることを活かし、露光点を回折像1枚ごとにずらしながらデータを収集するヘリカルスキャンをおこなうなど、放射線損傷を可能な限り低減する工夫も重要である。近年の放射光ビームラインはヘリカルスキャンを実行するためのソフトウェアが整備されているほか、マイクロビームの利用ができるところもあるなど、放射線損傷を低減しながらのデータ収集が可能であり、高精度な中性子構造解析をおこなう上でも非常に役立っている。

中性子データとX線データを同時に収集することのもう一つのメリットとして、各々単独のデータからだけでは特定できない原子種が推定可能であることがあげられる。例えば電子数が同程度のナトリウムイオンと水分子との区別はX線データから得られる電子密度マップを見るだけでは難しいが、中性子データではナトリウムイオンの散乱長密度マップが水分子のそれよりもはるかにあいまいであることや、水分子は2つの水素原子も含んだ三角形の密度として現れることから容易に識別が可能である。

今回、中性子データではX線データよりも水素原子が明らかに多く観測され、特に水分子上の水素原子は1.03 Å分解能のX線データではほとんど観察できなかったものの、中性子データでは容易に観測することができた。また、酵素反応とは無関係な部分ではあるものの、CuNIR分子表面に存在するグルタミン酸側鎖のカルボキシル基上に存在するプロトンも中性子データでは明瞭に観測することができたが、この水素は0.7 Å台のX線回折データを用いてさえ可視化できないものである。さて、このような中性子構造解析の恩恵にあずかり、われわれはCuNIRの反応中心の全ての水素・重水素原子由来の明瞭な中性子散乱長密度を観測できた (Fig. 4)。すなわち2つの触媒残基であるアスパラギン酸とヒスチジンについて、アスパラギン酸は脱プロトン化状態であるが、ヒスチジンはプロトン化状態であることがはっきりと見て取れた。これは分光学的、生化学的測定および量子化学計算から予想されていた

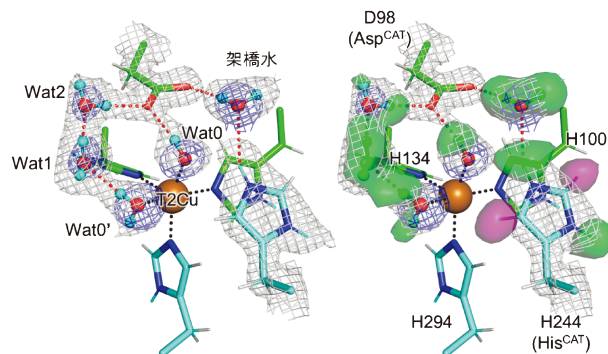


Fig. 4 (Color online) Structure of the catalytic site of CuNIR. Left) Electron density and neutron scattering length density around the catalytic copper center. The electron densities of water molecules ($2mF_o - DF_o$, 1.5σ) are shown by blue meshes and the neutron scattering length densities of catalytic residues and water molecules ($2mF_o - DF_o$, 1.0σ) are shown by gray meshes. While the electron densities of water molecules are spherical, the neutron scattering length density map shows shapes reflecting the presence of deuterium atoms. Right) The neutron scattering length density omit map ($\pm 3\sigma$) for hydrogen and deuterium atoms. The electron densities and the neutron scattering length densities are the same as the left figure. Negative (purple) and positive (green) difference densities are observed at the hydrogen and deuterium positions, respectively. Wat0 shows only one positive peak around it, indicating that it is in the state of hydroxide, OH^- (more precisely OD^-). Hydrogen and deuterium atoms are illustrated by white and cyan, respectively. Hydrogen bonds and coordination bonds are shown by red and black dotted lines, respectively.

状態と一致する結果である。一方、われわれに先んじてイギリスと日本の共同研究グループが他のバクテリア由来のCuNIRの中性子結晶構造を発表していたが¹¹⁾、その構造では触媒残基であるアスパラギン酸とヒスチジンのどちらもが脱プロトン化状態となっていた。しかしながらこのグループのデータでは、反応中心周囲の水素原子の中性子散乱長密度はほとんど見えていない。データの完全性が85.5% (最高分解能のシェルで69.8%)であり、分解能(1.8 Å)もわれわれのものより低いことが関係しているのかもしれない。また、このグループはNX joint refinementもおこなっていなかった。脱着性の水素原子位置に関する正確な構造解析と議論のためには、質の高い中性子データを取得し、放射光X線を相補的に利用した精密な構造解析を実施せねばならないと言えるだろう。

本研究における興味深い発見として、反応中心である銅イオン (T2Cu と呼ばれる) の上に存在する水分子の酸素原子の傍に、重水素1つ分の中性子散乱長密度しか観測されなかったことがあげられる (Fig. 4中のWat0)。つまりこの化学種は水素原子を2つ有する水ではなく、プロトンが1つ外れた水酸化物イオンであると推定できる。タンパク質のような巨大分子 (CuNIRの場合、分子量はおおよそ106,000) の中の水素1つ分の差が明瞭に区別でき

るといふ、中性子結晶構造解析ならではの結果である。今回は酸性条件下で作製した結晶を実験に用いたため、この結果は CuNIR の反応中心では酸性環境下でさえ水酸化物イオンが安定的に存在できることを示唆している。「水酸化物イオンの結合した銅イオンが活性中心に残される」という反応機構が理論化学の立場から提唱されてきたが、水酸化物イオンの結合した銅中心が CuNIR 中で安定して存在できることを示す実験的証拠はなかった。われわれの構造はまさにそうした構造が安定に存在できることを示唆しており、量子化学計算の結果を支持するものである。また、水酸化物イオンが結合したタンパク質中の銅サイトは CuNIR 以外のさまざまな銅含有タンパク質でも存在可能性が指摘されてきた構造である。直接的に可視化されたのは今回のケースが初めてであり、本成果は CuNIR 以外の銅含有タンパク質の構造機能相関研究にも新たな知見を与えるものである。

最後に、中性子構造解析では軽水素と重水素との区別が可能であることを利用して、今回のデータからさらなる構造情報を引き出すことができたことについて述べる。一般的にタンパク質中の柔軟な部分では水素-重水素置換が起こりやすく、剛直な部分や他の分子と強く相互作用している界面ではそれが起こりにくいと言われている。例えば、われわれが用いたような軽水素サンプルを重水素置換したサンプルでは、フレキシブルなループ構造中ではアミド

N 原子上の水素は基本的にはほぼ完全に重水素に置き換わる。いっぽう、 β シートに存在するアミド N 原子上の水素は重水素に置換されにくい。こうした水素-重水素置換率は、構造精密化プログラム phenix.refine¹²⁾の占有率精密化機能を用いて見積もることができる。CuNIR は分子表面から T1Cu で電子を受け取り、この電子がタンパク質内部を活性中心の銅部位 T2Cu へと流れて亜硝酸還元反応に消費されるが、量子化学計算を用いた研究¹³⁾で、タンパク質内の主たる電子移動経路は非共有結合性の水素結合を介するものであると目されていた。われわれは、この電子移動反応経路上にあるヒスチジン (His134) が形成する水素結合に関与する水素では、重水素置換効率が周囲と比べて有意に低いことを見出した (Fig. 5)。これは、この水素原子が関与する水素結合が強固であることを示している。強固な水素結合は電子移動反応についての Marcus 理論における再配向エネルギー項を小さくすると考えられるため、電子移動に有利に働くことが予想される。

4. これからの展望

ごく最近 AlphaFold¹⁴⁾や RoseTTAFold¹⁵⁾といった高精度なタンパク質立体構造予測プログラムの登場によってタンパク質の立体構造を実験データが無くとも予測することができるようになってきた。予測構造が示すアミノ酸残基の配置から酵素反応機構を予測することも可能なようである¹⁶⁾。しかしながら、CuNIR についてこれまで多くの X 線結晶構造 (そのうちいくつかは 1 Å 分解能を超える超高分解能データである) が蓄積されてきたにもかかわらず反応機構がまだに議論的になっていることからわかるように、立体構造を知ることは残念ながら酵素を完全に理解することと同値ではない。われわれが明らかにした CuNIR の中性子結晶構造は、これまで蓄積されていた生化学実験データと矛盾しないばかりか、量子化学計算によって予測されていた結果とも辻褄の合うものであった。化学の視点から酵素反応を完全に理解するという目的の下では、X 線結晶構造解析や中性子結晶構造解析を利用し、水素ひとつ分の違いを直接的に検出したり量子化学計算との整合性が取れた構造情報を得たりといった精密構造解析をおこなう重要性は、むしろ今後ますます高まるだろう。先にも述べたように、中性子の散乱能は低い大型結晶化が難しい膜タンパク質の中性子結晶構造解析は、様々な取り組みが行われているものの、依然として不可能に近い状態である¹⁷⁾。また、結晶格子体積が大きくなると、回折点の重なりや単位体積当たりの格子数が少ないことに起因する回折強度の低下といった問題から高分解能データの取得が難しくなる。つまり、分子量の大きなタンパク質やタンパク質複合体の中性子結晶構造解析は非常に困難である。一方で近年、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) を用いた単粒子解析法で得られた高分解能データを

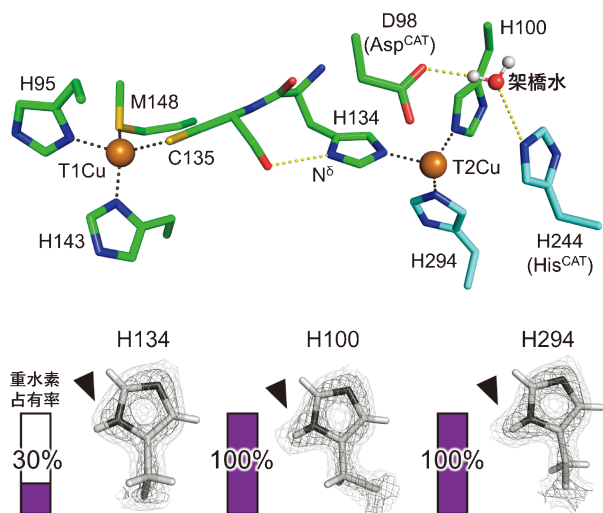


Fig. 5 (Color online) Pathway of intramolecular electron transfer (ET). Upper) Structures of T1Cu and T2Cu. Hydrogen bonds and coordination bonds are shown by yellow and black dotted lines, respectively. A quantum chemical calculation suggests that the main ET pathway from T1Cu to T2Cu contains a hydrogen bond formed between the carbonyl O atom of Cys135 and the N δ atom of His134. Lower) Differences of the neutron scattering length density maps of three histidine residues that coordinate to T2Cu. The maps show that the deuterium exchange rate on the N δ atom of His134 is significantly lower than those of other histidine residues.

用いて水素原子位置を可視化できることが報告されており¹⁸⁻²⁰⁾, 膜タンパク質や分子量の大きいタンパク質, タンパク質複合体の水素原子位置の直接可視化に対しては Cryo-EM の利用が一般的になるかもしれない。今後は X 線, 中性子, 電子線を相補的に利用する「マルチプローブ精密構造生物学」がこれまで以上に重要になってくるだろう。

謝辞

本研究の中性子回折実験は茨城県中性子ビームライン県プロジェクト研究において, J-PARC・MLF の iBIX を用いて実施し, X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構 (KEK) のフォトンファクトリーアドバンストリング (AR-NE3A) にて実施した。

参考文献

- 1) A. Nakamura *et al.*: *Sci Adv.* **1**, e1500263 (2015).
- 2) J. Yano *et al.*: *Proc Natl Acad Sci.* **102**, 12047 (2005).
- 3) I. Schlichting: *IUCrJ* **2**, 246 (2015).
- 4) Y. Fukuda *et al.*: *Proc Natl Acad Sci.* **117**, 4071 (2020).
- 5) J. W. Godden *et al.*: *Science* **253**, 438 (1991).
- 6) M. E. P. Murphy *et al.*: *J Biol Chem.* **272**, 28455 (1997).
- 7) E. Tocheva *et al.*: *Science* **304**, 867 (2004).
- 8) S. Ghosh *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10310 (2007).
- 9) S. Ghosh *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 277 (2009).
- 10) P. V. Afonine *et al.*: *Acta Cryst.* **D66**, 1153 (2010).
- 11) T. P. Halsted *et al.*: *IUCrJ* **6**, 761 (2019).
- 12) P. V. Afonine *et al.*: *Acta Cryst.* **D68**, 352 (2012).
- 13) R. G. Hadt *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15045 (2014).
- 14) J. Jumper *et al.*: *Nature* **596**, 583 (2021).
- 15) M. Baek *et al.*: *Science* **373**, 871 (2021).
- 16) K. Tunyasuvunakool *et al.*: *Nature* **596**, 590 (2021).
- 17) L. Coats: *Acta Cryst.* **D76**, 326 (2020).
- 18) T. Nakane *et al.*: *Nature* **587**, 152 (2020).
- 19) K. M. Yip *et al.*: *Nature* **587**, 157 (2020).
- 20) K. Yamashita *et al.*: *Acta Cryst.* **D77**, 1282 (2021).

著者紹介



福田庸太

大阪大学大学院薬学研究科創成薬学専攻助教

E-mail: y_fukuda@phs.osaka-u.ac.jp

専門：構造生物化学

【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年コロンビア大学ポスドクトラルフェロー、2016年大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻助教、2019年より現職。2020年より先導的学際研究機構生命医科学融合フロンティア研究部門兼任。



井上 豪

大阪大学大学院薬学研究科創成薬学専攻教授

E-mail: t_inoue@phs.osaka-u.ac.jp

専門：構造生物学

【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年同工学研究科教授、2018年より現職。2001-2004科学技術振興機構さきがけ研究員兼務。



平野 優

量子科学技術研究開発機構量子生命科学研究所 主幹研究員

E-mail: hirano.yu@qst.go.jp

専門：構造生物学

【略歴】

2007年3月京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了。博士(理学)。2014年茨城大学博士研究員、2009年京都大学博士研究員、2013年日本原子力研究開発機構博士研究員、2016年量子科学技術研究開発機構主任研究員、2017年より現職。2017-2021科学技術振興機構さきがけ研究員兼務。



玉田太郎

量子科学技術研究開発機構量子生命科学研究所グループリーダー 上席研究員

E-mail: tamada.taro@qst.go.jp

専門：構造生物学

【略歴】

1996年3月東京工業大学大学院総合理工学研究科博士課程単位取得退学。1998年博士(理学)。1996年キリンビール株式会社研究員、2004年日本原子力研究所(現日本原子力研究開発機構)副主任研究員、2007年同サブグループリーダー・研究副主幹、2010年同グループリーダー・研究主幹、2016年より現職。



日下勝弘

茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター 教授

E-mail: katsuhiko.kusaka.1129@vc.ibaraki.ac.jp

専門：中性子構造生物学、結晶学

【略歴】

1999年3月姫路工業大学大学院 理学研究科博士課程修了。博士(理学)。1999年CREST研究員、2000年フランクフルト大学研究員、2002年学振特別研究員(受入機関：KEK, PF)、2005年JAEA 特定課題推進員、2007年茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター産学官連携准教授、2016年より現職。

Neutron crystallography reveals the reaction mechanism of copper-containing nitrite reductase

Yohta FUKUDA Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Yu HIRANO Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology, 2-4 Shirakata, Tokai, Ibaraki 319-1106, Japan

Katsuhiro KUSAKA Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University, 162-1 Shirakata, Tokai, Ibaraki 319-1106, Japan

Tsuyoshi INOUE Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Taro TAMADA Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology, 2-4 Shirakata, Tokai, Ibaraki 319-1106, Japan

Abstract Copper-containing nitrite reductase (CuNIR) catalyzes the one-electron reduction reaction from nitrite to nitric oxide, which is a key step in the denitrification process. The conflicting reaction mechanisms of CuNIR have been proposed by X-ray crystal structures and quantum chemical calculations. We have performed neutron crystal structure determination of CuNIR to understand the precise reaction mechanism by observing hydrogen atoms. The high-resolution neutron crystal structure reveals that a hydroxide ion is bound to the Cu ion consisting of the catalytic center. The result from the neutron crystal structure agrees with the reaction mechanism proposed by the quantum chemical calculation. In addition, the analysis of hydrogen-deuterium exchange indicated that a hydrogen bond, which is an expected electron pathway between two Cu ions, forms a rigid interaction.