

SACLA 時分割結晶構造解析による動的構造生物学研究
～酵素反応の可視化に向けた分子動画～

久保 稔

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

要旨

SACLAによりタンパク質の時分割結晶構造解析が実用化されつつある。この手法がさらに発展し、構造生物学に真のブレイクスルーを生み出すためには、今後、越えなければならない課題が2つある。一つは、酵素などの非光感受性タンパク質への適用拡大であり、もう一つは、結晶パッキングのダイナミクスへの影響の評価である。筆者らはこれらの課題に取り組むべく、時分割分光を時分割結晶構造解析と組み合わせながら、ケージド化合物を用いた酵素反応観測を試みた。本稿ではその研究を概説するとともに、今後の展望についてふれたい。

1. はじめに

生体内には、多種多様なタンパク質が存在し、物質代謝やエネルギー代謝などの生命現象を支えている。タンパク質とは20種類のアミノ酸が鎖状に連なった高分子であり、アミノ酸の種類の組み合わせ（アミノ酸配列）によって安定な立体構造が決まる。個々のタンパク質の機能は、個々のタンパク質に特有の構造に起因するため、タンパク質の機能メカニズムを基礎科学として理解し、さらに創薬や人工タンパク質の設計といった応用展開に繋げるためには、タンパク質の構造を解析することがまず必要である。タンパク質の構造を原子分解能で解析できる強力な手法は、X線結晶構造解析である。これまでに10万個を超えるタンパク質の構造が解かれており、まさに構造生物学を牽引してきた手法であろう。

しかし、X線結晶構造解析は動的計測においてはまだまだ十分に力を発揮していない。タンパク質は、高分子ゆえの柔らかさを利用して、大域のかつ局所的に、準安定な状態に構造を変化させながら機能している。したがって、タンパク質の構造変化を動的に計測することは本質的に重要である。これまでタンパク質の構造変化の動的計測を担ってきたのは、X線結晶構造解析ではなく、主に分子分光法であった。分子科学の延長線上でタンパク質の動的計測の発展があったと言える。しかしX線自由電子レーザーが出現し、時分割結晶構造解析が実用化されるにつれて、状況は一変しつつある。構造生物学と分子科学はより緊密な関係になりつつある。

SACLAにおいて時分割結晶構造解析の幕開けを飾ったのは、バクテリオロドプシンの光反応の研究であった¹⁾。測定スキームは、シリアルフェムト秒X線結晶構造解析(SFX)^{2,3)}をベースにしたポンプ-プローブ法であった。すなわち、連続フローする微結晶試料に対して、光パルス(ポンプ光)照射によって反応を誘起し、その一定遅延時

間(Δt 秒)後にXFELパルス(プローブ光)を照射することで、反応中間体の回折像を記録する。バクテリオロドプシンの研究で注目すべき点は、ナノ秒からミリ秒と幅広い時間スケールにおいて、13点の時刻で構造変化を追跡し、それを「動画」として見せたところにある。そして、構造全体を観測できる本手法の強みを遺憾なく発揮した。一般に時分割分光では、タンパク質中の観測可能な部位(共鳴局所)の変化で反応中間体を特徴付け、それらの間の遷移を時定数という数値で近似する。しかし、時定数というパラメーターの背後に、タンパク質の局所的かつ大域的な動きのドラマがあることを(分光学出身の)筆者は目の当たりにした。

バクテリオロドプシンの次には、光化学系IIの光反応やチトクロム酸化酵素のCO光解離が原子分解能で捉えられ^{4,5)}、時分割結晶構造解析の巨大膜タンパク質への適用が示された。これらの研究内容はすでに本放射光学会誌で詳細に報告されているが⁶⁻⁸⁾、相次ぐ時分割結晶構造解析の成功は、昨今のクライオ電子顕微鏡や高速AFMの発展と相まって、“動的構造生物学”発展の機運を大いに高めている。数年前からはナノ秒OPOベースのポンプ光学系がSACLAに常設されており⁹⁾、300-2000nmの励起波長で比較的簡便にポンプ-プローブ実験ができる環境が整備されている。現在、光感受性タンパク質の時分割結晶構造解析はルーチン化に向かっており、と言ってもよいであろう。

しかし、時分割結晶構造解析がさらなるブレイクスルーを生み出すには、まだ越えなければならない課題が2つ存在する。一つは、非光感受性タンパク質への適用拡大である。全タンパク質の内、99%以上は光に無関係に働く。リガンド(基質やシグナル分子)との結合が刺激となって働く大多数のタンパク質をいかに計測するかは、世界的にも大きな課題になっている。酵素反応の観測は、一つの試金石である。もう一つの壁は、結晶パッキングのダイナミクスへの影響をどのように評価するか、である。これ

は結晶を用いる以上避けては通れない課題だが、多くの研究者が気にかけているところである。筆者らは、最近これら2つの課題に取り組むべく、時分割分光を時分割結晶構造解析と組み合わせながら、酵素反応の観測を試みた¹⁰⁾。本稿ではその研究について紹介したい。

2. ケージド化合物を用いた酵素反応トリガー

非光感受性タンパク質の時分割分光では、stopped flow 法や mixed flow 法などの測定スキームが確立しており、近年はマイクロ流路を用いた mixer 開発もなされている。時分割結晶構造解析でも、タンパク質微結晶とリガンド溶液を mixing するタイプの時分割結晶構造解析が進められており、すでに数報の報告がある¹¹⁻¹³⁾。ただし、タンパク質微結晶とリガンドを瞬時に（～ミリ秒）混合しても、実際にはリガンドが微結晶内に浸潤して拡散する時間が律速になる。したがって、いかに小さな微結晶で実験できるかが一つの鍵となる。しかし、結晶のサイズを小さくすると回折分解能が低下するため、空間分解能と時間分解能のトレードオフもあるであろう。

一方で、筆者らはケージド化合物に注目した¹⁴⁾。ケージド化合物とは、光励起によりリガンドを放出する化合物である。あらかじめケージド化合物を微結晶内に浸潤させておけば、シンプルにポンプ-プローブ法で時分割実験を実行できる（Fig. 1）。ケージド化合物が微結晶中の水溶液領域に拡散した状態から反応をスタートできるので、mixing タイプの測定に見られる dead time はない。そこで筆者らは、NO 還元酵素（P450nor）をモデルに、ケージド化合物を活用した時分割結晶構造解析を試みた。

P450nor は、Cys 配位のヘム活性中心を持ち、NADH（還元剤）を利用して NO を N₂O にまで還元する酵素である（2NO + NADH + H⁺ → N₂O + NAD⁺ + H₂O）¹⁵⁾。この NO 還元反応は地球上の窒素循環を担っており、生成物 N₂O が温暖化かつオゾン層破壊の原因ガスである点で、環境科学的に注目されている¹⁶⁾。これまでに結晶構造解析、分光解析、計算機シミュレーションによって、“Fe³⁺+

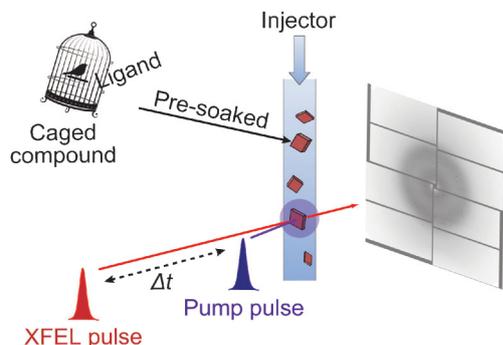


Fig. 1 (Color online) Time-resolved SFX using protein microcrystals soaked with caged compound.

NO 型”及びその二電子還元型である“中間体 I”を経由する反応サイクルが提案されている（Fig. 2）¹⁷⁾。しかし、動的構造解析に基づく詳細な反応機構はまだ明らかにされていない。光照射により基質 NO を放出するケージド NO を用いれば、P450nor の時分割結晶構造解析が可能であろう。筆者らはケージド NO として、Fig. 3 に示す化合物を用いた¹⁸⁾。この化合物は紫外光照射後、マイクロ秒程度で二当量の NO を放出するケージド NO である（308 nm での量子効率1.4）¹⁰⁾。ここで、ケージド化合物を用いる場合、ケージド化合物からのリガンド放出時間が、時分割測定の事実上の時間分解能を与える点に注意しておきたい。

3. 時分割顕微分光測定による結晶相での酵素反応解析

3.1 結晶相での酵素活性

時分割結晶構造解析を進める前に、筆者らはまず、P450nor の酵素反応が微結晶中でも進むのかどうかを顕微赤外分光で検証した¹⁰⁾。NADH とケージド NO を浸潤させた P450nor 微結晶（20–50 μm 角、<10 μm 厚）に対して、紫外光を照射し、その後の赤外吸収スペクトルを SPring-8/BL43IR で測定した。その結果、生成物 N₂O の

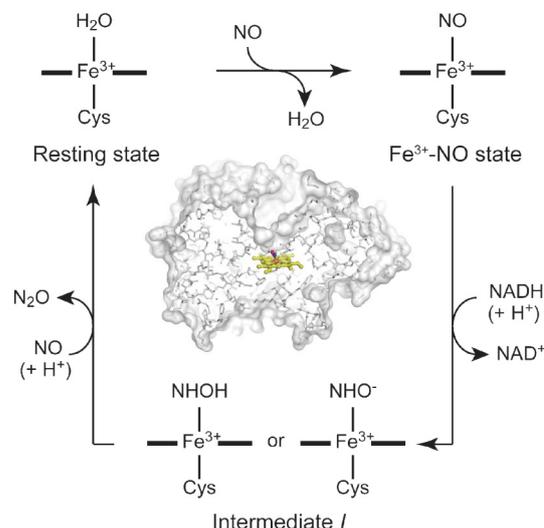


Fig. 2 (Color online) Reaction cycle of P450nor. This figure is modified from Nat. Commun. 8, 1585 (2017).

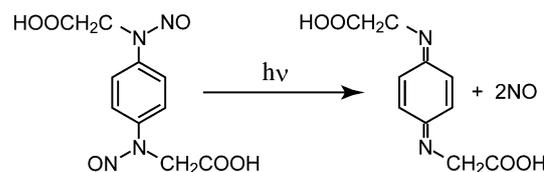


Fig. 3 Caged NO photolysis. This figure is modified from Nat. Commun. 8, 1585 (2017).

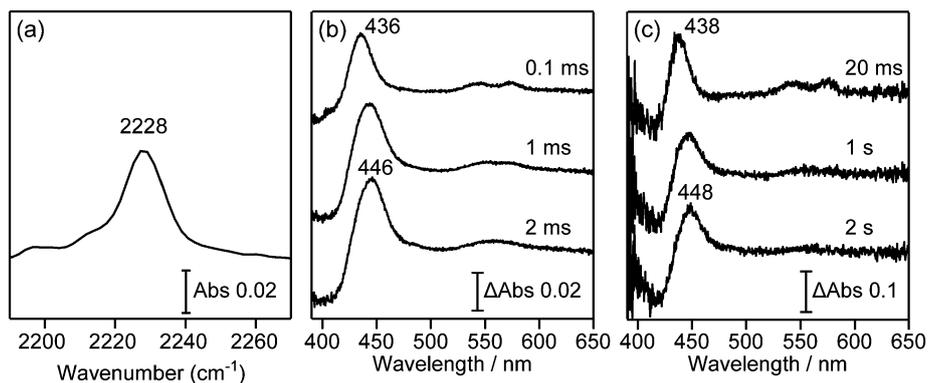


Fig. 4 Microspectroscopic analyses of P450nor. (a) IR spectrum of P450nor microcrystals after the catalytic reaction. (b,c) Time-resolved visible difference spectra of P450nor during the catalytic reaction. (b) In solution. (c) In microcrystal. The difference was calculated by subtracting the spectrum recorded prior to caged NO photolysis. This figure is modified from Nat. Commun. 8, 1585 (2017).

NN伸縮振動 (2228 cm^{-1}) が検出された (Fig. 4a)。このことは微結晶中でも酵素反応が進行することを示している。ただし、 N_2O ガスの微結晶外への拡散の問題から、代謝回転数までは不明である。

3.2 結晶相での反応ダイナミクス

次に、微結晶中での反応ダイナミクスを計測するために、顕微視吸収分光光度計を自作し、紫外光照射後のP450norの時分割吸収スペクトルを測定した¹⁰⁾。P450norのヘム活性中心は、各反応中間体に特有の可視吸収ピークを示すため、酵素反応の追跡に可視吸収分光が有効であった。溶液試料の時分割スペクトルを Fig. 4(b) に示す。紫外光照射後 ($t=0$)、サブミリ秒で $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ 型 ($\lambda=436\text{ nm}$) が生成し、ミリ秒で NADH と反応して中間体 I ($\lambda=446\text{ nm}$) が生成する様子がわかる。この結果は過去の stopped flow 測定の結果と一致する¹⁹⁾。次に、微結晶試料の時分割スペクトルを Fig. 4(c) に示す。観測されたピーク位置は溶液試料のそれとほぼ同じであった。このことは、結晶相でも溶液相と同様に、 $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ 型及び中間体 I を経由して反応が進行することを示している。

ただし、結晶相では中間体 I の生成時間が秒のオーダーである点に注意されたい。微結晶の時分割スペクトルは最小遅延時間 20 ms で測定したため、結晶相での $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ 型の生成速度はまだ不明であるが、少なくとも中間体 I の生成速度は溶液相のそれと比べて桁違いに遅くなっている。これは結晶パッキングにより分子の動きが制限されたためであろう。実際に P450nor の結晶構造をよく見ると、NADH チャンネルの入り口に隣の P450nor 分子が存在しており (Fig. 5)、結晶相では NADH の結合速度が大きく低下している可能性が考えられる。筆者らは以上の分光データに基づいて、まずは $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ 型の構造解析を目標に、遅延時間 20 ms の時分割結晶構造解析を計画した。ここで溶液試料の分光データに基づいて時分割結晶構造解析を行なうと、結果の解釈を間違える危険性がある点に注意したい。

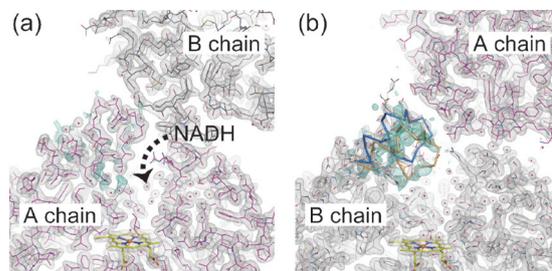


Fig. 5 (Color online) NADH channel entrance of two resting P450nor molecules in the asymmetric unit. (a) A chain. (b) B chain. Multiple conformations are present in the B chain. This figure is modified from Nat. Commun. 8, 1585 (2017).

4. 酵素反応中間体の時分割結晶構造解析

ケージド NO と NADH を浸潤させた P450nor 微結晶に対して、ポンプ-プローブ型の時分割 SFX を行なった¹⁰⁾。紫外光照射前および照射 20 ms 後の P450nor のヘム活性中心の構造を Fig. 6 に示す。20 ms の構造には、基質 NO に由来する電子密度が明瞭に観測された。Fig. 6 には、NADH 非存在下で調製した $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ 型の SPring-8 による低温構造解析も示してある (吸収線量 0.72 MGy)。SACLA の構造では NO は少し傾いた配向をとっており、 Fe-N-O の成す角は 158° であったが、SPring-8 の構造では 147° であった。 $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ 型は、 $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ 型に比べて Fe-N-O 角が小さくなることが知られているため、SPring-8 で決定した構造は X 線損傷 (還元) の影響が考えられる。一方、SACLA で決定した構造は、フェムト秒露光の破壊前回折計測 (“Diffraction before Destruction”)²⁰⁾ による無損傷構造と考えられる。すなわち、SACLA を用いることにより、常温無損傷でまさに反応途中の構造が捉えられたわけである。

P450nor の $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ 型の構造では、(X 線損傷のためではなく) 近傍のアミノ酸残基との立体反発によって、

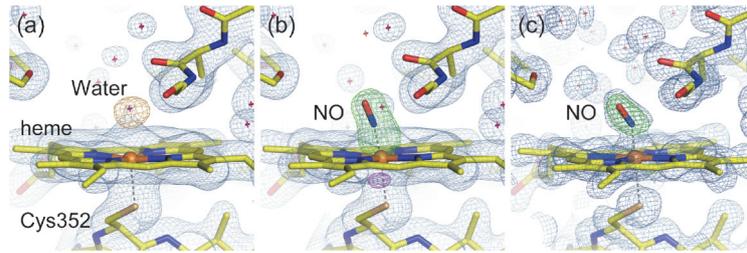


Fig. 6 (Color online) Structures of (a) resting state and (b) Fe^{3+} -NO state of P450nor determined at room temperature using SACLA. (c) Structure of Fe^{3+} -NO state determined at 100 K using SPring-8 with the X-ray dose of 0.72 MGy. This figure is modified from Nat. Commun. 8, 1585 (2017).

NOは少し傾いて配位していることが本実験で明らかにされた。一般に Fe^{3+} -NO型のヘムは、NOが直立すると Fe^{2+} -NO $^+$ の電子構造をとるが、この電子構造だと水酸化物イオンと反応して分解されやすいことが知られている(Fe^{2+} -NO $^+$ +OH $^-$ → Fe^{2+} +NO $_2^-$ +H $^+$)²¹⁾。P450norのヘムポケットは、NADHの結合のために溶媒に比較的露出しているため、水酸化物イオンの攻撃を受けやすい。したがって、P450norは Fe^{3+} -NO型を安定に保つために、NOを傾ける戦略をとっているであろう。

5. おわりに

P450norを用いた研究により、ケージド化合物を用いた時分割結晶構造解析の実用性を示すことができた。ケージド化合物は他にも、ケージドATP、ケージドH $^+$ 、ケージド電子(光感受性電子ドナー)、ケージドO $_2$ など生体反応と関連した多種多様なものが開発されており^{14,22-25)}、またタンパク質のケージド化も進んでいる²⁶⁾。今後、ケージド化合物を活用した時分割結晶構造解析が大きく進展することを期待したい。ただし、ケージド化合物を用いる場合、ケージド化合物の濃度や量子効率、ポンプ光の強度、微結晶のサイズ(結晶内部の励起率)が、反応中間体の占有率を決める上で重要なパラメーターになる。筆者らはそれらの条件を顕微分光により決定した。詳しくは原著論文の補足資料を参照されたい¹⁰⁾。またP450norの研究では、結晶パッキングの反応ダイナミクスへの影響も、顕微分光で評価した。時分割結晶構造解析は、実際に結晶中で起こることを分光でモニターし、機能研究と結びつけながら進めることが極めて重要であることが示されたと思う。時分割結晶構造解析と時分割分光の協調は、今後ますます重要になってくるであろう。

P450norの研究の次のターゲットは、中間体Iである。しかしP450norの研究をする中で、時分割SFXでは数十ms秒よりも遅い過程は観測が難しいことが判明した。長い遅延時間の測定には、微結晶をフローせず、チップやテープ上に微結晶を固定して測定するスキーム(Fixed-Targetタイプ)が適している²⁷⁻²⁹⁾。そのような測定スキームは顕微分光測定にも適していると思われる。今後の一層

の技術開発に期待したい。

謝辞

本研究は、理化学研究所放射光科学研究センター SACLA 利用技術開拓グループ、生命系放射光利用システム開発チーム、高輝度光科学研究センター XFEL 利用研究推進室、兵庫県立大学大学院生命理学研究科細胞制御学 II 分野をはじめ多くの方々との共同研究による成果であり、ここに深く感謝いたします。

参考文献

- 1) E. Nango *et al.*: Science **354**, 1552 (2016).
- 2) H. N. Chapman *et al.*: Nature **470**, 73 (2011).
- 3) I. Schlichting: IUCrJ **2**, 246 (2015).
- 4) M. Suga *et al.*: Nature **543**, 131 (2017).
- 5) A. Shimada *et al.*: Sci. Adv. **3**, e1603042 (2017).
- 6) 南後恵理子, 久保稔, 岩田想: 放射光学会誌 **30**, 218 (2017).
- 7) 菅倫寛, 秋田総理, 菅原道泰, 久保稔, 岩田想, 沈建仁: 放射光学会誌 **30**, 228 (2017).
- 8) 島田敦広, 久保稔, 馬場清喜: 放射光学会誌 **31**, 226 (2017).
- 9) M. Kubo *et al.*: J. Synchrotron Rad. **24**, 1086 (2017).
- 10) T. Tosha *et al.*: Nat. Commun **8**, 1585 (2017).
- 11) J. R. Stagno *et al.*: Nature **541**, 242 (2017).
- 12) C. Kupitz *et al.*: Struct. Dyn. **4**, 044003 (2017).
- 13) I. Ishigami *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **116**, 3572 (2019).
- 14) G. C. R. Ellis-Davies: Nat. Methods **4**, 619 (2007).
- 15) H. Shoun, S. Fuchinobu, L. Jiang, S. W. Kim and T. Wakagi: Philos. Trans. R. Soc. B **367**, 1186 (2012).
- 16) A. R. Ravishankara, J. S. Daniel and R. W. Portmann: Science **326**, 123 (2009).
- 17) C. Riplinger, E. Bill, A. Daiber, V. Ullrich, H. Shoun and F. Neese: Chem. Eur. J. **20**, 1602 (2014).
- 18) S. Namiki, T. Arai and K. Fujimori: J. Am. Chem. Soc. **119**, 3840 (1997).
- 19) Y. Shiro, M. Fujii, T. Iizuka, S. Adachi, K. Tsukamoto, K. Nakahara and H. Shoun: J. Biol. Chem. **270**, 1617 (1995).
- 20) R. R. Neutze, R. R. Wouts, D. D. van der Spoel, E. E. Weckert and J. J. Hajdu: Nature **406**, 752 (2000).
- 21) D. P. Linder and K. R. Rodgers: Inorg. Chem. **44**, 1367 (2005).
- 22) M. L. Donten, P. Hamm and J. VandeVondele: J. Phys. Chem. B **115**, 1075 (2011).
- 23) M. Lübber and K. Gerwert: FEBS Lett. **397**, 303 (1996).
- 24) C. Ludovici, R. Fröhlich, K. Vogtt, B. Mamat and M. Lüb-

- ben: Eur. J. Biochem. **269**, 2630 (2002).
- 25) 古田寿昭, 鈴木商信: 生化学 **83**, 966 (2011).
- 26) J. Spradlin *et al.*: Biochim. Biophys. Acta **1864**, 1732 (2016).
- 27) F. D. Fuller *et al.*: Nat. Methods **14**, 443 (2017).
- 28) D. A. Sherrell, A. J. Foster, L. Hudson, B. Nutter, J. O’Hea, S. Nelson, O. Paré-Labrosse, S. Oghbaey, R. J. D. Miller and R. L. Owen: J. Synchrotron Rad. **22**, 1372 (2015).
- 29) P. Roedig *et al.*: Sci. Rep. **5**, 10451 (2015).

著者紹介



久保 稔

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 教授
E-mail: minoru@sci.u-hyogo.ac.jp

専門: 生物物理学, 分子分光学

【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), 理化学研究所専任研究員などを経て, 2018年7月より現職。

Dynamic structural biology based on time-resolved X-ray crystallography at SACLA—Toward “molecular movies” to visualize enzymatic reactions—

Minoru KUBO Graduate School of Life Science, University of Hyogo
3-2-1 Kouto, Kamigori, Ako, Hyogo 678-1297, Japan

Abstract Time-resolved X-ray crystallography using SACLA is increasingly being applied to study protein dynamics. However, to make a breakthrough in structural biology, there are still two issues to be considered. One is the broader application to proteins other than photo-driven proteins, such as enzymes. The other is the evaluation of crystal packing effects on the dynamics. To overcome these issues, we recently tried visualizing the catalytic reaction of an enzyme using caged compound, by time-resolved X-ray crystallography combined with time-resolved *in crystallo* spectroscopy. Here, we will describe our attempt and future perspectives towards dynamic structural biology.