

研究終了報告書

「時分割 XFEL 結晶解析で可視化する金属酵素の動的構造活性相関」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：溝端 栄一

1. 研究のねらい

生体高分子(タンパク質・核酸・酵素)がはたらく時に起こる立体構造変化の全貌を、原子レベルの解像度で可視化し理解することは、生命科学の重要な課題のひとつである。最先端の量子技術、X線自由電子レーザー(XFEL)を応用した時分割連続フェムト秒結晶構造解析法(TR-SFX)が誕生し、タンパク質が機能する際の動きを原子分解能で観察可能な時代に入った。XFELの極短パルス特性を活かすことで、室温かつ放射線損傷のない生理条件に近い状態でタンパク質の構造を決定することもできる。

TR-SFXの計測では、結晶試料中の多数のタンパク質/酵素の分子の反応を同時に開始させ、反応中の分子構造変化を同期的に進ませることで、反応過程の構造遷移の情報を増幅することが求められる。これを達成するには、通常、多くの試行錯誤と条件検討を経て、試料タンパク質の種類ごとに、その機能に最適化した計測手法の開発が必要となる。

本さきがけ研究は、電子伝達をとまなう酸化還元酵素に汎用的に適用可能な、新しいTR-SFXの基盤技術の開発を目指した。呼吸鎖や光合成の電子伝達系、あるいは、窒素循環過程に関与する微生物には、電子供与体から電子を受け取ることで機能する多様な酸化還元タンパク質/酵素が存在する。本研究はそれらタンパク質/酵素の計測への展開を見据える。

本実験においては、亜硝酸イオン(NO_2^-)を一電子還元して一酸化窒素(NO)を生じる反応を触媒する銅含有亜硝酸還元酵素(CuNiR)をモデルに用い、CuNiRを同期的に還元して触媒反応を開始させるための2種類のシステムの開発を試みた。ひとつは、可視光による励起で電子を放出するルテニウム(Ru)錯体の性質を利用し、CuNiRの反応を誘起するスイッチとして利用するシステムである(研究テーマA)。もうひとつのアプローチは、電気化学的に酵素を還元して反応を誘起するシステムである(研究テーマB)。本研究を通し、生命科学を新たなステージに進める革新的知見を与えることのできる、酵素化学における新しい解析基盤を創出する。

2. 研究成果

(1) 概要

研究テーマAでは、酵素反応を誘起する低分子スイッチとしてルテニウム錯体を用い、これに青色光を照射することで放出された電子で酸化還元金属酵素CuNiRを還元してその反応を開始させる測定システムの構築を試みた。このシステムが構築可能であれば、SACLAなどのXFEL施設に既存のポンプ・プローブシステムをそのまま適用して、TR-SFX計測を実施できる利点がある(図1)。条件検討の結果、観測されたCuNiRの反応速度は通常溶液中で観られる最大速度の約1000分の1と小さかったものの、ルテニウム錯体からの電子放出によって、CuNiRを還元することが可能であることが示された。

一方、研究テーマBでは、酵素溶液に電流を流すことで、電気化学的に酵素を還元して反応を誘起するシステムの開発を試みた。この手法は、将来的には微結晶を充填したイン

ジェクターノズルの先端に電極を装備し、酵素の微結晶が電極部位を通過する瞬間に一気に通電して、酵素の金属中心を還元して反応を制御する装置の開発をとまなう。ポテンシostatを用いて電気化学測定を行ったところ、通常溶液中での CuNiR の最大速度の1000分の1程度の速度を確認できた。

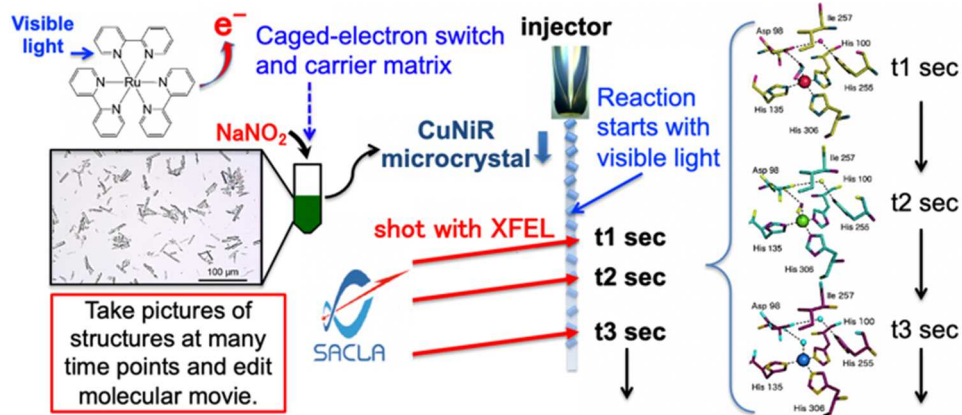


図1. 時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析法 (TR-SFX) の概略図。

(2) 詳細

研究テーマA「青色光-ルテニウム錯体制御による反応誘起システムの開発」

CuNiR の反応を誘起するスイッチとしてルテニウム錯体を用い、これに青色光 (450nm) を照射することで放出された電子で CuNiR を還元してその反応を開始させる測定システムの構築を目指した(図2)。精製した酵素の水溶液と結晶状態で触媒活性を評価した。活性測定は、酵素依存的な反応を直接観察するため、基質 NO_2^- の濃度の低下を追跡することで実施した。 NO_2^- の定量は Griess 法により分光的に行った。この際、アーティファクトによって NO_2^- の濃度変化は起こらず、酵素とルテニウム錯体と青色光の照射のみ起こることを確認してアッセイを進め、再現性を確保した。CuNiR の活性は反応系への微量な酸素の混入によって阻害されるため、嫌気チャンバーを設置して、酵素反応を嫌気雰囲気下で進行させた。

ルテニウム錯体を利用して 450nm の可視光制御で CuNiR の還元反応を開始できることを初めて観測することに成功した。観測された反応速度は通常溶液中での最大速度の 1000分の1程度であった。青色光照射によりルテニウム錯体放出される電子が、十分に CuNiR の電子受容サイトに到達していないためと考え、反応系にレドックスメディエーターの添加、導電性の銀ナノ粒子、カーボンペースト、イオン液体を懸濁させてアッセイを行ったところ、反応速度は2倍まで改善がみられた。

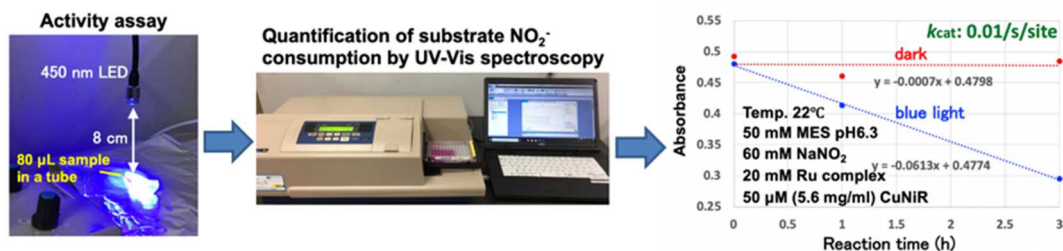


図2. 青色光-ルテニウム錯体依存的な酵素反応の解析。

研究テーマB「電気化学制御による反応誘起システムの開発」

酵素反応を誘起する別のアプローチとして、電気化学的手法を検討した(図3)。上記テーマAと同様、酵素の水溶液と結晶状態で活性を評価した。ポテンシostatを用いて通電しつつ活性測定を行った結果、通常の溶液中でのCuNiRの最大速度の1000分の1程度の速度が観測され、酵素の電極への固定化を伴わずに電気化学的にCuNiRの反応を誘起できることを初めて確認した。酵素溶液量に対して電極表面積が小さく、電極から供給される電子量が少ないためと考えられたため、今後、マイクロサイズの反応セルを構築して検討を進める。

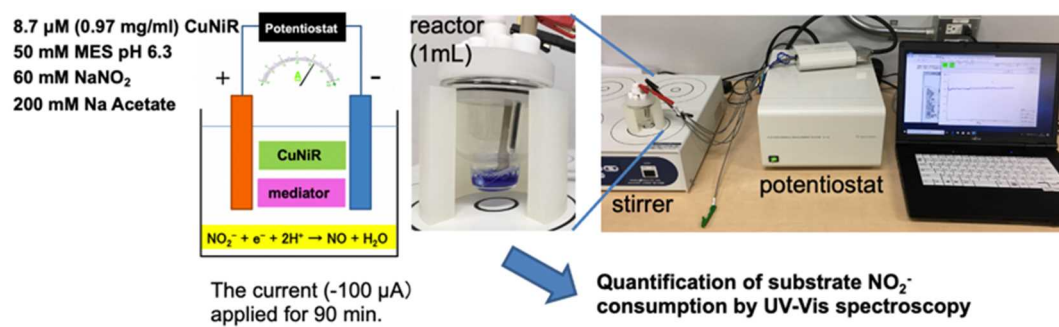


図3. 電流依存的な酵素反応の解析.

3. 今後の展開

XFEL を応用した TR-SFX による動的構造計測においては、結晶を構成する多数のタンパク質の反応を同時に開始させ、タンパク質の動きを同期的に進行させることが必要である。これにより、反応過程での構造変化の情報を精度よく集めることができる。本研究では、ルテニウム錯体からの電子放出、または、電極を用いた通電によって、酸化還元金属酵素 CuNiR を還元することが技術的に可能であることを示した。今後、還元効率の改良を進めることが、XFEL 施設での TR-SFX 実験の実用化に向けた課題である。テーマAでは、電子放出のターンオーバー頻度を向上させるための、金属錯体、メディエーター、添加剤の組み合わせや濃度のスクリーニングと最適化が必要である。テーマBでは、マイクロサイズの反応セルを構築して検討を進める。反応誘起効率が改良された後は、XFEL 施設のサイエンティストやエンジニアと連携を図り、反応誘起システムをXFEL施設に実装するためのステップに入る。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

ルテニウム錯体からの電子放出を青色光により制御してCuNiRの還元反応を開始できることを初めて観測した。並行して、酵素の電極への固定化を伴わずに電気化学的にCuNiRの反応を誘起できることを見出した。これら2種類の実験手法で検出された酵素反応速度はいずれも、XFEL施設において実際にTR-SFX計測に利用するには不十分であった。しかし、今後の実験系の改良を経て、生命現象の量子現象にアプローチできる手法の技術基盤が構築できるきっかけとなるものであり、当初目的のマイルストーンを一つ達成することに成功した。

なお、さきがけ研究期間中、所属研究室の上長の転出にともない撤去された実験機器の調達や、新しい上長の着任にともなう自らの実験室の移転、さらには、コロナ禍による実験停止

措置や多くの緊急の教育業務の発生など、度重なる不可抗力の事由への対応に多大なエフォートを割くことになったため、当初の研究計画がやむなく遅延するに至った。しかし、新たな研究環境を確立するための整備を粘り強く進め、今後の飛躍的な成果に繋がる基礎となる結果が得られたことに、手応えを感じている。

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

本研究における実験操作は、さきがけ研究者・溝端自身が専ら行い、研究補助者1名のサポートを受けつつ進めてきた。さきがけ研究を機に、4つの研究グループとの連携研究に着手している。研究期間の途中、実験環境の整備や新たな実験戦略を追加する必要があったため、当初の研究費の執行計画を修正することになったが、JST の指導を受けつつ、適切な執行を進めた。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

今日、各界において持続可能な開発目標(SDGs)への取り組みがなされているが、地球環境の保全の鍵のひとつはグローバルな窒素循環に見出すことができる。窒素循環は、土壌微生物がもつ酸化還元金属酵素群が主要な役割を担っている。土壌中の窒素含有量は、農作物の収穫量や食糧需給ひいては人口動態に影響し、また、温室効果やオゾン層破壊能をもつ窒素酸化物の生成量にも関与している。人類の化学窒素肥料の使用が自然の窒素循環のバランスを損ない、地球環境に多大な影響を与えている。本さきがけ研究は、量子技術の視点からこの分野の問題解決に寄与しうるものであり、開発した基盤技術は、将来、窒素循環の解明や制御につながり、SDGs の達成に貢献することが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【総説】

1. *Mizohata E, Nakane T, Fukuda Y, Nango E, Iwata S. Serial femtosecond crystallography at the SACLA: breakthrough to dynamic structural biology. **Biophys Rev.** 10(2), 209-218. 2018.

【招待講演】

2. Eiichi Mizohata. **Janelia Conference** -Challenges in Structural Biology-. Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, USA, 2017.
3. 溝端栄一. **日本プロテオーム学会 2019 年大会 第 70 回日本電気泳動学会総会**. X 線自由電子レーザーを応用したタンパク質の動的結晶構造解析, フェニックス・シーガイヤ・リゾート, 宮崎, 2019.
4. Eiichi Mizohata. **LSBM Symposium 2019**. The high resolution molecular movie taken by X-ray

free electron laser. Yumoto Fujiya Hotel, Hakone, Kanagawa, Japan, 2019.

5. 溝端栄一. **第 93 回日本生化学会大会**. 銅含有亜硝酸還元酵素の動的結晶構造解析, Web 開催, 2020.

【受賞】

6. 溝端栄一. **大阪大学賞**. X 線自由電子レーザーを応用したタンパク質構造解明法の研究. 大阪大学, 2018.

【著作物】

7. 溝端栄一, 久保稔. **膜タンパク質工学ハンドブック** (津本浩平 監修, エヌ・ティー・エス). X 線自由電子レーザーで観る膜タンパク質の立体構造, 11-15, 2020.
8. 山下恵太郎, 溝端栄一. **膜タンパク質工学ハンドブック** (津本浩平 監修, エヌ・ティー・エス). X 線結晶解析による新規構造の解明, 27-33, 2020.