

研究報告書

「新規赤外分光法と XFEL 結晶構造解析の融合によるタンパク質の動的精密構造解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 久保 稔

1. 研究のねらい

生体反応の特異性が、精緻に設計されたタンパク質の構造に基づいていることはよく知られている。その設計原理を理解するためには、反応の動的過程において各原子がどのように動き、機能部位の電子構造やプロトン化状態がどのように制御されているかを詳しく調べる必要がある。

タンパク質の三次元構造を高い空間分解能で決定できる実験手法は X 線結晶構造解析であり、これまでに多くのタンパク質に利用されてきた。この手法を用いれば 0.1 Å レベルで原子配置を決定することが可能である。一方、機能部位の原子団(官能基)の電子構造やプロトン化状態を解析できる強力な手法は、赤外分光法である。赤外分光法とは、COOH/COO⁻などの官能基の振動状態を観測する実験手法である。官能基の振動数はわずか 0.01 Å レベル(結合次数レベル)の構造変化を鋭敏に反映するため、X 線結晶構造解析では困難な精密な構造解析に有用である。しかし、赤外分光法はタンパク質の三次元構造の可視化には無力である。したがって、X 線結晶構造解析と赤外分光法は互いに相補的な手法であり、これらをうまく組み合わせることができればタンパク質の反応機構解明に有効であろう。

時間分解 X 線結晶構造解析は、X 線自由電子レーザー(XFEL)の出現により新たな道が拓かれた。XFEL は最先端のフェムト秒 X 線源であり、数十 fs の時間分解能を実現できる。一方、時間分解赤外分光法は、最先端のフェムト秒赤外レーザーを用いることで、100 fs の時間分解測定が可能である。またフェムト秒パルスは輝度が高いため、タンパク質結晶のような微小試料の高感度測定も期待できる。結晶の赤外分光は X 線結晶構造解析との相補利用・相関利用に有用であろう。そこで本研究では上記の先端光源を用いて、時間分解 X 線結晶構造解析と時間分解結晶赤外分光法の基盤技術を開発する。その基盤技術を、生体エネルギー分野で重要なチトクロム酸化酵素に応用する。この酵素が O₂ を水に変換することでエネルギーを得るしくみを明らかにして、光合成系と並んで重要な呼吸系のエネルギー変換システムの解明と応用に繋げる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、時間分解 X 線結晶構造解析ならびに時間分解赤外分光解析の基盤技術を開発し、それらを用いてチトクロム酸化酵素の反応機構を解明することを目的とした。チトクロム酸化酵素とは、呼吸で取り入れた O₂ を水にまで還元するとともに、プロトンをポンプするエネルギー変換酵素である。O₂ 還元反応は、ヘム鉄と銅原子(Cu_B)からなる金属中心で触媒される。最近の X 線結晶構造解析から、ヘム鉄に CO(O₂ アナログ)が結合すると、H 経路(プロトンポンプ推定経路)のゲートが閉じることが明らかにされた。そこでまずは、金属中心と H 経路

との間の連動機構を明らかにするために、CO 光解離に伴うダイナミクスの追跡を目指した。

時間分解赤外分光装置は、高輝度のフェムト秒赤外レーザーを用いることで高感度の装置を開発した[原著論文 2]。さらに結晶マウント用の赤外フローセルを開発することで、結晶試料の CO 光解離後のダイナミクスの観測に成功した。装置は、励起条件を含めて、時間分解 X 線結晶構造解析の実験条件の決定に利用された。

一方、時間分解 X 線結晶構造解析の装置は、SACLA(理研・播磨の XFEL 施設)を用いて開発した。CO 光解離のための励起光学系は、X 線とほぼ同軸の二方向から励起することで、数百 μm の大型結晶でも十分に励起できる系を開発した[原著論文 1]。CO 光解離後の時間分解 X 線結晶構造解析のデータセット収集には成功しており、現在、中間体構造を解析中である。

また、時間分解赤外分光・時間分解 X 線結晶構造解析の基盤開発・応用研究は、本研究を進める中で当初の計画を超えた発展を見せた。時間分解赤外分光においては、極微量送液マイクロフローシステムの開発を通して、酵素反応の時間分解観測を可能にした。NO 還元酵素に適用し、*trans* 機構で酵素反応が進むことを解明した。一方、時間分解 X 線結晶構造解析においては、数十 μm の微結晶をフローするシリアルフェムト秒結晶解析法(SFX)の研究チームと共同研究を開始し、SFX の装置を時間分解測定が可能な系に発展させた。第一の応用としてバクテリオロドプシンの中間体を観測しているところである。

(2) 詳細

「時間分解結晶赤外分光の基盤開発」

フェムト秒赤外レーザーを用いた時間分解赤外分光装置を開発し、理研・播磨キャンパス内に設置した。赤外光はダブルビームに分割し、片方は赤外パルス強度のゆらぎの補正に利用した。赤外ビームの試料位置での大きさは、放物面鏡($f25.4$)を用いることで(aperture 無しで)約 100 μm にまで絞れた。スペクトル測定には、分光器およびマルチチャンネル MCT 検出器(2 段 64 素子)を用いた。検出器からの信号は boxcar 積分器で 1 パルス毎にゲート検出し、24 ビットで AD 変換した。

時間分解測定には、ポンプ・プローブ法を用いた。励起用レーザーとして、Nd:YAG レーザー(4 ns, 532 nm)および XeCl レーザー(8 ns, 308 nm)を設置した。前者はバクテリオロドプシンの光反応やヘムタンパク質のリガンド光解離に有用であり、後者はケージド化合物の光分解に有用である。これらの励起用レーザーと赤外レーザーを同期させることによって、ナノ秒の時間分解測定を可能にした。(なお、フェムト秒赤外レーザーの前段から 800 nm のフェムト秒パルスを一部切り出し、波長変換することでフェムト秒の励起用パルスを生成できる。これを利用すれば、100 フェムト秒の時間分解測定が可能となるが、本研究期間でそこまでは達成できなかった。)

次に、結晶マウント用の赤外フローセルを開発した。このフローセルの流路はテーパー型をしており、結晶を母液とともに流すと、結晶の厚みと流路の深さが一致したところで結晶が留まる。その後は穏やかに母液をフローすることで(数 $\mu\text{L}/\text{min}$)、結晶は安定に固定される。流路の最も浅い箇所の深さは 10 μm とした。このセルは CaF_2 単結晶を sub- μm 精度で微細加工することにより作製された(慶応大・閻らとの共同研究)。セルは水冷により温調可能である。このセルの利点は二つある。一つは、非常に強い赤外吸収を持つ水が赤外光軸上にほとん

ど存在しない条件となるため、高精度の赤外分光測定が可能な点である。もう一つは、フローする母液の種類を適宜選択することにより、セル内で試料の状態を制御可能な点である。

「時間分解 X 線結晶構造解析の基盤開発」

時間分解測定には、ポンプ・プローブ法を用いた。ここでは、ループマウントした大型結晶の時間分解測定系について述べる(時間分解 SFX については後述)。

大型結晶の利用は、チトクロム酸化酵素のような巨大タンパク質(格子定数の大きな結晶)の高分解能構造解析に有利である。大型結晶を励起する場合、結晶全体を励起することは不可能なため、励起光を X 線とほぼ同軸で且つ局所的に照射する必要がある。そのための励起光学系を開発した(図 1)。この光学系は、X 線の上流側・下流側で対称な設計であるため、結晶を表面・裏面の 2 方向から励起することが可能である。実際に 2 方向励起は大型結晶の 100 %励起に有効であった。

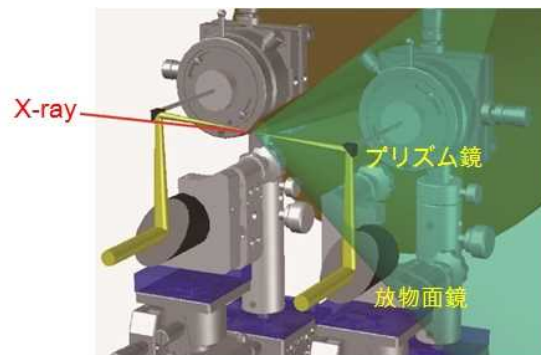


図 1. 大型結晶励起光学系

さらに図 1 の光学系において、励起光の光軸に可視白色光(390–700 nm)を重ねることで、可視吸収スペクトルのその場測定を可能にした。回折データ収集前後での可視吸収測定は、試料状態の確認に有用であった。

励起用レーザーについては、ナノ秒の時間分解能で十分な場合は、ナノ秒レーザーを使用する。一方、数十 fs の時間分解能が必要な場合は、SACLA 共用のフェムト秒同期レーザーシステム(http://xfel.riken.jp/users/eqp000_2.html)を使用可能である。

時間分解 X 線結晶構造解析においては、光学系のほかに、常温で結晶を安定に保持する機構も必須である。そのための調温調湿装置は、共同研究者が開発した(JASRI・馬場ら)。ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶において最適な 4°C の条件でも 98 %以上の調湿環境を実現できるものが開発された。

「ウシ心筋チトクロム酸化酵素の応用研究」

CO 光解離に伴うダイナミクスを時間分解結晶赤外分光と時間分解 X 線結晶構造解析で追跡した。CO がヘム鉄から解離すると、プロトンポンプ経路(H 経路)上の水チャネルが閉状態から開状態へ遷移することが、過去の高分解能 X 線結晶構造解析から明らかにされている。この構造の動的変化の解明が目的である。ヘム鉄からの CO の光解離は、532 nm のナノ秒パルスによって誘起した。

まずは、結晶マウント用赤外フローセルを使用し、4°C の条件で時間分解赤外吸収スペクト

ルを測定した。その結果、ヘム鉄から光解離した CO は、20 ns 以内に Cu_B に結合し、その後 4.4 μs と 13 ms の 2 相で Cu_B から解離することが明らかとなった。すなわち、Cu_B のリガンド親和性が異なる 2 つのコンフォーマーの存在が動的解析から明らかとなった。また、6.2 ms と 34 ms の時定数で CO はヘム鉄に再結合する(光解離前の状態に戻る)ことがわかった。

次に、時間分解 X 線結晶構造解析を行なった。実験条件(励起光の偏光特性を含めた励起条件、遅延時間など)は off-line での時間分解分光により決定した。本さがけ期間中に中間体構造を決定する見込みで解析を進めている(兵庫県立大・月原ら、理研・吾郷、平田らとの共同研究)。

「その他の研究発展」

・時間分解 SFX の基盤開発とバクテリオロドプシンの中間体の観測

微結晶をフローしながら回折データを収集する SFX の装置(DAPHNIS; Diverse Application Platform for Hard X-ray diffraction In SACLA)に、ナノ秒レーザーパルスを 2 方向から照射する励起光学系を組み込んだ(理研・岩田ら、JASRI 登野らとの共同研究)。励起光を照射した条件の回折データと励起光を照射しない dark 条件の回折データを交互に収集するスキームで、バクテリオロドプシンの中間体構造の解析に応用したところである。

一方で、時間分解 SFX の実験条件を簡便に決定できる off-line 時間分解可視吸収分光装置を開発し、理研・播磨キャンパス内に設置した。現在はマイクロ秒の時間分解能であるが、ナノ秒ゲート付きの ICCD を用いることでナノ秒の時間分解能に改善予定である。バクテリオロドプシン微結晶の時間分解可視吸収スペクトルを測定し、結晶相での光サイクル中間体生成の時定数を明らかにした。事前の off-line 時間分解分光測定は、時間分解 SFX の成功に必須であった。

・酵素反応観測のためのフロー・フラッシュ型時間分解赤外測定系の開発

CO 光解離ダイナミクスのようなサイクル反応の測定では、同一試料を用いた積算が可能であるが、酵素反応の測定では、フローによる試料交換が必須となる。そこで、ケージド化合物を利用して酵素反応を観測できるフロー・フラッシュ型の時間分解測定システムを開発した。具体的には、マイクロ流路フローセル、及びレーザー照射と同期した極微量送液シリンジポンプを開発し、時間分解赤外分光装置に組み込んだ。測定では、①フレッシュな試料の送液(試料交換)、②送液ストップ、③励起光照射(ケージド化合物からの基質放出)、④一定遅延時間後にスペクトル測定、を繰り返す。

装置の第一の応用として、NO 還元酵素の酵素反応(窒素サイクルのキーププロセスである NO 還元反応)を観測した。低収量の膜タンパク質の不可逆反応であるため、これまで不可能とされてきた類の計測である。ケージド NO は市販のものを用いた。NO 還元酵素はチトクロム酸化酵素の祖先型であり、ヘム鉄と非ヘム鉄(Fe_B)からなる金属中心で 2 分子の NO を N₂O へと変換する。この反応の NO 結合型中間体(10 μs)の観測に成功し、その NO 伸縮振動の振動数の構造敏感性を利用して、本酵素の反応機構が *trans* 機構であることを解明した。長年の論争に決着をつける研究成果を得ることができた(理研・城らとの共同研究)。

なお、本測定系はケージド O₂を用いることで、チトクロム酸化酵素の酵素反応(O₂還元/ブ

ロトンポンプ反応)の観測に応用可能である。ケージド O_2 は、既報の化合物をベースに開発中である(兵庫県立大・杉村らとの共同研究)。暗所・4°Cの条件で数時間安定な化合物が開発されたところである。

3. 今後の展開

チトクロム酸化酵素の研究については、 O_2 還元/プロトンポンプ反応の観測が最大の課題である。CO 光解離の系の次には、開発中のケージド O_2 を用いてこの生理反応の時間分解 X 線結晶構造解析・時間分解赤外分光に挑戦したい。時間分解赤外分光においては、プロトンポンプ経路(H経路)の出口に存在する Asp51 のプロトン化・脱プロトン化の観測が一つの目標である。そのバンドの帰属には、結晶(配向試料)の偏光赤外測定を利用する。

装置はチトクロム酸化酵素の応用にとどまらず汎用的なものである。特に最近は種々のケージド化合物が利用可能になってきているので(ケージド ATP やケージド Glu など)、それらを利用した他のタンパク質の応用研究も展開していきたい。それと同時に、より汎用的な mixed flow による測定系の開発も重要な将来課題と考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

ナノ秒時間分解 X 線結晶構造解析(ルーパマウントおよび SFX 測定系)ならびにナノ秒時間分解赤外分光解析(結晶およびフロー測定系)の基盤を、理研・播磨に整備した。本研究ではチトクロム酸化酵素の CO 光解離の系を第一の研究対象としたが、本基盤を用いた応用研究はそれに留まるものではない。特に、①ケージド化合物を用いた時間分解 SFXと②ケージド化合物を用いたフロー・フラッシュ時間分解赤外分光は、ケージド化合物の利用という制約はあるものの、光サイクル反応以外のさまざまな酵素反応への応用が見込める基盤と考えている。

また、理研・播磨に時間分解分光測定環境を整備したメリットも大きいと考えている。SACLA ユーザーが来所した際に利用できる形にしたい。なお、米国の XFEL 施設(LCLS)で時間分解 SFX をした研究グループが、われわれの時間分解分光装置で予備実験をした例もある。時間分解 X 線結晶構造解析の成功(あるいはデータの解釈)には、結晶中のタンパク質ダイナミクスを時間分解分光測定で理解しておくことが重要だからである。

ただし、時間分解分光の役割が時間分解 X 線結晶構造解析の実験条件の検討にとどまるようでは不十分である。分光情報(電子状態に関する情報)が反応機構解明に活用されてこそ意義が大きい。チトクロム酸化酵素のプロトンポンプや NO 還元酵素の NO 還元中間体といった酵素反応の研究は、時間分解 X 線結晶構造解析・時間分解赤外分光解析の相補利用・相関利用のよいモデル研究となる。今後は本さきがけで開発された基盤技術をベースにシャープな相関構造解析を進めることが、より広く構造生命科学の発展に繋がると考えている。

研究の進め方自体に大きな問題はなかったと考えている。共同研究体制を築き、理研・播磨にいる利点をフル活用して、できることから着実に進めた。しかし中間目標を多く設けたせいで、やり残したことも多い。一つはフェムト秒領域の現象の測定であるが、これに関しては SACLA 共用のフェムト秒同期レーザーを用いてフェムト秒時間分解 X 線結晶構造解析を計画

している。また時間分解 X 線回折・時間分解赤外分光の同時測定も当初念頭にあった。SACLA 共用のフェムト秒同期レーザーを用いてフェムト秒赤外光を生成することを考えていたが、共用レーザーは安定性の問題で精密分光用途の測定光には向かないことが判明した。同時測定の実現には赤外光源の再考が必要である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

チトクロム酸化酵素の O₂結合型と CO 結合型ではヘリックス 10 のバルジ移動により H 経路が閉ざされる。この過程の解明のために XFEL による結晶構造解析とフェムト秒赤外レーザーによる結晶分光との時分割同時構造解析を目指し、赤外レーザーでは結晶マウント用フローセルによる結晶試料の CO 光解離ダイナミクスの時分割測定に成功した。XFEL では、X 線とほぼ同軸の2方向ポンプ光導入及び時分解測定に成功した。また、副次的な成果として、小型の2方向ポンプ装置を開発し、シリアルフェムト秒結晶解析法の時分割利用へ寄与した。さらに、微量(20 μL)フローセルによる時分割赤外分光装置を開発し、NO リダクターゼに応用した結果、基質 NO の時分割赤外測定により、反応機構の解明に寄与した。以上多くの成果が得られたと認められた。

今後は、まずはチトクロム C 酸化酵素を対象とし生命科学の問題として、開発した手法を用いて、金属中心と H 経路との間の連動機構を明らかにして欲しい。将来的には、チトクロム酸化酵素以外の膜タンパク質まで、応用範囲が広がると予想されるので今後の研究が楽しみである。

本さがけで開発された時間分解赤外分光装置を用いた研究で、共同研究者が第 15 回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞を受賞(マイクロ流体フローを用いた一酸化窒素還元酵素の触媒反応の動的分光観察)した。

また、本さがけ研究課題がきっかけで多くの共同研究がスタートした。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sakaguchi, M., Kimura, T., Nishida, T., Tosha, T., Yamaguchi, Y., Yanagisawa, S., Ueno, G., Murakami, H., Ago, H., Yamamoto, M., Ogura, T., Shiro, Y.*, **Kubo, M.*** A nearly on-axis spectroscopic system for simultaneously measuring UV-visible absorption and X-ray diffraction in the SPring-8 structural genomics beamline. *J. Synchrotron Rad.* (2016) Vol. 23, 334-338.
2. **Kubo, M.**, Nakashima, S., Yamaguchi, S., Ogura, T., Mochizuki, M., Kang, J., Tateno, M., Shinzawa-Itoh, K., Kato, K., Yoshikawa, S.* Effective pumping-proton collection facilitated by a copper site (Cu_B) of bovine heart cytochrome c oxidase, revealed by a newly developed time-resolved infrared system. *J. Biol. Chem.* (2013) Vol. 288, 30259-30269 (Selected for *JBC Bioenergetics* Most-Read Articles in Sep-Oct 2013).

(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)

・招待講演

[1] 久保稔 ダイナミクス研究における未解決問題と振動分光からのアプローチ. 蛋白研セミナー “構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題”, 東京, 2016年3月.

[2] 久保稔 X線結晶構造解析と振動分光法の併用によるタンパク質の動的精密構造解析. 蛋白研セミナー “結晶構造を併用したハイブリッド構造研究の最前線”, 大阪, 2014年2月.

[3] 久保稔 蛋白質水溶液を扱える高感度赤外分光装置の開発: 酵素反応の生理条件下での測定を目指して. 第36回溶液化学シンポジウム プレシンポジウム, 札幌, 2013年10月.

[4] 久保稔 酵素反応の観測を可能にする振動分光技術の開発と展望. 第13回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ “蛋白質機能を化学的に理解するために”, 鳥取, 2013年6月.

・国際学会 (口頭)

[1] Kubo, M., Kimura, T., Yamaguchi, Y., Yanagisawa, S., Komiya, R., Yan, J., Nakashima, S., Ogura, T., Shiro, Y. Development of a highly-sensitive time-resolved IR spectrometer and its application to high-background aqueous biological samples. *Pacificchem 2015*, Hawaii (USA), December 2015.

・その他

本さがけで開発された時間分解赤外分光装置を用いた研究で、共同研究者(木村)が第15回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞を受賞(木村哲就, 石井頌子, 當舎武彦, 城宜嗣, 久保稔 マイクロ流体フローを用いた一酸化窒素還元酵素の触媒反応の動的分光観察. 第15回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞シンポジウム, 徳島, 2015年6月.)