

# 研究終了報告書

## 「高分解能立体構造解析によるタンパク質における量子現象の解析」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：平野 優

### 1. 研究のねらい

タンパク質分子中の水素原子は、分子の主要な構成要素であるだけでなく、触媒反応や酸化還元反応などに直接関与する原子である。また、原子中の外殻電子は、原子の電荷や電子移動反応などタンパク質の分子機能に直接関与している。タンパク質の触媒する水素移動反応や電子移動反応においては、古典的な遷移状態理論で説明できない水素原子や外殻電子のふるまいから、量子トンネル効果が寄与する可能性が示されている。その中で水素移動反応においては、軽水素と重水素の同位体間で反応速度の変化する同位体効果が知られている。同位体効果の観測されるアルコール脱水素酵素などにおいては、量子化学計算による解析からドナー-アクセプター間において軽水素と重水素で局在状態が変化すると報告されているが、実験的に軽水素-重水素間の立体構造変化を検出した例は報告されていない。また、タンパク質の関与する電子移動反応における量子化学計算による解析から、電子トンネル移動には電子移動経路周囲の静電的環境、水素結合ネットワークなどが影響すると報告されている。したがって、水素原子や外殻電子を含めた高精度の立体構造情報を取得することは、タンパク質の触媒する化学反応における量子トンネル効果の寄与を理解する上で重要な課題となっている。

タンパク質において高精度の立体構造情報を取得可能な手法として、水素原子の検出に有効な中性子回折と電子密度の検出に有効な X 線回折を挙げることができる。中性子回折では重水素と軽水素の同位体を識別することが可能であり、X 線回折では高分解能の回折データ取得により外殻電子密度を含めた立体構造解析が可能となる。本研究では研究対象として、哺乳類の肝臓代謝系で脂質合成などに関与する NADH-シクロム  $b_5$  還元酵素 (b5R) 酸化還元反応系を用いた。b5R に結合する補因子を介した水素移動反応、b5R から電子伝達パートナーであるシクロム  $b_5$  (b5) への電子移動反応においては、量子トンネル効果が寄与すると考えられている。そこで本研究課題では、b5R の酸化還元反応サイクル全体での中性子回折と X 線回折を相補的に利用した高分解能立体構造解析により、中性子回折では軽水素と重水素間の立体構造変化を検出し、X 線回折では外殻電子密度を含めた立体構造情報を取得することにより、量子トンネル効果の構造基盤解明を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

b5R は 2 種類の補因子 NADH と FAD を結合し、b5R の触媒する酸化還元反応サイクルにおいては補因子を介したヒドリド ( $H^-$ ) とプロトン ( $H^+$ ) の 2 段階の水素移動反応を伴っている。これまで生化学的な解析から明らかとなっている b5R の水素移動反応における同位体効果については、ヒドリド移動とプロトン移動の影響を識別することができていなかった。そのため b5R の水素移動反応における量子トンネル効果の寄与を解析する際に、ヒドリドおよびプロトン移動それぞれの反応機構について高分解能立体構造解析により明らかにするこ

とは必要不可欠である。b5R においては、ストップ・フロー測定による分光学的解析から、pH 依存的に酸化還元反応速度が変化することが明らかとなり、反応速度の大きく変化する条件からプロトン移動経路にアミノ酸残基の一つであるヒスチジン(His)が存在すると考えられた。そこで、反応速度変化の起こる 2 種類の条件において中性子回折実験に必要な大型結晶作製条件を確立し、良質な大型結晶を用いることで高分解能中性子回折データ収集に成功した。高分解能中性子構造解析により決定した 2 つの立体構造を比較したところ、補因子 FAD からタンパク質外部に繋がる水素結合ネットワークに立体構造変化が観測された。この立体構造変化は、水素結合ネットワークの途中に位置するヒスチジンのプロトン化状態の変化という微小な構造変化であり、分光学的解析で予想された通りヒスチジンが関与する水素結合ネットワークがプロトン移動経路であることが示された。また、ヒドリド移動反応や電子移動反応の開始状態である還元型 b5R については、これまで高分解能立体構造解析が行われていなかった。還元型 b5R が酸素存在下で不安定であることが大きな原因となっていたが、無酸素環境下における高純度試料調製、結晶作製条件の確立により良質な結晶を取得することが可能となった。その結果、還元型 b5R の高分解能 X 線結晶構造解析に成功し、補因子の一部の水素を含めた立体構造解析から、ヒドリド移動前後の立体構造情報を取得することが可能となった。立体構造の比較から、2 種類の補因子の空間的な配置が、ヒドリド移動に重要な役割を果たすことが示された。今回 b5R における 2 段階の水素移動反応について高分解能立体構造解析を達成できたことで、水素移動反応における量子トンネル効果の寄与理解に繋がる実験条件を確立することができた。

## (2) 詳細

本研究課題では、b5R 酸化還元反応系を対象として、1. 良質な結晶作製、2. 高分解能回折データ収集、3. 高分解能立体構造解析、4. 高分解能立体構造情報を用いた量子トンネル効果の解明、の研究項目を設定し研究を進めてきた。

1. b5R においては、酸化型で高分解能立体構造解析が進んでいたが、酸素存在下で不安定な還元型については高分解能立体構造解析が行われていなかった。そこで再結晶化による試料純度の向上および無酸素環境下での結晶化条件の再検討を行い、還元型 b5R について良質な結晶作製条件を確立することができた。また、中性子回折では回折強度を増大するため X 線回折に比べ体積が 1000 倍以上の大型結晶が必要となる。大型結晶を作製するためにはタンパク質が長期間安定に存在する条件を決定する必要があるが、結晶化法の検討などにより酸化型と還元型 b5R の大型結晶作製条件を確立することができた。

2. 還元型 b5R の良質な結晶を取得できたことで、放射光施設 SPring-8 を利用した回折実験により、高分解能 X 線回折データ収集に成功した。現在、外殻電子密度を含めた立体構造解析に必要な分解能 ( $d_{\min} < 0.8 \text{ \AA}$ ) の X 線回折データ取得には至っていないが、水素由来の電子密度を観測可能な分解能 ( $d_{\min} < 1.0 \text{ \AA}$ ) の X 線回折データを取得することができている。また、大型結晶作製条件が確立できたことにより、酸化型および還元型 b5R の中性子回折データを取得することが可能となった。中性子回折実験は、日本の大強度陽子加速器施設 J-PARC に設置された回折装置 iBIX と、ドイツの研究用原子炉 FRM II に設置された回折装置 BIODIFF を利用して実施し、高分解能の中性子回折データ収集に成功した。また中

性子回折データ処理においては、強度補正を適用することによりデータ精度の向上を達成することができた。

3. 還元型 b5R について野生型と水素移動反応を阻害する変異体を用い高分解能 X 線構造解析を実施し、補因子に結合する一部の水素原子を含めた高精度立体構造情報を取得することが可能となった。またストップ・フロー測定による b5R の酸化還元反応ターンオーバー速度の解析から、pH 依存的に反応速度が変化することが明らかとなった。そこで酸化型 b5R について酸化還元反応速度が大きく変化する 2 種類の条件で高分解能中性子構造解析を実施し、どちらの条件においても補因子および溶媒の水素原子を含めた立体構造情報を取得することが可能となった。

4. 還元型 b5R における野生型と変異体の高分解能 X 線構造解析により、野生型は NAD<sup>+</sup> 結合状態、変異体は NADH 結合状態であることが明らかとなり、ヒドリド(H<sup>-</sup>)移動前後の状態での立体構造情報を取得することが可能となった。野生型と変異体の立体構造の比較から、補因子周辺での微小な立体構造変化の検出に成功し、ドナー(NADH)とアクセプター(FAD)の 2 種類の補因子の空間的な配置がヒドリド移動に重要であることが明らかとなった(図 1)。

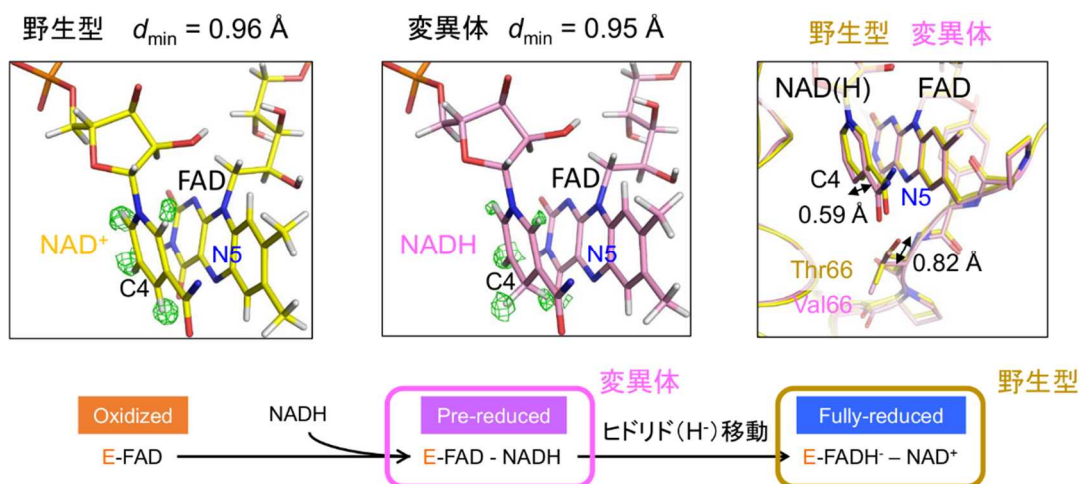


図 1 還元型 b5R の高分解能 X 線構造解析。(左)野生型の立体構造、(中央)変異体の立体構造、(右)野生型と変異体の立体構造重ね合わせ。緑色網目は水素由来の電子密度。ヒドリド移動の起こる NADH の C4 炭素と FAD の N5 窒素の空間的な配置に、ヒドリド移動前後において微小な立体構造変化を検出することができた。

また、酸化型 b5R における酸化還元反応速度の変化する 2 種類の条件での高分解能中性子構造解析により、補因子からタンパク質外部に繋がる水素結合ネットワークに立体構造変化が観測された(図 2)。ストップ・フロー測定による分光学的解析からは、反応速度の変化する pH 条件からプロトン移動経路にアミノ酸残基ヒスチジン(His)が関与することが予想された。水素結合ネットワークの途中に位置するアミノ酸残基ヒスチジン(His49)において、酸化還元ターンオーバー速度の速い条件ではダブルプロトネーション状態、酸化還元ターンオーバー速度の遅い条件ではシングルプロトネーション状態、とプロトン化状態の変化という



微小な立体構造変化の検出に成功した。この結果は、ストップ・フロー測定 of 分光学的解析から予想された通りプロトン移動へのヒスチジンの関与を示しており、水素結合ネットワークを介したプロトン移動経路が明らかとなった。

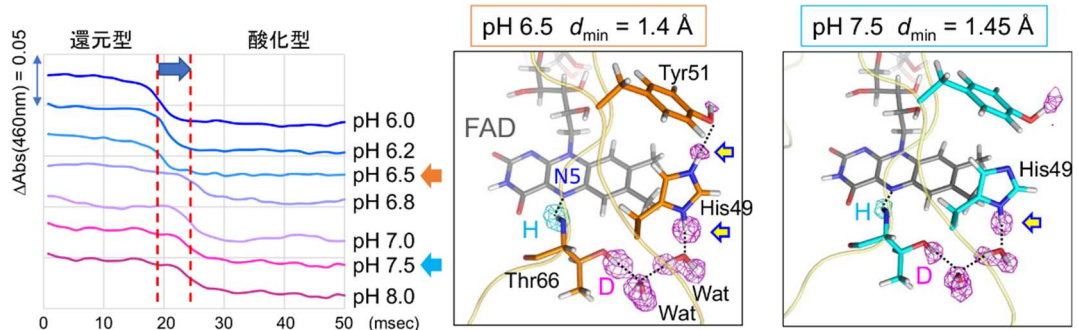


図 2 酸化型 b5R の高分解能中性子構造解析。(左)ストップ・フロー測定による酸化還元反応速度変化の検出、(中央)酸化還元ターンオーバー速度の速い条件での立体構造、(右)酸化還元ターンオーバー速度の遅い条件での立体構造。水色および桃色網目は軽水素および重水素由来の中性子散乱長密度。補因子 FAD からタンパク質外部に繋がる水素結合ネットワークの途中に位置するヒスチジン(His49)においてプロトン化状態変化を検出することができた。

以上の高分解能立体構造解析によって、ヒドリド移動とプロトン移動を識別して解析可能となった。今回確立した実験条件を利用することで、水素移動経路における軽水素と重水素間の立体構造変化の検出に繋がると期待できるため、水素移動反応における量子トンネル効果の寄与理解への道筋を切り開くことができた。一方、電子移動反応については b5R と b5 の電子伝達複合体の立体構造情報取得を目指しているが、現在立体構造解析を実現できておらず、量子トンネル効果の寄与の解析に繋がる高精度立体構造情報の取得に至っていない。

### 3. 今後の展開

さきがけ研究において、b5R の酸化還元反応サイクルにおけるヒドリド(H<sup>-</sup>)とプロトン(H<sup>+</sup>)の 2 段階の水素移動反応を、高精度立体構造情報に基づき解析可能な実験条件を確立することができた。今後は、水素移動経路における軽水素と重水素間の同位体間の立体構造変化を検出するため、重水素化した補因子や反応に影響する変異体を用いた高分解能立体構造解析を行い、水素移動反応における量子性の寄与の検証を目指す。また、電子移動反応においては、b5R と b5 の電子伝達複合体での高分解能立体構造解析を行い、電子トンネル移動に影響を与えると考えられている電子移動経路周辺の詳細な相互作用様式の解明を目指す。さらに本研究課題で用いた手法を他のタンパク質にも適用し、タンパク質の分子機能理解を目指す構造生物学分野における新規研究領域を展開していきたい。

### 4. 自己評価

これまで高精度立体構造情報の得られていなかった、水素移動および電子移動反応の開

始状態である還元型 b5R については、良質な結晶作製条件の確立などにより、高分解能立体構造解析を達成した。一方、当初目的としていた b5R 酸化還元反応サイクル全体での高分解能立体構造解析のうち、電子移動反応を理解する際に重要な電子伝達複合体の高分解能立体構造解析には至らなかった。水素移動反応における量子トンネル効果の寄与を検証する際に、b5R における 2 段階の水素移動反応を識別して解析することが必要不可欠であった。そこで、酸化還元反応速度変化の起こる実験条件および変異体を用いた実験条件を確立することで、高分解能立体構造解析により 2 段階の水素移動反応を識別することを可能にした。さきがけ研究において目指していた水素移動反応における量子トンネル効果の構造基盤解明に至らなかったが、水素移動経路における軽水素と重水素による同位体間の立体構造変化を検出し量子トンネル効果の寄与を検証する際に基礎となる実験条件を確立することができた。さきがけ研究期間中には研究補助員 1 名を雇用し、また良質な結晶作製、高分解能回折データ収集、高分解能立体構造解析に必要な機器を購入することで、高精度立体構造情報取得に必要な環境を整備した。今回のさきがけ研究の領域会議などを通じて計算科学を専門とする研究者を中心に意見交換、連携を進めることができたことで、生体分子の分子機能理解に対する新しい手法の開発や立体構造解析における新規技術開発などに繋がる研究への道筋を開拓できた。それらの手法は今後構造生物学分野に広く波及する技術となると考えられ、創薬や触媒開発などの応用研究への展開も期待できると考えている。

## 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

なし

### (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)

#### 学会発表

・Yu Hirano, X-ray and neutron structure analysis of redox proteins at high-resolutions, 3rd International Symposium of Quantum Beam Science in Biology and Soft Materials, 2018

・Yu Hirano, Kazuo Kurihara, Katsuhiko Kusaka, Shigenobu Kimura, Kunio Miki, Taro Tamada, Neutron structure analysis of the oxidized form of NADH-cytochrome b5 reductase, 第 18 回日本蛋白質科学会年会、2018

・Yu Hirano, Kazuo Kurihara, Katsuhiko Kusaka, Andreas Ostermann, Shigenobu Kimura, Kunio Miki, Taro Tamada, 高分解能立体構造解析で迫る酸化還元酵素の反応機構、第 93 回日本生化学会大会、2020

・Yu Hirano, Kazuo Kurihara, Katsuhiko Kusaka, Andreas Ostermann, Shigenobu Kimura, Kunio Miki, Taro Tamada, NADH シトクロム b5 還元酵素の結晶構造解析、日本結晶学会令和 2 年度年会、2020

#### 著作物

・玉田太郎、平野優、量子構造生物学の創成と挑戦、OPTRONICS、2020、39、92-97