

トピックス

中性子/X線複合構造解析で酵素触媒反応におけるプロトンリレーを可視化する

中村彰彦^{1,*}, 石田卓也¹, 日下勝弘², 田中伊知朗^{2,3}, 新村信雄², 鮫島正浩¹, 五十嵐圭日子¹¹東京大学大学院農学生命科学研究科^{*}現 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター²茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター³茨城大学工学部

1. 酵素におけるプロトン観測の重要性

水素原子は酵素分子の中に最も多く含まれている原子であり、水素結合の重要な要素であるとともに、酵素の高次構造の安定化や酵素と基質との相互作用に必須である。また、極性残基や水酸基を持つアミノ酸では、基質や溶媒とプロトン（水素原子核、一般的には水素イオン H^+ と呼ばれる）の交換が起こることもよく知られている。例えば、加水分解酵素では基質へのプロトンの付加と水分子からのプロトンの引き抜きで反応を行っており、プロトンポンプではプロトンそのものが輸送されていると言われている。即ち、水素原子やプロトンを含めた構造解析は、酵素の構造や反応機構を理解する上で極めて重要である。

2. 中性子結晶構造解析

酵素の立体構造を決定する手法として、最も一般的な方法はX線結晶構造解析であり、これまでに10万以上の構造データがProtein Data Bank (PDB) に登録されている。X線結晶構造解析ではX線をプローブとして酵素分子を構成している原子の電子密度を観測しているため、原子番号が大きく電子の量が多い炭素や酸素、窒素原子の観測は比較的容易であるが、電子を1つしか持たない水素原子の観測は難しい上に、電子を持たないプロトンについては原理上観測ができないと考えられる。それに対して中性子結晶構造解析では中性子をプローブとして、原子核によって回折された中性子を観測する。それ故に原子の観測しやすさはX線とは完全に異なる(図1)¹⁾。例えば、X線では高分解能データでないと区別が難しい酸素原子と窒素原子

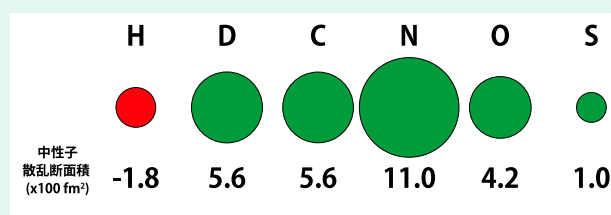


図1

中性子での各原子の検出効率の違い。

は、中性子では窒素原子の方がより強い散乱強度を示すため容易に区別できる。また中性子構造解析では同位体で散乱強度が大きく異なるという特徴がある。この性質により重水素(D)は炭素原子と同等の散乱強度を示すのに対し、軽水素(H)は逆の位相の散乱を示すため明確に区別できる。その結果軽水素と重水素の比率を解析することができ、水素原子のダイナミクスに関する情報を得ることも可能となる。我が国において生体高分子の中性子構造解析が可能な施設は日本原子力研究開発機構(JAEA)のJRR-3と大強度陽子加速器施設(J-PARC)の物質・生命科学実験施設(MLF)である。JRR-3は原子炉を用いた定常中性子源であり、現在まで中性子構造解析において重要な役割を果たしている。MLFは核破砕法により生成されるパルス中性子源の特性を生かして、ラウエ回折像を時分割して測定する検出方法により世界最高レベルの解析効率を可能としている²⁾。

3. プロトン経路の可視化例

上述の通り、中性子は原子核との相互作用で回折するため、電子を持たないプロトンや重水素イオン(D^+)でも回折し、中性子散乱図にその情報が含まれ

Direct Observation of Proton Pathway in Enzyme by Joint Analysis of Neutron and X-ray Crystallography

Akihiko NAKAMURA^{1,*}, Takuya ISHIDA¹, Katsuhiro KUSAKA², Ichiro TANAKA^{2,3}, Nobuo NIIMURA², Masahiro SAMEJIMA¹ and Kiyohiko IGARASHI¹¹Department of Biomaterials Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo^{*}Present Address: Okazaki Institute for Integrative Bioscience National Institutes of Natural Sciences²Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University³College of Engineering, Ibaraki University

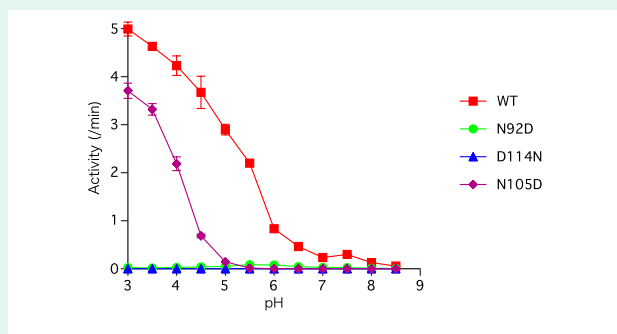


図2 セルロース加水分解酵素の天然型と各変異体による触媒反応のpHプロファイル。

ることになる。中性子回折法によって、ゼオライトにおけるプロトンの位置を同定した研究例などが報告されており³⁾、燃料電池用のプロトン伝導性素材の解析にもしばしば用いられる⁴⁾。しかしながら、生体高分子に関するこのような解析は限られている。

最近、筆者らのグループではきのこ由来のセルロース加水分解酵素の中性子X線複合構造解析を行った⁵⁾。通常、セルロース加水分解酵素は2つの酸性アミノ酸(アスパラギン酸またはグルタミン酸)を触媒残基として利用するが、本酵素ではそのうちの 하나가アスパラギン(Asn92)であることが確認された(図2)。そこで本酵素の巨大結晶(6 mm³)を重水環境下で作製してJ-PARC/MLFの茨城県生命物質構造解析装置(iBIX)を用いて中性子構造解析を行い、触媒残基のプロトネーション状態を調べた。その結果Asn92残基は通常の「アミド型」ではなく、そのプロトン互変異性体である「イミド酸型」を取っていることが明らかとなった。しかしながら、通常環境ではイミド酸型は非常に不安定であり、平衡はアミド型に片寄っている。そこで触媒残基周りの水素結合をさらに解析したところ、Asn92側鎖のカルボニル基の酸素と主鎖のアミドの窒素の間に正の散乱強度が確認された。そこにはX線の散乱強度が観測されないため、この2つの原子の間にX線を回折しないが中性子を回折する物質、即ち重水素イオンの共有が起こっていると考えられた。そこで2つの触媒残基(Asn92とAsp114)間の水素結合パターンをさらに詳細に調べたところ、Asn92とAsn105の側鎖およびPhe95とCys96のペプチド結合のアミドイミド酸のプロトン互変異および側鎖の水素結合を介して、2つの触媒残基間は一連の水素結合(プロトンリレー)でつながれていることが明らかとなった。すなわち、2つの触媒残基間は連鎖的にプロトンの受け渡しを行うことが可能であることを示していた(図3)。この仮説を検証するために、反応には直接関与していないがプロトン进行中継していると考えられるAsn105残基をアスパラギン酸残基に変化させた変異酵素

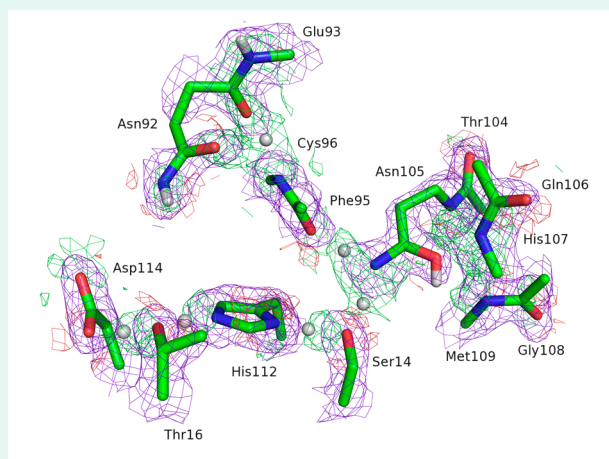


図3 セルロース加水分解酵素のプロトン伝達経路例。紫:中性子 2Fo-Fc, 赤(負), 緑(正):中性子 Fo-Fc. 白球は推定されるプロトンの位置を示す。

(N105D)を作製し、その活性を調べた。その結果、天然型は反応至適pHがpH 3.0でありpH 5.5で約40%の活性となるのに対して、N105DはpH 3.0では天然型の約80%の活性を保っていたが、pH 5.5で完全に活性を失っており、pHプロファイルが酸性側にシフトしていることが明らかとなった(図2)。これはN105D変異体では、アスパラギン酸側鎖からのプロトンの脱離が、野生型と比較して低いpHで起こるためと考えられ、中性子X線複合構造から考えられたプロトンリレー仮説の正しさが示された。これらの結果からこの酵素の反応機構は、イミド酸型のAsn92残基が水からプロトンを引き抜いてアミド型に戻ることによって玉突き式にプロトンがAsp114残基のカルボニル基にまで運ばれ、セルロース分子鎖のグリコシド結合の酸素原子をプロトネーションしていると考えられた。また、このモデルではAsp114残基のプロトネーションによる逆回りのプロトンリレーを経て2つの触媒残基のプロトネーションの状態が再生されるため、反応の至適pHが酸性であることも説明できる。

4. 今後の展望と課題

以上の様に、X線構造解析で酵素の全体の構造を決定するとともに、中性子構造解析によって水素原子およびプロトンの位置情報を合わせることで、プロトンの授受を行う酵素の詳細な反応メカニズムを明らかにすることができた。中性子構造解析は世界的にも注目され始めている分野であり、ヨーロッパでは新たにEuropean Spallation Sourceの建設が行われている。今後プロトンポンプの様な膜タンパク質の構造解析例も出てくることが予想される。

PDBに登録されている中性子結晶構造はX線やNMRとの複合解析のデータと合わせても89セット

しかなく、酵素の種類としては33種だけである(2015年11月現在)。その主な原因は、中性子ビームの強度が弱く、巨大なタンパク質の結晶が必要となることが挙げられる。このような状態を改善するためには、出力の向上、検出器の改良、そして結晶の作成方法を改良する必要がある。例えばJ-PARCでは中性子ビームを発生させる加速器の出力を1 MW (1000 kW) まで上昇させる計画がある。筆者らの観測例では、加速器出力は300 kW、結晶サイズは6 mm³、測定時間が13.5日であったことを考えると、出力が1 MWまで向上すると計算上1.8 mm³の結晶で同程度のデータが取得できることになる。または6 mm³の結晶であれば測定時間を4日程に短縮することも可能になる。しかしながら大きな結晶を用いてより精度よく回折実験を行うことも大切である。大型の結晶を作成する際には、相図(Phase diagram)等を用いて結晶化条件を綿密に調べ、沈澱剤濃度等を調整することで結晶核の生成と結晶の成長を制御する方法があるが^{6,7)}、必ずしも全ての酵素に適用できる手法ではない。水素原子やプロトン経路を含めた構造を解析し、様々な酵素の機能を明らかにするためには、より簡便に結晶核生成と成長を制御する手法が必要となるであろう。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会の科学研究費補助金新学術領域研究「植物細胞壁の情報処理システム」(領域代表:東北大学 西谷和彦教授)、JAXA オープンラボ公募共同研究(研究代表者:五十嵐圭日子)、JAXA JEM利用高品質タンパク質結晶生成実験(研究代表者:五十嵐圭日子)、文部科学省科学研究費補助金 基盤研究(B)(研究代表者:五十嵐圭日子)、文部科学省地球観測技術等調査研究委託事業「高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成」(研究代表者:筑波大学 裏出良博教授)の補助を受けた。また中性子回折実験は、茨城県のiBIXプロジェクト課題を利用して実施し、X線回折は高エネルギー研究所 KEK BL5A で測定した。この場を借りて謝辞を述べさせていただきたい。

文 献

- 1) Sears, F. Y. (1992) Neutron News **3**, 26-37. DOI: 10.1080/10448639208218770.
- 2) Kusaka, K. *et al.* (2013) J. Synchrotron Radiat. **20**, 994-998. DOI: 10.1107/S0909049513021845.
- 3) Czjzek, M. *et al.* (1992) J. Phys. Chem. **96**, 1535-1540. DOI: 10.1021/j100183a009.
- 4) Karlsson, M. (2015) Neutron Applications in Materials for Energy (Peterson, V. K., Kearley, G. J., eds.) **3**, pp. 243-271, Springer International Publishing, Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-319-06656-1_9.
- 5) Nakamura, A. *et al.* (2015) Science Adv. **1**, e1500263. DOI: 10.1126/sciadv.1500263.
- 6) Oksanen, E. *et al.* (2009) J. R. Soc. Interface **6**, S599-S610. DOI: 10.1098/rsif.2009.0162.focus.
- 7) Nakamura, A. *et al.* (2014) J. Synchrotron Radiat. **20**, 859-863. DOI: 10.1107/S0909049513020943.



中村彰彦

中村彰彦(なかむら あきひこ)

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター助教、博士(農学)

研究内容:酵素の構造機能相関

連絡先:〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

E-mail: aki-naka@ims.ac.jp



石田卓也

石田卓也(いしだ たくや)

東京大学大学院農学生命科学研究科特任助教、博士(農学)

研究内容:構造生物学

連絡先:〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

E-mail: da-ishi@db3.so-net.ne.jp



日下勝弘

日下勝弘(くさか かつひろ)

茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター准教授、博士(理学)

研究内容:中性子構造生物学、結晶学

連絡先:〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1

E-mail: kusakats@mx.ibaraki.ac.jp



田中伊知朗

田中伊知朗(たなか いちろう)

茨城大学工学部生体分子機能工学科教授、博士(理学)

研究内容:中性子構造生物学と関連技術開発

連絡先:〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

E-mail: ichiro.tanaka.h27@vc.ibaraki.ac.jp

URL: http://www.biochem.ibaraki.ac.jp/05_tanaka.html



新村信雄

新村信雄(にいむら のぶお)

茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター特命研究員、理学博士

研究内容:中性子構造生物学

連絡先:〒982-0802 宮城県仙台市太白区八木山 東 1-12-6

E-mail: nobuo.niimura.n@vc.ibaraki.ac.jp



鮫島正浩

鮫島正浩(さめじま まさひろ)

東京大学大学院農学生命科学研究科教授、農学博士

研究内容:林産学・森林生物化学

連絡先:〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

E-mail: amsam@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp



五十嵐圭日子

五十嵐圭日子(いがらし きよひこ)

東京大学大学院農学生命科学研究科准教授、博士(農学)

研究内容:セルロース分解に関わる酵素学および微生物学

連絡先:同上

E-mail: aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp