

X線自由電子レーザーで捉えたビフィズス菌酵素の常温構造

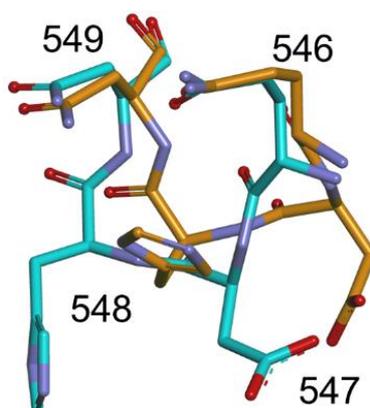
－局所的な構造変化から示唆された酵素反応メカニズム－

理化学研究所（理研）放射光科学研究センター利用技術開拓研究部門 SACLA 利用技術開拓グループの岩田想グループディレクター（京都大学大学院医学研究科教授）、分子動画研究チームの南後恵理子チームリーダー（東北大学多元物質科学研究所教授）、高輝度光科学研究センターXFEL 利用研究推進室実験技術開発チームの登野健介チームリーダーらの共同研究グループは、ビフィズス菌の解糖系^[1]酵素の立体構造を常温下で決定し、その酵素の反応メカニズムに関する新たな知見を見いだしました。

本研究成果は、生理的環境下に近いタンパク質構造を取得することで、酵素反応メカニズムの解明に有用な情報が増える可能性を示しており、各種酵素の高機能化設計などを通して、酵素の産業利用の高度化に貢献すると期待できます。

今回、共同研究グループは、X線自由電子レーザー（XFEL）^[2]施設「SACLA^[3]」において連続フェムト秒結晶構造解析（SFX）法^[4]により、ビフィズス菌の解糖系酵素の一つであるホスホケトララーゼ^[5]の常温構造解析に成功しました。その結果、ホスホケトララーゼの活性部位の入り口に位置する小さなループ状構造が、従来の極低温構造とは異なっていることを発見しました。同時に実施した阻害剤との複合体構造の特徴も踏まえた考察により、ホスホケトララーゼの反応メカニズムに関する新たな知見を得ることができました。解析に必要なホスホケトララーゼの微小結晶は光誘起タンパク質結晶化プレート^[6]を用いて取得し、この結晶化法が SACLA での構造解析の効率化に有効であることも分かりました。

本研究は SACLA 産学連携プログラムにて行われ、科学雑誌『*Acta Crystallographica Section D*』オンライン版（3月28日付）に掲載されました。



構造変化が観測された QN ループ構造
(常温構造はオレンジ色、極低温構造は水色で示す)

背景

生体内には、酵素と呼ばれる特定の物質を別の物質に変換する機能を持つタンパク質が数多く存在しています。これらの酵素群が共同してさまざまな物質やエネルギーを合成することにより、複雑な生命現象が機能しています。

酵素の反応メカニズムを理解する上で、その形状（立体構造）は重要な情報となります。有用物質を効率的に合成できる特性から、酵素は古くから工業生産に利用されています。その際には、対象酵素を高機能化する必要性がしばしば生じます。こうした高機能化酵素を設計する上でも、その立体構造情報は重要です。

近年では、酵素の立体構造はX線結晶構造解析^[7]やクライオ電子顕微鏡^[8]によって解析されていますが、これらの手法で得られるのは、放射線損傷^[9]を減じるために、もっぱら-170°C付近の極低温で測定された構造（極低温構造）です。従来、この極低温への冷却はタンパク質構造にわずかな影響しか引き起こさないとされてきました。しかし近年の研究により、タンパク質の機能的に重要な可動領域は極低温の影響を特に受けやすく、バイアスのかかった構造を見てしまう可能性があることが示されています。

X線自由電子レーザー（XFEL）施設「SACLA」では、連続フェムト秒結晶構造解析（SFX）法により、常温のタンパク質の構造（常温構造）を放射線損傷の影響を受けることなく観測することができます。そこで本研究では、ビフィズス菌の解糖系酵素であるホスホケトラーゼをターゲットとして、常温構造解析の有用性を見極め、また対象酵素の反応メカニズムに対して新たな知見を得るべく、SACLAにおいてSFX法を実施しました。

研究手法と成果

SFX法を実施するにあたっては、数マイクロメートル（ μm 、 $1\mu\text{m}$ は1,000分の1mm）程度の大きさのタンパク質の微小結晶が一定量必要となります。今回のターゲットであるホスホケトラーゼの場合、通常の方法では、タンパク質の凝集物の沈殿が優先的に生じてしまい、微小結晶を効率よく得ることは困難でした。そこで、共同研究グループは光誘起タンパク質結晶化プレート（富士フイルム和光純薬製）を用いて、光を照射しながら結晶化を試みたところ、SFX法の測定に必要な量の微小結晶を短時間で取得できるようになりました（図1）。

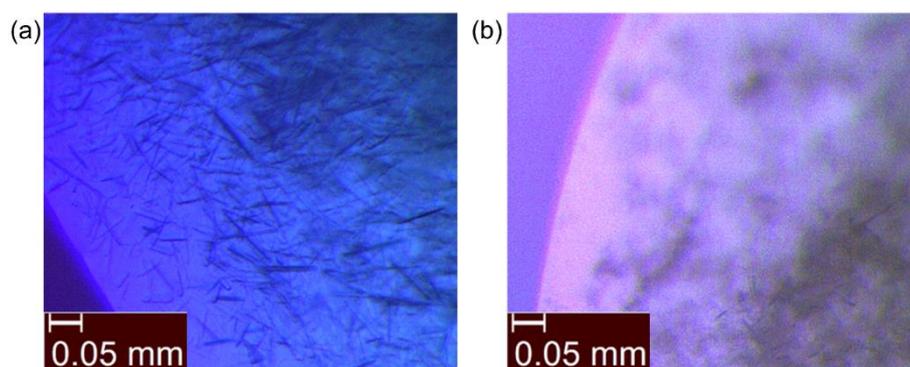


図1 光誘起タンパク質結晶化プレートを用いたホスホケトラゼ微小結晶の調製

- (a) 蛍光照射時。25 °Cで1日間静置した後の写真。数多くの微小結晶の析出が見られた。
(b) 蛍光未照射時。25°Cで1週間静置した後の写真。最初に沈殿した大量の凝集物の中から、少量の微小結晶の析出が見られた。

こうして得られた微小結晶を用いて、SFX法によるホスホケトラゼの常温構造解析を実施しました。その結果、決定された立体構造は分子全体の構造に関しては、以前に解析された極低温構造とほぼ一致していました(図2上)。一方、両構造を詳細に比較すると、546~549番目の4アミノ酸残基から構成されるループに興味深い構造変化が観測されました(p1の図)。このループ(QNループ)は、基質が結合するポケットの入り口付近に位置しています(図2下)。極低温構造では、QNループが基質結合ポケットの入り口を狭めていた(closed form コンフォメーション)のに対し、今回SFX法で解析された常温構造では、QNループは逆に入り口を広げていました(open form コンフォメーション)。

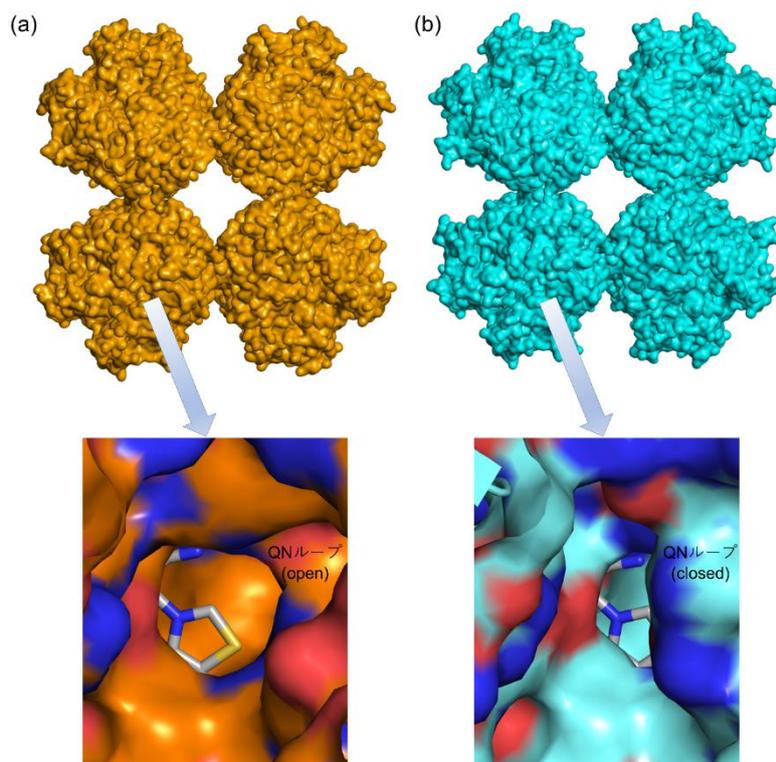


図2 ホスホケトララーゼの立体構造

上側は全体構造の図。下側は基質結合ポケット周辺を拡大した図である。下図では、基質結合ポケットの底に補酵素であるチアミンニリン酸（スティック表示）が見える。

- (a) XFEL 施設「SACLA」で SFX 法により解析された常温構造。QN ループが基質結合ポケットの入り口を広げている。
- (b) 通常の X 線結晶構造解析で解析された極低温構造。QN ループが基質結合ポケットの入り口を狭めている。

今回同時に解析したホスホケトララーゼと阻害剤の複合体の構造や、過去に解かれた類縁酵素の構造を参考にした結果、QN ループの構造変化がホスホケトララーゼの反応メカニズムに関係していることが推定されました（図3）。すなわち、QN ループの open form コンフォメーションは、1 番目の基質であるフルクトース 6-リン酸（またはキシルロース 5-リン酸）がホスホケトララーゼの触媒部位にアクセスできるように機能し、同ループの closed form コンフォメーションは、2 番目の基質をサイズの小さなリン酸に限定する役割を果たしているというメカニズムが示唆されました。

SFX 法による常温構造解析が、機能発現に重要な役割を果たすことが多いタンパク質分子の可動領域のダイナミックな構造変化を捉えた結果、得られた知見といえるでしょう。

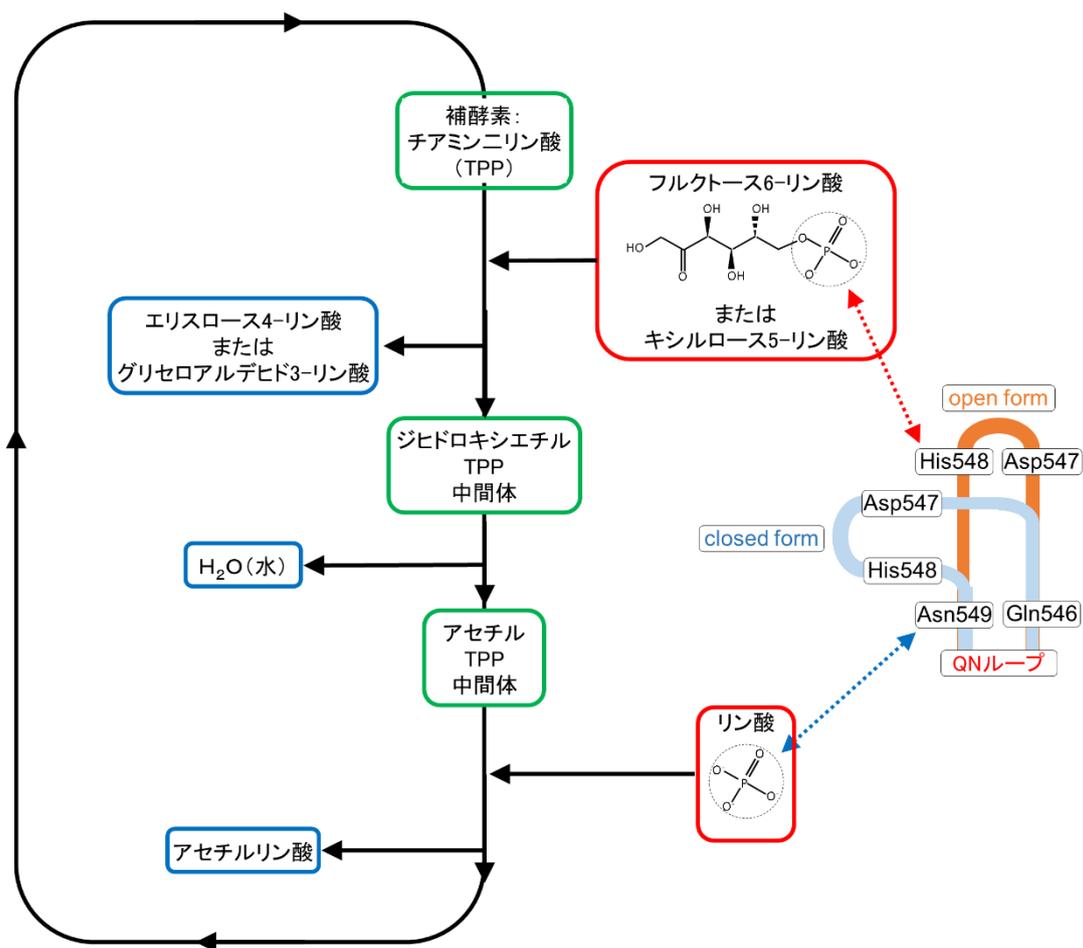


図3 ホスホケトララーゼの反応メカニズムの模式図

補酵素であるチアミンニリン酸に1番目の基質であるフルクトース6-リン酸が結合し、いくつかの中間体を経て2番目の基質であるリン酸が結合し、最終生成物であるアセチルリン酸が遊離することにより、反応が完了する。今回の解析から推定されたQNループの役割を模式的に追記した。

今後の期待

ホスホケトララーゼの微小結晶の調製に際しては、光誘起タンパク質結晶化プレートの使用が非常に有効でした。一般にタンパク質の微小結晶はタンパク質が凝集しやすい過酷な条件で調製されることが多いため、この結晶化プレートは他のタンパク質の微小結晶調製にも有効である可能性があります。

タンパク質の極低温構造においては、機能的に重要な可動領域がバイアスのかかった構造をとっている場合があることが、近年の研究によって示されていますが、今回の解析により、ホスホケトララーゼについてもその知見が当てはまることが確認されました。今後、SFX法を活用した構造研究を積み重ねることにより、常温・極低温間におけるタンパク質の構造

変化のメカニズムの解明がさらに進むと期待できます。

SFX 法は放射線損傷の問題を克服し、常温という生理的環境下でのタンパク質構造を解明できる強力な解析法です。こうした方法により、タンパク質立体構造情報の取得や研究が進むと、各タンパク質の機能解明に有用な学術的知見が増大するとともに、ドラッグデザインや酵素の高機能化設計などを通じてタンパク質構造の産業利用がますます進展すると期待できます。

論文情報

<タイトル>

Ambient temperature structure of phosphoketolase from *Bifidobacterium longum* determined by serial femtosecond X-ray crystallography.

<著者名>

Kunio Nakata, Tatsuki Kashiwagi, Naoki Kunishima, Hisashi Naitow, Yoshinori Matsuura, Hiroshi Miyano, Toshimi Mizukoshi, Kensuke Tono, Makina Yabashi, Eriko Nango and So Iwata.

<雑誌>

Acta Crystallographica Section D

<DOI>

<https://doi.org/10.1107/S2059798323001638>

補足説明

[1] 解糖系

グルコースをピルビン酸などの有機酸に分解する代謝経路。最も基本的な代謝系の一つ。エムデン-マイヤーホフ経路は最も一般的な解糖系として知られており、ほとんどの真核生物や嫌気性細菌ではこの経路が用いられている。ホスホケトララーゼは、乳酸菌、酵母、カビなど一部の微生物に存在する特殊な解糖系であるビフィドシャント (bifid shunt) で中心的な役割を担う酵素である。

[2] X線自由電子レーザー (XFEL)

X線領域におけるレーザーのこと。従来の半導体や気体を発振媒体とするレーザーとは異なり、真空中を高速で移動する電子ビームを媒体とするため、原理的な波長の制限はない。また、数フェムト秒 (1 フェムト秒は 1,000 兆分の 1 秒) の超短パルスを出力する。XFEL は X-ray Free Electron Laser の略。

[3] XFEL 施設「SACLA」

理研と高輝度光科学研究センターが共同で建設した日本で初めての XFEL 施設。2011 年 3 月に施設が完成し、SPring-8 Angstrom Compact free electron LAser の頭文字を取って SACLA と命名された。コンパクトな施設の規模にもかかわらず、0.1nm 以下という世界最短波長クラスのレーザーの生成能力を持つ。

[4] 連続フェムト秒結晶構造解析 (SFX) 法

多数の微結晶を含む液体などをインジェクター（試料輸送装置）から噴出しながら、X 線レーザーを照射し結晶の構造を解析する手法。配向の異なる多数の微結晶からの回折イメージを連続的に収集する。SFX は Serial Femtosecond Crystallography の略。

[5] ホスホケトラーゼ

チアミンニリン酸 (TPP) を補酵素とする酵素群の一種。キシロース 5-リン酸（またはフルクトース 6-リン酸）とリン酸からグリセルアルデヒド 3-リン酸（またはエリスロース 4-リン酸）と水とアセチルリン酸を生成する反応を触媒する酵素（図 3 を参照）。

[6] 光誘起タンパク質結晶化プレート

ポケット部に金ナノ膜加工を施したタンパク質結晶化プレート。このプレートに光照射を行うと、金ナノ粒子に表面プラズモン共鳴が誘起され、金に吸着していたタンパク質分子の濃縮と配向が進行して、タンパク質結晶の核形成が促進され、結晶化期間の短縮が実現するとされている。群馬大学の奥津教授らにより開発され、富士フイルム和光純薬から製品化された。

[7] X 線結晶構造解析

タンパク質が規則正しく並んだ結晶に、X 線を照射すると回折像が得られる。その回折像を解析して、タンパク質の構造を解明する実験手法。タンパク質を構成する個々の原子の位置を決定できる。

[8] クライオ電子顕微鏡

透過型電子顕微鏡の一種。極低温下にサンプルを冷却して観察する。サンプルを結晶化する必要がないため、タンパク質などの生体分子の構造解析に適している。

[9] 放射線損傷

X 線の持つエネルギーによって、X 線と相互作用した分子が壊れること。X 線との相互作用で分子が壊れる場合だけでなく、分子が壊れる過程で生じる電子や、壊れた分子から生成する反応性の高い分子が観察対象の分子と化学反応する場合もある。一般的にタンパク質結晶の放射線損傷は、X 線と水の相互作用をきっかけに、X 線照射後ピコ秒（1 ピコ秒は 1 兆分の 1 秒）の時間スケールで、水から生成する反応性の高い分子がタンパク質

と化学反応することで起きる。

共同研究グループ

理化学研究所 放射光科学研究センター

利用技術開拓研究部門 SACLA 利用技術開拓グループ

グループディレクター 岩田 想 (イワタ・ソウ)

(京都大学大学院 医学研究科 教授)

分子動画研究チーム

チームリーダー 南後恵理子 (ナンゴ・エリコ)

(東北大学 多元物質科学研究所 教授)

利用システム開発研究部門 生物試料基盤グループ

グループディレクター (研究当時) 国島直樹 (クニシマ・ナオキ)

(理研 RSC-リガク連携センター 客員研究員)

前任研究員 (研究当時) 内藤久志 (ナイトウ・ヒサシ)

(利用技術開拓研究部門 生体機構研究グループ 前任研究員)

リサーチアソシエイト (研究当時) 松浦祥悟 (マツウラ・ヨシノリ)

利用システム開発研究部門 物理・化学系ビームライン基盤グループ

グループディレクター 矢橋牧名 (ヤバシ・マキナ)

高輝度光科学研究センター XFEL 利用研究推進室 実験技術開発チーム

チームリーダー 登野健介 (トノ・ケンスケ)

味の素株式会社

研究員 (研究当時) 中田國夫 (ナカタ・クニオ)

上席研究員 (研究当時) 柏木立己 (カシワギ・タツキ)

グループ長 (研究当時) 水越利巳 (ミズコシ・トシミ)

理事 (研究当時) 宮野 博 (ミヤノ・ヒロシ)

(エーエス フロンティアーズ代表/東京薬科大学客員教授)

研究支援

本研究は、the Japan Society for the Promotion of Science KAKENHI Grants No. 19H05781 (研究代表者：南後恵理子) and 19H05776 (研究代表者：岩田想); the Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research from the Japan Agency for Medical Research and Development under Grant No. JP21am0101070 (研究代表者：岩田想); the X-ray Free-Electron Laser Priority Strategy Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (研究代表者：岩田想)による支援を受けて行われました。