



日本学術振興会・産学協力委員会

R022 量子構造生物学委員会

第15回 研究会 資料

2024年9月13日（金）
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）

R022 量子構造生物学委員会
第 15 回研究会 プログラム

2024 年 9 月 13 日 (金)

会場：ミーティングスペース AP 日本橋
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2
日本橋フロント 6F

13:30 – 13:40

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

講 演

13:40 – 14:40 （講演 1）

司会：委員・庄村康人（茨城大学）

鉄活性中心における一酸化窒素還元分子機構

兵庫県立大学・大学院理学研究科
當 舎 武 彦

14:40 – 15:00 休 憩

15:00 – 16:00 （講演 2）

司会：委員・禾 晃和（横浜市立大学）

タンパク質分子機能の理論的理解と設計

京都大学・大学院理学研究科・化学専攻
林 重 彦

16:00 – 17:00 （研究交流討論）

委員・講師間の自由討論

鉄活性中心における一酸化窒素還元分子機構

Molecular mechanism for nitric oxide reduction at active iron centers

兵庫県立大学 大学院理学研究科

當 舍 武 彦

Takehiko Tosha

Graduate School of Science, University of Hyogo

1. はじめに

鉄をはじめとする遷移金属原子は、生体内において酵素の活性部位として機能し、様々な化学反応を生体内という温和な条件下で、高効率かつ高選択的に行っている。そのため、このような金属酵素の反応機構を理解することは、生命現象を分子論的に理解するために必須である。また、金属酵素に秘められた高活性の仕組みを明らかにすることは、新規触媒や人工酵素の設計においても重要な知見となる。金属酵素の反応機構を理解するためには、反応途中に過渡的かつ準安定的に形成される短寿命反応中間体の化学構造を明らかにすることが鍵となる。そのために、これまでに短寿命反応中間体の構造情報を得るための手段として種々の計測手法の開発や独自に設計した計測装置を用いた研究が数多く行われてきた。これらの過去の研究の測定技術の進歩は目覚ましいものがあるが、未だ短寿命反応中間体の構造情報を得るのは容易ではない。そこで、我々は、光照射により基質が放出されるケージド基質に注目し、金属酵素の反応機構解明のための手法開発に取り組んできた。そして、鉄活性中心において一酸化窒素 (NO) を還元する酵素の反応機構解明に挑んできた。以下では、可溶性 NO 還元酵素 (P450_{nor}) および膜結合型 NO 還元酵素 (NOR) の反応機構について、ケージド基質を用いた時間分解 X 線結晶構造解析、時間分解分光解析、ケージド基質の低温光解離を駆使して反応中間体の化学構造を決定した研究について説明する。

2. 可溶性 NO 還元酵素の反応機構の解明

可溶性 NO 還元酵素である P450nor は、カビ（真菌）にみられる酵素で、一原子添加酵素であるシトクロム P450 に属する。活性部位には、システイン由来のチオレートが配位したヘムを持ち、NADH からの電子を利用して、NO を還元し亜酸化窒素（ N_2O ）を発生する反応（ $2\text{NO} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ）を触媒する。本酵素に関する研究は、1990 年代に進められ高分解能結晶構造解析、変異体解析、および分光解析から反応機構が提案されたものの、反応中間体の構造を当時の技術では、決定することが難しく、その後、論争が続いていた。

2000 年代に入り、X 線自由電子レーザー（XFEL）を利用した時間分解構造解析が可能となり、P450nor の反応中間体の構造解析の道が拓けた。XFEL を用いれば、光励起の一定時間後に XFEL からの X 線パルス照射して反応途中の試料の X 線回折像を得る時間分解シリアルフェムト秒結晶構造解析（TR-SFX）が可能である。この TR-SFX の手法を P450nor の反応機構解析に適用するために、我々は、紫外光照射により NO を発生するケージド NO を利用した（図 1）。すなわち、P450nor の微結晶に NADH とケージド NO を含ませておき、紫外光照

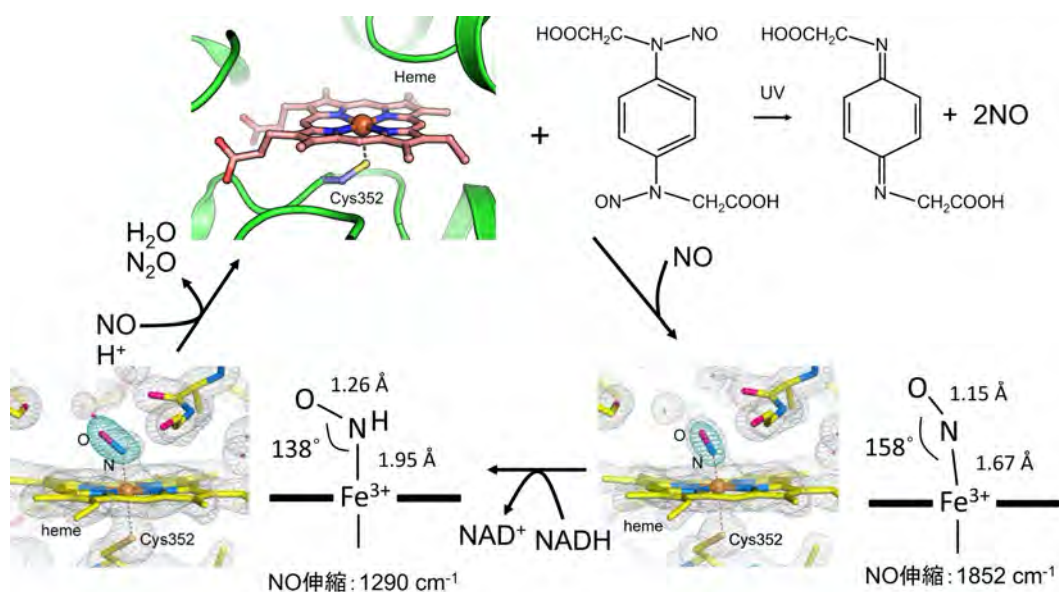


図 1. ケージド NO を利用した時間分解構造解析および分光解析から明らかとなった P450nor の反応機構。

射を反応のトリガーとして利用することで、TR-SFX を行った。その結果、鉄三価の休止状態に NO が結合した NO 結合型と、そこに NADH からの H⁺が供与された中間体（中間体 I）の構造決定に成功した [1, 2]。図 1 に示したとおり、NO 結合型では、NO が少し曲がった配向でへムに配位していた（ $\angle \text{FeNO} = 158^\circ$ ）のに対し、中間体 I では、NO 更に折れ曲がり、 $\angle \text{FeNO} = 138^\circ$ となるとともに、Fe-N と N-O の結合距離が、それぞれ 0.25 および 0.1 Å 長くなっていた。中間体 I は、NO 結合型が NADH により 2 電子還元された電子状態となるので、NO の結合次数がさがり、このような化学構造となったものと考えられる。

次に我々は、中間体 I の電子状態についての詳細を得るために、ケージド NO を利用した時間分解赤外分光（TR-IR）により、その NO 伸縮振動の観測を試みた。ケージド NO を用いた酵素反応のような不可逆反応の計測のために、試料を絶えず交換しながら測定を行うための微量フローセルを自作し、TR-IR 測定を行った。その結果、はじめに NO 結合型に由来する NO 伸縮振動が 1852 cm^{-1} に観測され、その減衰とともに、中間体 I に由来する NO 伸縮が 1290 cm^{-1} に観測された [2]。本結果と理論化学計算の結果とを合わせて、中間体 I は、 $\text{Fe}^{3+}\text{-NHO}^{\bullet-}$ という状態であると結論付けられた。この結果から、P450nor は、中間体 I において、配位子上のラジカル性を高めることで、もう一分子の NO とのラジカルカップリングによる反応を起こりやすくしているものと考えられた。このように、本研究から、1990 年代には明らかにすることができなかった P450nor の反応機構を 20 年以上の時を経て明確にすることができた（図 1）。

3. 膜結合型 NO 還元酵素の反応機構の解明

膜結合型の NO 還元酵素である NOR は、活性部位にへム鉄と非へム鉄からなる複核中心をもつ酵素で、本質的には P450nor と同様の反応（ $2\text{NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ ）を触媒する。NOR は、緑膿菌などの病原菌が感染時に宿主内で生育するために必須の酵素であり、新規抗菌薬の標的となりうる重要な酵素である。NOR による NO 還元の反応機構については、多くの研究者が興味をもち、多様なアプローチから研究が行われてきたが、その反応機構については決着が

ついていない。その理由は、NOR による NO 還元反応が数ミリ秒程度で完結する非常に速い反応であるために、短寿命反応中間体に関する情報が得られていないためである。

我々は、上述のような状況を打破するために、ケージド NO を用いた手法を NOR にも適用した [3]。還元型 NOR とケージド NO を混合した試料に紫外光を照射することで NO 還元反応を開始させ、その後の可視吸収変化を追跡した。その結果、以下のことが明らかとなった (図 2) [3, 4]。

- ① NO 還元反応は、中間体 1 と中間体 2 を経由した 3 段階の反応からなる。
- ② 第一段階の反応では、還元型 NOR に一分子の NO がマイクロ秒の時間領域で結合し、中間体 1 を形成する。
- ③ 第二段階の反応では、100 マイクロ秒程度の時間で、中間体 1 から中間体 2 が形成する。なお、この過程には、二分子目の NO の結合やプロトン輸送は関与しない。
- ④ 第三段階の反応では、ミリ秒の時間領域において、中間体 2 に二分子目の NO の結合およびプロトン化が起こることで N_2O を生成する。

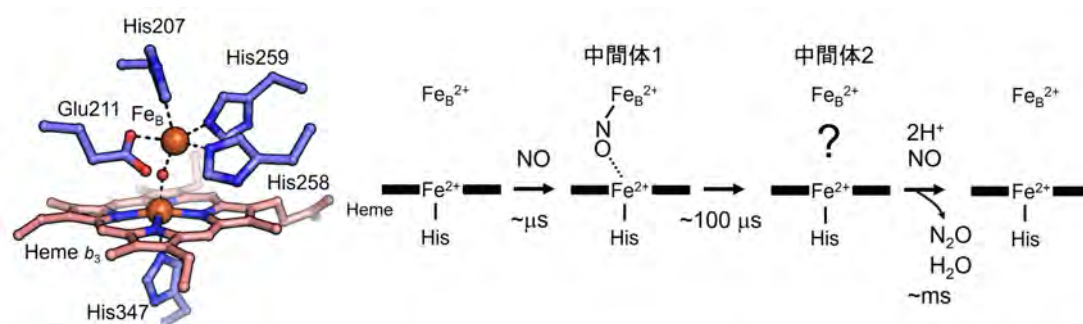


図 2. ケージド NO を用いた時間分解分光解析およびケージド基質の低温光解離を利用して明らかとなった NOR の反応機構。

次に、中間体の化学構造を決定するために、低温でのケージド NO の光解離を利用した反応中間体の捕捉を試みた [5]。本手法では、はじめに還元型 NOR とケージド NO を混ぜた試料を凍結し、液体窒素温度で紫外光照射を行う。液体窒

素温度においてもケージド NO からの NO の発生は起こるものの、NO は試料中を拡散しないため、NOR とは反応しない。この後、試料温度を水溶液のガラス転移温度以上 (>160 K) まで昇温すると、凍結状態を保ったまま試料中を NO が拡散し、NOR との反応が開始されるので、反応中間体を低温捕捉できる。この手法を用いて、中間体 1 を捕捉し、電子スピン共鳴法による解析を行った結果、中間体 1 は、非ヘム鉄に NO が結合した状態であることを突きとめた (図 2)。現在は、別の分光法を用いて、中間体 2 の化学種の決定を目指している。

4. 今後の展望

ここまで、二種類の NO 還元酵素について、光解離性のケージド NO を用いた手法による反応機構の解明を目指した我々の研究について述べてきた。P450nor と NOR が単離されて約 30 年の時が経ち、その反応機構の詳細がようやく明らかとなってきた。これらの研究の背景には、XFEL の共用利用開始をはじめとした科学技術の発展がある。今後も様々な計測技術の発展があると予想されるが、それらを自身の研究に上手く取り入れ、研究を進めることが重要であろう。本研究では、光解離性の基質としてケージド NO を用いたが、ケージド化合物には、タンパク質の動的構造解析研究に適用可能な様々な化合物が存在しているため、それらを利用した研究に期待がもてる。特に、ケージド化合物の低温光解離を用いた研究では、ケージド化合物の光解離の速度や、その量子収率など、時間分解測定において重要な因子を気にする必要がなく、汎用性のある手法として利用できる可能性がある。我々の研究が、今後のタンパク質の動的研究に少しでも役立てば幸いである。

- [1] Tosha T *et al.* “Capturing an Initial Intermediate during the P450nor Enzymatic Reaction using Time-Resolved XFEL Crystallography and Caged-Substrate” *Nat. Commun.*, **8**: 1585 (2017)
- [2] Nomura T *et al.* “Short-lived intermediate in N_2O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**: e2101481118 (2021)

- [3] Takeda H *et al.* "Timing of NO Binding and Protonation in the Catalytic Reaction of Bacterial Nitric Oxide Reductase as Established by Time-Resolved Spectroscopy" *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **93**: 825-833 (2020)
- [4] Tosha T *et al.* "NO Dynamics in Microbial Denitrification System" *Chem. Lett.*, **50**: 280-288 (2021)
- [5] Takeda H *et al.* "Trapping of a Mononitrosyl Nonheme Intermediate of Nitric Oxide Reductase by Cryo-Photolysis of Caged Nitric Oxide" *J. Phys. Chem. B*, **127**: 846-854 (2023)

タンパク質分子機能の理論的理解と設計

Theoretical Understanding and Design of Protein Functions

京都大学 大学院理学研究科 化学専攻

林 重彦

Shigehiko Hayashi

Department of Chemistry, Graduate School of Science,
Kyoto University

1. はじめに

生命活動を支えるタンパク質分子は、様々な形で与えられるエネルギーを効率良く使い、物質や情報の変換・制御などの顕著な分子機能を発揮する。40 億年の進化の洗練を経て精緻な分子構造に織り込まれたタンパク質分子の機能性は、多くの場合、人工的に合成された分子のそれを遥かに凌駕する。そのような顕著な分子機能は、分子機能をトリガーするリガンド結合や酵素活性反応などの活性部位での局所的分子イベントと、複雑なタンパク質分子の動的かつ大域的な分子コンフォメーション変化を共役させることに達成される。すなわち、そのタンパク質機能は、安定状態の分子構造のみならず、機能発現ダイナミクスの中に瞬間的に現れ、共役を実現する機能活性化状態の構造が決定している。従って、その分子機能を理解し、さらにそれを改変し有用な新規タンパク質機能を開発するためには、その機能活性化状態を明らかにする必要がある。

そのようなタンパク分子ダイナミクスの中に現れる機能活性化状態に対して、原子・分子の物理法則を基盤とする物理化学な分子モデルを構築し、コンピュータを用いてその物理化学モデルの解を数値的に求めることにより、分子機能の物理的・化学的理解を得る分子シミュレーションが発展してきた。特に近年の計算機能力の飛躍的な向上と、それに呼応する方法論の拡張・成熟により、その近似的精度は格段に向上し、最近では実験的観測に先立つ理論予測・設計の成功が得られている。本講演では、我々が開発したタンパク質分子機能解析のための新

規な分子シミュレーション手法を概説すると共に、それを用いた膜輸送体などにおける機能活性化状態の予測・解明や、実験探索を凌駕する新規な光特性を有する変異体の理論予測について解説し、今後の新規タンパク質分子機能開発に関して議論する。

2. 機能活性化状態を予測する新規な分子シミュレーション手法

最も良く用いられる分子シミュレーション手法である分子動力学 (MD) 法では、構造生物学的手法により与えられる分子構造情報から、MM 力場と呼ばれる物理化学的な分子のエネルギー関数に基づき、その分子ダイナミクスをシミュレートし、得られた統計データから現象を決定するエナジェティクスを得ることが出来る。また、分子の電子量子状態が大きく変化する酵素反応に関しても、量子化学的 (QM) 手法を用いたハイブリッド法である QM/MM 法により取り扱うことが可能である。

しかし、QM/MM 法は、非常に多くの演算を要する QM 法の計算に律速されるため、タンパク質機能活性化ダイナミクスを十分に記述できる時間スケールのシミュレーションを行うことができない。我々は、その困難を回避するために、長時間の MD シミュレーションから得られる MM 構造統計サンプルデータから構成される自由エネルギーを最適化する QM/MM 自由エネルギー法 (QM/MM RWFE-SCF 法) を開発した [1-3]。この手法は、厳密に変分的であり、かつ高い計算効率性を有するように設計されており、大域的なタンパク質構造変化における高精度な機能活性化状態のモデリングを可能にする。

また、MM 力場を用いた MD シミュレーションの時間スケールは、最近の計算機の発展により大きく伸びているものの、以前マイクロ秒に留まっており、ミリ秒以上の時間スケールをもつ多くのタンパク質機能活性化を直接的にシミュレートすることは困難である。そこで、我々は、化学反応やリガンド結合部位などの機能に重要な局所的相互作用とタンパク質の機能的な大規模構造変化の相関に着目し、機能活性化のタンパク質構造変化を促進する MD シミュレーション手法 (LRPF 法) を開発した [4]。この手法では、池口らの線形応答理論 [5]

に基づく手法を拡張し、大域的で複雑な機能活性化のタンパク質構造変化の探索を可能にしている

3. チャネルロドプシンの光活性化状態の構造モデリング

チャネルロドプシンは、レチナールプロトン化シッフ塩基 (RPSB) 分子を発色団分子としてタンパク質内部に結合する光感受性のイオンチャネルであり、神経科学における光遺伝学のタンパク質ツールとして用いられている。チャネルロドプシンのイオンチャネル輸送は、RPSB 分子の光吸収による光異性化反応により活性化される。

我々は、カチオンチャネルロドプシンである C1C2 タンパク質の光活性化中間状態の構造を、QM/MM RWFE-SCF 法を用いてモデリングした (図 1) [6]。その結果、これまで知られている類縁のイオンポンプ機能を有するロドプシンとは大きく異なる光活性化中間状態の構造が予測された。その後、時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析 (TR-SFX) 実験により C1C2 タンパク質の光活性化の構造変化が報告されたが、我々の理論予測と同様な構造変化が観測され (図 1) [7]、分子シミュレーションによる予測の成功が示された。

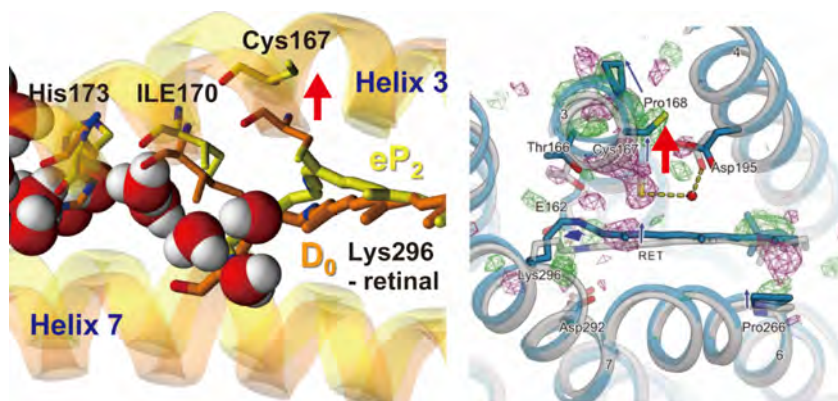


図 1. C1C2 タンパク質の光活性化中間状態の理論モデル (右) と TR-SFX 解析による光活性化構造変化 (左)

更に、QM/MM RWFE-SCF 法を用いてアニオンチャネルである GtACR1 の光活性化構造のモデリングを行った [8]。その結果、イオンチャネルが開いた状

態の開構造のモデルを得ることに成功した。チャンネルロドプシンのチャンネル開状態の構造は実験的にも得られておらず、イオンチャンネル機能解明やチャンネル機能改変変異体に向けての大きな予測となっている。

4. レチナールタンパク質の色変異体の理論設計

QM/MM RWFE-SCF 法は、長時間の MD 法と組み合わせるため、機能を変調する変異体タンパク質の高精度な構造モデリングが可能である。そこで、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、RPSB 分子を結合したレチナールタンパク質の色変異体の設計を行った。RPSB 分子は、光吸収波長が周辺のタンパク質環境に依存して鋭敏に変化する。その性質は光遺伝学のタンパク質ツールとしても有用であり、光吸収波長が変調する色変異体の実験的な探索が精力的に行われている。そこで、我々は、光遺伝学で用いられている光感受性イオン膜輸送体ロドプシンに対して、光吸収波長が大きく変調する変異体の理論設計を行った [9]。実験検証の結果、100 nm もの大きな吸収波長シフトをもたらす変異体の理論設計の成功が示された。これまでの色変異体の実験探索では 50 nm の吸収波長シフトが最大であり、理論設計によりその倍の吸収波長シフトを得ることに成功した。

また、指向的進化実験により得られている非常に大きな吸収波長シフトを有するレチナール結合モデルタンパク質の色変異体に対して QM/MM RWFE-SCF 法を用いた構造モデリング及び吸収波長計算を行った [10]。その結果、実験の吸収波長シフトを再現することに成功し、本手法が変異導入によるタンパク質構造変化を高精度に捉えることが可能であることが示された。

5. ADP/ATP 膜輸送 (AAC) タンパク質の alternating access 構造の理論予測

AAC タンパク質はミトコンドリア内膜に存在し、ADP 分子と ATP 分子の膜輸送を行う。研究を行った当時は、ミトコンドリア輸送体として唯一その結晶構造が得られており、他の膜輸送体とは大きくことなる擬三回対称性を有する新規フォールドの構造であることが知られていた。また、得られていた結晶構造は、

ミトコンドリアの外側に開いた構造（OF 構造）であり、内側に開いた構造（IF 構造）は実験的に得られておらず、その輸送機構の詳細は未開であった。

そこで我々は、LRPF 法を用いて、alternating access 構造変化の理論的な探索を行い、IF 構造の理論的なモデリングに成功した（図 2）[11]。その理論構造モデルは非常に安定であり、また、IF 構造を阻害する薬剤分子も強く結合することが示された。その後、X 線結晶構造解析により IF 構造が決定されたところ [12]、理論構造モデルはその構造を原子レベルから正確に予測していたことが示された（図 2）。ミトコンドリア膜輸送体の alternating access 構造を最初に解明したのは理論計算である。

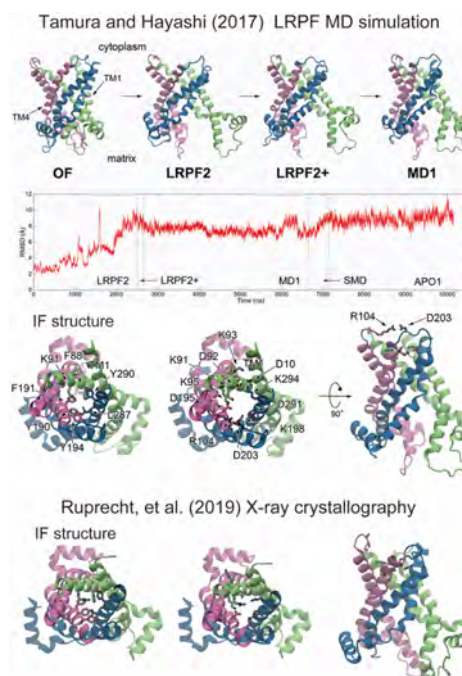


図 2. AAC 輸送体の alternating access 構造変化

6. おわりに

従来の理論研究は、実験結果を後付的に説明し物理的・化学的解釈を与えることが主たる役割であった。しかし、近年の計算機能力の向上とそれが可能にする分子シミュレーションの方法論の発展は、タンパク質分子機能の理解と設計に対して理論的な予測能力を基盤とする次の段階の研究ステージに発展しつつあることを示している。一方、分子シミュレーションのアプローチは、間違える可能性を宿命として持ち（それが本質の一部とも言える）、また新規機能性変異体予測探索の効率も未だ低い。この弱点は、しかしながら、TR-SFX などの様々な実験的手法の発展とのシナジーにより解決されることが期待される。本講演では、理論と実験の協同による新規タンパク質機能開発の今後の可能性についても議論したい。

-
1. T. Kosugi, S. Hayashi, *J. Chem. Theory Comput.*, **8**, 322 (2012).
 2. T. Kosugi, S. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 7045 (2012).
 3. S. Hayashi *et al.*, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **68**, 135 (2017).
 4. K. Tamura, S. Hayashi, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 2900 (2015).
 5. M. Ikeguchi *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 078102 (2005).
 6. C. Cheng, *et al.*, *Biophys. J.*, **115**, 1281 (2018).
 7. K. Oda *et al.*, *eLife*, **10**, e62389 (2021).
 8. T. Shikakura *et al.*, *J. Phys. Chem. B* (2024), in press.
 9. H. E. Kato *et al.*, *Nat. Commun.*, **6**, 7177 (2015).
 10. C. Cheng *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 13362 (2015).
 11. K. Tamura, S. Hayashi, *PLOS ONE*, **12**, e0181489 (2017).
 12. J. J. Ruprecht *et al.*, *Cell*, **176**, 435 (2019).