

2022 年度 iBIX-JAXA-KEK 物構研-QST 合同タンパク質研究会

WEB 配信によるオンライン開催といたします。

テーマ：「酵素反応の中間体」の観測は可能か

主 催：

茨城県中性子利用研究会

(国研) 宇宙航空研究開発機構 (JAXA) きぼう利用センター

高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 物質構造科学研究所

(国研) 量子科学技術研究開発機構(QST) 量子生命・医学部門 量子生命科学研究所

共 催：中性子産業利用推進協議会

J-PARC MLF 利用者懇談会

開催日時：2023 年 2 月 27 日 (月) 13:00-17:00

場 所：オンライン開催 (ウェブ会議システムは後日通知)

参加費：無料

趣旨：創薬の対象となるタンパク質は、主にバクテリアと動物のものである。これらの普通の酵素は、温度を下げると全体の酵素活性が低下し、10°Cをきると反応が進行しない。

これまで、酵素の反応機構について、約 20°Cで成長させた結晶を用い、液体窒素温度で測定し、X 結晶構造解析が行われてきた。その際、1. 反応活性を失った変異体酵素と基質との複合体の結晶の試料、2. 金属イオンが活性の中心となる酵素において、金属イオンを変えて酵素活性が低下した酵素の単結晶に基質をソーキングし、短時間で反応を止めた試料、あるいは、3. 高い阻害活性を持っている反応性のない基質のアナログとの複合体の試料が、X 線結晶構造の対象となり、「酵素反応の中間体」の状態として捉え反応機構が提案されてきた。

ところで、活性を示さない温度で酵素と基質を混ぜた試料を使ってクライオの試料を作成し、この試料をクライオ電子顕微鏡で測定した場合、反応前に酵素に付いている基質の状態を観測することが可能かどうか。このような実験は行われているだろうか。

結晶構造から、水溶液中の酵素の反応機構を論ずる際、基質の溶解度が低いが、水に溶ける状態は、基質にある割合で水がついている、水和していることを示している。水和した水が外れていくと、基質が互いについて沈殿してしまう。このことを考慮しているだろうか。基質について水分子が外れ、酵素の活性領域の水分子も外れて相互作用し、生成物は水分子が付いて離れていく機構を、水を含めて考えているのだろうか。結晶構造解析で観測される水分子は、3 次元的に規則正しく並んでいる。これまでの酵素の反応機構を振り返る時期に来ているのではないか。これまでの反応機構の提案に何が問題か考えることも必要ではないか。

今回は、結晶構造から提案された様々な酵素反応機構について考える場にしたい。

研究会主査：

今野美智子 (茨城県)、山田貢 (JAXA)、千田俊哉 (KEK 物構研)、玉田太郎 (QST)

(講演時間は質疑応答時間 10 分を含む)

プログラム

司会 玉田 太郎 (QST)

13:00 開会挨拶 今野 美智子 (茨城県)

13:05-13:35 「高エネ機構における結晶化の自動化の最新状況」

加藤龍一 (KEK 物構研)

タンパク質の立体構造情報を取得する手法として、これまで主であったX線結晶構造解析に加え、クライオ電顕による単粒子解析、AlphaFold2による構造予測、が大きな比重を占めてきている。X線結晶構造解析の手法上の弱点は、良い結晶を得る過程にある。それを克服するために、我々は結晶化条件の探索を全自動で行う自動化システムの開発を行ってきた。本講演では、最少0.1 μ Lの微量分注、観察装置の高解像度化、seeding や additive screening への対応、結晶化プレートのままでのX線回折実験、などのここ数年で実装した機能について述べ、以前に比べてより効率的にX線結晶構造解析が実施できるようになってきたかを紹介したい。

13:35-14:05 「ウミホタルが光る仕組みを結晶構造から解き明かしたい」

木平 清人 (JAXA)

ウミホタルは日本沿岸にも棲息する発光生物の一つで、細胞外に分泌されたルシフェラーゼ (CLuc) とイミダゾピラジノン骨格のウミホタルルシフェリンが反応すると青色に発光する。CLuc は分泌型であることや既存の系とは異なる基質を利用し異なる発光色を呈することから、プローブとしての有用性・独自性が高く、新奇イメージング技術を構築可能であると考えている。最近、宇宙実験により得られた結晶を用いてNative SAD法による位相決定に成功し、CLucの結晶構造を明らかにすることができた。そこで、これまでの実験結果をご紹介しつつ、発光反応機構について聴衆の皆様方と意見交換をさせていただきたい。

14:05-14:50 特別講演 「X線自由電子レーザーによるタンパク質分子動画解析」

南後 恵理子 (東北大学)

近年、X線自由電子レーザー (XFEL) により、数10フェムト秒に達する時間分解能でタンパク質動的構造を捉えることが可能となった。我々は、XFELを用いたタンパク質結晶構造解析手法であるシリアルフェムト秒結晶構造解析による時分割実験手法開発に取り組んできた。実際、本手法により光駆動型プロトンポンプの光反応過程を原子レベルで“動画”のように捉えることに成功し、最近では酵素などの光非励起性タンパク質の動画解析も可能になりつつある。本発表では、我々が取り組んできた分子動画解析の技術開発と実際の解析例について紹介する。

14:50-15:05 休憩

司会 山田 貢 (JAXA)

15:10-15:40 「Mn-カタラーゼにおける過酸化水素不均化反応機構の解明に向けて」

庄村 康人 (茨城大学)

カタラーゼは過酸化水素を不均化する好気性生物特有の酵素で、多くの生物種は活性部位にヘムを含む

タイプの酵素を有する。一方、活性部位に二核マンガンをもつタイプのカタラーゼは乳酸菌や好熱菌など一部のバクテリアのみに知られており、1960年代に発見されてから今日に至るまでその反応機構は解明されていない。我々のグループではX線・中性子結晶構造解析を主たる手法としてMn-カタラーゼの研究を進めており、これまでに各酸化状態の結晶構造解析を行ってきたが、活性部位周りの密度図の解釈が困難なため、水素を含む配位構造の決定には未だ至っていない。本講演では、この問題に対するこれまでの取り組みと成果について報告する。

15:40-16:10 「X線回折データを相補的に用いたヒドロゲナーゼ酸化型の中性子結晶構造解析」
廣本 武史 (QST)

ヒドロゲナーゼは水素分子の合成と分解を触媒する酵素で、嫌気性微生物のエネルギー代謝において重要な役割を担っている。硫酸還元菌の有する[NiFe]ヒドロゲナーゼは、大小2つのサブユニットからなるヘテロ二量体を形成し、その活性部位にNi-Fe二核金属錯体を有している。本研究では、NiおよびFeのX線異常分散効果を利用することで、好気条件下で得られる不活性な酸化型酵素中に、四角錐型Ni(III)錯体の他に平面四角形型Ni(II)錯体が生成していることを明らかにした。また、この酸化型酵素に特有な水素原子の位置情報の取得を目指し、中性子結晶構造解析を行ったので報告する。

16:10-16:55 特別講演 「RNaseHにおけるMg²⁺イオン依存性触媒反応機構」
森川 耿右 (京都大学)

RNaseHは生物に普遍的に存在するnucleaseであり、DNA/RNAハイブリッドのRNA主鎖のみを特異的に分解する。生物種に依存して異なるタイプが存在するが、Mg²⁺イオンを必須とする切断機構は普遍的と考えられている。一方、細胞内における本来の機能については未だに結論が出ていない。1990年に我々のグループにより*E. coli* RNaseHIの立体構造が報告されて以来、触媒部位と基質結合様式の概要は、他のグループによる構造研究結果とも一致している。一方、RNA鎖の詳細な加水分解機構については、必須のMg²⁺イオン数をはじめとして未解決の問題が多々存在する。特に当講演者は、この問題の本質は「生物界において、DNAやRNA等の分解と合成反応に何故かくもMg²⁺イオンが必須の金属リガンドとして広く要求されるのか？」という分子進化に関する問題と考えている。このような観点からRNaseHとMg²⁺イオンの相互作用について述べてみたい。

16:55 閉会挨拶 安齋 英哉 (茨城県)

<参加申込み先>

参加を希望される方は下記申込フォームから2月23日(木)までにお申し込みください。定員になり次第、締め切ることがあります。

https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSf_Xag7ERm8X5sgDtF_3BQGctv36bMJdfm7ats53lSh3D2Pwg/viewform

上記フォームより申込みできない場合は、(1)名前、(2)所属、(3)メールアドレスをご記入の上、事務局までお申し込みください。

茨城県中性子利用研究会事務局 田中志穂 (tanaka@ibaraki-neutrons.jp)

接続情報、配付資料につきましては開催前に参加者へお知らせします。