

SACLA で捉えた フラビントタンパク質中の逐次的電子・プロトン移動の動的制御

大阪大学 大学院基礎工学研究科

山元 淳平

Academia Sinica, Taiwan

National Taiwan University

Manuel MAESTRE-REYNA

Philipps University Marburg, Germany

Lars-Oliver ESSEN

Academia Sinica, Taiwan

Ming-Daw TSAI

Academia Sinica, Taiwan

国立研究開発法人 理化学研究所 放射光科学研究センター

東京大学 大学院農学生命科学研究科

別所 義隆

Abstract

フラビン補酵素はさまざまな生体内酸化還元反応において普遍的に用いられている。フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を有する DNA 光回復酵素は、DNA 修復反応および FAD の光還元反応に青色光を用いる。後者の反応では、FAD への 2 回の電子移動反応およびプロトン化が起こることで、DNA 修復活性を有する酵素状態が形成される。本研究では、光還元における電子移動反応に続くナノ秒〜マイクロ秒における FAD および周辺アミノ酸側鎖の動きを記述するため、SACLA にて時分割シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析を実施した。その結果、光回復酵素・クリプトクロムスーパーファミリーが持つ FAD 近傍に存在する Asn 側鎖および Arg-Asp 塩橋が、FAD 還元反応に伴う構造変化およびプロトン化を制御することを見出した。

1. フラビンと光回復酵素

光合成や好気呼吸に代表されるように、全ての細胞システムは電子伝達鎖に依存している^[1]。シトクロムや鉄硫黄タンパク質のような電子伝達タンパク質群は一電子移動を行う一方で、電子伝達鎖が触媒する反応サイクルではドナー・アクセプター間で計 2 電子の移動が行われる。この一見した矛盾は、キノン類分子もしくはフラビン系分子の存在によって解決される。これらの分子種は 1 電子ないし 2 電子を受け取ることができるため、酸化型 (キノン)、半還元型 (セミキノン)、ならび還元型 (ヒドロキノン) の 3 つの酸化還元状態で存在する。フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) における複数の電子移動反応の一例として、DNA 修復を担うフラビントタンパク質である DNA 光回復酵素における FAD 光還元反応が挙げられる。光還元反応とは、サブナノ秒で起こる光誘起電子移動を起点として、触媒不活性な酸化型 FAD (FAD_{ox}) からラジカルセミキノン FAD[•] およびそのプロトン化体

FADH[•] を経て、光回復酵素の DNA 修復活性に必要なヒドロキノン FADH₂ を光依存的に生成する過程である (図 1A) ^[2]。この反応の電子伝達鎖はタンパク質内部に存在する 3 つないし 4 つの Trp 側鎖であり、最終的に外部環境から電子を獲得することができる^[3]。活性化された光回復酵素は、光励起状態の FADH[•] から紫外線によって形成される損傷 DNA であるシクロブタン型ピリミジンダイマーへ青色光依存的に電子移動が起こることで、元の塩基構造へと戻ることができる^[4]。

過去 30 年以上にわたり、光回復酵素の FAD 光還元反応は分光学や計算科学によって研究されてきた。しかし、ナノ秒〜マイクロ秒に起こる電子移動後のフラビン化学種がどのように周辺アミノ酸側鎖によって安定化されるのか、依然として情報が不足している。さらに、分光学測定ではフラビン化学種や電子伝達鎖の電子遷移に限定した情報を与えるため、タンパク質環境やフラビンの構造変化に関する情報は得られない。

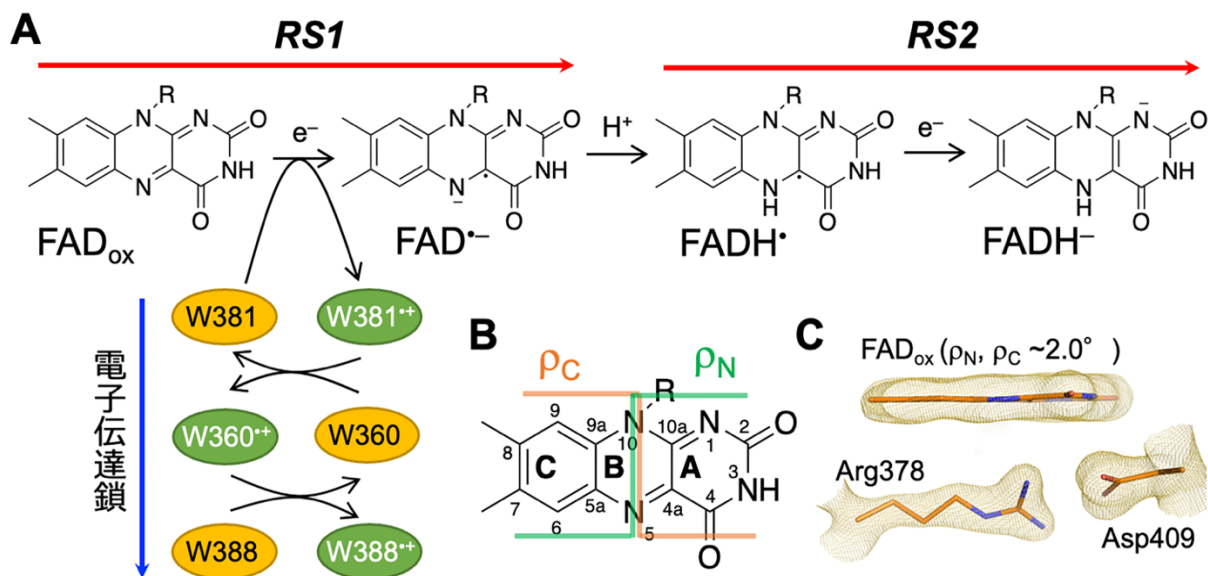


図1 光回復酵素中のFADについて。(A) FAD光活性化過程。光回復酵素中に高度に保存された3つのTrp(W)側鎖から光依存的に電子を獲得することで、酸化型FAD(FAD_{ox})からアニオンラジカル型FAD($FAD^{\bullet-}$)へと変化し、さらにプロトン化が進行することで中性セミキノン型FAD($FADH^{\bullet}$)が生じる。 $FADH^{\bullet}$ が同様の反応を経ることで、2電子還元型FAD($FADH^-$)が生じる。(B) FADの構造変化を記述する二面角。C9-N10-N5-C4を ρ_C 、C6-N5-N10-N1を ρ_N と定義する。(C) FAD_{ox} を有する*MmCPDII*のSFX構造と $2Fo-2Fc$ 電子密度マップ。

従来のX線結晶構造解析では、短寿命なフラビンラジカル類を含めた過渡的な立体構造の捕捉は困難であり、さらに放射線損傷の影響により単一の酸化還元状態にある構造さえも解析することは難しい。

本研究では、*Methanosarcina mazei*由来クラスII DNA光回復酵素(*MmCPDII*)の光還元反応に着目し、FAD酸化還元状態の変化、および過渡的な立体構造変化をSACLAにおける時分割シリアルフェムト秒X線結晶構造解析(TR-SFX)により解析した。本研究により、フラビンラジカル類ならびに過渡生成化学種がどのように安定化されるかを明らかにした^[6]。

2. 実験概要と構造命名ルール

光回復酵素の光還元反応では、1段階目の還元反応(RS1)として FAD_{ox} から $FAD^{\bullet-}$ の形成を経て $FADH^{\bullet}$ が、また2段階目の反応(RS2)では $FADH^{\bullet}$ から $FADH^-$ の形成が起こる。RS1において、 $FAD^{\bullet-}$ のプロトン化が起こらない限り、RS2は起こらない。そこで、 FAD_{ox} 、 $FADH^{\bullet}$ ならびに $FADH^-$ を有する酵素を各々調製し、RS1とRS2を別々に追跡した。得られた酵素の構造は E_{XY} と表し、Xは反応前のFAD酸化還元状態(ox: FAD_{ox} 、semi: $FADH^{\bullet}$ 、red: $FADH^-$)を、またYは

データ収集条件(sync: シンクロトロン、ss: 定常状態SFX、dark: TR-SFXにおける暗状態構造、時間: TR-SFXにおける遅延時間)とする。

また、FAD中のイソアロキサジン環の構造変化を記述するため、2つの二面角 ρ_C および ρ_N を導入する(図1B)。一般に、FADの還元に伴って、A環面とC環面間の角度 α が小さくなるバタフライ構造をとることが知られている。しかし、角度 α は長軸側のねじれ構造と水平方向の曲がりや短軸側のバタフライ構造を区別することができない。二面角の導入により、これらを区別することができる。

3. RS1における構造変化

RS1の初期状態である $E_{ox/ss}$ の無損傷SFX測定の結果、シンクロトロン構造 $E_{ox/sync}$ ^[6]と比較して、同様の全体構造をとっていることを確認した。しかし、 $E_{ox/sync}$ におけるイソアロキサジン二面角($\rho_C \sim 7.6^\circ$, $\rho_N \sim 8.7^\circ$)と比較して、 $E_{ox/ss}$ はよりフラットな構造(ρ_C , $\rho_N \sim 2.0^\circ$)を有することがわかった(図1C)。このことから、 $E_{ox/ss}$ はほぼ完全に FAD_{ox} を持つ一方で、 $E_{ox/sync}$ は放射線損傷を受け、部分的に還元されていることが示唆された。また、 $E_{ox/dark}$ は $E_{ox/ss}$ とほぼ同一の構造であ

ったことから、TR-SFX 測定のコントロールとなることがわかった。

FAD_{ox}を有する酵素結晶を 408 nm にて励起後、10 ns から 5 ms までの 9 点の遅延時間にて、RS1 の電子移動後に起こる構造変化を追跡した (図 2A)。その結果、イソアロキサジン環や周辺環境における構造変化が見られた一方で、電子伝達鎖である Trp には変化が見られなかった。この結果は本酵素の電子移動そのものは 1 ns 以下にて完了するという分光学による知見と一致する。

まず、FAD 構造の変化について記述する。FAD_{ox}から FAD⁻の遷移に伴い、 ρ_C が 10 ns から 10 μ s にかけて約 30°まで増加した (図 2A)。 ρ_N についても同様の傾向を示したが、その変化は緩やかであった。一方、2 つの二面角は 125 μ s から 400 μ s にかけて元の角度へと戻った。これは過渡的に形成されたトリプトファンラジカルと FAD⁻の間で電荷再結合することで暗状態へと戻っていることを示唆している。

FAD の近傍に、Arg378 と Asp409 で形成される塩橋があり、この Arg378 において構造変化が認められた。 $E_{ox/1\mu s}-E_{ox/ss}$ の差マップを解析したところ、Arg378 の N ϵ 原子の上部に正の電子密度ピークが観測された (図 2B)。このピーク強度は 250 ns から 1 μ s にかけて増大し、その後 1–5 ms にかけて元の状態に緩和した^[5]。このことから、Arg378 のイソアロキサジン N5 原子への接近は、FAD⁻の折れ曲がりと同時に起こっていることが示唆された。興味深いことに、Arg378 の N ϵ が N5 へ接近する一方で、Arg378–Asp409 塩橋には変化が観測されなかった。

上記 N5 の近傍には、Asn403 が位置している。 $E_{ox/ss}$ 構造では、Asn アミド基 N δ はイソアロキサジン O4 と水素結合距離に位置している一方で、RS1 の進行に伴いアミド基が回転し、N δ はイソアロキサジン N5 に接近する様子が観測された (図 2C)。

4. RS1 後の $E_{semi/ss}$ 構造

RS1 の後、FAD⁻がプロトンを獲得すると、FADH⁻が形成される。RS1 の TR-SFX 測定では、10 μ s 以降暗状態への電荷再結合が観測されていたため、FADH⁻形成過程を捉えることはできなかった。そこで、RS2 の初期状態である $E_{semi/ss}$ の無損傷 SFX 測定を行った。

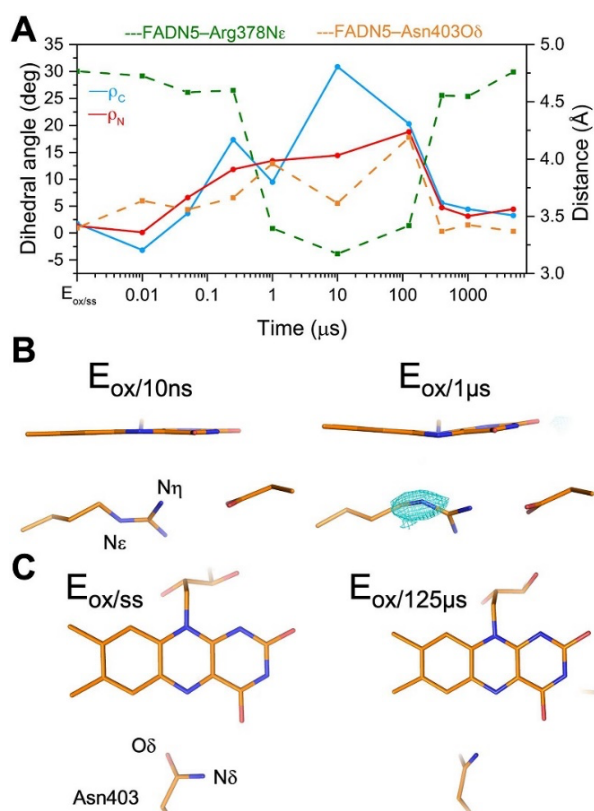


図 2 RS1 における FAD および近傍アミノ酸の構造変化。(A) FAD および Arg378–Asp409 塩橋の構造変化。青色は $E_{ox/1\mu s}-E_{ox/ss}$ の電子密度差マップ (3 σ) の正の変化を表している。(B) FAD および Asn403 の構造変化。(C) RS1 における FAD 構造変化 (実線: ρ_C と ρ_N) および周辺アミノ酸との距離の変化 (点線)。

$E_{semi/ss}$ のイソアロキサジンは比較的フラット (ρ_C , $\rho_N \sim 5^\circ$) であり、FADH⁻の構造は FAD_{ox} のそれと類似点が見られた (図 3A)。一方で、その近傍に存在する Arg378–Asp409 塩橋には変化が見られた。Asp409 の構造は大きな変化がなかった一方で、Arg378 のグアニジン部位は回転しており、もはや Arg–Asp 側鎖間で塩橋は形成していないことが観測された (図 3A)。この結果および周辺環境にプロトンドナーとなりうるアミノ酸側鎖や水分子が存在しないことから、Arg378 が FAD⁻から FADH⁻へのプロトンドナーを担っていることが示唆される。実際、19,524 種の光回復酵素・クリプトクロムスーパーファミリータンパク質のアミノ酸配列を調査すると、わずか 9 種を除く大多数がこの塩橋を保有しており、高度に保存されている塩橋が機能に非常に重要である

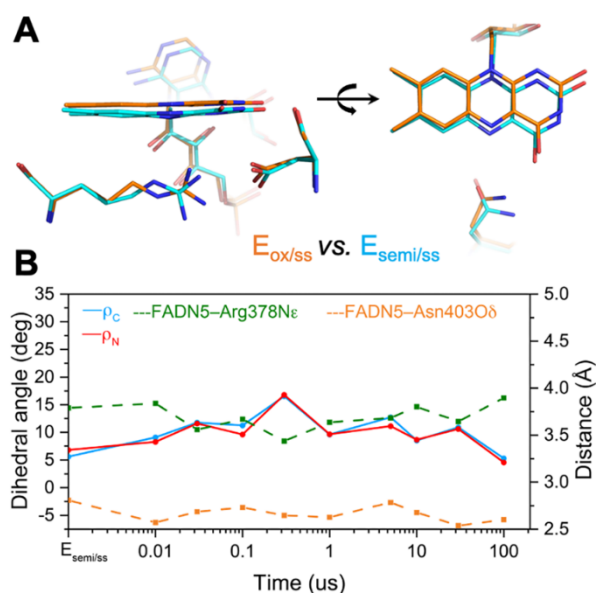


図3 RS2におけるFADおよび近傍アミノ酸の構造変化。(A) RS2の初期状態である $E_{\text{semi/ss}}$ の構造(シアン)。比較のため、RS1の初期状態である $E_{\text{ox/ss}}$ の構造(オレンジ)についても示している。(B) RS2におけるFAD構造変化(実線： ρ_C と ρ_N)および周辺アミノ酸との距離の変化(点線)。

ことが示唆される。

溶液中における $\text{FADH}^\cdot$ の pK_a は8.5程度であることから、塩基性側鎖($pK_a \sim 12.5$)を持つArgからのプロトン化は起こらないことが考えられる。しかし、フラボドキシン中の $\text{FMNH}^\cdot$ の pK_a は、タンパク質主鎖のカルボニル基との水素結合形成により、13程度まで上昇することが報告されている^[7]。今回、同様のことが $Mm\text{CPDII}$ でも起こっていると考えられる。 $E_{\text{ox/ss}}$ におけるAsn403の $\text{O}\delta$ 原子は、イソアロキサジンN5原子の近傍に位置しているが、 $\text{FAD}^\cdot$ の形成に伴い回転し、N5から遠ざかる様子が観測されていた(図2C)。プロトン化が起こった後の $E_{\text{semi/ss}}$ では、Asn403側鎖は再び回転し、N5-Hの近傍に位置していた(図3A)。このことから、Asn403が $\text{FADH}^\cdot$ の pK_a の向上に寄与すると考えられる。

5. RS2における構造変化

次に、 $\text{FADH}^\cdot$ から FADH_2 への光還元反応(RS2)の追跡のため、 $\text{FADH}^\cdot$ を有する酵素微結晶を408 nmで励起後、10 nsから100 μs までの9点の遅延時間にて構造解析を行なった。二面角 ρ_C と ρ_N は300 nsま

で一様に増加し、 16.5° および 16.8° まで変化した(図3B)。この値は、 $E_{\text{red/ss}}$ における二面角の値(14.3° と 14.5°)とよい相関を示す。しかし、これらの値は100 μs にかけて 5° 程度戻ることから、部分的に電荷再結合が進行していることが示唆された。

RS2では、イソアロキサジン二面角が最も大きくなる300 nsまで、イソアロキサジンN5とArg378のN ϵ 原子間距離が短くなる様子が観測された。一方で、Arg378側鎖の位置そのものはRS1での観測と同様に、大きな変化は観測されなかった。つまり、この接近はイソアロキサジン環の折れ曲がり由来のものであると考えられる。Asp409の位置も $E_{\text{semi/ss}}$ から大きな変化はみられなかった。また、Asn403の $\text{O}\delta$ はイソアロキサジンN5-Hからやや遠位にシフトしたものの、RS2の過程で大きく変化していなかった。

6. 光回復酵素の光還元反応機構

今回のTR-SFX測定で捉えたRS1とRS2におけるナノ秒からマイクロ秒で起こる構造変化、ならびFADの各酸化還元状態のSFX構造から、光還元反応の全反応機構について総括する(図4)。

光励起後の FAD_{ox} は電子伝達鎖のTrp側鎖から電子を獲得し、 $\text{FAD}^\cdot$ が過渡的に形成する。FADの電子状態の変化に伴って、Asn403の $\text{O}\delta$ は静電反発により回転しイソアロキサジンN5から離れる一方で、Asn403のN δ および正電荷を持つArg378側鎖が静電相互作用によって引き付けられる。結果、1 μs から125 μs の間でイソアロキサジンN5とArg378のN η 間の距離が最も短く、またAsn403の $\text{O}\delta$ との距離が最も離れ、イソアロキサジンN5のプロトン化に備える。

Arg378側鎖がイソアロキサジンN5に最も近づいた後、プロトン移動が起こる。これにより生成する $\text{FADH}^\cdot$ およびArg378は中性電荷であり、相互作用の弱体化に伴ってArg378はイソアロキサジンおよびAsp409から離れる。この状態では、Arg378-Asp409はもはや塩橋ではなく、1本の水素結合で結ばれている。プロトン移動の駆動力はAsn403の $\text{O}\delta$ とN5-Hとの水素結合であり、これが中性セミキノン状態における主要な安定化要因となる。

RS2では、Asn403の $\text{O}\delta$ がイソアロキサジンか

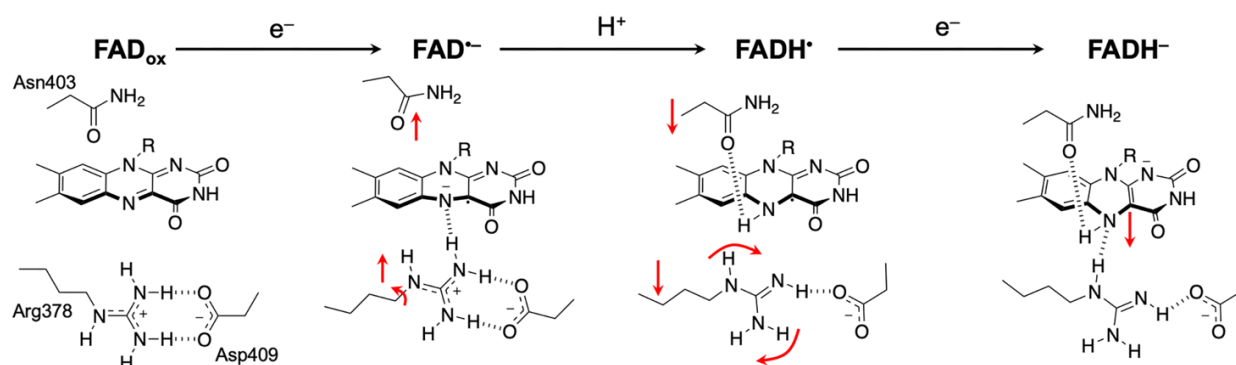


図4 TR-SFX 測定で捉えた FAD および酸化還元センサーである Arg-Asp 塩橋ならび Asn の構造変化。

らやや遠ざかるものの、N5-H との水素結合を維持しつつ、100 ns から 1 μ s にかけて起こるイソアロキサジンの折れ曲がりによって、N5 原子が Arg378 の N ϵ へと接近する。これによって、還元状態 FADH $^-$ の構造とほぼ同様の状態になる。この際、上記 2 種類の水素結合が FADH $^-$ の安定化に寄与するものと考えられる。

これらのことから、イソアロキサジン近傍に存在する Asn および Arg-Asp 塩橋は、FAD の酸化還元センサーとして機能し、プロトン化で分断されたキノン類の 2 電子還元反応を制御していることがわかった。

7. 総括と今後の展開

本研究で見つかった Asn/Arg-Asp センサーについて、Arg-Asp(Glu)対をイソアロキサジン環近傍に持つフラビンタンパク質群を構造ベースで探索したところ、光回復酵素・クリプトクロムスーパーファミリーのみが持つことがわかり^[5]、本タンパク質ファミリーの特徴的な役割を果たすことが示唆された。興味深いことに、Asn については酵素活性を持つ光回復酵素にのみ保存されていることが知られている。植物由来の光受容クリプトクロムでは Asp を、また昆虫型クリプトクロムでは Cys を Asn の代わりに持ち、それぞれ光還元反応において FADH $^-$ および FAD $^{\bullet-}$ 状態を安定化することが知られている^[6]。つまり、オルタナティブな酸化還元センサーによってフラビンの酸化還元反応が大幅に制御されることから、本センサーの重要性を窺い知ることができる。

光回復酵素の分子内電子移動反応は、光合成反応中心における光駆動電荷分離過程と同等の最も単純なモデル系であると認識されてきた。Q $_B$ キノン電子受容

体での電子供給は、電子移動-プロトン移動-電子移動-プロトン移動のスキームを取ることが知られており、酸化還元状態に依存した Q $_B$ 分子の移動を伴う。今回、Arg 側鎖がフラビンのプロトン化に関与するという予期せぬ観測結果から、今後光合成反応中心のような複雑生命系における酸化還元反応の TR-SFX 測定を行うことで、これらの中で起こる酸化還元反応に伴うプロトン化過程を明らかにできることが期待される。

謝辞

本研究は、SACLA の BL2 (課題番号 2017A8019、2017B8052、2018A8008、2018B8031、2019A8014、2019B8005) にて実施されました。本研究の一部は科研費 (16K01942、21K06042) の助成を受けて行われました。

参考文献

- [1] I. Belevich, D. A. Bloch, N. Belevich, M. Wilmström and M. I. Verkhovskiy: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (2007) 2685-2690.
- [2] C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A.P. Eker and K. Brettel: *Nature* **405** (2000) 586-590.
- [3] K. Brettel and M. Byrdin: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20** (2010) 693-701.
- [4] A. Sancar: *Chem. Rev.* **103** (2003) 2203-2238.
- [5] M. Maestre-Reyna et al.: *Nat. Chem.* **14** (2022) 677-685.
- [6] S. Kiontke et al.: *EMBO J.* **30** (2011) 4437-4449.
- [7] M. L. Ludwig, L. M. Schopfer, A. L. Metzger, K. A. Patridge and V. Massey: *Biochemistry* **29** (1990) 10364-10375.
- [8] I. Chaves et al.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **62** (2011) 335-364.

山元 淳平 YAMAMOTO Junpei

大阪大学 大学院基礎工学研究科
〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3
TEL : 06-6850-6240
e-mail : yamamoto.junpei.es@osaka-u.ac.jp

Manuel MAESTRE-REYNA

Academia Sinica, Taiwan
Department of Chemistry, National Taiwan University
e-mail : mmaestre@ntu.edu.tw

Lars-Oliver ESSEN

Department of Chemistry, Philipps University Marburg,
Germany
e-mail : essen@chemie.uni-marburg.de

Ming-Daw TSAI

Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica,
Taiwan
e-mail : mdtsai@gate.sinica.edu.tw

別所 義隆 BESSHO Yoshitaka

Academia Sinica, Taiwan
(国) 理化学研究所 放射光科学研究センター
東京大学 大学院農学生命科学研究科
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
TEL : 03-5841-3069
e-mail : bessho@g.ecc.u-tokyo.ac.jp