

# XFEL 時分割構造解析法を用いたチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ経路開閉機構の解明

島田敦広

岐阜大学応用生物科学部 〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1-1

久保 稔

理化学研究所放射光科学総合研究センター 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1 丁目 1-1

馬場清喜

(公財)高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1 丁目 1-1

## 要旨

X線自由電子レーザー (XFEL) の高輝度極短パルスという特徴を利用することで、光励起による酵素の反応誘起法と組み合わせたポンププローブ時分割構造解析が可能になった。我々はこの手法を用いて、呼吸鎖末端酸化酵素であるチトクロム酸化酵素 (CcO) の一酸化炭素の光解離に伴う立体構造変化を捉えることに成功し、プロトンポンプ経路の開閉機構を明らかにした。本トピックスでは、XFEL 時分割構造解析の今後についても議論したい。

## 1. はじめに

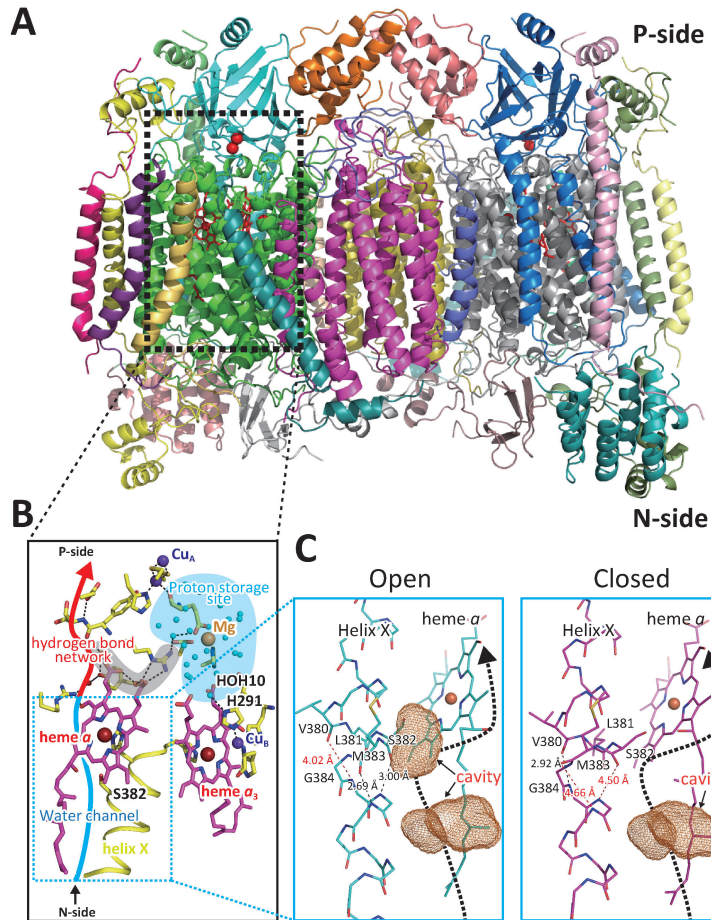
タンパク質の高分解能立体構造を決定することは、生命現象を化学的に理解すると同時に創薬などへの応用という点でも重要である。タンパク質の立体構造を得る方法には X 線や中性子による回折法、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子再構成法、核磁気共鳴 (NMR) 法など幾つか存在する。しかし、いずれの方法においてもこれまで構造の決定されてきた大部分はいわゆる安定な状態の静止画構造であった。もしタンパク質による反応過程を直接動画として観察することができれば、その反応機構を正確に理解することが可能である。そのために、従来の測定方法に比べて時間分解能の高い測定方法が求められてきた。

2012年より供用運転している SACLA で利用可能な X 線自由電子レーザー (XFEL) は、 $10^{11}$  のフォトンを含むパルス幅が数フェムト秒 (fs) の X 線を照射可能である。この XFEL と同期した可視レーザー光を利用することで、可視レーザー光をポンプ光、XFEL をプローブ光として利用する高い時間分解能でのポンププローブ実験が可能となった。つまり、ポンプ光とプローブ光の照射間隔を様々に変化させながらデータを収集することでタンパク質による反応をコマ送りの動画として捉える、時分割構造解析が可能となった。本トピックスでは、呼吸鎖末端酸化酵素であるチトクロム酸化酵素の反応機構を XFEL 時分割構造解析法によって明らかにした過程と結果について説明する<sup>1)</sup>。

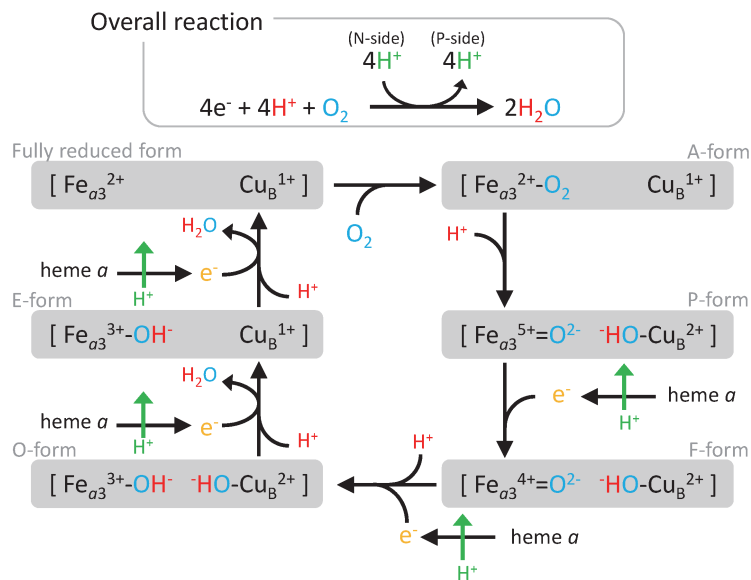
## 2. 研究背景

チトクロム酸化酵素 (CcO) はミトコンドリア呼吸鎖の末端に存在し、13のサブユニットからなる分子量約210 kDa の膜タンパク質である (Fig. 1A)。本酵素は、呼吸鎖の上流からチトクロム *c* によって伝達されてきた電子とマトリクスのプロトンを利用して酸素を水へと還元する<sup>2-4)</sup>。さらに、この還元反応と共役してプロトンをマトリクス (N-side) から膜間腔 (P-side) へと H-pathway と呼ばれるプロトン輸送経路を介してポンプすることで、高効率な ATP 合成に利用されるプロトン濃度勾配と膜電位を生み出している (Fig. 1B)。CcO の反応機構を明らかにすることは、酸素還元反応とプロトンポンプの共役機構を明らかにするというものであり、生体エネルギー分野における最重要課題であり続けている。

1995年にウシ心筋由来 CcO の二量体の結晶構造が月原・吉川らによって初めて 2.8 Å 分解能で報告されてから、CcO の反応機構に関する理解は飛躍的に進んだ<sup>5)</sup>。CcO は 4 つの酸化還元金属中心 ( $\text{Cu}_A$ , heme *a* ( $\text{Fe}_a$ ),  $\text{Cu}_B$ , heme  $a_3$  ( $\text{Fe}_{a3}$ )) を持ち、 $\text{Cu}_B$  と heme  $a_3$  によって酸素還元中心が形成されている (Fig. 1B)。振動分光学的な解析と種々の酸素アナログとの複合体結晶構造解析から、酸素はまず  $\text{Cu}_B$  へ結合した後に  $\text{Fe}_{a3}$  へ安定に結合して直ちに 4 電子還元されることが分かっている<sup>2-4)</sup>。その後チトクロム *c* から  $\text{Cu}_A$ , heme *a* を介して電子が酸素還元中心へ伝達される毎に、1 等量のプロトンが水チャンネルと水素結合ネットワークから成る H-pathway を通ってポンプされる<sup>6-8)</sup> (Fig. 1B)。このプロトンポンプ過程ではプロトンを一方向



**Fig. 1** (Color online) The structure of the H-pathway in CcO. (A) The location of the H-pathway in the X-ray structure of bovine heart CcO which is dimeric in the crystalline state<sup>1)</sup>. (B) The structure of the H-pathway. The locations of the water channel and the hydrogen-bond network composing the H-pathway are shown by the blue and red curves. The short hydrogen bond network (a grey area) connects the hydrogen bond network of the H-pathway and the proton storage site (the blue area). A water molecule in the proton storage site marked by HOH 10 forms a hydrogen bond to H291. (C) The structure of the water channel. Helix X structures of the closed structure with two bulges at S382 and M383 and the open structure with one bulge at V380 are given in the right and left panels. These bulges are marked by red dotted lines. Water cavities marked by brown cages were calculated with a probe radius of 1.2 Å.



**Fig. 2** (Color online) The reaction cycle of CcO indicated by O<sub>2</sub> reduction center.

へのみ輸送するため、CcO 内部にはプロトンの逆流防止機構が存在すると予想されてきた。

1 反応サイクル中で CcO は酸素還元中心の構造で特徴付けられた比較的安定な 6 つの中間体を経ることが知られており、1 反応サイクルあたり 4 等量のプロトンをポンプする (Fig. 2)。ウシ心筋から精製・結晶化した CcO は休止酸化型構造を取っており、この CcO 結晶を還元処理することで完全還元型結晶を調製することができる。休止酸化型と完全還元型、および種々の酸素アナログとの複合体の高分解能立体構造解析から、H-pathway の水キャビティーがその近傍に存在するヘリックス構造 (helix X) の構造変化 (open 構造→closed 構造) によって消失することで H-pathway を閉じていることが明らかとなり、酸素還元中心にリガンドが存在する場合は H-pathway は閉じていることが強く示唆された (Fig. 1C)<sup>9,10</sup>。つまり、反応サイクル中で H-pathway が開いているのは完全還元型状態だけであり、酸素の結合した A 型以降では H-pathway は既に閉じているということである (Fig. 2)。したがって、ポンプされる 4 等量のプロトンは H-pathway が閉

じる前に CcO 内部に蓄えられる必要があり、実際、CcO 内部に 4 等量のプロトンを一時的に貯蔵可能な、H-pathway と水素結合ネットワークでつながった水クラスター領域が確認されている<sup>9)</sup> (Fig. 1B)。これらの結果から、一度に 4 等量のプロトンを取り込んだ後は酸素還元中心への電子伝達に伴う静電的な反発力を利用して、タンパク質内部に大きな構造変化を起こすことなく高効率なプロトンポンプを行っていることが予想されている。こうした

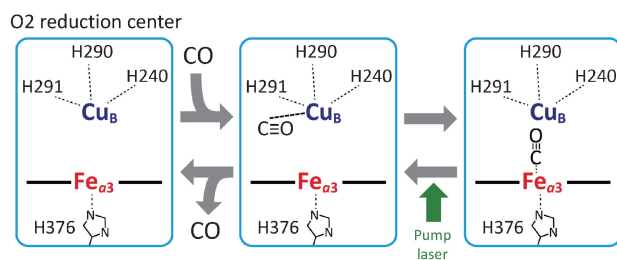


Fig. 3 (Color online) The scheme of CO migration in O<sub>2</sub> reduction center.

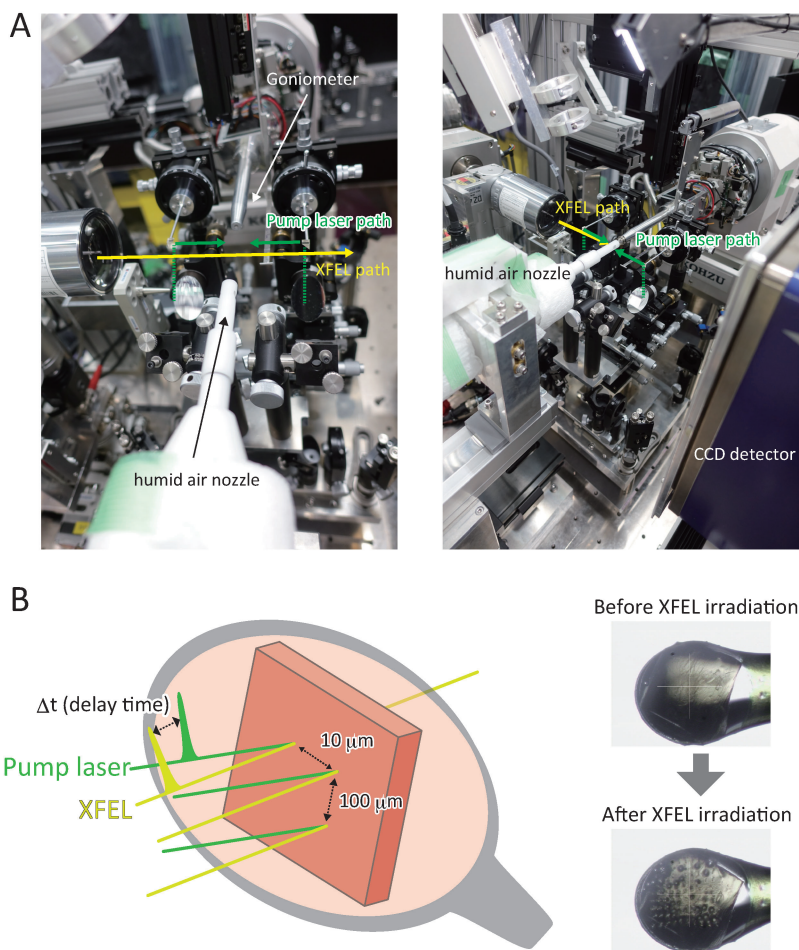


Fig. 4 (Color online) SF-ROX method using PVA coated crystal. (A) The experimental layout of pump probe analysis. (B) The scheme of XFEL irradiation step in SF-ROX. To avoid the effect of XFEL radiation damage, each XFEL irradiation point is separated with 10 mm in the horizontal direction and with 100 mm in the longitudinal direction.

CcO による高効率プロトンポンプ機構を保証するには、CcO 内部に 4 等量のプロトンが取り込まれた後に直ちに H-pathway の水チャンネルが消失する必要があるが、そのタイミングについては謎であった。そこで、XFEL 時分割構造解析によって水チャンネル領域の構造変化過程を捉えることとした。

### 3. CcO を用いた XFEL 時分割測定法

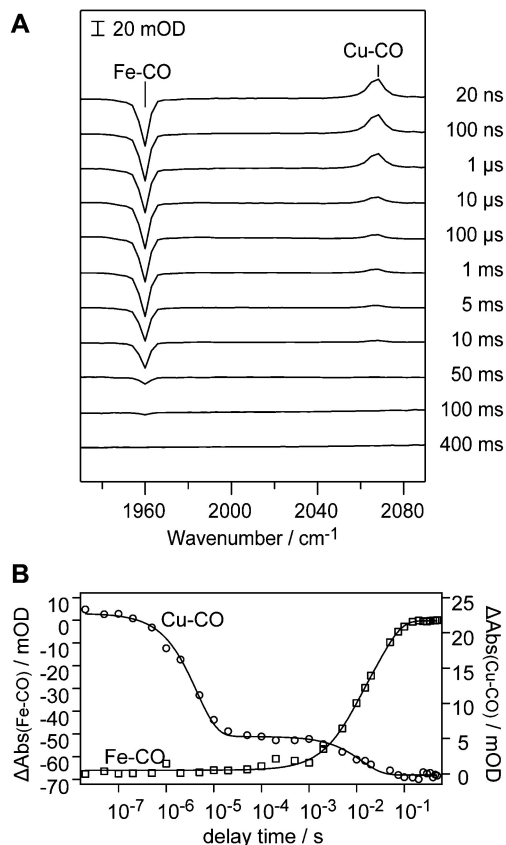
#### 3.1 一酸化炭素結合還元型 CcO の利用

H-pathway の水チャンネルが閉じるタイミングを、生理学的な基質である酸素を使って直接調べることは容易ではない。結晶中の XFEL が照射される箇所全ての CcO 分子へ任意のタイミングで酸素を同時に結合させなければならないし、1つの結晶につき XFEL を照射できるのは 1 度きりである。これは、XFEL を照射すると照射箇所のタンパク質分子が壊れてしまうことと、一旦酸素が結合して還元反応の始まった CcO 結晶は還元型状態まで再び戻るかどうかわからないからである。そこで、擬似的な A 型（酸素結合型）である一酸化炭素（CO）結合還元型 CcO の結晶を用いることにした<sup>10)</sup>。

CO 結合還元型 CcO は、休止酸化型 CcO を CO 飽和した還元剤で処理することで安定に調製できる。さらに、結合している CO は可視レーザー光によって CcO の酸素還元中心から解離したのちに再結合することが知られている。したがって、CO 結合還元型 CcO へポンプ光として可視レーザー光を照射したのちに XFEL を照射することで、CcO からの CO 解離過程を追跡することが可能である（Fig. 3）。つまり、酸素結合過程の逆過程を時分割構造解析によって追跡することで、還元型 CcO の酸素結合に伴う構造変化過程を解析することが可能ということである。また、光解離した CO は還元型 CcO 結晶へ再結合するため、XFEL の照射位置を照射ダメージの影響のない位置までずらせば、同じ結晶を使用して複数回のポンププローブ測定が可能であるという利点もある。

#### 3.2 非凍結状態での測定条件の決定

ポンププローブ時分割測定を行う上で、反応励起に伴う結晶中でのタンパク質の構造変化を可能とするためにタンパク質結晶は非凍結状態でなければならない。しかし、非凍結状態のタンパク質結晶はゴニオメーター上で乾燥するため、結晶性へ深刻なダメージを与え分解能の著しい低下をもたらす。さらに、CcO は温度に対する感受性が高くできるだけ低温での測定が望ましい。また、CO 結合還元型状態の CcO はポンプ光によって CO が解離して再結合する前に酸素が結合してしまう可能性もあるため、測定環境はできるだけ嫌気条件が求められた。これらの条件を解決するために、JASRI の馬場・熊坂によって開発された HAG 法を用いた<sup>11)</sup>。ポリビニルアルコール（PVA）溶液



**Fig. 5** CO ligand dynamics initiated upon CO photolysis of CcO in the crystalline phase at 4°C. (A) Time-resolved IR difference spectra upon CO photolysis. Each difference spectrum was obtained by subtracting the probe-only (CO-bound) spectrum. (B) Temporal changes in the Fe-CO and Cu-CO intensities.

を薄く張ったループで CO 飽和還元溶液中の結晶をすくい上げたのち、素早くゴニオメーター上へセッティングし調温湿気流下に置くことで、CcO 結晶を 30 分以上安定に維持可能である。結晶へ吹き付ける調温湿気流は窒素ガスを用いており、懸案である嫌気条件下での測定も可能とした。また、温度は 4°C から 20°C まで設定可能であり、かつ湿度はほぼ 100% まで設定できるため、PVA によってコーティングされた結晶を急激に乾燥させることなくループ上に固定して非凍結条件下で測定を行うことができた。

#### 3.3 ポンププローブ間隔の決定

実際にポンププローブ実験を行う前に、オフラインでのポンプ光照射条件の決定も必要である。具体的には、CO 結合還元型 CcO 結晶に対して CO を 100% 光解離させるのに必要なポンプ光のエネルギーの決定や、ポンプ光とプローブ光の照射間隔 ( $\Delta t$ ) の決定を行う必要がある。CO の結合と解離に伴って CcO は 590 nm と 620 nm の波長に大きな吸収スペクトル変化を示す。そこで、ポンプ光の照射エネルギーに対して CcO の可視吸収スペクトルの変化

**Table 1** Statistics of intensity data collection and structure refinement.

States	Dark		20 ns		100 $\mu$ s	
No. of crystals*	40		24		43	
No. of images	5,201		4,350		4,232	
Space group	$P2_12_12_1$		$P2_12_12_1$		$P2_12_12_1$	
Cell (a, b, c)	184.9, 208.5, 177.9		185.8, 209.5, 179.5		185.0, 208.8, 178.0	
Resolution range ( $\text{\AA}$ )	25.00–2.20 (2.24–2.20)		14.99–2.40 (2.44–2.40)		24.99–2.20 (2.24–2.20)	
No. of unique reflections	33,213 (16,601)		266,141 (10,691)		336,147 (15,196)	
Completeness (%)	97.0 (97.1)		98.2 (79.6)		96.9 (88.4)	
Redundancy	105.91 (26.32)		63.23 (4.61)		70.89 (5.72)	
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	15.27 (2.98)		6.28 (2.29)		11.78 (2.44)	
$R_{\text{split}}$	0.1278 (0.2296)		0.1624 (0.4131)		0.1677 (0.3812)	
$CC_{1/2}$	0.9635 (0.8250)		0.9576 (0.4967)		0.9429 (0.5907)	
$R_{\text{work}}$ (%)	17.20		18.19		17.29	
$R_{\text{free}}$ (%)	20.89		22.97		21.00	
R.m.s.d bond angle ( $^\circ$ )	2.04		1.83		1.97	
R.m.s.d bond length ( $\text{\AA}$ )	0.0179		0.0134		0.0163	
Averaged B-factor ( $\text{\AA}^2$ )	A <sup>†</sup>	B <sup>†</sup>	A <sup>†</sup>	B <sup>†</sup>	A <sup>†</sup>	B <sup>†</sup>
Proteins	53.9	62.5	64.7	74.4	59.3	69.8
Heavy metals	42.3	50.3	53.1	60.5	47.4	56.2
Lipids and detergents	99.8		114.7		111.1	
Waters	68.8		84.4		80.0	
All atoms	61.1		72.7		68.0	

\* Crystals, each with a maximum width and a maximum thickness of 500  $\mu$ m and 100  $\mu$ m, respectively, were rotated by 0.1 $^\circ$  and translated by 50  $\mu$ m after each shot.

<sup>†</sup> A and B indicate two independent enzyme molecules in an asymmetric unit.

量をプロットすることで、完全に CO が光解離するのに必要なポンプ光のエネルギーを決定した。また、大型の結晶を回転させながら測定を行う際、角度によってポンプ光の結晶中を通過する光路長が変化するため、結晶を60 $^\circ$ 回転させた状態での測定も行った。その結果、CO の光解離には200  $\mu$ J のエネルギーで十分であることが決定できた (実際の XFEL 時分割実験に際しては両方向から100  $\mu$ J ずつ結晶に対して照射した (Fig. 4A))。次に、CO 結合還元型結晶を用いた時分割赤外分光解析<sup>12)</sup>によって、ポンプ光照射による CO の挙動を確認した。CO 結合還元型 CcO 結晶に対するポンプ光照射前後の差スペクトルを解析することで、CO が酸素還元中心内のどこに結合しているのか、または酸素還元中心から解離してしまっているのかを判断できる。実際には CcO の酸素還元中心を構成する Fe<sub>a3</sub> 及び Cu<sub>B</sub> に結合した CO の伸縮振動バンドの強度変化を20 ns から400 ms まで追跡した (Fig. 5A)。その結果、ポンプ光照射20 ns 後の時点で既に CO は Fe<sub>a3</sub> から Cu<sub>B</sub> へと完全に移動しており、さらに100  $\mu$ s 後には76%の CO が酸素還元中心外へと解離し、100 ms 後に再び Fe<sub>a3</sub> へと CO が再結合していることがわかった (Fig. 5B)。CO の酸素還元中心からの解離は76%以上確認できなかった。この結果から、CO が Cu<sub>B</sub> へと移動している状態、および最も酸素還元中心から CO が解離している状態の2つ ( $\Delta t = 20$  ns および100  $\mu$ s) について構造決定を行うこととした。

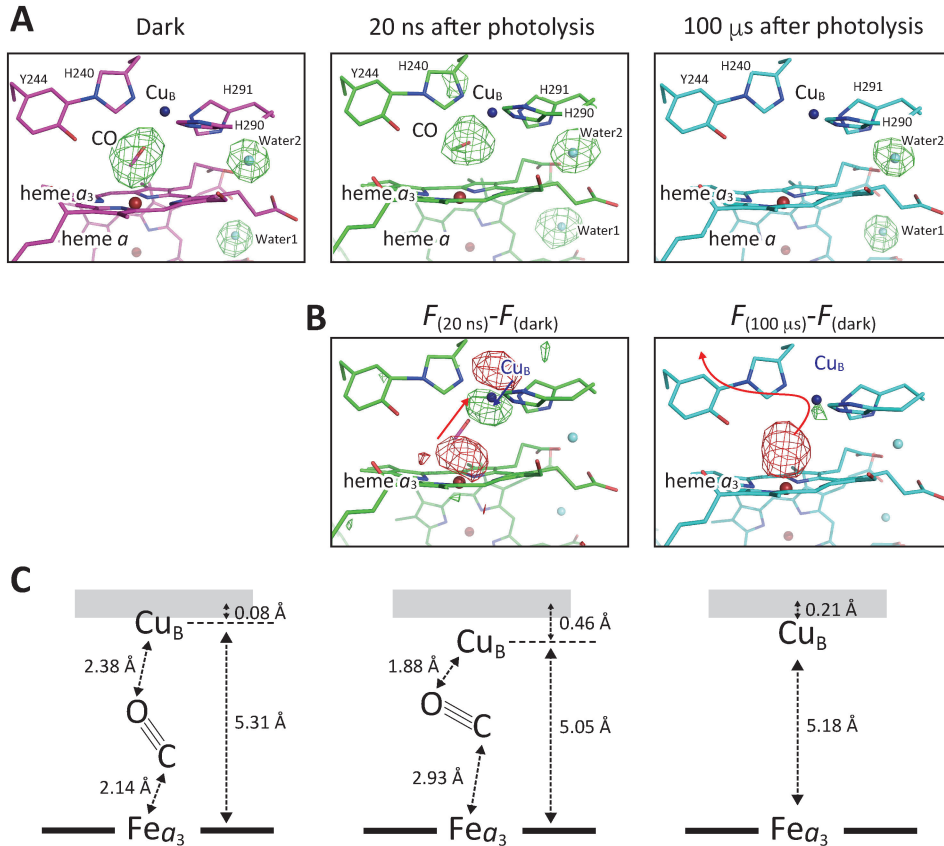
### 3.4 XFEL 回折像の収集と解析

XFEL の照射毎に結晶を回転させて still の回折像を多数集める方法 (SF-ROX 法)<sup>13)</sup> によって測定を行った (Fig. 4B)。詳細は省くが、集めた画像からプログラム cxi.index<sup>14)</sup> によって指数付けと積分を行ったのちに、プログラム prime<sup>15)</sup> によって精密化と指数強度の計算を行った。その結果、ポンプ光照射なし (Dark) と  $\Delta t = 20$  ns および100  $\mu$ s の各データについてそれぞれ2.2, 2.4, 2.2  $\text{\AA}$  分解能での構造決定に成功した (Table 1) (Dark, 20 ns, 100  $\mu$ s それぞれの PDB ID は 5X1F, 5X1B および 5X19)。

## 4. CcO の XFEL 時分割測定結果

### 4.1 酸素還元中心内での CO の移動

$F_0 - F_c$  電子密度マップを計算したところ、Dark では Fe<sub>a3</sub> に結合した CO のピークがはっきりと確認され、20 ns では Cu<sub>B</sub> 側に確認されたが、100  $\mu$ s では CO のピークが3.5  $\sigma$  レベルでは確認されなかった (Fig. 6A)。各ポンププローブデータから Dark のデータを引いた  $F_0 - F_c$  電子密度マップから、よりはっきりとポンプ光照射後の CO の軌跡が確認できた (Fig. 6B)。さらに各構造における CO の占有率を比較するために、CcO の構造において普遍的に占有率100%で存在する水分子 (heme a および heme a<sub>3</sub> のプロピオン酸基にそれぞれ結合している水分子) のピー



**Fig. 6** (Color online) Structures of the O<sub>2</sub> reduction center of the CO-bound fully reduced state at dark and at 20 ns and 100 μs after the photolysis. (A)  $F_o$ - $F_c$  difference electron density maps at  $3.5\ \sigma$  and structural models are illustrated. Purple, blue and light-blue spheres represent iron ions, copper ions and oxygen atoms of water molecules, respectively. CO, water 1 and water 2 were not included in the structure refinement. (B) The  $F_o(20\ \text{ns or } 100\ \mu\text{s}) - F_o(\text{dark})$  difference electron density maps at  $+5.0/-5.0\ \sigma$  level are shown as green/red mesh. The difference density maps show the directions of CO and Cu<sub>B</sub> movements given by red and blue arrows, respectively. (C) Geometries of CO in the O<sub>2</sub> reduction site in the structures measured at dark and at 20 ns and 100 μs after photolysis. Thick gray line at the top of each structure shows the Cu<sub>B</sub> coordination plane consisting of three imidazole nitrogen atoms.

ク値の平均値とCOのピーク値の割合を求めた (Table 2)。その結果、Dark, 20 ns, 100 μs のCOのピーク値はそれぞれ1.337, 0.994, 0.222であった。赤外分光の結果から20 nsではCOはCu<sub>B</sub>に100%結合していることから、Darkに比べて低い20 nsの0.994という値は、Cu<sub>B</sub>に結合したCOの温度因子が高いことに起因していると考えられる。これらの結果から、占有率を計算すると、Darkおよび20 nsではCOは100%酸素還元中心に存在しており、100 μsでは76%のCOが酸素還元中心外へと解離していることが明らかとなった。この結果は赤外分光の結果とも一致している。

$F_{o(20\ \text{ns})} - F_{o(\text{dark})}$  の電子密度図から、20 nsではCu<sub>B</sub>近傍のheme a<sub>3</sub>とは反対側に大きなネガティブのピークが確認され、Cu<sub>B</sub>がheme a<sub>3</sub>側へ動き、Fe<sub>a3</sub>-Cu<sub>B</sub>間の距離が狭くなっていることも確認された。Cu<sub>B</sub>にはH240, H290, H291の3つのヒスチジンのN原子が配位しており、DarkではCu<sub>B</sub>がこの3つのN原子によって形成され

**Table 2** The peak height of CO molecule at O<sub>2</sub> reduction site.

	Dark	20 nsec	100 μsec
Reference water molecules			
Water1 (heme a) (e <sup>-</sup> /Å <sup>3</sup> )	0.472	0.269	0.395
Water2 (heme a <sub>3</sub> ) (e <sup>-</sup> /Å <sup>3</sup> )	0.472	0.373	0.406
Average (e <sup>-</sup> /Å <sup>3</sup> )	0.472	0.321	0.401
CO at Fe <sub>a3</sub> (e <sup>-</sup> /Å <sup>3</sup> )			
CO at Cu <sub>B</sub> (e <sup>-</sup> /Å <sup>3</sup> )	0.631	0.319	0.089
Ratio (CO/monitor)	1.337	0.994	0.222
Occupancy of CO (%)			
IR	100.0	100.0	24.0
X-ray	100.0	100.0	22.3

る平面内に存在する平面三角形構造をとる。一方で、20 nsではCu<sub>B</sub>がFe<sub>a3</sub>側へ近づくことでこの平面から大きくずれている (Fig. 6C)。Cuを含むこの平面三角形構造は非

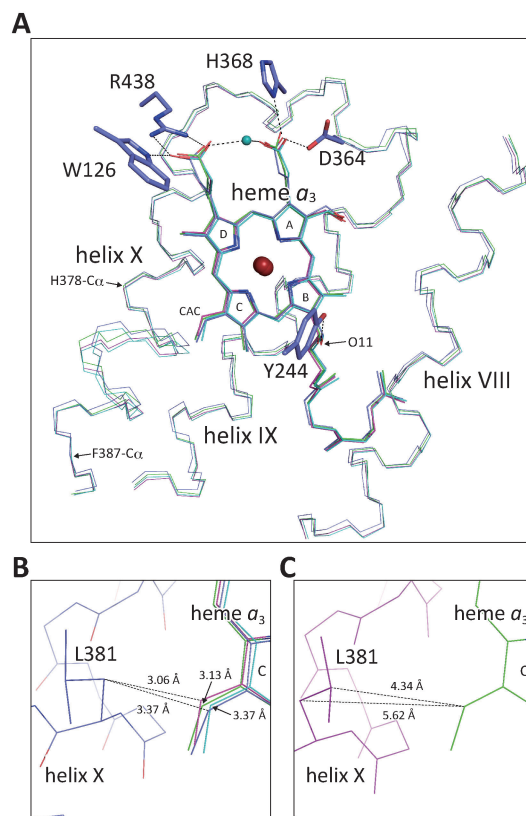
常に安定であり、4配位構造をとりづら。このことから、COがCu<sub>B</sub>に結合するためには、Cuが安定な平面三角形構造からずれる必要があることを示している。100 μsではCu<sub>B</sub>が再び平面三角形構造に近づいていることから、酸素還元中心にCOが入って来る前には、まずCu<sub>B</sub>の平面三角形構造からのずれが生じることでCOへの親和性が上がっていることが示唆された。

#### 4.2 heme a<sub>3</sub>の構造変化

heme a<sub>3</sub>はプロピオン酸基とヒドロキシフェルネシルエチル基が周囲のアミノ酸残基と水素結合などの相互作用を形成することで強く固定されているため、大きな構造変化を起こさない。しかし、COの光解離に伴ってheme a<sub>3</sub>のCピロール環にあるビニル基がわずかにシフトすることが分かった (Fig. 7A)。このビニル基は、H-pathwayの水キャビティー消失に関与するhelix Xに属するL381と非常に近い位置に存在している。完全還元型 (PDB ID: 5B1B), Dark, 20 ns, 100 μsの構造を重ね合わせて、完全還元型構造 (open構造)のhelix XのL381-C<sub>β</sub>と、各構造のheme a<sub>3</sub>のビニル基のC原子 (Fig. 7AのCAC)間の距離を測定すると、Darkでは3.06 Å, 20 nsでは3.13 Å, 100 μsと完全還元型では3.37 Åであり、COの光解離に伴ってL381から離れるように一方向へシフトしていることが分かった (Fig. 7B)。Darkと20 nsではopen構造であるhelix XのL381-C<sub>β</sub>とビニル基のCAC間の距離は構造的に近すぎて不安定であり、L381の構造変化を誘起することでhelix Xをopen構造からCO結合型構造 (closed構造)へと変化させていることが考えられた。言い換えると、完全還元型 (もしくは100 μs)にCOが結合していくことでheme a<sub>3</sub>のシフトが誘起され、ビニル基のCACとL381-C<sub>β</sub>が構造的に不安定な距離まで近づくということである。その結果、L381を含むhelix Xがopen構造からclosed構造へ大きな構造変化を起こす。実際にDarkのL381-C<sub>β</sub>と20 nsのheme a<sub>3</sub>ビニル基のCAC間の距離は4.0 Å以上離れており、構造的に安定である (Fig. 7C)。このことから、helix Xの構造変化はCOがheme a<sub>3</sub>に含まれるFe<sub>a3</sub>ではなく、Cu<sub>B</sub>に結合した時点で誘起されることが強く示唆された。

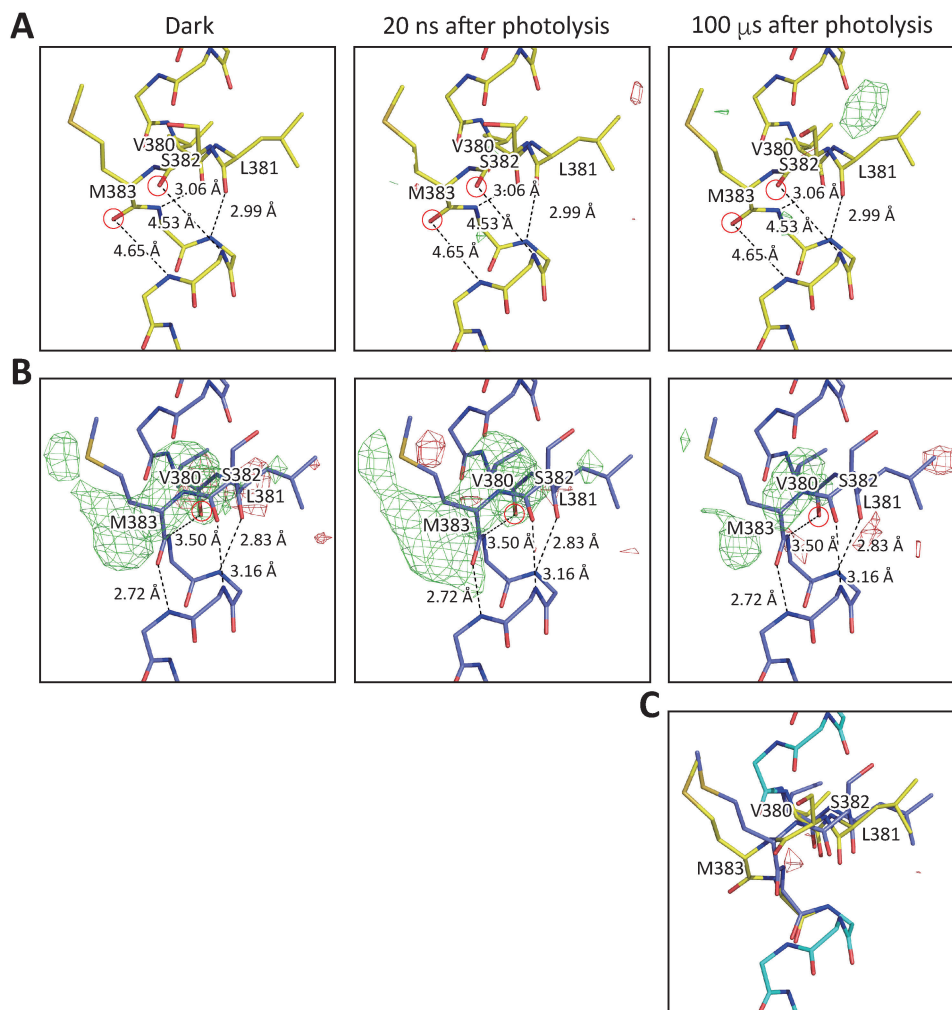
#### 4.3 helix Xの構造

helix Xの構造を決定するために、open構造とclosed構造をそれぞれ固定した状態でF<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>電子密度マップを計算し、その残余電子密度を確認した。Darkと20 nsではhelix Xにclosed構造を固定して計算を行った場合には残余電子密度が確認されなかったが、open構造を固定した場合はclosed構造の存在する位置に大きな残余電子密度が確認された (Fig. 8A, B)。このことから、Darkと20 nsのhelix Xはclosed構造であり、水キャビティーの消失によってH-pathwayは閉じている。100 μsでは、he-



**Fig. 7** (Color online) Structural comparison of heme a<sub>3</sub> region in the structures measured at dark and at 20 ns and 100 μs after the photolysis. (A) Each structure is superposed on that of the fully reduced ligand-free state (PDB ID, 5B1B) by least-squares fitting of the main chain atoms of subunit I. Red, green, light-blue and blue colors indicate the structures measured at dark, at 20 ns and 100 μs after photolysis and at the ligand-free fully reduced state, respectively. The light blue sphere denotes the location of Water 2 shown in Fig. 6A. Amino acid side chains interacting with the heme a<sub>3</sub> by hydrogen bonds are drawn in thick stick models for the fully reduced state. The characters, A, B, C and D, in the heme designate the PDB naming of the pyrrole rings. The CAC marks one of the carbon atoms of the vinyl group covalently bounded to the C-ring. (B) A close-up of the vinyl group regions in panel A. The structures of heme a<sub>3</sub> and C<sub>α</sub> drawings of protein regions at dark, 20 ns and 100 μs are illustrated using the same color code as in panel A. Helix X of the ligand-free fully reduced state (the open structure) is illustrated by a thin stick model. The distances between CAC and the β carbon of L381 at 20 ns (green) and 100 μs (blue) are given by the digits with arrows. (C) Heme a<sub>3</sub> in the structures measured at 20 ns after photolysis. Helix X structure measured at dark (the closed structure) is illustrated by a red stick model.

lix X構造がclosed/openのいずれの場合でも残余電子密度が確認されたことから、closed構造とopen構造の多型構造を取っていると考えられた (Fig. 8A, B)。主鎖の温度因子が同程度になり、かつ残余電子密度が最も無くなるようにclosed構造とopen構造の占有率を精密化した結果、closed構造とopen構造の占有率がそれぞれ0.55, 0.45であると決定された (Fig. 8C)。100 μsの構造では、酸素還



**Fig. 8** (Color online) *Fo-Fc* difference electron density maps of structures measured at dark and at 20 ns and 100  $\mu$ s after the photolysis. The structure factors of *Fc* were calculated from the closed and open structures of helix X with two bulges at S382 and M383 (A) and with one bulge at V380 (B), and the *Fo-Fc* difference electron density maps were drawn at  $3.5 \sigma$  together with the closed and open structures of helix X, respectively. The red circles mark the location of these bulges. (C) The *Fo-Fc* difference electron density map of the structure measured at 100  $\mu$ s after photolysis where structure factors of *Fc* were calculated with multiple structures of helix X (55% closed structure and 45% open structure) and drawn at  $3.5 \sigma$  together with the open and closed structures of helix X.

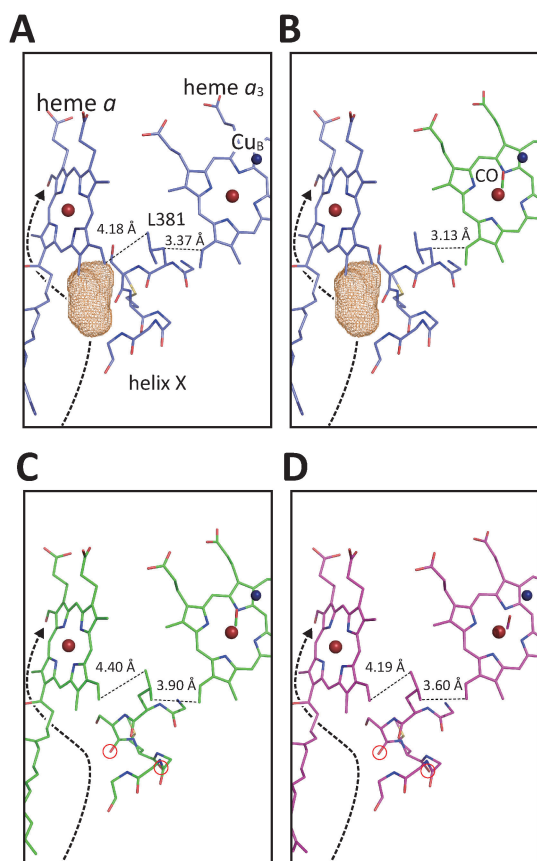
元中心の  $\text{Cu}_B$  に結合している CO の占有率は24%であり、 $\text{Cu}_B$  への CO の結合と helix X の closed 構造への構造変化が完全に同期して起こるならば、100  $\mu$ s では closed 構造の helix X の占有率は24%であるはずである。このことから、CO の  $\text{Cu}_B$  からの解離と helix X の構造変化は完全には同期していない。しかし、100  $\mu$ s で helix X が多型構造をとっていることから、CcB からの酸素還元中心外への CO 解離が helix X の closed 構造から open 構造への構造変化を誘起していることは明らかである。

#### 4.4 プロトン逆流防止機構

CO 光解離に伴う構造変化から、CO の酸素還元中心への結合に伴う heme  $a_3$  のシフトと helix X の構造変化および H-pathway の水キャビティの消失にいたるリレーシ

ステムの存在が明らかとなった (Fig. 9)。酸素還元中心にリガンドが存在しない状態では helix X は open 構造をとっており、heme  $a_3$  のビニル基と L381 との距離も構造的に妥当である。この状態では Fig. 9A にメッシュで示されたような水キャビティが存在し、プロトンは  $\text{H}_3\text{O}^+$  の状態でこのキャビティを介して輸送されると考えられる。CO が酸素還元中心の  $\text{Cu}_B$  へ結合すると、heme  $a_3$  がシフトしビニル基と L381 の距離が短くなり構造的に不安定になる (Fig. 9B)。この構造的不安定さを解消するために helix X が大きく構造変化を起こすと、S382 が水キャビティへ突き出しこの水キャビティが消失する (Fig. 9C)。その後 CO は  $\text{Fe}_{a3}$  側へ移動する (Fig. 9D)。この水キャビティが消失することで、水分子が H-pathway の水チャンネル上流まで侵入することを防ぎ、CcO 内部へ一旦取り





**Fig. 9** (Color online) The atomic process of the water channel closure upon CO binding to the O<sub>2</sub> reduction site. Hemes *a* and *a*<sub>3</sub>, CO and the residues 380–386 of the helix X are drawn by stick models. The purple, green and pink structures denote the open and CO-bound at Cu<sub>B</sub> and at Fe<sub>a3</sub> states, which are detectable in the ligand-free fully reduced state, at 20 ns after the photolysis and at dark, respectively. Nitrogen, oxygen and sulfur atoms are indicated by blue, red and yellow colors, respectively. Red and blue spheres are Fe<sub>a</sub>, Fe<sub>a3</sub> and Cu<sub>B</sub>. Side chains of the residues 380, 385 and 386 are excluded from the models for simplicity. The location of the water channel in each panel is marked by the dotted line and the brawn cage. (A) The structure of reduced state where the water channel is open as indicated by the cage. (B) A predicted structure constructed by introducing heme *a*<sub>3</sub> structure at 20 ns after the photolysis (in which CO is at Cu<sub>B</sub>) into the arrangement in the ligand-free fully reduced state, suggesting that CO binding to Cu<sub>B</sub> induces a significant shift of vinyl group of heme *a*<sub>3</sub> toward L381. (C) The experimentally obtained X-ray structure at 20 ns after the photolysis, showing significant conformational changes in L381 and bulge formation at S382 and M383, as marked by red circles. (D) The dark structure. After closing the channel, CO migrates to Fe<sub>a3</sub> from Cu<sub>B</sub> without any conformational change in helix X.

込まれたプロトンが水分子を介してマトリクス側へ逆流することを防いでいると考えられる。

#### 4.5 CcO によるプロトンポンプ機構

CO の Cu<sub>B</sub> への結合は、Cu<sub>B</sub> と 3 つのヒスチジンの N

原子によって構成される平面三角形構造から Cu<sub>B</sub> がずれることによって起きる (4.1 参照)。したがって、CO の結合前に Cu<sub>B</sub> の構造変化を誘起する機構が存在するはずである。Cu<sub>B</sub> に配位している 3 つのヒスチジンの 1 つである H291 は、プロトン貯蔵部位である水クラスター中の水分子と水素結合を形成している (Fig. 1B および Fig. 10)。このことから、水クラスター内に 4 等量のプロトンが入ってきたことを、H291 が感知することで Cu<sub>B</sub> の構造変化を誘起している可能性が考えられる。この仮説に基づいて CcO による酸素還元反応と共役したプロトンポンプ機構のモデルを考察する。

まず、H-pathway の水チャネルを通して H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> の状態で 4 等量のプロトンが水クラスターまで運搬される (Fig. 10A)。水クラスター内に 4 等量のプロトンが取り込まれたことが水分子との水素結合を介して H291 へ伝わると、Cu<sub>B</sub> の平面三角形構造が歪むことで Cu<sub>B</sub> の酸素への親和性が高くなる (Fig. 10B)。次に、Cu<sub>B</sub> へ酸素が結合することで酸素還元中心の heme *a*<sub>3</sub> がシフトし、ビニル基と L381 間の距離が構造的に不安定になる。この不安定さを解消するために helix X が大きく構造変化を起こし水チャネル内の水キャビティーの 1 つが消失する。これによって水分子が水チャネルの上流まで侵入することを阻害する (Fig. 10C)。水チャネルが消失することで H-pathway が閉じると酸素が Cu<sub>B</sub> から heme *a*<sub>3</sub> (Fe<sub>a3</sub>) へ移動し、直ちに heme *a* (Fe<sub>a</sub>) から 1 等量の電子が供給される。この電子伝達によって Fe<sub>a</sub> の電荷が 2+ から 3+ へと変化し、静電的な反発によって水クラスター内のプロトンが H-pathway へと移動する。水チャネルは閉じているので、プロトンは逆流することなく水素結合ネットワークを通して P-side へとポンプされる (Fig. 10D)。

本反応機構モデルの構築を可能とした、Cu<sub>B</sub> から helix X の構造変化に至るリレーシステムの発見は、ポンプロープ時分割構造解析でしか明らかにできなかった成果である。この研究結果によって、CcO の高効率プロトンポンプ機構を保証するプロトン逆流防止機構を解明することができた。

## 5. 今後の展望

XFEL 時分割解析でしか得られないタンパク質の反応中間体構造はタンパク質の反応機構を理解するのに非常に重要である。実際に CcO 以外にもバクテリオロドプシンや光化学系 II などで XFEL 時分割解析によって顕著な成果があげられている<sup>16-18)</sup>。一方で、現状では励起光の照射によってのみ反応を誘起可能なタンパク質に測定対象が限定されがちである。多くの一般的な基質を代謝する酵素にまで測定対象を広げるためには、結晶中のタンパク質分子に同時に基質を結合させて酵素反応を同期させる方法が必要である。有力な手法の 1 つはケージド化合物を利用



## 謝辞

CcO の大型結晶を調製していただいた兵庫県立大学生命科学研究科の新澤 - 伊藤恭子准教授に感謝いたします。また、時分割測定データの解析に際して多大な貢献をしていただいた理研 SPring-8 センターの山下恵太郎研究員に感謝いたします。HAG 法による条件検討は SPring-8 BL38B1 の課題番号 2014A1293, 2014B1483, 2015A1115, 2015B2115 および 2016B2732 にて行った。SACLA BL3 での時分割データの収集は、課題番号 2014A8036, 2014B8055, 2015A8030, 2015A8053, 2015B8032, 2015B8051, 2016A8034, 2016A8050, 2016B8053 および 2016B8070 にて行った。本研究は JSPS 科研費 26291033, 15K18493, 15H03841 および 15H01055 からの助成を受けたものである。また、本研究は MEXT X 線自由電子レーザー施設重点戦略課題, JST CREST, JST PREST, 工作機械技術振興財団からの助成を受けたものである。

## 参考文献

- 1) A. Shimada, M. Kubo, S. Baba, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, T. Nomura, T. Kimura, K. Shinzawa-Itoh, J. Baba, K. Hatano, Y. Eto, A. Miyamoto, H. Murakami, T. Kumasaka, S. Owada, K. Tono, M. Yabashi, Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, M. Sakaguchi, T. Ogura, R. Komiya, J. Yan, E. Yamashita, M. Yamamoto, H. Ago, S. Yoshikawa and T. Tsukihara: *Sci. Adv.* **3**, e1603042 (2017).
- 2) S. Yoshikawa and A. Shimada: *Chem. Rev.* **115**, 1936 (2015).
- 3) P. R. Rich and A. Maréchal: *J. R. Soc. Interface* **10**, 20130183 (2013).
- 4) S. Yoshikawa, K. Muramoto and K. Shinzawa-Itoh: *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 205 (2011).
- 5) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa: *Science* **269**, 1069 (1995).
- 6) S. A. Siletsky and A. A. Konstantinov: *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 476 (2012).
- 7) K. Faxén, G. Gilderson, P. Adelroth and P. Brzezinski: *Nature* **437**, 286 (2005).
- 8) D. Bloch, I. Belevich, A. Jasaitis, C. Ribacka, A. Puustinen, M. I. Verkhovskiy and M. Wikström: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 529 (2004).
- 9) N. Yano, K. Muramoto, A. Shimada, S. Takemura, J. Baba, H. Fujisawa, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, T. Tsukihara and S. Yoshikawa: *J. Biol. Chem.* **291**, 23882 (2016).
- 10) K. Muramoto, K. Ohta, K. Shinzawa-Itoh, K. Kanda, M. Taniguchi, H. Nabekura, E. Yamashita, T. Tsukihara and S. Yoshikawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7740 (2010).
- 11) S. Baba, T. Hoshino, L. Ito and T. Kumasaka: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **69**, 1839 (2013).
- 12) M. Kubo, S. Nakashima, S. Yamaguchi, T. Ogura, M. Mochizuki, J. Kang, M. Tateno, K. Shinzawa-Itoh, K. Kato and S. Yoshikawa: *J. Biol. Chem.* **288**, 30259 (2013).
- 13) K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, M. Hatanaka, K. Muramoto, T. Kawahara, T. Tsukihara, E. Yamashita, K. Tono, G. Ueno, T. Hikima, H. Murakami, Y. Inubushi, M. Yabashi, T. Ishikawa, M. Yamamoto, T. Ogura, H. Sugimoto, J. Shen, S. Yoshikawa and H. Ago: *Nat. Methods* **11**, 734 (2014).
- 14) J. Hattne, N. Echols, R. Tran, J. Kern, R. J. Gildea, A. S. Brewster, R. Alonso-Mori, C. Glöckner, J. Hellmich, H. Laksmono, R. G. Sierra, B. Lassalle-Kaiser, A. Lampe, G. Han, S. Gul, D. DiFiore, D. Milathianaki, A. R. Fry, A. Miahnahri, W. E. White, D. W. Schafer, M. M. Seibert, J. E. Koglin, D. Sokaras, T.-C. Weng, J. Sellberg, M. J. Latimer, P. Glatzel, P. H. Zwart, R. W. Grosse-Kunstleve, M. J. Bogan, M. Messerschmidt, G. J. Williams, S. Boutet, J. Messinger, A. Zouni, J. Yano, U. Bergmann, V. K. Yachandra, P. D. Adams and N. K. Sauter: *Nat. Methods* **11**, 545 (2014).
- 15) M. Uervirojnangkoorn, O. B. Zeldin, A. Y. Lyubimov, J. Hattne, A. S. Brewster, N. K. Sauter, A. T. Brunger and W. I. Weiss: *elife* **4**, e05421 (2015).
- 16) M. Suga, F. Akita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, Y. Nakajima, T. Shimizu, K. Yamashita, M. Yamamoto, H. Ago and J. Shen: *Nature* **517**, 99 (2015).
- 17) M. Suga, F. Akita, M. Sugahara, M. Kubo, Y. Nakajima, T. Nakane, K. Yamashita, Y. Umena, M. Nakabayashi, T. Yamane, T. Nakano, M. Suzuki, T. Masuda, S. Inoue, T. Kimura, T. Nomura, S. Yonekura, L.-J. Yu, T. Sakamoto, T. Motomura, J.-H. Chen, Y. Kato, T. Noguchi, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, T. Hatsui, E. Nango, R. Tanaka, H. Naitow, Y. Matsuura, A. Yamashita, M. Yamamoto, O. Nureki, M. Yabashi, T. Ishikawa, S. Iwata and J.-R. Shen: *Nature* **543**, 131 (2017).
- 18) E. Nango, A. Royant, M. Kubo, T. Nakane, C. Wickstrand, T. Kimura, T. Tanaka, K. Tono, C. Song, R. Tanaka, T. Arima, A. Yamashita, J. Kobayashi, T. Hosaka, E. Mizohata, P. Nogly, M. Sugahara, D. Nam, T. Nomura, T. Shimamura, D. Im, T. Fujiwara, Y. Yamanaka, B. Jeon, T. Nishizawa, K. Oda, M. Fukuda, R. Andersson, P. Bath, R. Dods, J. Davidsson, S. Matsuoka, S. Kawatake, M. Murata, O. Nureki, S. Owada, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, G. Schertler, M. Yabashi, A. Bondar, J. Standfuss, R. Neutze and S. Iwata: *Science* **354**, 1552 (2016).
- 19) T. Tosha, T. Nomura, T. Nishida, N. Saeki, K. Okubayashi, R. Yamagiwa, M. Sugahara, T. Nakane, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, T. Kimura, T. Hisano, K. Muramoto, H. Sawai, H. Takeda, E. Mizohata, A. Yamashita, Y. Kanematsu, Y. Takano, E. Nango, R. Tanaka, O. Nureki, O. Shoji, Y. Ikemoto, H. Murakami, S. Owada, K. Tono, M. Yabashi, M. Yamamoto, H. Ago, S. Iwata, H. Sugimoto, Y. Shiro and M. Kubo: *Nat. Commun.* **8**, 1585 (2017).
- 20) J. R. Stagno, Y. Liu, Y. R. Bhandari, C. E. Conrad, S. Panja, M. Swain, L. Fan, G. Nelson, C. Li, D. R. Wendel, T. A. White, J. D. Coe, M. O. Wiedorn, J. Knoska, D. Oberthuer, R. A. Tuckey, P. Yu, M. Dyba, S. G. Tarasov, U. Weierstall, T. D. Grant, C. D. Schwieters, J. Zhang, A. R. Ferré-D'Amaré, P. Fromme, D. E. Draper, M. Liang, M. S. Hunter, S. Boutet, K. Tan, X. Zuo, X. Ji, A. Barty, N. A. Zatsepin, H. N. Chapman, J. C. H. Spence, S. A. Woodson and Y. Wang: *Nature* **541**, 242 (2017).

## 著者紹介

**島田敦広**

岐阜大学応用生物科学部 助教

E-mail: ashima@gifu-u.ac.jp

専門：構造生物学，酵素化学

## 【略歴】

2013年5月大阪大学大学院理学研究科博士後期課程単位取得退学。博士（理学）。2013年6月兵庫県立大学生命理学研究科特任助教。2017年4月より現職。

**馬場清喜**

高輝度光科学研究センター 研究員

E-mail: baba@spring8.or.jp

専門：放射光構造生物学

## 【略歴】

2004年3月千葉工業大学大学院工学研究科工業化学専攻博士後期課程修了。博士（工学）。2004年4月千葉工業大学特別研究員，2006年4月大阪大学特認研究員，2007年4月理化学研究所研究員，2007年5月より現職。

**久保 稔**

理化学研究所放射光科学総合研究センター 専任研究員

E-mail: minoru.kubo@riken.jp

専門：時間分解振動分光，生体分子のダイナミクスを見るための手法開発

## 【略歴】

2003年北海道大学大学院理学研究科修了。博士（理学）。岡崎統合バイオサイエンスセンター IMS フェロー，JSPS 海外特別研究員（ノースイスタン大学），兵庫県立大学特任准教授などを経て，2014年4月より現職。

## XFEL time-resolved analysis revealed what drives the closure of the proton pumping pathway in cytochrome c oxidase

**Atsuhiko SHIMADA** Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu 501-1193, Japan  
**Minoru KUBO** RIKEN SPring-8 Center, Sayo-gun 679-5148, Japan  
**Seiki BABA** Japan Synchrotron Radiation Research Institute, Sayo-gun 679-5198, Japan

**Abstract** Especially high flux and short pulse-width of XFEL enables us to perform the pump-probe time resolved structural analysis in combination with the method of inducing enzymatic reaction by light irradiation. By using this pump-probe time resolved method, we successfully revealed that the open/closed mechanism of proton pumping pathway of cytochrome c oxidase (CcO), terminal oxidase in mitochondrial respiratory chain. In this topic, we want to discuss the future of XFEL time resolved analysis.