

京都大学教育研究振興財団助成事業 成 果 報 告 書

2021年 3月 22日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団
会 長 藤 洋 作 様

所属部局 理学研究科

職 名 助 教

氏 名 藤 橋 雅 宏

助 成 の 種 類	令和元年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	新しい結晶構造分析法の開発による酵素反応機構の新基盤原理確立と抗ウイルス剤の開発			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	長波長X線を用いた結晶構造中のリン原子位置の同定			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品(試薬, 器具他)	291,956	
		備品(PC)	697,544	
		その他(network利用料)	10,500	
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 助成を頂いたのは、研究室の教授が定年を迎えたため研究費の確保が大変重要であったのに、科研費の獲得に失敗してしまったときで、大変ありがたかったです。貴財団のような助成をして下さる財団があることで、少し背伸びをした研究計画をたて、大型の助成金への申請を行うことが可能になります。今後も京都大学の研究の発展のために、本事業を継続していただければ、大変ありがたいです。			

成果の概要 / 藤橋雅宏

生命活動は様々な化学反応の集合体といえる。これら生体内での反応の多くは、酵素によって触媒されている。本研究では、この酵素の反応触媒機構をより詳しく開発するための手法開発に取り組んだ。

(1) 水素原子の振る舞いの理解を目指した研究

生体内におけるほぼ全ての酵素反応の解析に、水素原子の振る舞いの理解は欠かせない。例えば UDP-galactose epimerase や alanine racemase などの酵素では、活性中心チロシンのヒドロキシ基からプロトンが解離し、活性化したヒドロキシ基が基質からプロトンを引き抜くことで反応が開始されると考えられている。これら 2 酵素以外にも、活性中心置換基のプロトン化状態が反応性の鍵であると提案されている酵素は、転移酵素、加水分解酵素、異性化酵素など、様々な反応様式の酵素に無数に存在する。

しかし、水素原子を含む立体構造の解析例は非常に限られている。現在の技術では、中性子線結晶構造解析か、1 Å を超える超高分解能 X 線結晶構造解析以外の選択肢が存在しないが、これらの解析に必要な極めて大型・良質の結晶作製は非常に困難であることがその理由である。また、X 線による超高分解能結晶構造解析では、X 線照射による結晶の放射線損傷も問題となる。X 線結晶構造解析における水素原子のシグナルは非常に小さいため、わずかな放射線損傷であっても影響は大きい。

そこで本研究ではまず、X 線の吸収線量と結晶の損傷の関係性の解明を試みた。解析は、オロチジンーリン酸脱炭酸酵素(ODCase)の結晶を対象に行った。まず ODCase の結晶から X 線回折データを連続的に収集した。連続で収集したそれぞれの回折データを基に、累積線量の増加に伴う電子密度の変化を調べた。これにより ODCase の場合では、吸収線量 0.5~1 MGy 程度で、結晶構造の損傷が始まることを明らかにした。これまでに、0.5 MGy でも分解能 1 Å 近い X 線回折データを取得することができている。現在このデータを使って、活性中心付近のプロトン化状態の解析を行っている。ODCase は核酸の新規合成に必須の酵素であり、この経路の遮断によってウイルスの増殖が抑制されることも知られている。将来的には、プロトン化状態を含めて明らかになった ODCase の基質結合部位の構造から、詳細な反応機構を明らかにしたい。さらにこれらの情報を基に、抗ウイルス剤としての応用を目指した、より効果的な反応阻害剤開発につなげたいと考えている。

(2) 長波長 X 線を用いたリン原子位置の同定

リン酸基の脱離と付加は、生体内の代謝において普遍的に見られる反応である。このような反応を行う酵素の反応触媒機構を明らかにするためには、リン酸基を含む反応基質(またはその類似化合物)と、酵素の複合体の結晶構造解析が必要である。一般にリン酸基の中心にあるリン原子は、炭素・窒素・酸素の 2 倍程度の電子を持つため、X 線結晶構造解析による電子密度図上で、強いピークとして見える。しかし、リン酸基は炭素鎖と比べると不安定であるために、結晶中に含まれる基質のうち、一部のリン酸基が脱離してしまうことが、時に問題となる。このような場合、電子密度上でのリン酸基のピークは相対的に小さくなり、結晶構造決定の難度が上昇する。

そこで我々は、波長 2.7 Å の X 線を用いて X 線回折データを収集することにより、リン原子の異常分散シグナルの取得を試みた。この波長による X 線回折データでは、結晶内の炭素・窒素・酸素原子による異常分散シグナルは無視できるが、リンの異常分散シグナルは検出可能な大きさとなるため、異常分散差フーリエ図を描くとリンの容易な検出が可能になる。一方、波長 2.7 Å の X 線を用いての X 線回折データは、汎用的に使われている波長 1 Å 付近の X 線を用いた場合よりも分解能が低くなることが問題となる。そこで本研究では、波長 1 Å の X 線を用いた X 線回折データを、吸収線量 1 MGy となるように取得した上で、同じ結晶を用いて波長 2.7 Å の X 線による回折データ収集を行った。データの解析は現在進行中であるが、リン原子の位置は波長 2.7 Å の X 線回折データを基にした異常分散差フーリエ図上で、明確に示された。今後、構造の精密化を進め、酵素反応機構の決定につなげる考えである。