

時間分解赤外分光法による酵素反応中間体の捕捉

(兵庫県大院理¹) ○久保 稔¹

Capturing enzyme reaction intermediates by time-resolved IR spectroscopy (¹*Graduate School of Science, University of Hyogo*) ○Minoru Kubo¹

Proteins are now being designed and utilized as components of molecular systems. Understanding the fundamental processes underlying protein function requires the observation of their dynamics, and numerous techniques, primarily based on spectroscopic methods, have been developed for this purpose. Recently, time-resolved (TR) X-ray crystallography using SACLA has emerged as a powerful method for visualizing protein dynamics. This technique allows the direct observation of positional changes of individual atoms within a protein, enabling structural changes related to function to be visualized as “molecular movies.” While TR spectroscopy has long been regarded as a useful method for observing protein dynamics, the advent of “molecular movies” prompts a re-evaluation of the role of TR spectroscopy. In structural biology, we are now entering an era in which providing only kinetics is insufficient to fully appreciate the value of TR spectroscopy.

The limitations of TR X-ray crystallography are as follows: (1) Capturing the formation and breaking of chemical bonds is difficult; (2) Observing protons is challenging. (3) Distinguishing between single and double bonds, and consequently identifying molecular species, is difficult; and (4) Analyzing electronic state dynamics is impossible. Importantly, these challenges can be addressed by TR spectroscopy, highlighting the potential for complementary use of TR spectroscopy with TR X-ray crystallography. From this perspective, TR spectroscopy is likely to find more opportunities in studying enzymes and photo-responsive proteins than in research on channels and receptors.

In this presentation, I will introduce our TR-IR spectroscopic instruments^{1,2)} and discuss two examples of vibrational spectroscopic research on enzymes. The first example involves the intermediate analysis of DNA photolyase, a flavin enzyme that repairs damaged DNA using blue light energy. The repair reaction can be initiated by photoinduced electron transfer from flavin to damaged DNA. We observed the repair reaction of the (6-4) photoproduct (a type of DNA lesion) and obtained the IR absorption spectrum of a key intermediate. By using isotopically-labelled (6-4) photoproducts and performing DFT calculations, we assigned the intermediate as an oxetane species.

The second example involves the intermediate analysis of NO reductase, a heme enzyme that catalyzes the reduction of NO to N₂O in the nitrogen cycle. We used a photo-sensitive caged substrate (caged NO) to trigger the enzymatic reaction with light and measured the IR absorption spectra of the intermediates. By employing isotopically-labelled caged substrates and DFT calculations, we demonstrated that the reactive nitrogen species appearing during the reaction is a nitroxyl radical anion (Fe³⁺-NHO[•]).

Through these studies, this presentation will explore the role and potential of spectroscopy in understanding the elementary processes underlying protein function.

Keywords : *Infrared spectroscopy; DNA photolyase; NO reductase; Enzyme reaction intermediate*

生体高分子であるタンパク質は、分子システムの構成要素として、いまや設計・利用されるステージに入りつつある。タンパク質機能発現の素過程を理解するためには、そのダイナミクスの観測が不可欠であり、これまで分光技術を中心に多くの手法が開発されてきた。近年、その中でもタンパク質ダイナミクスを可視化する優れた手法として、SACLAを用いた時間分解 X 線結晶構造解析が登場した。この手法では、タンパク質を構成する各原子の座標変化が直接得られるため、タンパク質が機能する際の構造変化をあたかも“分子動画”として観ることができる。ダイナミクス観測の有用な手法はこれまで時間分解分光法であったが、“分子動画”を観ることができるようになったいま、時間分解分光法に求められるものは何かが問われつつある。特に構造生物学においては、単にキネティクスを与えるだけでは分光法の価値は十分に理解されない時代が到来している。

時間分解 X 線結晶構造解析の制約を整理すると、(1) 分解能に依存するが、多くの場合、化学結合の形成・開裂を捉えるのが困難、(2) プロトンの観測が困難、(3) 一重結合と二重結合の区別が困難、したがって分子種の同定が困難、(4) 電子状態ダイナミクスの解析が困難、といった点が挙げられる。これらの課題はまさに分光法が得意とする領域であり、分光法の時間分解 X 線結晶構造解析との相補的な活用が期待される。この観点からすれば、分光法の相補活用の際は、チャンネルや受容体よりも、酵素や光応答性タンパク質の研究において見出しやすいと思われる。

本講演では、演者が開発してきた時間分解赤外分光装置を紹介し^{1,2)}、2つの酵素に関する振動分光研究を話題提供したい。1つ目の研究例は、DNA 光修復酵素の中間体解析である。この酵素は、青色光のエネルギーを利用して損傷 DNA を修復するフラビン酵素であり、修復反応はフラビンから損傷 DNA への光電子移動によって引き起こされる。われわれは、(6-4)光産物（損傷 DNA の一種）の修復反応を観測し、その過程で現れる中間体の赤外吸収スペクトルを取得した。スペクトル解析に同位体ラベルした(6-4)光産物を用い、さらに DFT 計算を併用することで、その中間体がオキセタン種であることを明らかにした。

2つ目の研究例は、一酸化窒素還元酵素の中間体解析である。この酵素は窒素循環に関与し、NO を N_2O に還元するヘム酵素である。われわれは、光感受性のケージド基質（ケージド NO）を用いて光で酵素反応をトリガーし、酵素中間体の赤外吸収スペクトルを測定した。同位体ラベルしたケージド基質を用い、DFT 計算を併用することで、反応途中に現れる活性窒素種がニトロキシルラジカルアニオン ($\text{Fe}^{3+}\text{-NHO}^{\bullet-}$) であることを示した。

本講演ではこれらの研究例を通して、タンパク質機能発現の素過程理解における分光法の役割や可能性について議論したい。

1) 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* **2021**, 118, e2101481118.

2) Time-resolved IR spectroscopy for monitoring protein dynamics in microcrystals. *Methods Enzymol.* **2024**, 709, 161-176.