X-ray Crystal Structure Analysis of Multifunctional Dioxygenases in Fungal Meroterpenoid

Yu Nakashima^{*1}, Takahiro Mori¹, Shotaro Hoshino¹, Masahiro Okada¹, Takayoshi Awakawa¹, Miki Senda², Toshiya Senda², and Ikuro Abe¹ ¹ Grad. Sch. of Pham. Sci., Univ. of Tokyo, Japan, ² SBRC, IMSS, KEK, Japan

Non-heme iron/ α -ketoglutarate (α KG) dependent dioxygenases catalyse key oxidation reactions to afford complex molecular structures in the fungal meroterpenoid biosynthesis.^{1,2} AusE and PrhA are two dioxygenases that catalyse intriguing oxidative rearrangement reactions in austinol and paraherquonin biosynthetic pathways, respectively. AusE and PrhA have high sequence similarity (~78%), and both enzymes accept the same preaustinoid A1 substrate but generate different products, preaustinoid A3 and berkeleydione (Figure 1). Here we describe the X-ray crystal structures of apo AusE and PrhA, as well as PrhA complexed to Fe(II), αKG, and preaustinoid A1 at under 2 Å resolution. Comparison of the crystal structures revealed several key active site residues that are proximal to the substrate and are different in AusE and PhrA. Mutation of the identified PhrA active site residues to mimic those of AusE (A232S/V150L) resulted in a PrhA-A232S/V150L mutant that catalyses an AusE-type reaction to produce preaustinoid A3. Subsequently, we solved the X-ray crystal structure of PrhA-A232S/V150L complexed to Fe(II), αKG, and preaustinoid A1 or preaustinoid A2. In the co-crystal structure with preaustinoid A1, the distance between C2 of preaustinoid A1 and Fe(II) was reduced by 0.9 Å compared to the wild type PrhA, providing evidence for the position of the initial hydrogen abstraction. Furthermore, we observed that the C5 position of preaustinoid A2 is proximal to the catalytic Fe center in the co-crystal structure of the PrhA mutant with preaustinoid A2, indicating that the hydrogen abstraction at C5 triggers the sequential reaction to form the spirolactone ring of preaustinoid A3. We also generated PrhA-A232S/V150L/M241V triple mutant and found that in this mutant generates several novel compounds through four steps oxidation from preaustinoid A1. This study presents the structural basis of a novel reaction mechanism in a multifunctional dioxygenases, in combination with mutagenesis studies that successfully led to the engineering of a new function for these enzymes.



Figure 1 | The catalytic pathway of AusE and PrhA.

References

1. Matsuda, Y. et al. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 10962.

2. Matsuda, Y. et al. J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 12671.

PF/BL27B

X 線マイクロビームを用いた DNA 損傷に開始される 細胞周期変調のライブセルイメージング Live-cell imaging of cell cycle modification started by DNA damage using X-ray microbeam

神長輝一^{1.2}、宇佐美徳子⁻³、横谷明徳^{-2.1}

1 茨城大学大学院 2 量子科学技術研究開発機構 3 KEK

近年、放射線のヒットを受けた細胞に隣接する非照射細胞にも、染色体異常や細胞死が誘発されるバイスタンダー効果と呼ばれる現象が報告されているが、細胞分裂そのものの周期性に与える影響は明らかにされて来なかった。 一般に、照射細胞中で DNA 損傷やタンパク質の発現、機能異常が引き起こされると、細胞周期に変調(遅延や停止)が生じることが知られている。私たちはは、細胞周期へ与えるバイスタンダー効果の有無の検証を試みてきた。

これまでに、PF / BL27B の X 線マイクロビーム照射装置を線源として使用し、 細胞コロニー内の数個の細胞、あるいは 3 次元培養した細胞集団 (スフェロイ ド)に対して 10G 及び 20Gy の X 線マイクロビームを照射することで、照射細胞 と隣接するバイスタンダー細胞をライブセル観察してきた。細胞周期を可視化 するため、Fucci 処理された HeLa.S 細胞を試料として用いた。まず単層培養し た試料に対し照射後 72 時間のライブセル観察を行い、個々の細胞の分裂の 様子を細胞系譜図として解析を行った。その結果、照射細胞だけではなく、バ イスタンダー細胞の一部に細胞周期変調や細胞死が観察された。さらにスフ ェロイドの一部に対してマイクロビーム照射を試みる実験系の構築を行い、照 射部位における細胞周期停止を観測することに成功した。

ー方細胞核の DNA に対し、細胞質中に多量に存在する ATP を合成する細胞小器官であるミトコンドリアも放射線照射の重要なターゲットとして想定される。私たちは細胞周期変調の解析からさらに、ミトコンドリアの活性変化に研究対象を拡張した。ミトコンドリアの量と高膜電位部位の割合、細胞内 ATP 量の変化を指標として、細胞質あるいは核のみへの X 線照射の影響解明を試みた。6Gyの X 線を細胞質あるいは核のみに照射し、照射後 72 時間までの継時変化を解析した。その結果、ミトコンドリア量は照射後二日以降、細胞質照射で減少、核照射では逆に増加した。高膜電位部位の全ミトコンドリア面積に占める割合は、どの照射条件でも大きな違いはなかった。細胞核内の DNA 損傷とその修復及びその後のクロマチンのリモデリングに必要な ATP を確保するために、ミトコンドリア量そのものが増加したと推測される。一方 ATP 量については、培養条件等による変動が大きく、今後実験条件の改良が必要と考えられる。

有機分子を用いた金属の表面状態の制御 Manipulation of metallic surface states by organic molecule adsorption

古池 晴信¹、水島 啓貴¹、間瀬 一彦^{2,3}、小澤 健一⁴、 石田 行章⁵、久保 孝史⁶、辛 埴⁵、金井 要¹

1 東理大理工、2 高工研 PF、3 総研大、

4 東工大理、5 東大物性研、6 大阪大理

有機半導体デバイスの電気特性を十分に理解するためには、有機/金属界 面の電子状態を詳細に解明する必要がある。有機/金属界面では、界面電気 二重層の形成により、真空準位が変化することが知られている[1]。しかし、そ の界面電気二重層の起源や、それが電子状態や電気特性に与える影響に関 しては、未だ十分に解明されていない。

先行研究より、有機分子が Au(111)表面に吸着することで、Au(111)表面に 存在するショックレー状態と呼ばれる二次元自由電子状態が大きな影響を受 けることが知られている[2]。このような自由電子的な表面状態は、吸着分子と 表面電子状態の間の相互作用を解明する上で良い指標になると考えられる。

そこで本研究では、Au(111) 表面に Ph2-IDPL や直鎖アルカン分子を吸着さ せた系に注目し、ショックレー状態の変 化から界面に関する情報を得ることを 目的とした。Ph2-IDPL と直鎖アルカン 分子は、一次元的な分子構造を持つ炭 化水素分子という点で類似点を持つが、 それらの分子が持つ電子状態は大きく 異なる。そのため、吸着分子の電子状 態が界面の電子状態に与える影響に ついて系統的に理解することができる。

当日は、吸収端近傍 X 線吸収微細構 造(NEXAFS)(図1)と低速電子線回折 (LEED)を用いた吸着分子構造の解析 結果を参考にしながら、吸着分子によ るショックレー状態の変化について議論 する。

参考文献

[1] H. Ishii et al., Advanced Materials, **11**, 605 (1999).

[2] J. Ziroff. et al., Surf. Sci., 603, 354 (2009).



NEXAFS 測定から求めた 図 1 Au(111) 上の Ph2-IDPL 分子の配 向角。 θ_a は Ph₂-IDPL 分子の配向 角を表す。挿入図(上)は Au(111) 表面に吸着した Ph₂-IDPL 分子の 模式図を表す。挿入図(下)は Ph₂-IDPL 分子の分子構造を表す。

PF/BL-3A, 4C, 8A

ハニカム反強磁性体 Co₄Nb₂O₉ における 放射光を用いた格子歪みの測定 Measurement of lattice deformation in Honeycomb antiferromagnets Co₄Nb₂O₉

松浦慧介、徳村謙祐、N.D. Khanh¹、佐賀山基²、有馬孝尚 東大新領域、RIKEN CEMS¹, KEK 物構研²

本研究では、ハニカム反強磁性体 $Co_4Nb_2O_9$ における電気磁気効果と格子 歪みの関係を超音波による音速・吸収測定及び放射光 X 線回折を用いて調 べた。 $Co_4Nb_2O_9$ は、三方晶系空間群 P-3m1 に属する。単位胞内に非等価な Co^{2+} イオンが2種類存在し(図1)、蜂の巣ネットワークを形成する。磁気転移点 $T_N=27$ K において磁場下で巨大な電気分極が出現することが知られている [1]。図2は、音速の相対変化の温度依存性を示しており、B=1.5 T で 12%もの 巨大なソフト化が磁気転移点以下で生じることがわかった。このソフト化は高 磁場を印加することで抑制されることもわかった。さらに、PF-BL3A において、 c-glide の破れを示す(009)反射を観測した。(009)反射強度の磁場依存性を調 べたところ、磁場の印加に伴い強度が減少する振る舞いが観測された。発表 では、超音波の結果と放射光回折の結果を踏まえて $Co_4Nb_2O_9$ における電気 磁気効果と格子歪みの関係を議論する予定である。

Reference

[1] N. D. Khanh et al., Phys. Rev. B 93, 075117 (2016)



In-situ偏光依存ARPESを用いた面方位制御酸化物 極薄膜における強相関量子井戸状態の研究

In-situ ARPES study of orbital-selective quantization states in orientation-controlled oxide ultrathin films

三橋太一^{1,2}, 簔原誠人², 湯川龍², 北村未歩², 堀場弘司², 小林正起², 組頭広志^{1,2} ¹東北大院理、²KEK-PF

真空紫外光領域の光電子分光においては、光電子の脱出深さが数Å程度 と短いために試料垂直方向の運動量に不確定性が生じる、所謂" k_{\perp} -broadening"効果[1]が顕著になることが知られている。今回我々は、この k_{\perp} -broadeningが角度分解光電子分光(ARPES)スペクトルに及ぼす影響 について調べるために、異なる面方位のSrVO₃薄膜における*in situ* ARPES 測定を行なった。SrVO₃薄膜における偏光依存ARPES測定から、各 t_{2g} 軌道 (d_{xy}, d_{yz}, d_{zx}) 由来のバンド構造に対する k_{\perp} -broadening効果を分離して特

定することが可能である。

図1に偏光依存ARPES測定の結果 を示す。SrVO₃(110)薄膜におけるバ ンド分散に注目すると、dxyバンド(図 1(a)) に比べて、*d_{vz}/d_{zx} バン*ド(図 1(b)) の運動量方向のピーク幅が明確に広 がっていることがわかる。一方で、 このピーク幅の広がりは、SrVO₃(001) このビーク幅の広かりは、 $SrVO_3(001)$ 薄膜における結晶学的に等価な方向 においては観測されなかった(図1(c))。 そこで、このピーク幅の広がりが測 定面(挿入図参照)に対する各バン ドの対称性に起因していると考え、k 」-broadening 効果を考慮した ARPES -スペクトルのシミュレーションを行 なったところ、シミュレーションは 実験結果を良く再現した。これらの 結果は、ARPES スペクトルの面方位 依存性を理解するためには、各軌道 のARPES測定面に対する対称性が重 要であることを示している[2]。

V. N. Strocov, JESRP **130**, 65 (2003).
 T. Mitsuhashi *et al.*, Phys. Rev. B, **95**, 125148 (2016).



図1. SrVO₃ 薄膜における Γ-M 方向の *in situ* 偏光依存 ARPES。(110)面におい て(a)水平(LH)および(b)垂直(LV)偏光 で得られた結果。(c)(001)面での結果。

窒素含有芳香族有機分子と金属表面の 界面における電子相互作用の測定 Measurements of electron interaction at the interface between nitrogen-containing aromatic organic molecules and a metal surface

宮澤徹也¹, 間瀬一彦^{1,2}, 小澤健一³, 古池晴信⁴, 金井要⁴,
Alexandre Foggiatto⁵, 櫻井岳暁⁵, 栗原真志⁶
1 総研大, 2 KEK 物構研, 3 東工大, 4 東理大, 5 筑波大, 6 横国大

有機/金属界面の電子状態や構造は有 機薄膜太陽電池、ペロブスカイト太陽電 池、ペロブスカイト単結晶を用いたX線検 出器などのデバイス特性と密接に関わる [1, 2] (Fig. 1)。例えば、バソクプロイン (BCP)のような窒素含有芳香族有機分子 を有機/金属界面に緩衝層として挿入する ことで有機薄膜太陽電池の変換効率は 向上することが知られている[3]。しかし BCP は耐久性が低いという欠点がある[4]。 変換効率が高く耐久性もある緩衝材料を 選定するためには、有機/金属界面につ

いて詳細な研究を行う必要 がある。そこで、ピリジンや ピラジンなどの窒素を含有 した構造の簡単な有機分 子と、金(111)表面との電子 状態や構造を放射光 X 線 光電子分光などの方法で 明らかにする研究を進めて いる(Fig. 2)。 先行研究の 結果や実験方法、実験計 画について発表する。

[1] H. Zhou *et al.*,

Science. **345**, 542 (2014).

- [2] H. Wei *et al.*, nature photonics. **10**, 333 (2016).
- [3] P. Peuman et al., Appl. Phys. Lett. 76, 2650 (2000).
- [4] M. F. Lo et al., Appl. Phys. Lett. 97, 143304 (2010).





Fig. 2. PF BL-13B の光電子分光装置。

PF-BL9A

インドール側鎖基を有する M^{II}(MeS-salen)錯体の 酸化による構造変化 Structural Change by Oxidation of M^{II}(MeS-salen) Complexes with a Side Chain Indole Moiety

大下宏美¹, 阿部仁^{2,3}, 島崎優一¹ 1 茨城大院理工, 2KEK-PF, 3 総研大

アルコールをアルデヒドへと変換するガラクトースオキシダーゼの活性種は、 Cu^{II} -フェノキシルラジカル種であることが知られている。このフェノキシルラジカルは、トリプトファン側鎖基のインドールによる π - π スタッキング相互作用がみられ、活性種の安定化等に寄与していると 考えられている。インドールとのスタッキング相互作用については、インドール基を有する様々な金属錯体を用いて検討されており、構造のわずかな違いによるスタッキング相互作用の変化について議論されている。 しかしながら、酸化還元反応において、 π - π スタッキング相互作用による金属錯体の電子状態の変化については未だ不明な点が多い。そこで本 課題では、インドール基を有する Ni^{II}, Cu^{II}-サレン錯体[M(MeS-salindole)] を合成・単離し、酸化前後の電子状態や構造について研究している。

[M(MeS-salindole)]の X 線吸収スペクトルの解析から、酸化前後の価数 に変化はないことが確認された。しかしながら、EXAFS が大きく変化し ていることが明らかとなった。今回は、[M(MeS-salindole)]の酸化還元挙 動や一電子酸化体の電子状態と、X 線吸収分光法による金属イオン周辺 の構造の検討から、フェノキシルラジカル近傍に存在するインドール基 の影響について報告する。



図 1. [Cu(MeS-salindole)]錯体とその一電子酸化体[Cu(MeS-salindole)]SbCl₆の X 線吸収スペクトル