

嫌気呼吸における超分子複合体形成の分子科学

寺坂瑛里奈¹、石井頌子¹、當舎武彦²、中村寛夫²、杉本 宏²、久野玉雄²、佐藤希美²、
David Young²、城 宜嗣²

兵庫県立大・理学部¹、理研・城生体金属科学研究室²

膜結合型一酸化窒素還元酵素（NOR）は、微生物が行う嫌気呼吸の鍵となる酵素であり、亜硝酸還元酵素（NiR; $\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$ ）が生成する一酸化窒素（NO）の還元反応（ $2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ ）を行う。生成物である亜酸化窒素（ N_2O ）が、二酸化炭素 CO_2 の約310倍の温室効果ガスであり、オゾン層破壊ガスであることから、NORは環境科学の観点からも注目されている。さらに、NORは、好気呼吸の根幹を担っているチトクロム酸化酵素の祖先蛋白質であるという点でも注目されている。これらの観点から、我々が最近明らかにした緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来NOR（cNOR）と *Geobacillus stearothermophilus* 由来NOR（qNOR）の構造を基盤に、嫌気呼吸におけるNO分解の分子機構を理解する事を目的に研究を進めた。

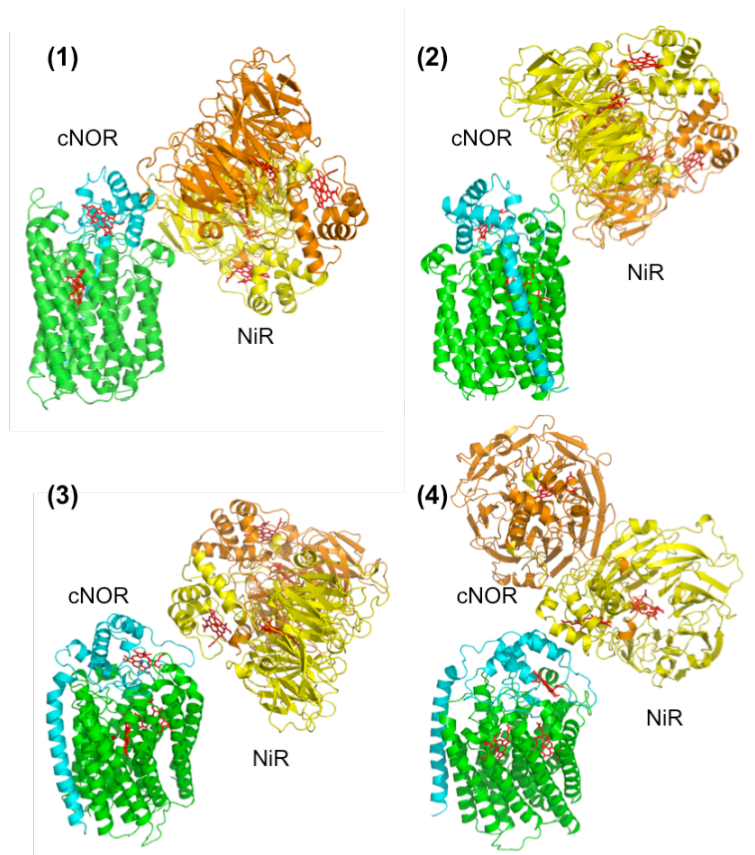
配位子結合型cNORの構造解析： 昨年度、X線回折データを取ることができた還元CN結合型（2.5 Å分解能）に関して、徹底的にデータの解析を行ったところ、活性部位にみられる電子密度を説明するためには、2分子のCNイオンをそれぞれヘム鉄および非ヘム鉄に配位させたモデルが妥当であることが示した。現在、2.6 Å分解能で得られた還元CO結合型のデータについても解析を行っており、CN結合型と同様に活性部位に2分子のCOが結合している構造が得られている。CNやCOが活性部位に結合することで、ヘム鉄-非ヘム鉄間の距離に0.5 Å程度の伸長がみられたが、その他のタンパク質部分には、構造変化が検出されなかった。また、よりかさ高い配位子として、アセトアルドキシム（ $\text{CH}_3\text{-CH=N-OH}$ ）を結合させたcNORの構造を2.4 Å分解能で決定したが、この場合も目立った構造変化は確認できなかった。酸化型cNORの構造からは、2分子の基質NOが活性部位に結合するためには、活性部位に構造変化が起こり、基質結合部位の空間が大きくなると予想していたが、今回得られた結果は、むしろ活性部位の空間を狭く保つことで、2分子のNOを近接させ、N-N結合の形成を促進させることで、NO還元を円滑に行っていることを示唆している。

嫌気呼吸酵素超分子複合体の構造解析： 細胞内における効率良いNOの無毒化機構を理解するために、cNORだけではなく他の嫌気呼吸酵素にも注目した。NiRによるNOの生成、cNORによるNOの還元という一連の反応において、細胞毒性の高いNOが細胞内に拡散、蓄積されないことに注目し、NiRとNORが蛋白質複合体を形成し、効率良いNOの伝達を行っているという仮説をたてた。表面プラズモン共鳴装置による相互作用解析から、溶液中において、NiRとcNORが複合体を形成しているという結果が示唆された。そこで、NiRとcNORを混合し、結晶化を試みたところ、複合体に由来すると思われる結晶が得られた。SPRING-8におけるX線回折実験により、4.7 Åの分解能でデータ収集ができた。NiRおよびcNORのそれぞれの構造を用いて分子置換を行った結果、低分解能ながらNiR-cNOR複合体の構造決定にいたった。結晶構造から、cNORのペリプラズム側に存在する可溶性ドメインとNiRが相互作用していることが示された。現在、より詳しい構造情報を得るために、高分解能化を目指している。

大腸菌でのNOR発現系の構築：
cNORの立体構造を基にした機能解析
を実施し、モデルを検証するための有
力な手法は遺伝子操作による組換え
変異タンパク質の取得である。そこ
で、大腸菌内でシトクロム*c*生成遺伝
子群と緑膿菌のnorQOPCBD遺伝子を
共に発現させたところ、大腸菌細胞膜
からNO還元活性を有する組み換え型
cNORを取得することができた。

好熱菌および病原菌由来NORの
結晶構造解析： NORの構造と機能の
普遍性を確立する為に、好熱性細菌由
来のcNORおよびqNORの構造機能研
究に着手した。*Thermus thermophilus*由
来cNOR (TtcNOR)および*Persephonella*
*marina*由来qNOR (PmqNOR)の発現・精
製を試みた。PmqNORに関しては、大
腸菌発現株を大量培養した後、界面
活性剤n-dodecyl- β -D-maltosideを用い
て可溶化し、Ni-アフィニティカラム
を用いた精製を行うことによって、

結晶化条件の検討に適した精製度の試料を調製できた。一方、TtcNORについては、Ni-アフィニ
ティカラムへの結合が弱く、結晶化に適した精製度の試料の調製が困難であった。また、病原菌
が宿主の免疫系が産生するNOを分解し、宿主内で生育するためにキノール依存型NOR(qNOR)を
用いていることに着目し、病原菌由来qNORに関する研究もスタートさせた。既報およびデータ
ベースに基づき、生理学的重要性が示唆されているqNORとして、髄膜炎菌(*N. meningitidis*)、ジフ
テリア菌(*C. diphtheriae*)、肺炎菌(*M. catarrhalis*)、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)、日和見感染菌(*A.*
xylosoxidans)由来qNORを選択し、大腸菌での発現系を構築した。それぞれのqNORを発現させた
大腸菌から膜画分を調製し、NO還元活性を調べたところ、髄膜炎菌、黄色ブドウ球菌、日和見
感染菌由来の3種類のqNORが効率よく発現していることがわかった。髄膜炎菌由来qNORについ
ては、高い活性を保持した状態での精製にも成功した。今後は、病原菌由来qNORの構造学的研
究を進めるとともに、ケミカルバイオロジー分野の研究者と連携し、抗菌薬開発に向けた阻害剤
探索にも取り組む。



図：NiR（オレンジ、黄）とcNOR（緑、青）の4種類の
超分子複合体の構造

【参考文献】

- [1] T. Hino, S. Nagano, H. Sugimoto, T. Tosha, Y. Shiro, Special Issue on *Respiratory Oxidases in Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **2012**, 1817, 680-687 [2] 日野智也、當舎武彦、城 宜嗣 生物物理、Vol 52, pp. 186-189 (2012) [3] T. Tosha, Y. Shiro IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) Life **2013**, 65, 217-226 (2013) [4] A. V. Pisliakov, T. Hino, Y. Shiro, Y. Sugita *POLS Comp. Biol.* **2012**, 8, e1002674

生体内の鉄動態の分子論

直江洋一¹、土井章弘²、杉本 宏²、中村寛夫²、城 宜嗣²

理研・加藤分子物性研究室¹、理研・城生体金属科学研究室²

鉄は微生物から動植物までのすべての生物の生命維持に必須の金属元素である。生体内の鉄の大部分はタンパク質に結合して存在し、その多くはタンパク質・酵素の活性中心として機能している。酸化還元反応、配位子結合反応をとおして、生体内におけるエネルギー変換、物質変換、情報変換という重要な生理作用に関わっている。鉄は生体内で合成できないので、その生物も外部からの取込みと、生体内部で回収 (recycle) され、再利用 (reuse) されるシステムが構築されている。本研究では、このような鉄の生体内動態に関わるタンパク質分子間の連環 (まさに生体分子システム) を分子レベルで明らかにすることを目的としている。

ヒトの鉄吸収に関与する還元酵素の構造研究：鉄は生体に必須なミネラルの一つであるが、体内に過剰に存在すると活性酸素の産生源となって細胞障害を引き起こすため、鉄の細胞への吸収や排出の制御が恒常性の維持にとって重要となる。ヒトで十二指腸 (duodenum) において食物からの鉄分吸収を行なう際には腸管表面の細胞に入った鉄は、腸管上皮細胞膜上で6回膜貫通型の鉄イオン還元酵素Duodenal cytochrome *b* (Dcytb)によって三価 (Fe^{3+})から二価 (Fe^{2+}) に還元され、輸送タンパク質 Divalent Metal ion Transporter-1 (DMT-1) によって細胞内に取り込まれる。我々は、ヒトの小腸での鉄獲得の分子メカニズムを解明すること目的とし、Dcytb の分子構造解明をめざしている。大腸菌の発現系を用いてDcytb を大量発現させ、界面活性剤n-dodecyl-β-D-maltosideなどを用いて精製した試料から結晶が得られた (図1)。そのX線回折分解能は構造解析には十分ではなかったため、Dcytbに特異的なモノクローナル抗体のスクリーニングと精製を行った。得られた抗体とDcytbは安定な複合体を形成することがゲルろ過クロマトグラフィーで確認できた。今後、大量調製を行い結晶化に利用する事が可能である。

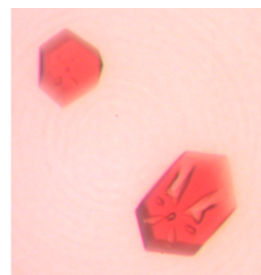


図1 Dcytbの結晶

病原菌のヘムセンサータンパク質の構造機能解析：病原菌にとっても鉄は必須元素であり、多くの場合、宿主の血液ヘモグロビンのヘムを主な鉄源としている。病原菌の持つ二成分制御系のセンサータンパク質が周囲のヘム濃度を感知し、ヘム分解系 (ヘムオキシゲナーゼ) と排出ポンプの遺伝子の発現を促進している。二成分制御系は、細菌や菌類、植物に普遍的に存在する環境センサーであり、ヒスチジンキナーゼ (HK) とレスポンスレギュレーター (RR) が、環境 (光、酸素、栄養など) 変化を感知し、その情報を細胞内に伝達する。ジフテリア菌 *Corynebacterium diphtheriae* はヒト上気道粘膜に感染する病原菌であり、我々はその二成分制御系タンパク質 ChrS/ChrA (HK/RR) が周囲のヘム濃度を感知するセンサーであることを直接的に証明した。ChrS/ChrA がヘム濃度変化に応答して、タンパク質間で生じるATP 依存的なリン酸基転移反応を介した細胞内情報伝達機構を原子・分子レベルで解明することを目的としている。本年度は、ChrS/ChrAのX線結晶構造解析をおこなった。その結果、遺伝子結合能をもつChrAの立体構造

を約2 Å分解能で決定した。またChrSのこれまでに決定した結晶化条件は、再現性が得られなかったため、新たに試料調製方法から再検討を行った。界面活性剤n-decyl- β -D-maltosideに溶媒置換したサンプルを用いて行った結晶化より、再現性の良い複数の条件を新規に決定することができた。得られた結晶は低分解能の反射だったため、引き続き結晶化条件の最適化を

行う。また分解能向上を目指しChrSを特異的に認識するモノクローナル抗体を作成した。数種類のChrS認識抗体から、結晶化により最適な抗体条件を検討中である。

病原菌の鉄吸収に関与するトランスポーターの構造研究:病原微生物と宿主の間には必須栄養元素である鉄の争奪戦がくりひろげられており、病原菌の鉄代謝システムは創薬ターゲットとして注目されている。鉄の取り込みの鍵となっているタンパク質を分子レベル

で理解するため、ABCファミリーに属するヘムトランスポーター複合体の構造解析を行っている。すでに結晶が得られている*Burkholderia cenocepacia*由来のヘムトランスポーターの試料において、界面活性剤octylglucoside 存在下で可溶化、精製を試み、スクロース等の添加材を加えることで結晶化にも成功した。またヘムが結合していると思われる色のついたヘムトランスポーターの結晶も得られた。これら得られた結晶の構造解析のために必須となる SeMet 誘導体の調製にも成功した。さらに、ヘムトランスポーターを構成するサブユニットの中で、ペリプラズム側でヘムを捕捉するサブユニットのみの立体構造を1つのヘムを結合した状態と 2つのヘムを結合した状態で明らかにした。これらの構造からヘムの受け渡しの際に必要な構造変化についての知見が得られた。

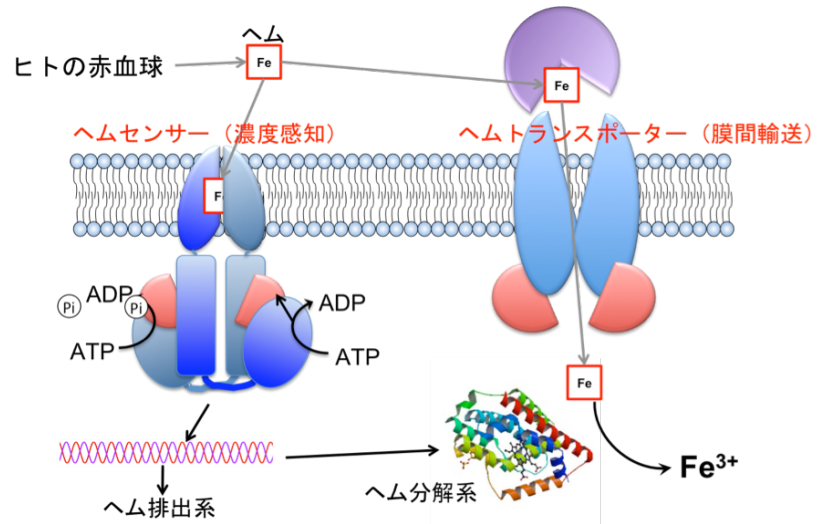


図2 病原菌がヒトのヘモグロビンからヘムを奪取するシステム

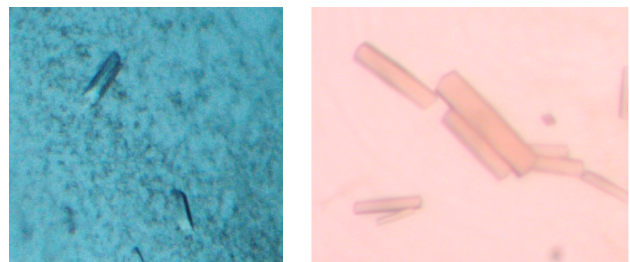


図3 (左) ヘムセンサータンパク質 ChrS、(右) ヘムトランスポーターの結晶

細菌のイオン共役型エネルギー供与体の構造基盤研究

渡邊真宏，眞木さおり，田中麻衣子，影山裕子，米倉功治

理研・米倉生体機構

多くのグラム陰性細菌は、生存に必要不可欠な鉄やビタミンB₁₂およびタンパク質毒であるコリンなどを外界から細胞膜を通じて取り込んでいる。それらの物質の細胞内輸送にはTonB依存性外膜レセプターやABCトランスポーターなど多くの膜タンパク質が深く関与している。物質の最初の輸送プロセスである外膜レセプターを通過するにはTonB、ExbB、ExbDで構成される3種類の膜タンパク質複合体による細胞質膜内外のプロトン濃度勾配(pmf)からのエネルギー供与が必要であることが明らかになっている。このTonB-ExbB-ExbDは、細胞質膜上にあるプロトンチャンネル型の膜タンパク質複合体であり、過去の研究よりExbBとExbD2種類の膜タンパク質がpmfを利用してTonBの構造変化を引き起こすことで外膜レセプターとの相互作用を可能にし、物質の輸送を制御していることが示唆されている。しかしながら、エネルギー供与を担う実体であるTonB-ExbB-ExbD複合体の立体構造情報はほとんどなく、そのプロセスは依然不明な点が多い。

本研究では、外膜と細胞質膜という物理的に隔てられた2つの膜の間で行われているプロトンチャンネルTonB-ExbB-ExbD複合体のイオン共役型エネルギー供与機構をX線結晶構造解析により解明することを目的とした。これまでの研究で、大腸菌のTonB-ExbB-ExbD 3者複合体のうちExbB-ExbD複合体の大量発現系の構築、精製および結晶化に成功した。

Electron Crystallography of 3D Protein Crystals

Koji Yonekura¹, Chikashi Toyoshima²

¹RIKEN SPring-8 Center,

²Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Membrane proteins or macromolecular complexes often give tiny and thin crystals that are smaller than a few μm and thinner than $0.1\ \mu\text{m}$. Such samples are generally difficult to be prepared enough for many crystallization trials and to grow to crystals suitable for X-ray crystallography even with synchrotron radiation. Tiny and thin crystals, however, sometimes diffract electrons to $\sim 2\ \text{\AA}$ resolution, because the scattering power of light atoms for electron is more than $\sim 100,000$ times higher than that for X-ray. X-rays are scattered by electrons around atoms, whereas electrons are scattered by Coulomb potential of atoms. Hence it is possible to observe experimental charge distributions of molecules [1, 2], which will unravel the working mechanisms of biological nano-machines in more detail.

A 3D crystal gives discrete diffraction spots in all the directions, and only a limited number of partial diffraction spots are recorded on a still diffraction pattern. Crystals have to be rotated or oscillated to integrate diffraction spots mechanically. It is a challenge for electron microscopy to control rotation of the specimen stage precisely and to process diffraction data from thin crystals. Fig. 1 shows an electron diffraction pattern from thin crystals of bovine catalase. We have been developing a new technology to fulfill electron crystallography of thin 3D protein crystals. Fig. 2 shows a GUI of our newly developed programs, which carry out 3D profile fitting to extract accurate intensities of diffraction spots. We have succeeded in obtaining the first 3D Coulomb potential maps of Ca^{2+} -ATPase and catalase thin 3D crystals at $3.0\ \text{\AA}$ and $2.4\ \text{\AA}$ resolution, respectively.

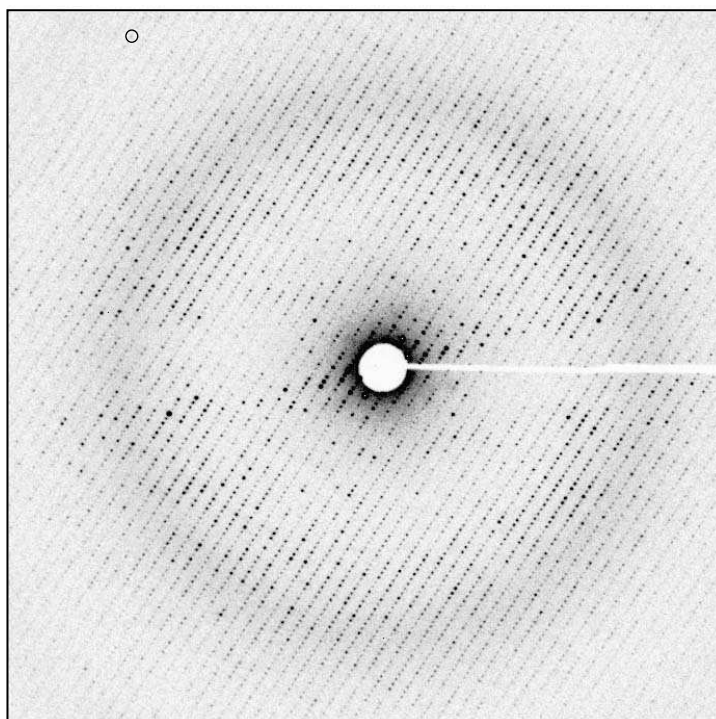


Fig. 1. Electron diffraction pattern from thin crystals of bovine catalase. A circle indicates a diffraction spot at $2.3\ \text{\AA}$ resolution.

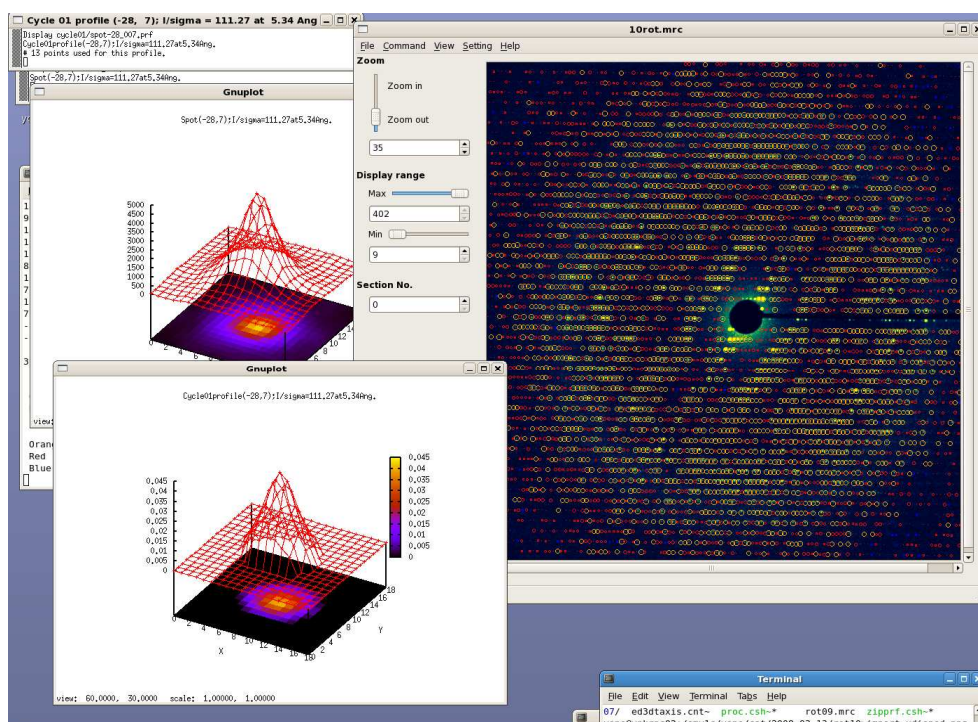


Fig. 2. GUI of our newly developed programs to process electron diffraction patterns.

- [1] Kimura Y., Vassilyev D. G., Miyazawa A., Kidera A., Matsushima M., Mitsuoka K., Murata K., Hirai T. & Fujiyoshi Y. *Nature* **389**: 206-211 (1997).
- [2] Mitsuoka K., Hirai T., Murata K., Miyazawa A., Kidera A., Kimura Y. & Fujiyoshi Y. *J. Mol. Biol.* **286**: 861-882 (1999).