

# 生体内の一酸化窒素動態： NOの産生、授受、消去システムの構造機能解析

當舎 武彦<sup>1</sup>, 杉本 宏<sup>1</sup>, 久野 玉男<sup>1</sup>, 寺坂 瑛里奈<sup>1,2</sup>, 佐藤 希<sup>1,3</sup>,  
David Young<sup>1,4</sup>, Andrea Duo<sup>1,4</sup>, 石井 頌子<sup>1,2</sup>, 城 宜嗣<sup>1,2</sup>

理研・城生体金属科学<sup>1</sup>, 兵庫県立大・生命理学<sup>2</sup>, 京大院・農<sup>3</sup>, U. Liverpool<sup>4</sup>

## 1. 緒言

一酸化窒素 NO はラジカル分子であり、その高い反応性の為に、細胞に取っては非常に毒性の高い気体分子である。しかし、生体内には、NO を積極的に産生するシステムが存在する。一つは、ヒトを含む哺乳動物において一酸化窒素合成酵素がアルギニンを基質とする酸素添加反応によって産生している。産生された NO は、その受容体である可溶性グアニル酸シクラーゼに結合することにより、血管拡張、殺菌、神経伝達などの生理作用を発揮している。他の一つは、嫌気性微生物の呼吸 (O<sub>2</sub>を使わない呼吸) の一種である脱窒 denitrification の中間体として産生されている。脱窒においては、4 種類の金属酵素により硝酸塩 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> や亜硝酸塩 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が窒素分子 N<sub>2</sub> まで還元される (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NO → N<sub>2</sub>O → N<sub>2</sub>)。この過程で、NO は亜硝酸還元酵素 Nitrite Reductase: Nir による NO<sub>2</sub><sup>-</sup>還元によって産生され (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup> → NO + H<sub>2</sub>O)、一酸化窒素還元酵素 Nitric Oxide Reductase: NOR により速やかに亜酸化窒素 N<sub>2</sub>O へ変換されている (2NO + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup> → N<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>O)。

我々は、膜結合性タンパク質である NOR の結晶構造を明らかにし、NOR が好気呼吸酵素 (チトクロム酸化酵素) と共通の祖先を有する事を明確に示した。すなわち、呼吸酵素がその分子進化において、NO 還元から酸素 O<sub>2</sub>還元へと機能変換されたと考える事ができる。両呼吸酵素の分子構造と酵素反応機構を詳細に比較できれば、進化に学んだ「小分子活性化触媒の設計」が可能となる。以上の考えの基で、NOR の構造を基盤にして触媒反応機構の確立をめざして研究を進めてきた<sup>1-5</sup>。

一方、微生物の脱窒において、Nir が産生した NO は細胞内を拡散することなく、NOR によって無毒化されている点は興味深い。実際、NOR を欠損した脱窒微生物は生育が悪いことが知られている。脱窒微生物内には、NO の産生と消去を連続的に行っている触媒反応システムが存在すると考えて解析を行った。

## 2. 結果と考察

### 1. NOR の反応機構の確立

従来の酸化型の結晶構造に加えて、還元型、還元一酸化炭素結合型、還元アルドキシム結合型の構造解析に成功した。その結果、NOR の酵素反応中心であるヘム-非ヘム鉄の複核中心の構造には、二分子の NO 同士を非常に近い状態で鉄に配位させる特徴がある事が明らかとなった。その結果、還元鉄から NO への電子移動の結果生成する 2 つの NO アニオン (NO<sup>-</sup>) が近接効果により不均化反応により N<sub>2</sub>O が生ずる反応機構を支持する結果が得られた。



現在、大腸菌を宿主とする NOR の発現系を作成しており、それが出来次第に各種変異体を調製し、上記反応機構を検証する予定である。

## 2. Nir-NOR 超分子複合体の解析

脱窒において、NO 産生酵素 Nir によって産生される NO は、細胞毒性が強い為に、産生後、細胞内を拡散することなく、速やかに NO 消去酵素 NOR によって消去されなければならない。実際、精製した Nir と NOR を用いて、NO 産生と消去の活性測定を行った (Figure 1)。その結果、Nir は  $\text{NO}_2^-$  を還元して NO を産生するが、NOR が存在すると産生された NO は速やかに消去されている事を確認した。このような  $\text{NO}_2^-$  から  $\text{N}_2\text{O}$  への連続反応を可能とする為には、Nir と NOR が複合体を形成する事が一番効率的である。しかし、このような複合体の形成は、未だ何の証拠も無い。そこで、表面プラズモン共鳴法を用いた相互作用解析の結果、明らかに両酵素は相互作用しており、さらに Nir-NOR 複合体の X 線結晶構造解析にも成功した (Figure 2)。

温室効果ガスであり、オゾン層破壊物質である  $\text{N}_2\text{O}$  の地球規模での産生の約 70% に、脱窒微生物がかかわっている事を考えると、これらの成果は、その減少につながる。

## 3. 病原菌由来のキノール依存型 NOR の構造機能解析

病原菌がヒトに感染した際に、ヒトのマクロファージは細胞毒性の高い活性酸素や NO を放出することにより殺菌する。それに対して、病原菌は NOR を用いて、NO を無毒化し生育をはかっている。病原菌由来の NOR の構造機能解析とその情報を基盤にした抗菌薬設計をめざして、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) と日和見感染菌 (*Achromobactor xylosoxidans*) 由来 NOR の研究を開始した。これらの NOR の大腸菌を用いた発現系および、精製系を確立した。

### 【参考文献】

- (1) Hino, T. et al. *Science* **2010**, 330, 1666-1670
- (2) Matsumoto, Y. et al. *Nat. Strl. Mol. Biol.* **2012**, 19, 238-245
- (3) Sato, N.; et al. *Proteins* **2014**, in press
- (4) Terasaka, E. et al. Special Issue on *Respiratory Oxidases* in *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **2014** in press

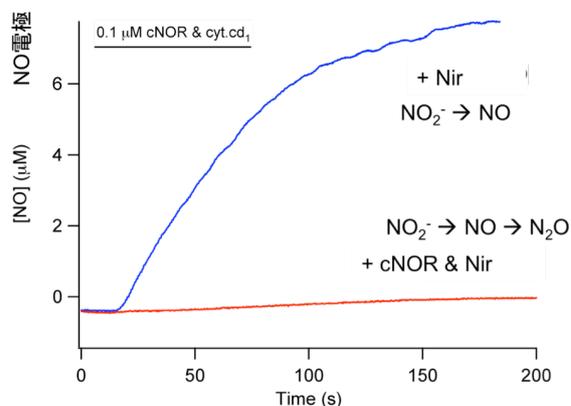


Figure 1. NO generation by Nir and NO decomposition by NOR

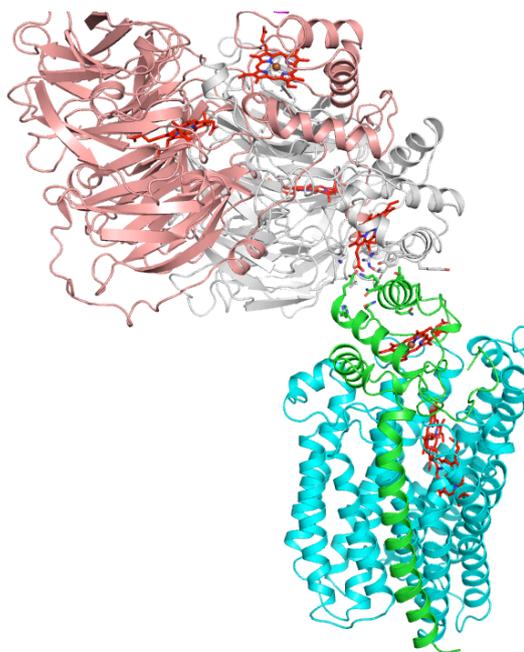


Figure 2. Structure of Nir-NOR Complex

# 生体内の鉄動態： 鉄の生体内輸送システムの構造機能解析

杉本 宏<sup>1</sup>，中村 寛夫<sup>1</sup>，土井 章弘<sup>1</sup>，富樫 ひろ美<sup>1</sup>，城 宜嗣<sup>1</sup>

理研・城生体金属科学<sup>1</sup>

## 1. 緒言

鉄イオンは、微生物から植物・動物まで、すべての生物にとって、その生存に必須の微量元素（ミナラル）である。多くの場合、鉄はタンパク質分子内にとりこまれて、電子移動反応・物質代謝・酸素運搬・エネルギー変換・情報変換などの重要な生理反応で必須の役割を担っている。ヒトの場合は、鉄は十二指腸において食物から取り込まれると同時に、体内の鉄を回収し再利用するシステムが働いている。このシステムには多くのタンパク質が関わっており、それらが厳密な制御のもとで、体内の鉄濃度を一定に保つ、すなわち「鉄の恒常性」を維持している。何らかの理由で、この制御が破壊されるとシステムが機能しなくなり、体内における鉄が欠乏や過剰となり、貧血やがんなどの深刻な疾病の原因となる。

病原性バクテリアにおいても、鉄イオンは必須の栄養源であり、宿主への感染後の増殖に利用されている。病原菌は、必要となる鉄分を宿主の体内に多く存在するヘモグロビンなどのタンパク質やヘム（鉄ポルフィリン錯体）から得ている。その際、ヘム濃度を感知するタンパク質、細胞内に取り込む輸送タンパク質（インポーター）、余分なヘムを排出する輸送タンパク質（エクスポーター）が機能している。以上のように、すべての生物には、鉄の吸収・運搬・感知・貯蔵・利用を行うために様々なタンパク質分子が連環した「分子システム」が機能しているのである。そのシステムの全貌を、関連するタンパク質の分子構造と分子機能を基盤に理解することが本研究の大目的である。

## 2. 結果と考察

### 1. ヒトの鉄吸収に関与する還元酵素の構造機能研究

ヒトで十二指腸 (duodenum)において食物からの鉄イオンが吸収される際には、腸管表面の細胞に入った鉄はまず、腸管上皮細胞膜上で Duodenal cytochrome *b* (Dcytb)という 6 回膜貫通型の還元酵素によって三価 ( $\text{Fe}^{3+}$ )から二価 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) に還元された後に、輸送タンパク質 Divalent metal iron transporter-1 (DMT-1) によって細胞内に取り込まれる。Dcytb の分子構造から鉄獲得の分子メカニズムを解明すること目的とし、結晶構造解析を進めている。大腸菌の発現系を用いて Dcytb の野生型および部位特異的変異体を作製し、結晶化条件の検討を行った。現在、約 6 Å分解能の X 線回折像を与える結晶が得られている。機能解析についてはストップフロー法を用いて Dcytb に含まれるヘム鉄の還元および再酸化の反応速度の測定を行った。

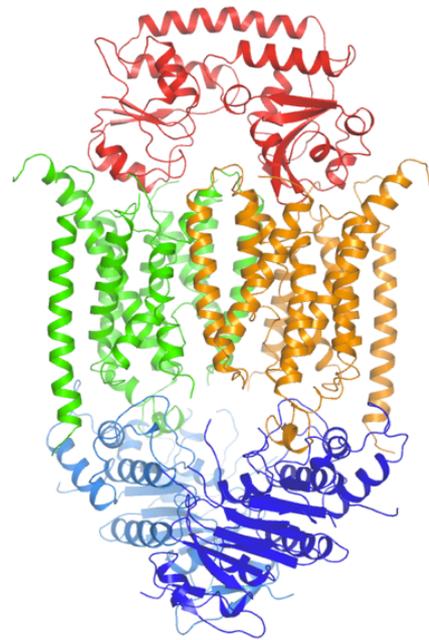
### 2. 病原菌由来ヘム輸送タンパク質（インポーター）の構造機能研究

病原菌がヘムを細胞内に取り込む際には、ATP の加水分解を利用して膜タンパク質 ABC トラン

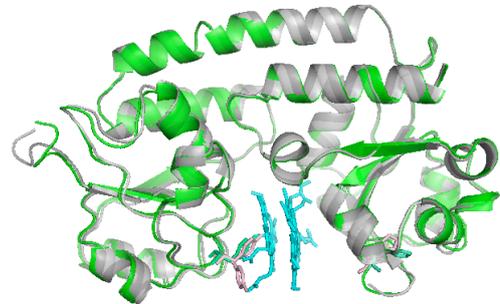
スポーター複合体（インポーター）が機能している。日和見病原菌の一種である *Burkholderia cenocepacia* 由来のヘムトランスポーター BhuUV-T の構造解析については、約 3.5 Å 分解能の X 線回折データが得られ、分子置換法による位相決定に成功した (Figure 3)。構造精密化を進めた結果、ヘム非結合型の構造であり、膜貫通領域のヘリックスの配置 (Figure 3 の緑、橙の部分) は細胞内側に大きな口を開けた状態をとっていることが解った。BhuT (Figure 3 の赤の部分) は可溶性のタンパク質であり、ヘムを運搬し、膜貫通サブユニット BhuUV (Figure 3 の緑、橙、青の部分) に受け渡す機能を果たしている。BhuT 単独での結晶構造解析により、ヘムと結合している 2 種類のホロ型構造に加えてヘムの結合していないアポ型構造を得た (Figure 4)。決定した複数の構造で観測された特徴の差異は、ヘムの結合に加えてトランスポーターへのヘムの受け渡しに関わる構造変化を反映していると推測される。変異体を用いた詳細な機能解析を行うと同時に、時分割分光測定ならびに分子動力学シミュレーションによって、ヘム取り込みの動的構造解析まで発展させる予定である。

### 3. 病原菌由来ヘム輸送タンパク質（エクスポーター）の構造機能研究

病原菌は、感染先から増殖に必要なヘムを取り込む一方で、過剰なヘムが強い細胞毒性を示す事から、それを細胞外に排出する解毒系も備えている。従来の生理学、遺伝学的研究に加えて、新たにこの解毒系膜タンパク質（エクスポーター）分子の構造機能を明らかにし、病原菌によるヘム排出の分子機序の解明をめざしている。ジフテリア菌由来のエクスポーター HrtBA タンパク質を研究対象とし、細胞・分子生物学的手法を用いて、ヘム排出の機能解析をおこなった。さらに、可溶化、精製した HrtBA を用いて、このエクスポーターが ATP の加水分解エネルギーを利用して細胞膜からヘムを排出する ABC 型のポンプであることを示した。現在、結晶化を試みている。



**Figure 3.** Crystal Structure of Heme Importer BhuUVT of Pathogenic Bacterium *Burkholderia cenocepacia* at 3.5 Å



**Figure 4.** Crystal Structures of Heme-bound (green) and -unbound (grey) Forms of isolated BhuT

# 時分割構造解析装置の開発と利用

久保 稔<sup>1</sup>, 木村 哲就<sup>1</sup>, 城 宜嗣<sup>1</sup>

理研・城生体金属科学<sup>1</sup>

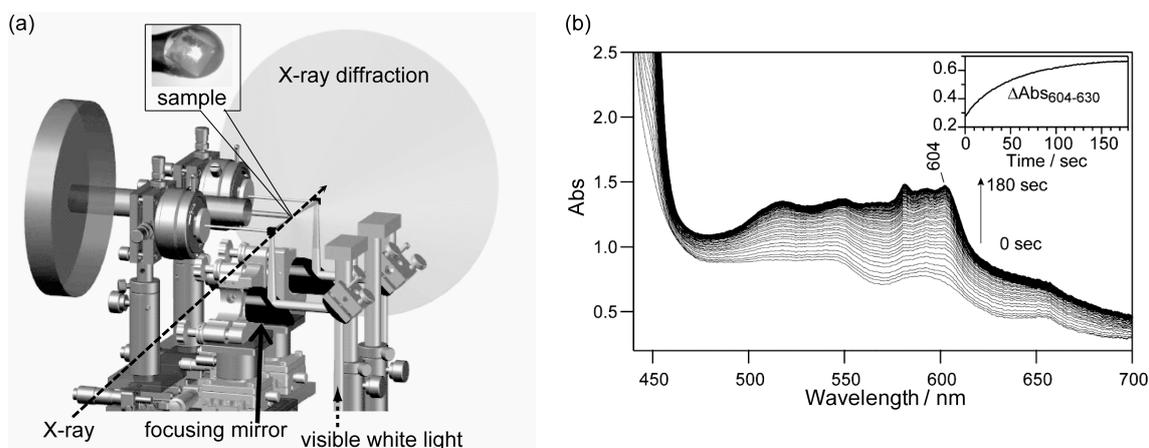
## 1. 緒言

タンパク質機能を真に理解するためには、X線結晶構造解析等で得られる静的な構造だけでなく、実際にタンパク質が機能している際の動いている構造（動的構造）の情報が必須である。本研究では、タンパク質の動的構造情報を得ることを目的に、SACLAを用いた時間分解X線結晶構造解析法の開発、ならびにその情報と相補的に利用できる時間分解分子分光測定装置（特に赤外分光装置）の開発を行っている。

## 2. 結果と考察

### 1. SACLAを用いた時分割X線結晶構造解析の基盤開発

SACLAを用いた時分割X線結晶構造解析では、タンパク質の単結晶にポンプ光（可視光パルスもしくは紫外光パルス）を照射することによって光反応を誘起し、その $\Delta t$ 秒後にSACLAからのフェムト秒X線パルスを照射して反応途中のタンパク質結晶からのX線回折像を取得する。さらに我々の実験では、フェムト秒X線パルスと同期したフェムト秒白色光（450~700 nm）を光源として、時分割可視吸収スペクトルを同時に取得する。可視吸収分光は、ポンプ光による反応効率の評価のほか、反応中間体の同定やそれらの存在比の解析に有用である。本年度は、X線回折と同軸・同時測定が可能な顕微可視吸収分光装置を開発した。この装置をSPring-8 BL26B2に設置し、チトクロム酸化酵素とNORに適用した結果、これらの金属酵素がX線照射によって還元される過程が、可視吸収スペクトルの変化を通してリアルタイムで観測された（Figure 5）。またX線回折像も可視吸収スペクトルと同時に取得でき、本装置の有用性が確認された。また、



**Figure 5.** (a) Optical layout of X-ray diffraction and visible absorption measurement system. (b) Absorption spectral change of oxidized cytochrome c oxidase under X-ray irradiation.

SACLA での時分割 X 線結晶構造解析を進めるにあたり、予備実験を行える時分割顕微可視吸収分光装置を開発し、SPring-8 側室に設置した。時分割 X 線結晶構造解析の第一の目標は、チトクロム酸化酵素の配位子光解離後の動的構造観測である。現在、時分割可視吸収実験を通して、その実験条件（温度、ポンプ光の偏光や強度）を検討している。

## 2. 時分割 X 線結晶構造解析との相補利用を目指した時分割顕微赤外分光装置の開発

赤外分光法は、機能部位（官能基）の電子状態・プロトン化状態の解析が可能であり、且つ結晶試料にも溶液試料にも適用できる分光法である。そこで我々は、SACLA を用いた時分割 X 線結晶構造解析との相補利用を目指して、フェムト秒赤外レーザーを用いた時分割顕微赤外分光装置を開発し、SPring-8 側室に設置している。本年度は、結晶マウント用赤外フローセルを開発した。このセルの流路はテーパー型をしており、結晶の厚みと流路の厚みが一致したところで結晶が固定される。フローする溶液を選択することで、様々な測定条件（酸化還元状態や配位子の有無）を制御可能である。このセルの有用性は、配位子光解離後のチトクロム酸化酵素結晶の時分割可視吸収スペクトル測定を通して確認された。また、本年度にフェムト秒赤外レーザーとマルチチャンネル赤外検出器が導入され、赤外分光装置の開発に必要な機器が揃い、赤外光学系を構築中である。

## 3. 時分割可視・赤外分光法による NOR の短寿命中間体の解析

NOR の反応機構を明らかにするためには、NO 結合型中間体や hyponitrite 中間体の化学構造の解明が必須であるが、それらの中間体は短寿命（サブミリ秒～ミリ秒）であるために、これまで観測が困難であった。そこで本研究では、高い時間分解能を実現できるフロー・フラッシュ測定システムを開発し、時分割可視・赤外分光実験に適用することで、短寿命中間体の化学構造の決定を目指した。フロー・フラッシュ測定では、紫外光パルス照射によるケージド NO からの NO 放出（ $\sim 50 \mu\text{s}$ ）で反応を開始する。試料は 1 パルス測定毎にフローによって交換される。本年度はマイクロ流路フローセルを開発し、フロー・フラッシュ時分割可視吸収測定を可能にした。現在、可視分光により NO 還元反応の中間体の同定を試みている。

# Post-transcriptional regulator Hfq binds catalase HP11:

## Crystal structure of the complex

Koji Yonekura, Masahiro Watanabe, Yuko Kageyama, Kunio Hirata, Masaki Yamamoto and

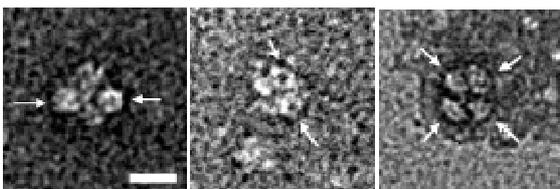
Saori Maki-Yonekura

RIKEN SPring-8 Center

The post-transcriptional regulator Hfq plays a key role in the survival of bacteria under stress. A small non-coding RNA (sRNA) DsrA is required for translation of the stationary phase sigma factor RpoS, which is the central regulator of the general stress response [1]. Hfq facilitates efficient translation of *rpoS* mRNA, which encodes RpoS. Hfq helps in the function of other specific proteins involved in RNA processing, indicating its versatility in the cell. However, structural information regarding its interactions with partners is missing.

HP11 is one of two catalases in *E. coli* and its mRNA is transcribed by an RNA polymerase holoenzyme containing RpoS, which in turn is under positive control of small non-coding RNAs and of the RNA chaperone Hfq. This sigma factor is known to have a pronounced effect on the expression of HP11 [2].

We obtained crystals of Hfq and HP11 complexes from cell lysates following attempts to overexpress a foreign membrane protein [3]. The overexpression probably increased stress, and likely promoted expression of catalase HP11 from the *katE* gene through RpoS. We identified the crystal contents as Hfq and catalase HP11 by peptide mass finger printing (PMF) MALDI-TOF analysis. EM observation showed large complexes with ring-like structure (Fig. 1), which corresponded to Hfq and HP11 complexes in sample solution. This observation supports the view that complex formation takes place prior to crystallization [3].

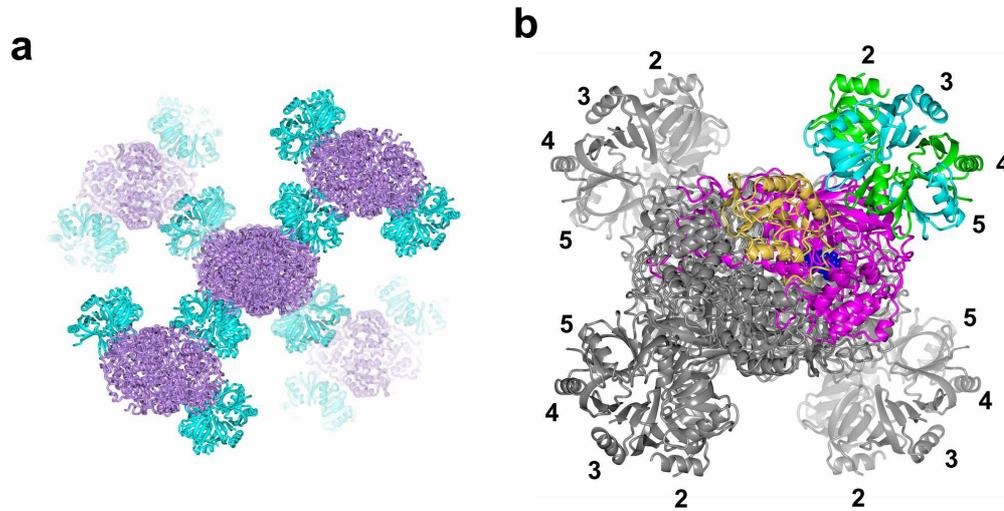


**Fig. 1.** Typical electron micrographs of complexes of endogenous Hfq and HP11 in *E. coli*, prepared with negative staining. Some ring-like structures with dimensions of 70 - 80 Å are indicated with arrows. The scale bar represents 100 Å.

We solved the crystal structure of the Hfq and catalase HP11 complex at 2.85 Å resolution by X-ray crystallography [3]. Diffraction data from the crystals were collected on a micro-focus beam line BL32XU of SPring-8 at a wavelength of 1 Å. X-ray diffraction from whole crystals showed high diffuse backgrounds and blurred diffraction spots. A focused beam with a dimension of  $1.6 \times 10 \mu\text{m}$  gave excellent patterns.

The crystal structure reveals that a Hfq hexamer binds each subunit of a HP11 tetramer (Fig. 2). Each subunit of the Hfq hexamer exhibits a unique binding mode with HP11. The hexamer of Hfq interacts via its distal surface. The proximal and distal surfaces are known to specifically bind different sRNAs, and binding of HP11 could affect Hfq function. Hfq-HP11 complexation has no effect on catalase HP11 activity. The complexation would suggest a negative-feedback system that down-regulates mRNA

translation by a stress-response protein itself when many products of the gene accumulate in the cell.



**Fig. 2.** Crystal structure of the Hfq and catalase HPII complex. **(a)** The crystal packing of the complex composed of Hfq hexamers in cyan and HPII tetramers in violet. All the four bound Hfq hexamers are displayed for the HPII tetramer at the center, whereas only two hexamers are displayed for each surrounding HPII tetramer for clarity. **(b)** Structure of one HPII tetramer with four bound Hfq hexamers showing interaction through their distal surfaces. Subunits of one Hfq hexamer are displayed in cyan and green. Numbers 2 - 5 indicate the subunit number in the Hfq hexamer as in Fig. 14. One molecule of the HPII tetramer is displayed in tan (the C-terminal lobe) and in magenta (the other parts). A space-filling model in blue represents heme. Other models are in grey.

#### [Reference]

1. A. Muffler, D. Fischer and R. Hengge-Aronis: "The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q $\beta$  RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*", *Genes Dev* (1996) **10**: 1143 - 1151.
2. M. R. Mulvey and P. C. Loewen: "Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests KatF protein is a novel a transcription factor", *Nucleic Acids Res.* (1989) **17**: 9979 - 9991.
3. K. Yonekura, M. Watanabe, Y. Kageyama, K. Hirata, M. Yamamoto and S. Maki-Yonekura: "Post-transcriptional regulator Hfq binds catalase HPII: crystal structure of the complex," *PLOS ONE* **8**, e78216 (2013).

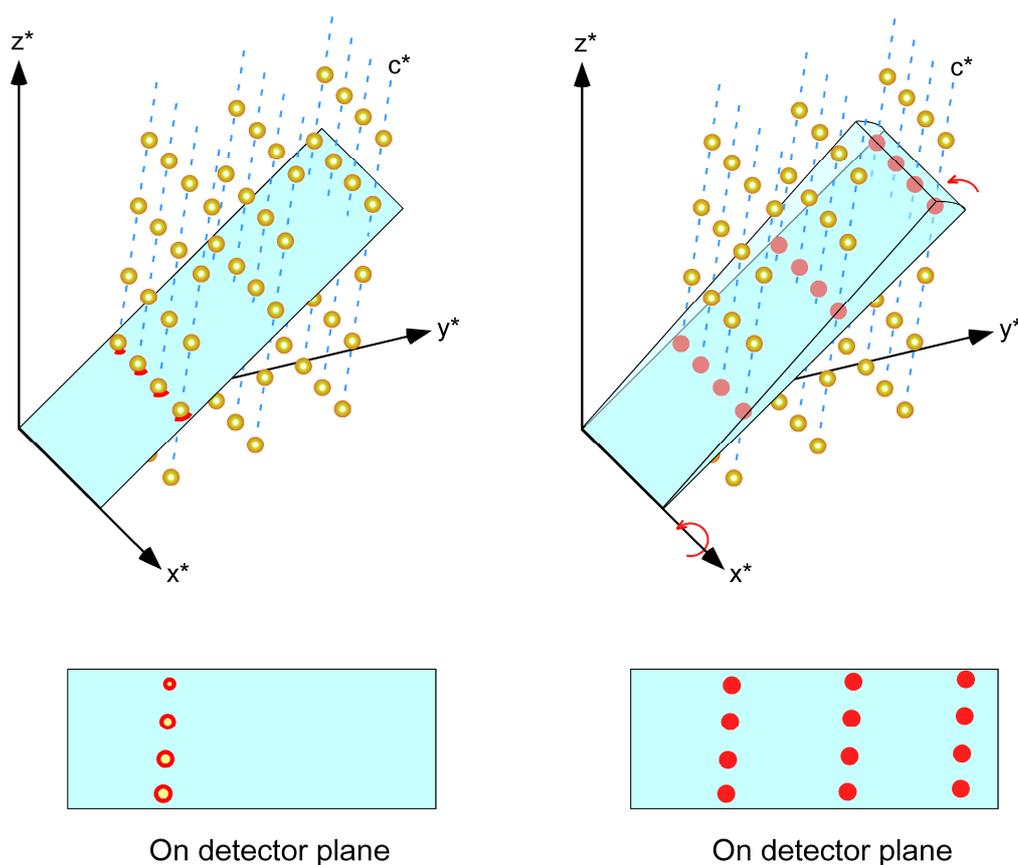
# Electron crystallography of thin 3D protein crystals

Koji Yonekura<sup>1</sup> and Chikashi Toyoshima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biostructural Mechanism Laboratory, RIKEN SPring-8 Center,

<sup>2</sup>Institute 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  $\mu\text{m}$  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 more than  $\sim 2 \text{ \AA}$  resolution, because the scattering power of light atoms for electrons is more than  $\sim 100,000$  times higher than that for X-rays. 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, which will unravel the working mechanisms of biological nano-machines in more detail.



**Fig. 1.** Schemes for recording electron diffraction patterns from a 3D crystal.

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 (left, Fig. 1). Crystals have to be rotated or oscillated to integrate diffraction spots mechanically (right, Fig. 1). It is a challenge for electron microscopy to control rotation of the specimen stage precisely and to process diffraction data from thin crystals. We have been developing a new technology to fulfill electron crystallography of thin 3D protein crystals.

We have succeeded in obtaining the first 3D Coulomb potential maps of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and catalase thin 3D crystals at 3.4 Å and 3.2 Å resolution, respectively.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is an integral membrane protein and transports  $\text{Ca}^{2+}$  against the concentration gradient by hydrolyzing ATP. Catalase is a heme-binding protein and decomposes toxic  $\text{H}_2\text{O}_2$  into  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$ . Atomic scattering factors of ions and neutral atoms for electrons show distinct values over spatial frequencies. Indeed, the Coulomb potential maps resolve charged states of amino-acid residues around the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites in the transmembrane region of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and around the heme binding site of catalase. The results clearly demonstrate that electron crystallography has great potential over X-ray, which cannot give such information.