分子システム生体チーム

(チームリーダー:城 宜嗣)

生体内の一酸化窒素動態:

一酸化窒素還元酵素の分子機構を中心に

當舎武彦¹、村本和優^{1,2}、澤井仁美^{1,2},大畠海人^{1,2},松本喜慎^{1,2}、山際来佳^{1,2}, 井上 雅^{1,2}、杉本 宏^{1,2}、城 宜嗣^{1,2} 理研・城生体金属科学¹,兵庫県立大・理²

生体中には一酸化窒素 NO を積極的に産生するシステムが2種類ある。一つは、哺乳動物細胞に おいて一酸化窒素合成酵素によってアルギニンを基質として産生され、NO 受容体(可溶性グア ニル酸シクラーゼ)に受け渡される系である。この NO がシグナル分子として機能し、哺乳動物 の様々な重要な生理機能に関与している。他の一つは、微生物の嫌気呼吸(酸素を使わない呼吸) の一種である脱窒過程である。脱窒は硝酸 NO₃⁻、亜硝酸 NO₂⁻を逐次還元して最終的に窒素分子 N₂まで変換する。亜硝酸還元酵素 Nir(Nitrite Reductase)は NO₂⁻を還元して NO を産生する酵素 であり、その強い細胞毒性を無毒化する為に、一酸化窒素還元酵素 NOR(Nitric Oxide Reductase) が NO を亜酸化窒素 N₂O に変換している。我々は、脱窒菌の NO 産生、輸送、消去の細胞システ ムを分子レベルで理解する事をめざしている。

1. 脱窒関連タンパク質の複合体形成と効率的連続反応場形 成

昨年度までに、NOを生成する NiR と NO を分解する cNOR が複合体を形成することを X 線結晶構造解析により発見し た。我々は、この複合体形成は、脱窒過程で NiR から NOR に NO を速やかに受け渡し、NO を細胞環境に拡散させずに、 効率良く分解するシステムであると提案した。本年度は、NiR と cNOR が溶液中でも相互作用しているのか検討するため に、プルダウンアッセイを行った。化学修飾により cNOR を ビーズに固定化し、緑膿菌からの抽出液を添加したところ、 NiR が cNOR と結合することがわかった(図1)。更に、詳し く溶液条件における NiR と cNOR の相互作用を調べるため に、アミノ酸置換による相互作用様式の解明を目指した。昨 年度に解明した NiR-cNOR 複合体の構造をもとに、複合体形



図 1 プルダウンアッセイ(NiR と cNOR の複合体形成を示す)

成に重要な役割を果たしているアミノ酸残基として、cNORのGlu119に着目し(図2)、いくつかの変異体を調製した。今後は、それら変異体とNiRの相互作用を検討する予定であり、 NiR-cNOR 複合体の機能的意義の解明を目指す。

NiR と cNOR の触媒反応には、電子供与体からの電子が必須である。NiR と cNOR が複合体を 形成した際に、どのようにして電子が NiR や cNOR に供給されるのか理解するために、NiR と cNOR に電子伝達タンパク質(チトクロム c551)もしくはブルー銅タンパク質アズリン

(Az))を加えた三者複合体の結晶構造解析に取り組んだ。結晶化条件を検討したところ、
NiR-cNOR-c551 および NiR-cNOR-Az のいずれの場合においても、結晶が得られた。
BL41XU@SPring-8 で X 線回折実験を行ったが、分解能は 10 Å 程度であり、構造決定には至って

いない。現在、より質の良い結晶を得るために、更なる結晶化 条件の検討を行っている。また、三者複合体だけでなく、NiR および cNOR 単体と電子伝達タンパク質の複合体の結晶化にも 取り組んでいる。一方で、このような電子伝達複合体形成に機 能的意義を評価するために、cNOR の c551 ならびにアズリン酸 化活性を測定した。c551、アズリンともに好気条件下で cNOR により酸化されることが観測された。今後、電子伝達効率の詳 細な解析を進めていく。



図2 NiR と NOR の接触界面

2. cNOR 変異体の調製

アミノ酸置換体を利用した機能解析が可能になるように、cNORの大腸菌を用いた発現系の構築に取り組んできた。その結果、精製試料に脂質を添加することで活性型の cNOR 組換え体が得られるようになった。しかし、活性部位の非ヘム鉄が亜鉛に置換された不活性型 cNOR が混在していることがわかり、更なる検討が必要であることが明らかとなった。活性型の cNOR 組換え体を得るために、東京大学農学部の新井博士との共同研究として、緑膿菌を使った cNOR の発現系の構築に取り組み始めた。脱窒条件(硝酸存在下、嫌気条件)での生育実験から、緑膿菌の cNOR 破壊株に、cNOR の発現プラスミドを導入することで、組換え型 cNOR が発現することを確認できた。今後は、緑膿菌から組換え型 cNOR を単離する方法を確立するとともに、アミノ酸置換体 cNOR の発現に取り組む予定である。

3. 病原菌由来 qNOR

病原菌がヒトに感染すると、ヒトの免疫系一酸化窒 素合成酵素が NO を産生し、病原菌を殺菌する。これに 対し、病原菌は、NOR を利用することで、NO の無毒 化し、ヒトの体内で生育をはかる。そこで、将来的な 創薬の可能性も視野に入れ、病原菌由来 qNOR に注目 した。昨年度は、髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* 由来 qNOR の発現・精製に成功し、今年度は、その機能解析 を行った。ストックホルン大学 Pia Ädelroth 博士との共 同研究で、*N. meningitidis* 由来 qNOR が細胞膜の内側か らのプロトンを利用し NO 還元を行っている可能性が





示唆された。現在、プロトン輸送経路に存在すると予想されるアミノ酸の変異体を準備している。 また、NOの輸送経路と予想される疎水性チャネルの変異体(Val489 変異体)が NO 還元活性に 影響することも明らかとなった(図3)。こちらも更なる変異体解析を進め、Val489 の役割を明 らかにする。更に、本試料のX線結晶構造解析にも着手しており、再現よく結晶が得られる条件 をみつけており、低分解(6.5Å)ではあるが電子密度が得られている。また、共鳴ラマン分光測 定による活性部位の構造解析にも取り組んでいる。

タンパク質の短寿命反応中間体の構造・電子状態解析: 時分割X線構造ならびに赤外分光解析基盤の確立

久保 稔¹,木村哲就¹,當舎武彦¹,石井頌子^{1,2},西田拓真^{1,2},城 宜嗣^{1,2}

理研·城生体金属科学¹,兵庫県立大·理²

生体内の化学反応を、関連するタンパク質の構造を基盤に電子・原子レベルで理解する為には、 反応に伴うタンパク質の構造の時間変化(動的構造)と、反応中に超短時間だけ現れる中間体(短 寿命反応中間体)の構造・電子状態の情報が必須である。これらを解析可能な装置・解析技術を 開発している。

1. 時分割 X 線結晶構造解析および時分割赤外分光法の基盤開発

本研究では、 XFEL(X線自由電 子レーザー)を用い た時分割 X 線結晶 構造解析とフェム ト秒赤外レーザー を光源として用い た時分割赤外分光 法を併用して、機能 部位の化学反応を 原子・電子レベルで 追跡できる基盤技 術を開発している。 赤外分光は、機能部 位(官能基)の電子 状態・プロトン化状 態の解析を可能と するため、X 線結晶



図 1 時分割赤外分光装置.時間分解能はポンプレーザーのパルス幅に依存 して 10 ナノ秒. Pol: polarizer, BS: beam splitter, λ/2: half waveplate.

構造解析との相補的・協調的な利用が期待される。時分割測定では、ポンプ光の照射により試料 に光反応を誘起し、そのΔt 秒後にプローブ光(XFEL パルスもしくはフェムト秒赤外パルス)を 照射して、反応中間体を解析する(ポンプ-プローブ法)。昨年度は、時分割 X 線結晶構造解析 を実現するために、X 線回折計と共存可能なポンプ光光学系および可視吸収同時測定装置を開発 した。本年度は、時分割赤外分光装置を開発した(図1)。高輝度赤外レーザー光源のビーム径 は、試料上で約100 μm であり、タンパク質水溶液試料はもちろんタンパク質単結晶へも適用可 能である。任意の遅延時間における計測の自動化を自作の LabVIEW プログラミングによって実 現した。

これら装置の適用例として、本年度は以下の実験および開発を行った。

(1) ナノ秒 Nd-YAG レーザー(532 nm)によって励起される、溶液状態でのミオグロビン Mb の

CO 再結合反応に伴う、CO 伸縮振 動の回復とタンパク質主鎖である ペプチド結合の構造変化に由来す るアミドIバンドの時間変化の観察 に成功した(図2)。

(2) チトクロム酸化酵素の配位子 光解離後の時分割赤外吸収スペク トルを測定し、結晶中での配位子ダ イナミクスを明らかにした。時分割 X線結晶構造解析は、2015年2月 に SACLA で行う計画である。

(3) タンパク質の短寿命反応中間 体の構造・電子状態を解析すると同 時に、その後の反応を追跡するため には、1 ms 以上の時間窓を高い分 解能で計測する必要がある。昨年度 までにフロー・フラッシュ法の測定 装置を構築したが、市販のシリンジ



図2 ミオグロビンの CO 再結合反応における CO 伸縮振動とア ミド I バンドの時間変化

ポンプを使用したため試料交換が連続的に起こっており、励起された試料はせいぜい 1ms までし か観察点に滞在できなかった。そこで、ポンプ光およびプローブ光の照射のタイミングと同期し て溶液交換を駆動可能なステップパルス・シリンジポンプを作製した。この装置を Mb への NO 結合反応に適用し、10 ms までの時間領域での測定が可能となったことを確認した。

2. 脱窒微生物の一酸化窒素還元酵素の反応機構解析への適用

微生物の嫌気呼吸の一種である脱窒では、鉄Fe含有 タンパク質である一酸化窒素還元酵素 NOR が、細胞毒 性の高い一酸化窒素 NO を速やかに無毒化している。 その酵素反応は、N-O 結合の開裂と N-N 結合の生成を 含み、その反応機構解析は化学的に非常に興味深い。 その機構確立には、短寿命反応中間体の構造と電子状 態の情報が必須である。

脱窒カビ由来と脱窒菌由来の2種類の NOR が知ら れている。脱窒カビ NOR の反応中間体は、Fe³⁺-NO型 酵素が NAD(P)Hにより二電子還元された[Fe³⁺-NO]²⁻型 酵素と提案されている。本年度は、反応前(休止状態) の酵素の 1.1 Å 分解能の結晶を得ることに成功し(図 3)、その一方で、結晶試料への NO 添加法も検討した。 NO 結合型酵素の生成には、光照射により約 10 μs の時 定数で NO を発生する化合物(ケージド NO)を用い、



図 3 脱窒カビ NOR の酸化型結晶の 1.1 Å 分解能の電子密度図(2Fo-Fc). SPring-8 にて回折データを収集.

この方法が常温において有用であることを可視吸収分光によって確認した。今後は、[Fe³⁺-NO]²⁻型中間体のX線結晶構造解析および赤外分光解析に先立ち、まずはXFELを用いてFe³⁺-NO型のX線結晶構造解析を行う計画である。過去にSPring-8を用いてFe³⁺-NO型の構造解析がなされたが、X線損傷の影響が疑われた。XFELを用いれば、フェムト秒X線のシングルパルス照射で、X線損傷が起こる前の回折像撮影が可能である。2015年2月にSACLAでFe³⁺-NO型の無損傷構造解析を行う計画である。

一方の脱窒菌 NOR は、脱窒カビ酵素と同じ反応を触媒するが、構造は全く異なっており、活

性中心に2分子の鉄を含む膜内在性の 酵素である。 脱窒菌 NOR の反応機構を 明らかにするためには、2分子のNOの 鉄への配位様式の解明とその後に起こ る反応過程の直接観察が鍵となる。し かし、NO 結合型中間体はきわめて短寿 命(ミリ秒以内)であり、酵素反応の ターンオーバーから推定される反応時 定数は数ミリ秒であるため、これまで 直接観測が困難であった。本研究では まずは時分割赤外分光法の適用によ り、脱窒菌 NOR の NO 結合型中間体の 配位構造解析を目指した。時分割測定 ではケージド NO を用い、マイクロ流 体フローで試料交換をしながらポン プ・プローブ測定を行う(フロー・フ ラッシュ法)。反応の速度論を解明す る為にフロー・フラッシュ法を可視吸 収分光に提供した結果、数マイクロ秒 で NO 結合型が生成し、数十マイクロ 秒およびミリ秒の2相で酸化型(終状 態)に至ることが示唆された(pH 7、 20°C) (図4)。現在、詳細な解析を 進めると同時に、NO 結合型中間体の観 測に適した実験条件(pH、温度)を検 討中である。さらに、今後はケージド NO の光分解により適したエキシマレ ーザー (308 nm) と赤外分光装置を組



図4 ケージド NO 光分解後の cNOR のフロー・フラッシ ュ時分割可視吸収スペクトル (pH 7.0, 20°C). 還元型との 差を表示.フローの流速は 10 µl/min であり,各スペクト ルは 20 秒積算(0.4 mM 濃度,3.3 µl 体積)で取得した.ケ ージド NO の光分解には,337.1 nm のナノ秒パルスを用い た(3 ns, 10 Hz, 20 µJ).

み合わせ、各反応相においてどのような NO 結合型中間体が形成しているかを明らかにする。

鉄の生体内動態システム

杉本 宏^{1,2},澤井仁美^{1,2}、富樫ひろ美¹、中村 希^{1,2},倉智彩夢^{1,2}、武田英恵^{1,2}、 結城 力^{1,2}、久野玉雄¹、中村寛夫¹,城 宜嗣^{1,2}

理研·城生体金属科学¹,兵庫県立大·理²

鉄はすべての生物の生命維持にとって、必須の微量元素である。生物は、外部から鉄を取り入 れ、輸送、感知、貯蔵などの連環システム(鉄動態とよぶ)によって、例えば鉄含有タンパク質 の活性中心として活用している。我々は、ヒトと病原菌の鉄動態を、関連するタンパク質(多く は膜タンパク質)の構造を基盤に理解することをめざしている。

1. 病原菌のヘム取込みトランスポーターの分子機構解明

病原菌が宿主(ヒト)へ感染してさらに増殖していくには、ヒト赤血球中のヘモグロビンか らヘム(鉄ポルフィリン

錯体)の形で鉄イオンを 獲得することが必要と なる。グラム陰性病原菌 の内膜では、ABC トラ ンスポーターに属する 膜タンパク質複合体が ヘムを細胞内へと膜輸 送する (ヘムインポータ ーと呼ぶ)。本研究で研 究対象とする日和見感 染に関わる病原菌 Burkholderia cenocepacia のヘムインポーター BhuUV-T では、ペリプ ラズムにおいてヘム輸 送を仲介する可溶性タ



図 1 ヌクレオチド非結合型のヘムインポーター の全体構造 (左) BhuUV-T(右) BhuUVの構造のリボン図

ンパク質であるペリプラズムヘム結合タンパク質(BhuT)、2つの膜貫通サブユニット(BhuU) と細胞質でATPを結合する2つのヌクレオチド結合サブユニット(BhuV)の複合体が、ヘム膜 輸送を担っている。ATPの結合やその加水分解が引き起こすトランスポーターの構造変化がヘム を輸送する駆動力になっていると考えられているが、その詳細なメカニズムやヘムの認識の仕組 みは明らかにされていない。我々は、生化学的な解析および輸送反応の各ステップの状態でのX 線構造解析を基盤に、ヘム輸送の分子メカニズムを明らかにする事を目的にしている。

今までに、BhuT 単独とヌクレオチド非結合型 BhuUV-T 複合体(分解能 3.2 Å、R=26.8%、 free-R=31.7%)の構造を決定していた。本年度は、BhuUV 複合体の結晶化にも成功し、2.8 Å分 解能のデータを収集した。BhuUV 複合体の主鎖構造は BhuUV-T 複合体のものと似ており(図1)、 いずれも膜貫通サブユニットを形成する合計 20 本のヘリックスが細胞質側に開いた状態(内向 き)であった。このことは、BhuT の解離は膜貫通ヘリックスの大きな構造変化(内向き→外向 き)を引き起こさない事を示している。すでにペスト菌由来のヘムインポーターが細胞外側に開 いた構造であることが報告されており、これに加えて今回得られた BhuUV の構造は、ヘム輸送 におけるインポーターのもう一つの休止型の構造と考えられる。今後は ATP 類縁体との複合体 の立体構造解析と得られた三次元構造を基盤にした変異体実験や時間分解分光解析を計画して いる。

2. 病原菌のヘム排出トランスポーターの分子機構解明

遊離へムは細胞毒性をもつために、病原菌はインポーターで取り込んだへムが過剰となる と、ヘム特異的排出ポンプ(HrtBA エクスポーター)によってヘム毒性を解毒することが近年 判明した。ヘム排出ポンプは膜貫通サブユニット HrtB と ATPase サブユニット HrtA からなる ABC トランスポーターであるが、遺伝子情報があるのみで、輸送タンパク質として構造や性状 は依然不明のままである。ヘム排出ポンプ遺伝子を欠損した病原菌では外来のヘムに対して感受 性になることから、細胞表層にあるタンパク質として新しい薬剤のターゲットとなる可能性を含 んでいる。

本研究では細菌におけるヘム毒性とそれを回避する 排出ポンプの分子を理解する目的で以下の研究をおこな った。大腸菌 K12 株は生化学、分子生物学研究のモデル細 胞であるが、外膜にヘム透過能がない。そこで、大腸菌 O157 の外膜ヘムチャンネル ChuA を発現させることによ り、ヘム毒性やヘム輸送を評価できるモデルシステムを構 築した。このモデル大腸菌はヘムに対し感受性を示し、



図2 モデル大腸菌を用いたヘムお よび各種金属ポルフィリンの排出ポ ンプ活性測定

HrtBAを発現させることでこれらの毒性は回避された(図2)。このモデル大腸菌を用いて、各 種金属ポルフィリンを輸送基質として用いた結果、それらはアロステリックあるいは非アロステ リックな輸送基質として分類された。

この組換え大腸菌から HrtBA タンパク質を可溶化・精製した後、ATPase 活性を調べた。 さらに、ATP 有無の条件下での HrtBA におけるヘムの可視吸収スペクトルの経時変化の測定結 果を加えて、作業仮説として HrtBA によるヘム排出の分子機構を提案した。分子機構を確立す るために X 線結晶構造解析に向け、単結晶を作製している。

3. ヒト小腸での鉄の吸収に関わる鉄還元タンパク質の構造機能解析

ヒトの体内の過剰な鉄は、活性酸素産生の主原因となり、がんや神経系の疾患を引き起こす ことから、生体内での鉄の恒常性維持は重要である。しかし、鉄吸収の分子レベルでの機構解明 はほとんど進んでいない。ヒトは、食餌中の鉄を十二指腸で吸収するが、その際、鉄還元タンパ ク質 Duodenal cytochrome *b*₅₆₁ (Dcytb)と二価の金属イオン輸送タンパク質 Divalent metal transporter (DMT-1)が関与していることは分かっている。DMT-1 は二価金属イオン特異的なトランスポータ ーである。しかし、食餌由来の鉄はおおむね酸化型 Fe³⁺であるため、Dcytb が Fe³⁺から Fe²⁺に還 元している。Dcytb は細胞膜を介した電子移動反応を行う鉄含有膜タンパク質であり、分子中に 2 つのヘムを有し、細胞内側のアスコルビン酸から電子を受け取り膜の外側の食餌由来の Fe³⁺を Fe²⁺に還元している。本研究では Dcytb による鉄還元機構を結晶構 造解析およびストップトフロー法 による機能解析から明らかにする 事めざしている。

Dcytbは、種々の界面活性剤を 用いて可溶化した状態での結晶 化、モノクローナル抗体との複合 体の結晶化、脂質メソフェーズ法

(LCP 法)を用いる結晶化などを 試みているが、未だ構造解析に適 した結晶は得られていない。今後 はさらに結晶化条件を展開し、構



図3 Dcytb の還元速度のアスコルビン酸濃度依存性。4 相性を 示す

造決定に適した結晶の作製をめざす。また、ストップトフロー法を用いて Dcytb とアスコルビン 酸の電子授受の反応速度論的解析を行った。Dcytb に対して1等量から2500等量までのアスコル ビン酸との反応を測定・解析したところ、アスコルビン酸濃度依存を示す4つの成分が含まれて いることが明らかになった(図3)。今後は、この4相の意義を明らかにするために、アスコル ビン酸結合部位と予想されるアミノ酸残基を変異させた変異体を用いて同様の測定を行う計画 である。

4.後生動物におけるヘム輸送の分子機構解明

我々は食物から摂取したヘムや体内で生合成あるいはリサイクルしたヘムを獲得して利用 している。したがって、生体内にはヘムを輸送するシステムが存在すると推定されていたが、そ れに関わる分子が同定されておらず、生体内ヘム動態は全く未解明のままであった。近年、後生 動物の生体内ヘム動態に関わるタンパク質として HRG (heme-responsive gene) タンパク質群が、 ヘム栄養要求生物である線虫 *C.elegans* の遺伝子解析により同定された。小胞中から細胞質にヘ ムを取り出すヘムトランスポーターHRG-1、ヘムを細胞間輸送するタンパク質 HRG-3、ヘムを細 胞質に輸送するためのヘムインポーターHRG-4 などが同定されている。HRG-1 はヒトや家畜を 含む脊椎動物にも存在するが、HRG-3 と HRG-4 は回虫・寄生蠕虫・寄生原虫などのヘム栄養要 求生物だけに存在する。本研究では、*C. elegans* 由来 HRG-3 と HRG-4 を研究対象としている。

大腸菌組換えにより、HRG-3を安定かつ高純度に調製する方法を確立した。ヘミン滴定実験 により、HRG-3は2分子あたり1分子の酸化型ヘムを結合することが明らかになった。CDスペ クトル測定により、酸化型ヘムの結合/非結合に関わらず、HRG-3はαヘリックスを含有した二 次構造を有していることを明らかにした。今後、還元型ヘムの結合とそれに伴う二次構造の変化 について検討する。

出芽酵母 S. cerevisiae の遺伝子組換えにより、HRG-4 を大量かつ安定に発現させる方法を確 立した。今後は、X線結晶構造解析のための結晶調製を目標に、HRG-4 を高純度に精製する方法 を検討する。また、組換え HRG-4 の機能解析のために、ヘム生合成遺伝子欠損株 hem1Δ (S. cerevisiae の変異株)を用いた機能解析システムを構築した。HRG-4 によるヘム輸送の駆動力を明 らかにするために、今後はこれらの in vivo システムを用いて変異体解析を行う予定である。

酸素センサータンパク質による

分子内および分子間シグナル伝達機構の解明

澤井仁美^{1,2},佐伯茜子^{1,2},中村寛夫¹,城 宜嗣^{1,2}

理研·城生体金属科学¹,兵庫県立大·理²

生物は環境中の酸素濃度に適応するために、周囲の酸素濃度を感知するシステム「酸素セン サータンパク質」を有している。好気性生物にとって、酸素O,は生体エネルギー獲得と物質変換 に必要不可欠な分子である。一方で、高濃度の酸素は活性酸素種の発生源となり、細胞毒として 機能する場合もあるため、環境中の酸素濃度に対応するように生理機能を調節している。また、 嫌気性生物においても、酸素の有無は生存圏と生存手段の決定に強く関与している。

本研究では、マメ科植物の根に共生する根粒菌に存在する酸素センサータンパク質システム FixL/FixJを研究対象としている。根粒菌は、大気中の窒素を還元してアンモニアを生成する (窒 素固定)反応をすることで有名であるが、FixL/FixJは環境中の酸素濃度を識別感知し、それに伴 って窒素固定酵素ニトロゲナーゼの発現を遺伝子レベルで制御することが明らかになっている。 FixL/FixJは、細菌やカビから高等植物まで普遍的に存在する細胞内情報伝達系「二成分情報伝達 系」に属する酸素センサータンパク質システムである。二成分情報伝達系は、「センサーヒスチ ジンキナーゼHK」と「レスポンスレギュレーターRR」の2種類のタンパク質で構成され、外部刺 激を識別感知するHKの「センサードメイン」が外部からの刺激(栄養物質・酸素・ホルモン・浸 |透圧・光など| を識別感知して、それに応じてHK「触媒ドメイン」によるリン酸転移を通して特 定の生理機能を遺伝子レベルで制御する。

根粒菌の酸素センサーシステムでは、FixL がHK、FixJ がRR に相当する。FixL センサード メインにはヘム(鉄ポルフィリン錯体)を含み、鉄への酸素の吸脱 着がニトロゲナーゼの遺伝子発現を制御している。FixLおよびFixJ の各ドメインの構造は明らかになっているが、FixL全体構造、 FixL/FixJ複合体構造ならびにセンシング時の動的構造は明らかに なっていないため、FixLにおける酸素の結合/解離が、どのように 触媒ドメインに伝わるのか?(分子内情報伝達)」「FixLからFixJへ どのようにリン酸基が転移するのか?(分子間情報伝達)」に関し ては全く情報がない。本研究は、これらの問題を分子・原子のレベ



ルで解明することを目的とする。今年度は、大腸菌組換えにより、ダイズ根粒菌Bradyrhizobium japonicum由来FixLとFixJを全てのドメインを含む全長で安定かつ大量に高純度標品を調製する 方法を確立し、鉄の様々な状態(図)でのリン酸転移活性を測定した。X線結晶構造解析による 立体構造解析を行うために必要な結晶の調製を目指して、結晶化条件のスクリーニングを行い、 FixLの初期微結晶を得た。さらに、FixL/FixJシステムによる酸素センシング時の動的構造変化を 明らかにする目的で、X線溶液散乱測定を開始した。現在、予備的なデータ収集により、FixL精 製標品がX線小角散乱測定に適していることを確認できている。今後は、X線結晶構造解析とX 線溶液散乱共に、FixLのリガンド結合型、ATPアナログ結合型、さらにFixJの共存などの条件で の測定を試みる。

金コロイド粒子を利用した

生体粒子の高分解能コヒーレントX線回折イメージング法の開発

高山裕貴¹,眞木さおり², 苙口友隆³,中迫雅由³,米倉功治¹ 理研 RSC・米倉生体機構研究室¹,理研 RSC・生物試料基盤グループ²,慶應大・理工²

コヒーレントX線回折イメージング(CXDI)はレ ンズレスイメージング法の1つであり、X線の高い透 過性と短波長性により、電子線が透過しないµmサイ ズの試料「丸ごと」の内部構造を、レンズ収差による 像のぼけや歪みも無く、光学顕微鏡より高い分解能で 可視化可能である。細胞生物学においては光学顕微鏡 と電子顕微鏡での観察で蓄積された知見のギャップ を埋める成果が期待されている。

CXDI法では、孤立した非結晶試料にコヒーレント X線を照射して生じる Fraunhofer 回折パターンを、2 次元検出器上で Nyquist 周波数より細かくサンプリン グして観測する(図 1)。この回折パターンに反復的位 相回復法と呼ばれる計算アルゴリズムを適用するこ とで試料の投影電子密度像を再生する。高分解能での イメージングには、低空間周波数から高空間周波数ま での広い回折角範囲で回折パターンを観測する必要 があるが、回折 X線強度は回折角が大きい程急速に減 衰する。特に細胞のように炭素や窒素、酸素といった 軽元素から構成される試料は、金属粒子に比べて散乱



図1 XFEL を光源とした CXDI 実験。炭素 薄膜上に測定対象試料を散布した試料上に XFEL パルスを照射し、回折パターンを2次元 検出器で記録する。XFEL 被照射範囲はX線回 折後に爆散するため、試料を移動させながら回 折パターンを収集する。回折パターンの極小回 折角領域は試料を透過した X線から検出器を 保護するビームストップにより観測できない。

断面積が著しく低く、イメージングには非常に強いコヒーレントX線が必要とされる。近年利用 が可能となったコヒーレントパルスX線光源であるX線自由電子レーザー(XFEL)は、フェムト 秒の極短時間に光子密度10¹⁰~10¹¹/µm²/pulseという強力なX線の照射を可能とし、試料は原子 レベルで破壊されるものの、X線照射による損傷が生じる前の一瞬の姿を30~60 nmの分解能で 可視化することが可能となってきている。

しかし、分解能のさらなる向上には生体試料の回折能の低さが依然として大きな障壁となって いた。また、従来の位相回復法に重要な試料概形情報を有する小回折角領域は、検出器保護のた めに置かれるビームストップにより観測できないため、測定条件によっては安定に正しい像が再 生できないという問題があった。

そこで我々は、CXDI法の基本原理でもある X 線の干渉現象に着目し、生体試料と同時に X 線 回折能の高い多数の金粒子をイメージングするという新たな測定・解析法を考案した(図 2)。こ のとき観測される回折パターンには、生体試料と金粒子それぞれで回折された X 線の干渉項が含 まれる。金粒子の単位体積当たりの散乱断面積は生体試料の 10 倍程度高いため、生体試料由来 の回折シグナルを測定可能レベルまで効果的に押し上げることができ、高分解能情報を有する大



図 2 新手法の試料モデルと計算機実験で得られた回折 パターン。新手法では測定対象試料(バクテリア)の周囲に 金粒子を多数散布した試料(a)を作製し、XFEL を照射す る。この試料から計算される回折パターン(b,右)では、 バクテリアのみ(b,左)に比べて 2 倍以上の広い回折角で 強強度の回折パターンが観測された。回折パターンは端 で約 14 nm の構造情報を有している。(c)は回折パターン 赤線上の回折強度をプロットしたもので、全回折シグナ ルを青の実線、金粒子由来を黄の破線、バクテリア由来 を緑の実線、両者の干渉によるシグナル(絶対値)を赤の実 線で示した。干渉効果によりバクテリアの回折シグナル がおよそ1桁押し上げられたことが確認できた。

きな回折角のシグナルまで観測可能となる。また、個々の金粒子からの回折 X 線が干渉し合うこ とで、回折パターンには金粒子間の相対位置の情報が含まれており、その Fourier 変換で得られ る投影電子密度の自己相関関数を解析することで金粒子の配置が導出される。こうした操作は、 分子の構造解析法として成熟した X 線結晶構造解析法において、重原子法として広く行われてい る手法に類似したものである。そこで、我々は重原子法に用いられるアルゴリズムを組み込んだ 独自の解析ソフトウエアを開発して、回折パターンから導出された金粒子配置を既知の試料情報 として位相回復計算に利用する新たな試料像再生法を開発し、従来に比べて信頼度の高い試料像 の再生を試みた。

以上の理論の実証に向けて、我々は SACLA での CXDI 実験を基に、べん毛を有するバクテリ アを模した試料での計算機実験を行い、金粒子によってバクテリアの回折シグナルをおおよそ1 桁強められることを確認した(図 2)。また、開発した新規試料像再生法を回折パターンに適用す ることで、従来法の2倍以上の分解能で投影電子密度像を再生することに成功した(図 3)。この 投影電子密度像では、従来法では困難な、金粒子の僅か1%の投影電子密度しかないバクテリア の細胞の周囲のべん毛まで再現性良く可視化することができた(図 3)。

バクテリア+金粒子群(新手法)

バクテリアのみ(従来法)



図 3 従来法と新手法で再生された投影電 子密度像の比較。従来のバクテリアのみで イメージングされた投影像(左)に比べて、 新手法で再生されたバクテリア投影像(右) では、バクテリア内外のべん毛まで精緻に 再生されていることが分かる。新手法での 再生像の分解能を計算すると 13 nm であ り、従来法の 29 nm に比べて 2 倍以上の向 上に成功した。

【参考文献】

[1] Takayama et al., Scientific Reports, in press.

Electron crystallography of thin 3D protein crystals: atomic model with charges

Koji Yonekura¹, Kazuyuki Kato², Mitsuo Ogasawara³, Masahiro Tomita^{4, 3}, Chikashi Toyoshima³

¹ Biostructural Mechanism Laboratory, RIKEN SPring-8 Center,
² Hitachi High-Tech Fielding Corporation
³ Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo
⁴ Hitachi High-Technologies Corporation

Protein atoms scatter electrons 4 - 5 orders of magnitude more strongly than they do X-rays, thus allowing individual protein molecules to be imaged by electron microscopy. Though not fully exploited so far, electron protein crystallography has great potential and indeed has yielded superb high-resolution (~ 2.0 Å resolution) atomic structures from 2D crystals. However electron crystallography of 3D crystals is problematic as stacking of even a few layers makes diffraction patterns discrete in all directions, and methods developed for conventional electron crystallography of 2D crystals are not useful. This problem can be overcome, however, by developing an electron diffractometer that allows the intensities of diffraction spots to be integrated spatially by rotating the crystal, similarly to the rotation camera used for X-rays.



Fig. 1. Atomic scattering factors and theoretical maps. (A) Atomic scattering factors for 300 keV electrons based on values from International Tables for Crystallography. (B) Scattering factors for X-rays. Scattering factors for X-rays are much less affected by the charged state compared with those for electrons.

Another important feature of electron scattering is that the diffraction pattern formed by elastically scattered electrons is directly related to the distribution of Coulomb potential. This is in marked contrast to X-rays, which, because they are scattered by electrons, yield an electron density map. Coulomb potential maps may be more difficult to interpret, when compared with electron density maps by X-ray crystallography, as the appearance of the same residues may differ depending on their charged state, resolution and surrounding environment, but they provide unique information, not attainable by X-rays. The features of Coulomb potential maps result from the fact that atomic scattering factors for electrons vary considerably over a range of spatial frequency depending on the charged state (Fig. 1A) and can become close to zero or even negative (e.g. for O⁻, Fig. 1A). An advantageous consequence is that it is possible to determine experimentally the charged states of protein residues and metals. As proteins use metals of different ionic states for many purposes, notably for catalysis and electron transfer, information on the charged state of metals and amino acid residues can be critical in understanding protein function.

We obtain the Coulomb potential maps at 3.4 Å and 3.2 Å resolution, respectively, of Ca^{2+} -ATPase and catalase obtained from ultra-thin (just a few layers thick) crystals using a new electron diffractometer. These maps demonstrate that it is indeed possible to build atomic models from such crystals and even to determine the charged states of amino acid residues in the Ca^{2+} -binding sites of Ca^{2+} -ATPase and that of the iron atom in the heme in catalase.

[Reference][1] Yonekura *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, accepted.