# 分子システム生体チーム

(チームリーダー:城 宜嗣)

### 一酸化窒素の生体内動態システム

當舎武彦<sup>1</sup>、村本和優<sup>1,2</sup>、澤井仁美<sup>1,2</sup>、北西健一<sup>1</sup>、大畠海人<sup>1,2</sup>、松本喜慎<sup>1,2</sup>、 山際来佳<sup>1,2</sup>、結城 力<sup>1,2</sup>、岡本拓也<sup>1,2</sup>、風間翔太<sup>1,2</sup>、武田真梨子<sup>1,2</sup>、細川寛大<sup>1,2</sup>、 杉本 宏<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·理<sup>2</sup>

一酸化窒素NOは、生体内においてシグナル分子として機能し、種々の生理反応に関わると いう正の側面をもつ。一方で、NOは反応性が高く生体分子の修飾などを経て細胞損傷を引き起 こすという負の側面も持つ。それゆえ、生体にはNOの細胞内動態を制御する巧妙なシステムが 存在すると考えられる。本研究では、このような生体分子システムの理解のために、生体反応系 としてNOの生成と分解が含まれる脱窒に注目した。脱窒とは、微生物が嫌気下で生きていくた めのエネルギーを得るための嫌気呼吸(酸素分子を用いない呼吸)の一種であり、硝酸を段階的 に還元し窒素分子を生成する。NOは、脱窒の中間生成物として亜硝酸還元酵素(NiR)により 生成されるが、その細胞毒性を無毒化するために一酸化窒素還元酵素(NOR)により速やかに亜 酸化窒素へと変換される。我々は、NORを中心としたNOの効率的な分解システムの分子レベル での解明を目指している。

#### 1. 緑膿菌をホストとしたチトクロムc依存型NORの発現系とin vivo機能解析系の構築

NORは、2当量のプロトンと電子を用い、2分子のNOから亜酸化窒素N<sub>2</sub>Oを生成する(2NO + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>  $\rightarrow$  N<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>O)。我々は、緑膿菌由来チトクロムc依存型NOR(cNOR)の構造を明らかにし、NO還元反応に重要なアミノ酸残基を提案した。この提案を検証するために変異体の調製が必要であるが、大腸菌をホストとしたcNOR発現系では、酵素活性を保持したcNORが得られなかった。そこで、新井博之博士(東京大学)の協力のもと、緑膿菌をホストとした発現系を構築し、天然酵素と同等の酵素活性を有する組換え体cNORの発現精製に成功した。

今年度は、この手法を最適化し、変異体を自由自在に調製可能な系を構築した。野生型や酵

素活性を保持した変異体については、緑膿菌のcNOR 欠損株にcNOR遺伝子を形質転換し、嫌気培養を行う ことで、酵素活性を保持した試料を得た。一方、酵素 機能を大きく損なう変異体では、cNOR欠損株を用い て培養すると、cNOR変異体の働きが不十分なため、 脱窒の中間生成物であるNOが細胞内に蓄積し、緑膿 菌が生育しなかった(図1)。これにより、cNOR欠 損株に変異体cNORを導入した菌の生育度合から、変 異体の機能を*in vivo*で簡便に評価できることが明ら かとなった。このような不活性変異体の場合は、緑膿 菌野生株(cNORを持つ)にcNOR変異体を共発現さ せ、HisタグによりcNOR変異体のみを選択的に精製



図 1. 緑膿菌の cNOR 破壊株の嫌気培養。野生型 cNOR を発現させると脱窒が行われ菌が生育 する(培地が濁る)。一方で、機能が損なわれた 変異体を導入した場合は、cNOR の働きが不十 分で NO が培地に蓄積し、菌が生育しない。

することで精製標品が得られるようになった。

新たに構築したcNORの発現系および機 能評価系を用い、cNORのプロトン輸送経路 を検討した。プロトン輸送経路と予想されて いるアミノ酸の変異体を作成し、生育実験か ら機能評価を行った。その結果、NorCサブユ ニットのGlu57を入り口として、活性部位に つながるプロトン輸送経路が提案できた(図 2)。今後は、それぞれのcNOR変異体を精製 し、機能評価およびX線結晶構造解析を行う ことで、それぞれのアミノ酸の役割を解明す る。

# 2. NiR-cNOR複合体形成による効率的なNO 分解機構

脱窒反応の中間生成物であるNOは細胞 毒性が高いので、脱窒には、NOを細胞環境 に拡散させないためのシステムがあるはずで

ある。そのシステムとして、NOを生成する亜硝酸還 元酵素(NiR)とNOを分解するNORに何らかの連携 があると考え、緑膿菌由来NiRとcNORが複合体を形 成することをX線結晶構造解析により示してきた。本 年度は、NiR:cNOR複合体形成の機能的意義を検討す るために、NiRとcNORの界面で塩橋を形成している cNORのGlu119に着目した(図3)。Glu119をArgに 置換したE119R変異体を1. に示した方法で緑膿菌の cNOR欠損株で発現させたところ、菌の生育速度が野 生型cNORを発現させた場合に比べてわずかながら低 下した(図3)。この結果は、NiRとcNORの複合体形 成が効率的なNO分解に寄与することを支持する。現 在、杉田グループとの共同研究により、MDシミュレ ーションによりNiR:cNOR複合体のダイナミクスを調 べている。シミュレーションの結果から、相互作用に 重要なアミノ酸を解析し、実験へとフィードバックす

る予定である。また、今後は、蛍光標識したNiRや cNORを用いた細胞内動態解析へと展開し、脱窒にお ける効率的なNO分解システムを解明する。



図 2. 緑膿菌での発現系を利用した in vivo スクリーニン グの結果。赤文字で示したアミノ酸は変異を導入した部 位。変異体を cNOR 欠損株に発現させたときの生育度合 を+の数で示している。破線は、推測されるプロトン輸送 経路。



図 3. cNOR:NiR 複合体の相互作用部位。塩橋を 形成する cNOR の Glu119 を Arg に置換した E119R 変異体を調製した。右図は、緑膿菌の cNOR 破壊株に野生型および E119R を導入し、 嫌気培養を行った結果。野生型と比較すると E119R 変異体での菌の生育が悪い。

#### 3. チトクロムc依存性一酸化窒素還元酵素の電子伝達機構

cNORとNiRはチトクロム $c_{551}$  (c551)またはアズリンから電子を受け取りそれらの酵素反応に利用している。電子伝達の分子機構を明らかにするため、我々はcNORあるいはcNOR:NiR 複合体と電子供与体タンパク質との複合体構造をX線結晶解析により決定し、電子伝達特性を酸 化還元活性測定により解析することを目指している。本年度は、電子伝達複合体(c551-cNOR、 アズリン-cNOR、 cd1NIR-c551-cNOR、cd1NIR-アズリン-cNOR)の共結晶化を試みたが、未 だ単結晶は得られていない。一方、好気条件下でのc551-cNOR、アズリン-cNORの電子伝達速

度を測定したと ころ、c551の方 がアズリンより も電子伝達効率 が高かった。ま た、両システム共 にpHの低下に伴 い電子伝達効率 が上昇したこと から(図4)、こ れらの電子伝達 はタンパク質の プロトン化と共 役している (Proton-Coupl ed Electron Transfer) ことが 示唆された。



図 4 (左) チトクロム *c*<sub>551</sub>(右) アズリンの酸化速度(v<sub>0</sub>) 好気条件下で還元型 c551、 または還元型アズリンを含む溶液に cNOR を添加した。吸光度変化から酸化速度を測定し た。

4. キノール依存型NORのプロトン輸送機構の解明:病原菌由来NORの構造・機能解析

キノール依存性一酸化窒素還元酵素(qNOR)はキノールから電子を受け取り、一酸化窒素 (NO) 還元反応を触媒する。我々は、2012年に好熱菌*Geobacillus stearothermophilus* にお

いて脱窒に関与するqNORの構造を報告した(図5)。 一方、病原菌にもqNORを有しているものもあり、qNOR を利用することで、ヒトの免疫系にある一酸化窒素合成 酵素が抗菌剤として生成するNOを無毒化し、ヒト体内 で生育をはかっている。将来的な創薬の可能性も視野に 入れ、髄膜炎菌*Neisseria meningitidis*由来qNORを対象 とした研究を行っている。昨年度までに構築してきた qNORの大腸菌を用いた発現・精製系を最適化し、活性 部位に非へム鉄を含み、高いNO還元活性を持つ試料の 調製方法を確立した。Pia Ädelroth博士(ストックホル ン大学)との共同研究で、qNORを人工脂質二重膜(リ



図 3 キノール依存性 qNOR 分子構造は Geobacillus stearothermophilus qNOR の 不活性型に基づく。

ポソーム)に再構成し、酵素反応の特性を調べたところ、qNORはNO還元に伴い脂質二重膜を 隔てたプロトン濃度勾配を形成することが示唆された。これは、cNORが生体膜の外側からのプ ロトンを用いるのと異なり、qNORがNO還元のために、生体膜の内側からのプロトンを利用す ることを示唆している。

構造を決定しプロトン輸送機構を理解す るために、qNORの結晶化を試みたところ、4.0 Å程度の分解能を示す単結晶が得られた(図6)。 今後は結晶化条件を最適化し、立体構造の決定 を目指すとともに、構造情報に基づいた変異体 を作成し、プロトン輸送経路を決定する。



図 6 (左) NmqNOR の結晶 (右) X 線回折像

# 時分割X線結晶構造解析・時分割赤外分光法を用いた タンパク質反応中間体の構造・電子状態解析

久保 稔<sup>-1</sup>、當舎武彦<sup>-1</sup>、木村哲就<sup>-1</sup>、野村高志<sup>-1</sup>、武田英恵<sup>-1,2</sup>、西田拓真<sup>-1,2</sup>、奥林洸太<sup>-1,2</sup>、 山本 雅貴<sup>-3</sup>、杉本 宏<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・理<sup>2</sup>、理研・ビームライン基盤研究部<sup>3</sup>

生体内の化学反応を、関連するタンパク質・酵素の構造を基盤に電子・原子レベルで理解す

るためには、反応に伴うタンパク質・酵素の構造の時間 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。この目的を達成するために、我々は昨年度に、 フェムト秒赤外パルスを光源とする時分割赤外分光装置 を作製した。本年度は、この装置を、脱窒菌cNOR、脱窒 カビNOR、チトクロム酸化酵素の短寿命反応中間体の電 子状態解析に適応した。また、これらの試料にSACLAの フェムト秒X線パルスを光源とする構造解析手法を適応 し、無損傷結晶構造解析ならびに、時分割X線構造解析を 試みた。



図1 cNOR の活性中心の構造

#### 1. 脱窒菌由来NORのNO還元機構の解明

前述の脱窒菌由来cNORによるNO還元反応には、N-N結合の生成とN-O結合の開裂を含むた め、反応機構の理解には反応中間体の構造と電子状態の解析が必須である。cNORの活性部位は、 ヘム鉄と非ヘム鉄による複核鉄中心である(図1)。これまでに2つの反応機構が提案されてい る。一つは、2分子のNOがヘム鉄と非ヘム鉄それぞれに結合した後、それらの間でN-N結合が形 成されるモデルであり(*trans*機構)、もう一つは、1分子のNOがヘム鉄と非ヘム鉄を架橋する ように結合した後、そのNOに2分子目のNOが結合するモデルである(*cis*機構)。そこで本研究 では、反応中に過渡的に現れるNO結合型を時分割赤外分光で捉え、NOの鉄への配位様式を直接 観測することで、反応機構の決着をめざした。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・プローブ測定を行った。最初に、生成物N<sub>2</sub>OのN-N伸縮 振動(2229 cm<sup>-1</sup>)を観測した結果、500 μsの時点でN<sub>2</sub>Oが生成していることがわかった(図2a)。 したがって、昨年度の時分割可視吸収測定の結果と併せると、NO結合型は数μsの時定数で生成 し、約100 μsの時定数で消滅することが明らかとなった。そこで、遅延時間10 μsの時分割赤外 吸収スペクトルを測定した。その結果、1753 cm<sup>-1</sup>にNO伸縮振動が観測された(図2b)。これ は非ヘム鉄に結合したNOの典型的な振動数範囲にあるため、*trans*機構が支持された。現在はヘ ム鉄に結合したNO伸縮振動の観測を試みている。



図2 脱窒菌 NOR の酵素反応の時分割赤外分光測定.

(a) 生成物 N<sub>2</sub>O の NN 伸縮振動 (遅延時間 0.5 ms). (b) NO 結合型における基質 NO の NO 伸縮振動 (遅延時間 10 μs). 1753 cm<sup>-1</sup> および 1723 cm<sup>-1</sup> のバンドはそれぞれ <sup>14</sup>NO および <sup>15</sup>NO に由来。



図 3 脱窒カビ NOR の Fe<sup>3+</sup>-NO 型の活性中心の構造 (左) SACLA で測定した X 線無損傷構造、(中) SPring-8 で測定した低 X 線損傷構造、(右) SPring-8 で測定した高 X 線損傷構造

#### 2. 脱窒カビ由来NORのNO還元機構の解明

脱窒カビ由来NORは、活性部位にヘムを含む水溶性のチトクロムP450型酵素である。この 酵素の反応中間体は、[Fe<sup>3+</sup>-NO]型がNADHにより二電子還元された[Fe<sup>3+</sup>-NO]<sup>2</sup>型と提案されてい る。一電子還元された[Fe<sup>2+</sup>-NO]型は不活性種のため、二電子がヒドリドイオン(H)の形で同時 に活性部位に供与されることが、本酵素の反応機構の特徴である。我々は、脱窒カビ由来NOR の反応機構確立を目的に、[Fe<sup>3+</sup>-NO]型、[Fe<sup>2+</sup>-NO]型、[Fe<sup>3+</sup>-NO]<sup>2</sup>型の構造と電子状態の解明を めざしている。これらの結果は、生体内におけるNOと金属との相互作用の一般化に寄与すると 考えている。

本年度は、[Fe<sup>3+</sup>-NO]型の構造決定をめざした。[Fe<sup>3+</sup>-NO]型はNADH非存在下では安定に調 製可能である。SPring-8を用いてX線結晶構造解析を行ったところ、X線吸収線量に依存して活 性部位が損傷し、NOの配位構造が歪むことが明らかとなった。そこでSACLAを用いた無損傷構 造解析を行った(図3)。SACLA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。構造解析に必要なデータセットの収集を終えており、 現在は構造精密化を行っている段階である。

また本年度は、[Fe<sup>2+</sup>-NO]型・[Fe<sup>3+</sup>-NO]<sup>2</sup>型の構造決定に必要な準備研究も開始した。これら

は不安定種あるいは反応過渡種であるため、構造決 定にはSACLAを用いた時分割シリアルフェムト秒 X線結晶構造解析(時分割SFX)が必要である。SFX とは、20 µm程度の微結晶を含む溶液を連続的にフ ローしながら回折像撮影する手法である。微結晶の 密度を最適化することで、30%程度のヒット率で回 折像を収集できる。

時分割測定では、NADHとケージドNOを浸潤 した微結晶をフローし、UVパルス照射によるケー ジドNOの光分解(NO発生)を反応トリガーにして、 ポンプ-プローブ測定を行う。我々は時分割SFXの装 置を開発し、バクテリオロドプシンの反応中間体の 観測に適用している。現在NORの系にも利用できる ように、装置の汎用化に取り組んでいるところであ る。なお、ケージドNOで酵素反応を開始できるこ とは溶液条件で確認している(図4)。一方、NOR の微結晶生成条件の検討も進め、休止状態(反応前) の酵素の2.2 Å分解能でのSFX構造解析に成功して いる(図5)。

# 3. ウシ由来チトクロムc酸化酵素のプロトンポン プゲーティング機構の解明

チトクロムc酸化酵素CcOは、酸素呼吸で取り 入れたO<sub>2</sub>を水にまで還元し、それと共役してプロ トンをポンプする好気呼吸酵素である。ウシ由来 CcOは13種のサブユニットからなる分子量約21万 の巨大膜タンパク質である。CcOは触媒サブユニ ットの相同性から脱窒菌NORと進化的類縁関係に あると考えられている。CcOはヘム鉄と銅原子か らなる活性部位でO<sub>2</sub>還元反応を触媒する。

最近のX線結晶構造解析から、ヘム鉄にCO(O<sub>2</sub> アナログ)が結合すると、プロトンポンプ経路のゲ ートが閉じることが明らかにされている。そこで、 金属中心とプロトンポンプ経路との間の連動機構 を明らかにするために、CO光解離に伴うダイナミ クスをSACLAを用いた時分割X線結晶構造解析で 観測した。ただし、ウシ由来CcOのような巨大タ



図 4 脱窒カビ NOR の酵素反応の時分割紫外可 視吸収測定.ケージド NO を利用.



図5 脱窒カビ NOR の休止型の電子密度図. SFX にて回折データを収集. 青: 2Fo-Fc. 緑: Fo-Fc の正のピーク. 赤: Fo-Fc の負のピーク.

ンパク質を扱う場合、微結晶では高分解能の解析は困難であるため、ここではSFXではなく、500 µmサイズの大型結晶をループマウントする測定系を利用した。 大型結晶を励起する場合、結晶全体を100%励起することは不可能なため、ポンプ光をX線 とほぼ同軸に入射し、X線照射部位を局所的に励起する必要がある。また結晶の表面・裏面の2 方向から照射することも100%の励起率を達成する上で重要である。それらを実現する光学系は 昨年度までに開発した(*J. Synchrotron Rad.* 23, 334-338, 2016)。本年度は結晶周囲の調温・ 調湿装置を開発し、CO光解離後の中間体構造を解析するためのデータセットを収集した。現在、 構造精密化を行っている段階である。

## 鉄の生体内動態システム

澤井 仁美<sup>1,2</sup>、杉本 宏<sup>1,2</sup>、中村寛夫<sup>1</sup>、久野玉雄<sup>1</sup>、富樫ひろ美<sup>1</sup>、中村 希<sup>1,2</sup>、 Md. Mahfuzur Rahman<sup>1,2</sup>、Menega Ganasen<sup>1,2</sup>、武田英恵<sup>1,2</sup>、伊藤 達矢<sup>1,2</sup>、丹沢充裕<sup>1,2</sup>、 Iqbal Hamza<sup>3</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・理<sup>2</sup>、Univ. Maryland, USA<sup>3</sup>

鉄は、すべての生物の生命維持に必 須の微量元素である。生物は、外部から 鉄を取り入れ、感知・輸送・貯蔵・再利 用すること(鉄動態)により、タンパク 質や酵素の活性中心として利用する。鉄 源である無機鉄やヘム(鉄ポルフィリ ン錯体)は、細胞膜を直接透過できない 性質をもつため、種々の膜タンパク質の 介助によって細胞膜を隔てて輸送され 利用されるが、そのメカニズムは未解明 である。本研究では、生体内鉄動態に関 わるタンパク質の構造機能解析により、 生体内鉄動態の分子機構を明らかにす ることを最終目的としている。



図1.提案している病原菌におけるヘム取り込みの機構(青が我々 が決定した構造)

#### 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

病原菌は宿主が多量に保有するヘムを細胞内へ取り込むことで増殖に必須な栄養素の一つ である鉄イオンを獲得している。グラム陰性の日和見感染菌である*Burkholderia cenocepacia* では、外膜と内膜に挟まれたペリプラズム層に局在する可溶性のヘム結合タンパク質(BhuT) が内膜に発現するABC型トランスポーター(インポーター)であるBhuUVにヘムを受け渡す。 このインポーターは2つの膜貫通サブユニット(BhuU)と2つのATP結合サブユニット(BhuV) から構成され、ヘムを細胞質側へと輸送する機能をもつ。本研究ではヘムインポーター複合体で あるBhuUV-Tを解析の対象とし、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 造解析を目指している。

これまでにヘム輸送完了後の状態となるBhuUV-T複合体と、BhuTが解離したBhuUVのみ の状態、そしてBhuT単独の構造を明らかにした。しかし、輸送の反応サイクルに必要なATPが BhuVに結合することでどのような構造変化が起こるかについては明らかではない。そこでプル ダウン法によるBhuUVとBhuTの相互作用解析を行った。その結果、ATPおよびATPアナログ存 在化ではBhuUVとBhuTの間の親和性が低下することが明らかになった。この結果を明らかにし た立体構造の特徴と合わせて考えると、BhuUV-Tが「内開き構造」となったへムの輸送完了後 にATPが結合することでBhuTが解離して「外開き構造」へと構造変換が行われると考えられる。 つまりATPの結合はインポーターの構造のリセットという役割が示唆された(図1)。

また、好熱菌由来のヘム結合タンパク質RhuTについても立体構 造解析に成功した。そのヘム結合部位の構造から、生物種間でのヘ ム結合タンパク質 (PBP)によるヘムの認識機構の多様性が明らかと なった(図2)。今後、インポーターがその機能を発揮する上で鍵 となると考えられる残基を機能解析から証明し、ヘムの膜輸送の作 動原理の解明を目指す。



図2 ヘム結合タンパク質 RhuT の結晶構造

#### 2. 病原菌のヘム解毒排出ポンプの分子機構解明

遊離へムは生物にとって、主要な鉄源になるが、一方で強い細胞毒性をもつ。黄色ブドウ球

菌などのグラム陽性病原菌はインポーターで取り込んだ宿主由来 のヘムが過剰となると、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。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。

本研究では病原性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。

 ジフテリア菌由来のHrtBA タンパク質を組換え大腸菌から 可溶化・精製した。脂質膜に再構成したHrtBAはヘム依存的 なATPase 活性を示した。



図 3 ヘム排出ポンプ HrtBA の結晶構造

- ② ATP またはATPアナログの添加により、ヘムがHrtBA から遊離することが可視吸収スペクトル測定により判明した。
- ③ ATPアナログ結合型の結晶を得て、エックス線構造解析を行った。その結果、ATP結合によりヘムが遊離した状態の構造を明らかにした(図3)。

#### 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

ヒトでは十二指腸の細胞が食物から鉄分の吸収を担っている。鉄は必須の栄養素であるが、 体内の過剰な鉄は活性酸素産生の主原因となってがんや神経系の疾患を引き起こすことから、鉄 イオンの吸収過程は鉄の恒常性を維持するための重要なステップである。管腔側の非へム鉄は、 十二指腸の細胞の刷子縁膜に発現している膜タンパク質である鉄還元酵素 duodenal cytochrome  $b_{561}$  (Dcytb)によって三価から二価に還元される。そして二価金属輸送タンパク質

(DMT-1)により腸管細胞に取り込まれることが知られている。Dcytbは二分子のヘムを有し、 細胞質内のアスコルビン酸(Asc)から電子が一つ目のヘム鉄に受け渡され、さらにもう一つの ヘム鉄に受け渡された後、細胞外(管腔側)の鉄を還元していると予測されている。本研究では、 細胞膜を介した鉄イオンへの電子移動反応というDcytbがもつ特性に注目し、機能構造解析によ ってその分子メカニズムを明らかにすることを目指 している。

この反応の初期段階となるAscによるDcytb内 のへムの還元反応を追跡するために、ストップドフロ ー装置を用いて吸収スペクトルの時間変化を測定し た。反応速度論的解析を行った結果、Dcytbの還元速 度を4つの指数関数で近似できた。これらのうち最も 早い反応は明瞭なAsc濃度依存性を示したことから Ascの結合が律速となっている反応であることをこ れまでに明らかにしている(図4)。さらに、Dcytb と同じファミリーに属する植物由来のタンパク質の 結晶構造とアミノ酸配列の保存性からAsc結合に関 わる残基を予測し、3種類の変異体を作製した。それ らの変異体の還元反応を解析して野生型と比較した 結果、解離定数および最大反応速度は変異によって大 きく影響を受けた。したがってこれらの3つのアミノ



図4 細胞質側の塩基性残基はアスコルビン酸の 結合に関与する。

酸残基によってDcytbのAsc結合部位が形成されていることが示された。

膜タンパク質であるDcytbの立体構造解析のための結晶化実 験では、これまでは界面活性剤中のタンパク質の溶解度を蒸気拡散 により制御する方法で結晶を調製していたが、X線回折分解能が低 くて構造解析には不十分であった。そこで、脂質キュービック相

(LCP)法を試みた結果、長辺サイズが約10 µmの結晶が得られた (図5)。この微小サイズの結晶を多数用いてSPring-8 BL32XUで X線回折実験を行ったところ、最大で3.2 Åの回折分解能を示す反 射が確認できた。Dcytbは6回膜貫通型で膜表面の親水性部位が比 較的小さいため、LCP法による結晶化が解析に有利であると考えら れる。今後も引き続き結晶化条件の最適化を進めて高分解能での立 体構造決定を目指す。



図 5 脂質キュービック相 法で得られたヒトDcytbの 結晶

#### 4. 後生動物におけるヘム輸送システムの分子科学

動物におけるへム輸送システムは全く未解明である。動物は、食物から摂取したヘムや体内 で生合成あるいは再利用したヘムを鉄源として利用する。そのためには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、関連分子が同定されておらず、動物における生体内 ヘム動態は全く未解明であった。近年、共同研究者Iqbal Hamza教授のグループにより、後生動 物のヘムに応答する遺伝子群としてheme-responsive gene (hrg) 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。しかし、hrgがコードするタンパク質群HRGの 性質については情報がなく、ヘム輸送に関する知見は得られていなかった。

本年度は、線虫が食餌から獲得したヘムを腸管細胞へ輸送するために用いる膜タンパク質 CeHRG-4を研究対象とし、メタノール資化酵母P. pastorisを用いて組換えCeHRG-4の大量発現 法を確立した。CeHRG-4のX線結晶構造解析による構造決定を目指して、高純度かつ安定な *Ce*HRG-4を精製するために、各種界面活性剤を用いた精製条件の検討を行った。その結果、 n-dodecyl-β-D-maltosideとcholesteryl hemisuccinate存在下で*Ce*HRG-4を可溶化し精製した 場合に安定な試料を調製できることを見出した。今後は、結晶化条件の検討と精製標品のヘム輸 送活性測定系の構築を進める。

また、in vivoでHRGタンパク質の 機能解析を行うために、ヘム生合成遺伝 子欠損酵母hem1 Δ (S. cerevisiaeの変 異株)を用いた機能解析システムを構 築した。ヘムやその類縁体を含む寒天培 地での増殖を検討することにより、 CeHRG-4はヘムだけでなく、中心鉄を 持たないプロトポルフィリンIXも輸送 することを明らかにした。この結果か ら、CeHRG-4によるヘムの輸送にはヘ ム鉄の結合を伴わないと考えられた。一 方で、CeHRG-4のホモログであるリー シュマニア原虫L. amazonensis由来 LHR-1では、プロトポルフィリンIXを輸 送できない結果となった (図6)。このこ



図6 ヘム欠乏条件におけるヘム生合成遺伝子欠損酵母 hem1Δ株の生育実験 上段から順に CeHRG-4 遺伝子を導入 した株 (CeHRG-4)、コントロールとして 空のベクターを導 入した株 (vector)、LHR-1 遺伝子を導入した株 (yLHR1) を、 ヘムあるいはプロトポルフィリン IX を添加した寒天培地上 に、濃度系列を つくりスポッティングした。30度で4日 間インキュベートし、写真をとった。 写真上の記載は、培 地中にヘムおよびプロトポルフィリン IX の濃度。

とから、*Ce*HRG-4とLHR-1はアミノ酸配列の相同性が45% (similarity)であり立体構造が類似す る可能性はあるが、それらのヘム輸送機構は異なる可能性が示唆された。今後、*Ce*HRG-4と LHR-1の構造機能を比較することで、後生動物におけるヘム輸送機構の一般則を見出していきた い。また、この*in vivo*機能解析系を用いて、ヘムに代わる輸送基質を検索し、より簡便な*in vitro* 輸送活性測定系の構築を試みる。

# 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<sup>1,2</sup>、佐伯 茜子<sup>1,2</sup>、西園 陽子<sup>1,2</sup>、引間 孝明<sup>3</sup>、Gareth Wright<sup>4</sup>、山本 雅貴<sup>3</sup>、 S. Samar Hasnain<sup>4</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・理<sup>2</sup>、理研・ビームライン基盤研究部<sup>3</sup>, Univ. Liverpool, UK<sup>4</sup>

#### 1. 二成分情報伝達系タンパク質FixL/FixJによる酸素センシングの分子機構

生物は、化学的あるいは物理的な環境因子を敏感に感知し、生体機能を厳密に制御すること により、環境変化に適応して生命を維持している。この一連の環境応答システムの最上流で、環 境因子を識別感知するために必須の分子がセンサータンパク質である。多種多様な環境因子に対 応するセンサータンパク質が同定されているが、それらの分子内および分子間シグナル伝達の詳 細なメカニズムは、すべてのセンサータンパク質で未解明である。本研究では、マメ科植物の根 に共生する根粒菌が酸素に応答するために用いる二成分情報伝達系タンパク質FixL/FixJを研 究対象として、酸素センシングに伴うシグナル伝達機構の解明を目指している。平成26年度ま でに、全長タンパク質の調製や生化学的手法を用いた機能解析は完了していた。

本年度は、全長で調製したFixLとFixJについて、様々な条件下でX線小角散乱測定 (small-angle X-ray scattering, SAXS)を行った。FixLについては、酸素結合型(不活性型)/非 結合型(活性型)の代わりに、空気中で安定に扱えるシアン結合型(不活性型)/非結合型(活性 型)について測定した。また、FixLとFixJの過渡的複合体の構造を捉えるために、金属フッ素を用 いて調製したFixL-FixJ複合体についても測定した。SAXS測定は、手法や装置の違いによるデー タの差を考慮するために、SPring-8の理研ビームラインBL45XUとフランスの放射光施設

	Met form	Cyanomet form	Met form + AMP-PCP	BeF <sub>3</sub> <sup>-</sup> complex	FixJ
$R_{ m g}$ (Å)	54.9	51	55.7	66.6	21.2
<i>I</i> (0)	26.2	20.9	26.1	19.9	49.6
D <sub>max</sub> (Å)	205	195	230	260	69
$V_{\rm p}({\rm \AA}^3)$	224410	193200	228040	265760	41320
MM from V <sub>p</sub> (kDa)	140.2	120.7	142.5	166.1	25.8
				aptilike.	
Bead model				after the second se	

#### 表1 FixL と FixJ の SAXS データ解析における構造パラメーターとビーズモデル

SOLEILのSWINGビームラインで行った。前者では溶液セルを 用い、後者はサイズ排除クロマトグラフィーを融合した手法 (size-exclusion chromatography integrated SAXS, SEC-SAXS) で測定した。それらの測定データに基づく解析から、分子の形 状、分子量、最大長D<sub>max</sub>、慣性半径R<sub>g</sub>などのパラメーターを求め ることができた (表1)。これらを用いて、各状態のビーズモデル を構築したが、各状態の構造差異が小さいため、タンパク質中 の各ドメインの配置を決定するには至らなかった。今後は、各 ドメインの配置を決定してリガンドの結合に伴う構造変化につ いて議論することを目指す。FixLのヘム結合ドメインには鉄が 含まれること、キナーゼドメインには金属を融合したATPが結 合することを利用して、anomalous SAXSによる金属の配置決 定を試みる。さらにドメイン間で分断したFixLを調製し、SAXS とX線結晶構造解析により構造を決定し、全長FixLのドメイン の配置決定に用いる。

さらに全長FixLとFixJのX線結晶構造解析を目指した結晶 化も行った。FixLでは、ATPアナログ存在下で初期結晶を調製 できたが、X線回折実験には至らなかったため、今後さらに結 晶化条件を検討する必要がある。FixJでは、長径250 um以上の 単結晶を調製し、最高分解能3.1ÅのX線回折を確認できた(図 1)。来年度のビームタイムでは、完全な回折データを収集し、高 分解能でのX線結晶構造解析を行う予定である。





図 1.(上) 全長 FixJ の単結晶。 20℃で 7-8 週間静置して調製し た。(下) SPring-8 の理研ビームラ イン BL26B2 で観測した上記結晶 のX線回折像。

## 低温光学・電子顕微鏡を相補的に利用した

## 凍結水和生体試料のX線レーザーコヒーレント回折イメージング

高山裕貴,米倉功治

理研 RSC·米倉生体機構研究室

コヒーレントX線回折イメージング(CXDI)法は、X線の高い透過性と短波長性といった特性に より、電子顕微鏡(EM)での内部観察が困難なµmサイズの非結晶試料の構造を「丸ごと」、光学 顕微鏡(LM)より高い分解能で可視化できる手法である。また、CXDI法では結像レンズを用いず、 孤立した試料にコヒーレントX線を照射して回折パターンを観測し、これに反復的位相回復法を 適用することで、試料の電子密度分布を反映した投影像を再生する。そのため、細部までレンズ 収差によるぼけや歪みの無い像を得ることができる。

このような CXDI 法の特徴は、細胞や細胞内小器官のように比較的厚く、複雑な内部構造を持 つ生体試料の観察に有効である。特に、試料を瞬間凍結し、液体窒素温度下で観察する低温 CXDI 法では、乾燥や環境変化に敏感に影響される生体試料の構造を機能状態のまま観察できる。さら に X 線自由電子レーザー(XFEL)を光源とする低温コヒーレント回折イメージング (低温 XFEL-CDI) 法により、フェムト秒の極短時間に光子密度 10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup>/µ m<sup>2</sup>/pulse という強力な X 線 を照射し、生体試料の構造に X 線照射による損傷が生じる前の一瞬の姿を、数 10 nm の分解能で 可視化することが可能となっている。

一方で、生体試料からの回折シグナルは微弱であり、また、XFEL を照射された試料は直後に 原子レベルで破壊されるため、低温 XFEL-CDI 法では試料を覆う氷を極力薄くする、新しい試料 を効率的に供給するために支持薄膜上に試料を高い数密度で散布するなど、様々な試料条件の検 討が必要であった。そこで本研究では、低温 LM や低温 EM を凍結試料の直接評価に導入するこ とで試料作製の再現性を向上し、効率的な回折データ収集を実現した。さらに両顕微鏡を XFEL-CDI 法と相補的に利用することで、従来法より約 1.5 倍大きな生体試料像の再生や、前年 度提案したシグナル増幅 XFEL-CDI 法の実効性の実証に成功した。

まず、原始的な紅藻の一種である Cyanidioschyzon merolae から単離した葉緑体の低温 XFEL-CDI 実験を SACLA で行った(図 1)。凍結後の試料の散布密度や氷の厚さを低温 LM で評価し、葉緑体 が 2~5 個/(10×10  $\mu$  m<sup>2</sup>)の高い数密度で非常に薄い氷に覆われた試料を再現性良く作製すること ができた。この条件で作製した試料で低温 XFEL-CDI 測定を行うことで、XFEL が試料粒子に照 射される確率を 65%以上に高めることに成功した。また、氷を薄くしたことでイメージングに適



d 投影電子密度 (任意単位)



図1(a) 葉緑体のコヒーレントX線 回折パターン。単一葉緑体の低温 LM 像(b)および低温 EM 像(c)。同一 視野を観察。(d)低温 XFEL-CDI 像。 a か再生。全て液体窒素温度近傍で 観察。スケールバーは5 μm(a)、1 μm(b)、0.5 μm(d)。 当な回折パターン(図 1a)を高い再現度で観測することができた。再現性の高さは、回折パターン が混入した微粒子などに由来するものではなく、確かに観察対象の試料由来であることを示して いる。

測定条件の制約から、回折データからは試料形状の情報が欠落する。その影響は試料粒子が 大きくなるほど顕著であり、1 µmより大きい試料像の再生は困難だった。そこで、凍結試料の 同一視野を低温 LM と低温 EM で観察する低温光・電子相関顕微鏡法で葉緑体の形状を確認し、 回折パターンからの像再生に利用した。低温 LM で光合成色素が呈する緑色を基に葉緑体が損傷 を受けていないことを確認し(図 1b)、その葉緑体を低温 EM で観察することで、損傷の無い葉緑 体が、直径 1.7 µm 程度の真円に非常に近い形状であることが分かった(図 1c)。この形状情報を 利用した位相回復計算により、従来法では像を再生できなかった回折パターンから、葉緑体投影 像を分解能 192 nm で再生することに成功した(図 1d)。低温 XFEL-CDI 法で得られた葉緑体像で は、光合成膜に相当する内部構造が明瞭に可視化されている。

続いて、前年度提案したシグナル増幅 XFEL-CDI 法の実証実験を行った(図 2)。本手法では、 生体試料の X 線回折能の低さを補うため、金粒子由来の強い回折シグナルによって生体試料の微 弱な回折シグナルを増強し、高分解能の情報を持つ回折パターンを観測する。その実現には、観 察対象試料と複数の金粒子が共に XFEL 照射野に入る必要があり、EM 観察による試料作製条件 の評価・検討が不可欠であった。X 線回折能の低い窒化シリコン製の穴の近くに金粒子群が高頻 度で付着した試料を作製し(図 2a)、同心円状の特徴的な干渉縞を有する回折パターンを得た(図 2b)。EM 像のフーリエ変換から、同心円状の干渉縞は穴と金粒子からの回折 X 線の干渉に由来す るものだと確認できた。また、干渉縞として記録された穴由来の回折シグナルは、穴のみの場合 (図 2c)に比べて 2 倍以上広い空間周波数範囲で観測されており、この手法が X 線回折能の低い試 料の高分解能観察に有効な手法であることが示唆された。回折シグナル増強法と同時に提案した 解析法により、回折パターンから金粒子の配置を導出して像の再生に利用することで、従来法の 5~40 倍の効率で金粒子像を再生できることも実証し、本手法の実効性が示された。



図2 金粒子による回折シグナル増強の実証。(a) 窒化シリコン薄膜上の穴と金粒子群の EM 像。スケールバー は 0.5 µm。(b) XFEL 照射野に穴と金粒子群が共に入った場合の回折パターン。矢印は穴由来の同心円状の干 渉縞。穴からの信号が金粒子により高分解能まで強められている。(c) 穴のみからの回折パターン。(b)に比べ て信号は極低い分解能に留まっている。回折パターンが有する構造情報(分解能)は空間周波数 S の逆数。

#### 【参考文献】

[1] Takayama and Yonekura, Acta Crystallographica section A 72, in press.