

共同利用研究ハイライト

実験と計算の協奏解析による揺らぎを持つ巨大複合体の溶液構造解析

杉山 正明 京都大学複合原子力科学研究所 教授

溶液散乱（小角散乱）は、文字通り溶液中の生体高分子の構造解析手法の一つであるが、分解能の点からは、X線結晶回折・NMR・クライオ電顕などと比べると一歩譲ることとなる。そこで、溶液散乱を用いた研究では「試料が溶液中に存在している」事に着目し、構造的に揺らいでいる状態≒Nativeに近い状態の構造解析を目指すこととなる。本稿では、著者のグループ（京都大学複合原子力科学研究所）、加藤晃一教授のグループ（ExCELLS）、河野秀俊博士のグループ（QST）、A.Martel・L.Porcar 両博士（ラウエ・ランジュバン研究所（ILL）、フランス）と共同で行った溶液散乱実験・計算機解析の協奏による時計タンパク質が作る巨大複合体の構造・ダイナミクス研究を紹介する^[1]。

シアノバクテリアは3つのタンパク質 KaiA、KaiB、KaiC が ATP 存在下において 24 時間周期で解離会合を繰り返す概日時計を持っている^[2]。今回の研究対象は、3つのタンパク質が会合した ABC 複合体である。この ABC 複合体の構造は、2017年にクライオ電顕によって初めて報告された^[3]。それによると最大の ABC 複合体は 12 個の KaiA、6 個の KaiB、6 個の KaiC からなる巨大複合体であり、円筒状の BC 複合体（図(a)黄色・灰色）^[4,5]をベースに、円筒上部の KaiB6 量体リング（図(a)黄色）の外周を 12 個の KaiA がシャンパーハット状に取り囲んでいるものであった。提示された構造では、KaiA の 2 つのドメインの内、KaiB に結合している C 端ドメインの配置は判明しているが（図(a)水色・ピンク）、12 個の N 端ドメインの配置は不明である。これは N 端ドメ

インが揺らいでいる事が原因であると推定されるが、このような揺らぎを含んだ構造の解析は、現時点でもクライオ電顕を用いても困難な課題である。本研究では、この構造揺らぎを含んだ A₁₂B₆C₆ の全長構造の解明に取り組んだ。

まず溶液散乱実験では、溶液中の不要物をサイズ排除クロマトグラフィーにより除去し、溶出溶液を直接測定することで目的分子の散乱を高精度で取得する「SEC-SAS」法を適用した。近年、生物用 SAXS 装置では SEC-SA<X>S は必須となっているが、本研究では SEC-SA<N>S も用いている^[6]。SAXS 散乱データはタンパク質複合体の全体構造を反映している（図(b)上）。一方、本研究の SANS では、KaiB と KaiC は内部の水素の 75% を重水素化し、非重水素化 KaiA とで構成される複合体試料を調製し、100% 重水溶媒中で測定を行った（図(b)下）。この場合、中性子散乱における

同位体効果から複合体中の KaiB、KaiC からの散乱は観測されず、KaiA からの散乱のみが観測される。つまり、この測定法=逆転コントラスト同調 SANS (iCM-SANS) 法^[7]では、N 端ドメインを含む KaiA の配置情報のみを得ることができる。

解析では、計算機モデリング、SAXS・SANS 散乱データ、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いている。まず、計算機モデリングでは、クライオ構造を基に KaiA の N 端ドメインの存在可能な全ての位置を探索し、2,000 万個の KaiA の N 端ドメインを含む全長構造モデルを作成した。次に、各構造モデルの SAXS 曲線と実験 SAXS 曲線（全体構造を反映）を比較し、実験データを反映する 3 構造群 (A, B, C, 構造群、計 8,600 構造) を抽出した。更に抽出した構造の SANS 曲線と実験 SANS 曲線（KaiA 構造のみを反映）の比較を行い、A 構造群に属する 250 個の構造のみが実験結果

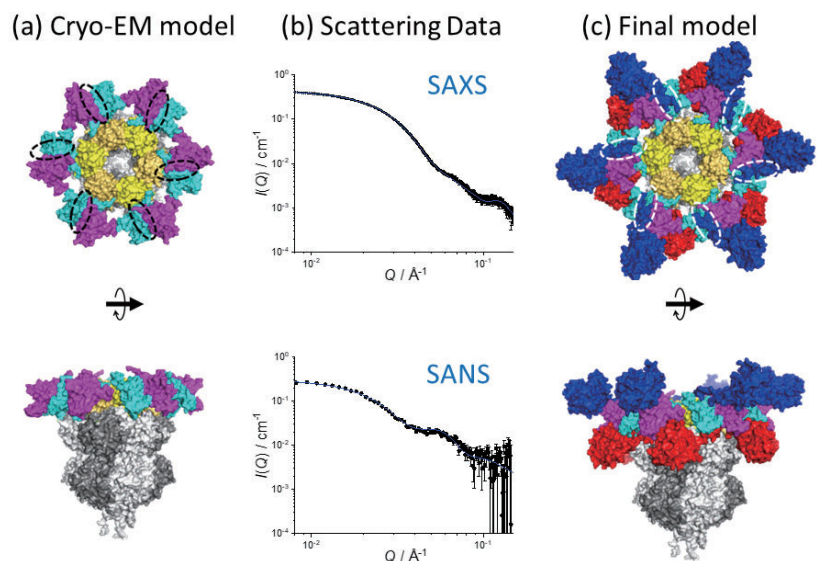


図 (a) クライオ電顕により明らかにされた A₁₂B₆C₆ 構造。KaiA の C 端ドメイン（水色・ピンク）、KaiB（黄色）、KaiC（灰色）。黒点線領域は KaiC との相互作用部位。(b) 上：SAXS、下：SANS。黒点は実験データ、青線は最終構造より求められた散乱曲線。(c) 最終安定解。KaiA の N 端ドメイン（赤色・青色）。白点線領域は KaiA のリンカー領域。

を反映していることを明らかにした。ただし、この構造は散乱データを反映しているがエネルギー的安定性は不明であり最終解とはできない。そこで、対称性の検討により250個の構造を8つのサブ構造群に分類し、各サブ構造群に対しMDシミュレーションを行った。その結果、長期的安定性を示した1つのサブ構造群を最終安定解として採用した。

図(c)に示すように最終安定構造では、2種類のKaiAのN端ドメインの配置が存在する。1つの配置(赤)は隣り合うKaiAのC端間であり、KaiAのリング構造の安定化に寄与していることが推察された。もう一つ位置(青)では、白点線で示したリンカー部分が2つのKaiAのC

端間に存在するKaiCに対する相互作用部位を覆っている(図(a)黒点線、(c)白点線領域)。この遮蔽によりこの部位にKaiCが結合することを防ぎ、複合体の構造安定化に寄与していると考えられる。

以上に示したように、(1)2種類の溶液散乱を用いることで、複合体の全体・部分構造の情報を取得し、(2)結晶構造解析・クライオ電顕などの原子レベルの構造情報を基に計算機を用いて構造モデルを構築し、(3)上記データとMDシミュレーションにより、揺らぎを含んだ大型複合体の構造解析に成功した。本研究により今後の統合的構造解析への一つの道標を示せたと考えている。



すぎやま・まさあき
京大大学院理学研究科物理学第2専攻博士後期課程
単位取得退学。
京都大学博士(理学)
九州大学理学部物理学科 助手
京都大学原子炉実験所* 准教授
京都大学原子炉実験所* 教授(現職)
*: 2018年より京都大学複合原子力科学研究所
に名称変更。

参考文献

- [1] Y. Yunoki, A. Matsumoto, et al., *Commun. Biol.* **5** (2022) 184. [5] R. Tseng, et al., *Science* **355** (2017) 1174.
[2] T. Kondo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** (1993) 5672. [6] N. T. Johansen, et al., *Acta Cryst.* **D74** (2018) 1178.
[3] J. Snijder, et al., *Science* **355** (2017) 1181. [7] M. Sugiyama, et al., *J. Appl. Cryst.* **47** (2014) 430.
[4] M. Sugiyama, et al., *Sci. Rep.* **6** (2016) 35567.

共同利用研究ハイライト

金属酵素や金属触媒が反応活性種を生成するうえでその配位環境はどんな役割をもつのか？

藤井 浩 奈良女子大学大学院自然科学系 教授

生体内にはたくさんの金属酵素があり、それぞれ生命を維持するための必須の反応を担っている。生体内の遷移金属イオンは体重70kgの人でも最も多い鉄でさえ5g程度しかなく、銅やニッケルなどにいたっては数十mgしかない。こんなわずかな金属イオンでも70kgもある我々の体の生命活動を支えられるのは、個々の金属酵素の機能が非常に優れている(少量でも大量の反応ができる)ためである。実際、自然界の酵素は位置選択性、立体選択性、触媒効率などさまざまな面で優れていて、その機能は我々化学者が作り

出した触媒を遙かに凌駕している。金属触媒の反応も生体内の酵素の反応と共通する点が多々あるため、金属酵素の機能や仕組みを解明する研究は触媒開発の面からも有用であると考えている。私の研究室では、生体内の金属酵素がいかんして優れた機能を獲得しているのかを活性部位のモデル錯体や変異体酵素を用いて電子構造の立場から解明する研究を行っている。ここでは、最近論文として報告した末端酸化剤の活性化機構に関する研究成果を紹介する。

金属酵素や金属触媒の反応の多くは、活性反応中間体を作る過程と活性反応

中間体が反応する過程に大きく分けることができる(図1)。活性反応中間体は名前の通り高い反応性を有しているため、その反応は速く、通常の実験中では検出できない。したがって、金属酵素や金属触媒の反応効率は、活性反応中間体を生成する過程に依存している。つまり金属酵素や金属触媒の効率は、いかに速く活性反応中間体を生成するにかかっている。活性反応中間体を生成する過程は、まず酵素や触媒の金属イオンと酸化剤(末端酸化剤)の反応から始まる(図1)。金属イオンに配位した酸化剤は、酸化剤自身の結

合を切断することにより活性反応中間体を生成する。活性反応中間体は、酸化剤の結合開裂反応から高い反応性を獲得しているのである。では金属酵素は、いかにしてこの反応過程を加速しているのでしょうか？私たちはこの疑問に答えるため、末端酸化剤として次亜塩素酸イオンを用いて活性反応中間体生成過程の研究を行った。次亜塩素酸イオンは、洗濯や掃除で使う漂白剤の主成分であり、また私たちの体内の白血球内でも合成されて、体内に侵入した細菌を撃退するために使われる酸化剤である。

ヘム（鉄ポルフィリン錯体）が次亜塩素酸イオンによって活性化される過程を種々の分光法を用いて研究した結果、次亜塩素酸イオンが鉄イオンに結合した錯体（ヘムが活性化される直前の状態）を世界で初めて捉えることに成功した。この状態をさらに詳しく研究した結果、次亜塩素酸イオンが結合を切断して活性反応中間体を生成する速度は、金属イオンに結合するその他の分子（配位子）の電子的な効果によって決定されることを明らかにした。この効果はすでに「push効果」として知られていたが、我々の研究は「push効果」の中身をも明らかにした。これまでの多くの研究者は、「push効果」を配位子からの金属イオンを介した酸化

剤への電子供与と捉えていた。しかし、私たちの分光学的研究は、「push効果」は酸化剤から金属イオンの電子の流れを配位子からの電子供与が堰きとめていることであることを示した（図2）。つまり電子の流れが逆であるということを示した。酸化剤は金属イオンに結合することにより活性化されている（結合が切れやすくなっている）と考えられていたが、実際はその逆であり、不活性化されていた（結合が切れにくくなっていた）のである。では、どうして結合が切れにくくなったにもかかわらず、活性反応中間体をより速く生成できるのでしょうか？酸化剤自身が結合を切る反応は、結合開裂反応であるためエネルギー的に不利な反応であり、酸化剤単独では自発的に起こりにくい反応である。しかし酸化剤が金属イオンと結合すると、酸化剤の結合が切断した後の状態が切断する前の状態より安定となり、エネルギー的に有利な反応となるため自発的に素早く起こると考えられる。酸化剤の結合の切れ方にも反応にとって良い切れ方と悪い切れ方がある。これまでも、酸化剤がどのような切れ方をするかが議論になることが多々あった。酸化剤の切れ方はもちろん自然（エネルギー）が決めているはずである。私たちはこの考え方に基づいて、酸化剤の結合の

切れ方を予測する新しい考え方も提案した。

ここで記した研究は、分子科学研究所の施設利用の制度を活用させていただいた成果である。私が所属するような規模の小さな大学では運営経費の削減で大型研究機器の更新がほとんど不可能な状態になっている。こうした状況は他の多くの大学でも直面している問題であると考えます。分子科学研究所の共同利用施設の存在は、多くの研究者に研究を継続する機会を提供し、日本の研究のすそを広げるために大きく貢献していると考えます。今後もこうした制度の存続を切望する。また、外部の研究者がすぐに公開機器を活用できるのは、それらを支えるスタッフの力があるからである。機器を購入、設置するだけでは外部ユーザーが利用することは不可能である。それらが、維持管理されているから成り立っていると考えます。今後もこの体制が維持されることを望む。毎回分子研を訪問すると、多くの方にお世話になっている。特に今回の研究では、機器センターの藤原さん、伊木さん、上田さん、岡野さん、長尾さん、高山さん、兵藤さんにお世話になりました。この場をお借りして御礼申し上げます。

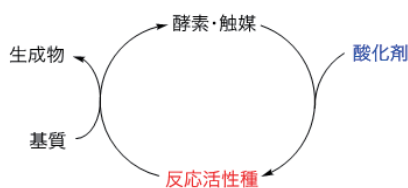


図1. 金属酵素や金属触媒の反応機構。

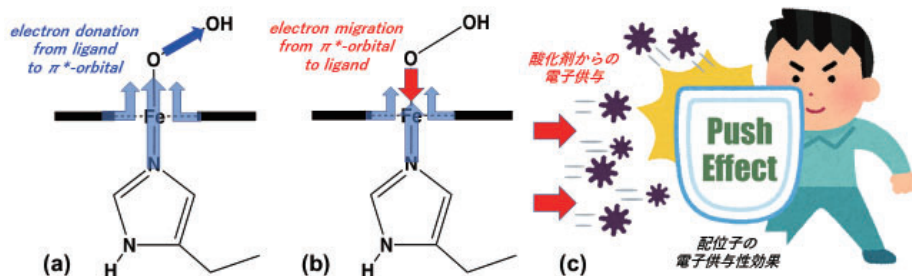


図2. Push効果とは？ (a)これまで多くの研究者が考えるpush効果の電子の流れ。金属イオンに結合する配位子が酸化剤の空に軌道に電子を押し込むことで酸化剤の結合が切断する。分子軌道計算をしてもこんな軌道はない！ (b)我々の研究から提案するpush効果の電子の流れ。配位子からの電子は金属イオンの電子密度を増加し、酸化剤からの電子の流れを食い止めている。(c)我々が提案するpush効果のイメージ図。

参考文献

- [1] Z. Cong, S. Yanagisawa, T. Kurahashi, T. Ogura, S. Nakashima, and H. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 20617-20620.
- [2] S. Yokota and H. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 5127-5137.
- [3] S. Yokota, Y. Suzuki, S. Yanagisawa, T. Ogura, S. Nozawa, M. Hada, H. Fujii, *ACS Catalysis*, **2022**, *12*, 10857-10871.



ふじい・ひろし

1990年京都大学大学院工学研究科分子工学専攻で学位取得後、北海道大学理学部化学科助手、ミネソタ大学化学科博士研究員、山形県テクノリス財団生物ラジカル研究所主任研究員を経て、1998年より分子科学研究所助教授。2001年より岡崎総合バイオサイエンスセンター助教授。2014年より現職。

共同利用研究ハイライト

細胞内のヘム濃度を感知するタンパク質の構造機能相関

澤井 仁美 長崎大学大学院工学研究科 准教授

すべての生物は「鉄」を利用して生命を維持している。たとえば、ヒトが呼吸をして肺に取り込んだ酸素を運ぶ赤血球中のヘモグロビンには、鉄がヘム（ポルフィリン鉄錯体）の形で多量に含まれており、その中心鉄に酸素分子を結合させて全身に供給している。また、遺伝子合成や物質代謝など生命維持に不可欠な生理機能を担う酵素は、鉄を活性中心に含んでいるため、生物は鉄がないと遺伝情報を保持することができない。バクテリアの場合、正常に増殖するためには1細胞あたり 10^{-6} M（ヒトの 10^{12} 倍）程度の鉄が必要となるため、鉄源となるヘム鉄を積極的に獲得する方法を進化させている。動物に感染する病原菌（ペスト菌・コレラ菌・ジフテリア菌など）や腸内細菌（乳酸菌・ビフィズス菌など）は、ヘムの生合成遺伝子を欠損したヘム栄養要求生物（heme auxotroph）であるため、動物の血液や腸管に住み着いて赤血球中のヘモグロビンからヘムを奪取して鉄栄養として利用できる独自のシステムを進化的に獲得している^[1]。しかし、このようなバクテリアのヘム獲得システムでは、1個の赤血球を壊すと10億分子以上のヘムが放出されるので、菌体内に多量のヘムが流入し、鉄

源として利用されないヘムは菌体内に遊離してしまう。遊離のヘムは、活性酸素種を発生させる「細胞毒」となるため、菌体内のヘム濃度を感知して一定の濃度に調節するタンパク質が存在している。しかし、どのようにしてヘムを感知しているのか、ヘムを感知した情報をどのように伝達し菌体内のヘム濃度を調節しているのかなど、詳細な分子メカニズムは未解明であった。

本研究では、新生児の敗血症・髄膜炎・肺炎、さらには乳牛に乳房炎をもたらす酪農経済に影響を及ぼすアガラクチア菌 *Streptococcus agalactiae* におけるヘム濃度センサータンパク質PefRの構造機能相関を解明し、細胞内のヘム濃度を感知する分子メカニズムについて研究した^[2]。菌体の生存に必要なヘム濃度では、PefRはヘムエクスポーター遺伝子の上流に結合してその発現を抑制している。宿主の血中から菌体内にヘムが流入して菌体内のヘム濃度が上昇すると、PefRは遊離ヘムを感知（結合）し、ヘムエクスポーター遺伝子の上流から解離する。これをスイッチにして、ヘムエクスポーターの発現が促進し、余剰なヘムが菌体外へと排出される。つまり、PefRはヘムをエフェクターとするリプレッサー型の転写調

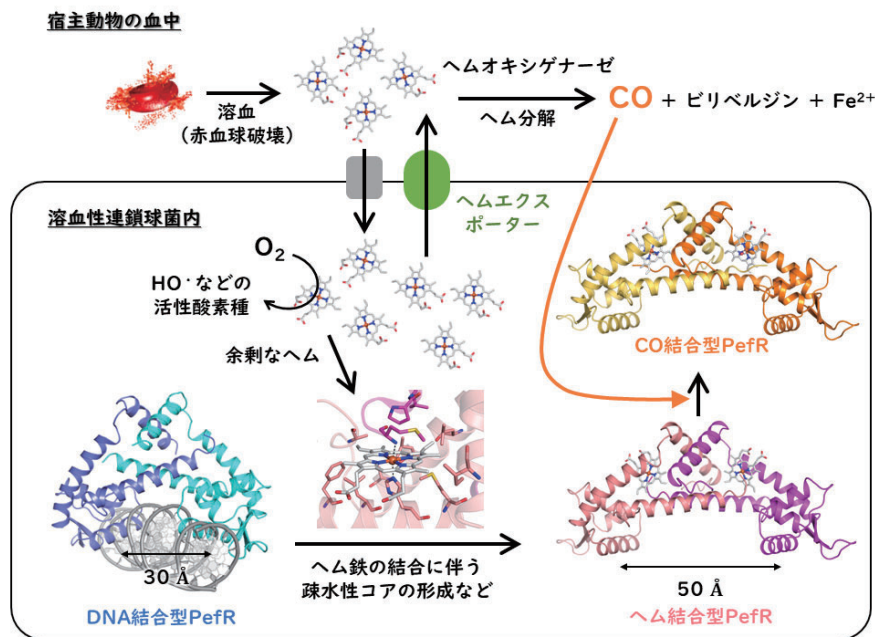
節因子として機能している。PefRがヘムを結合して標的DNAから解離する分子メカニズムを理解するために「DNA結合型」「ヘム結合型」などの各状態におけるPefRを用いて単結晶を調製し、X線結晶構造解析により立体構造を決定した（図1）。PefRは二量体を形成しており、ヘムはN末端の主鎖窒素ともう一方のサブユニットに存在するHis114による6配位構造をとって結合していた。この結合により、ヘムの周辺の疎水性アミノ酸側鎖の配向が変化することで、DNA結合ドメイン間の距離や配向が変化して標的DNAに結合できない構造に変化することを明らかにした。さらに、標的DNAから解離したヘム結合型PefRのヘム鉄には、マッコウクジラのみオグロビンと同程度の結合親和性で一酸化炭素COが結合することも見出した。哺乳類の体内において、COはヘム分解酵素（ヘムオキシゲナーゼ）による酸素添加反応の副産物として生じる分子であるが、神経細胞保護や抗炎症作用に関与するシグナル分子として機能している。一方で、バクテリアの菌体内にCOが存在すると死滅や休眠を招いてしまうため、バクテリアはCOを発生させずにヘムを分解する独自の酵素を有していること

が知られている^[3]。したがって、ヘムを感知（結合）して標的DNAから解離したPefRは細胞質中に遊離しており、ヘム分解産物であるCOが菌体内に入ってきた時にCOを安定に結合して捕捉する役割も担える可能性を提案した。

本稿の内容は、兵庫県立大学大学院

理学研究科の城 宜嗣先生の研究室で助教をしていた頃の研究成果です。この研究は、所属研究室だけでなく、生命・錯体分子科学研究領域の青野 重利先生との「共同利用研究」により精力的に進めることができました。城先生、青野先生をはじめ、多くの共同研究者の

先生方と学生さん達に心から感謝申し上げます。私は十数年前に青野先生の研究室の博士研究員だった経緯もあり、本研究では共同利用研究として色々な実験装置を使用させていただきました。所内に理解のある共同研究者がいる場合は円滑に共同利用研究を進められると思いますが、そうでない場合はどこに何を持ち掛ければよいのか少し不安な感じもします。共同利用研究の素晴らしさや利用方法がもっと広く知れ渡り、たくさんの研究者が分子研を訪れ、より多くの輝かしい研究成果が分子研から発信されるように期待するとともに、私も継続的に利用させていただきたいと考えております。今後もよろしくお願い申し上げます。



X線結晶構造解析により明らかにしたDNA結合型・ヘム結合型・CO結合型のPefRの立体構造をそれぞれ青色と水色、ピンク色とマゼンタ色、黄色とオレンジ色のリボン図で描いている。DNA領域とヘムは灰色で示している。PefRが菌体内で遊離している余剰なヘムを結合すると、ヘム周辺の構造変化をトリガーとしてDNA結合部位の距離や配向が変化してDNAに結合できない構造に変化する。ヘムを結合したPefRはCOを安定に結合する性質も備えていることも明らかにした。

参考文献

- [1] T. A. Rouault (2004) *Science* **305**, 1577-1578.
- [2] M. Nishinaga, H. Sugimoto, Y. Nishitani, S. Nagai, S. Nagatoishi, N. Muraki, T. Tosha, K. Tsumoto, S. Aono, Y. Shiro, H. Sawai (2021) *Commun. Biol.* **4**, 467.
- [3] A. Wilks, M. Ikeda-Saito (2014) *Acc. Chem. Res.* **47**, 2291-2298.



さわい・ひとみ
博士（理学）を取得後、2006年より分子科学研究所にて博士研究員、日本学術振興会特別研究員、特任助教、2013年より兵庫県立大学大学院生命理学研究科にて助教、2022年5月より長崎大学大学院工学研究科の准教授として着任。生体内の鉄の動態と機能について、鉄イオンの感知・輸送・貯蔵・利用に関わる種々のタンパク質が相互に働く仕組みを、分子にとどまらず細胞組織のレベルでも解明することを目指して研究を展開している。

施設だより	<h2 style="text-align: center;">高性能分子シミュレータの更新</h2> <p style="text-align: center;">計算科学研究センター 岩橋 建輔</p>
-------	---

最初にお詫びしなければならないのは、2022年12月1日に予定していた高性能分子シミュレータの運用開始が2023年2月上旬となってしまいました

た。運用再開を待たれていたユーザーの方々には心からお詫び申し上げます(写真1)。
今回の調達ではこれまでにない問題

に直面しました。既設の冷却塔を再利用するか同じ場所に作り直す工事を行うため、異例の2か月の運用停止期間を設けました。また、物不足による納期が遅れ