

I 金属蛋白質の構造機能解析

Structural and Functional Studies of Some Metalloproteins

城 宜嗣

Shiro, Y.

生体内には数多くの金属蛋白質・金属酵素が存在し、酸化還元あるいは酸塩基触媒反応、気体分子の運搬・貯蔵・センシングなどさまざまな生理機能を関与している。本グループでは、SPRING-8を用いて、いくつかの金属蛋白質・金属酵素の結晶構造を明らかにし、さらに分子分光学、分子生物学、生化学的なデータの解析とあわせて、これらの構造と機能の関連を議論している。2種類の脱窒菌 (*Pseudomonas aeruginosa*と*Geobacillus stearothermophilus*) の一酸化窒素還元酵素 (膜結合型蛋白質) の結晶構造解析に成功した。反応活性中心の詳細な構造、ならびに電子伝達経路とプロトン輸送経路などを明らかにし、構造を基盤にして一酸化窒素還元反応機構を議論した。この構造を基盤にした分子動力学計算により、プロトン輸送経路と酵素の動的構造との関連を議論した。この2つの酵素と、微好気呼吸ならびに好気呼吸の呼吸酵素 (チトクロム酸化酵素) と構造比較する事により、呼吸酵素の分子進化について議論した。いくつかのGFP様蛍光タンパク質の構造解析に成功し、クロモフォア近傍の詳細な構造と蛍光特性 (色、強度など) との関連を議論した。

II 生体内の金属動態の構造生物学的研究

Structural Biology on Metal Dynamics in Cell

杉本 宏

Sugimoto, H.

微量金属元素の細胞内への吸収、運搬、その濃度感知などの生体内動態に関わるタンパク質の分子機能解明を目的に、それらの分子構造を解き書かす事をめざしている。具体的には、ヒトの小腸において鉄を吸収する前に三価から二価に還元する酵素(Dcyt b)、病原菌がホストからヘム鉄を奪取する際にヘムを細胞内に取り込むヘムトランスポーター(HT)、取り込んだヘムの濃度を感知してヘムを分解し鉄を取り出す酵素を誘導するヘムセンサータンパク質(ChrS)の発現精製に成功した。Dcyt bとHTは、結晶が得られているが、分解能は6Å程度であり、精製ならびに結晶化条件を検討中である。ビタミンDの活性化能を有するバクテリアのチトクロムP450の構造機能解析にも成功した。また、哺乳動物におけるトリプトファン代謝に関わるヘムを含

む二原子酸素添加酵素インドールアミン 2, 3 ジオキシゲナーゼについて、そのラマン分光測定より酵素反応中に鉄四価オキソ状態が存在することを見だし、反応機構との関連でその役割を議論した。

発表論文 List of Publications

- I-1 J. Hasegawa (京大), Y. Ise (京大), K. Fujimoto (京大), A. Kikuchi (理研), E. Fukumura (阪大), A. Miyawaki (理研), Y. Shiro: "Excited States of Fluorescent Proteins, mKO and DsRed: Chromophore-protein Electrostatic Interaction Behind the Color Variations" *J. Phys. Chem. B* **114**, 2971-2979 (2010)
- I-2 T. Kurahashi, A. Kikuchi, **Y. Shiro**, M. Hada, H. Fujii: "Unique Properties and reactivity of High-Valent Manganese-Oxo versus Manganese-Hydroxo in the Salen Platform" *Inorg. Chem.* **49**, 6664-6672 (2010)
- I-3 O. Shoji, T. Fujishiro, S. Nagano, S. Tanaka, T. Hirose, **Y. Shiro**, Y. Watanabe: "Understanding Substrate Misrecognition of Hydrogen Peroxide-Dependent Cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*" *J. Bio. Inorg. Chem.* **15**, 1331-1339 (2010)
- I-4 T. Hino, Y. Matsumoto, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Fukumori, T. Murata, S. Iwata, **Y. Shiro**: "Structural Basis of Biological N₂O Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductase" *Science* **330**, 1666-1670 (2010)
- II-1 S. Yanagisawa, K. Yotsuya, Y. Hashiwaki, M. Horitani, H. Sugimoto, **Y. Shiro**, E. H. Appelman, T. Ogura: "Identification of the Fe-O₂ and the Fe=O Heme Species for Indoleamine 2,3-Dioxygenase during Catalytic Turnover" *Chem. Lett.* **39**, 36-37 (2009)
- II-2 K. Hayashi, K. Yasuda, H. Sugimoto, S. Ikushiro, M. Kamakura, A. Kittaka, R. Horst, T. Chen, M. Ohta, **Y. Shiro**, T. Sakaki: "Three-step Hydroxylations of Vitamin D₃ by a Genetically Engineered CYP105A1" *FEBS Lett.* **277**, 3999-4009 (2010)
- II-3 T. Sakaki, H. Sugimoto, K. Hayashi, K. Yasuda, E. Munetsna, M. Kamakura, S. Ikushiro, **Y. Shiro**: "Bioconversion of Vitamin D to Its Active Form by Bacterial or Mammalian Cytochromes P450" *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 249-256 (2010)
- II-4 L. W. Chung, X. Li, H. Sugimoto, **Y. Shiro**, K. Morokuma: "ONIOM Study on a Missing Piece in Our Understanding of Heme Chemistry: Bacterial Tryptophan 2,3-Dioxygenase with Dual Oxidants" *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 11993-12005 (2010)
- II-5 S. Yanagisawa, H. Sugimoto, **Y. Shiro**, T. Ogura: "A Specific Interaction of L-Tryptophan with CO of CO-Bound Indoleamine 2,3-Dioxygenase Identified by Resonance Raman Spectroscopy" *Biochemistry* **49**, 10081-10088 (2010)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

岡田昇大：一酸化窒素還元酵素qNORの構造機能解析

科学研究費補助金等

- 1 文部科学省 科学研究費補助金（平成20～23年度）基盤研究(A) 課題番号: 21245041
研究課題 呼吸酵素における、酸素還元と一酸化窒素還元 of 機能変換と分子進化
研究代表者 城 宜嗣
- 2 文部科学省 科学研究費補助金（平成22～26年度）新学術領域研究「分子活性化」
課題番号: 22105012
研究課題 生体反応場の高特異性の解析と機能制御
研究代表者 城 宜嗣