

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、これら構造と振動分光実験の結果を基にして一酸化窒素還元反応機構を議論した。また、この構造を基盤にした分子動力学計算により、酵素反応に利用される触媒プロトン輸送経路と酵素の動的構造の関係、さらに好気呼吸酵素であるチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機能との関連を議論した。加えて、還元型、還元シアンイオン結合型一酸化窒素還元酵素の構造解析を進めている。

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と作動機構を解明するために、これらのタンパク質の立体構造解析をめざしている。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 (Dcytb)、病原菌が感染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発現誘導するヘムセンサータンパク質 (ChrS)を調製して結晶化することに成功した。HT結晶のX線回折分解能は3.5 Åで、DcytbとChrS結晶の分解能は7 Å程度であり、試料調製方法ならびに結晶化条件を検討中である。ChrSのシグナル伝達における下流因子であるChrAについては1.9 Åでの構造決定

に成功した。哺乳類のステロイド代謝系で機能しているシトクロムP450の結晶の調製についても進行中である。さらに、ヒトのトリプトファン代謝の律速酵素である二原子酸素添加酵素インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼの変異体の生化学・分光解析により、活性部位を形成するアミノ酸残基の基質認識における役割を明らかにした。

発表論文 List of Publications

- I-1 T. Yamamoto, Y. Shimizu, T. Ueda, Y. Shiro, M. Suematsu: “Application of Micro-reactor Chip Technique for Millisecond Quenching of Deuterium Incorporation into 70S Ribosomal Protein Complex” *Intl. J. Mass Spectrometry* **302**, 132-138 (2011)
- I-2 R. Makino, S.-Y. Park, E. Obayashi, T. Iizuka, H. Hori, **Y. Shiro**: “Oxygen Binding and Redox Properties of the Heme in Soluble Guanylate Cyclase : Implications for the Mechanism of Ligand Discrimination” *J. Biol. Chem.* **286**, 15678-15687 (2011)
- I-3 S. Asamizu, Y. Shiro, Y. Igarashi, S. Nagano, H. Onaka: “Characterization and Functional Modification of StaC and RebC, Which are Involved in Pyrrole Oxidation of Indolocarbazole Biosynthesis” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 2184-2193 (2011)
- I-4 日野智也・城 宜嗣: “一酸化窒素還元酵素NOR –呼吸酵素の分子進化と温室効果ガスの産生メカニズム–” 化学、Vol 66, pp.30-35 (2011)
- II-1 M. Makino, H. Sawai, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Crystal Structure of Carbonmonoxide Complex of Human Cytoglobin” *PROTEINS* **79**, 1143-1153 (2011)
- II-2 T. Fujishiro, O. Shoji, S. Nagano H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: “Crystal Structure of H₂O₂-dependent Cytochrome P450_{SPa} with Its Bound Fatty Acid Substrate: Insight into the Regioselective Hydroxylation of Fatty Acids at the a Position” *J. Biol. Chem.* **286**, 29941-29950 (2011)
- II-3 T. Sakaki, H. Sugimoto, K. Hayashi, K. Yasuda, E. Munetsuna, M. Kamakura, S. Ikushiro, Y. Shiro: “Bioconversion of Vitamin D to Its Active Form by Bacterial or Mammalian Cytochromes P450” Special Issue on *Cytochrome P450* in *Biochim. Biophys. Acta* (2011) **1814**, 249-256

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21～24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