

## 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。特に、近年では、地球上の窒素循環において重要な働きをしている脱窒菌の一酸化窒素還元酵素（膜結合型蛋白質）の構造機能解析において世界的な成果をあげている。本年度は、*Pseudomonas aeruginosa* の一酸化窒素還元酵素の還元型、還元シアニオン結合同型、還元一酸化炭素結合同型の結晶構造解析に成功した。反応活性中心の詳細な構造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。病原菌由来で、キノールを電子供与体とする一酸化窒素還元酵素の構造機能解析をめざして、発現系構築、単離精製、結晶化に着手した。

## 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と作動機構を解明するために、これらの膜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。HTへヘムを運搬するタンパク質に関して、1.5 Å分解能での構造解析に成功した。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。DcytbとHTをリポソームに埋め込み、その活性を測定するシステムを構築している。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Y. Matsumoto, T. Tosha, A. V. Pislakov, T. Hino, H. Sugimoto, S. Nagano, Y. Sugita, **Y. Shiro**: “Crystal Structure of Quinol-Dependent Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus Stearothermophilus*” *Nat. Strl. Mol. Biol.* **19**, 238-245 (2012)
- I-2 R. Makino, S. Yazawa, H. Hori, Y. Shiro: “Interactions of Soluble Guanylate Cyclase with a P-Site Inhibitor: Effects of Gaseous Heme Ligands, Azide, and Allosteric Activators on the Binding of 2'-Deoxy-3'-GMP” *Biochemistry* **51**, 9277-9289 (2012)
- I-3 A. V. Pislakov, T. Hino, Y. Shiro, Y. Sugita: “Molecular Dynamic Simulations Reveal Proton Transfer Pathways in Cytochrome C-Dependent Nitric Oxide Reductase” *POLS Comp. Biol.* **8**, e1002674 (2012)
- I-4 T. Hino, S. Nagano, H. Sugimoto, T. Tosha, Y. Shiro: “Molecular Structures and Mechanism of Bacterial Nitric Oxide Reductase” Special Issue on *Respiratory Oxidases* in *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1817**, 680-687 (2012)
- I-5 L. Salomonsson, J. Reimann, T. Tosha, N. Krause, N. Gonska, Y. Shiro, P. Adelroth: “Proton Transfer in the Quinol-dependent Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus stearothermophilus* during Reduction of Oxygen” Special Issue on *Respiratory Oxidases* in *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1817**, 1914-1920 (2012)
- I-6 Y. Shiro, H. Sugimoto, T. Tosha, S. Nagano, T. Hino: “Structural Basis for Nitrous Oxide Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductases” the Proceedings of the Royal Society Meeting ‘Nitrous oxide, the forgotten greenhouse gas’, *Philosophical Transactions B, The Royal Society* **367**, 1195-1203 (2012)
- I-7 Y. Shiro: “Structure and Function of Bacterial Nitric Oxide Reductases, Anaerobic Enzymes” Special Issue on *European BioEnergetic Conference 2012* in *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1817**, 1907-1913 (2012)
- I-8 日野智也・當舎武彦・城 宜嗣: “一酸化窒素還元酵素の結晶構造から見えてきた呼吸酵素の機能変換” *生物物理*, Vol 52, pp. 186-189 (2012)
- II-1 H. Sawai, H. Sugimoto, **Y. Shiro**, H. Ishikawa, Y. Mizutani, S. Aono: “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-Based Sensor Protein Aer2 from *Pseudomonas aeruginosa*” *Chem. Commun.* **48**, 6523-6525 (2012)

- II-2 T. Fujishiro, O. Shoji, N. Kawakami, T. Watanabe, H. Sugimoto, **Y. Shiro**, Y. Watanabe: "Chiral Substrate Analogues Assisted Stereoselective Epoxidation Catalyzed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dependent Cytochrome P450SPa" *Chem. Asian J.* **7**, 2286-2293 (2012)
- II-3 S. Asamizu, S. Hirano, H. Onaka, H. Koshino, **Y. Shiro**, S. Nagano: "Coupling Reaction of Indolepyruvic Acid by StaD and Its Product: Implications of Biosynthesis of Indolocarbazole and Violacein" *ChemBioChem* **13**, 2495–2500 (2012)
- II-4 H. Sugimoto, **Y. Shiro**: "Diversity and Substrate Specificity in the Structures of Steroidogenic Cytochrome P450 Enzymes" *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 818-823 (2012)

## 大学院生命理学研究科

博士前期課程

寺坂瑛里奈：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