

## I 一酸化窒素還元酵素の構造と機能

### Structural and Functional Studies on Nitric Oxide Reductases

城 宜嗣・村本和優・澤井仁美

Shiro, Y., Muramoto, K., Sawai, H.

一酸化窒素還元酵素 (NOR) は、微生物の嫌気呼吸の一種である脱窒において、中間体として産生される一酸化窒素 NO を亜酸化窒素  $N_2O$  に変換する酵素である。呼吸酵素の分子進化との関係や、地球温暖化・オゾン層破壊などの環境科学との関連で注目されている酵素である。NOR による NO 変換の分子機構を議論する為に、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* RM495) を宿主とした NOR 発現系および *in vivo* スクリーニング系によって見いだした、いくつかの重要なアミノ酸残基 (Glu57、Asp198、Val206) の変異体を調製、精製し、それらの酵素活性・分光測定ならびに結晶化を行った。また、時分割赤外分光紫外レーザー照射によりマイクロ秒の時間領域で NO を発生できる「ケージド NO」と解析により、NOR 酵素反応中に 2 種類の短寿命 (数マイクロ秒と数ミリ秒の寿命) 反応中間体が現れる事をみだし、それらの構造・電子状態解析を開始した。

キノール依存性一酸化窒素還元酵素 (qNOR) の活性型構造を決定するため、髄膜炎菌 qNOR の発現、精製、X 線結晶解析に取り組み、解析の分解能が 3.5 Å に向上した。キノールアナログ分子 (メナジオール) を基質として髄膜炎菌 qNOR による NO 消費活性の速度論的解析を開始した。精製した髄膜炎菌 qNOR の再構成系を用いた測定により、qNOR の反応が起電性であることを明らかにした。

## II 酸素センサータンパク質の構造機能解析

### Structural and Functional Studies on Oxygen-Sensor Proteins

澤井仁美・城 宜嗣

Sawai, H., Shiro, Y.

豆科植物の根に共生する根粒菌は窒素固定を行う事で有名である。根粒菌の窒素固定はニト

ロゲナーゼにより触媒される。しかし、ニトロゲナーゼは酸素に対して不安定な為、酸素センサータンパク質 FixL/FixJ が酸素濃度を感知し、ニトロゲナーゼの発現を遺伝子レベルで調節している。FixL は酸素センサードメインとヒスチジンキナーゼドメインを有し、低酸素濃度を酸素センサー部位が感知した際に、ATP のリン酸基を用いて自己の His をリン酸化し、さらに FixJ にそのリン酸基を移す。リン酸化された FixJ は転写因子としてニトロゲナーゼ遺伝子の発現を促進する。この FixL から FixJ への一連の酸素感知の分子機構の解明を目的に、昨年、X 線小角散乱法で決定した FixL-J 複合体の構造モデルを基盤に、FixL の分内情報伝達に重要と思われるアミノ酸残基の変異体を調製し、そのリン酸化活性を測定した。

### III 生体内の鉄動態に関わるタンパク質の構造と機能

#### Structural and Functional Studies on Proteins Related to Iron Dynamics in Cell

澤井仁美・城 宜嗣

Sawai, H., Shiro, Y.

鉄は、酸素の運搬貯蔵・酸化還元・異物代謝など重要な生理機能を担うタンパク質の補因子として機能し、ほぼ全ての生物が生命維持に利用されている。一方、タンパク質に結合していない鉄は、活性酸素源として酸化ダメージを誘起する「細胞毒」でもある。生物にとって鉄は「両刃の剣」であるため、生体内には鉄の濃度や酸化状態を厳密に制御するシステムが存在する。ヒトにおいては、食餌・生合成・赤血球分解による再利用により、鉄を獲得することが明らかになっているが、獲得した鉄が生体内でどのように輸送されるのかは全く明らかではない。食餌中の鉄のほとんどは酸化鉄であるが、それが十二指腸の絨毛で吸収される際、絨毛の細胞膜に局在する鉄還元酵素 *Dcytb* によって還元鉄に変換され、細胞内に取り込まれる。本年度は、酵母を用いた *Dcytb* の機能評価系を構築した。昨年成功した *Dcytb* の結晶構造を基盤に、鉄の結合、アスコルビン酸の結合、分子内電子伝達に関係するアミノ酸残基の機能を評価した。さらに、この評価系を用いて、食餌中に含まれるクエン酸などが鉄のキレーターとして、*Dcytb* による鉄還元の重要な働きをしている事を見いだした。

さらに、病原菌（溶連菌）の鉄獲得機構で、へム鉄のセンサーとして機能する転写調節因子についても、X線結晶構造解析によりへム結合型／非結合型ならびに DNA 結合型の立体構造を決定した。

## IV 呼吸鎖末端酵素の構造と機能

### Structural and Functional Studies on Respiratory Terminal Enzymes

村本和優

Muramoto, K.

呼吸鎖電子伝達系末端酵素であるヘム・銅酸素還元酵素 (HCOR) スーパーファミリーを対象として効率的なエネルギー変換機構の解明を目指して研究を進めてきた。A タイプ HCOR のプロトン輸送経路に関わる酵素内部のイオン結合部位について、リガンドであるアミノ酸残基の pKa を計算により解析した。A タイプ HCOR のアジ化物結合酸化型構造を決定した。

#### 発表論文 List of Publications

- I-1 Takehiko Tosha, Takashi Nomura, Takuma Nishiada, Naoya Saeki, Kouta Okubayashi, Raika Yamagiwa, Michihiro Sugahara, Takanori Nakane, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Go Ueno, Tetsunari Kimura, Tamao Hisano, Kazumasa Muramoto, Hitomi Sawai, Hanae Takeda, Eiichi Mizohata, Ayumi Yamashita, Yusuke Kanematsu, Yu Takano, Eriko Nango, Rie Tanaka, Osamu Nureki, Osami Shoji, Yuka Ikemoto, Hironori Murakami, Shigeki Owada, Kensuke Tono, Makina Yabashi, Masaki Yamamoto, Hideo Ago, So Iwata, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Minoru Kubo: “Capturing an initial intermediate during the P450nor enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate” *Nature Communications*, 8, e1585 (2017)
- I-2. Erina Terasaka, Kenta Yamada, Po-Hung Wang, Kanta Hosokawa, Raika Yamagiwa, Kimi Matsumoto, Shoko Ishii, Takaharu Mori, Kiyoshi Yagi, Hitomi Sawai, Hiroyuki Arai, Hiroshi Sugimoto, Yuji Sugita, Yoshitsugu Shiro, Takehiko Tosha: “Dynamics of nitric oxide controlled by protein complex in bacterial system” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 9888-9893 (2017)
- I-3 Raika Yamagiwa, Takuya Kurahashi, Mariko Takeda, Mayuho Adachi, Hiro Nakamura, Hiroyuki Arai, Yoshitsugu Shiro, Hitomi Sawai, Takehiko Tosha: “*Pseudomonas aeruginosa* overexpression system of nitric oxide reductase for *in vivo* and *in vitro* mutational analyses” *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1859, 333-341 (2018)
- I-4 O. Shoji, S. Yanagisawa, J. K. Stanfield, K. Suzuki, Zhiqi Cong, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: “Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol by Cytochrome P450BM3 Triggered

- by Amino Acid Derivatives” *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 10324-10329 (2017)
- I-5 K. Suzuki, J. K. Stanfield, O. Shoji, S. Yanagisawa, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: “Control of Stereoselectivity of Benzylic Hydroxylation Catalysed by Wild type Cytochrome P450BM3 Using Decoy Molecules” *Catal. Sci. Technol.* **7**, 3332-3338 (2017)
- I-6 Gonska N, Young D, Yuki R, Okamoto T, Hisano T, Antonyuk S, Hasnain SS, Muramoto K, Shiro Y, Tosha T, Ädelroth P. “Characterization of the quinol-dependent nitric oxide reductase from the pathogen *Neisseria meningitidis*, an electrogenic enzyme.” *Scientific Reports* **8**, 3637 (2018).
- I-7 山際 来佳、澤井 仁美、當舎 武彦、中村 寛夫、新井 博之、城 宜嗣: “一酸化窒素還元酵素の基質輸送経路に存在するアミノ酸残基の役割” 「物質階層原理研究」第1回春期研究会御殿場高原ホテル、2017年5月12-13日
- I-8 山際 来佳、澤井 仁美、當舎 武彦、中村 寛夫、新井 博之、城 宜嗣: “膜内在性一酸化窒素還元酵素における効率的なNO還元反応のための仕組み” 第17回日本蛋白質科学会年会仙台国際センター、2017年6月20-22日
- I-9 R. Yamagiwa, H. Sawai, T. Tosha, H. Nakamura, H. Arai, M. Yamamoto, Y. Shiro: “Mechanism for efficient NO reduction in nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*.” RIKEN Summer School, Kazusa Arc, September 1-2 (2017)
- I-10 山際 来佳、澤井 仁美、當舎 武彦、中村 寛夫、新井 博之、城 宜嗣: “膜内在性一酸化窒素還元酵素cNORの保存されたバリニン残基の役割” 第55回生物物理学会年会、熊本大学、2017年9月19-21日
- I-11 倉橋 拓也、山際 来佳、武田 真理子、新井 博之、澤井 仁美、當舎 武彦、城 宜嗣: “緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の保存されたグルタミン酸残基の役割” 2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸ポートアイランド、2017年12月6-9日
- I-12 岡本拓也、Arif Jamali、村本和優、當舎武彦、城宜嗣 髄膜炎菌由来一酸化窒素還元酵素の結晶化と速度論的解析 日本生体エネルギー研究会第42回討論会 京都産業大学むすびわざ館 2017年12月19日～21日
- II-1 H. Sawai, Y. Shiro: “Haem-based sensors of dioxygen” Chapter 3 of RSC Metallobiology Series No. 11, *Gas Sensing in Cells*, Edited by Shigetoshi Aono, The Royal Society of Chemistry, pp. 47-83 (2017)
- II-2 Hitomi Sawai “Intra- and inter-molecular signal transduction mechanisms of heme sensing systems” 7<sup>th</sup> Congress of the International BioIron Society Conference, University of California Los Angeles (USA), May 7-11 (2017)
- II-3 澤井 仁美 “完全な酸素センシングシステムにおける分子内および分子間のシグナル伝達

機構” 第17回蛋白質科学会年会 新学術領域研究「酸素生物学」共催ワークショップ「酸素センシングの蛋白質科学」、仙台国際センター、2017年6月20日

- III-1 Y. Naoe, N. Nakamura, Md. M. Rahman, T. Tosha, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural Basis for the Capture and Transfer of Heme by Periplasmic Heme-Binding Proteins in a Bacterial Heme-Acquisition System” *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* **85**, 2217- 2230 (2017)
- III-2 H. Uehara, Y. Shisaka, T. Nishimura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Miyake, H. Shinokubo, Y. Watanabe, O. Shoji: “Structure of the Heme Acquisition Protein HasA with Iron(III)-5, 15-Diphenyl-Porphyrin and Derivatives Thereof as an Artificial Prosthetic Group” *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 1-6 (2017)
- III-3 M. Ganasen, H. Sawai, H. Togashi, H. Takeda, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural insights into ascorbate-dependent ferric reductase, Dcytb, in human” 7<sup>th</sup> Congress of the International BioIron Society Conference, University of California Los Angeles (USA), May 7-11 (2017)
- III-4 M. Ganasen, H. Sawai, S. Nagatoishi, H. Togashi, H. Takeda, K. Tsumoto, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural analysis of a human duodenal ferric reductase, Dcytb.” The 17<sup>th</sup> annual meeting of the protein science society of Japan, Sendai International Center, June 20-22 (2017)
- III-5 西永 恵、村木 則文、杉本 宏、青野 重利、城 宜嗣、澤井 仁美 “新規なヘムセンサータンパク質による転写調節の分子メカニズム” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、2017年12月9日
- III-6 M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: “Structural insights into ferric reduction mechanism by a human duodenal ferric reductase, Dcytb.” Leading program conference “Science and Society: Roles of Basic Science in Drug Discovery”, CAST, December 4-5 (2017)
- IV-1 村本和優 pKa analysis of the proton transfer pathway in respiratory A-type heme-copper oxygen reductase. 日本生物物理学会第55回年会 熊本大学 黒髪北地区 2017年9月19日～9月21日

## 大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

Menega Ganasen : ヒト由来鉄還元酵素 Dcytb の構造機能解析

Muhamad Arif Mohanmad Jamali : キノール依存性一酸化窒素還元酵素の結晶化

#### 博士後期課程

山際来佳：一酸化窒素還元酵素の変異体調製とそれらの機能構造解析

武田英恵：緑膿菌一酸化窒素還元酵素の短寿命反応中間体の構造機能解析

#### 博士前期課程

岡本拓也：髄膜炎菌由来キノール依存性一酸化窒素還元酵素の精製、速度論的解析

西園陽子：二成分情報伝達酸素センサータンパク質の構造解析

細川寛太：脱窒菌酵素群の複合体構造解析：電子顕微鏡用試料の調製法の確立

倉橋拓也：一酸化窒素還元酵素の変異体調製とそれらの結晶化

### 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 27～29 年度）基盤研究 C  
研究課題：呼吸鎖末端酵素における効率的エネルギー変換機構の普遍性と多様性の構造基盤  
研究代表者：村本和優
- 2 文部科学省科学研究費補助金（平成 26-30 年度）基盤研究 S  
研究課題：一酸化窒素の生体内動態の分子科学  
研究代表者：城 宜嗣  
研究分担者：澤井仁美
- 3 共同研究費（理化学研究所）（平成 27-32 年）  
研究課題：統合的脂質科学「脂質-タンパク質の分子間相互作用の研究」  
研究代表者：澤井仁美
- 4 分子科学研究所との協力研究費 平成 29 年度  
研究課題：溶連菌由来ヘムセンサータンパク質による遺伝子発現制御機構の解明  
研究代表者：澤井仁美
- 5 共同研究費（理化学研究所）（平成 29-34 年）  
研究課題：物質階層原理研究  
研究代表者：城 宜嗣