

I 生体金属輸送システムの構造生物学研究

Structural Biology of Proteins in Metal Transport System

當舎武彦・杉本 宏

Tosha, T., Sugimoto, H.

微量金属元素は生体内の多くのタンパク質に結合して活性中心として利用されており、生理活性物質の生合成・代謝やエネルギー・情報変換などの様々な生体内反応に関与している。病原菌では増殖に必要な鉄を宿主（感染先）の体内に多量に含まれる赤血球のヘモグロビンからヘム（鉄-ポルフィリン錯体）を奪い取って補給している。このことから、病原菌のヘム獲得戦略に関する研究は、感染症の予防や治療法の確立に貢献するとして、近年注目されている。病原菌および好熱菌のペリプラズム層に存在するヘム輸送タンパク質（PBP）について、本年度は共鳴ラマン分光解析および等温滴定型熱量測定法によってヘムの結合の特性を明らかにした。また、前年度までに行ったこれらの PBP の立体構造と他の菌種由来の PBP との構造比較により、ヘム結合に関与する配位子、疎水性残基、極性残基の構造的な多様性を明らかにした。

ヒトの非ヘム鉄の吸収には小腸の上皮細胞で発現している膜内在性の鉄還元酵素である Duodenal cytochrome *b*₅₆₁ (Dcytb) が関与している。Dcytb による鉄還元反応における分子内電子伝達や鉄イオン認識の分子機構を解明するために共鳴ラマン分光実験を行った。前年度に決定した結晶構造や生化学実験による解析と合わせ、食物に含まれるアスコルビン酸や有機酸が鉄分の吸収効率を向上させる仕組みを原子レベルで明らかにした。

II 金属タンパク質の構造機能解析

Structural and Functional Studies of Metalloproteins

當舎武彦・杉本 宏

Tosha, T., Sugimoto, H.

大型放射光施設 SPring-8 や X 線自由電子レーザー施設 SACLA を利用した種々の金属タンパク質の結晶構造や分光法を利用した時間分解構造解析、構造に基づいた生化学的な解析に基づいて触媒反応機構を明らかにする研究を行っている。本年度は、脱窒菌の脱窒過程に関与するタンパク質複合体の構造解析による細胞内連続化学反応機構の解明を目的として、脂質二重膜であるナノディスク内で安定に膜タンパク質が複合体を形成する条件の探索を行った。

また、SACLA の X 線自由電子レーザーを用いて、カビ由来一酸化窒素還元酵素 (チトクロム P450_{nor}) の酵素反応中に現れる反応中間体の構造解析を行った。昨年度に解析を行った第一の反応中間体に加えて、第二の反応中間体の配位構造を決定するためにデータ収集を行い、構造解析を進めている。そのほか、種々のヘム酵素の立体構造解析を行った。

発表論文 (List of publications)

- I-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)
- I-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)
- I-3 杉本宏, 城宜嗣: ヘム輸送体の立体構造と基質輸送メカニズム、*生物物理* 335, 5-8 (2018)
- I-4 杉本宏: バクテリアにおけるヘムの獲得と輸送の構造生物学、*日本結晶学会誌* 59, 166-173 (2017)
- I-5 杉本宏: ヘム輸送タンパク質の立体構造、*感染・炎症・免疫* 47, 41 (2017)
- I-6 杉本宏 「結晶構造から明らかになった病原菌ヘムトランスポーターの分子メカニズム」 第17回日本蛋白質科学会年会 (仙台)、2017年6月22日 (招待講演)
- I-7 杉本宏 「病原菌のヘム輸送タンパク質の立体構造と機能」 第41回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (東京)、2017年9月23日 (招待講演)
- I-8 H. Sugimoto: “Structural basis of the ABC heme transporter in iron uptake system of pathogenic bacteria.” 7th FEBS Special Meeting on ABC Proteins - ABC2018, Innsbruck, March 7, 2018 (招待講演)
- I-9 M. Ganasen, H. Sawai, H. Togashi, H. Takeda, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Structural insights into ascorbate-dependent ferric reductase, Dcytb, in human.” 7th Congress of the International BioIron Society Conference, May 7-11, 2017, Los Angeles (Poster)
- I-10 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 17th annual meeting of the protein science society of Japan, June 20-22, Sendai (Poster)
- I-11 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", June 20-22, 2017, Akou (Poster)
- II-1 E. Terasaka, K. Yamada, P.-H. Wang, K. Hosokawa, R. Yamagiwa, K. Matsumoto, S. Ishii, T. Mori, K. Yagi, H. Sawai, H. Arai, H. Sugimoto, Y. Sugita, Y. Shiro, T. Tosha: "Dynamics of Nitric Oxide Controlled by Protein Complex in Bacterial System" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 9888-9893 (2017)
- II-2 T. Tosha, T. Nomura, T. Nishida, N. Saeki, K. Okubayashi, R. Yamagiwa, M. Sugahara, T. Nakane, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, T. Kimura, T. Hisano, K. Muramoto, H. Sawai, H. Takeda, E. Mizohata, A. Yamashita, Y. Kanematsu, Y. Takano, E. Nango, R. Tanaka, O. Nureki, Y. Ikemoto, H. Murakami, S. Owada, K. Tono, M. Yabashi, M. Yamamoto, H. Ago, S. Iwata, H. Sugimoto, Y. Shiro, M. Kubo: "Capturing an Initial Intermediate during Enzymatic Reaction of P450nor using Time-Resolved XFEL Crystallography and Caged-Substrate" *Nat. Commun.* **8**, 1585 (2017)
- II-3 H. Onoda, O. Shoji, K. Suzuki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "α-Oxidative decarboxylation of fatty acids catalysed by cytochrome P450 peroxygenases yielding shorter-alkyl-chain fatty acids." *Catal. Sci. Technol.* **8**, 434 (2018)
- II-4 Shoji, S. Yanagisawa, J. K. Stanfield, K. Suzuki, Z. 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)
- II-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)
- II-6 K. Oohora, H. Meichin, Y. Kihira, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Hayashi: "A manganese(V) porphycene complex responsible for inert C–H bond hydroxylation in myoglobin matrix" *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 18460 (2017)
- II-7 K. Yasuda, Y. Yogo, H. Sugimoto, H. Mano, T. Takita, M. Ohta, M. Kamakura, S. Ikushiro, K. Yasukawa, Y. Shiro, T. Sakaki: "Production of an active form of vitamin D₂ by genetically engineered CYP105A1" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **486**, 336-341 (2017)
- II-8 K. Yasuda, H. Sugimoto, K. Hayashi, T. Takita, K. Yasukawa, M. Ohta, M. Kamakura, S. Ikushiro, Y. Shiro, T. Sakaki: "Protein Engineering of CYP105s for Their Industrial Uses" *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **1866**, 23-31 (2017)

- II-9 R. Yamagiwa, T. Kurahashi, M. Takeda, M. Adachi, H. Nakamura, H. Arai, Y. Shiro, H. Sawai, T. Tosha “*Pseudomonas aeruginosa* overexpression system of nitric oxide reductase for *in vivo* and *in vitro* mutational analyses” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1859**, 333-341 (2018)
- II-10 N. Gonska, D. Young, R. Yuki, T. Okamoto, T. Hisano, S. Antonyuk, S. S. Hasnain, K. Muramoto, Y. Shiro, T. Tosha, P. Ädelroth “Characterization of the quinol-dependent nitric oxide reductase from the pathogen *Neisseria meningitidis*, an electrogenic enzyme” *Scientific Reports* **8**, 3637 (2018)
- II-11 T. Halsted, K. Yamashita, K. Hirata, H. Ago, G. Ueno, T. Tosha, R. Eady, S. Antonyuk, M. Yamamoto, S. Hasnain “An unprecedented dioxygen species revealed by serial femtosecond rotation crystallography in copper nitrite reductase” *IUCrJ* **5**, 22-31 (2018)
- II-12 T. Tosha ”Time-resolved XFEL crystallography and in crystallo spectroscopy for probing reaction dynamics of respiratory metalloenzymes” 5th BioXFEL International Conference, Feb. 13-15, 2018, New Orleans, USA (招待講演)
- II-13 當舎武彦「X線自由電子レーザーを用いた時間分解結晶構造解析による酵素反応の追跡」日本化学会第98春季年会(船橋)2018年3月20-23日(招待講演)
- II-14 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本 宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田 想、城 宜嗣、久保 稔「X線自由電子レーザーを利用した時間分解 X線結晶構造解析による酵素反応の観測」第44回生体分子科学討論会(秋田)、2017年6月23-24日(口頭発表)
- II-15 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本 宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田 想、城 宜嗣、久保 稔“Time-resolved X-ray crystallography at SACLA: Application to enzymatic reaction” 錯体化学会第67回討論会(札幌)、2017年9月16-18日(口頭発表)
- II-16 當舎武彦「X線自由電子レーザーを用いた時間分解結晶構造解析：酵素反応への応用」第55回日本生物物理学会年会(熊本)、2017年9月19日(招待講演)
- II-17 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本 宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田 想、城 宜嗣、久保 稔「酵素反応機構解明のためのX線自由電子レーザーを利用した時間分解X線結晶構造解析」第50回酸化反応討論会(横浜)、2017年11月11-12日(口頭発表)

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金(平成29~32年度)基盤研究B 課題番号17H03092
 研究課題 酵素超分子複合体形成による効率的な細胞内連続化学反応機構の解明
 研究代表者 當舎武彦
- 2 科学研究費補助金(平成29~30年度)新学術領域研究「動的構造生命」 課題番号17H05896
 研究課題 ヘムトランスポーターの動的結晶構造解析
 研究代表者 杉本 宏