

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。ヘムを含む二原子酸素添加酵素の構造は、本グループが世界で初めて報告したが、その構造を基盤にいくつかの変異体を調製し、活性測定を行い、酵素反応におけるいくつかのアミノ酸残基の役割について議論した。また、基質（トリプトファン）、阻害剤結合型酵素の結晶化も試みた。さらに、酵素、酸素、基質の反応を、共鳴ラマン分光法で追跡し、従来見つかっていない新しい電子状態の反応中間体を発見した。脱窒菌の嫌気呼吸に関わる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、構造を基盤にしてその反応機構を議論した。電子伝達経路、プロトン輸送経路などが明らかとなり、好気呼吸の呼吸酵素（チトクロム酸化酵素）との関連で議論を展開した。多くの生物でセンサー蛋白質として機能している二成分情報伝達系（ヒスチジンキナーゼ／レスポンスレギュレーター複合体）の結晶構造を報告した。

II 生理活性天然物の生合成酵素群の構造と反応機構解析

Structure-Function Relationship of Enzymes Involved in Bioactive Natural Products

永野真吾

Nagano, S.

放線菌などの微生物は多くの有用な生理活性物質などを生産する。インドロカルバゾールと呼ばれる一群の化合物も微生物由来の抗生物質であり、Protein Kinase CやDNA Topoisomerase I の阻害活性を示すことから抗がん剤として期待されている。我々はこれらの化合物群の中でスタウロスポリンの骨格構造を作り出す鍵酵素 StaP の結晶構造を平成19年度に解明したが、本年度はその構造に基づいた DFT QM/MM 計算と変異体の活性測定などの生化学的解析を進めた。理論計算は、我々が結晶構造から推定したように基

質から一電子を引き抜いてインドールラジカルを生じることを支持する結果を与えた。さらに骨格構造を構築するために必要な分子内 C-C 結合反応は、第二の電子引き抜き反応とカップルした **bond formation coupled electron transfer (BFCET)** によって進められていることが示された。これら一連の反応には基質-酵素間のプロトンの授受が重要となるが、活性部位の **His250** と二つの水分子によって基質-酵素間に適切な水素結合ネットワークがつくられプロトンの移動を可能にしていることが示唆された。

発表論文 List of Publications

- I-1 Y. Nishino, K. Yamamoto, S. Kimura (茨城大), A. Kikuchi (理研), Y. Shiro, T. Iyanagi: “Mechanistic Studies on the Intramolecular One-electron Transfer between the Two Flavins in the Human Endothelial NOS Reductase Domain” *Arch. Biochem. Biophys.* **465**, 254-265 (2007)
- I-2 H. Sugimoto (理研), R. Shinkyō (京大), K. Hayashi (富山県大), S. Yoneda (京大), M. Yamada (富山県大), M. Kamakura (富山県大), S. Ikushiro (富山県大), Y. Shiro, T. Sakaki (富山県大): “Crystal Structure of CYP105A1 (P450SU-1) in Complex with 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃” *Biochemistry* **47**, 4017-4027 (2008)
- I-3 L. W. Chung (京大), X. Li (京大), H. Sugimoto, Y. Shiro, K. Morokuma (京大): “Density Functional Theory Study on a Missing Piece in Understanding of Heme Chemistry: The Reaction Mechanism from Indoleamine 2,3-dioxygenase and Tryptophan 2,3-dioxygenase” *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12299-12309 (2008)
- I-4 K. Hayashi (富山県大), H. Sugimoto (理研), R. Shinkyō (京大), M. Yamada (富山県大), S. Ikeda (富山県大), S. Ikushiro (富山県大), M. Kamakura (富山県大), Y. Shiro, T. Sakaki (富山県大): “Structure-based Design of a Highly Active Vitamin D Hydroxylase from *Streptomyces griseolus* CYP105A1” *Biochemistry* **47**, 11964-11972 (2008)
- II-1 S. Hirano (理研), S. Asamizu (富山県大), H. Onaka (富山県大), Y. Shiro, S. Nagano: “Crystal Structure of VioE, a Key Player in the Construction of the Molecular Skeleton of Violacein” *J. Biol. Chem.* **283**, 6459-6466 (2008)

大学院生命科学研究科

博士前期課程

米谷依梨紗：二原子酸素添加酵素の変異体調製と構造機能解析

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年度）特定領域研究(2) 課題番号 20050033
研究課題 時間分割共鳴ラマン分光法による二原子酸素添加酵素の構造ダイナミクス
研究代表者 城 宜嗣
- 2 日本学術振興会 科学研究費補助金（平成20年度）基盤研究(B) 課題番号 19310147
研究課題 短寿命な気体分子・呼吸酵素複合体の結晶構造から明らかにする呼吸機能の進化
研究代表者 永野真吾
- 3 文部科学省 科学研究費補助金（平成20年度）特定領域研究(2) 課題番号 20051026
研究課題 膜結合型一酸化窒素還元酵素の気体分子複合体の振動分光的解析
研究代表者 永野真吾