

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 N₂O 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。脱窒菌の一酸化窒素還元酵素は、鉄を活性中心に有する膜結合性タンパク質である。この酵素による NO 変換の分子機構を詳細に議論する為に、本年度から、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の酵素を、大腸菌 (*E. coli*) をホストとして発現させる系の構築を開始した。この発現系が確立され次第、各種変異体の調製とそれらの構造・機能解析を開始する予定である。

II 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.)

ヘム(鉄ポルフィリン錯体)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欠分子として機能し、ほぼ全ての生物が生命維持に利用する「生理活性物質」である。一方、タンパク質に結合していない遊離ヘムは、活性酸素源であるだけでなく細胞膜を透過できない性質を持ち細胞組織に沈着するため、酸化ダメージを誘起する「細胞毒」でもある。生物にとってヘムは「両刃の剣」の化合物であるため、生体内にはヘム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。しかし、その制御に関連する遺伝子やタンパク質の同定が遅れており、詳細なメカニズムは未解明である。本年度からは、生体内ヘム動態の解明を目的として、ヘムの感知・輸送・利用に関与する新規なタンパク質の構造機能解析を開始した。

乳酸菌は、細胞内に過剰に存在する遊離ヘムを細胞外に排出するシステムを有しており、ヘム

排出に関連するタンパク質が同定されている。本研究では、遊離ヘムの感知によりヘム排出トランスporter遺伝子の転写調節を行う HrtR を研究対象とした。HrtR のヘム感知に伴う転写調節機構を明らかにするために、生化学的手法による機能解析とヘム結合/非結合状態での X 線結晶構造解析を行った。その結果、HrtR ではヘムの結合に伴い標的 DNA 結合ドメインの相対位置が変化し、標的 DNA から解離することを明らかにした。本成果は、エフェクター分子の結合/非結合に伴う転写調節因子の機能制御機構を分子レベルで明らかにした世界初の例となった。

ヒトは、食餌・生合成・赤血球分解による再利用により、ヘムを獲得することが明らかになっている。しかし、獲得したヘム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。その主な原因は、ヘムを細胞内や細胞間で輸送するタンパク質が近年まで同定されておらず、詳細な分子メカニズムが未解明である点にある。本年度からは、真核生物のヘム輸送機構の分子レベルでの解明を目指し、近年同定された真核生物のヘム輸送タンパク質 HRG の構造機能解析を開始した。大腸菌組換えにより調製した HRG を高純度に精製する方法を確立し、精製標品の結晶化スクリーニングで微小結晶を調製することができた。今後、結晶化条件を最適化し X 線結晶構造解析を行う。

III 呼吸鎖電子伝達系末端酵素の構造と機能

Structural and functional studies on terminal enzymes of the electron transport system in the respiratory chain

村本和優

Muramoto, K.

生体エネルギー変換は膜蛋白質超分子複合体によって駆動され、エネルギー効率の高いその分子機構は極めて興味深い。エネルギー変換機構の本質を理解するためには、高精度の構造情報に基づいた機能解析が不可欠である。我々は、ミトコンドリアならびに細菌呼吸鎖電子伝達系の末端酵素を対象として、電子伝達と共役したプロトン能動輸送のエネルギー変換機構の解明を目指して、X 線結晶構造解析と機能解析に基づいた研究教育に地道に取り組んでいる。

発表論文 List of Publications

- II-1 Tsujino H, Yamashita T, Nose A, Kukino K, Sawai H, Shiro Y, Uno T. Disulfide bonds regulate binding of exogenous ligand to human cytoglobin. *J. Inorg. Biochem.* 135, 20-27 (2014)

- II-2 澤井仁美・城宜嗣 サイトグロビンの分子構造 細胞 45 (13), 9-12 (2013)
- II-3 Sawai H, Sugimoto H, Shiro Y, Aono S. Molecular mechanisms of the transcriptional regulation by heme sensing. 16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 22-26 (2013) Grenoble, France (poster)
- III-1 村本和優・岩本唯・大島海人・城宜嗣 C型プロトンポンプ性酸素還元酵素の精製結晶化 : 日本生体エネルギー研究会第39回討論会 (静岡, 2013)
- III-2 岩本唯・安藤友里子・城宜嗣・村本和優 pH dependence of the oxygen consumption activity of the C-type heme-copper oxygen reductase. 日本生物物理学会第51回年会 (京都, 2013)
- III-3 Kenji Takagi, Ayaka Kishimoto, Aya Amano, Keisuke Sakurai, Kazumasa Muramoto, Tsunehiro Mizushima and Hideo Shimada. Heme serves as scaffold for substrate-driven active site structuring in cytochrome P450cam. 日本生物物理学会第51回年会 (京都, 2013)
- III-4 村本和優・望月正雄・矢野直峰・武村秀平・川原貴子・蓼原瞳・前田友子・伊藤-新澤恭子・山下栄樹・月原富武・吉川信也 Structural analysis of bovine heart cytochrome *c* oxidase in the cyanide- and azide-bound fully oxidized states. 日本生物物理学会第51回年会 (京都, 2013)
- III-5 村本和優・望月正雄・谷口槇・矢野直峰・武村秀平・長尾修平・馬場淳平・前田友子・伊藤-新澤恭子・山下栄樹・月原富武・吉川信也 Structural analysis of bovine heart cytochrome *c* oxidase in the CO- and cyanide-bound mixed valence states. 日本生物物理学会第51回年会 (京都, 2013)
- III-6 矢野直峰・加藤公児・山下栄樹・村本和優・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也 ウシ心筋チトクロム酸化酵素のMgを含む水クラスターの機能の高分解能X線構造解析による研究 : 第13回日本蛋白質科学会年会 (鳥取, 2013)
- III-7 武村秀平・加藤公児・矢野直峰・山下栄樹・村本和優・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也 ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸性アミノ酸残基のイオン化状態のX線結晶学的解析 : 第13回日本蛋白質科学会年会 (鳥取, 2013)

大学院生命科学研究科

博士前期課程

岩本 唯 : C型チトクロム酸化酵素の精製と活性測定

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 25 年度) 基盤研究 B

研究課題 ヘム・銅酸素還元酵素のエネルギー変換機構解明のための構造・機能解析

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 25-27 年度）若手研究(B)

研究課題 ヘムシャペロン HRG-3 による細胞間ヘム輸送の分子機構

研究代表者 澤井仁美

3 第5回 資生堂女性研究者サイエンスグラント

研究課題 細胞内ヘム濃度の恒常性維持に関わる分子機構の解明

研究代表者 澤井仁美

4 平成 25 年度 公立大学法人兵庫県立大学特別教育研究助成金 若手研究者支援

研究課題 生体内ヘム輸送の分子科学を基盤とする寄生原虫に特異的な阻害剤の設計

研究代表者 澤井仁美

5 平成 25 年度 公益財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団 教育研究助成

研究課題 ヒトおよび寄生原虫由来ヘム輸送蛋白質のX線結晶構造解析

研究代表者 澤井仁美

6 公益財団法人ひょうご科学技術協会 学術研究助成

研究課題 高分解能X線結晶構造解析によるヘム輸送機構の解明

研究代表者 澤井仁美