

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 変換の分子機構を詳細に議論する為に、本年度は、まず、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の酵素を、大腸菌 (*E. coli*) ホストとして発現させる系を構築した。しかし、これにより得られた野生型 NOR は非ヘム鉄の代わりに亜鉛が結合した酵素が得られてしまい、酵素活性も極めて低かった。そこで、東大農学部の新井博之先生から NOR 遺伝子を破壊した緑膿菌 (RM495) を提供いただき、これをホストとした発現系構築を試みた。RM495 は NO の無毒化が出来ないため脱窒条件下では生育できない。RM495 に NOR 遺伝子をコードしたプラスミドを導入すると、生育可能となり、そこから活性な野生型 NOR を精製する事に成功した。また、RM495 を使った NOR 変異体の簡便な活性・不活性のスクリーニング系も確立した。また、緑膿菌内で NO を拡散させない仕組みとして、亜硝酸還元酵素 NiR (NO 産生酵素) と NOR (NO 除去酵素) との複合体形成を昨年度までに報告していたが、今年度からはさらに NiR-NOR 複合体とそれらへの電子供与体 (チトクロム c551、アズリン) との超分子複合体の結晶化に取り組み始めた。

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、FixL/FixJ システムの構造機能解析を開始した。本年度は、大豆根粒菌由来の FixL と FixJ の大腸菌における発現系とそこからの精製系を確立した。さらに、構造情報を得る為に、それらの X 線小角散乱測定ならびに結晶化を開始した。

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.

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。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、ヘムを獲得することが明らかになっているが、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。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 (Heme Responsive Gene) の構造機能解析をおこなっている。酵母をホストとした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を開始した。

発表論文 List of Publications

- I-1 Hirata K, Shinzawa-Itoh K, Yano N, Takemura S, Kato K, Hatanaka M, Muramoto K, Kawahara T, Tsukihara T, Yamashita E, Tono K, Ueno G, Hikima T, Murakami H, Inubushi Y, Yabashi M, Ishikawa T, Yamamoto M, Ogura T, Sugimoto H, Shen J-R, Yoshikawa S, Ago H.
“Determination of damage-free crystal structure of an X-ray sensitive protein using an XFEL.”
Nature Methods **11**, 734–736 (2014)
- I-2 E. Terasaka, N. Okada, N. Sato, Y. Sako, Y. Shiro, T. Tosha: “Characterization of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*: Enzymatic activity and active site structure.” *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 1019-1026 (2014)
- I-3 H. Tsujino, T. Yamashita, A. Nose, K. Kukino, H. Sawai, Y. Shiro, T. Uno: “Disulfide bonds regulate binding of exogenous ligand to human cytoglobin.” *J. Inorg. Biochem.* **135C**, 20-27 (2014)
- I-4 S. Takahashi, S. Nagano, T. Nogawa, N. Kanoh, M. Uramoto, M. Kawatani, T. Shimizu, T. Miyazawa, Y. Shiro, H. Osada: “Structure-function analyses of cytochrome P450revI involved in reveromycin A biosynthesis and evaluation of the biological activity of its substrate, reveromycin T.” *J. Biol. Chem.* **289**, 32446-32458 (2014)
- I-5 K. Takagi, M. Al-Amin, N. Hoshiya, J. Wouters, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Fukuda, S. Shuto, M. Arisawa: “Palladium-nanoparticle-catalyzed 1,7-palladium migration involving C-H activation, followed by intramolecular amination: regioselective synthesis of N1-arylbenzotriazoles and an evaluation of their inhibitory activity toward indoleamine 2,3-dioxygenase.” *J. Org. Chem.* **79**, 6366-6371 (2014)
- I-6 Z. Cong, O. Shoji, C. Kasai, N. Kawakami, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: “Activation of Wild-Type Cytochrome P450BM3 by the Next Generation of Decoy Molecules: Enhanced Hydroxylation of Gaseous Alkanes and Crystallographic Evidence.” *ACS Catalysis* **5**, 150-156 (2014)
- I-7 C. Shirataki, O. Shoji, M. Terada, S. Ozaki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: “Inhibition of Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* by its Hemophore (HasA_p) Bound to Synthetic Metal Complexes.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2862-2866 (2014)
- I-8 Y. Okamoto, A. Onoda, H. Sugimoto, Y. Takano, S. Hirota, D.M. Kurtz, Y. Shiro, T. Hayashi: “H₂O₂-dependent substrate oxidation by an engineered diiron site in a bacterial hemerythrin.” *Chem. Commun.* **50**, 3421-3423 (2014)
- I-9 村本和優：呼吸鎖電子伝達系プロトンポンプ性C型ヘム・銅酸素還元酵素（チトクロム *cbb*₃）の電子伝達活性 日本生体エネルギー研究会第40回討論会（松山, 2014）

- I-10 村本和優：生体膜を介した高効率なエネルギー変換機構 ～呼吸鎖電子伝達系を例に～
第3回異分野融合若手研究者*Science & Technology*クラブ（姫路, 2014）
- I-11 Yoshikawa S, Yano N, Shinzawa-Itoh K, Muramoto K, Yamashita E, Tsukihara T. “Improved X-ray structures of bovine heart cytochrome *c* oxidase reveal redox-driven proton active transports by Mg²⁺-containing water cluster.” *The 18th European Bioenergetics Conference* (Lisbon, Portugal, 2014)
- I-12 矢野直峰・武村秀平・前田友子・村本和優・山下栄樹・伊藤(新澤)恭子・月原富武・吉川信也：高分解能X線結晶構造解析によって明らかになったチトクロム*c* 酸化酵素のプロトンポンプ反応過程におけるMgを含む水クラスターの機能 第14回日本蛋白質科学会年会（横浜, 2014）
- I-13 川原貴子・長尾修平・島田敦広・矢野直峰・武村秀平・前田友子・村本和優・伊藤(新澤)恭子・山下栄樹・月原富武・吉川信也：CN⁻結合酸化型およびCN⁻結合部分還元型チトクロム*c* 酸化酵素の高分解能X線結晶構造解析 第14回日本蛋白質科学会年会（横浜, 2014）
- I-14 馬場淳平・島田敦広・矢野直峰・山下栄樹・武村秀平・前田友子・村本和優、伊藤(新澤)恭子・月原富武・吉川信也：CO結合型ウシ心筋チトクロム*c* 酸化酵素に対する高分解能X線結晶構造解析法を用いた金属酸化還元中心によるプロトンポンプ制御機構の解明 第14回日本蛋白質科学会年会（横浜, 2014）
- I-15 大島海人・岩本唯・村本和優・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 第6回日本生物物理学会中国四国支部大会（鳥取, 2014）
- I-16 山際来佳・澤井仁美・當舎武彦・中村寛夫・城宜嗣：緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の組換え体の調製とVal206の役割 第87回日本生化学会大会（国立京都国際会館 京都市, 2014年10月15～18日）（ポスター）
- I-17 山際来佳・澤井仁美・當舎武彦・中村寛夫・城宜嗣：緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の組換え体の調製 第6回日本生物物理学会中国四国支部大会（とりぎん文化会館 鳥取市, 2014年5月17日～18日）（ポスター）
- III-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)

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

Menega Ganasen : 線虫由来 HRG4 の構造機能解析

博士前期課程

大島海人 : 一酸化窒素還元酵素と電子供与タンパク質の精製及び共結晶化

山際来佳 : 一酸化窒素還元酵素の組み替え体調製方法の確立

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 26 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 公益財団法人ひょうご科学技術協会 平成 26 年度 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
- 4 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
研究分担者 澤井仁美
- 5 公益信託山村富美記念女性自然科学者研究助成基金 研究助成「山村フェロー」
研究課題 新規な酸素センサータンパク質 Aer2 の構造機能解析および細胞内酸素濃度
センサーの創製
研究代表者 澤井仁美
- 6 理化学研究所との共同研究費
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