

Supramolecular Structural Biology

細胞膜超分子複合体機能解析学

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を用いて様々な金属蛋白質・金属酵素の結晶構造や溶液構造を解析し、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明らかにしている。特に、地球上の窒素循環において重要な働きをしている脱窒菌の一酸化窒素還元酵素（膜結合型蛋白質）の構造機能解析の成果は近年世界的にも高く評価されている。本年度は、*Pseudomonas aeruginosa* の一酸化窒素産生酵素（亜硝酸還元酵素）と一酸化窒素消去酵素（一酸化窒素還元酵素）の複合体形成における相互作用解析を行った。また、一酸化窒素還元酵素の組替え体の発現系構築に成功し、変異体解析を行った。これらの結果および結晶構造を基に、細胞毒性の高い一酸化窒素 NO を細胞内に拡散させることなく消去するためのメカニズムを提案した。

II 生体内の金属動態の構造生物学的研究

Structural Biology on Metal Dynamics in Cell

杉本 宏

Sugimoto, H.

微量生体金属元素の細胞内への吸収・運搬・濃度感知などの生体内動態に関わるタンパク質の分子機能と作動機構を解明することを目的とし、関連する膜タンパク質の立体構造解析を進めている。病原性細菌は宿主体内に多く存在するヘモグロビンからヘム（鉄-ポルフィリン錯体）を奪いとり、膜内在型のヘムトランスポーターを利用して細胞内に取り込むことで増殖に利用している。本年度は、病原菌由来ヘムインポーターの膜貫通サブユニットおよびヌクレオチド結合サブユニットの複合体の結晶構造を決定し、構造変化の機構に関して議論した。一方、ヒ

トの腸管での鉄イオン吸収では鉄還元酵素 Dcytb が関与している。Dcytb の酸化還元反応について速度論的解析を行い、膜を貫通する電子伝達機構の特徴を議論した。

発表論文 List of Publications

- I-1 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-2 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-3 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-4 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-5 石井頌子・木村哲就・當舎武彦・城宜嗣。久保稔：一酸化窒素還元酵素における基質 NO 結合の分子機構 第 52 回日本生物物理学会年会 (札幌コンベンションセンター 札幌市, 2014 年 9 月 27 日)
- I-6 松本喜慎・寺坂瑛里奈・當舎武彦・城宜嗣：Analysis of the Interaction between Nitric Oxide Reductase and Nitrite Reductase 第 52 回日本生物物理学会年会 (札幌コンベンションセンター 札幌市, 2014 年 9 月 27 日)
- I-7 松本喜慎・寺坂瑛里奈・當舎武彦・城宜嗣：亜硝酸還元酵素と一酸化窒素還元酵素の相互作用解析 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)
- I-8 松本喜慎・寺坂瑛里奈・當舎武彦・城宜嗣：亜硝酸還元酵素と一酸化窒素還元酵素の相互作用解析 第 14 回日本蛋白質科学会年会 (ワークピア横浜/横浜産貿ホール 横浜市, 2014 年 6 月 25～27 日) (ポスター)

- II-1 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)
- II-2 K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, M. Hatanaka, K. Muramoto, T. Kawahara, T. Tsukihara, E. Yamashita, K. Tono, G. Ueno, T. Hikima, H. Murakami, Y. Inubushi, M. Yabashi, T. Ishikawa, M. Yamamoto, T. Ogura, H. Sugimoto, J.R. Shen, S. Yoshikawa, H. Ago: "Determination of damage-free crystal structure of an X-ray-sensitive protein using an XFEL." *Nat. Methods* **11**, 734-736 (2014)
- II-3 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)
- II-4 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)
- II-5 中村希・直江洋一・土井章弘・杉本宏・城宜嗣：病原菌由来ヘムトランスポーターの X 線結晶構造解析 平成 26 年度 日本結晶学会年会（東京大学 2014 年 11 月 1 日）
- II-6 中村希・直江洋一・土井章弘・城宜嗣・杉本宏 "Conformational change of periplasmic heme-binding protein in ABC transporter." 23rd Congress and general assembly of the international union of crystallography (Montreal, Canada, 2014 年 8 月 5~12 日)
- II-7 中村希・直江洋一・杉本宏・城宜嗣：病原菌由来ヘム結合タンパク質における柔軟なヘム認識 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）

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

Md. Mahfuzur Rahman：ヘムトランスポーターの構造機能解析

博士前期課程

石井頌子：一酸化窒素還元酵素反応中間体の解析

中村 希：ヘムトランスポーターの構造機能解析

松本喜慎：一酸化窒素還元酵素と亜硝酸還元酵素との相互作用解析

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 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
- 2 文部科学省 科学研究費補助金（平成 25～26 年度）新学術領域研究「構造細胞生物学」
研究課題 病原微生物におけるヘム獲得システムの構造基盤
研究代表者 杉本 宏