

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 変換の分子機構を議論する為に、昨年度に構築した緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* RM495) を宿主とした NOR 発現系および *in vivo* スクリーニング系を使って、活性・不活性 NOR 変異体の簡便なスクリーニングを行い、中でも興味深い変異体のいくつかを調製、精製し、それらの酵素活性・分光測定ならびに結晶化を行った。また、時分割赤外分光紫外レーザー照射によりマイクロ秒の時間領域で NO を発生できる「ケージド NO」と解析により、NOR 酵素反応中に現れる短寿命 (数マイクロ秒) 反応中間体の構造・電子状態解析を開始した。

キノール依存性一酸化窒素還元酵素 (qNOR) の活性型構造を決定するため、髄膜炎菌 qNOR の発現、精製条件を確立した。さらに、X 線結晶解析に取り組み、4.2 Å 分解能の電子密度を得た。キノールアナログ分子 (メナジオール) を基質として髄膜炎菌 qNOR による NO 消費活性を実証した。

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

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、高純度に精製した全長 FixL と全長 FixJ の複合体の X 線小角散乱測定に成功した。今まで報告されている各々のドメイン結晶構造を、我々が昨年度決定した全長 FixJ の立体構造 (1.8Å 分解能) を基盤に、FixL-J 複合体の構造モデルを構築した。このモデル構造を基盤に、FixL から FixJ へのリン酸基転移メカニズムを提案した。

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.

鉄は、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因子として機能し、ほぼ全ての生物が生命維持に利用されている。一方、タンパク質に結合していない鉄は、活性酸素源として酸化ダメージを誘起する「細胞毒」でもある。生物にとって鉄は「両刃の剣」であるため、生体内には鉄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。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、鉄を獲得することが明らかになっているが、獲得した鉄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。食餌中の鉄のほとんどは酸化鉄であるが、それが十二指腸の絨毛で吸収される際、絨毛の細胞膜に局在する鉄還元酵素 Dcytb によって還元鉄に変換され、細胞内に取り込まれる。ヒトの鉄吸収で重要な役割を担う酵素 Dcytb による鉄還元反応のメカニズムを、その分子構造を基盤に明らかにする事を目的に、脂質キュービックフェーズ (LCP) 法による結晶化をおこない、単結晶の調製に成功した。SPring-8 を用いた X 線結晶構造解析により 2.6Å 分解能の立体構造決定に成功した。さらに、鉄結合部位に亜鉛-アスコルビン酸が結合した Dcytb の構造解析にも成功し、Dcytb による鉄還元反応のメカニズムの全容解明のための構造情報を得た。

IV 呼吸鎖末端酵素の構造と機能

Structural and Functional Studies on Respiratory Terminal Enzymes

村本和優

Muramoto, K.

呼吸鎖電子伝達系末端酵素であるヘム・銅酸素還元酵素 (HCOR) スーパーファミリーを対象として効率的なエネルギー変換機構の解明を目指して研究を進めてきた。A タイプ HCOR の 1.5 Å 分解能酸化型構造と 1.6 Å 分解能還元型構造の X 線結晶解析を完了した。プロトン輸送経路と推定される酵素内部の水クラスターについて、HCOR スーパーファミリーに属する 9 種の酵素構造の比較解析を行った。

発表論文 List of Publications

- I-1 O. Shoji, T. Fujishiro, K. Nishio, Y. Kano, H. Kimoto, S.-C. Chien, H. Onoda, A. Muramatsu, S. Tanaka, A. Hori, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "A Substrate-Binding-Sate Mimic H₂O₂-Dependent Cytochrome P450 Produced by One-point Mutagenesis and Peroxygenation of Non-native Substrate" *Catalysis Science & Technology* **6**, 5806-5811 (2016)
- I-2 T. Tosha and Y. Shiro "Structure and Function of Nitric Oxide Reductases" in *Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts* (Royal Society of Chemistry Metallobiology Series), I. Moura, J. J. G. Moura and S. R. Pauleta Ed., 2016, p114-140
- I-3 Shiro, Y.: "Molecular Mechanism of NO Reduction by Bacterial Nitric Oxide Reductases" 229th *ECS Meeting*, San Diego, USA, May 29 – June 3 (2016)
- I-4 Kubo, M., Nomura, T., Nishida, T., Tosha, T., Sugimoto, H., Kimura, T., Takano, Y., Yamashita, K., Hirata, K., Ueno, G., Ago, H., Yamamoto, M., Shiro, Y.: "Damage-free X-ray Crystallographic Analysis of P450nor in the NO Bound Form using SACLA." British Biophysical Society 2016 Biennial Meeting, Liverpool, UK, July 7 (2016)
- I-5 Shiro, Y.: "NO Dynamics in Biology: Its Generation and Decomposition" Royal Society Meeting Inorganic Chemistry, Osaka, Oct. 26 (2016)
- I-6 山際来佳、澤井仁美、當舎武彦、中村寛夫、新井博之、城宜嗣「膜貫通型一酸化窒素還元酵素の変異体解析によるNOおよびH⁺輸送経路の解明 (ポスター)」第16回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場、2016年6月7日
- I-7 山際来佳、武田真梨子、澤井仁美、當舎武彦、中村寛夫、新井博之、城宜嗣「緑膿菌由来

- 一酸化窒素還元酵素のNOおよびH⁺の輸送に関わるアミノ酸残基の役割 (ポスター)」第89回日本生化学会大会、仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス、2016年9月27日
- I-9 細川寛大、北西健一、山際来佳、新井博之、當舎武彦、城宜嗣「緑膿菌での組換え体発現系を利用した一酸化窒素還元酵素-亜硝酸還元酵素複合体の機能解析 (ポスター)」第89回日本生化学会大会、仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス、2016年9月27日
- I-10 村本和優、大島海人、當舎武彦、城宜嗣「緑膿菌一酸化窒素還元酵素によるシトクロムc₅₅₁およびアズリン酸化反応の速度論的解析」日本生体エネルギー研究会第42回討論会、名古屋工業大学 (名古屋市) 2016年12月19日～2016年12月21日
- I-11 結城力、岡本拓也、David Young、村本和優、當舎武彦、城宜嗣「髄膜炎菌由来一酸化窒素還元酵の活性測定と結晶化」日本生体エネルギー研究会第42回討論会、名古屋工業大学 (名古屋市)、2016年12月19日～2016年12月21日
- II-1 Otomo, A., Ishikawa, H., Mizuno, M., Kimura, T., Kubo, M., Shiro, Y., Aono, S., Mizutani, Y.: “A Study of the Dynamics of the Heme Pocket and C-helix in CoxA upon CO Dissociation Using Time-resolved Visible and UV Resonance Raman Spectroscopy.” *J. Phys. Chem. B* **120**, 7836-7843 (2016)
- II-2 T. Yamawaki, H. Ishikawa, M. Mizuno, H. Nakamura, Y. Shiro, Y. Mizutani: “Regulatory Implications of Structural Changes in Tyr201 of the Oxygen Sensor Protein FixL” *Biochemistry* **55**, 4027–4035 (2016)
- II-3 A. Saeki, G. S. A. Wright, T. Hikima, M. Yamamoto, S. V. Antonyuk, S. S. Hasnain, Y. Shiro, H. Sawai: “Overall Architectures of Two-Component Signal Transduction Proteins” 9th Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, Gyeongju, Korea, Nov.13-16 (2016)
- II-4 佐伯茜子、Wright, G. S. A., 引間孝明、Antonyuk, S. V., Hasnain, S. S., 城宜嗣、澤井仁美「窒素固定を制御する酸素適応システムFixL/FixJにおける分子内および分子間情報伝達機構 (ポスター)」第16回日本蛋白質科学会年会、福岡市、2016年6月7-9日
- II-5 西園陽子、佐伯茜子、久野玉雄、城宜嗣、澤井仁美「全長FixJのX線結晶構造解析による二成分情報伝達系における転写調節機構の解明 (ポスター)」第16回日本蛋白質科学会年会、福岡市、2016年6月7-9日
- III-1 Menega Ganasen, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, and Hitomi Sawai, “Structural insights into iron absorption mechanism in human duodenal by a membrane protein, Dcytb” University of Strasbourg-RIKEN workshop on membrane lipidology, Strasbourg, March 9-10, 2017 (oral)
- III-2 Menega Ganasen, Hitomi Sawai, Yoshitsugu Shiro, Hiroshi Sugimoto, “Structural Analysis of Human Duodenal Cytochrome b₅₆₁.” The 89th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Sendai, September 25-28, 2016 (poster)

- III-3 Menega Ganasen, Hitomi Sawai, Satoru Nagatoishi, Hiromi Togashi, Hanae Takeda, Kohei Tsumoto, Yoshitsugu Shiro, Hiroshi Sugimoto, “Structural insight into iron reduction mechanism in human duodenum by Dcytb” Leading Program Evaluation Conference, March 13-14, 2017 (poster)
- IV-1 Yano N[#], Muramoto K[#], Shimada A[#], Takemura S, Baba J, Fujisawa H, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S. (#equal contribution) “The Mg²⁺-containing water cluster of mammalian cytochrome *c* oxidase collects four pumping proton equivalents in each catalytic cycle.” *J. Biol. Chem.* **291**, 23882-23894 (2016).
- IV-2 村本和優 “Structural analysis of the proton transfer pathway in respiratory heme-copper oxygen reductase superfamily.” 日本生物物理学会第54回年会、つくば国際会議場（つくば市）、2016年11月25日～2016年11月27日
- IV-3 Inoue M, Shibata A, Imai M, Uchida T, Muramoto K, Shiro Y, Yoshikawa S, Ishimori K. Structural and functional characterization of nanodisc-reconstituted cytochrome *cbb₃* oxidase from *Vibrio cholerae*. 日本生物物理学会第54回年会、つくば国際会議場（つくば市）、2016年11月25日～2016年11月27日
- IV-4 Shimada A, Yano N, Muramoto K, Yamashita E, Shinzawa-Itoh K, Tsukihara T, Yoshikawa S. “High-resolution crystal structure of cytochrome *c* oxidase reveals the mechanism of highly efficient proton pumping.” 日本生物物理学会第54回年会、つくば国際会議場（つくば市）、2016年11月25日～2016年11月27日
- IV-5 月原富武、島田敦広、矢野直峰、村本和優、新澤・伊藤恭子、山下栄樹、吉川信也 “Detailed crystal structural studies of bovine cytochrome oxidase to elucidate the coupling mechanism of dioxygen reduction and proton pump.” 日本生物物理学会第54回年会、つくば国際会議場（つくば市）、2016年11月25日～2016年11月27日
- IV-6 Yoshikawa S, Yano N, Muramoto K, Shimada A, Baba J, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Tsukihara T. “The Mg²⁺-containing water cluster of mammalian cytochrome *c* oxidase collects four pumping proton equivalents in each catalytic cycle.” *The 19th European Bioenergetics Conference*, Riva del Garda (Italy) July 2 ~ 7, 2016
- IV-7 島田敦広、馬場淳平、山下栄樹、村本和優、伊藤-新澤恭子、月原富武、吉川信也「チトクロム酸化酵素の様々な反応中間体及び反応中間体類似物の構造から提唱されるプロトンポンプ機構」第16回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場（福岡市）、2016年6月7日～2016年6月9日

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

Menega Ganasen : ヒト由来鉄還元酵素 Dcytb の構造機能解析

Muhamad Arif Mohanmad Jamali : キノール依存性一酸化窒素還元酵素の結晶化

博士後期課程

山際来佳 : 一酸化窒素還元酵素の変異体調製とそれらの機能構造解析

博士前期課程

佐伯茜子 : 酸素センサータンパク質 FixL の X線小角散乱法による構造解析

武田英恵 : 緑膿菌一酸化窒素還元酵素の短寿命反応中間体の構造機能解析

西田拓真 : 脱窒カビ一酸化窒素還元酵素の短寿命反応中間体の XFEL 構造解析

結城 力 : 髄膜炎菌由来キノール依存性一酸化窒素還元酵素の機能解析

岡本拓也 : 髄膜炎菌由来キノール依存性一酸化窒素還元酵素の精製、結晶解析

西園陽子 : 二成分情報伝達酸素センサータンパク質の構造解析

細川寛太 : 脱窒菌酵素群の複合体構造解析 : 電子顕微鏡用試料の調製法の確立

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 27~29 年度) 基盤研究 C

研究課題 呼吸鎖末端酵素における効率的エネルギー変換機構の普遍性と多様性の構造
基盤

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 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

研究分担者 澤井仁美

3 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