

I 生体金属輸送システムの構造生物学研究

Structural Biology of Proteins in Metal Transport System

當舎武彦・杉本 宏
Tosha, T., Sugimoto, H.

微量金属元素は生体内の多くのタンパク質に結合して活性中心として利用されており、生理活性物質の生合成・代謝やエネルギー・情報変換などの様々な生体内反応に関与している。そのため、病原菌は増殖に必要な鉄を宿主（感染先）の体内に多量に含まれる赤血球のヘモグロビンからヘム（鉄-ポルフィリン錯体）を奪い取って補給している。病原菌が持っている ABC 型ヘムトランスポーターについて、低温電子顕微鏡による高分解能立体構造解析を行うための試料調整方法の確立に取り組んだ。3 つのタンパク質サブユニットが複合体を形成し、輸送基質が結合した状態での構造決定を目指しており、測定のための安定な試料を調製できる精製条件の検討を行った。また、共同研究で分子動力学計算を行い、ATP がヌクレオチド結合サブユニットへ結合することによって引き起こされる膜貫通領域のコンフォメーション変化の経路を予測した。

II 金属タンパク質の構造機能解析

Structural and Functional Studies of Metalloproteins

當舎武彦・杉本 宏
Tosha, T., Sugimoto, H.

大型放射光施設 SPring-8 や X 線自由電子レーザー施設 SACLA を利用し、金属タンパク質の結晶構造解析や時間分解構造解析に取り組み、得られた構造情報を基盤に分光計測や生化学的解析を組み合わせることで、金属タンパク質の反応機構の解明を目指している。本年度は、SACLA を用いて、カビ由来一酸化窒素還元酵素（チトクロム P450_{nor}）の触媒反応の鍵となる反応中間体の構造解析を行った。現在、構造に基づいた理論計算により、反応中間体の電子状態についての詳細を検討中である。他の金属酵素についても SACLA での時間分解計測にむけて準備を進めている。

発表論文 List of publications

- I-1. H. Onoda, O. Shoji, K. Suzuki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: α -Oxidative decarboxylation of fatty acids catalysed by cytochrome P450 peroxygenases yielding

- shorter-alkyl-chain fatty acids, *Catal. Sci. Technol.* 8, 434 (2018)
- I-2. M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, H. Asakura, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, Y. Nariai, T. Urano, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: Structural basis for promotion of duodenal iron absorption by enteric ferric reductase with ascorbate, *Commun. Biol.* 1, 120 (2018)
- I-3. K. Omura, Y. Aiba, H. Onoda, J. K. Stanfield, S. Ariyasu, H. Sugimoto, Y. Shiro, O. Shoji, Y. Watanabe: Reconstitution of full-length P450BM3 with an artificial metal complex by utilising the transpeptidase Sortase A, *Chem. Commun.* 54, 7892 (2018)
- I-4. M. Ganasen、富樫ひろ美、山下恵太郎、平田邦生、A. G. Mauk、城 宜嗣、澤井仁美、杉本宏: ヒト小腸の細胞膜で Dcytb が鉄分吸収を促進するメカニズム, 平成 30 年度結晶学会年会、(東京)、2018 年 11 月 10-11 日 (口頭発表)
- I-5. 野村高志、當舎武彦、杉本宏、久野玉雄、山際来佳、Chai Gopalasingam、山下恵太郎、平田邦生、山本雅貴、城宜嗣、久保稔: 時間分解赤外分光法および凍結トラップ X 線結晶構造解析による P450nor 反応中間体の解析, 第 12 回分子科学討論会 (福岡)、2018 年 9 月 10-13 日 (口頭発表)
- I-6. M. Ganasen, 藤代瞳、X. Yuan, I. Hamza, 姫野誠一郎、A. G. Mauk, 杉本宏、城宜嗣、澤井仁美: ヒトの鉄イオン吸収に関わる膜タンパク質の立体構造に基づく生きた細胞での機能解析, メタルバイオサイエンス研究会 (仙台)、2018 年 11 月 16-17 日 (口頭発表)
- I-7. M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto and H. Sawai: Structural Insight into the Dietary Non-heme Iron Absorption in Human Duodenum, 第 18 回日本蛋白質科学学会年会 (新潟)、2018 年 6 月 27 日 (ポスター発表)
- I-8. 鎌谷美咲、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美: 酸素センサータンパク質 FixL における分子内シグナル伝達機構の解析, 第 18 回日本蛋白質科学学会年会 (新潟)、2018 年 6 月 27 日 (ポスター発表))
- I-9. 西永恵、杉本宏、村木則文、青野重利、城宜嗣、澤井仁美: ヘムセンサータンパク質 PefR における転写調節の分子メカニズム, 第 18 回日本蛋白質科学学会年会 (新潟)、2018 年 6 月 27 日 (ポスター発表)
- I-10. M. Ganasen, H. Fujishiro, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, S. Himeno, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Sawai: Structure-guided Functional Analysis of Human Ferric Reductase Using Living Cells, Gordon Research Conference: 2018 Chemistry and Biology of Tetrapyrroles (Newport), Jul. 15-20, 2018 (ポスター発表)
- I-11. K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, and Y. Sugita: Computational Modeling of the Outward-facing Form and the Occluded Intermediate of a Heme Importer with Bound Nucleotides, 256th American Chemical Society National Meeting (Boston), Aug. 19-23, 2018 (ポスター発表)
- I-12. 田村康一、杉本宏、城宜嗣、杉田有治: 分子シミュレーションによるヘムインポーターの化学-力学共役機構の解明、第 56 回日本生物物理学会年会 (岡山)、2018 年 9 月 17 日 (ポスター発表)
- I-13. M. Ganasen, H. Asakura, T. Tosha, T. Urano, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: Understanding the Mechanism of Dietary Iron Absorption at the Atomic level, 第 91 回日本生化学学会年会 (京都)、2018 年 9 月 26 日 (ポスター発表)

- I-14. 鎌屋 美咲, 杉本 宏, 城 宜嗣, 澤井 仁美: ダイズ根粒菌由来酸素センサータンパク質 FixL のタンデム PAS ドメインにおけるシグナル伝達機構、第 91 回日本生化学会年会 (京都)、2018 年 9 月 26 日 (ポスター発表)
- I-15. 西永恵、長井聖奈、村木則文、青野重利、城宜嗣、杉本宏、澤井仁美: ヘムセンサータンパク質のヘムの結合に伴う構造変化、第 91 回日本生化学会年会 (京都)、2018 年 9 月 26 日 (ポスター発表)
- I-16. 杉本宏, Menega Ganasen, 富樫ひろ美, 武田英恵, 朝倉帆南, 山下恵太郎, 平田邦生, A. Grant Mauk, 城宜嗣, 澤井仁美: 小腸上皮細胞膜で機能する鉄還元酵素 Dcytb の結晶構造、平成 30 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 (鳥取)、2018 年 11 月 23-24 日 (ポスター発表)
- I-17. H. Sugimoto, M. Ganesen, H. Togashi, H. Takeda, H. Asakura, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, X. Yuan, I. Hamza, A. G. Mauk, Y. Shiro, H. Sawai: Structural basis of ascorbate-dependent iron reduction by human duodenal cytochrome b (Dcytb) involved in intestinal iron absorption, Asian Crystallographic Association Conference (Auckland), Dec. 2-5, 2018 (ポスター発表)
- I-18. M. Nishinaga, S. Nagai, S. Nagatoishi, N. Muraki, S. Aono, K. Tsumoto, Y. Shiro, H. Sugimoto, and H. Sawai: Structural Basis for Transcriptional Regulation of a Novel Heme Sensor Protein in Pathogenic Bacteria, 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC9) (Singapore), Dec. 9 – 13, 2018 (ポスター発表)
- II-1 R. Yamaguchi, H. Furutachi, S. Shiotsuki, X. Zhang, T. Ishikawa, S. Akine, T. Tosha, S. Fujinami, M. Suzuki and T. Kitagawa, Synthesis and Crystal Structure of the Bis(\square -hydroxo)diiron(II) Complex with Tridentate Ligands Having a Sterically Bulky Imidazolyl Group, *X-ray Structure Analysis Online* 35, 27-29 (2019)
- II-2 Y. Furukawa, C. T. Lim, T. Tosha, K. Yoshida, T. Hagai, S. Akiyama, S. Watanabe, K. Nakagome and Y. Shiro: Identification of a novel zinc-binding protein, Clorf123, as an interactor with a heavy metal-associated domain, *PLoS One*, 13, e0204355 (2018)
- II-3 M. Kato, S. Nakagawa, T. Tosha, Y. Shiro, Y. Masuda, K. Nakata and I. Yagi: Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Bacterial Nitric Oxide Reductase under Electrochemical Control Using a Vibrational Probe of Carbon Monoxide, *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 5196-5200 (2018)
- II-4 T. Tosha and Y. Shiro: Structure and Function of Membrane-bound Bacterial Nitric Oxide Reductases, in *Dioxygen-dependent Heme Enzymes* (Royal Society of Chemistry Metallobiology Series No. 13), M. Ikeda-Saito and E. Raven Ed., p334-350 (2019)
- II-5 H. Sugimoto: Structure analysis of radiation-sensitive NO-bound state of cytochrome P450nor using XFEL at SACLA, 10th International workshop on X-ray radiation damage to biological samples (Upton, USA), Sep. 13-14, 2018 (招待講演)
- II-6 T. Tosha, E. Terasaka, K. Yamada, P.-H. Wang, H. Arai, H. Sugimoto, Y. Sugita and Y. Shiro: Nitric Oxide Dynamics Controlled by Formation of Protein Complex in Denitrification, 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC9), Singapore, Dec. 9-13, 2018 (招待講演)

- II-7 T. Tosha: Regulation of nitric oxide dynamics in microbial denitrification, The International Symposium on Bioinorganic Chemistry 2018, Okazaki, Japan, Nov. 30-Dec. 1, 2018 (招待講演)
- II-8 T. Tosha, H. Takeda, T. Nomura, T. Kimura, M. Kubo and Y. Shiro: Elucidation of Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction, 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC), Sendai, Japan, Jul. 30-Aug. 4, 2018 (口頭発表)
- II-9 T. Tosha: Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction Proved by Time-resolved Spectroscopic Analyses, International Conference on Porphyrin and Pthalocyanines (ICPP)-10, Munich, Germany, Jul. 1-6, 2018 (招待講演)
- II-10 當舎武彦: 亜硝酸還元酵素と一酸化窒素還元酵素の複合体形成による迅速な NO 分解機構, 平成 30 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 (鳥取) 2018 年 11 月 23-24 日 (ポスター)
- II-11 野村高志, 當舎武彦, 杉本 宏, 久野玉雄, 山際来佳, Chai Gopalasingam, 山下恵太郎, 平田邦生, 山本雅貴, 城 宜嗣, 久保 稔: 時間分解赤外分光法および X 線結晶構造解析による P450nor の反応中間体の解析, 平成 30 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 (鳥取)、2018 年 11 月 23-24 日 (口頭発表)
- II-12 當舎武彦: 脱窒にみられる金属タンパク質複合体による効率的な連続化学反応, 第 56 回日本生物物理学会年会 (岡山) 2018 年 9 月 15-17 日 (招待講演)
- II-13 當舎武彦: Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction, 平成 30 年度化学系学協会東北大会 (秋田) 2018 年 9 月 15-16 日 (招待講演)
- II-14 當舎武彦 “生体システムがもつ効率的な一酸化窒素分解機構” 秋田大学工学部生命科学コース特別講演会 (秋田) 2018 年 9 月 14 日 (招待講演)
- II-15 當舎武彦 “SACLA を利用した時間分解構造解析による酵素反応の観測” 新学術領域「中分子戦略」「分子夾雑化学」ジョイントシンポジウム第 21 回生命化学研究会 (豊中) 2018 年 9 月 8 日 (招待講演)
- II-16 當舎武彦 “光解離性基質を利用した時間分解 X 線結晶構造解析による酵素反応の追跡” 第 18 回日本蛋白質科学会年会 (新潟) 2018 年 6 月 26-28 日 (招待講演)

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金 (平成 29~令和 2 年度) 基盤研究 (B) 課題番号 17H03092
 研究課題 酵素超分子複合体形成による効率的な細胞内連続化学反応機構の解明
 研究代表者 當舎武彦
- 2 科学研究費補助金 (平成 29~30 年度) 新学術領域研究「動的構造生命」 課題番号 17H05896
 研究課題 ヘムトランスポーターの動的結晶構造解析
 研究代表者 杉本 宏
- 3 科学研究費補助金 (平成 30~令和 2 年度) 基盤研究 (B) 課題番号 18H02396
 研究課題 生体金属イオンの輸送システムで機能する膜タンパク質の構造解析
 研究代表者 杉本 宏