

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、さらには抗菌薬開発などで注目されている酵素である。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* RM495) 由来のチトクロム c 依存型 NOR (*PacNOR*) と NO との反応は μ 秒からミリ秒の時間領域で 3 段階の反応である事を昨年度に提案した。この際に現れる 2 つの短寿命反応中間体について、第一の反応中間体では、NO の伸縮振動が 1683 cm^{-1} に観測され、caged NO の低温光分解とアニーリングを組み合わせた ESR 測定で $g=4$ のシグナルが観測された事から、非ヘム鉄に一分子の NO が結合した構造と決定した。第二の反応中間体ではその NO がヘム鉄に移動した構造であることを決定し、これらの結果を基に、*PacNOR* による NO 還元反応機構を提案した。また、*PacNOR* の電子伝達特性を調べるため、電子供与体 (チトクロム c_{551}) の変異体を作製し、*PacNOR* によるチトクロム c_{551} 酸化反応の速度論的解析を進めた。

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来のキノール依存性 NOR (*NmqNOR*) の単量体亜鉛結合構造を X 線結晶解析により 3.15 \AA 分解能で、2 量体構造を電子顕微鏡単粒子解析により 3.06 \AA 分解能で決定し、論文で報告した。決定された構造に基づき、プロトン輸送機構、亜鉛による活性阻害機構、2 量体化による活性化機構の解析を進めた。*NmqNOR* と阻害剤 (キノールアナログ分子) の結合構造決定に向けて、阻害剤処理した *NmqNOR* の結晶化と X 線回折測定、ならびに電子顕微鏡像測定に取り組んだ。

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.

マメ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ヒスチジンをリン酸化し、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。本年度は、FixL の酸素感知に伴う自己リン酸化から FixJ へのリン酸基転移までの一連の分子機構の解明を目的に、各タンパク質の X 線結晶構造解析ならび NMR 分光法を用いた立体構造解析を行った。X 線結晶構造解析では、FixL の酸素センサードメインを含む二量体化領域について、ヘムに配位子が結合していない状態 (2.95 Å 分解能)、酸素ホモログとして機能するイミダゾール結合型 (2.85 Å) とシアンイオン結合型 (2.70 Å) の立体構造解析に成功した。これらの構造を比較することにより、酸素感知は局所的で小さな構造変化によることを明らかにした。また、これらの構造をもとに部位特異的変異体解析を行った結果、ヘム鉄へのリガンドの結合/解離に伴ってヘム周辺のアミノ酸側鎖の向きが変化すると、それに連なる二量体界面の構造変化が誘起され、ヘム結合ドメインの配置を歪ませることにより分子内で情報が伝達されることが示唆された。

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、二価金属トランスポーター DMT1 を介して細胞内に取り込まれる。本年度は、これまでに我々が決定したヒト由来 *Dcytb* の X 線結晶構造を基盤に、構造情報から得られた知見を生きた細胞で検討できる「ヒト腸管モデル細胞系」を構築した。この細胞系に、ヒト由来 *Dcytb* の X 線結晶構造から鉄還元反応の促進に重要と推定されたアミノ酸残基の変異体を発現させ、細胞内に取り込まれた鉄イオンを定量することに成功した。さらに、DMT1 による金属輸送メカニズムの原子レベルでの解明を目指して、DMT1 の発現精製法を検討している。

ヒトだけでなく病原菌（溶血性連鎖球菌）の鉄獲得機構で、ヘム鉄のセンサーとして機能する転写調節因子についても、X 線結晶構造解析によりヘム結合型/非結合型ならびに DNA 結合型の立体構造を決定することにより、ヘム鉄の感知に伴う構造変化を明らかにした。さらに、各種分光解析により、ヘム結合型は一酸化炭素 (CO) を安定に結合できることを明らかにした。溶血性連鎖球菌が、宿主動物の赤血球を溶血しヘムが放出されると、ヘム分解反応により CO が放出される。その CO は菌体の死滅や休眠を招くため、ヘム結合型は CO による細胞毒性を回避するために機能している可能性があることを提案した。

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。ウシミトコンドリア由来 A タイプ HCOR について、酵素単量体とリン脂質の 1.85 Å 分解能構造、および 2 量体化による不活性化機構とリン脂質を介した超複合体形成機構を論文で報告した。酸素還元反応中間体のひとつである F 型の構造を 1.8 Å 分解能で決定し、論文で報告した。酸素還元反応中間体のひとつである O 型構造の 1.6 Å 分解能での解析を進めた。酵素 2 量体構造の 1.3 Å 分解能での解析を進めた。

発表論文 List of Publications

- I -1 S. Yanagisawa, K. Kayama, M. Hara, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura: "UV-Raman Characterization of a Substrate Tryptophan Bound to Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1" *Biophys. J.* 117, 706-716 (2019) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.017>
- I -2 C. Gopalasingam, G. Chiduzu, T. Tosha, M. Yamamoto, Y. Shiro, S. V. Antonyuk, S. Muench, S. S. Hasnain: "Structure of Quinol-dependent Nitric Oxide Reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* by Cryo-electron microscopy" *Sci. Adv.* 5 eaax1803 (2019) DOI: 10.1126/sciadv.aax1803
- I -3 E. Sakakibara, Y. Shisaka, H. Onoda, D. Koga, Ning Xu, T. Ono, Y. Hisaeda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Highly Malleable Haem-binding Site of the Haemoprotein HasA Permits Stable Accommodation of Bulky Tetraphenylporphycenes" *RSC Advances* 9, 18697-18702 (2019) DOI: 10.1039/c9ra02872b
- I -4 K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Sugita: "Chemomechanical Coupling in the Transport Cycle of a Type II ABC Transporter" *J. Phys. Chem. B* 123, 7270-7281 (2019) DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b04356
- I -5 Y. Shisaka, Y. Iwai, S. Yamada, H. Uehara, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, J. K. Stanfield, K. Ogawa, Y. Watanabe, O. Shoji: "Hijacking the haem acquisition system of *Pseudomonas aeruginosa* for antimicrobial delivery" *ACS Chemical Biology* 14, 1637-1642 (2019) DOI: 10.1021/acscchembio.9b00373
- I -6 K. Yoshitani, E. Ishii, K. Taniguchi, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Akiyama, A. Kato, R. Utsumi, Y. Eguchi: "Identification of an internal cavity in the PhoQ sensor domain for PhoQ activity and SafA-mediated control." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83, 684 (2019)
- I -7 M. A. M. Jamali, C. C. Gopalasingam, R. M. Johnson, T. Tosha, K. Muramoto, S. P. Muench, S. V. Antonyuk, Y. Shiro and S. S. Hasnain. "The active form of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Neisseria meningitidis* is a dimer." *IUCr J* 7, 404-415 (2020)
<https://doi.org/10.1107/S2052252520003656>.

- I -8 Y. Shiro: "Dynamics of Nitric Oxide in Bacterial Cellular Systems: NO Generation and Decomposition" *Japan-BIOCEV Symposium: Macromolecules; Structure, Function and Beyond*, Prague, Czech, Apr. 23 (2019)
- I -9 K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Direct Benzene Hydroxylation Catalyzed by Wild-type Cytochrome P450BM3 with Novel Decoy Molecules", *The 29th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (SRM2019)*, Osaka, Japan, May 31- June 1 (2019)
- I -10 K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Engineering of Enzymatic Activity Achieved By Employing Newly Screened Peptide-Like Molecules" *15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15)*, Nara, June 2-5 (2019)
- I -11 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, T. Tosha, Y. Shiro, M. Kubo: "NO-binding and Protonation Process in the Catalytic Reaction of Heme/non-heme Iron Nitric Oxide Reductase Proved by Time-Resolved Spectroscopic System" *15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15)*, Nara, June 2-5 (2019)
- I -12 K. Omura, Y. Aiba, A. Matsumoto, J. K. Stanfield, H. Onoda, S. Ariyasu, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Oxygen Activation by Self-sufficient Cytochrome P450 Reconstituted with Manganese Porphyrin" *19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)*, Interlaken, Switzerland, August 11-16 (2019)
- I -13 Y. Shisaka, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Specific Photosterilization of *Pseudomonas Aeruginosa* Exploiting Its Heme Acquisition System" *19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)*, Interlaken, Switzerland, August 11-16 (2019)
- I -14 K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Screening of N-substituted dipeptides for Activation of Cytochrome P450BM3" *19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)*, Interlaken, Switzerland, August 11-16 (2019)
- I -15 T. Tosha, T. Nomura, H. Takeda, T. Kimura, H. Sugimoto, M. Kubo, Y. Shiro: "Mechanism of P450nor-Catalyzed NO Reduction Proved by Time-Resolved Spectroscopic and Crystallographic Analyses" *19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)*, Interlaken, Switzerland, August 11-16 (2019)
- I -16 城 宜嗣 「分子構造を基盤にしたヘムタンパク質の機能解明～生命金属科学への展開をめざして～」 錯体化学会第69回討論会 貢献賞受賞講演 2019年9月22日、名古屋
- I -17 當舎武彦、山際来佳、倉橋拓也、新井博之、杉本宏、城宜嗣 "Functional Roles of Conserved Residues near the Active Site of Nitric Oxide Reductase Based on the Structural Analysis" 日本生物物理学会第57会年会、2019年9月24日-26日、宮崎
- I -18 武田英恵、木村哲就、野村高志、當舎武彦、城宜嗣、久保稔 "NO-binding and Protonation Process in the Catalytic Reaction of the Bacterial Nitric Oxide Reductase as Established by Time-Resolved Spectroscopy" 日本生物物理学会第57会年会、2019年9月24日-26日、宮崎
- I -19 M. Arif M. Jamali, C.C. Gopalasingam, R.M. Johnson, S.P. Muench, S.V. Antonyuk, S.S. Hasnain, T. Tosha, K. Muramoto, Y. Shiro: "Crystallographic and CryoEM Structures of Quinol-Dependent Nitric Oxide Reductases from *Neisseria meningitidis*" *International Symposium on Diffraction Structure*

- Biology*, Osaka, Japan, Oct. 17-20 (2019)
- I -20 Y. Shiro: “Dynamics of Nitric Oxide in Cellular Systems: NO Generation and Decomposition” *Korean-Taiwan-Japan Bioinorganic Chemistry Symposium 2019 (KTJ-BICS 2019)*, Taichung, Taiwan Nov. 12 -14 (2019)
- I -21 K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, H. Onoda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: “Regulation of the Reaction Site of Cytochrome P450BM3 with Peptide Derivatives” *4th International Symposium on Precisely Designed Catalysts with Customized Scaffolding*, Nara, Dec. 3-5 (2019)
- I -22 M. Arif M. Jamali, C.C. Gopalasingam, R.M. Johnson, S.P. Muench, S.V. Antonyuk, S.S. Hasnain, T. Tosha, K. Muramoto and Y. Shiro. “Crystallographic and cryoEM structures of quinol-dependent nitric oxide reductases from *Neisseria meningitidis*.” 技術・人材マッチング交流会、兵庫県立先端科学技術センター、2019年12月12日
- II -1 H. Sawai, Y. Shiro: “Missing Piece of Two-Component Signal Transduction Systems Unveiled by SEC-SAXS” *SPring-8/SACLA Research Frontiers 2018*, Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI), 15-16, (2019)
- II -2 鎌屋美咲、小手石泰康、當舎武彦、馬場清喜、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美 「酸素センサータンパク質FixL のセンサーモジュールの構造解析」 第19 回日本蛋白質科学会年会／第71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会、2019 年6 月24-26 日、神戸
- II -3 鎌屋美咲、小手石泰康、當舎武彦、馬場清喜、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美 “Structural Basis for the Intramolecular Signal Transduction of Oxygen Sensor Protein FixL from *Bradyrhizobium japonicum*” 日本生物物理学会第57 会年会、2019 年 9 月24 日-26 日、宮崎
- III-1 澤井仁美 「病原菌の鉄獲得システムで機能するヘムセンサー蛋白質の多機能性とその構造的機序」 第19 回日本蛋白質科学会年会／第71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 ワークショップ「生命金属とタンパク質による細胞機能の協奏的制御」2019 年6 月24 日、神戸、招待講演
- III-2 西永恵、長井聖奈、村木則文、青野重利、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美 「病原菌の鉄獲得システムで機能するヘムセンサー蛋白質の多機能性とその構造的機序」 第19 回日本蛋白質科学会年会／第71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会、2019年6 月24-26 日、神戸
- III-3 M. Ganasen, X. Yuan, H. Fujishiro, S. Himeno, A. G. Mauk, I. Hamza, Y. Shiro, H. Sugimoto, H. Sawai: “Structural Basis for Enhancement of Human Iron Absorption by Duodenal Membrane Proteins with Some Dietary Metal-chelators” *7th International Symposium on Metallomics*, Warsaw, Poland, July 2 (2019)
- III-4 M. Nishinaga, S. Nagai, N. Muraki, S. Nagatoishi, K. Tumoto, S. Aono, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Sawai “Structural Basis for the Transcriptional Regulation of Heme Detoxification Involved in Pathogenic Bacterial Iron Acquisition” *7th International Symposium on Metallomics*, Warsaw, Poland, July 2 (2019)
- III-5 澤井仁美 「原子から細胞レベルの研究による鉄イオンの吸収メカニズムの理解と有効な鉄栄養強化食品成分の探索」 第92 回日本生化学会大会 シンポジウム「生体内における Singularity Elements としての生体金属の利用と制御」 2019 年9 月18 日、横浜
- III-6 澤井仁美、西永恵、長井聖奈、長門石暁、津本浩平、杉本宏、城宜嗣 「病原菌の鉄獲得システムで機能するヘムセンサータンパク質の構造機能相関の解明」 第43 回日本鉄バイオ

- サイエンス学会学術集会、2019年9月21日、京都
- III-7 城 宜嗣 “Molecular Mechanism of NO Reduction by Nitric Oxide Reductase in Cellular System” 第57回日本生物物理学会年会 シンポジウム「ヘム蛋白質の機能を司る構造・ダイナミクスとエネルギー流：実験と理論」2019年9月26日、宮崎
- III-8 鎌屋美咲、小手石泰康、當舎武彦、馬場清喜、杉本宏、城宜嗣、澤井仁美 “Structural Basis for the Intramolecular Signal Transduction of Oxygen Sensor Protein FixL from *Bradyrhizobium japonicum*” 日本生物物理学会第57回年会、2019年9月24日-26日、宮崎
- III-9 澤井仁美 「溶血性連鎖球菌が宿主の血中から鉄を獲得するシステムで機能するセンサータンパク質の多機能性に関する分子機序」 日本薬学会第140年会 環境・衛生部会若手研究者シンポジウム「生体分子およびタンパク質との相互作用から見た生命金属動態」2020年3月27日、京都、招待講演
- IV-1 A. Shimada, Y. Etoh, R. Kitoh-Fujisawa, A. Sasaki, K. Shinzawa-Ito, T. Hiromoto, E. Yamashita, K. Muramoto, T. Tsukihara, and S. Yoshikawa. X-ray structures of catalytic intermediates of cytochrome *c* oxidase provide insights into its O₂-activation and unidirectional proton-pump mechanisms. *J. Biol. Chem.* **295**, 5818-5833 (2020)
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009596>
- IV-2 Shinzawa-Itoha K, Sugimura T, Misaki T, Tadehara Y, Yamamoto S, Hanada M, Yano N, Nakagawa T, Uene S, Yamada T, Aoyama H, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S, Muramoto K. Monomeric structure of an active form of bovine cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 19945–19951 (2019) doi: 10.1073/pnas.1907183116
- IV-3 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優「ウシ心筋シトクロム酸化酵素の活性型単量体構造」日本生体エネルギー研究会第44回討論会、九州工業大学、2019年12月20日～22日
- IV-4 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優”Monomeric structure of an active form of respiratory oxygen reductase from bovine mitochondria.” 日本生物物理学会第57回年会、シーガイアコンベンションセンター、2019年9月24日～26日
- IV-5 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優「ウシシトクロム酸化酵素の活性型モノマー構造」第92回日本生化学会大会、パシフィコ横浜、2019年9月18日～20日
- IV-6 島田敦広、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反応中間体の構造解析による、酸素還元と共役したプロトンポンプ機構の解明」第19回日本蛋白質科学会年会、神戸国際会議場、2019年6月24日～26日

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

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

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
博士前期課程

鎌屋美咲：酸素センサータンパク質 FixL の構造解析解析

西永恵：病原菌のヘムセンサータンパク質の X 線結晶構造解析

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 30～令和 2 年度）基盤研究 C
研究課題：プロトンポンプ機構解明に向けた呼吸鎖末端酵素の構造機能解析
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 31-令和 4 年度）基盤研究 A
研究課題：時間分解構造解析を活用した一酸化窒素還元酵素の構造ダイナミクス研究
研究代表者：城 宜嗣
- 3 文部科学省科学研究費補助金（平成 31-令和 5 年度）新学術領域研究
研究課題：生命金属動態のタンパク質構造ダイナミクス
研究代表者：城 宜嗣
- 4 文部科学省科学研究費補助金（平成 30-令和 2 年度）基盤研究 C
研究課題：ヒトの鉄吸収に関わる膜タンパク質の立体構造を基盤とした生細胞での構造機能
相関解析
研究代表者：澤井仁美
- 5 共同研究費（理化学研究所）（平成 29-令和 4 年度）
研究課題：物質階層原理研究
研究代表者：城 宜嗣
- 6 共同研究費（理化学研究所）（平成 30-令和 5 年度）
研究課題：ヘテロ界面研究
研究代表者：城 宜嗣
- 7 公益財団法人ひょうご科学技術協会学術研究助成（令和元年度）
研究課題：病原菌の鉄源としてのヘムの濃度を感知するタンパク質の分子機構解析
研究代表者：澤井仁美
- 8 文部科学省科学研究費補助金（平成 30-令和 2 年度）基盤研究 B
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
研究分担者：澤井仁美