

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.

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）を奪い取ることで補給している。鉄は様々なタンパク質の活性中心に結合して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ことから、鉄の輸送に関与するタンパク質分子は新たな抗生物質やワクチン開発のターゲットとして注目されてきた。本研究室では病原菌の内膜で発現している 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に取り組んでいる。輸送基質であるヘムが結合した状態や ATP 結合型の構造決定を行うことで、タンパク質の大規模なコンフォメーションの変化のメカニズムを原子レベルで解明することを目的としている。構造解析試料の調整の際に両親媒性分子の存在で分子が安定化することを見出していることから、高分解能での構造決定によってヘム輸送サイクルの分子メカニズムの詳細を明らかになると期待される。

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.

金属タンパク質は、温和な条件下で高選択的かつ高効率的に触媒反応を行うことができる。この仕組みを理解するためには、触媒反応中に過渡的に形成される反応中間体の構造情報を得ることが重要となる。本研究室では、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、脂肪酸酸化酵素（チトクロム P450BM3）、ヘム含有ペルオキシダーゼの反応中間体、銅結合型亜硝酸還元酵素の休止酸化状態・基質結合型・生成物結合型の無損傷構造解析を行った。また、SACLA での時間分解計測に向けて、チップを利用した基盤技術開発に取り組んだ。他の金属タンパク質の触媒反応の鍵となる反応中間体の構造解析についても 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. M. Horitani, K. Kusubayashi, K. Oshima, A. Yato, H. Sugimoto, K. Watanabe: X-ray crystallography and electron paramagnetic resonance spectroscopy reveal active site rearrangement of cold-adapted inorganic pyrophosphatase. *Sci. Rep.* **10**, 4368 (2020)
- I-2. R. H. Pek, X. Yuan, N. Rietzschel, J. Zhang, L. Jackson, E. Nishibori, A. Ribeiro, W. Simmons, J. Jagadeesh, H. Sugimoto, M. Z. Alam, L. Garrett, M. Haldar, M. Ralle, J. D. Phillips, D. M. Bodine, I. Hamza: Hemozoin produced by mammals confers heme tolerance. *eLIFE* **8**, e49503 (2019)
- I-3. S. Yanagisawa, K. Kayama, M. Hara, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura: UV resonance Raman characterization of a substrate bound to human indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Biophys. J.* **117**, 706 (2019)
- I-4. K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Sugita: Chemo-mechanical coupling in the transport cycle of a heme ABC transporter. *J. Phys. Chem. B* **123**, 7270 (2019)
- 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 heme acquisition system of *Pseudomonas aeruginosa* for the delivery of phthalocyanine as an antimicrobial. *ACS Chem. Biol.* **14**, 1637 (2019)
- I-6. E. Sakakibara, Y. Shisaka, H. Onoda, D. Koga, N. 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 Adv.* **9**, 18697 (2019)
- I-7. 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-8. H. Sugimoto, M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, T. Tosha, A.G. Mauk, Y. Shiro, H. Sawai: Structural basis of iron reduction by human duodenal cytochrome *b* (Dcytb) involved in intestinal iron absorption. 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Interlaken), August 11-16, 2019 (口頭発表)
- 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 (Osaka), May 31- June 1, 2019 (口頭発表)
- I-10. 四坂勇磨, 杉本宏, 莊司長三: 合成ポルフィリンを内包させたヘム蛋白質の超高分解能 X 線結晶構造解析 日本結晶学会令和元年度年会 (金沢)、2019 年 11 月 19-20 日 (口頭発表)
- I-11. H. Sugimoto, M. Ganasen, H. Togashi, H. Takeda, T. Tosha, A.G. Mauk, Y. Shiro, H. Sawai: Structural basis of ascorbate-dependent iron reduction by human Dcytb involved in intestinal iron absorption, 32nd European Crystallographic Meeting (Vienna), Aug 18-23, 2019 (ポスター発表)
- 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 (Interlaken) August 11-16, 2019 (ポスター発表)
- I-13. E. Sakakibara, Y. Shisaka, D. Koga, X. Xu, T. Ono, Y. Hisaeda, H. Sugimoto, Y. Watanabe, O. Shoji: Construction of Hemoprotein HasA Incorporating Bulky Metal Complexes 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Interlaken), August 11-16, 2019 (ポスター発表)
- I-14. 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 (Interlaken), August 11-16, 2019 (ポスター発表)
- I-15. 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 (Interlaken), August 11-16, 2019 (ポスター発表)
- I-16. 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), December 3-5, 2019 (ポスター発表)
- I-17. 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), June 2-5, 2019 (Nara), December 3-5, 2019 (ポスター発表)
- I-18. 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 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-19. 浅田拓也、鏝木基成、城宜嗣、杉本宏、木村哲就: ナノディスク再構成型ヘム ABC トランスポーターを用いた基質輸送機構の分光学的解析、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 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-20. 米村開、有安真也、Joshua K. Stanfield、小野田浩宜、杉本宏、城宜嗣、渡辺芳人、 荘司長三: シトクロム P450BM3 の酵素活性改変を誘起するペプチド様小分子のスクリーニング、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 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-21. 四坂勇磨、岩井佑介、山田志歩、當舎武彦、杉本宏、城宜嗣、 渡辺芳人、 荘司長三: 緑膿菌のヘム獲得機構を標的とする薬剤輸送システムの開発、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 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-22. 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 (神戸)、2019 年 6 月 24-26 日 (ポスター発表)
- I-23. 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*、第 57 回日本生物物理学会年会 (宮崎)、2019 年 9 月 24 -26 日 (ポスター発表)
- I-24. 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「ヘムセンサータンパク質における転写調節の分子機構」第 92 回日本生化学会大会 (横浜) 2019 年 9 月 18 日-20 日 (ポスター発表)
- II-1 M. Suga, A. Shimada, F. Akita, J.R. Shen, T. Tosha, H. Sugimoto: Time-resolved studies of metalloproteins using X-ray free electron laser radiation at SACLA, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 1864, 129466 (2020)
- II-2 T. Moreno-Chicano, A. Ebrahim, D. Axford, M. V. Appleby, J. H. Beale, A. K. Chaplin, H. M. E. Duyvesteyn, R. A. Ghiladi, S. Owada, D. A. Sherrell, R. W. Strange, H. Sugimoto, K. Tono, J. A. R. Worrall, R. L. Owen, M. A. Hough: High-throughput structures of protein-ligand complexes at room temperature using serial femtosecond crystallography. *IUCrJ* **6**, 1074 (2019)
- II-3 A. Ebrahim, T. Moreno-Chicano, M. V. Appleby, A. K. Chaplin, J. H. Beale, D. A. Sherrell, H. M. E. Duyvesteyn, S. Owada, K. Tono, H. Sugimoto, R. W. Strange, J. A. R. Worrall, D. Axford, R. L. Owen, M. A. Hough: Dose-resolved serial synchrotron and XFEL structures of radiation-sensitive metalloproteins. *IUCrJ* **6**, 543 (2019)
- II-4 C. Gopalasingam, G. Chidusa, T. Tosha, M. Yamamoto, Y. Shiro, S. V. Antonyuk, S. Muench, S. S. Hasnain: Dimeric structures of quinol-dependent Nitric Oxide Reductase (qNOR) revealed by cryo-Electron Microscopy, *Science Advances*, **5**, no 8, eaax1803 (2019)
- II-5 當舎武彦、久保稔: SACLA を利用した酵素反応の可視化 (Visualization of enzymatic reactions using SACLA)、生物物理 (SEIBUTSU BUTSURI)、**59**、205-207 (2019)
- II-6 T. Tosha, M. Kubo: Observation of enzymatic reactions by time-resolved X-ray crystallography using photosensitive caged substrate, *SPRING-8/SACLA Research Frontiers 2018*, 28-29 (2019)
- II-7 M. Kato, Y. Masuda, S. Nakagawa, T. Tosha, I. Yagi: Mechanistic Insights into Enzymatic Nitric Oxide Reduction Revealed by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy, 235th The Electrochemical Society Meeting (Dallas), May 26-30, 2019 (ポスター発表)
- II-8 M. Kato, Y. Masuda, S. Nakagawa, T. Tosha, I. Yagi: Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase Immobilized on Gold Electrodes, 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (Nara), Jun. 2-5, 2019 (口頭発表)
- II-9 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 (Nara), Jun. 2-5, 2019 (ポスター発表)
- II-10 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 (Interlaken), Aug. 11-16, 2019 (口頭発表)

II-11 T. Tosha: Elucidation of NO reduction mechanism in soluble NO reductase by time-resolved crystallography with photosensitive caged compound, 32nd European Crystallographic Meeting (Vienna), Aug. 18-23, 2019 (招待講演)

II-12 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、第 57 回日本生物物理学会年会 (宮崎)、2019 年 9 月 24 -26 日 (ポスター発表)

II-13 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、第 57 回日本生物物理学会年会 (宮崎)、2019 年 9 月 24 -26 日 (ポスター発表)

II-14 當舎武彦: 放射光および X 線自由電子レーザーを用いた構造生物学: 金属含有酵素の触媒反応機構に関する研究、医療・バイオ研究に有効なインターフェースと量子ビーム応用に関する技術調査専門委員会第二回委員会 (大阪)、2019 年 9 月 26 日 (依頼講演)

科学研究費補助金等

博士前期課程

阿部綾萌: 低温電子顕微鏡によるヘムトランスポーターの構造解析

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金 (平成 31~令和 2 年度) 挑戦的研究 (萌芽) 課題番号 19K22403
研究課題 XFEL とマイクロ流体技術の融合によるモノオキシゲナーゼの新しい構造解析
研究代表者 杉本 宏
- 2 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
- 3 科学研究費補助金 (平成 31~令和 2 年度) 挑戦的研究 (萌芽) 課題番号 19K22208
研究課題 一酸化窒素から酸素分子を合成する金属酵素の同定
研究代表者 當舎武彦
- 4 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