

## 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<sub>2</sub>O 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  $\mu$  秒からミリ秒の時間領域で 3 段階の反応である事を提案した。この際に現れる 2 つの短寿命反応中間体について、これまでは時間分解の可視・赤外分光法を用いてそれらの電子状態を解析してきた。その解析をさらに進め Fe-NO 配位構造を決定するために、本年度から時間分解 X 線結晶構造解析を開始した。cNOR の結晶を還元状態に保つ方法として、酸素透過性が非常に低い酸素バリア性フィルムで還元型 cNOR の結晶を包み、酸素分子による cNOR の酸化が起きないようにして X 線回折実験を行うことを考え、その準備実験を開始した。

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来のキノール依存性 NOR (*NmqNOR*) は、*PacNOR* が単量体で機能するのに対して、二量体で高活性である。二量体 *NmqNOR* の高分解能構造を得るために、界面活性剤で可溶化した試料とナノディスクと複合体を形成した試料の低温電子顕微鏡構造解析 (CryoEM) を行ない、2.9 Å 分解能で構造を得ることに成功した。高活性の二量体 *NmqNOR* との構造比較を目的に単量体 *NmqNOR* の構造解析も開始した。さらに、CryoEM により *NmqNOR* と非競合阻害剤 (HQNO: 2-heptyl-4-quinolinol 1-oxide) の複合体の構造を決定した。その結果、3.1 Å 分解能の電顕像が得られ、ヘム b 付近の膜貫通ヘリックス表面に結合した HQNO 分子が観測された。HQNO の結合には Tyr312 残基と Asp728 残基の水素結合、および膜貫通ヘリックスとの疎水性相互作用が関与することが示唆される。

## 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。FixJ は FixL 及び DNA と相互作用する 2 つのドメインを持ち、結晶構造解析においてはそれぞれが様々な配向を取ることが明らかになっている。本年度は、NMR 分光法を用いて FixJ の溶液構造解析を目指した。FixJ の NMR 構造解析では、常磁性ラベルを用いた PCS/PRE 測定を計画しており、FixJ のラベル用変異体 C51S/S118C、C51S/S129C、C51S/S191C を作製した。このうち 129、191 の変異体については野生型と同等のリン酸基転移活性を示した。C51S/S129C について、DO3MA-Tb<sup>3+</sup> タグを導入して HSQC スペクトルの測定を行ったところピークのシフトが見られ、PCS を観測できたと結論付けた。

### 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。このモデル細胞系を用いて、さまざまな食物由来の添加物を加えた際の鉄取り込みを解析した結果、フルクトースの添加で最も効率よく鉄イオンが取り込まれることが明らかになった。現在、フルクトースの作用を分子レベルで調べるために、鉄イオンとフルクトースが結合した Dcytb の構造解析に向けて結晶を作製している。

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、メタノール資化性酵母あるいはチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO 細胞) を宿主として DMT1 の発現精製法を検討した。

## 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 J. K. Stanfield, K. Omura, A. Matsumoto, C. Kasai, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji: "Crystals in Minutes: Instant On-site Microcrystallisation of Various Flavours of the CYP102A1 (P450BM3) Haem Domain." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 59, 2-10 (2020) <https://doi.org/10.1002/anie.201913407>
- I -2 M. A. M. Jamali, C. C. Gopalasingam, R. M. Johnson, T. Tosha, K. Muramoto, S. P. Muench, S. V. Antonyuk, Y. Shiro, S. S. Hasnain: "Active Form of Quinol-dependent Nitric Oxide Reductases (qNOR) from *Neisseria meningitidis* is a Dimer" *IUCr J.* 7, 404-415 (2020) <https://doi.org/10.1107/S2052252520003656>
- I -3 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, A. Yokota, A. Matsubayashi, S. Ishii, Y. Shiro, M. Kubo, T. Tosha: "Timing of NO binding and Protonation in Catalytic Reaction of Bacterial Nitric Oxide Reductase Proved by Time-Resolved Spectroscopic System" *Bull. Chem. Soc. Japan* 93, 825-833 (2020) doi:10.1246/bcsj.20200038 **Selected Paper**
- I -4 M. Kato, Y. Masuda, N. Yoshida, T. Tosha, Y. Shiro, and I. Yagi "Bilayer Lipid Membranes on SAM-modified Gold Electrode" *Electrochim. Acta*, 373, 137888-1378xx (2021) doi: 10.1016/j.electacta.2021.137888
- I -5 T. Nomura, T. Kimura, Y. Kanematsu, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, T. Hisano, R. Yamagiwa, H. Takeda, C. Gopalasingam, Y. Kino, R. Kousaka, S. Yanagisawa, O. Shoji, T. Kumasaka, Y. Takano, H. Ago, M. Yamamoto, H. Sugimoto, T. Tosha, M. Kubo, Y. Shiro: "Coordination and Electronic Structures of Short-Lived Intermediate in NO Reduction by Cytochrome P450 NO Reductase as Characterized by Time-Resolved IR Spectroscopy and XFEL Crystallography" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2101481118 (2021) doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2101481118>
- I -6 H. Kwon, J. Basran, C. Pathak, M. Hussain, S. Freeman, A. Fielding, A. Bailey, N. Stefanou, H. Sparkes, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, H. Murakami, G. Ueno, H. Ago, K. Tono, M. Yamamoto, H. Sawai, Y. Shiro, H. Sugimoto, E. Raven, P. Moody: "XFEL

- Crystal Structures of Peroxidase Compound II” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60**, 14578-14585 (2021)  
doi: <https://doi.org/10.1002/anie.202103010>
- I -7 城 宜嗣：「分子構造を基盤にしたヘムタンパク質・ヘム酵素の機能解明」 *BJSCC* **75**, 51-56 (2020) **Award Accounts**
- I -8 T. Tosha, R. Yamagiwa, H. Sawai, Y. Shiro: “NO Dynamics in Bacterial Denitrification System” *Chem. Lett.* **50**, 280-288 (2021) <https://doi.org/10.1246/cl.200629> **Vol. 50 Commemorative Highlight Review & The Chemical Society of Japan Award for 2020 Award Highlight Review**
- I -9 城 宜嗣：「『生命金属科学』のめざすところ」コラボレーション企画 CSJ化学フェスタ 2020年10月20日 [オンライン開催]
- I -10 城 宜嗣 「分子構造を基盤にした鉄結合タンパク質の機能解明：Functional Studies of Iron-Related Proteins on Molecular Basis」第73回日本化学会賞 受賞講演、日本化学会第101春季年会、2021年3月22日 [オンライン開催]
- I -11 C.C. Gopalasingam: “Transformation of the Structural Biology Landscape with Cryogenic Electron Microscopy” Japan Advancement on CryoEM and SACLA: Leading Techniques in Structural Characterization (Universiti Teknologi MARA (UiTM), Selangor, Malaysia) September 15<sup>th</sup>, 2020
- I -12 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: “Cryo-EM, Crystallographic and kinetic study of quinol-dependent nitric oxide reductases from *Neisseria Meningitidis*.” *2020 World Conference on Protein Science*, July 6-10 (2020) [発表証明発行]
- I -13 當舎武彦、武田英恵、木村哲就、堀谷正樹、久保稔、城宜嗣 「マイクロ秒時間領域で形成される一酸化窒素還元酵素反応中間体の分光解析」 第58回日本生物物理学会年会 2020年9月16-18日 [オンライン開催]
- III-1 H. Sawai, K. Ishimori: “Integrated Bio-metal Science: New Frontiers of Bio-metal Science Opened with Cutting-edge Techniques” *Biophysics and Physicobiology*, **17**, 94-97 (2020) doi: 10.2142/biophysico.BSJ-2020017
- III-2 M. Nishinaga, S. Nagai, N. Muraki, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, S. Aono, H. Sugimoto, **Y. Shiro**, H. Sawai: “Heme Controls the Structural Rearrangement of Its Sensor Protein Mediating the Hemolytic Bacterial Survival” *Commun. Biol.* **4**:467 (2021) doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01987>
- III-3 城 宜嗣、澤井仁美、當舎武彦 「第4章 維持 一分子— 第2節 ヒト、病原菌における鉄の動態 ～分子から細胞へ～」生命金属ダイナミクス：生体内における金属の挙動と制御 城宜嗣、津本浩平 監修 (エヌ・ティー・エス出版) 2021年
- III-4 澤井仁美 Hyogo EYE 科学研究の第一線を訪ねて「病原菌が菌体内のヘム濃度を感知するメカニズムを原子レベルで解明」ひょうごサイエンス (公益財団法人ひょうご科学技術協会発行)、38号、pp. 9-10
- III-5 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 [発表証明発行]
- III-6 H. Sawai 「Structural Basis for the Survival of Hemolytic Bacteria by a Heme-responsive Sensor Protein (ヘム応答性センサータンパク質による溶血性細菌の生存の構造的機序)」 第94回日本細菌学会総会 シンポジウム「生命金属の新潮流」、2021年3月23日 [オンライン開催]
- III-7 澤井仁美 「ヒトにおける鉄イオンの吸収に関わる膜タンパク質の構造機能相関と腸管細胞モデルでの機能評価系を用いた鉄イオン吸収を向上させる新たな化合物スクリーニング」 日本薬学会第141年会 環境・衛生部会若手研究者シンポジウム～金属研究の新たな切り口：分子からヒトを対象とした研究最前線～、2021年3月28日 [オンライン開催]
- III-8 M. Takahara, H. Fujishiro, T. Kambe, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Sawai: “Functional Analysis of Membrane Proteins Involved in Iron Absorption Using Human Intestinal Model Cell System” *2020 World Conference on Protein Science*, July 6-10 (2020) [発表証明発行]
- III-9 Y. Nishitani, M. Nishinaga, S. Naga, H. Sugimoto, T. Tosha, Y. Shiro, H. Sawai: “Dual Function of the Heme Ligation in a Heme-responsive Sensor Protein, PefR” *2020 World Conference on Protein Science*, July 6-10 (2020) [発表証明発行]
- III-10 A. Abe, H. Shigematsu, M. Yamamoto, Y. Shiro, H. Sugimoto: “Reconstitution of Full-Complex of Bacterial Heme Transporter into the Platforms Suitable for Structural Analysis.” *2020 World Conference on Protein Science*, July 6-10 (2020) [発表証明発行]
- III-11 西谷雄大、西永恵、長井聖奈、杉本宏、當舎武彦、城宜嗣、澤井仁美 「Structural and Kinetic Analysis of CO Binding to Bacterial Heme-responsive Sensor Protein」 第93回日本生化学会大会 2020年9月15日 [オンライン開催]
- III-12 浅田拓也、鏑木基成、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58回日本生物物理学会年会 2020年9月16-18日 [オンライン開催]
- III-13 木村哲就、林沙英、池本夕佳、城宜嗣、杉本宏 「Time-resolved Spectroscopic Measurements on the Transport Dynamics of ABC Transporter」 第58回日本生物物理学会年会 2020年9月16-18日 [オンライン開催]

## 大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

Muhamad Arif Mohanmad Jamali :

Cryo-Electron Microscope, X-ray Crystallography and Kinetics Study of Quinol-dependent Nitric Oxide Reductase from *Neisseria meningitidis*

博士後期課程

寺田隆一郎 : Theoretical Analysis of Functional Mechanism of Biological Macromolecular Systems Employing *ab initio* Quantum (QM) and Classical (MM) Molecular Dynamic (MD) Simulation

