

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.

私たちが食べ物から体内に吸収した鉄分は、各細胞へ運ばれて様々なタンパク質と結合して生理反応を触媒する。その一方で、病原菌が増殖に必要な鉄を補給する際には、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。そのため、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ヘムトランスポーターが安定化することを見出しており、低温電子顕微鏡による画像データの取得を進めた。今後引き続き試料調製とデータ収集を進めて 3 次元マップへの再構成解析へと進め、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する計画である。

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.

タンパク質の活性部位に補因子として金属イオンを結合している金属タンパク質は、温和な条件下で高選択的かつ高効率に触媒反応を行うことができる。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んでおり、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）、ペルオキシダーゼ、銅結合型亜硝酸還元酵素の反応中間体の無損傷構造解析を行った。また、他の金属タンパク質の触媒反応のメカニズムの解析においても、反応過程の解析で鍵となる中間体の時間分解計測のための基盤技術開発を行った。

発表論文 List of publications

- I-1. 杉本宏 「病原菌のヘム獲得のメカニズム」第15回トランスポーター研究会年会 2020年10月12-16日、オンライン開催（招待講演）
- I-2. Ayaho Abe, Hideki Shigematsu, Masaki Yamamoto, Yoshitugu Shiro, Hiroshi Sugimoto: Reconstitution of full-complex of bacterial heme transporter into the platforms suitable for structural analysis. 日本蛋白質科学会年会 2020年7月6-9日札幌（ポスター要旨発表）
- I-3. 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（ポスター発表）
- I-4. 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（ポスター発表）
- II-1 Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, K. Suzuki, H. Onoda, C. Kasai, H. Sugimoto, Y. Aiba, Y. Watanabe, O. Shoji: Systematic Evolution of Decoy Molecules for the Highly Efficient Hydroxylation of Benzene and Small Alkanes Catalyzed by Wild-Type Cytochrome P450BM3, *ACS Catal.* 10, 9136-9144 (2020)
- II-2 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.* 59, 7611-7618 (2020)
- II-3 A. Jamali, C. Gopalasingam, R. Johnson, T. Tosha, K. Muramoto, S. Muench, S. Antonyuk, Y. Shiro, S. Hasnain: The active form of quinol-dependent nitric oxide reductases from *Neisseria meningitidis* is a dimer, *IUCrJ* 7, 404-415 (2020)
- II-4 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, M. Horitani, A. Yokota, A. Matsubayashi, S. Ishii, Y. Shiro, M. Kubo, T. Tosha: Timing of NO Binding and Protonation in the Catalytic Reaction of Bacterial Nitric Oxide Reductase as Established by Time-Resolved Spectroscopy, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 93, 825-833 (2020)
- II-5 M. Lucic, D. A. Svistunenko, M. Wilson, A. Chaplin, B. Davy, A. Ebrahim, D. Axford, T. Tosha, H. Sugimoto, S. Owada, F. Dworkowski, I. Tews, R. Owen, M. Hough, J. A. R. Worrall: Serial femtosecond zero dose crystallography captures a water-free distal heme site in a dye-decolourising peroxidase to reveal a catalytic role for an arginine in FeIV=O formation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 21656-21662 (2020)
- II-6 S. Rose, S. Antonyuk, D. Sasaki, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Ago, R. Eady, T. Tosha, M. Yamamoto, S. Hasnain: An unprecedented insight into the catalytic mechanism of copper nitrite reductase from atomic resolution and damage-free structures, *Sci. Adv.*, 7, eabd8523 (2021)

- II-7 M. Kato, Y. Masuda, N. Yoshida, T. Tosha, Y. Shiro, I. Yagi: Impact of membrane protein-lipid interactions on formation of bilayer lipid membranes on SAM-modified gold electrode, *Electrochim. Acta*, 373, 13788 (2021)
- II-8 T. Tosha, R. Yamagiwa, H. Sawai, Y. Shiro: NO Dynamics in Microbial Denitrification System, *Chem. Lett.*, 50, 280-288 (2021)
- II-9 堀谷正樹, 杉本宏, 渡邊啓一, X-ray Crystallography and EPR Spectroscopy Reveal Active Site Rearrangement of Cold-Adapted Inorganic Pyrophosphatase, 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 (口頭発表)
- II-10 I. Yagi, Y. Masuda, N. Yoshida, S. Nakagawa, T. Tosha, M. Kato: Electrochemical Surface-enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase Immobilized on Gold Electrodes, 71st Annual Meeting of ISE (Belgrade Online), Aug. 2, 2020 (招待講演)
- II-11 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(オンライン開催)、2020 年 9 月 16-18 日 (ポスター発表)
- II-12 當舎武彦: 時間分解結晶構造解析および分光解析が明らかにする金属酵素による一酸化窒素分解機構、第 2 回量子線科学セミナー ~生体分子の構造と作動原理を分子・原子・電子レベルで理解する~ Zoom を使った Web 講演会 (茨城大学)、2020 年 9 月 25 日 (招待講演)
- II-13 M. Kato, N. Yoshida, Y. Masuda, S. Nakagawa, T. Tosha, I. Yagi: Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Bacterial Nitric Oxide Reductase under Electrocatalytic Conditions, International Online Conference on Bio-Hybrid Approaches to Solar Energy Conversion (Biohybrid), Oct. 27-29, 2020 (口頭発表)
- II-14 當舎武彦: 構造生物学における XFEL と放射光の相補的利用~金属酵素の反応機構解明を目指して~、放射光ユーザーのための SACLA の利活用に関するワークショップ (SP8/SACLA オンライン)、2021 年 3 月 9 日 (招待講演)
- II-15 當舎武彦: 光解離性ケージド基質を利用した時間分解構造解析による酵素反応の可視化、日本薬学会第 141 回年会 (広島 オンライン)、2021 年 3 月 26-29 日 (招待講演)

生命理学専攻

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

- 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
- 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（令和 2～3 年度）新学術領域（研究領域提案型） 課題番号 20H05452
- 研究課題 ヘム酵素が生成する酸化活性種の精密構造析
- 研究代表者 杉本 宏
- 4 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
- 5 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
- 6 科学研究費補助金（令和 2～3 年度）新学術領域（研究領域提案型） 課題番号 20H05451
- 研究課題 高速分子動画でみる金属酵素活性中心における NO 還元反応
- 研究代表者 當舎武彦