

## Supramolecular Structural Biology

## 細胞膜超分子複合体 機能解析学

### 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.

病原微生物が感染後に増殖していくためには、宿主（感染先）の体内に含まれるヒト赤血球ヘモグロビンなどから鉄を獲得することが必要となる。したがって、鉄取り込みの阻害は「兵糧攻め」による感染防御の第一線として機能を果たすと期待される。鉄イオンやヘム（鉄-ポルフィリン錯体）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 あるいはそのアナログ化合物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。構造解析の成功のカギを握るのは、試料の調製の際の界面活性剤や両親媒性分子の選択である。これまでの実験からヘムトランスポーターが安定化する界面活性剤を見出しており、SPRING-8 で稼働している低温電子顕微鏡を利用して画像データを収集した。3次元マップへの再構成計算を行い、高分解能での構造決定を進めている。構造解析とそれを基盤にした機能解析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的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、嫌気条件下での時間分解構造解析を見据えた基盤技術開発や、光解離性ケージド化合物の低温光解離を利用した金属酵素反応中間体の捕捉につい

て研究を進めた。今後は、これらの手法を SACLA での構造解析に応用し、金属酵素反応中間体の構造解析へと展開する予定である。

## 発表論文 List of publications

- I-1 木村哲就, 浅田拓也, 林沙英, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏 「ナノディスク再構成型 BhuUV-T による段階的な基質輸送の分光学的観察」 第 21 回蛋白質科学会年会、オンライン (富山)、2021 年 6 月 16-18 日 (口頭発表)
- I-2 仲絢香、小堀康博、鏑木基成、城宜嗣、杉本宏、木村哲就 “Structural analyses of ABC transporters in nucleotide bound states investigated by CW-ESR spectroscopy” 第 59 回日本生物物理学会年会、オンライン (仙台)、2021 年 11 月 25-27 日 (口頭発表)
- I-3 杉本 宏、西堀 英治、R. H. Pek、X. Yuan、I. Hamza 「ヘムの毒性回避のための細胞内結晶の生成と X 線粉末回析測定」 2021 年度日本結晶学会年会、オンライン (札幌)、2021 年 11 月 19-21 日 (ポスター発表)
- I-4 Hiroshi Sugimoto: Structure and dynamics of proteins involved in bacterial heme transport, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2021), Online (Honolulu, USA), Dec 16-21, 2021 (招待講演)
- II-1 K. Mukai, H. Sugimoto, K. Kamiya, R. Suzuki, T. Matsuura, T. Hishiki, H. Shimada, Y. Shiro, M. Suematsu, N. Kagawa: Spatially restricted substrate-binding site of cortisol-synthesizing CYP11B1 limits multiple hydroxylations and hinders aldosterone synthesis, *Curr. Res. Struct. Biol.* 3, 192-205 (2021)
- II-2 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)
- II-3 M. Nishinaga, H. Sugimoto, Y. Nishitani, S. Nagai, S. Nagatoishi, N. Muraki, T. Tosha, K. Tsumoto, S. Aono, Y. Shiro, H. Sawai: Heme Controls the Structural Rearrangement of Its Sensor Protein Mediating the Hemolytic Bacterial Survival, *Commun. Biol.*, 4, 467 (2021)
- II-4 H. Kwon, J. Basran, C. Pathak, M. Hussain, S. L. Freeman, A. J. Fielding, A. J. Bailey, N. Stefanou, H. A. Sparkes, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, H. Murakami, G. Ueno, H. Ago, K. Tono, M. Yamamoto, H. Sawai, Y. Shiro, H. Sugimoto P. C. E. Moody, E. L. Raven: XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 60, 14578-14585 (2021)
- II-5 T. Nomura, T. Kimura, Y. Kanematsu, D. Yamada, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, T. Hisano, R. Yamagiwa, H. Takeda, C. Gopalasingam, R. Kousaka, S. Yanagisawa, O. Shoji, T. Kumasaka, M. Yamamoto, Y. Takano, H. Sugimoto, T. Tosha, M. Kubo, Y. Shiro: Short-lived intermediate in N<sub>2</sub>O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2101481118 (2021)
- II-6 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, *YAKUGAKU ZASSHI*, 142, 487-494 (2022)

- II-7 H. Matsumura, A. S. Faponle, P.-L. Hegedoorn, T. Tosha, S. P. de Visser, P. Moënne-Loccoz: Mechanism of substrate inhibition in cytochrome-c dependent NO reductases from denitrifying bacteria (cNORs), *J. Inorg. Biochem.*, 231, 111781 (2022)
- II-8 城 宜嗣、澤井仁美、當舎武彦: 第4章、第2節 生体鉄の分子科学と細胞生物学、“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” エヌ・ティー・エス出版、城 宜嗣、津本浩平監修、126-138 (2021)
- II-9 榛葉幹治、松浦滉明、平田邦生、山本雅貴、城 宜嗣、當舎武彦: 酸素バリア性フィルムを用いた嫌気条件下での一酸化窒素還元酵素反応中間体の構造解析への挑戦, 第47回生体分子科学討論会(オンライン)、2021年6月4-5日(ポスター発表)
- II-10 加藤 優、吉田生未、増田侑也、當舎武彦、八木一三: 電極表面での脂質二分子膜形成に対する膜タンパク質-脂質相互作用の影響、15回分子科学討論会(オンライン)、2021年9月18-21日(口頭発表)
- II-11 當舎武彦: 光解離性ケージド基質を利用した一酸化窒素還元酵素の反応機構の解明, 第94回日本生化学大会(生体分子の高速分子動画撮影の最前線)(オンライン)、2021年11月3-5日(招待講演)
- II-12 平田邦生、松浦滉明、坂井直樹、竹下浩平、當舎武彦、榛葉幹治、山本雅貴: SPring-8 ZOOシステム 次の一手、令和3年度日本結晶学会(北海道大学+オンライン)、2021年11月19日-21日(口頭発表)
- II-13 杉本宏 「ヘムタンパク質の反応中間体の精密構造解析」第16回高速分子動画オンラインセミナー、2021年12月14日(口頭発表)
- II-14 T. Tosha, H. Takeda, Y. Shiro, M. Kubo: Time-resolved techniques provide mechanism for nitric oxide reduction by nitric oxide reductase, *Pacificchem 2021 (Novel Heme Proteins and Model Systems)*, オンライン, 12月16-21日(招待講演)
- II-15 平田邦生、松浦滉明、坂井直樹、竹下浩平、當舎武彦、榛葉幹治、山本雅貴: SPring-8 ZOOシステム 次の一手、第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム(オンライン)、2022年1月7-9日(ポスター発表)
- II-16 H. Sugimoto “High-resolution structural analysis of the heme proteins using neutron and XFEL crystallography” 6th International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University, Online (Ibaraki), Feb 21-22, 2022 (招待講演)
- II-17 H. Sugimoto “Hydrogen atoms in protein structure: high resolution analysis of heme enzymes”, “SACLA User’s Meeting, Online (Sayo), Mar 2, 2022 (招待講演)

## 科学研究費補助金等

- 1 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
- 2 科学研究費補助金(令和3~5年度)基盤研究(B) 課題番号21H02064  
研究課題 核共鳴散乱分光を駆使した鉄複核中心と気体分子の化学の解明  
研究代表者 當舎武彦

- 3 科学研究費補助金（令和 1～5 年度）新学術領域研究（研究領域提案型）課題番号 19H05768  
研究課題 細胞内生命金属動態を制御するタンパク質メタレーション  
研究分担者 杉本宏
- 4 科学研究費補助金（令和 2～3 年度）新学術領域研究（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
- 5 科学研究費補助金（令和 3～5 年度）基盤研究（B）課題番号 21H02421  
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