

I 哺乳類呼吸鎖シトクロム酸化酵素の構造と機能

Structural and Functional Studies on Mammalian Cytochrome *c* Oxidase

村本和優

Muramoto, K.

細胞呼吸を担う呼吸鎖電子伝達系は、基質の酸化（電子伝達）に伴い放出されるエネルギーを使って水素イオン（プロトン）を能動輸送する。エネルギーは膜を介したプロトンの電気化学ポテンシャル差へ環境に応じて効率的に変換され、ATP合成など様々な生命活動に利用される。哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム酸化酵素（Cytochrome *c* oxidase: CcO）を対象にして、そのエネルギー変換反応と反応制御のメカニズムを分子構造に基づいて理解することを目指して研究を進めてきた。ウシ心筋 CcO の機能（酵素活性等）に影響を与えることが報告されているカルシウムイオンと酸化型および還元型 CcO との結合構造をそれぞれ 1.7 Å 分解能で決定し、電子伝達経路の構造変化を論文で報告した。活性阻害効果を示す界面活性剤を含まないコール酸フリー CcO を調製し、構造決定へ向けた X 線結晶解析および電顕単粒子解析を進めた。

II 一酸化窒素還元酵素の構造と機能

Structural and Functional Studies on Nitric Oxide Reductases

村本和優・城 宜嗣

Muramoto, K., Shiro, Y.

一酸化窒素還元酵素（Nitric Oxide Reductase: 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 N₂O 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。髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）由来のキノール依存性 NOR (*Nmq*NOR) は、機能単位は単量体であるが二量体で高活性である。電顕単粒子解析により決定された単量体および二量体構造に基づきアミノ酸変異体を作製し、ゲルろ過、Blue Native-PAGE による分析および活性測定から二量体の安定化と二量体化による活性化に重要なアミノ酸残基を特定した。脂質ナノディスクに再構成された二量体 *Nmq*NOR の電顕単粒子構造を 2.9 Å 分解能で決定し、二量体構造の安定化およびプロトン輸送経路の構造形成に関与する脂質を見いだした。

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 Cellular Iron Dynamics

城 宜嗣
Shiro, Y.

鉄は、ほぼ全ての生物にとって必須の元素であり、酸素の貯蔵・運搬、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、生命機能の維持に貢献している。一方で、タンパク質に結合していない遊離の鉄は、活性酸素源として細胞損傷を引き起こす負の側面を有する。このように、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（生体内鉄動態）を制御するシステムが存在する。本課題では、ヒトにおける鉄動態制御機構の分子論的な解明にむけて、ヒトの鉄吸収に関わるタンパク質に着目した研究に取り組んでいる。本年度は、十二指腸において鉄が取り込まれる際に中心的な役割を果たす膜タンパク質、二価鉄金属輸送体（DMT1）の発現・精製法の検討を行った。その結果、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO 細胞）を用いた系で、DMT1 を発現させることができ、膜の単離、界面活性剤での可溶化を経て、高純度に DMT1 を精製する手法を確立した。今後は、精製試料を大量に調製し、低温電子顕微鏡での構造解析に挑戦する。また、細胞内での鉄輸送に関わる鉄シャペロンタンパク質 PCBP についても発現・精製法を確立した。PCBP は、DMT1 をはじめ、様々な鉄動態制御に関わるタンパク質との複合体を形成すると提案されているので、これらの精製試料を用いて、複合体形成の確認、複合体の構造解析へと展開する。

発表論文 List of Publications

- I-1 Muramoto K, Shinzawa-Itoh K. Calcium-bound structure of bovine cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1864, 148956 (2023) DOI: 10.1016/j.bbabi.2023.148956
- I-2 島田 敦広、村本 和優、新澤-伊藤 恭子、月原 富武、吉川 信也 シアン化物結合シトクロム酸化酵素の結晶構造から示唆される金属中心の酸化状態変化による活性制御 日本生物物理学会第 60 回年会（函館, 2022）
- I-3 島田 敦広、新澤-伊藤 恭子、村本 和優、月原 富武、吉川 信也 XFEL を用いた時分割構造解析によって期待されるシトクロム酸化酵素の反応機構解明 第 48 回生体分子科学討論会（鳥取, 2022）
- II-1 Nishida Y, Yanagisawa S, Morita R, Shigematsu H, Shinzawa-Itoh K, Yuki H, Ogasawara S, Shimuta K, Iwamoto T, Nakabayashi C, Matsumura W, Kato H, Gopalasingam C, Nagao T, Qaqorh T, Takahashi Y, Yamazaki S, Kamiya K, Harada R, Mizuno N, Takahashi H, Akeda Y, Ohnishi M, Ishii Y, Kumasaka T, Murata T, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y, Honma T, Shigeta Y, Kubo M, Takashima S, Shintani Y. Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases. *Nat. Commun.* 13, 7591 (2022) DOI: 10.1038/s41467-022-34771-y
- II-2 Takeda H, Shimba K, Horitani M, Kimura T, Nomura T, Kubo M, Shiro Y, Tosha T.

Trapping of a Mononitrosyl Nonheme Intermediate of Nitric Oxide Reductase by Cryo-Photolysis of Caged Nitric Oxide. *J. Phys. Chem. B*, 127, 846 (2023) DOI: 10.1021/acs.jpcc.2c05852

- III-1 Nakamura H, Hisano T, Rahman M, Tosha T, Shirouzu M, Shiro Y. Structural insight into heme detoxification by an ABC-type efflux pump in Gram-positive bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 119, e2123385119 (2022) DOI: 10.1073/pnas.2123385119
- III-2 柴田 晃利、藤宇 将吾、築取 いずみ、西谷 雄大、高原 教代、城 宜嗣、澤井 仁美 ヒト由来二価金属輸送体 DMT1 の構造解析にむけた精製法の確立 第 48 回生体分子科学討論会 (鳥取, 2022)
- III-3 浦 敦人、築取 いずみ、城 宜嗣、澤井 仁美 ヒト由来鉄シャペロンタンパク質 PCBP による細胞内鉄イオン輸送・貯蔵の制御機構 第 48 回生体分子科学討論会 (鳥取, 2022)
- III-4 浦 敦人、築取 いずみ、城 宜嗣、澤井 仁美 ヒトの細胞内における鉄イオンの輸送と貯蔵の分子メカニズム 日本農芸化学会 2022 年度西日本支部大会 (長崎, 2022) *優秀発表賞
- III-5 浦 敦人、築取 いずみ、城 宜嗣、澤井 仁美 細胞内鉄輸送タンパク質 PCBP1 における鉄イオンの結合と輸送の分子メカニズム 第 95 回日本生化学会大会 (名古屋, 2022)

生命科学専攻

博士前期過程

柴田晃利：ヒト由来二価金属輸送体 DMT1 の構造機能解析

山岡博明：ナノディスク再構成系一酸化窒素還元酵素の構造機能解析

浦 敦人：ヒト由来鉄シャペロンタンパク質 PCBP による細胞内鉄イオンの輸送・貯蔵の制御機構解明

阪口智哉：フェロトキシスに關与するタンパク質 101F6 の構造解析

藤宇将吾：ヒト由来二価金属輸送体 DMT1 と他タンパク質との相互作用解析

科学研究費補助金等

- 1 2022 年度 ひょうご科学技術協会学術研究助成金 課題番号：4069

研究課題 コール酸フリー新規精製法を用いた呼吸酵素の分子進化による獲得機能の解明

研究代表者 村本和優

- 2 科学研究費補助金 (令和 1-5) 新学術領域研究 (研究領域提案型) 課題番号：19H05761

研究課題 生命金属動態に關与するタンパク質分子の構造機能ダイナミクス研究

研究代表者 城 宜嗣