

## Supramolecular Structural Biology

## 細胞膜超分子複合体 機能解析学

### I イオンチャネルの構造生命学研究

#### Structural Biology of Ion channel

竹下浩平・杉本 宏

Takeshita, K., Sugimoto, H.

イオンチャネルは生命に必須の膜タンパク質であり、神経系では電気信号を生み出し神経伝導を担い、また筋収縮にも深く関わっている。我々は、貪食細胞に発現し生体内レドックス反応にも関与する電位依存性プロトンチャネル (Hv1) を研究対象としてプロトンを透過するメカニズムの解明に向けて精密構造情報の取得を目指している。2014年に世界に先駆けて Hv1 の X 線結晶構造を報告したが、現在はネイティブな 2 量体として活性化および不活性化機構の解明に向けて各ステップのスナップショット構造の解明を目指している。Hv1 は 35 kDa の膜タンパク質であり細胞質領域に長いコイルドコイル構造を持つため結晶化が困難であり、また CryoEM 単粒解析も困難であるため、本年度では特異的抗体の作製を進め、得られた 3 種の抗体 Fab 断片を用いて構造解析を進める予定である。また植物 P450 をプラットフォームとする小胞体膜上でのメタボロン超分子複合体形成に関する研究にも膜タンパク質研究を活かして取り組んでいる。

### II ゲノム維持および編集の構造機能研究

#### Structural and Functional Studies of Genome maintenance and Editing

竹下浩平・杉本 宏

Takeshita, K., Sugimoto, H.

ゲノムは親から子へ DNA 配列として受け継がれている生物の形質を決定するために必要なワンセットの遺伝情報である。遺伝情報の継承のためには DNA が複製されることが必須であるが、多くの DNA はメチル化状態にあるためメチル化模様も受け継ぐ必要がある。このメチル化模様を維持する分子が DNA メチルトランスフェラーゼ 1 (Dnmt1) であり、2011 年にほぼ全長の Dnmt1 の結晶構造から、Dnmt1 が多段階的に活性化することで正確にメチル化模様を継承するといったエピジェネティクス研究のランドマーク的な構造生物学研究成果を報告した。また、近年では CRISPR システムを応用したゲノム編集技術の発展が目覚ましく、我々も Type I-E CRISPR-Cas3 に関してゲノム編集に有用な組み換えタンパク質の生産を基盤として構造機能研究を進めている。本年度は、Type I-E CRISPR-Cas3 において標的 DNA を認識する約 400 kDa の Cascade-RNP 超分子複合体の形成メカニズムの解明に向けて、in-mature な Cascade-RNP の構造解析などに着手した。

### III 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

竹下浩平・杉本 宏

Takeshita, K., Sugimoto, H.

病原微生物が感染後に増殖していくためには鉄イオンの獲得が必須であり、感染先である宿主（ヒト）の体内に含まれるヒト赤血球ヘモグロビンからヘム（鉄-ポルフィリン錯体）の状態ですべて鉄を獲得することが知られている。鉄取り込みを阻害すれば感染防御の機能を果たすことから、鉄イオンやヘム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細胞膜で発現している ABC 型の金属イオントランスポーターやヘムトランスポーターについて、X線結晶解析および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。ヘム ABC トランスポーターについては SPring-8 で稼働している低温電子顕微鏡を利用して単粒子解析用画像データを収集し、構造解析を進めてきた。駆動エネルギーとなる ATP あるいはそのアナログ化合物結合型の構造に加えて変異体の構造決定によって、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の一端を明らかにした。Fe/Mn イオンのトランスポーターについては大腸菌を用いた大量発現系の構築を行い、構造解析に適した試料調製方法の探索を行なった。いずれのタンパク質についても、今後さまざまなコンフォメーションでの構造解析とそれを基盤にした機能解析へと展開することで、輸送サイクルの分子メカニズムの全容を明らかにする計画である。

#### 発表論文 List of publications

- I-1 R. Imaizumi, H. Matsuura, T. Yanai, K. Takeshita, S. Misawa, H. Yamaguchi, N. Sakai, Y. Miyagi-Inoue, M. Suenaga-Hiromori, T. Waki, K. Kataoka, T. Nakayama, M. Yamamoto, S. Takahashi, S. Yamashita: Structural-Functional Correlations between Unique N-terminal Region and C-terminal Conserved Motif in Short-chain cis-Prenyltransferase from Tomato, *ChemBioChem*. **25** (7), e202400160 (2024) (学術論文)
- I-2 T. Yanai, Y. Takahashi, E. Katsumura, N. Sakai, K. Takeshita, R. Imaizumi, H. Matsuura, S. Hongo, T. Waki, S. Takahashi, M. Yamamoto, K. Kataoka, T. Nakayama, S. Yamashita: Structural insights into a bacterial  $\beta$ -glucosidase capable of degrading sesaminol triglucoside to produce sesaminol: toward the understanding of the aglycone recognition mechanism by the C-terminal lid domain, *J. biochem.* **174** (4), (2024) (学術論文)
- I-3 A. Kawanabe, K. Takeshita, M. Takata, Y. Fujiwara: ATP modulates the activity of the voltage-gated proton channel through direct binding interaction, *J Physiol.* **601**(18), (2023) (学術論文)
- I-4 K. Takeshita, N. Sakai, G. Ueno, M. Horie, H. Tsujino, M. Arisawa, M. Yamamoto, M. Arai, T. Yamashita: A large pocket structure surrounding the catalytic center in the BCG protein

- from *Mycobacterium tuberculosis*, *bioRxiv*, doi.org/10.1101/2024.05.14.591795, (2024) (学術論文)
- I-5 馬場匠望、上野剛、大内田守、大守伊織、山本雅貴、竹下浩平：てんかん発作と関連するラットチオレドキシン変異体の結晶構造、第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）2023年6月8日（ポスター発表）
- I-6 矢内太朗、高橋由季乃、坂井直樹、竹下浩平、今泉璃城、松浦滉明、宮原真、和氣駿之、高橋征司、山本雅貴、片岡邦重、中山亨、山下哲：セサミノール配糖体加水分解酵素のX線結晶構造解析によって示されたC末端ドメインの新奇機能、第96回日本生化学会大会（福岡市）2023年11月1日（ポスター発表）
- II-1 竹下浩平：簡便に扱える相互作用解析装置が新たな構造生物学を切り拓く 日本の研究.com (<https://research-er.jp/articles/tieup/view/125>) 2024年1月22日掲載（記事）
- II-2 竹下浩平：SPRING-8における構造生物学を支えるタンパク質生産基盤、「株式会社ニッポンジーン社内セミナー」株式会社ニッポンジーン 2024年2月15日（招待講演）
- II-3 大恵千翔、小杉慎吾、峯岸恭孝、吾郷日出夫、熊坂崇、山本雅貴、竹下浩平：汎用的P1'非依存TEVプロテアーゼの開発 第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）2023年6月8日（ポスター発表）
- II-4 浅野宏治、吉見一人、竹下浩平、Zhao Di、石田紗恵子、真下知士：CRISPR-Cas3を用いたリポト診断法の開発、日本ゲノム編集学会第8回大会（江戸川区）2023年6月8日（ポスター発表）
- II-5 特願2023-121605 「ガイドRNAおよびその利用」真下知士、吉見一人、竹下浩平、小堀俊吾（出願日：2023年7月26日）（特許出願）
- II-6 特願2023-219813 「TEVプロテアーゼ」竹下浩平、峯岸恭孝、小杉慎吾、松岡敬太、山本雅貴、熊坂崇（出願日：2023年12月26日）（特許出願）
- III-1 R. Bolton, M. M. Machelett, J. Stubbs, D. Axford, N. Caramello, L. Catapano, M. Malý, M. J. Rodrigues, C. Cordery, G. J. Tizzard, F. MacMillan, S. Engilberge, D. von Stetten, T. Tosha, H. Sugimoto, J. A. R. Worrall, J. S. Webb, M. Zubkov, S. Coles, E. Mathieu, R. A. Steiner, G. Murshudov, T. E. Schrader, A. M. Orville, A. Royant, G. Evans, M. A. Hough, R. L. Owen, I. Tews: A redox switch allows binding of Fe(II) and Fe(III) ions in the cyanobacterial iron-binding protein FutA from *Prochlorococcus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **121**, e2308478121 (2024) (学術論文)
- III-2 H. Inaba, Y. Shisaka, S. Ariyasu, E. Sakakibara, G. Ueda, Y. Aiba, N. Shimizu, H. Sugimoto, O. Shoji: Heme-substituted protein assembly bridged by synthetic porphyrin: achieving controlled configuration while maintaining rotational freedom, *RSC Adv* **14**, 8829 (2024) (学術論文)
- III-3 S. Ariyasu, K. Yonemura, C. Kasai, Y. Aiba, H. Onoda, Y. Shisaka, H. Sugimoto, T. Tosha, M. Kubo, T. Kamachi, K. Yoshizawa, O. Shoji: Catalytic Oxidation of Methane by Wild-Type Cytochrome P450BM3 with Chemically Evolved Decoy Molecules, *ACS Catal.* **13**, 8613 (2023) (学術論文)
- III-4 J. K. Stanfield, H. Onoda, S. Ariyasu, C. Kasai, E. M. Burfoot, H. Sugimoto, O. Shoji: Investigating the applicability of the CYP102A1-decoy-molecule system to other members of the CYP102A subfamily, *J. Inorg. Biochem.* **245**, 112235 (2023) (学術論文)

- III-5 K. Suzuki, J. K. Stanfield, K. Omura, Y. Shisaka, S. Ariyasu, C. Kasai, Y. Aiba, H. Sugimoto, O. Shoji: A Compound I Mimic Reveals the Transient Active Species of a Cytochrome P450 Enzyme: Insight into the Stereoselectivity of P450-Catalysed Oxidations, *Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202215706 (2023) (学術論文)
- III-6 Hiroshi Sugimoto, “Dynamics of hydrogen atom revealed by ultra-high resolution structure of the heme acquisition protein” Time-Resolved Crystallography Conference (Leicester UK) Sep 13-15, 2023 (招待講演)
- III-7 片岡 万知華、阿部 綾萌、Chai Gopalasingam、Christoph Gerle、山本 雅貴、重松 秀樹、杉本 宏「ABC 型ヘムトランスポーターの構造解析」生命金属科学 夏の合宿 (長崎) 2023 年 9 月 8-9 (口頭発表)
- III-8 杉本宏、長尾聡、桑野わ子、有安真也、Joshua Kyle Stanfield、笠井千枝、愛場雄一郎、山下恵太郎、村上博則、上野剛、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、當舎武彦、久保稔、荘司長三「シトクロムP450BM3の酸素化型中間体のXFEL無損傷結晶構造解析により明らかになった反応空間の制御機構」第37回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (姫路) 2024年1月10~12日 (口頭発表)
- III-9 片岡万知華、阿部綾萌、Chai Gopalasingam、Christoph Gerle、城宜嗣、山本雅貴、重松秀樹、杉本宏「クライオ電子顕微鏡を用いた病原菌ヘムトランスポーターの構造解析」第49回生体分子科学討論会 (大阪) 2023 年 5 月 (ポスター発表)
- III-10 片岡万知華、阿部綾萌、Chai Gopalasingam、Christoph Gerle、山本雅貴、重松秀樹、杉本宏「クライオ電子顕微鏡を用いた病原菌ヘムトランスポーターの構造解析」第2回生命金属科学シンポジウム (横浜) 2023 年 5 月 21 日 (優秀ポスター受賞)
- III-11 片岡万知華、阿部綾萌、Chai Goparsingam, Christoph Gerle、城宜嗣、山本雅貴、重松秀樹、杉本宏「クライオ電子顕微鏡による病原菌由来ヘムトランスポーターの構造解析」第23回日本蛋白質科学会年会 (名古屋) 2023 年 7 月 5 日~7 日 (優秀ポスター受賞)
- III-12 阪口智哉、澤井仁美、城宜嗣、鏑木基成、當舎武彦、木村哲就、杉本宏 「鉄還元機能を持つ6回膜貫通型タンパク質 101F6 の大腸菌での発現と機能解析」 第96回日本生化学会大会 (福岡) 2023 年 10 月 31~11 月 1 日 (ポスター発表)

## 生命科学専攻

### 博士前期課程

石原 琴音

片岡 万知華

川上 凌平

## 科学研究費補助金等

### 1 科学研究費補助金 (令和 4~令和 6 年度) 基盤研究 (B) 課題番号 23K23533

研究課題 安全かつ効率的な Cas3 ゲノム編集ツール開発に資する機能構造相関研究

研究代表者 竹下浩平

- 2 科学研究費補助金（令和 5～令和 9 年度）基盤研究 S 課題番号 23H05470  
研究課題 植物特化代謝マシナリの超分子解剖：膜アセンブル工学と多元構造解析による統合的理解  
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：中山亨）
- 3 科学研究費補助金（令和 5～令和 9 年度）基盤研究 A 課題番号 23H00367  
研究課題 Type I CRISPR ゲノム編集機構の解明に基づく新規遺伝子編集法の開発  
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：真下知士）
- 4 科学研究費補助金（令和 3～令和 5 年度）基盤研究 C 課題番号 21K06555  
研究課題 新規抗結核薬の創薬ターゲットの機能解明および検出キット作製への応用  
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：山下沢）
- 5 AMED 肝炎等克服実用化研究事業（令和 4～令和 6 年度）課題番号 M1520003  
研究課題 B 型肝炎ウイルスの全長 POL 発現技術を基盤とした POL 機能の解明と新規薬剤開発  
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：杉山真也）
- 6 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
- 7 科学研究費補助金（令和 5～7 年度）基盤研究（B）課題番号 23K26836  
研究課題 EPR・X 線による深海および南極海微生物由来酵素の高活性・高安定性機構の解明  
研究分担者 杉本宏（研究代表者：堀谷正樹）
- 8 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（研究代表者：神戸大朋）