

I 一酸化窒素還元酵素の構造と機能

Structural and Functional Studies on Nitric Oxide Reductases

當舎武彦
Tosha, T.

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、中間生成物として産生される細胞毒性の高い一酸化窒素 NO を亜酸化窒素 N_2O に変換・無毒化する酵素である。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。これまで、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来のキノール依存性 NOR (*NmqNOR*) の研究に取り組み、本酵素は単量体よりも二量体のほうが酵素活性が高く、生体内では二量体として機能するということを提案してきた。今年度は、*NmqNOR* の調製法や低温電子顕微鏡での測定グリッドの調子条件を検討することで、単量体と二量体の構造をいずれも 2.0 Å 程度の高分解能で決定できた。そして、両者の構造から、二量体形成に伴う界面での構造変化が活性部位に伝播することを見出し、二量体において酵素が活性化される分子機構を明らかにできた。また、緑膿菌由来シトクロム *c* 依存性 NOR (*PacNOR*) についても同様の検討を行った結果、これまで単量体で存在すると考えられてきた *PacNOR* が二量体としても存在することを突き止めた。こちらも電顕による構造解析に着手しており、*NmqNOR* とは異なる様式で二量体を形成していることが明らかにできている。今後は、単量体の構造解析を進めるとともに機能解析を進め、*PacNOR* 二量体と単量体の構造の違いと機能の関連を明らかにする。

II 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。CcO に対して強い阻害効果をもつことが知られているシアン化物イオン (CN^-) が結合したウシ心筋由来の酸化型 CcO と部分還元型 CcO の結晶構造、および CN^- 結合部分還元型・還元型 CcO 混合結

晶の構造をそれぞれ 1.6 Å、1.65 Å、1.45 Å 分解能で決定し、CN⁻の結合に伴う構造変化を論文で報告した。さらに、CN⁻結合還元型 CcO、アジ化物イオン結合再酸化型 CcO、一酸化炭素結合還元型 CcO、一酸化窒素結合還元型 CcO、亜酸化窒素結合酸化型および還元型 CcO の X 線結晶解析を進めた。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。

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

當舎武彦・城 宜嗣
Tosha, T., 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、生命機能の維持に関わっている。一方で、タンパク質に結合していない遊離の鉄は、反応性が高く活性酸素の発生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）の構造解析に向けた精製法の検討、および DMT1 と鉄還元酵素（Dcytb）との相互作用の検討を行った。これまでに確立してきた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、高純度に DMT1 を精製する手法を確立した。精製試料を用いて低温電子顕微鏡による単粒子解析に取り組んだが、試料濃度が薄く電顕像を確認することができなかった。今後は、試料を安定に高濃度に保つ方法を検討し、低温電子顕微鏡での構造解析に挑戦する。DMT1 と Dcytb の相互作用については、細胞内において、両蛋白質が近接して存在することを見出した。これら二つのタンパク質の CHO 細胞を用いた共発現系も構築できたので、今後は、両者を発現させた細胞から、形質膜を単離・可溶化することで、DMT1 と Dcytb の複合体が単離できないか検討する。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）についても研究を進め、PCBP が鉄貯蔵タンパク質フェリチンの H 鎖選択に結合することを発見した。今後は、PCBP とフェリチン複合体の構造解析にも挑戦する。

発表論文 List of Publications

- I-1 Bolton R, Machelett M, Stubbs J, Axford D, Caramello N, Catapano L, Maly M, Rodrigues M, Tizzard G, MacMillan F, Engilberge S, von Stetten D, Tosha T, Sugimoto H, Worrall J, Zubkov M, Coles S, Mathieu E, Steiner R, Murshudov G, Schrader T, Orville A, Royant A, Evans G, Hough M, Owen R, Tews I. : 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. USA, 121, e2308478121 (2024) doi: 10.1073/pnas.2308478121
- I-2 Li H, Nakajima Y, Nango E, Owada S, Yamada D, Hashimoto K, Luo F, Tanaka R, Akita F, Kato K, Kang J, Saitoh Y, Kishi S, Yu H, Matsubara N, Fujii H, Sugahara M, Suzuki M, Masuda T, Kimura T, Thao T, Yonekura S, Yu L, Tosha T, Tono K, Joti Y, Hatsui T, Yabashi M, Kubo M, Iwata S, Isobe H, Yamaguchi K, Suga M, Shen J. : Oxygen-evolving photosystem II structures during S1-S2-S3 transitions, *Nature*, 626, 670-677 (2024) doi: 10.1038/s41586-023-06987-5
- I-3 Safari C, Ghosh S, Andersson R, Johannesson J, Bath P, Uwangue O, Dahl P, Zoric D, Sandelin E, Vallejos A, Nango E, Tanaka R, Bosman R, Borjesson P, Dunevall E, Hammarin G, Ortolani G, Panman M, Tanaka T, Yamashita A, Arima T, Sugahara M, Suzuki M, Masuda T, Takeda H, Yamagiwa R, Oda K, Fukuda M, Tosha T, Naitow H, Owada S, Tono K, Nureki O, Iwata S, Neutze R, Branden G. : Time-resolved serial crystallography to track the dynamics of carbon monoxide in the active site of cytochrome c oxidase, *Sci. Adv.*, 9, eadh4179 (2023) doi: 10.1126/sciadv.adh4179
- I-4 Fadini A, Hutchison C, Morozov D, Chang J, Maghlai K, Perrett S, Luo F, Kho J, Romei M, Morgan R, Orr C, Cordon-Preciado V, Fujiwara T, Nuemket N, Tosha T, Tanaka R, Owada S, Tono K, Iwata S, Boxer S, Groenhof G, Nango E, van Thor J. : Serial Femtosecond Crystallography Reveals that Photoactivation in a Fluorescent Protein Proceeds via the Hula Twist Mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, 145, 15796-15808 (2023) doi: 10.1021/jacs.3c02313
- I-5 Ariyasu S, Yonemura K, Kasai C, Aiba Y, Onoda H, Shisaka Y, Ogasawara S, Sugimoto H, Tosha T, Kubo M, Kamachi T, Yoshizawa K, Shoji O. : Catalytic Oxidation of Methane by Wild-Type Cytochrome P450BM3 with Chemically Evolved Decoy Molecules, *ACS Catal.*, 13, 8613-8623 (2023) doi: 10.1021/acscatal.3c01158
- I-6 Tosha T. : Characterization of the short-lived reaction intermediate of NO reductase with caged substrate, *Dynamic Crystallography-XFELs and Synchrotrons to study enzyme reactions (英国レスタター)*, 2023
- I-7 Tosha T. : Mechanism of nitric oxide reduction by P450 in fungal denitrification, *日本薬物動態学会第38回年会/第23回シトクロムP450国際会議国際合同大会 (静岡)*, 2023
- I-8 Tosha T. : Mechanism of enzymatic nitric oxide reduction revealed by time-resolved structural analysis, *ESAB (European Society of Applied Biocatalysis) Webinar, Enzymatic Reaction Mechanisms and their Biocatalytic Applications (オンライン)*, 2023
- I-9 Tosha T. : Anaerobic X-ray diffraction data collection using oxygen barrier film for study on nitric oxide reductase, *"Molecular Movies" International Symposium 2023 (淡路)*, 2023
- I-10 當舎武彦・川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・西田優也・新谷泰範 : 嫌気呼吸酵素を標的とした緑膿菌の抗菌薬開発に向けて、*第2回生命金属科学シンポジウム (横浜)*, 2023
- I-11 Ishihara K, Tosha T. : Attempt to prepare the active form of ammonia monooxygenase from ammonia oxidizing *Nitrosomonas. sp.*, *日本生物物理学会 第14会中国四国支部大会 (鳥取)*, 2023
- I-12 當舎武彦・武田英恵・榛葉幹治・堀谷正樹・城 宜嗣 : ケージド基質の低温光解離を利用した

- 金属酵素反応中間体の捕捉、第49回生体分子科学討論会（豊中）、2023
- I-13 石原琴音・當舎武彦：アンモニア酸化細菌由来アンモニア酸化酵素の単離に向けて、第49回生体分子科学討論会（豊中）、2023
- I-14 川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・當舎武彦：シトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素二量体の構造解析、第49回生体分子科学討論会（豊中）、2023
- I-15 川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・新谷泰範・當舎武彦：抗菌薬開発を指向した緑膿菌由来NO還元酵素-阻害剤複合体の構造解析の試み、第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）、2023
- I-16 川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・當舎武彦：シトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素二量体の構造解析、第35回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023、ポスター賞受賞
- I-17 Tosha T. : Characterization of reaction intermediates of nitric oxide reductases involved in denitrification、ThermusQ高度好熱菌研究を切り拓くネオテクノロジー（伊豆）、2023
- I-18 川上凌平・Gopalasingam C・重松秀樹・當舎武彦：クライオ電子顕微鏡によるシトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素二量体の構造解析、第96回日本生化学会大会（福岡）、2023
- II-1 Shimada A, Baba J, Nagao S, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Muramoto K, Tsukihara T, Yoshikawa S. : Crystallographic cyanide-probing for cytochrome c oxidase reveals structural bases suggesting that a putative proton transfer H-pathway pumps protons, *J. Biol. Chem.* 299, 105277 (2023) DOI: 10.1016/j.jbc.2023.105277
- II-2 島田敦広・村本和優・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也：シトクロム酸化酵素における金属中心の酸化状態変化によって駆動されるプロトン輸送機構の解明、第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）、2023
- II-3 井出智博・伊藤-新澤恭子・村本和優：ウシ心筋シトクロム酸化酵素の一酸化窒素結合構造、第35回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023
- II-4 村本和優・伊藤-新澤恭子：ウシ心筋シトクロム酸化酵素のカルシウム結合構造、日本生物物理学会第61回年会（名古屋）、2023
- II-5 村本和優・伊藤-新澤恭子、ウシ心筋シトクロム酸化酵素のカルシウム結合構造、日本生体エネルギー研究会第49回討論会（山口）、2023
- II-6 森星志郎・村本和優・伊藤-新澤恭子、コール酸フリーシトクロム酸化酵素の活性測定、第9回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2023
- II-7 井出智博・伊藤-新澤恭子・村本和優、ウシ心筋シトクロム酸化酵素の阻害剤結合構造、第9回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2023
- III-1 Ura A, Yanatori I, Shiro Y, Tosha T, Sawai H. : Molecular mechanisms for the iron binding and transport by PCBP、日本生物物理学会 第14会中国四国支部大会（鳥取）、2023、若手発表賞受賞
- III-2 浦 敦人・築取いずみ・城 宜嗣・澤井仁美：鉄シャペロンタンパク質 PCBP による鉄イオン輸送機構の解明、第23回日本蛋白質科学会年会（名古屋）、2023
- III-3 坂上正虎・柴田晃利・阪口智哉・藤宇将吾・高原教代・築取いずみ・城 宜嗣・當舎武彦・澤井仁美：ヒト由来鉄還元酵素 *Dcytb* と二価金属輸送体 *DMT1* の相互作用解析に向けた恒常共発現系の構築、第35回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023

- III-4 大谷 豪・柴田晃利・藤宇将吾・高原教代・築取いずみ・城 宜嗣・當舎武彦・澤井仁美：
二価金属輸送体 DMT1 の構造解析に向けた精製法の検討、第 35 回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023
- III-5 浦 敦人・築取いずみ・當舎武彦・城 宜嗣・澤井仁美：細胞内での鉄の輸送と貯蔵の分子メカニズム、第 35 回生物無機化学夏季セミナー（長崎）、2023、ポスター賞受賞
- III-6 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
- III-7 Ura A, Yanatori I, Tosha T, Shiro Y, Sawai H. : Molecular mechanism of iron trafficking into ferritin via iron chaperone、20th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC20) (オーストラリア、アデレード)、2023

生命科学専攻

博士前期過程

- 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：フェロトーシスに関与するタンパク質 101F6 の構造解析
- 藤宇将吾：ヒト由来二価金属輸送体 DMT1 の効率的な精製法の確立

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（令和 3-5） 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
- 2 科学研究費補助金（令和 4-5） 新学術領域研究（研究領域提案型） 課題番号：22H04760
研究課題 金属酵素活性中心による一酸化窒素還元反応の高速分子動画撮影
研究代表者 當舎武彦
- 3 学術国際交流事業（令和 5-6） 二国間交流事業 課題番号：120233211
研究課題 高速分子動画が明らかにする光感受性タンパク質の作用機序
研究代表者 當舎武彦
- 4 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 生命金属動態に関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