

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や筋収縮に深く関わっている。我々は、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、また分子量も 35 kDa と小さく CryoEM 単粒解析も困難である。本年度から結晶化および CryoEM 単粒解析を有利に進めるために、これまでに取得した Hv1 特異的抗体の Fab 断片化の検討、Hv1 と Fab 複合体化の検討を開始した。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 システムの 1 つである 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等に向けた機能解析、および CryoEM 単粒解析による構造決定を進めている。

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.

鉄イオンの獲得は生物にとって重要であり、病原微生物が感染先で増殖していくためには宿主（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。当研究グループは病原菌の細胞膜で発現して ATP 依存的に膜輸送を行う ABC トランスポーターファミリーに分類されるヘムトランスポーターと金属イオン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。ヘムトランスポーターについては低温電子顕微鏡による単粒子解析用画像データを収集した。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を進め、トランスポーター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を試みている。いずれのタンパク質についても、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 T. Waki, R. Imaizumi, K. Uno, Y. Doi, M. Tsunashima, S. Yamada, R. Mameda, S. Nakata, T. Yanai, K. Takeshita, N. Sakai, K. Kataoka, M. Yamamoto, S. Takahashi, T. Nakayama, S. Yamashita: Structural insights into catalytic promiscuity of chalcone synthase from *Glycine max* (L.) Merr.: Coenzyme A-induced alteration of product specificity. *BBRC*, **718**, 150080 (2024) (学術論文)
- I-2 S. Takahashi, M. Suenaga-Hiromori, T. Ishii, N. N. Shazana, T. Mikami, T. Takahashi, C. Minakawa, F. Yanbe, T. Waki, T. Nakayama, R. Imaizumi, T. Yanai, K. Kataoka, S. Yamashita, K. Takeshita, H. Matsuura, N. Sakai, M. Yamamoto, H. Yamaguchi, Y. Miyagi-Inoue, K. Fushihara, Y. Tozawa: Biosynthesis of unnatural polyisoprenes by engineered prenyltransferases on rubber particles, *ResearchSquare*, DOI: 10.21203/rs.3.rs-3615345/v1, (2024) (学術論文)
- I-3 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**, e202400160 (2024) (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: 10.1101/2024.05.14.591795, (2024) (学術論文)
- I-5 A. Kawanabe, K. Takeshita, M. Takata, Y. Fujiwara, “ATP directly regulates the voltage-gated proton channel”, IUPAB 2024 (Kyoto) June 24 - 28, 2024 (ポスター発表)
- I-6 M. Takata, K. Takeshita, A. Kawanabe, Y. Fujiwara, “Relationship between arachidonic acid, pressure and pH in H⁺ channels” 第 102 回日本生理学会大会 (千葉) 2025 年 3 月 17-19 日 (ポスター発表)
- I-7 田村夏美, 矢内太朗, 今泉璃城, 山口晴彦, 宮城ゆき乃, 竹下浩平, 片岡邦重, 高橋征司, 山下哲, 「天然ゴム合成コア酵素を構成する HRBP の N 末端および C 末端ドメインに関する研究」第 97 回日本生化学大会 (横浜) 2024 年 11 月 6-8 日 (ポスター発表)
- I-8 宮原一真, 隅田深瑠, 今泉璃城, 竹下浩平, 和氣駿之, 高橋征司, 片岡邦重, 山本雅貴, 中山亨, 山下哲, 「キンギョソウ由来カルコン異性化酵素の結晶化とキャラクターゼーション」第 97 回日本生化学大会 (横浜) 2024 年 11 月 6-8 日 (ポスター発表)
- I-9 矢内太朗, 高橋由季乃, 荒井杏美, 坂井直樹, 竹下浩平, 今泉璃城, 松浦滉明, 高橋征司, 山本雅貴, 片岡邦重, 中山亨, 山下 哲, 「ゴマリグナン配糖体加水分解酵素の構造に基づく新奇 C 末端ドメインの機能解明」第 97 回日本生化学大会 (横浜) 2024 年 11 月 6-8 日 (ポスター発表)
- I-10 竹下浩平, 「植物特化代謝マシナリの超分子解剖に関するタンパク質発現系および相互作用解析の支援」 科研費基盤研究費 S 2024 年度成果進捗報告会 (金沢) 2024 年 12 月 12-13 日 (口頭発表)
- I-11 竹下浩平, 「BINDS 高度化および支援について」構造解析試料評価及び高度化について, 2024 年 BINDS 構造解析ユニット「生命科学と創薬研究に向けた関連構造解析プラットフォームによる支援と高度化」測定技術交流会 (京都) 2024 年 9 月 10-11 日 (口頭発表)
- I-12 馬場匠望, 大内田守, 大守伊織, 上野剛, 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シン変異体の結晶構造」第 24 回日本蛋白質科学会年会 (札幌) 2024 年 6 月 11-13 日 (ポスター発表)
- I-13 小林ことり, 上野剛, 真栄城正寿, 西岡晶子, 坂井直樹, 河村高志, 松浦滉明, 竹下浩平, 山本雅貴, 「マイクロ流路デバイスを用いた化合物スクリーニング系の構築」第 24 回日本蛋白質科学会年会 (札幌) 2024 年 6 月 11-13 日 (ポスター発表)
- I-14 竹下浩平, 吾郷日出夫, 佐治淑, 山本祥子, 大恵千翔, 馬場匠望, 松浦宏明, 上野剛, 坂井直樹, 山本雅貴, 「理研 SPring-8 生物系ビームライン基盤グループのウェットラボ整備及びその現状」第 24 回日本蛋白質科学会年会 (札幌) 2024 年 6 月 11-13 日 (ポスター発表)
- II-1 K. Asano, K. Yoshimi, K. Takeshita, S. Mitsuhashi, Y. Kochi, R. Hirano, Z. Tingyu, S. Ishida, T. Mashimo, CRISPR Diagnostics for Quantification and Rapid Diagnosis of Myotonic Dystrophy Type 1 Repeat Expansion Disorders. *ACS Synth. Biol.*, **13**, 2024 (学術論文)

- II-2 K. Yoshimi, A.Kuno, Y. Yamauchi, K. Hattori, H. Taniguchi, K. Mikamo, R. Iida, S. Ishida, M. Goto, K. Takeshita, R. Ito, R. Takahashi, S. Takahashi, T. Mashimo: Genome editing using type I-E CRISPR-Cas3 in mice and rat zygotes, *Cell Rep. Methods*, 4, 100833 (2024) (学術論文)
- II-3 R. Hirano, K. Yoshimi, K. Asano, K. Takeshita, K. J. Ishii, K. Sato, T. Mashimo, Sustainable and portable CRISPR-based diagnostics for high-sensitivity Mpox detection. *medRxiv*, DOI: 10.1101/2024.11.20.24317678, (2024) (学術論文)
- II-4 竹下浩平, 山下沢「新規抗結核薬の開発を目指した新規酵素のX線結晶構造解析」SPRING-8/SACLA 利用研究成果集, 12 巻(2024) 4 号 p. 170-172 (学術論文)
- II-5 US Patent 「Methods for producing cas3 proteins」 Tomoji MASHIMO, Kazuto YOSHIMI, Kohei TAKESHITA, Masaki Yamamoto, Satomi SHIBUMURA (2024-05-02 Publication of US20240141310A1) (特許出願)
- III-1. Y. Yokoyama, S. Ariyasu, M. Karasawa, C. Kasai, Y. Aiba, H. Sugimoto, O. Shoji: Bacterial acyl homoserine lactones triggered non-native substrate hydroxylation catalyzed by directed-evolution-derived cytochrome P450BM3 mutants, *ChemCatChem* e202401641 (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. 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-4. 片岡万知華, 阿部綾萌, Chai Gopalasingam, Christoph Gerle, 重松秀樹, 山本雅貴, 杉本宏, 「ABC 型ヘムトランスポーターの膜貫通領域に存在するアスパラギン酸残基の役割」、第 50 回生体分子科学討論会(横浜) 2024 年 6 月 21-22 日 (ポスター発表)
- III-5. Machika Kataoka, Ayaho Abe, Chai Gopalasingam, Christoph Gerle, Hideki Shigematsu, Masaki Yamamoto, Hiroshi Sugimoto, “Two distinct conformations in apo forms of bacterial heme ABC transporter” 21st IUPAB Congress, 京都, 2024 年 6 月 (ポスター発表, IUPAB2024 Student and Early Career Researcher Poster Award 受賞)
- III-6. T. Kimura, A. Naka, A. Hara, Y. Kobori, Y. Shiro, H. Sugimoto, “Coupling of ATP reactions with allocrite transport in heme ABC transporter; BhuUV-T, revealed by time-resolved spectroscopy”, 21st IUPAB Congress (京都) 2024 年 6 月 24-28 日 (ポスター発表)
- III-7. 中川開斗, 城宜嗣, 杉本宏, 木村哲就, 「UV/visible absorption spectroscopy of the early steps in heme transport of the ABC transporter BhuUV-T」 第 24 回日本蛋白質科学会年会(札幌) 2025 年 6 月 11-13 日 (ポスター発表)

- III-8. 吉村悠, 鏑木基成, 杉本宏, 木村哲就, 「シトクロム b561D2 の機能性評価に資する発現・精製系の構築」第 50 回生体分子科学討論会 (横浜) 2024 年 6 月 21-22 日 (ポスター発表)
- III-9. 炭田悠貴, 仲絢香, 原明穂, 小堀康博, 城宜嗣, 杉本宏, 木村 哲就, 「部位特異的スピンラベルによる ABC トランスポーター BhuUV-T の輸送機構の解明」第 50 回生体分子科学討論会 (横浜) 2024 年 6 月 21-22 日 (ポスター発表)
- III-10. 中川開斗, 城宜嗣, 杉本宏, 木村哲就, 「ABC トランスポーターBhuUV-T のヘム輸送における初期段階の紫外・可視吸収分光解析」第 50 回生体分子科学討論会 (横浜) 2024 年 6 月 21-22 日 (ポスター発表)
- III-11. 中川開斗, 城宜嗣, 杉本宏, 木村哲就「ABC トランスポーターBhuUV-T のヘム輸送解析」第 36 回生物無機化学夏季セミナー・第 4 回生命金属科学夏合宿合同大会 (唐津) 2024 年 9 月 11 日 (ポスター発表)
- III-12. 辻さやか, 大貝茂希, 福田雅一, 屋宏典, 杉本宏, 堀谷正樹, 「2 機能性システイン合成酵素におけるミモシン生合成触媒能獲得の分子機構」第 57 回酸化反応討論会 (鳥取) 2024 年 11 月 16 日 (ポスター発表, 奨励賞)
- III-13. 高戸真莉菜, 藤井和輝, 奥村英夫, 馬場清喜, 杉本宏, 堀谷正樹, 「先端 X 線結晶構造解析で観る酵素の構造柔軟性と活性・熱安定性相関」日本農芸化学会 2024 年度西日本支部大会 (佐賀) 2024 年 9 月 20 日 (口頭発表)
- III-14. 辻さやか, 大貝茂希, 福田雅一, 屋宏典, 杉本宏, 堀谷正樹, 「X 線結晶構造から見る亜熱帯性植物ギンネムの生存戦略～ギンネム由来ミモシン合成酵素は何故ミモシン合成能を獲得できたのか?～」日本農芸化学会 2024 年度西日本支部大会, 佐賀, 2024 年 9 月 20 日 (口頭発表, 優秀発表賞)
- III-15. 高戸真莉菜, 藤井和輝, 奥村英夫, 馬場清喜, 杉本宏, 堀谷正樹, 「先端 X 線結晶構造解析を利用した南極産低温適応酵素の高活性・高熱安定性機構解明への挑戦」第 36 回生物無機化学夏季セミナー・第 4 回生命金属科学夏合宿合同大会 (唐津) 2024 年 9 月 11 日 (ポスター発表)
- III-16. 辻さやか, 大貝茂希, 福田雅一, 屋宏典, 杉本宏, 堀谷正樹「X 線結晶構造解析で探るミモシン合成酵素の分子進化～亜熱帯性植物ギンネムの生存戦略～」第 36 回生物無機化学夏季セミナー・第 4 回生命金属科学夏合宿合同大会 (唐津) 2024 年 9 月 10 日 (ポスター発表)

生命科学専攻

博士後期課程

片岡 万知華

博士前期課程

川上 凌平

松竹 大樹

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 6～令和 9 年度）基盤研究 B 課題番号 24K02010
研究課題 非天然型 CRISPR-Cas3 による精密ゲノム操作法開発と生体応用
研究分担者 竹下浩平（研究代表者：吉見一人）
- 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 6～8 年度）基盤研究（B）課題番号 24K01969
研究課題 新しい動的構造解析法の開発と ABC トランスポーターへの応用
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）