

Cellular Regulation

細胞制御学 II

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*) の研究から qNOR が二量体として機能することを明らかにするとともに、単量体で機能すると考えられてきた緑膿菌由来シトクロム *c* 依存性 NOR (*PacNOR*) も二量体を形成しうることを見出してきた。今年度は、*PacNOR* 二量体の構造を低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析により 2.0 Å 程度の高分解能で決定した。qNOR 二量体の構造を比較すると、*PacNOR* は、異なる様式で二量体を形成しており、その界面には、緑膿菌由来と考えられる脂質分子が存在することを発見した。現在、還元型、単量体、および変異体についても構造解析を進めている。また、*PacNOR* の機能解析から二量体では、単量体でみられる基質阻害が起こりにくいことを発見し、緑膿菌内において *PacNOR* が二量体として機能しうることを見出した。

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。

本年度は、阻害剤が結合したウシ心筋 CcO (シアン化物イオン結合還元型、アジ化物イオン結合再酸化型、一酸化炭素結合還元型、二酸化炭素結合型、一酸化窒素結合還元型、亜酸化窒素結合型、キセノン結合型、および還元型) について、多型構造解析も含めた精密な X 線結晶解析を進めた。さらに、過酸化水素との反応により生成する反応中間体 CcO の X 線結晶解析を開始した。また、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、活性測定、X線結晶解析、電顕単粒子解析、ラマン分光測定を進めた。

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・東田 怜・城 宜嗣
Tosha, T., Tohda, R., 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。DMT1 と Dcytb の相互作用については、これら二つのタンパク質の CHO 細胞に共発させ、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した。予備的な結果ではあるが、DMT1 と Dcytb が複合体を形成しているのではないかという結果が得られたので、今後は、再現性を確認するとともに、より効率よく複合体を単離する条件を検討する。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 の鉄結合能に関する評価を行った。鉄貯蔵タンパク質フェリチンについては、X線自由電子レーザーを利用した時間分解構造解析に向けた微結晶の調製法を確立した。

Ⅳ 酸素センサータンパク質の構造と機能

Structural and Functional Studies on Oxygen Sensor Protein

東田 怜
Tohda, R.

気体分子（酸素や一酸化窒素など）は、細胞内において酵素の基質や反応生成物として利用されている。しかし、これら以外にも生理的エフェクター、（シグナル分子）として機能し、遺伝子発現制御、走化性制御などの生体内反応の調節に関わっていることが知られている。この際、これらの制御にお

いて選択的に気体分子を認識するためのセンサータンパク質の存在が重要になる。ヘム含有シグナルトランスデューサータンパク質 HemAT (Heme Aerotaxis Transducer protein) は細菌の酸素に対する走化性制御に関与しているセンサータンパク質であり、Che タンパク質と複合体を形成することで細胞の走化性を制御している。本課題では、酸素がどのようにして細胞の走化性を制御しているのか制御メカニズム解明を原子レベルで明らかにすることを目指している。これまでに HemAT 一部ドメインにおける酸素結合状態の構造と酸素非結合型の構造を得ることに成功しており、現在構造の精密化作業を行っている。また、複合体構造解析に向けてクライオ電子顕微鏡測定を進めている。今後は酸素が特異的に認識されているメカニズムを明らかにするために、酸素以外のリガンドの結晶構造を明らかにするほか、HemAT 全長の構造が得られるように結晶化条件の検討を行う。さらに複合体構造が得られるようにクライオ電子顕微鏡を用いた最適化作業を行う。

発表論文 List of Publications

- I-1 Nagao S., Kuwano W., Tosha T., Yamashita K., Stanfield J., Kasai C., Ariyasu S., Hirata K., Ueno G., Murakami H., Ago H., Yamamoto M., Shoji O., Sugimoto H., Kubo M. : XFEL crystallography reveals catalytic cycle dynamics during non-native substrate oxidation by cytochrome P450BM3, *Commun. Chem.*, 8, 63 (2025) doi: 10.1038/s42004-025-01440-2
- I-2 Tosha T. : Elucidation of mechanism for enzymatic nitric oxide reduction by using photosensitive caged substrate, *The 5th UOH-FZU-OMU Joint International Symposium on Photocatalysis, Photofunctional Materials, Photon-Science, Nano-Science & Technology* (姫路), 2024
- I-3 Kawakami R., Gopalasingam C., Shigematsu H., Tosha T. : Structure of nitric oxide reductase dimer revealed by single particle cryo-electron microscopy, *21st International Union of Pure and Applied Biophysics Congress (IUPAB 2024)* (京都), 2024 若手発表賞
- I-4 當舎武彦: 低温電子顕微鏡による膜結合型一酸化窒素還元酵素の構造解析: 単量体vs.二量体、*生物無機化学シンポジウム2025 (豊中)*、2025
- I-5 豊島諒士: シトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素の反応中間体の構造解析に向けて、*兵庫県立大学・大学院理学研究科 技術・人材マッチング交流会 (赤穂)*、2024
- I-6 川上凌平: 緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素二量体の構造解析、*第15回バイオダイナミクス研究会 (赤穂)*、2024 発表賞
- I-7 奥田莉帆: 構造・機能解析に基づいたシトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素のプロトン輸送機構の検討、*第15回バイオダイナミクス研究会 (赤穂)*、2024
- I-8 谷林桜来: 脱窒タンパク質超分子複合体の捕捉を目指して、*第15回バイオダイナミクス研究会 (赤穂)*、2024
- I-9 豊島諒士: シトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素の結晶化とX線結晶構造解析、*第15回バイオダイナミクス研究会 (赤穂)*、2024
- I-10 牟礼梨央花: 一酸化窒素不均化酵素の反応機構解明を指向した一酸化窒素還元酵素変異体の機能解析、*第15回バイオダイナミクス研究会 (赤穂)*、2024
- I-11 川上凌平・Gopalasingam C.・重松秀樹・當舎武彦: 緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素二量体

- の構造機能解析、第57会酸化反応討論会（鳥取県）、2024 奨励賞
- I-12 當舎武彦：鉄活性中心による一酸化窒素還元の化学、第57会酸化反応討論会（鳥取）、2024
- I-13 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97会日本生化学会大会（横浜）、2024
- I-14 當舎武彦：鉄活性中心における一酸化窒素還元分子機構、量子構造生物学委員会第15回研究会（東京）、2024
- I-15 豊島諒士・川上凌平・當舎武彦：シトクロムc依存型一酸化窒素還元酵素の反応機構解明に向けたX線結晶構造解析、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（唐津市）、2024
- I-16 谷林桜来・當舎武彦：脱窒タンパク質超分子複合体の捕捉、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
- I-17 奥田莉帆・川上凌平・當舎武彦：緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の変異体を用いた構造・機能解析、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
- I-18 當舎武彦：様々な手法を駆使して金属酵素の反応機構を決定する～その楽しさと・・・～、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（唐津市）、2024
- I-19 當舎武彦：各種分光計測による鉄活性中心の構造解析、第48回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会（京都）、2024
- II-1 Ide T., Shinzawa-Itoh K., Muramoto K.: Crystal structures of bovine heart cytochrome *c* oxidase with inhibitor complex, 21st International Union of Pure and Applied Biophysics Congress (IUPAB 2024)（京都）, 2024
- II-2 Shinzawa-Itoh K., Tsutsumi K., Ide T., Mori S., Yamashita E., Muramoto K. : Purification and characterization of cholate-free cytochrome *c* oxidase from bovine heart, 21st International Union of Pure and Applied Biophysics Congress (IUPAB 2024)（京都）, 2024
- II-3 村本和優・井出智弘・伊藤・新澤恭子：ウシ心筋シトクロム酸化酵素の阻害剤結合構造、日本生体エネルギー研究会第50回討論会（名古屋）、2024
- II-4 笹岡利優斗・村本和優：シトクロム酸化酵素の多型構造解析、第15回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2024
- III-1 大谷 豪：鉄吸収を行う二価金属輸送体 DMT1 の構造解析に向けた精製法の検討、第15回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2024
- III-2 坂上正虎：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取り組み、第15回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2024
- III-3 池田乃彩：鉄還元膜タンパク質 101F6 の機能解析のための大腸菌発現系・精製系の確立、第15回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2024
- III-4 西谷采恵：鉄貯蔵タンパク質フェリチンの動的構造解析に向けた微結晶の結晶化条件確立への試み、第15回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2024
- III-5 坂上正虎・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：膜貫通型鉄還元酵素 Dcytb から二価金属輸送体 DMT1 への Fe²⁺授受機構の解析、第97会日本生化学会大会（横浜）、2024
- III-6 大谷 豪・柴田晃利・藤宇将吾・高原教代・築取いずみ・當舎武彦・城 宜嗣・澤井仁美：鉄イオンの吸収に関与する二価金属輸送体 DMT1 の構造解析に向けた精製法の検討、第97会日本生化学会大会（横浜）、2024

- III-7 大谷 豪・柴田晃利・藤宇将吾・高原教代・築取いずみ・當舎武彦・城 宜嗣・澤井仁美：構造解析に向けた二価金属輸送体の精製法の検討、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
- III-8 坂上正虎・高原教代・築取いずみ・城 宜嗣・當舎武彦・澤井仁美：膜貫通型鉄還元酵素 Dcytb と二価金属輸送体 DMT1 の共発現細胞を用いた相互作用解析、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
- III-9 浦 敦人・佐藤 渚・築取いずみ・當舎武彦・城 宜嗣・澤井仁美：細胞内での安全な鉄輸送を可能にする分子機構、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
- III-10 浦 敦人・佐藤 渚・築取いずみ・城 宜嗣・當舎武彦・澤井仁美：鉄シャペロン PCBP は鉄をフェリチンの H 鎖に輸送する、第 48 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会（京都）、2024
- III-11 浦 敦人・佐藤 渚・築取いずみ・當舎武彦・城 宜嗣・澤井仁美：細胞内での安全な鉄輸送を可能にする分子機構、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
- IV-1 Shimakawa G., Demulder M., Flori S., Kawamoto A., Tsuji Y., Nawaly H., Tanaka A., Tohda R., Ota T., Matsui H., Morishima N., Okubo R., Wietrzynski W., Lamm L., Righetto R., Uwizeye C., Gallet B., Jouneau P.-H., Gerle C., Kurisu G., Finazzi G., Engel B., Matsuda Y. : Diatom pyrenoids are encased in a protein shell that enables efficient CO₂ fixation, Cell, 187, 1-16 (2024) doi: 10.1016/j.cell.2024.09.013
- IV-2 東田 怜：構造から理解するガス分子センサータンパク質の働き、第 13 回バイオダイナミクス研究会（赤穂）、2024

生命科学専攻

博士後期過程

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

博士前期過程

大谷 豪：ヒト由来二価金属輸送体 DMT1 の構造解析に向けた調製法の確立
坂上正虎：ヒト由来鉄還元酵素と二価金属輸送体 DMT1 の相互作用に関する研究

科学研究費補助金等

1 科学研究費補助金（令和 6-9） 海外連携研究 課題番号：24KK0116

研究課題 固定ターゲット型チップを用いた時間分解構造解析による金属酵素反応の分子動画撮影

研究代表者 當舎武彦

研究分担者 東田 怜

2 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

3 科学研究費補助金（令和 6-8） 基盤研究（B） 課題番号：24K01640

研究課題 合成ヘムモデル化合物による生理活性ガスの系統的機能探索

研究代表者 北岸宏亮

研究分担者 當舎武彦

4 科学研究費補助金（令和 4-8） 学変（A）計画班 課題番号：22H05129

研究課題 酵素を誤作動させる分子による酸化反応の遷移状態設計

研究代表者 莊司長三

研究分担者 當舎武彦

5 科学研究費補助金（令和 5-7） 若手研究 課題番号：23K14162

研究課題 生体内酸素センサー・シグナル伝達タンパク質複合体による走化性制御の構造基盤

研究代表者 東田 怜

6 科学研究費補助金（令和 5-7） 特別研究員奨励費 課題番号：23KJ2218

研究課題 酸素をシグナル分子とする生体内センサー・シグナル伝達システムの構造基盤

研究代表者 東田 怜