

生体物理化学研究室

Biophysical Chemistry Laboratory

主任研究員 城 宜 嗣

SHIRO, Yoshitsugu

生体内の要所に数多く存在する金属タンパク質・酵素は、電子移動、分子状酸素の結合・活性化、さらには一酸化窒素の生成・消去などの化学反応を通して、生体の物質・エネルギー代謝、恒常性維持など多くの重要な生理作用に関与している。最近では、細胞内情報伝達系の重要な因子として機能していることも知られている。当研究室では、X線結晶構造解析法や各種分子分光法等による分子構造解析と共に、分子生物学・生化学的な手法を駆使した機能解析を併せ、「金属タンパク質・酵素およびその関連生体高分子の構造情報を基にした生理作用の分子レベルでの理解」を目標に研究を行っている。

1. 特異な化学反応を触媒する金属酵素の構造機能研究

(1) 二原子酸素添加酵素インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ (IDO) の結晶構造ならびに機能解析 (小田^{*1}, 大槻^{*2}, 杉本, 城)

IDO は哺乳類の様々な組織で発現しているヘムタンパク質であり、トリプトファン代謝における第一段階かつ律速段階の反応を触媒する。この酵素の触媒反応では基質のインドール環への二原子酸素添加が行われるが、この過程を原子レベルで理解することを目的として、ヒト由来の IDO の結晶化および立体構造の決定に成功した。IDO は 2 つのドメイン構造からなり、それぞれ新規のフォールディングを有している。活性中心は疎水性アミノ酸側鎖に富んでいることなどから、基質の 2 位および 3 位炭素間への酸素の求電子反応をとまう反応機構を予測した。また、分光学的手法を用いて、ヘム鉄の状態のちがいが (鉄三価, 鉄二価, 一酸化炭素 (CO) 結合型) による基質親和性の差、ならびに基質の有無による CO 分子結合速度の差を明らかにした。

(2) 哺乳動物の第四のグロビンタンパク質の構造機能解析 (澤井^{*3}, 牧野^{*1}, 杉本, 城)

サイトグロビン (Cgb) はヘモグロビン, ミオグロビン, ニューログロビンに続いて近年発見されたヘム結合グロビンタンパク質である。ヒト由来 Cgb の鉄三価型での結晶化およびその立体構造の決定に成功した。主鎖構造に関しては、ヘム b を含んだ A-H の 8 つのヘリックスから構成される典型的なグロビンフォールドであり、ミオグロビン (Mb) と類似しているが、分子間ジスルフィド結合によりダイマーを形成していた。Cgb のヘム鉄は、第六配位座に His (E7) が配位した、六配位構造であった。この構造は、ヘモグロビン (Hb) や Mb とは大きく異なる構造であった。これを反映して、ヘム分子の第六配位座側を横切る E-ヘリックスは、Hb, Mb と比較して Cgb では最大 2.3 Å ほどヘム鉄に近づいている。ただし、同じような六配位構造を持つニューログロビンにおいて提唱されているような E-ヘリックスの前に存在する長くフレキシブルなループ (CD loop) によるリガンド結合の制御は Cgb には当てはまらず、また Hb や Mb と異なるメカニズムによって酸素の結合が制御されていると考えられた。

(3) 脱窒菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の膜結合型一酸化窒素還元酵素の反応機構解析と結晶化 (汲田^{*4}, 日野^{*5}, 城)

バクテリア由来の一酸化窒素還元酵素 (NOR) は、脱窒過程において一酸化窒素 (NO) から亜酸化窒素 (N_2O) への還元反応を触媒するチトクロム *bc* 型の膜内在性タンパク質である。これは大小 2 つのサブユニットから構成されるヘテロダイマーであり、大きいサブユニットに活性部位としてのヘム b_3 -非ヘム鉄 (Fe_B) 複核中心が存在する。NOR のアミノ酸配列は、好気呼吸系の末端酸化酵素であるチトクロム *c* 酸化酵素と高い相同性が見いだされ、生物の呼吸過程の進化を探る上で注目されている。本研究では、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来 NOR による NO 還元触媒反応を、独自の急速混合・凍結装置を用いた時間分解電子スピン共鳴スペクトルによって追跡し、反応中間体の構造、電子状態の帰属を行った。その結果、反応開始後 0.5 ミリ秒においてヘム b_3 と非ヘム鉄 Fe_B のそれぞれに NO 分子が配位した短寿命反応中間体の構造を明らかにし、これを基に新規の触媒反応機構を提唱した。また、提唱した反応機構を立体構造を基盤に理解する目的で、NOR の結晶化に取り組み、大きさ 1.0 mm × 0.5 mm × 0.1 mm の単結晶を得た。現在 7 Å 分解能の回折データが得られており、今後さらに結晶化条件を検討し、高分解能での構造解析を目指す。

(4) ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶構造解析 (青山, 吉川^{*6})

ウシ心筋チトクロム酸化酵素はミトコンドリア内膜に存在し酸素を水に還元するとともに水素イオンを能動輸送する膜タンパク質複合体である。酸化型酵素の酸素還元中心 (ヘム a_3 と Cu_B) の EPR シグナルは観測されないことからその配位構造は注目を集めており、構造決定に X 線結晶構造解析は有効な手段である。ところが、SPring-8 の強い X 線の影響を検出するため、結晶用分光装置を改良し、X 線が照射されている部分だけの酸化型結晶の吸収スペクトルを測定したところ、露光時間に比例して吸収スペクトルに変化が認められた。そこでスペクトル変化のない構造を明らかにするため、479 個の結晶から露光時間 1 秒の回折

データを収集し、構造解析を行った。その結果、ヘム a_3 と Cu_B の間には酸素原子 2 個分に相当する電子密度が確認され、過酸化物が存在すると考えられた。スペクトル変化は約 15 秒で最大となりそれ以上変化しないが、225 秒と 1,125 秒の露光時間の構造を比較すると、過酸化物と考えられる電子密度が約 50% 消失していることが明らかとなった。このことから、X 線照射により生じた水和電子はスペクトル変化を引き起こしヘムの電荷状態を変化させるが、タンパク質全体に大きな構造変化が生ずる可能性は低い。ところが、225 秒以上 X 線を照射すると、過酸化物から水が生成すると考えられる。

(5) 脂肪酸酸化酵素シトクロム $P450_{BS\beta}$ の構造解析 (金^{*4}, 杉本, 城)

Bacillus subtilis 由来のシトクロム $P450$ ($P450_{BS\beta}$) は活性中心にヘムを含み、過酸化水素 (H_2O_2) を利用して基質である長鎖脂肪酸 (ミリスチン酸, パルミチン酸) の α 位と β 位のどちらか一方を特異的に水酸化する。この酵素反応に伴う構造変化を明らかにし、触媒反応機構を分子レベルで理解することを目的として、遷移状態の酵素反応中間体の X 線結晶構造解析を目指している。酸化型結晶に過酸化水素を添加することによって酵素反応を進行させ、生成する反応中間体結晶を凍結トラップした後の構造決定を計画している。時間分解能や中間体の寿命などを把握し、目的反応中間体をトラップするための条件および測定条件を検索するために、現在は顕微分光装置を用いて反応の進行を追求し、結晶状態での反応速度解析を行った。

2. 気体センサーとして働く金属タンパク質の構造機能研究

細菌や菌類, 植物の環境 (光, 酸素, 栄養など) 感知・細胞内情報伝達は, 環境センサーとして働くヒスチジンキナーゼ (HK) と, レスポンスレギュレーター (RR) の 2 つのタンパク質間の ATP 依存性のリン酸基転移反応を介して行われ「二成分情報伝達系」と呼ばれる。現在, 数百種もの二成分情報伝達系遺伝子が明らかになっているものの, HK の環境因子 (リガンド) 結合に共役した自己リン酸化反応の制御やリン酸基受容による RR の活性化といったタンパク質レベルでのスイッチングのメカニズムは依然不明のままである。我々はリガンド結合の研究に有利なセンサードメインに金属を持つ気体センサータンパク質を二成分情報伝達系研究のパラダイムとしている。

(1) 酸素センサータンパク質 FixL/FixJ の情報伝達機構の解析 (中村, 汲田^{*4}, 穂本^{*3}, 田中^{*2}, 葛西^{*2}, 城)

根粒菌のヘム結合型酸素センサー FixL/FixJ タンパク質はそれぞれ二成分情報伝達系の HK と RR である。FixL はセンサードメインにヘムをもち, ヘムでの酸素着脱がその初発感知機構である。酸素存在下 (酸素結合型) ではキナーゼ活性が抑制され, 低酸素下 (酸素解離型) ではキナーゼ活性が上昇する。一方, 転写因子である FixJ は FixL からリン酸基を受け取ることで活性化され, マメ科植物に共生して窒素固定関連遺伝子 (*nifA*, *fixK*) を発現させる。我々は FixL/FixJ における情報伝達のフィードバックを検証する過程で, ADP が FixL の酸素親和性をおよそ 5 倍低下させることを発見した。このアロステリック効果には FixJ を要求すること, また, ADP 結合部位はリン酸化反応を行

うときに ATP が結合する部位と同じであることが分かった。これらを総合して, FixL/FixJ のリン酸化反応の「二気筒レシプロエンジンモデル」を提案した。このモデルは HK の二量体の必然性を示し, また, リガンド感知に伴い, HK が RR を効率良くリン酸化することを矛盾なく説明している。

(2) 好熱菌由来ヒスチジンキナーゼおよびそのレスポンスレギュレーター複合体の結晶化 (山田^{*4}, 中村, 城)

HK の構造をさらに詳細にみると, 一般に N 末端側より, 環境センシングを行う「センサードメイン (SD)」, リン酸化基質であるヒスチジン残基を含み, HK の二量化に寄与している「二量化ドメイン (DD)」と ATP の結合およびリン酸の転移を司る「触媒ドメイン (CD)」という 3 つのドメイン構造に細分化される。現在までに, 国内外のグループにより, これらドメイン個別の構造が決定されている。我々は, 高度好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の HK, RR を用い, HK の全長構造および HK-RR 複合体の構造を決定し, 二成分情報伝達系における「SD-DD-CD 間の分子内情報伝達機構」, 「HK の ATP 依存性自己リン酸化機構」および「HK-RR 間におけるリン酸転移機構」の解明を目的としている。全長 HK を試料とし, X 線小角散乱 (SAXS) を測定解析した結果, 2 つの SD は CD-DD ダイマーを挟みこむ形で存在し, その構造は $ADP-Mg^{2+}$ の有無では大きく変化しないことが明らかとなった。また, HK-RR 複合体の結晶 ($+ADP-Mg^{2+}$, 空間群 $I4_122$, 分解能 4.5 Å) も得ており, 今後, 結晶化条件の最適化を行っていく。

(3) エチレンセンサータンパク質 ETR1 の立体構造解析に向けた大量発現系構築 (菊地, 中村, 兼本^{*2}, 城)

エチレンは植物の生活環に重要な影響を与える植物ホルモモンとして知られている。植物におけるエチレン濃度の認識機構やその情報伝達機構を解明することは, 農作物の生産性向上を目指す上でも重要である。我々は, シロイヌナズナ由来で二成分情報伝達系に属するエチレンセンサータンパク質 ETR1 の情報伝達機構を明らかにするために, ETR1 の大量発現系構築を行っている。ETR1 の N 末側に当たるセンサードメインの大腸菌中での大量発現系を構築したが, エチレン分子の結合部位である銅イオンが結合し, 正しい膜配向性 (3 回膜貫通構造) を持つ組換えタンパク質は得られなかった。正しい配向を持つ ETR1 を得るには, C 末側のキナーゼドメインと共に発現させることが重要であると考え, シロイヌナズナ個体を用いて ETR1 全長の発現系を構築した。ウエスタンブロット法により, 組換え体では野生型よりも多い ETR1 タンパク質の発現を確認したが, この組換えシロイヌナズナの種子を得るまでに 3 ヶ月以上が必要であることが分かり, 大量精製に向かない系であると判断した。そこで, シロイヌナズナの培養細胞 (T87) を利用する発現系構築にも着手した。培養細胞の場合には, 2~3 週間程度で大量の成長した細胞を得ることが可能であり, 正しい配向を持つ ETR1 を精製して, タンパク質として得ることが可能であると期待できる。

3. 新規人工タンパク質の分子設計

(1) 人工ヘムタンパク質 (磯貝, 石田^{*3})

天然のシトクロム c は, 特有のアミノ酸配列モチーフ (-CXXCH-) を持ち, この 2 つのシステイン残基がヘムのピ

ニル基と共有結合している。また、これらの *c* 型シトクロムは、標準水素電極に対して +170 ~ +350 mV と、他のヘムタンパク質に比べて高い酸化還元電位を示す。本研究では、この配列モチーフを持つ 4 本ヘリックスバンドルタンパク質を設計し、ヘムとポリペプチドを反応させることによって人工シトクロム *c* を合成した。アミノ酸配列は、ヘリックスループ-ヘリックスをモノマーとしてデザインし、C 末側のヘリックスにヘム *c* 配列モチーフを導入した。ヘム鉄の第 6 配位子として、N 末側に His を配置したもの (bis-His 配位型) と Met を配置したもの (His-Met 配位型) を作製した。遺伝子工学的に合成したポリペプチドを温和な還元条件下でヘムと反応させることによって *c* 型ヘムを結合した人工タンパク質が得られた。これらの人工ヘムタンパク質は、ゲルろ過クロマトグラフィーと円偏光二色性の測定によって、設計通りの 4 本ヘリックスバンドル構造を形成していることが分かった。さらに、紫外-可視光吸収分光法によって、設計通り His-His あるいは His-Met の軸配位子構造をとることを確認した。His-His 配位型は、標準水素電極に対して -200 mV の酸化還元電位を示し、天然シトクロム *c* の多くと同様な配位構造を持つ His-Met 配位型はそれよりも 20 mV 程度高い -180 mV の電位を示した。これらの結果は、天然シトクロム *c* の高い酸化還元電位がヘム周りの共有結合構造だけでなく、その疎水的環境によって実現されていることを示す。

(2) 人工 DNA 結合タンパク質 (磯貝^{*2}, 武蔵^{*2}, 杉本)

我々は、 λ ファージ由来 Cro タンパク質の立体構造に折り畳まれるようなアミノ酸配列の設計と合成を行っている。本年度は、ターゲットである λ Cro の C 末端 6 残基を欠損した変異体の構造と機能を解析することによって、天然 λ Cro の C 末端領域の生物学的役割を明確にした。 λ Cro の C 末端 6 残基は溶液中で大きく揺らいであり、DNA 複合体の結晶構造中でも構造が特定されていない。 λ Cro はホモダイマーを形成し、オペレーター DNA との結合は、タンパク質のフォールディング反応とカップルしている。詳しい解析の結果、変異体は野生型と比べてオペレーター DNA に対する親和性が大きく損なわれていた。一方、変異体は野生型と同様な立体構造を保持しており、その安定性も野生型と同様であった。すなわち、 λ Cro の揺らいでいる C 末端 6 残基は、立体構造の安定性でなく、DNA 配列の特異的認識に関与している。この機構を X 線結晶構造解析によって明らかにするため、 λ Cro C 末端 6 残基欠損変異体の結晶化を行い、六方晶系の結晶を得ることに成功した。この結晶を用いて解析を行った結果、2.4 Å 分解能の回折データを収集することができた。

4. タンパク質構造解析測定法の開発と応用

(1) 分子構造を基盤にした蛍光タンパク質の発光機構の解明 (福村^{*2}, 菊地, 城)

GFP に代表される蛍光タンパク質は、細胞を光らせるばかりではなく、遺伝子やタンパク質のマーカーとして、さらに、FRET のドナー/アクセプターなどに広く応用されており、今では分子生物学の分野では欠かすことのできない道具となっている。近年、様々な色の蛍光を発する数多くの蛍光タンパク質が発見されている。しかしながら、蛍光タンパク質は「なぜ蛍光を発するのか?」、「なぜその色

になるのか?」など、化学的に最も基本的な疑問に関しては現在でも不明な点が多い。そこで、この疑問に答えることを目的として、サンゴ由来の様々な蛍光タンパク質の X 線結晶構造解析を系統的に行った。現在までに、2 つの新規蛍光タンパク質の立体構造を高分解能で明らかにすることができた。それ以外にも、10 種以上の蛍光タンパク質に関して結晶を得ることができており、今後、それぞれの立体構造の系統的な比較から、分子構造を基盤にした蛍光タンパク質の蛍光特性の解明が期待できる。

(2) X 線吸収スペクトルを利用した金属タンパク質の電子状態の解析 (菊地, 城)

X 線吸収スペクトル (XAS)、特に X 線吸収微細構造 (EXAFS) は、試料の形状 (溶液状態でも可)、pH、温度や純度も問わないために、生物試料においては生理条件下での測定が可能で、その測定から金属タンパク質中の金属イオン周辺の構造や電子状態に関する情報を得ることができる。また、吸収端近傍の XANES スペクトルは金属イオン周辺の原子配置やポテンシャルに非常に敏感であるために、XANES スペクトルだけでも大まかな構造に関する情報が得られる場合も少なくない。我々は既に、1 μ L 程度で簡便に XAS の測定ができる測定法の開発を行っていたが、今までの方法では、測定中に試料表面に生成した氷の結晶が原因となり、EXAFS 解析が困難なデータしか得られなかった。そこで、より簡便かつ氷の影響を受けることが少ない測定セルやセットアップの改良を行った。改良された測定法を用いて鉄-硫黄クラスターを持つ金属タンパク質の EXAFS 解析を行ったところ、変異体の鉄-硫黄間の結合距離が野生型と異なることを明らかにすることに成功した。

^{*1} 研修生 (姫工大大学院)、^{*2} 研修生、^{*3} ジュニア・リサーチ・アソシエイト、^{*4} 協力研究員、^{*5} 基礎科学特別研究員、^{*6} 客員主管研究員

Metal ions are present in biological system in the form of metal-binding proteins and enzymes, and are involved in physiologically important actions such as biological redox reactions, cellular signal transductions and so on. Research in this Laboratory focuses on understanding the functions of such metalloproteins and metalloenzymes at molecular and atomic levels on the basis of their molecular structures, which are determined by the SPring-8 RIKEN beam lines.

1. Structural and functional analyses of several metalloenzymes

We are studying some redox metalloenzymes such as indoleamine 2,3 dioxygenase, cytoglobin, bacterial nitric oxide reductase, cytochrome *c* oxidase and peroxygenase P450.

(1) Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) is a hemoprotein distributed in many tissues of mammals. IDO catalyzes the incorporation of dioxygen atoms of molecular oxygen (O_2) into indole rings that is the first and rate-limiting step in the main pathway of human tryptophan catabolism. We determined the crystal structure of IDO. IDO folds into two domains and the heme locates in their interface. The active site in distal pocket is formed by mainly hydrophobic residues and no charged residues which could abstract the proton of substrate. The kinetic

measurements revealed that the substrate affinity is independent to the pH and the heme iron state. The structure suggested the electrophilic reaction involving the O₂ attacking the double bond between C-2 and C-3 atom in the substrate.

(2) Cytoglobin (Cgb) is a newly discovered heme-protein belonging to the globin superfamily together with hemoglobin, myoglobin and neuroglobin. We determined the crystal structure of ferric form of human Cgb. The structure shows a typical three-over-three alpha helical globin fold. Cgb forms a dimeric association through two disulfide bonds. The hexacoordination of the heme is evident in the electron density map. The E helix of Cgb falls 2.3 Å onto the distal side of heme pocket when it is compared with that of myoglobin. We also characterized the heme environmental structure using various spectroscopic (resonance Raman, EPR, IR) methods and site-directed mutagenesis.

(3) Bacterial nitric oxide reductase (NOR) is a membrane bound cytochrome *bc* complex that catalyzes the two electron reduction of NO to N₂O in bacterial denitrification. This enzyme is considered as an ancestor of CcO. To propose a possible mechanism of the NO reduction reaction, the reaction intermediate in the single turnover of NO reduction by NOR from *Pseudomonas aeruginosa* was characterized by the time-resolved EPR spectroscopy combined with the originally designed freeze-quench device. In addition, we have obtained single crystals of NOR which diffracted X-rays to 7 Å resolution.

(4) Spectral change was observed when the crystal of cytochrome *c* oxidase (CcO) was exposed to X-rays for more than several seconds. Thus, the structure which was exposed to X-rays only for 1 second was determined to clarify the structure without spectral change. In the refined model with the residual electron density of the heme α_3 -Cu_B site, a peroxide ligand was observed to bridge the two metals.

(5) Peroxygenase P450 is a unique cytochrome P450 type enzyme which catalyzes the hydroxylation reaction of fatty acid using hydrogen peroxide (H₂O₂) as an oxidant. For elucidation of the catalytic mechanism, determination of the crystal structure of the intermediate is tried using X-ray analysis.

2. Structural and functional analyses of metallo-proteins relating to cellular signal transduction

The two-component regulatory system is widely distributed in bacteria, fungi and plants. It is well known that sensory histidine kinases (HK) sense individual environmental stimuli, and the cognate response regulators (RR) transduce their signals downstream upon receiving the phosphoryl group. However, it has been still unknown how HKs are autophosphorylated upon ligand-binding, and how RRs are activated upon phosphorylation.

(1) Taking advantage that FixL possesses heme as a ligand-binding site and its ligand-bound states are spectroscopically detectable, we discovered that ADP reduces the oxygen-binding affinity of FixL in the presence of FixJ when it binds to the catalytic site of the ATP-dependent kinase domain. Then, ADP seems to exert the allosteric effect when it is produced during the phosphorylation reactions. Based on these observations, the “two-cylinder reciprocating engine” model of deoxygenation-linked phosphorylation reaction is proposed to explain the efficient turnover reactions of FixL/FixJ phosphorylation.

(2) Using small angle X-ray scattering (SAXS) technique, we obtained the low-resolution structure of HK from

thermophile. We also obtained crystals of the HK-RR complex, which gave X-ray diffraction at 4.5 Å resolution.

(3) ETR1 belongs to the plant two-component systems, and mediates perception of plant hormone ethylene. To understand the ethylene signal transduction in plants, we have constructed a large-scale expression system of recombinant ETR1 of *Arabidopsis*. We have used *E. coli*, the transgenic *Arabidopsis*, culture cell (T87) as host to obtain the recombinant protein with “*in vivo* membrane topology” and with incorporation of Cu into the ethylene binding site. Western-blot analysis performed on membranes indicated high-level expression of ETR1 in the transgenic *Arabidopsis* and culture cell (T87) systems.

3. De novo protein design

(1) The consensus sequence of natural cytochromes *c*, -CXXCH-, was used for the heme-binding site of a designed four-helix bundle, and the apoproteins with either histidine residue or methionine residue positioned at the sixth-coordination site were synthesized and reacted with iron-protoporphyrin IX to create *de novo c*-type cytochromes.

(2) A variant of natural λ Cro, in which the fluctuated carboxyl terminal residues were truncated, was constructed and its functional and structural properties were investigated to clarify the physiological role of these residues. They were revealed to be involved in recognition of the DNA sequence rather than maintenance of the conformational stability.

4. Development and application of new methods to protein structural determination

(1) In the filed of molecular and cell biology, green fluorescent protein (GFP) and several GFP-like proteins (FPs), such as DsRed and Kaede, are commonly used as a biological marker, FRET-based application and so on. To understand better the photochemistry of absorption and fluorescence emission of the proteins, it is imperative to have structural information. We have started the study of structural genomics of FPs, aimed at providing information for rational design of variants with desired fluorescence properties. As far, two new structures of FPs have been solved at high-resolution.

(2) X-ray absorption spectroscopy (XAS) is a powerful tool to study the local structure of active site in metalloproteins. We have succeeded in a development of the micro-volume XAS measurement system, which enable us to perform XAS measurements with the sample volume less than 1 μ L. The performance of the system was checked by the study of the Fe K-edge of a protein containing [2Fe-2S] cluster. The XAS results indicated that Fe-S bond distances vary upon mutations of the protein.

Research Subjects and Members of Biophysical Chemistry Laboratory

1. Molecular structures and functions of metalloenzymes
2. Structural and functional analyses of signal transducing metalloproteins
3. *De Novo* protein design
4. Development and application of new techniques of protein crystallography

Head

Dr. Yoshitsugu SHIRO

Members

Dr. Hiroshi AOYAMA
Dr. Yasuhiro ISOGAI
Dr. Akihiro KIKUCHI
Dr. Hiro NAKAMURA
Dr. Hiroshi SUGIMOTO
Dr. Tomoya HINO^{*1}
Dr. Misa Kim^{*2}
Dr. Hideyuki KUMITA^{*2}
Dr. Seiji YAMADA^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

Visiting Members

Dr. Shin-ichi ADACHI (PF, KEK)
Mr. Satoru AKIMOTO (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)
Prof. Yoshiki HIGUCHI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Prof. Masao IKEDA-SAITO (IMRAM, Tohoku Univ.)
Mr. Manabu ISHIDA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Prof. Tsutomu KOYAMA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)
Prof. Yukio MORIMOTO (Res. Reactor Inst., Kyoto Univ.)
Prof. Takumi NOGUCHI (Inst. Mater. Sci., Univ. Tsukuba)
Ms. Hitomi SAWAI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Dr. Naoki SHIBATA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Prof. Chikashi TOYOSHIMA (IMCB, Univ. Tokyo)
Dr. Masaki UNNO (IMRAM, Tohoku Univ.)
Prof. Shin-ya YOSHIKAWA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Trainees

Ms. Eiko FUKUMURA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Ms. Mayuko KANEMOTO (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Yuji KASAI (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Masatomo MAKINO (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Akira MUSASHI (Fac. Eng., Hosei Univ.)
Mr. Syun-ichiro ODA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Takashi OHTSUKI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Atsunari TANAKA (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文

- Kudo T., Takaya N., Park S., Shiro Y., and Shoun H.: "A positively charged cluster formed in the heme-distal pocket of cytochrome P450nor is essential for interaction with NADH", *J. Biol. Chem.* **276**, 5020–5026 (2001). *
- Ishida M., Dohmae N., Shiro Y., and Isogai Y.: "Synthesis of biotinylated heme and its application to panning heme-binding proteins", *Anal. Biochem.* **321**, 138–141 (2003). *
- Akimoto S., Tanaka A., Nakamura K., Shiro Y., and Nakamura H.: "O₂-specific regulation of the ferrous heme-based sensor kinase FixL from *Sinorhizobium meliloti* and its aberrant inactivation in the ferric form", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 136–142 (2003). *
- Sawai H., Kawada N., Yoshizato K., Nakajima H., Aono S., and Shiro Y.: "Characterization of the heme environmental structure of cytoglobin, a fourth globin in humans", *Biochemistry* **42**, 5133–5142 (2003). *
- Noguchi T., Nojiri M., Takei K., Odaka M., and Kamiya N.: "Protonation structures of cys-sulfinic and cys-sulfenic acids in the photosensitive nitrile hydratase revealed by fourier transform infrared spectroscopy", *Biochemistry* **42**, 11642–11650 (2003). *
- Nagano S., Shimada H., Tarumi A., Hishiki T., Kimata-Ariga Y., Egawa T., Suematsu M., Park S., Adachi S., Shiro Y., and Ishimura Y.: "Infrared spectroscopic and mutational studies on putidaredoxin-induced conformational changes in ferrous CO-P450cam", *Biochemistry* **42**, 14507–14514 (2003). *
- Suruga K., Nagasawa N., Yamada S., Satoh T., Kawachi R., Nishio T., Kume T., and Oku T.: "Radiation-induced enhancement of nitrite reducing activity of cytochrome *c*", *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6835–6843 (2003). *
- Takaya N., Kuwazaki S., Adachi Y., Suzuki S., Kikuchi T., Nakamura H., Shiro Y., and Shoun H.: "Hybrid respiration in the denitrifying mitochondria of *Fusarium oxysporum*", *J. Biochem.* **133**, 461–465 (2003). *
- Makino R., Obayashi E., Homma N., Shiro Y., and Hori H.: "YC-1 facilitates release of the proximal his residue in the NO and CO complexes of soluble guanylate cyclase", *J. Biol. Chem.* **278**, 11130–11137 (2003). *
- Saito K., Ito E., Hosono K., Nakamura K., Imai K., Iizuka T., Shiro Y., and Nakamura H.: "The uncoupling of oxygen sensing, phosphorylation signalling and transcriptional activation in oxygen sensor FixL and FixJ mutants", *Mol. Microbiol.* **48**, 373–383 (2003). *
- Mizuno N., Voordouw G., Miki K., Sarai A., and Higuchi Y.: "Crystal structure of dissimilatory sulfite reductase D(DsrD) protein - Possible interaction with B- and Z-DNA by its winged-helix motif", *Structure* **11**, 1133–1140 (2003). *
- Suruga K., Murakami K., Taniyama Y., Hama T., Chida H., Satoh T., Yamada S., Hakamata W., Kawachi R., Isogai Y., Nishio T., and Oku T.: "A novel microper-

oxidase activity: Methyl viologen-linked nitrite reducing activity of microperoxidase”, Biochem. Biophys. Res. Commun. **315**, 815–822 (2004). *

Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: “ADP reduces the oxygen-binding affinity of a sensory histidine kinase FixL : The possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 2746–2750 (2004). *

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Higuchi Y., Ogata H., Hirota S., Adachi S., Yagi T., and Yasuoka N.: “New aspects of the structural and spectroscopic chemistry on [NiFe]hydrogenase”, 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Sawai H., Kawada N., Yoshizato K., Nakajima H., Aono S., Mizutani Y., and Shiro Y.: “Characterization of heme environmental structure of cytoglobin, A fourth globin in human”, 11th Int. Conf. on Biological Inorganic Chemistry, Cairns, Australia, July (2003).

Kumita H., Yamada S., Nakamura H., and Shiro Y.: “Interaction between sensor domain and histidine kinase domain of sensory histidine kinase in the two-component signaling system”, 11th Int. Conf. on Biological Inorganic Chemistry, Cairns, Australia, July (2003).

Shiro Y., Matsunaga I., and Lee D.: “Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid peroxygenase P450 from *Bacillus subtilis*”, 11th Int. Conf. on Biological Inorganic Chemistry, Cairns, Australia, July (2003).

Adachi S., Inoue K., Oka T., Yagi N., Tanaka Y., Ishikawa T., and Shiro Y.: “Subnanosecond-resolved X-ray diffraction at the SPring-8 high flux beamline BL40XU”, 8th Int. Conf. on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2003), (Stanford Synchrotron Radiation Laboratory and The Advanced Light Source), San Francisco, USA, Aug. (2003).

Makino M., Sawai H., Kawada N., Yoshizato K., Sugimoto H., and Shiro Y.: “A newly discovered globin has the hexacoordinated heme; Structural basis of human cytoglobin for ligand binding”, 3rd Symp. on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function, Kyoto, Oct. (2003).

Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: “ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL: The possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction”, 3rd Symp. on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function, Kyoto, Oct. (2003).

Ishida M., Dohmae N., Shiro Y., and Isogai Y.: “Design and synthesis of *de novo* cytochrome *c*”, 3rd Symp. on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function, Kyoto, Oct. (2003).

Kumita H., Matsuura K., Takahashi S., Hori H., Fukumori Y., Morishima I., and Shiro Y.: “Reaction intermediate of membrane associated nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*”, 3rd Symp. on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function, Kyoto, Oct. (2003).

Shiro Y.: “Sensing mechanism of two-component regulatory system”, 3rd Symp. on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function, Kyoto, Oct. (2003).

Kasai Y., Kanemoto M., Shiro Y., and Nakamura H.: “Two-component signal transferring systems: From bacteria to plants”, 3rd Symp. on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function, Kyoto, Oct. (2003).

Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: “ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL: The possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction”, Gordon Research Conf. on Sensory Transduction in Microorganisms, Ventura, USA, Jan. (2004).

(国内会議)

汲田英之, 松浦宏治, 高橋聡, 堀洋, 福森義宏, 森島績, 城宜嗣: “緑膿菌由来 NO 還元酵素の短寿命中間体の観測と反応機構解析”, 第 53 回錯体化学討論会, (錯体化学会, 日本化学会), 山形, 9 月 (2003).

穂本智, 城宜嗣, 中村寛夫: “FixL による O₂, CO, NO の分別 sensing と生理機能発現に関して”, 第 8 回酸素ダイナミクス研究会, (神戸芸術工科大学), 神戸, 9 月 (2003).

青山浩, 西原正晴, 村本和優, 山下栄樹, 伊藤-新澤恭子, 吉川信也, 月原富武: “X 線照射による酸化型チトクロム酸化酵素活性中心の構造変化”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).

村本和優, 前河早希, 青波里実, 平田邦生, 青山浩, 山下栄樹, 横尾信次, 倉内毅, 伊藤-新澤恭子, 月原富武, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素 Na⁺/Ca²⁺ 結合部位の構造”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).

寺田浩人, 山崎明子, 伊藤-新澤恭子, 蓼原吉輝, 青山浩, 杉村高志, 月原富武, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素に特異的に結合する脂質”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).

村本和優, 原正生, 青波里実, 平田邦生, 青山浩, 山下栄樹, 倉内毅, 横尾信次, 伊藤-新澤恭子, 月原富武, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸素還元中心のシアン化結合構造”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).

村本和優, 山下栄樹, 青山浩, 伊藤-新澤恭子, 望月正雄, 櫻井啓介, 月原富武, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸素還元中心付近における酸素透過経路”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).

西山善喬, Rukman H., 磯貝泰弘, 荒川秀雄, 猪飼篤: “ミオグロビンとその人工類似体の構造安定性と力学応答特性の関係”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).

- 汲田英之, 松浦宏治, 高橋聡, 堀洋, 福森義宏, 森島績, 城宜嗣: “急速凍結 EPR 分光法による緑膿菌由来 NO 還元酵素の短寿命中間体の観測と反応機能解析”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).
- 伊藤-新澤恭子, 山本尚吾, 花田真, 蓼原吉輝, 杉村高志, 青山浩, 月原富武, 吉川信也: “新規合成した界面活性剤を用いたウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶化”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).
- 武蔵映, 杉本宏, 城宜嗣, 磯貝泰弘: “揺らいでいる C 末断片を除去した λ Cro の機能・構造解析”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).
- 穂本智, 田中敦成, 中村花野子, 城宜嗣, 中村寛夫: “O₂ specific regulation of the ferrous heme-based sensor kinase FixL from *Sinorhizobium meliloti* and its aberrant inactivation in the ferric form”, 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2003).
- 石田学, 堂前直, 城宜嗣, 磯貝泰弘: “Synthesis of biotinylated heme and its application to panning heme-binding proteins”, 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2003).
- 汲田英之, 松浦宏治, 高橋聡, 堀洋, 福森義宏, 森島績, 城宜嗣: “急速凍結 EPR 分光法による緑膿菌由来 NO 還元酵素の反応機構解析”, 第 18 回生体機能関連化学部会・第 7 回バイオテクノロジー部会合同シンポジウム, 熊本, 10 月 (2003).
- 青山浩: “完全酸化型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析”, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「細胞膜のアダプター分子: テトラスパニンの分子機能と生理的役割」, 吹田, 11 月 (2003).
- 伊藤かおり, 葛西佑一, 伊藤隆, 柴田武彦, 田村浩二, 中村寛夫, 城宜嗣: “根粒菌 FixJ 蛋白質 C 末端ドメインの DNA との相互作用の解析”, 第 42 回 NMR 討論会, (日本核磁気共鳴学会), 吹田, 11 月 (2003).
- 葛西佑一, 倉島かおり, 伊藤隆, 中村寛夫, 柴田武彦, 城宜嗣: “二成分情報伝達系レスポンスレギュレーター FixJ の構造解析”, 第 42 回 NMR 討論会, (日本核磁気共鳴学会), 吹田, 11 月 (2003).
- 牧野正知, 杉本宏, 澤井仁美, 河田則文, 吉里勝利, 足立伸一: “ヒト由来サイトグロビンの結晶構造”, 日本結晶学会平成 15 年度年会, 熊本, 12 月 (2003).
- 青山浩, 村本和優, 山下栄樹, 伊藤-新澤恭子, 吉川信也, 月原富武: “温度因子分析によるチトクロム酸化酵素のイミダゾール基の配向決定”, 日本結晶学会平成 15 年度年会, 熊本, 12 月 (2003).
- 穂本智, 城宜嗣, 中村寛夫: “Arginine in distal side of oxygen-sensing domain acts as the switch for the initial reaction of autokinase activity to FixL”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 田中敦成, 中村寛夫, 城宜嗣: “酸素センサータンパク質 FixL の自己リン酸化制御機構における二重体化の意義”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 中村寛夫: “細胞内情報伝達系: 生物が用いるやわらかい相互作用”, 理研シンポジウム「モレキュラー・アンサンブル 2003」, 和光, 12 月 (2003).
- 磯貝泰弘: “人工タンパク質のデザイン”, 理研シンポジウム「モレキュラー・アンサンブル 2003」, 和光, 12 月 (2003).
- 神谷信夫, 吾郷日出夫, 青山浩, 宮野雅司, 城宜嗣, 沈建仁: “*Thermosynechococcus vulcanus* 由来光化学系 II 膜蛋白質複合体の結晶構造解析”, 第 17 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, つくば, 1 月 (2004).
- 杉本宏: “サイトグロビンのリガンド結合機構”, 理研シンポジウム「理研構造生物 IX シンポジウム Part1. 脂質メディエーター関連タンパク質の生物学からその応用発展 Part2. 放射光構造生物の進展とさらなる飛躍を目指して」, 播磨, 1 月 (2004).
- 汲田英之: “緑膿菌由来 NO 還元酵素の反応機構解析と三次元結晶化”, 理研シンポジウム「理研構造生物 IX シンポジウム Part1. 脂質メディエーター関連タンパク質の生物学からその応用発展 Part2. 放射光構造生物の進展とさらなる飛躍を目指して」, 播磨, 1 月 (2004).
- 磯貝泰弘: “人工タンパク質のデザイン”, バイオデザインの活用による新機能物質の開発研究会第 8 回研究会, 名古屋, 1 月 (2004).
- 磯貝泰弘: “人工タンパク質のデザイン”, 理工学研究所プロジェクト研究シンポジウム「蛋白質を主とする生態系の化学: 生物科学と溶液化学の融合」, 滋賀県草津, 1 月 (2004).
- 磯貝泰弘: “デザインとフォールディング研究の接点”, 理研シンポジウム「タンパク質のデザイン, 実験室進化, フォールディング」, 和光, 3 月 (2004).