

## 6-5 生命・錯体分子科学研究領域

### 生体分子機能研究部門

青野重利（教授）（2002年5月1日着任）

A-1) 専門領域：生物無機化学

A-2) 研究課題：

- a) ヒドロゲナーゼ生合成に関するタンパク質の構造機能相関解明

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) ヒドロゲナーゼは、多くの原核生物や一部の真核生物に含まれる金属酵素であり、水素代謝反応の中心的な役割を担っている。ヒドロゲナーゼは、その活性中心を構成する金属種の違いにより、[FeFe]型ヒドロゲナーゼ、[NiFe]型ヒドロゲナーゼ、[Fe]型ヒドロゲナーゼの3種に大別される。これらのうち、[NiFe]型ヒドロゲナーゼ中には、2分子のCN<sup>-</sup>と1分子のCOが配位したFeと、2つのCys残基が配位したNiが、2つのCys残基により架橋されたNiFe二核クラスターが存在しており、この二核クラスターが[NiFe]型ヒドロゲナーゼの活性中心として機能している。活性中心であるNi-Fe二核金属錯体の形成を始めとし、Feに配位したCN<sup>-</sup>やCOの生合成にも一連のアクセサリータンパク質が関与しているが、それらの詳細な反応機構については、不明な点が多く残されている。[NiFe]型ヒドロゲナーゼの活性中心として機能するNi-Fe二核金属錯体の骨格構造の一部であるFe(CO)(CN)<sub>2</sub>ユニットは、まず足場タンパク質（scaffold protein）として機能するHypCD複合体中で組み立てられ、ヒドロゲナーゼのlarge subunitへと輸送されると推定されている。本年度の研究では、Fe(CO)(CN)<sub>2</sub>ユニットの構成要素であるCOの生合成に関与すると推定されるアクセサリータンパク質HypXの結晶構造解析に成功し、得られた構造情報を基に、CO生合成反応の分子機構を明らかにした。HypXは、10-formyltetrahydrofolate dehydrogenaseと相同性を示すN末ドメインと、enoyl-CoA hydratase/isomeraseと相同性を示すC末ドメインから構成されていることがわかった。N末ドメインは、リンカーで連結された2つのサブドメイン（サブドメインA：残基1～151、サブドメインB：残基182～270）から構成されていた。サブドメインAは、6本のβストランドと5本のαヘリックスから構成されており、6本のβストランドからなるmixed parallel β-sheetとそれを両側から挟む2本のαヘリックス2組が、Rossmann foldを形成していた。19残基からなるループで連結されたN末ドメインとC末ドメイン間には、極性アミノ酸同士による15個の水素結合と、水分子を介した17個の水素結合が存在していた。HypX内部には、N末ドメインからC末ドメインまで連続したキャビティーが存在しており、分子表面に開いた2つの開口部がキャビティーへの入口となっていた。本キャビティーのC末ドメイン領域には、CoA分子が結合していることがわかった。野生型HypXの結晶をテトラヒドロ葉酸（THF）にソーキングすることにより、N末ドメイン中のキャビティーにTHFが結合したTHF-CoA結合型HypXを調製し、その結晶構造の決定にも成功した。HypXのN末ドメインの構造は、N<sup>10</sup>-formyl-THFを基質とするホルミル基転移酵素と高い構造相同性を示すことから、HypXによるCO生成反応においてもN<sup>10</sup>-formyl-THFが基質となっているものと考えられる。HypXとホルミル基転移酵素との構造比較の結果、N<sup>10</sup>-formyl-THFを基質とするHypXの酵素反応においては、His74、Asp80、Asp109の3残基が触媒残基として機能していると考えられる。HypX変異体の構造解析、およびMDシミュレーションの結果、HypX中に結合しているCoAは、二つの異なるコンフォメー

ション (open 型および closed 型) を取り得ることがわかった。HypX による CO 生成反応では, まず open 型コンフォメーションをとった CoA と N 末ドメインに結合した N<sup>10</sup>-formyl-THF との間でホルミル基転位反応が進行する。その結果生成した formyl-CoA が open 型から closed 型へとコンフォメーション変化し, C 末ドメイン中で CO 生成反応が進行するものと考えられる。

#### B-1) 学術論文

**A. PAVLOU, H. YOSHIMURA, S. AONO and E. PINAKOULAKI**, “Protein Dynamics of the Sensor Protein HemAT as Probed by Time-Resolved Step-Scan FTIR Spectroscopy,” *Biophys. J.* **114**, 584–591 (2018).

#### B-3) 総説, 著書

青野重利, 「遷移金属含有型ガス分子センサータンパク質によるシグナルセンシング」, *生化学* **90**, 290–296 (2018).

**S. AONO**, “Overview of Gas-sensing Systems,” in *Gas Sensing in Cells*, S. Aono, Ed., RSC Publishing; Cambridge, Chapter 1, pp. 1–14 (2018).

**S. AONO**, “Haem-Based Sensors of Carbon Monoxide,” in *Gas Sensing in Cells*, S. Aono, Ed., RSC Publishing; Cambridge, Chapter 4, pp. 84–135 (2018).

#### B-4) 招待講演

**S. AONO**, “Structural Basis for Transcriptional Regulation of Heme Homeostasis in *Lactococcus lactis*,” 2018 Korea-Taiwan-Japan Bioinorganic Chemistry Symposium, Daejeon (Korea), May 2018.

**S. AONO**, “Structural analyses of the heme uptake machinery in *Corynebacterium glutamicum*,” 10<sup>th</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10), Munich (Germany), July 2018.

**S. AONO**, “Structure and function of transcriptional regulator adopting heme as a signaling molecule,” 9<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-9), Singapore, December 2018.

#### B-7) 学会および社会的活動

##### 学協会役員等

触媒学会生体関連触媒研究会世話人 (2002–).

日本化学会生体機能関連化学部会幹事 (2007–2014).

日本化学会東海支部常任幹事 (2009–2010).

日本化学会生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン幹事 (2014–2015).

日本化学会生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン主査 (2016–2017).

##### 学会の組織委員等

14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry 組織委員会総務委員長 (2009).

The first International Symposium on Biofunctional Chemistry 組織委員 (2012).

Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations 組織委員 (2008–2010, 2012–2016).

##### 文部科学省, 学術振興会, 大学共同利用機関等の委員等

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員 (2005–2007).

日本学術振興会国際事業委員会書面審査員 (2005–2007).

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員 (2010–2012, 2014–2015).

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員及び国際事業委員会書面審査委員・書面評価員 (2016–2017).

大阪大学蛋白質研究所専門委員会委員 (2016).

大阪大学蛋白質研究所専門委員会委員長 (2017).

学会誌編集委員

*J. Biol. Inorg. Chem.*, Editorial Advisory Board (2002–2004).

*Biosensors*, Editorial Board (2010–2018).

*Chemistry Letters*, Section Editor (2013–).

その他

総合研究大学院大学物理科学研究科構造分子科学専攻長 (2016–).

#### B-10) 競争的資金

科研費基盤研究(B), 「気体分子を生理的エフェクターとする金属含有センサータンパク質の構造と機能」, 青野重利 (2007年–2009年).

科研費特定領域研究(公募研究), 「ガス分子により駆動される新規なセンサータンパク質の機能発現機構」, 青野重利 (2007年–2010年).

ノバルティス科学振興財団研究奨励金, 「ガス分子により駆動される生体内シグナル伝達の分子機構解明」, 青野重利 (2010年).

野田産業科学研究所研究助成, 「ヘムをシグナル分子とする *Lactococcus lactis* における遺伝子発現制御」, 青野重利 (2011年).

科研費挑戦的萌芽研究, 「環境汚染物質検出用の高感度蛍光プローブを装備したホーミングセルの創製」, 青野重利 (2011年–2012年).

科研費基盤研究(B), 「ガス分子による生体機能制御に関与するセンサータンパク質の構造と機能」, 青野重利 (2011年–2013年).

科研費挑戦的萌芽研究, 「生物の環境センシング機能を基盤とした高感度な環境汚染物質検出システムの構築」, 青野重利 (2013年–2014年).

科研費若手研究(B), 「ビタミン B12 を感光色素とする新規光センサーの構造機能研究」, 村木則文 (2014年–2016年).

科研費挑戦的萌芽研究, 「環境汚染物質に対する自発集積能を有する高感度汚染検出システムの構築」, 青野重利 (2015年–2016年).

科研費若手研究(B), 「過渡的複合体に着目したヘムリレー輸送の分子機構の解明」, 村木則文 (2017年–2018年).

科研費基盤研究(B), 「新規な遷移金属含有型センサータンパク質の構造機能相関解明」, 青野重利 (2017年–2020年).

#### C) 研究活動の課題と展望

生物は、様々な外部環境変化にさらされながら生育するため、外部環境変化に応答して細胞内の恒常性を維持する精緻なシステムを有している。このような外部環境変化に応答した恒常性維持システムには、外部環境の変化を感知するためのセンサータンパク質が必要不可欠である。我々の研究グループでは、遷移金属が関与するセンサータンパク質の構造機能相関解明、および遷移金属の細胞内恒常性維持機構の解明を目指して研究を進めている。今後は、構造生物学的、ならびに生化学・分子生物学的な実験手法を活用し、これらの研究を進めていきたいと考えている。