

6-7 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) コリネバクテリアのヘム取込みに関与するヘム結合・輸送タンパク質の構造機能相関解明
- b) ヒドロゲナーゼ生合成に関与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) コリネバクテリア属細菌 *Corynebacterium glutamicum* のヘム取り込み系は、宿主からのヘム獲得、およびヘムトランスポーターへのヘム輸送に関与するタンパク質 HtaA, HtaB と細胞内にヘムを取り込むトランスポーターシステムである HmuT-HmuUV から構成されている。本研究では、本システムによるヘム取込み反応の詳細な分子機構を明らかにするため、HtaA, HtaB の結晶構造解析を行った。HtaA はリンカーでつながれた N 末端ドメイン (HtaA-N) と C 末端ドメイン (HtaA-C) から、HtaB は 1 つのドメインから構成されている。HtaA-N, HtaA-C, HtaB は、いずれもホロ型（ヘム結合型）として単離精製された。本研究で決定した HtaA-C および HtaB の全体構造は、以前に構造決定した HtaA-N と高い相同性を示した。いずれの構造においても、Tyr が第 5 配位子としてヘム鉄に配位しており、Tyr は近傍の His と水素結合を形成していた。また、HtaA-N で観測されていた、ヘムプロピオン酸と Ser 間での水素結合、Phe とヘムピロール環の間の π - π スタッキングも、HtaA-N, HtaA-C, HtaB すべてで保存されており、これらの相互作用が、ヘム認識に重要な役割を果たしていることを示唆している。全体構造が高い相同性を示す一方、結合するヘムの配向やヘム結合部位周辺のループの長さには、違いが見られた。ヘム獲得・輸送反応において、ヘム軸配位子である Tyr と近傍の His 間での水素結合が果たす役割を明らかにするため、His を Ala に置換した HtaA-N, HtaA-C, HtaB の変異型タンパク質を調製した。いずれの変異体も、アポ型として単離精製されたことから、これら変異体ではヘムへの結合親和性が低下していることが分かった。これら変異体の結晶化条件のスクリーニングを行った結果、HtaA-C の H434A 変異体の結晶が得られ、その結晶構造を決定した。HtaA-C の H434A 変異体の結晶構造では、非対称単位中の 2 分子が N 末端の β -strand のドメインスワップによって二量体を形成していた。この二量体構造では、ヘムの軸配位子となる Tyr が隣り合う分子のヘム結合領域に入り込んでいることが分かった。これらの結果を基に、HtaA/HtaB 間でのヘム輸送反応において、タンパク質がダイナミックに構造変化（ドメインスワッピングが起こる）することにより、ホロ型 HtaA とアポ型 HtaB 間で同様な二量体構造を過渡的に形成し、ヘム輸送反応が進行するという反応モデルを提唱した。
- b) 水素ガスの酸化反応・プロトンの還元反応を触媒する酵素であるヒドロゲナーゼは、バクテリアなどによる水素代謝において中心的な役割を果たしている他、最近では燃料電池用触媒としての利用も期待されている金属酵素である。活性中心の構造の違いにより、[NiFe] 型、[FeFe] 型、[Fe] 型の 3 種のヒドロゲナーゼが存在するが、いずれの場合も活性中心の Fe には、CO が配位している。この CO は、酵素反応により生合成されることが分かっているが、CO 生成反応の分子機構は不明な状況であった。本研究では、[NiFe] 型ヒドロゲナーゼが利用している CO の生合成に関

わる酵素 (HypX) の結晶構造を決定し, HypX がこれまでに全く例の無い反応により CO を合成していることを明らかにした。HypX は二つのドメイン (N 末ドメインと C 末ドメイン) から構成されており, 分子内部にはこれら二つのドメインにまたがる形でキャビティーが存在している。また, C 末ドメイン側のキャビティーには, 補酵素 A (coenzyme A: CoA) が結合していることが分かった。得られた結晶構造を基に, 下記のような CO 生合成反応機構を提唱した。HypX の N 末ドメインと C 末ドメインでは, それぞれ異なる二つの化学反応が進行する。N 末ドメインでは, 反応基質として N 末ドメイン中のキャビティーに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸から CoA へのホルミル基転移反応が進行する。この時, キャビティー中の CoA は直鎖状に伸びたコンフォメーションを取り, CoA の末端にある -SH 基は N 末ドメインに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸中のホルミル基の側に位置し, CoA へのホルミル基転移反応によりホルミル -CoA が反応中間体として生成する。生成したホルミル -CoA は, CoA 分子の末端部分に存在するホルミル基が, HypX の C 末ドメイン中の酵素活性サイトに位置するよう, キャビティー中で大きくそのコンフォメーションが変化する。C 末ドメインでは, ホルミル -CoA からの CO 脱離反応が進行し, CO と CoA が生成する。

B-1) 学術論文

N. MURAKI, C. KITATSUJI, Y. OKAMOTO, T. UCHIDA, K. ISHIMORI and S. AONO, “Structural Basis for Heme Transfer Reaction in Heme Uptake Machinery from Corynebacteria,” *Chem. Commun.* **55**, 13864–13867 (2019).

N. MURAKI, K. ISHII, S. UCHIYAMA, S. G. ITOH, H. OKUMURA and S. AONO, “Structural Characterization of HypX Responsible for CO Biosynthesis in the Maturation of NiFe-Hydrogenase,” *Commun. Biol.* **2**, 385 (12 pages) (2019).

B-4) 招待講演

青野重利, 「ヘムが関与する生体内シグナルセンシングおよびシグナル伝達」, 同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」2018年度成果報告会, 同志社大学, 京田辺市, 2019年4月.

S. AONO, “Structural Characterization of HypX Responsible for CO Biosynthesis in the Maturation of [NiFe]-Hydrogenases,” Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

S. AONO, “Structural Characterization of HypX Responsible for CO Biosynthesis to assemble the active site of [NiFe]-Hydrogenase,” 2019 Korea-Taiwan-Japan Biological Inorganic Chemistry Symposium, Taichung (Taiwan), November 2019.

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

14th 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, 2019–2020).

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–).

豊田理化学研究所審査委員会委員 (2019–).

B-10) 競争的資金

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).

科研費新学術領域研究「生命金属科学」(計画研究), 「生命金属動態を鍵反応とするセンサー分子システムの構築と生理機能制御」, 青野重利 (2019年–2023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、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のみならず、これら新規金属タンパク質の生合成反応機構解明に関する研究も進めて行きたいと考えている。