

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）

村木 則文（助教）

武田 康太（特任助教（分子科学研究所特別研究員））

NAM, Dayeon（特任研究員）

村木 めぐみ（技術支援員）

中根 香織（事務支援員）

A-1) 専門領域：生物無機化学

A-2) 研究課題：

- a) ヒドロゲナーゼ生成に関与するタンパク質の構造機能相関解明
- b) バクテリアの走化性制御系における酸素センサーシステムの構造機能相関解明
- c) 鉄イオンセンサー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) 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活性部位を構成する金属中心の構造から [FeFe] 型, [NiFe] 型, [1Fe] 型の3種類に分類される。本研究では, [NiFe] 型ヒドロゲナーゼの活性中心生成における, 複数のアクセサリータンパク質やシャペロンタンパク質間での複合体形成や, 反応中間体として形成される金属錯体のタンパク質間輸送反応の詳細を明らかにすることを目的として研究を進めている。これまでに, ヒドロゲナーゼ活性中心の構築に必須な CO の生合成反応に関与する HypX の結晶構造を決定し, HypX が補酵素 A (CoA) を補因子として結合していることを明らかにした。得られた構造を基に, 下記に述べるような HypX による CO 生合成反応の反応スキームを提案した。CO 生合成反応ではまず, HypX の N 末ドメイン中で N¹⁰-formyl-tetrahydrofolate から CoA へのホルミル基転移反応が進行し, formyl-CoA が生成する。生成した formyl-CoA は, ホルミル基が C 末ドメインに位置するよう, 大きくそのコンフォメーションが変化する。その後, C 末ドメイン中で formyl-CoA の脱カルボニル反応が進行し, CO が生成する。formyl-CoA のコンフォメーション変化の過程は, MD シミュレーションによっても検討した。生成した CO を効率よく利用するため, 活性中心の構成ユニットである Fe(CO)(CN)₂ 錯体生合成反応に関与するアクセサリータンパク質 HypC/HypD と HypX が三者複合体を形成することを明らかにした。
- b) 酸素センサータンパク質 HemAT とシグナル伝達タンパク質である CheA, CheW から構成される, 酸素に対する走化性制御システムにおける酸素センシングならびに酸素に依存したシグナル伝達反応の分子機構解明を目的として研究を行っている。好熱性 *Bacillus* 属細菌である *Bacillus smithii* 由来の HemAT, CheA, CheW を単離精製し, CheA/CheW の二者複合体, HemAT/CheA/CheW の三者複合体が溶液中で安定に生成することを明らかにした。クライオ電顕によるこれら複合体の立体構造決定の予備実験として, ネガティブ染色した複合体サンプルの電子顕微

鏡像の観測を行ったところ、直径が 220 ~ 310 Å のサイズが異なるリング状構造が観測された。分子サイズから考えると、CheA, CheA/CheW, および HemAT/CheA/CheW それぞれの trimer of dimer が形成されていると考えられる。本酸素センサーシステムにおいては、CheA と CheW がシグナル伝達の足場となるリング状構造を形成し、そこにセンサータンパク質である HemAT が付加した超分子複合体を形成するものと推定される。現在、この仮説を検証するための実験を進めている。

- c) イネの細胞内鉄イオンセンサーとして機能すると考えられているユビキチンリガーゼ HRZ による鉄イオンセンシング機構、および鉄イオンによる HRZ の機能制御機構の解明を目的として研究を進めている。HRZ の全長タンパク質、および HRZ 中に存在するヘムエリスリン様ドメイン、亜鉛フィンガードメインを大腸菌で発現させた場合、封入体を形成し、可溶性画分には発現しなかった。一方、タンパク質のフォールディングシャペロンとして機能するトリガーファクターとの融合タンパク質として発現させると、可溶性画分に発現することが分かった。現在、結晶構造解析に適用可能な状態の試料調製法確立に向けて検討を進めている。

B-1) 学術論文

Y. OHNISHI, N. MURAKI, D. KIYOTA, H. OKUMURA, S. BABA, Y. KAWANO, T. KUMASAKA, H. TANAKA and G. KURISU, “X-Ray Dose-Dependent Structural Changes of the [2Fe-2S] Ferredoxin from *Chlamydomonas reinhardtii*,” *J. Biochem.* **167**, 549–555 (2020). doi: 10.1093/jb/mvaa045

D. SEO, N. MURAKI and G. KURISU, “Kinetics and Structural Insight into a Role of the Re-Face Tyr328 Residue of the Homodimer Type Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductase from *Rhodospseudomonas palustris* in the Reaction with NADP⁺/NADPH,” *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1861**, 148140–148154 (2020). doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148140

B-3) 総説, 著書

村木則文, 「コリネバクテリアのヘム取り込みの仕組み」, *日本結晶学会誌* **62**, 78–79 (2020).

青野重利, 「生命金属が関与するガス分子センサータンパク質」, 「生命金属ダイナミクス——生体内における金属の挙動と制御」, 城宜嗣, 津本浩平, 監修, NTS, p.176–186 (2021).

B-4) 招待講演

青野重利, 「NiFe 型ヒドロゲナーゼの活性中心構築に必要な CO 生合成反応の分子機構」, 日本農芸化学会大会 2020, 九州大学(福岡市), 2020年3月. (オンラインでは開催されなかったが大会は成立扱い)

村木則文, 「水素代謝酵素の活性中心に必須な一酸化炭素を生合成する分子機構」, 日本農芸化学会中部支部第 188 回例会, オンライン開催, 2020年11月.

青野重利, 「Molecular mechanism of CO biosynthesis required to assemble the active site in NiFe-hydrogenase」, 日本農芸化学会大会 2021, オンライン開催, 2021年3月.

B-7) 学会および社会的活動

文部科学省, 学術振興会, 大学共同利用機関等の委員等

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員 (2019–2020).

学会誌編集委員

Chemistry Letters, Section Editor (2013–).

その他

総合研究大学院大学物理科学研究科副研究科長 (2020–).

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」(総括班), 「生命金属科学」分野の創成による生体金属動態の統合的研究」(代表: 津本浩平), 青野重利 (研究分担者) (2019年–2023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).

科研費基盤研究(C), 「NiFe型ヒドロゲナーゼの成熟化における一酸化炭素輸送機構の解明」, 村木則文 (2020年–2023年).

武田科学振興財団ライフサイエンス研究助成, 「一酸化炭素の生合成を鍵反応とする金属酵素ヒドロゲナーゼの活性中心構築反応」, 村木則文 (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、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。