

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03092

研究課題名(和文) 酵素超分子複合体形成による効率的な細胞内連続化学反応機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of effective consecutive chemical reaction in cell with formation of supramolecular enzyme complex

研究代表者

當舎 武彦 (Tosha, Takehiko)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・専任研究員

研究者番号：00548993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が行う嫌気呼吸の一種であり、硝酸から窒素分子への4段階の連続した化学反応からなる脱窒反応が、どのようにして効率よく行われているか、その仕組みの理解を目指して研究を行った。本課題では、脱窒の中間生成物である一酸化窒素(NO)が高い細胞毒性を示すことに着目し研究を進めた結果、NOを合成する亜硝酸還元酵素(NiR)とNOを分解するNO還元酵素(NOR)が複合体を形成することで、NOを細胞環境に拡散させずに速やかに分解していることを発見した。NORによるNO分解の反応機構に関する研究にも着手し、二分子のNOが段階的にNORに結合し、NOの還元反応が進行することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内は、生体分子で満たされたクラウドディングという状態にあり、生体内での反応は、多数の夾雑物が存在する条件下で行われる。脱窒のように連続した化学反応が分子夾雑下で効率よく行われるためには、それぞれの反応を触媒する酵素タンパク質が連携して強制的に機能する仕組みが必要となる。このような問いに対する一つの回答として、本研究から、脱窒に関わるタンパク質が相互作用することで、中間生成物を拡散させずに効率よく逐次反応を行っていることが示唆された。一連の生理反応に関わるタンパク質が相互作用して機能するという概念は、脱窒以外の反応系にも適用できる考え方であり、一般性のある現象であることが推察される。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism in bacterial denitrification, a kind of anaerobic respiration, consisting of four consecutive chemical reactions was investigated to elucidate how biological system effectively conducts sequential reaction in cells. We found that, to minimize the cytotoxicity of nitric oxide (NO) which is an intermediate product in denitrification, NO-producing enzyme, nitrite reductase (NiR) and NO-decomposing enzyme, NO reductase (NOR), forms a complex, and NOR can decompose NO immediately after its production from nitrite by NiR. In addition, the reaction mechanism of the rapid NO decomposition by NOR was examined. Time-resolved visible absorption spectroscopic analysis using photosensitive caged NO as a reaction trigger showed that two NO molecules bind to the active site of NOR with step-wise manner for NO decomposition.

研究分野：生物無機化学

キーワード：蛋白質複合体 一酸化窒素 脱窒 金属酵素 反応機構 時間分解計測

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内は、タンパク質をはじめとする生体分子で混み合った状態にあり、細胞内での化学反応は、夾雑物が多数存在する中で行われる。つまり、細胞内において代謝や生合成反応などの連続する化学反応が効率よく行われるためには、反応に関与する複数のタンパク質が協調的に機能する必要がある。特に、反応性の高い化合物や、容易に細胞内を拡散するガス状分子が中間生成物として産生される場合、何らかの巧妙な仕組みがなければ、中間生成物が細胞内を自由に拡散し、他の生体分子と反応するなど反応効率の低下をまねく。つまり、効率良く生命活動を行うために、生体内には、我々がまだ明らかにできていない何らかのシステムが存在するはずである。

細胞内での効率的な連続した化学反応の分子機構について知見を得るために、脱窒に着目する。脱窒とは、微生物が嫌気下で生命エネルギー-ATPを合成するために行う嫌気呼吸で、硝酸を窒素分子にまで還元するために4段階の連続した還元反応からなる(図1)。その中間生成物である亜硝酸  $\text{NO}_2^-$  や一酸化窒素  $\text{NO}$  は、生体分子との反応性が高く、細胞内に蓄積すれば細胞毒となるため、速やかに分解される必要がある。実際に、 $\text{NO}_2^-$  や  $\text{NO}$  が細胞環境に漏れ出し、細胞

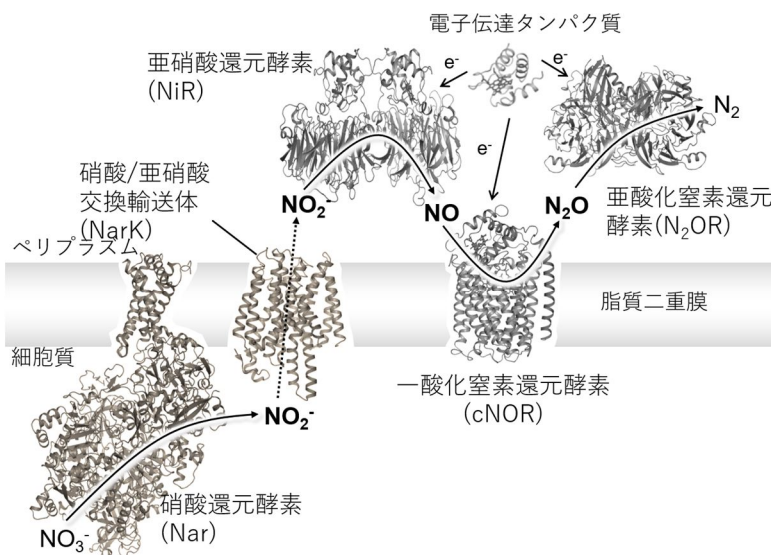


図1. 緑膿菌における脱窒反応と関与するタンパク質。

損傷を引き起こすことはない。例えば、 $\text{NO}$  を分解するシトクロム c 依存型  $\text{NO}$  還元酵素 (cNOR) が発見される以前では、脱窒反応中に  $\text{NO}$  がほとんど検出されないことから、脱窒は  $\text{NO}$  の生成を経由しないとまで考えられていたくらいである。このことは、脱窒における連続した化学反応には中間生成物を拡散させずに分解する巧妙なシステムが存在することを意味している。

上述した生体がもつ巧妙なシステムの理解を目指して、脱窒の中間生成物である  $\text{NO}$  が高い細胞毒性を示すことに着目した。予備的な結果として、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の脱窒において、 $\text{NO}$  を合成する亜硝酸還元酵素 (Nir) と  $\text{NO}$  を分解する cNOR が複合体を形成することを発見した(図2)。この結果から、脱窒において、関連するタンパク質群が相互作用して、協調的に機能することで、効率よく脱窒を行っているということと考えた。

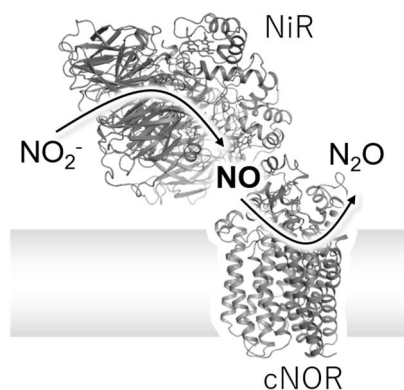


図2. Nir-cNOR 複合体の構造。

### 2. 研究の目的

細胞内で行われる代謝反応や生合成にみられる転属した化学反応のモデルとして微生物が行う脱窒反応を利用し、その効率的な反応に秘められた巧妙な仕組みを明らかにすることで、細胞内連続化学反応分子機構に関する理解を深める。

### 3. 研究の方法

#### (1) 緑膿菌を利用した脱窒酵素発現系を利用した酵素機能評価系の確立

緑膿菌の cNOR 欠損株に cNOR の変異体の発現ベクターを取り込ませたものを脱窒条件で培養し、その生育に及ぼす影響を検討した。緑膿菌を用いた発現系を利用し、cNOR 変異体を精製し、 $\text{NO}$  電極を用いることで、 $\text{NO}$  還元活性を評価した。cNOR の変異の菌の生育と  $\text{NO}$  還元に及ぼす影響の相関を調べることで、菌の生育を指標とした簡便な機能評価系の確立を試みた。

#### (2) Nir-cNOR 複合体の機能的意義の検討

既に X 線結晶構造解析が完了している緑膿菌由来 NiR-cNOR 複合体の構造を基盤に、その機能的役割の更なる検討を行った。緑膿菌の生育を指標とした機能評価系を利用することで、NiR-cNOR 複合体形成に重要なアミノ酸残基の変異体を利用し、NiR-cNOR 複合体形成の意義を調べた。また、詳細な分子動力学 (MD) 計算を行うことで、NiR-cNOR 複合体における NO の効率的な NO 分解機構に関する理解を深めることを目指した。

### (3) cNOR における迅速な NO 分解の分子機構の解明

cNOR における NO 還元反応機構を理解するために、光照射により NO を発生するケージド NO を利用した時間分解計測系を用い、NO 還元反応に伴う cNOR の可視吸収スペクトル変化を検討した。スペクトル変化の詳細な解析および変異体の解析から NO 結合過程やプロトン輸送過程を調べた。また、cNOR の NO 結合経路上に存在するアミノ酸残基の変異体を調製し、その構造・機能解析から NO 結合に関する理解を深めた。

### (4) 低温電子顕微鏡法による脱室タンパク質複合体の構造解析に向けて

脱室タンパク質の低温電子顕微鏡 (CryoEM) 法による構造解析に取り組んだ。本課題では、キノール依存型 NO 還元酵素 (qNOR) についての構造解析に取り組んだ (4. 研究成果参照)。

### (5) 脱室酵素超分子複合体捕捉の検討

脱室酵素超分子複合体を単離精製するために、緑膿菌の膜画分の可溶化方法の検討を行った。可溶化画分の評価については、ショ糖密度勾配遠心法を利用した。ショ糖密度勾配遠心法により得られた成分については、各種クロマトグラフィーによる精製を行い、酵素活性を調べることで、その構成成分の検討を行った。

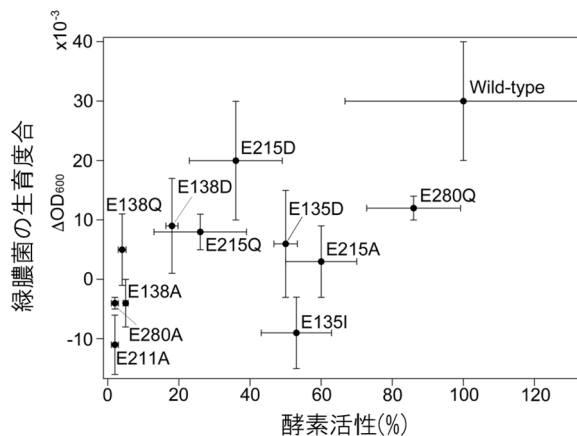


図 3. cNOR 変異体を有する菌の生育と cNOR 変異体の酵素活性の相関。

## 4. 研究成果

### (1) 緑膿菌を利用した脱室酵素発現系を利用した酵素機能評価系の確立

緑膿菌の cNOR 欠損株を脱室条件で培養すると NO が分解されずに蓄積するため、菌は生育できなくなるが、cNOR 欠損株に cNOR の発現ベクターを導入すると菌の生育が回復する。様々な cNOR の変異体の発現ベクターを準備し、これらを導入した緑膿菌 cNOR 欠損株の生育度合を検討したところ、cNOR の変異が菌体の生育に大きくえいきょうすることがわかった。次に、これらの cNOR 変異体を精製し、NO 消費活性を測定し、菌の生育度合との関係を調べたところ、これらはよく相関することがわかった (図 3)。この結果は、cNOR 変異体を発現させた緑膿菌の生育を調べること、cNOR タンパク質を精製することなく、変異の影響を調べられることを示している。そこで、この系を利用し、cNOR の NO 還元に必要なプロトン輸送経路について検討したところ、結晶構造から提案されていた 3 つのプロトン輸送経路のうちの 1 つがプロトン輸送経路として機能することを示すことができた (Yamagiwa *et al.* *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2018, **1859**, 333- )。

### (2) NiR-cNOR 複合体の機能的意義の検討

NiR-cNOR 複合体の X 線結晶構造を基に MD 計算を行ったところ、結晶構造でみられた相互作用に加えて、NiR-cNOR 間で過渡的に形成される水素結合がみられ cNOR の Lys100 が複合体形成において重要な役割をもつことが示唆された。また、MD 計算により NiR-cNOR 複体内での NO の伝達経路を調べたところ、cNOR の

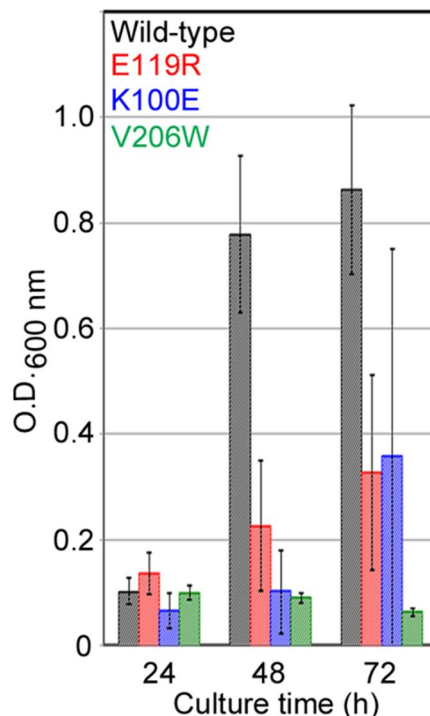


図 4. cNOR の変異が菌の生育に及ぼす影響。Glu119 および Lys100 は、NiR との相互作用部位に損及する。Val206 は、NO の結合経路に素に在する。

活性部位近傍に存在するアミノ酸残基 (Val206) が NO が cNOR の活性部位に結合する際に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、これらの cNOR のアミノ酸残基に変異を加え、緑膿菌の cNOR 欠損株に発現させ、菌の生育への影響を調べた。その結果、いずれの変異体を発現させた場合も、菌の生育が遅くなることがわかった (図 4)。これは、変異を加えたアミノ酸がいずれも NO の分解に重要であることを示している。特に、NiR と cNOR の相互作用に関わるアミノ酸残基の変異により菌の生育が低下したことは、変異により複合体形成が阻害され、その結果、NO が細胞内を拡散してしまうようになり、菌の生育が遅くなったことを意味している。つまり、NiR-cNOR 複合体の形成が効率的な NO 分解に大きく寄与していることが明らかとなった (Terasaka *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, **114**, 9888- )。

### (3) cNOR における迅速な NO 分解の分子機構の解明

緑膿菌における NO の分解が脱室において特に重要であると考え、当初は予定していなかったが、cNOR における NO 還元機構の詳細の解明にも取り組んだ。可溶性の NO 還元酵素の反応機構解析において、有効であった紫外光照射により NO を量論的に発生するケージド NO (Tosha *et al. Nat. Commun.* 2017, **18**:1585) を用いた時間分解可視吸収変化の測定を行った。嫌気グローブボックス内で調製した還元剤を完全に除去した還元型 cNOR とケージド NO を混合し、自作の時間分解可視吸収分光計測装置によって NO 還元反応を追跡した結果、cNOR による NO 還元反応は、二つの中間体を經由した 3 段階の反応からなることがわかった。また、ケージド NO の濃度を変えて実験を行った結果、反応の第一段階と第三段階が NO 濃度に依存することがわかり、これらの過程で NO 結合が起こることが示された。更には、本課題で明らかにしたプロトン輸送経路に注目し、プロトン輸送経路上のアミノ酸残基に変異を導入し、プロトン輸送が抑制された変異体においても時間分解計測を行った結果、野生型でみられた第三段階の反応が著しく遅くなっていることがわかり、第三段階にプロトン化が関わっていることが明らかとなった。これらの結果から、図 5 に示す反応機構を提案することができた (Takeda *et al. Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2020, **93**, 825-、Tosha *et al. Chem. Lett.* 2021, **50**, 280- )。

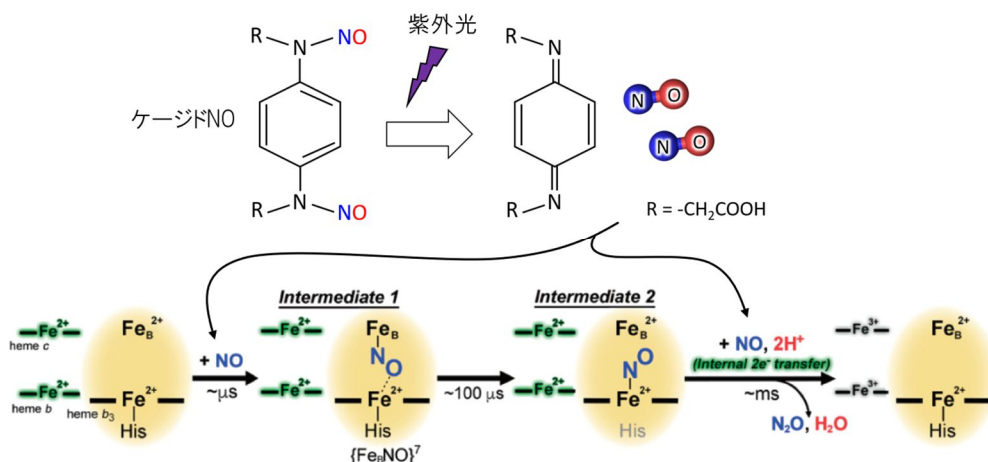


図 5. ケージド NO を利用した時間分解分光計測の結果から推定される cNOR の反応機構。

### (4) 低温電子顕微鏡法による脱室タンパク質複合体の構造解析に向けて

脱室タンパク質複合体の構造解析には、CryoEM が有効な手段となると考えた。モデル系として、NiR-cNOR 複合体の構造解析に着手したが、複合体の形成が溶液中で安定でなく、電顕像の取得が困難であった。そこで、他の脱室菌でも同様の複合体を形成しようと考え、*Achromobacter xylosoxidans* 由来の脱室酵素について検討を行った。この菌では、緑膿菌と異なり、銅型 NiR とキノール依存型 NO 還元酵素 (qNOR) が利用されている。これらの酵素を混合して電顕像の取得に取り組んだが、残念ながら複合体の像を得ることができなかった。しかし、この測定の過程で、qNOR の電顕像が明瞭に観測されることを発見し、qNOR の CryoEM による構造解析を行うこととした。これまでの X 線結晶構造化石から qNOR の構造は単量体として解析されてきたが、二量体として存在するこ

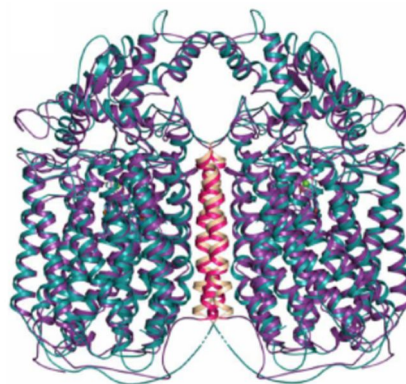


図 6. CryoEM で明らかとなった qNOR 二量体の構造。

とが明らかとなり、そのため見かけ上の分子量が大きくなり、CryoEM での構造解析が容易に行えた。構造解析の結果、qNOR の構造を 3.2 Å 分解能で決定することに成功した (Gopalasingam *et al. Sci. Adv.* 2019, 5:eaax1803)。この結果は、活性型の qNOR の構造を決定した初めての例である (図 6)。

#### (5) 脱窒酵素超分子複合体捕捉の検討

これまで緑膿菌由来の脱窒タンパク質をそれぞれ単離・精製し、それらを混合することで複合体の捕捉を試みてきたが、安定に複合体を捉えられなかったため、緑膿菌の膜画分を可溶化する際に、よりマイルドな条件にすることで、複合体をそのまま単離できないか検討した。緑膿菌の膜画分をいくつかの界面活性剤で可溶化し、それをショ糖密度勾配遠心法により分離した結果、それぞれで移動度が異なる成分、すなわち会合状態が異なる成分が得られることがわかった。特にジギトニンを用いた場合に、見かけ上より大きな分子量を示す成分が得られた。この成分をゲルろ過カラムで分析した結果、高分子量の超分子複合体が捕捉されている可能性が示唆された。電気泳動により、この超分子複合体には、cNOR が含まれていることがわかった。また、含まれる金属の分析を行った結果、硝酸還元酵素(Nar)に特有なモリブデンが含まれることがわかり、Nar が cNOR と相互作用していることが推察された。本課題では、この複合体の構造決定までは至らなかったが、今後研究を進めることで、脱窒における効率的な連続化学反応の仕組みを詳しく理解できることが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Shisaka Yuma, Iwai Yusuke, Yamada Shiho, Uehara Hiromu, Tosha Takehiko, Sugimoto Hiroshi, Shiro Yoshitsugu, Stanfield Joshua K., Ogawa Kazuya, Watanabe Yoshihito, Shoji Osami	4. 巻 14
2. 論文標題 Hijacking the Heme Acquisition System of Pseudomonas aeruginosa for the Delivery of Phthalocyanine as an Antimicrobial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1637 ~ 1642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.9b00373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gopalasingam Chai C., Johnson Rachel M., Chiduzza George N., Tosha Takehiko, Yamamoto Masaki, Shiro Yoshitsugu, Antonyuk Svetlana V., Muench Stephen P., Hasnain S. Samar	4. 巻 5
2. 論文標題 Dimeric structures of quinol-dependent nitric oxide reductases (qNORs) revealed by cryo-electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax1803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Suga Michihiro, Shimada Atsuhiko, Akita Fusamichi, Shen Jian-Ren, Tosha Takehiko, Sugimoto Hiroshi	4. 巻 1864
2. 論文標題 Time-resolved studies of metalloproteins using X-ray free electron laser radiation at SACLA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129466 ~ 129466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 TOSHA Takehiko, KUBO Minoru	4. 巻 59
2. 論文標題 Visualization of Enzymatic Reactions Using SACLA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 205 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ganasen Menega, Togashi Hiromi, Takeda Hanae, Asakura Honami, Tosha Takehiko, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Nariai Yuko, Urano Takeshi, Yuan Xiaojing, Hamza Iqbal, Mauk A. Grant, Shiro Yoshitsugu, Sugimoto Hiroshi, Sawai Hitomi	4. 巻 1
2. 論文標題 Structural basis for promotion of duodenal iron absorption by enteric ferric reductase with ascorbate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0121-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Furukawa Yoshiaki, Lim Carolyn, Tosha Takehiko, Yoshida Koki, Hagai Tomoaki, Akiyama Shuji, Watanabe Shoji, Nakagome Kenta, Shiro Yoshitsugu	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of a novel zinc-binding protein, C1orf123, as an interactor with a heavy metal-associated domain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kato Masaru, Nakagawa Shogo, Tosha Takehiko, Shiro Yoshitsugu, Masuda Yuya, Nakata Kou, Yagi Ichizo	4. 巻 9
2. 論文標題 Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Bacterial Nitric Oxide Reductase under Electrochemical Control Using a Vibrational Probe of Carbon Monoxide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5196 ~ 5200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.8b02581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamagiwa Raika, Kurahashi Takuya, Takeda Mariko, Adachi Mayuho, Nakamura Hiro, Arai Hiroyuki, Shiro Yoshitsugu, Sawai Hitomi, Tosha Takehiko	4. 巻 1859
2. 論文標題 Pseudomonas aeruginosa overexpression system of nitric oxide reductase for in vivo and in vitro mutational analyses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 333 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2018.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gonska Nathalie, Young David, Yuki Riki, Okamoto Takuya, Hisano Tamao, Antonyuk Svetlana, Hasnain S. Samar, Muramoto Kazumasa, Shiro Yoshitsugu, Tosha Takehiko, Adelroth Pia	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization of the quinol-dependent nitric oxide reductase from the pathogen <i>Neisseria meningitidis</i> , an electrogenic enzyme	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21804-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Halsted Thomas P., Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Ago Hideo, Ueno Go, Tosha Takehiko, Eady Robert R., Antonyuk Svetlana V., Yamamoto Masaki, Hasnain S. Samar	4. 巻 5
2. 論文標題 An unprecedented dioxygen species revealed by serial femtosecond rotation crystallography in copper nitrite reductase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 22 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252517016128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tosha Takehiko, Nomura Takashi, Nishida Takuma, 中略 (29名), Iwata So, Sugimoto Hiroshi, Shiro Yoshitsugu, Kubo Minoru	4. 巻 8
2. 論文標題 Capturing an initial intermediate during the P450 <sub>nor</sub> enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01702-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naoe Youichi, Nakamura Nozomi, Rahman Md. Mahfuzur, Tosha Takehiko, Nagatoishi Satoru, Tsumoto Kouhei, Shiro Yoshitsugu, Sugimoto Hiroshi	4. 巻 85
2. 論文標題 Structural basis for binding and transfer of heme in bacterial heme-acquisition systems	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 2217 ~ 2230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.25386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Terasaka Erina, Yamada Kenta, Wang Po-Hung, Hosokawa Kanta, Yamagiwa Raika, Matsumoto Kimi, Ishii Shoko, Mori Takaharu, Yagi Kiyoshi, Sawai Hitomi, Arai Hiroyuki, Sugimoto Hiroshi, Sugita Yuji, Shiro Yoshitsugu, Toshi Takehiko	4. 巻 114
2. 論文標題 Dynamics of nitric oxide controlled by protein complex in bacterial system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9888 ~ 9893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1621301114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Hanae, Kimura Tetsunari, Nomura Takashi, Horitani Masaki, Yokota Azusa, Matsubayashi Akiko, Ishii Shoko, Shiro Yoshitsugu, Kubo Minoru, Toshi Takehiko	4. 巻 93
2. 論文標題 Timing of NO Binding and Protonation in the Catalytic Reaction of Bacterial Nitric Oxide Reductase as Established by Time-Resolved Spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 825 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lucic Marina, Svistunenko Dimitri A., Wilson Michael T., Chaplin Amanda K., Davy Bradley, Ebrahim Ali, Axford Danny, Toshi Takehiko, Sugimoto Hiroshi, Owada Shigeki, Dworkowski Florian S. N., Tews Ivo, Owen Robin L., Hough Michael A., Worrall Jonathan A. R.	4. 巻 59
2. 論文標題 Serial Femtosecond Zero Dose Crystallography Captures a Water Free Distal Heme Site in a Dye Decolorising Peroxidase to Reveal a Catalytic Role for an Arginine in Fe IV =O Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 21656 ~ 21662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202008622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Rose Samuel L., Antonyuk Svetlana V., Sasaki Daisuke, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Ueno Go, Ago Hideo, Eady Robert R., Toshi Takehiko, Yamamoto Masaki, Hasnain S. Samar	4. 巻 7
2. 論文標題 An unprecedented insight into the catalytic mechanism of copper nitrite reductase from atomic-resolution and damage-free structures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd8523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato Masaru, Masuda Yuya, Yoshida Narumi, Tosha Takehiko, Shiro Yoshitsugu, Yagi Ichizo	4. 巻 373
2. 論文標題 Impact of membrane protein-lipid interactions on formation of bilayer lipid membranes on SAM-modified gold electrode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 137888 ~ 137888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.electacta.2021.137888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tosha Takehiko, Yamagiwa Raika, Sawai Hitomi, Shiro Yoshitsugu	4. 巻 50
2. 論文標題 NO Dynamics in Microbial Denitrification System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 280 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jamali M. Arif M., Gopalasingam Chai C., Johnson Rachel M., Tosha Takehiko, Muramoto Kazumasa, Muench Stephen P., Antonyuk Svetlana V., Shiro Yoshitsugu, Hasnain Samar S.	4. 巻 7
2. 論文標題 The active form of quinol-dependent nitric oxide reductase from Neisseria meningitidis is a dimer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 404 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252520003656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Takehiko Tosha
2. 発表標題 Elucidation of NO reduction mechanism in soluble NO reductase by time-resolved crystallography with photosensitive caged compound
3. 学会等名 32nd European Crystallographic Meeting (ECM32) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Tosha, T. Nomura, H. Takeda, T. Kimura, H. Sugimoto, M. Kubo and Y. Shiro
2. 発表標題 Mechanism of P450nor-Catalyzed NO Reduction Proved by Time-Resolved Spectroscopic and Crystallographic Analyses
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 當舎武彦、山際来佳、倉橋拓也、新井博之、杉本宏、城宜嗣
2. 発表標題 Functional roles of conserved residues near the active site of nitric oxide reductase based on the structural analysis
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田英恵、木村哲就、野村高志、當舎武彦、城宜嗣、久保稔
2. 発表標題 NO-binding and protonation process in the catalytic reaction of the bacterial Nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopy
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, T. Tosha, Y. Shiro, M. Kubo
2. 発表標題 NO-binding and Protonation Process in the Catalytic Reaction of Heme/non-heme Iron Nitric Oxide Reductase Proved by Time-Resolved Spectroscopic System
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry(ISABIC) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiko Tosha, Erina Terasaka, Kenta Yamada, Po-Hung Wang, Hiroyuki Arai, Hiroshi Sugimoto, Yuji Sugita, Yoshitugu Shiro
2. 発表標題 NITRIC OXIDE DYNAMICS CONTROLLED BY FORMATION OF PROTEIN COMPLEX IN DENITRIFICATION
3. 学会等名 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takehiko Tosha
2. 発表標題 Regulation of nitric oxide dynamics in microbial denitrification
3. 学会等名 The International Symposium on Bioinorganic Chemistry 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takehiko Tosha, Hanae Takeda, Takashi Nomura, Tetsunari Kimura, Minoru Kubo, Yoshitsugu Shiro
2. 発表標題 Elucidation of Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction
3. 学会等名 43rd International Conference on Coordination Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tosha Tosha, Tetsunari Kimura, Hanae Takeda, Shoko Ishii, Takashi Nomura, Minoru Kubo, Yoshitsugu Shiro
2. 発表標題 Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction Proved by Time-resolved Spectroscopic Analyses
3. 学会等名 International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 亜硝酸還元酵素と一酸化窒素還元酵素の複合体形成による迅速なNO分解機構
3. 学会等名 平成30年度 内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 脱窒にみられる金属タンパク質複合体による効率的な連続化学反応
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 Mechanism of Biological Nitric Oxide Reduction
3. 学会等名 平成30年度化学系学協会東北大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 光解離性基質を利用した時間分解X線結晶構造解析による酵素反応の追跡
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 Time-resolved XFEL crystallography and in crystallo spectroscopy for probing reaction dynamics of respiratory metalloenzymes
3. 学会等名 5th BioXFEL International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 X線自由電子レーザーを用いた時間分解結晶構造解析による酵素反応の追跡
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田想、城宜嗣、久保稔
2. 発表標題 酵素反応機構解明のためのX線自由電子レーザーを利用した時間分解X線結晶構造解析
3. 学会等名 第50回酸化反応討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 X線自由電子レーザーを用いた時間分解結晶構造解析：酵素反応への応用
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田想、城宜嗣、久保稔
2. 発表標題 Time-resolved X-ray crystallography at SACLA: Application to enzymatic reaction
3. 学会等名 錯体化学会第67回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 當舎武彦、西田拓真、野村高志、佐伯直哉、杉本宏、山下恵太郎、平田邦生、吾郷日出夫、山本雅貴、中根崇智、菅原道泰、南後恵理子、岩田想、城宜嗣、久保稔
2. 発表標題 X線自由電子レーザーを利用した時間分解X線結晶構造解析による酵素反応の観測
3. 学会等名 第44回生体分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 光解離性ケージド基質を利用した時間分解構造解析による酵素反応の可視化
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 マイクロ秒時間領域で形成される一酸化窒素還元酵素反応中間体の分光解析
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 構造生物学におけるXFELと放射光の相補的利用～金属酵素の反応機構解明を目指して～
3. 学会等名 放射光ユーザーのためのSACLAの利活用に関するワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 時間分解結晶構造解析および分光解析が明らかにする金属酵素による一酸化窒素分解機構
3. 学会等名 第2回量子線科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masao Ikeda-Saito, Emma Raven	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 376
3. 書名 Dioxygen-dependent heme enzymes	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>SACLAで酵素反応の可視化を実現  <a href="http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171117_2/">http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171117_2/</a>          合成酵素と分解酵素の協演  <a href="http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170829_1/">http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170829_1/</a>          病原菌における抗菌ガス分解酵素の新機能  <a href="http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180227_1/">http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180227_1/</a></p>
--



## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	新井 博之  (Arai Hiroyuki)  (70291052)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授    (12601)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Liverpool	University of Leeds	University of Essex	他1機関
スウェーデン	ストックホルム大学			