

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24506

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05761

研究課題名（和文）生命金属動態に関与するタンパク質分子の構造機能ダイナミクス研究

研究課題名（英文）Structural and Functional Dynamics on Proteins Related to Biometal Dynamics

研究代表者

城 宜嗣（SHIRO, Yoshitsugu）

兵庫県立大学・理学研究科・特任教授

研究者番号：70183051

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 61,700,000円

研究成果の概要（和文）：鉄は全て生物にとって生命維持に必須の微量金属元素である。鉄の細胞内での動態（吸収、感知、輸送、貯蔵、利用など）を分子のレベルで理解することを目的にした。ヒトでは食餌内の鉄は十二指腸上皮細胞で吸収されるが、その際に機能する鉄還元酵素（Dcytb）に関して、その分子構造機能と、Dcytbが還元した鉄を膜輸送するトランスポーター（DMT1）との細胞内での相互作用を明らかにした。病原菌の鉄動態で重要な働きをしているヘム取込ポンプ、ヘム濃度センサータンパク質、ヘム排出ポンプの細胞内機能を、それぞれの動的構造を基盤に理解した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の研究は、個別のタンパク質の静的な分子構造を基盤にしたものか、分子生物学あるいは細胞生物学を基盤にした細胞機能の記述が中心であったが、本研究の成功により「鉄の生体内動態に関する細胞機能を、関連するタンパク質群の分子構造・機能を基盤に記述する」ことが可能となった。これにより、鉄が関係する疾病、すなわち鉄の欠乏や過剰が引き起こす重篤な疾病の根本原因の究明や治療に関して、得られた研究成果が直接関与することを旨とした。さらに、この研究のために新しく開発した測定解析法は、他の研究分野にも広く応用可能である。

研究成果の概要（英文）：Iron is a bio-metal, which is essential in maintaining the lives of all living system. In this project, we have studied the dynamics of iron in cell (absorption, sensing, transport, storage, usage etc) on the basis of the dynamic structures and interaction of proteins related to the iron dynamics.

In human, the iron in diet is absorbed in duodenum, in which iron reductase (dcbtb) and iron transporter (DMT1) play crucial roles. We studied the interaction of Dcytb with the iron by native MASS technique, and with DMT1 in cell to transport the ferrous iron resulted by the reduction of ferric iron by Dcytb by PLA assay.

We also studied the molecular mechanisms of heme importer, heme sensor protein, and heme exporter in pathogenic bacteria, all of which play crucial roles in acquisition of iron. Especially, we focused on their dynamic structures in functionalization.

研究分野：構造生物化学

キーワード：生体鉄 鉄動態 トランスポーター 鉄還元酵素 鉄センサータンパク質 鉄含有タンパク質 フェリチン

1. 研究開始当初の背景

生命金属(生物の生命維持に必須の金属元素)の中でも、鉄 Fe は生体内存在量が最も多く、体重 60kg のヒト成人は 3~4g の鉄が生体内に存在している(生命鉄と定義)。鉄はほぼ全ての生物にとって生命活動に必須の微量元素であり、その化学的反応性である酸化還元と配位子結合を通して、生体内の物質・エネルギー・情報変換といった重要な生命現象に深く関与している。生命鉄と生命現象との関わりを明らかにする研究は、1. 鉄結合タンパク質・鉄結合酵素の機能を化学的な観点から、それらの構造を基盤に明らかにする研究と、2. 鉄の生体内での吸収・感知・輸送などの生体内動態とその制御を現象論的に理解する研究の 2 つの側面から進められてきた。一般的に、前者 1 の鉄結合タンパク質・鉄結合酵素の研究は、近年の構造生物学・分子分光学の発展により、分子・原子レベルの研究を中心にして成熟した分野となっている。また、後者 2 は、鉄に関わる生命現象に注目し、遺伝子ならびに細胞レベルでの研究を中心に進展してきた。鉄の生体内動態の破綻は重篤な疾病の原因となるために、医学との関連も深く、鉄バイオサイエンス学会といった医学系中心の学会も存在する。しかし、1、2 それぞれの分野の研究は独自に進展してきており、両分野間で連携した研究は近年増えてきてはいたものの、非常に少ないのが状況であった。

しかし、ヒトでは鉄の生体内動態の破綻が鉄の過剰や欠乏を引き起こし、重篤な疾病の原因になることや、ヒトの生命維持に脅威となる病原菌にとっても鉄の生体内動態の維持が必須であることなどを考えると、1 と 2 の分野を融合し生命鉄の関わる生命現象を微視的かつ巨視的な視点から広く理解し、分子レベルでの研究は細胞レベルへ、細胞レベルの研究は分子レベルへと研究を展開していかねばならなかった。

2. 研究の目的

本研究の大きな目的は、生命鉄動態関連のタンパク質・酵素を研究対象に、分子構造、特に動的な構造を基盤に、生命鉄が関連する細胞機能を議論し理解する事である。具体的には、ターゲットとなるタンパク質・酵素の静的な分子構造を得ることから開始して、さらに ①それが機能する時の構造変化(動的構造)、②酵素反応時に現れる短寿命反応中間体の電子状態と構造を理解することにより、その分子機能をより実態に近い状態で理解する。さらに、それらが細胞内という他の多くの生体物質が混み合った状態で他のタンパク質と関連しながら機能していることを考え、③2つ以上のタンパク質の複合体の構造情報を得ること、④実際の細胞内でのタンパク質間相互作用の情報を得ることにより細胞機能を分子レベルで理解することを目指した。以上の①~④を目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) ヒトでの鉄動態では、食餌中の鉄は十二指腸の腸管上皮細胞で吸収されるが、その際に鉄を三価(Fe^{3+})から二価(Fe^{2+})に還元する酵素(鉄還元酵素 *Dcytb*)、還元された鉄を細胞膜を通して細胞内に取り込むポンプタンパク質(DMT1: Divalent Metal Transporter)、取り込まれた鉄を輸送するタンパク質(PCBP)、運ばれてきた鉄を貯蔵するタンパク質(Ft: Ferritin)などが腸管細胞内での鉄の動態では連環して機能している。これらのタンパク質を研究対象とした。(2) 病原菌は感染増殖に必要な鉄を、宿主の赤血球ヘモグロビンのヘム(鉄ポルフィリン錯体)を奪取して得ている。その際に重要な働きをするのは、病原菌細胞内にヘムを取り込むポンプタンパク質(ヘムインポーター)、そのヘム濃度を感知するセンサータンパク質、細胞毒性が高い過剰ヘムを細胞外に排出するポンプタンパク質(ヘムエクスポーター)を研究対象とした。(3) 病原菌に感染された宿主細胞は、抗菌ガスである一酸化窒素(NO: Nitric Oxide)を産生し、殺菌する。一方、病原菌は鉄含有酵素である一酸化窒素還元酵素(NOR: Nitric Oxide Reductase)を用いてNOの無毒化を図る。病原菌NORと関連して脱窒カビNORを研究対象とした。(1)~(3)の研究対象の機能の破綻や機能制御は、ヒトの疾病の原因の理解と制御、病原菌の殺菌につながるものである。

4. 研究成果

(1) ヒト腸管細胞内の鉄動態

ヒトの十二指腸上皮細胞での鉄の動態を、関連するタンパク質の構造と共に模式的に示した(図1)。*Dcyb*の構造は、我々のグループが2018年に報告した¹。他のタンパク質(PCBP、Ft、フェロポーチン *Fpn* など)の構造は他のグループが既に報告している。本研究では; ①明石ら(横浜市大)との連携研究により、ネイティブ質量分析を用いて *Dcyb* と鉄(Fe^{3+} 、 Fe^{2+})とが直接相互作用をしている実験的な証拠を得た。また、ヒト腸管細胞のモデル細胞である *Caco-2* 細胞に *Dcytb* を強制発現させて、モデル細胞での鉄の取り込みを様々な条件で再現する系を構築した。その結果、リンゴ酸とフルクトースが腸管細胞での鉄取り込みを促進することを見出した。②ヒト腸管細胞での鉄動態で重要な役割を果たしている DMT1 の分子構造は得られていなかったため、CHO 細胞をホストとして用いて DMT1 を発現させる系の構築に成功した。高純度の試料を得ることに成功したが、低温電子顕微鏡を用いた構造解析に必要な試料量を得るために、細胞培養・単離・精製法を改良中である。③図1に示したタンパク質群は細胞内では決して

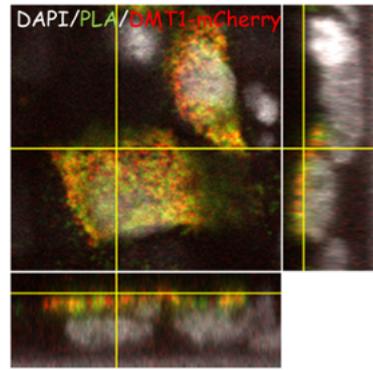
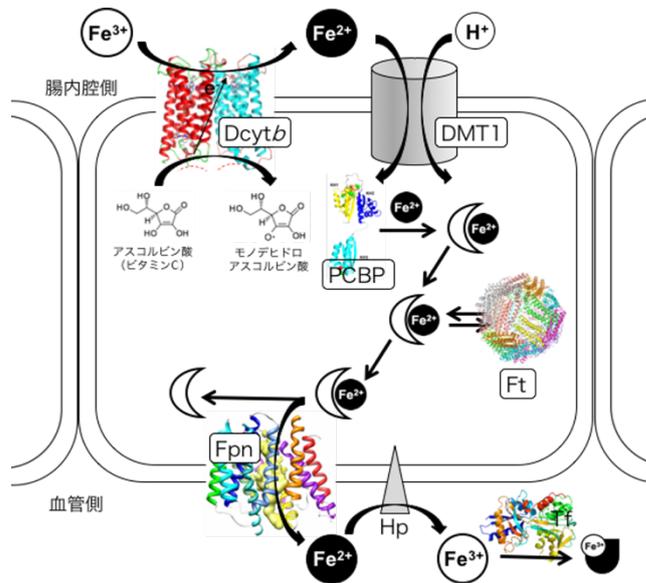


図1 (左) ヒト腸管細胞内での様々なタンパク質の関与する鉄動態を模式的に示した
 図2 (上) Caco-2 細胞内での DMT1 (赤) と Dcytb の PLA 分析。緑色の蛍光が観察されたことにより、DMT1 と Dcytb が近接して (40 Å 以内) 存在していることを示している

単独で独立して機能しているのではない。「細胞内という様々な生体物質が混み合った環境で、動的な相互作用、すなわち離合集散を繰り返しているはずである」という作業仮説を立てた。PLA (Proximity Ligation Assay) 法により、Caco-2 細胞や CHO 細胞内で Dcytb と DMT1 が近接して存在していることを世界で初めて見出した (図2)。この結果は、Dcytb が産生する細胞毒性の高い還元鉄 (Fe^{2+}) を生体中の拡散させることなく DMT1 が腸管細胞内に膜輸送できる機構が存在することを示している (図1)。この結果をさらに補強するために、免疫沈降、プルダウン分析、さらに DMT1/Dcytb 複合体の単離精製を試みており、将来的にはその構造解析にも挑戦する予定である。また、この作業仮説からは、DMT1 と PCBP、PCBP と Ft の相互作用も存在するはずであるので、それらも現在詳細を検討中である。

(2) 病原菌での鉄動態

図3に病原菌のヘム獲得系に関連するタンパク質の構造と共に、模式的に示した。①ヘムインポーターはヘモグロビン内のヘムを ATP のエネルギーを使って膜透過させて病原菌内に取り込む ABC トランスポーターである。我々はその構造を既に明らかにしている^{2,3}。ヘムインポーターは二量体で存在し、単量体同士の接触界面にヘムを透過させるチャンネルが存在している。そのチャンネルが細胞外に開いた構造 (outward 構造) と細胞内に開いた構造 (inward 構造) が存在し、ATP の加水分解エネルギーを用いて両構造を相互変換させること (動的構造) によりヘムを細胞内に取り込んでいる。本研究では、分子動力学シミュレーションによりこのヘムインポーターの動的構造を明らかにした⁴。②ヘム濃度センサータンパク質は、細胞内に取り込まれたヘム濃度を感知し、ヘムを分解して鉄を取り出す酵素群^{5,6}を発現している。本研究では、ヘム結合型 (DNA には結合できない) とヘム非結合型 (DNA に結合できる) のセンサーの構造を明らかにし、ヘム濃度感知してヘム分解酵素群を発現させる機構を議論した⁷。③過剰に取り込まれたヘムは活性酸素種の発生源となり細胞毒性が高く、病原菌を死滅させてしまう。そこで、ヘム濃度センサータンパク質は過剰なヘムを排出するヘムエクスポーターも発現させている。ヘムエクスポーターも ABC トランスポーターに属する。ヘム結合型、ATP 類縁体結合型、どちらも結合していないヘムエクスポーターの構造を明らかにし (図4)、ヘム

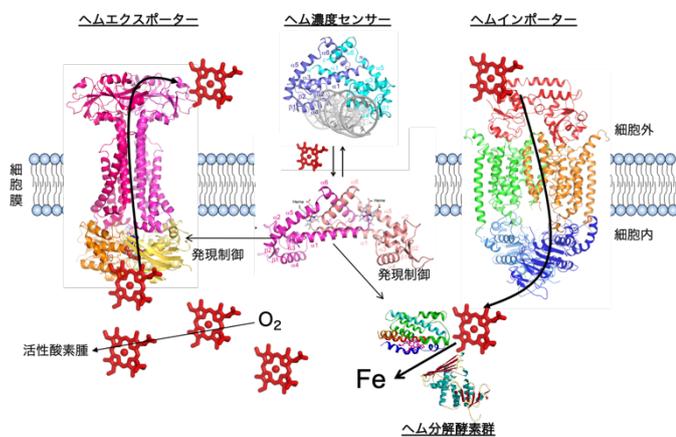


図3 病原菌のヘム動態に関連するタンパク質群の連関を、それらの分子構造を用いて示した

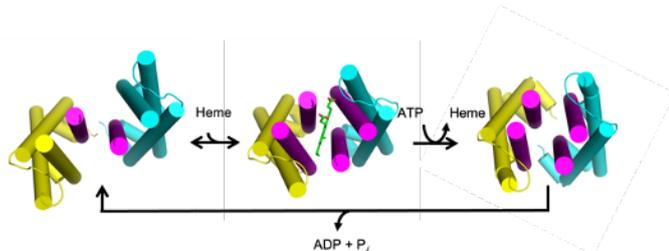


図4 ヘムエクスポーターの3種類の構造を、細胞外側から見た模式図で示した。これによりヘム排出の機構を提案した

類縁体結合型、どちらも結合していないヘムエクスポーターの構造を明らかにし (図4)、ヘム

排出の分子機構を提案した⁸。

(3) 一酸化窒素還元酵素の動的構造解析

上記の(1)(2)の研究からも、タンパク質の機能時の動き（動的構造）を実験的に直接観測することは、それらの分子機能を精緻に理解する上で非常に重要であり、その情報は新しいタイプの機能制御につながると理解できる。酵素機能時に現れる短寿命の反応中間体の構造と電子状態の解析手法は、タンパク質の動的構造解析と深く関連すると考え、鉄含有酵素である一酸化窒素還元酵素（NOR）を研究対象として手法開発を行なった。この手法開発の中で、反応を開始させる手法として caged NO を活用したことが一番重要な点である。Caged NO 自身は活性はないが、紫外線のパルス照射により数マイクロ秒の時間オーダーでほぼ定量的に NO を発生させることができた。これにより NO 還元反応を開始できて、それ以降の反応を紫外可視・赤外分光並びに X 線で追跡できた。

まず、水溶性で取り扱いの簡単な脱窒カビ NOR（1 分子のヘムを活性中心に含む）の短寿命反応中間体を対象とし、SPRING-8 及び SACLA を用いた時間分割結晶構造解析と時間分割赤外分光解析を行なった。その結果を図 5 に示した。時間分割結晶構造解析により Fe-N-O の配位構造、時間分割赤外分光解析により N-O 伸縮振動を明らかにした（図 5 左）。これらの情報を基に量子化学的手法により第二反応中間体の電子状態を理論的に明らかにし、NO 還元反応の機構を確定した（図 5 右）^{9,10}。

上記、脱窒カビ NOR で培った手法を、より難しい系である脱窒菌 NOR に適用した。難しさは、脱窒菌 NOR は膜タンパク質であるために精製試料が多く取れずかつ不安定であること、活性中心がヘムと非ヘム鉄よりなる複核中心であるために解析が複雑になることが挙げられた。それらの困難さを乗り越えて、図 6 に示した結果を得ることに成功した^{11,12}。本研究では、反応中間体、特に第一反応中間体（図 7）の構造解析のための新たな手法として、低温での caged NO の発生（Cryo-photolysis）とアニーリングの手法を組み合わせた EPR 測定法を開発した。本手法により得られた結果が、非ヘム鉄に一分子の NO は配位していることを示す決定的な証拠となった。また、この Cryo-photolysis/Annealing 手法は、他の cage 化合物にも適用できる手法であり、汎用性も高い。第二反応中間体に関しては、未だその配位構造・電子状態を示す決定的な証拠は得られていないが、一分子の NO がヘム鉄に配位していると推定している。時間分割結晶構造解析は現在進行中である。

以上の結果は総説として報告した¹³。

本研究により、生命鉄の関わる生命現象を、原子・分子のレベルから細胞のレベルまで、さらにマイクロ・ミリ秒の時間領域を含めて一貫して理解できるプラットフォームが構築できた。

<引用文献>

1. M. Ganasen, et al.: "Structural Basis for Promotion of Duodenal Iron Absorption by Enteric Ferric Reductase with Ascorbate" *Commun. Biol.* **1**: 120 (2018) DOI: 10.1038/s42003-018-0121-8
2. Y. Naoe, et al.: "Crystal Structure of Bacterial Heme Importer Complex in Inward-facing Conformation" *Nature Commun.* **7**, 13411 (2016) DOI: 10.1038/ncomms13411
3. Y. Naoe, et al.: "Structural Basis for the Capture and Transfer of Heme by Periplasmic Heme-Binding Proteins in a Bacterial Heme-Acquisition System" *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* **85**, 2217-2230 (2017) DOI: 10.1002/prot.25386
4. K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Sugita: "Chemomechanical Coupling in the Transport Cycle of a Type II ABC Transporter" *J. Phys. Chem. B* **123**, 7270-7281 (2019) DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b04356
5. A. Kikuchi, S.-Y. Park, H. Miyatake, D. Sun, M. Sato, T. Yoshida, Y. Shiro: "Crystal Structure of Rat Biliverdin Reductase" *Nature Strl. Biol.* **8**, 221-225 (2001)
6. S. Hirotsu, et al.: "The Crystal Structures of the Ferric and Ferrous Forms of the Heme Complex of Hmu O, a Heme Oxygenase of *Corynebacterium diphtheriae*" *J. Biol. Chem.* **279**, 11937-11947 (2004)

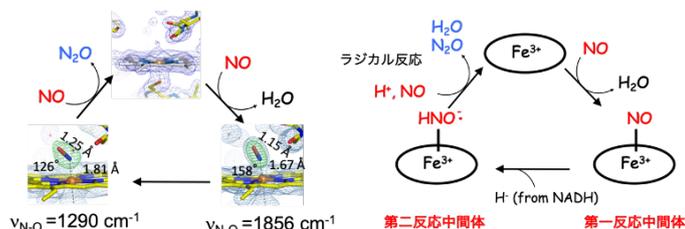


図 6 脱窒カビ NOR による NO 還元反応：(左) 時間分解の結晶構造解析と赤外分光解析により得られた Fe-N-O の配位構造と電子状態の情報、(右) それらの結果を基に確定した NO 還元反応の機構

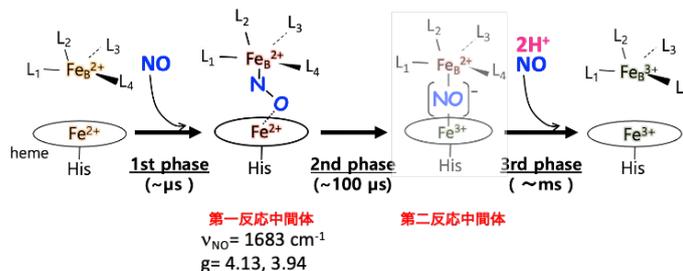


図 7 脱窒菌 NOR による NO 還元反応の機構

7. M. Nishinaga, et al.: "Heme Controls the Structural Rearrangement of Its Sensor Protein Mediating the Hemolytic Bacterial Survival" *Commun. Biol.*, 4, 467 (2021) DOI: 10.1038/s42003-021-01987-5
8. H. Nakamura, T. Hisano, M. Rahman, T. Tosha, M. Shirouzu, Y. Shiro: "Structural Insight into Heme Detoxification by an ABC-type Efflux Pump in Gram-positive Bacteria" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 119, e2123385119 (2022) DOI: 10.1073/pnas.2123385119.
9. T. Tosha, et al.: "Capturing an Initial Intermediate during Enzymatic Reaction of P450_{nor} using Time-Resolved XFEL Crystallography and Caged-Substrate" *Nat. Commun.* 8, 1585 (2017) DOI: 10.1038/s41467-017-01702-1
10. T. Nomura, et al.: "Short-lived Intermediate in N₂O Generation by P450 NO Reductase Captured by Time-resolved IR Spectroscopy and XFEL Crystallography" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2101481118, (2021) DOI: 10.1073/pnas.2101481118
11. H. Takeda, et al.: "Timing of NO binding and Protonation in Catalytic Reaction of Bacterial Nitric Oxide Reductase Proved by Time-Resolved Spectroscopic System" *Bull. Chem. Soc. Japan* 93, 825-833 (2020) DOI:10.1246/bcsj.20200038
12. H. Takeda, K. Shimba, M. Horitani, T. Kimura, T. Nomura, M. Kubo, Y. Shiro, T. Tosha: "Trapping of a Mononitrosyl Nonheme Intermediate of Nitric Oxide Reductase by Cryo-Photolysis of Caged Nitric Oxide" *J. Phys. Chem. B*, 127, 846–854 (2023) DOI: 10.1021/acs.jpcc.2c05852.
13. T. Tosha, R. Yamagiwa, H. Sawai, Y. Shiro: "NO Dynamics in Bacterial Denitrification System." *Chem. Letts*, 50, 280-288 (2021) DOI: 10.1246/cl.200629

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakamura Hiro, Hisano Tamao, Rahman Md. Mahfuzur, Tosha Takehiko, Shirouzu Mikako, Shiro Yoshitsugu	4. 巻 119
2. 論文標題 Structural basis for heme detoxification by an ATP-binding cassette?type efflux pump in gram-positive pathogenic bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2123385119	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 Nishida Yuya, et al. Shiro Yoshitsugu, Honma Teruki, Shigeta Yasuteru, Kubo Minoru, Takashima Seiji, Shintani Yasunori	4. 巻 13
2. 論文標題 Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases	5. 発行年 2022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/s41467-022-34771-y	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 Hieu Vu Ngoc, Thuy Le Thi Thanh, Hai Hoang, Dat Ninh Quoc, Hoang Dinh Viet, Hanh Ngo Vinh, Phuong Dong Minh, Hoang Truong Huu, Sawai Hitomi, Shiro Yoshitsugu, Sato-Matsubara Misako, Oikawa Daisuke, Tokunaga Fuminori, Yoshizato Katsutoshi, Kawada Norifumi	4. 巻 52
2. 論文標題 Capacity of extracellular globins to reduce liver fibrosis via scavenging reactive oxygen species and promoting MMP-1 secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 102286 ~ 102286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2022.102286	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 Takeda Hanae, Shimba Kanji, Horitani Masaki, Kimura Tetsunari, Nomura Takashi, Kubo Minoru, Shiro Yoshitsugu, Tosha Takehiko	4. 巻 127
2. 論文標題 Trapping of a Mononitrosyl Nonheme Intermediate of Nitric Oxide Reductase by Cryo-Photolysis of Caged Nitric Oxide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 846 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.2c05852	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 H. Kwon, J. Basran, C. Pathak, M. Hussain, S. L. Freeman, A. J. Fielding, A. J. Bailey, N. Stefanou, H. A. Sparkes, T. Tosha, K. Yamashita, K. Hirata, H. Murakami, G. Ueno, H. Ago, K. Tono, M. Yamamoto, H. Sawai, Y. Shiro, H. Sugimoto, E. L. Raven, and P. C. E. Moody	4. 巻 60
2. 論文標題 XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 14578 ~ 14585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202103010	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 T. Nomura, T. Kimura, Y. Kanematsu, D. Yamada, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, T. Hisano, R. Yamagiwa, H. Takeda, C. Gopalasingam, R. Kousaka, S. Yanagisawa, O. Shoji, T. Kumasaka, M. Yamamoto, Y. Takano, H. Sugimoto, T. Tosha, M. Kubo and Y. Shiro	4. 巻 118
2. 論文標題 Short-lived intermediate in N ₂ O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2101481118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2101481118	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 Mukai Kuniaki, Sugimoto Hiroshi, Kamiya Katsumasa, Suzuki Reiko, Matsuura Tomomi, Hishiki Takako, Shimada Hideo, Shiro Yoshitsugu, Suematsu Makoto, Kagawa Norio	4. 巻 3
2. 論文標題 Spatially restricted substrate-binding site of cortisol-synthesizing CYP11B1 limits multiple hydroxylations and hinders aldosterone synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Research in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 192 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crstbi.2021.08.001	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 Yamawaki Takeo, Mizuno Misao, Ishikawa Haruto, Takemura Kazuhiro, Kitao Akio, Shiro Yoshitsugu, Mizutani Yasuhisa	4. 巻 125
2. 論文標題 Regulatory Switching by Concerted Motions on the Microsecond Time Scale of the Oxygen Sensor Protein FixL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6847 ~ 6856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c01885	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 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, Tosha 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 城 宜嗣	4. 巻 75
2. 論文標題 分子構造を基盤にしたヘムタンパク質・ヘム酵素の機能解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BJSCC	6. 最初と最後の頁 51-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishinaga Megumi, Sugimoto Hiroshi, Nishitani Yudai, Nagai Seina, Nagatoishi Satoru, Muraki Norifumi, Tosha Takehiko, Tsumoto Kouhei, Aono Shigetoshi, Shiro Yoshitsugu, Sawai Hitomi	4. 巻 4
2. 論文標題 Heme controls the structural rearrangement of its sensor protein mediating the hemolytic bacterial survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01987-5	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 S. Yanagisawa, K. Kayama, M. Hara, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura	4. 巻 117
2. 論文標題 UV-Raman Characterization of a Substrate Tryptophan Bound to Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophys. J.	6. 最初と最後の頁 706-716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.07.017	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 C. Gopalasingam, G. Chiduzza, T. Tosha, M. Yamamoto, Y. Shiro, S. V. Antonyuk, S. Muench, S. S. Hasnain	4. 巻 5
2. 論文標題 Structure of Quinol-dependent Nitric Oxide Reductase from Alcaligenes xylosoxidans by Cryo-electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Adv.	6. 最初と最後の頁 eaax1803
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 K. Tamura, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Sugita	4. 巻 123
2. 論文標題 Chemomechanical Coupling in the Transport Cycle of a Type II ABC Transporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 7270-7281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b04356	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 H. Sawai, Y. Shiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Missing Piece of Two-Component Signal Transduction Systems Unveiled by SEC-SAXS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA Research Frontiers 2018	6. 最初と最後の頁 15-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 T. Tosha, M. Kubo	4. 巻 -
2. 論文標題 Observation of Enzymatic Reactions by Time-resolved X-ray Crystallography Using Photosensitive Caged Substrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA Research Frontiers 2018	6. 最初と最後の頁 28-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 15件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 T. Tosha, H. Takeda, Y. Shiro and M. Kubo
2. 発表標題 Elucidation of Mechanisms for Catalytic Reaction of Nitric Oxide Reductases by Time-resolved Techniques
3. 学会等名 International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-12) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Shiro
2. 発表標題 Molecular Mechanism of NO Reduction Catalyzed by Fe-containing Nitric Oxide Reductases
3. 学会等名 8th Asian Conference on Coordination Chemistry (ACCC8) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 H. Sawai
2. 発表標題 Heme Controls the Structural Rearrangement of Its Sensor Protein Mediating Survival of Pathogenic Bacteria
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC10) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 H. Sawai
2. 発表標題 Structural Basis for the Multifunctionality of the Heme-responsive Sensor Protein for Heme Detoxification in Hemolytic Bacteria
3. 学会等名 11th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-11) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Sawai
2. 発表標題 Structural Insights into the Multifunctionality of the Heme-responsive Sensor Protein for Detoxification in Hemolytic Bacteria
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城 宜嗣
2. 発表標題 分子構造を基盤にした鉄結合タンパク質の機能解明：生命金属科学への展開をめざして
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤井仁美
2. 発表標題 鉄イオンの吸収に関わる膜タンパク質の構造と腸管モデル細胞を用いた機能解析
3. 学会等名 第1回トランスポーター研究会関西支部会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城 宜嗣
2. 発表標題 鉄の生体内動態の分子科学
3. 学会等名 第2回レドックスR&D戦略委員会 春のシンポジウム 最先端技術が切り拓くレドックスバイオロジー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村哲就, 浅田拓也, 仲絢香, 林沙英, 城宜嗣, 杉本宏
2. 発表標題 ヘムABCトランスポーターの基質輸送機構に関する分光学的解析
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村哲就, 浅田拓也, 林沙英, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏
2. 発表標題 ナノディスク再構成型BhuUV-Tによる段階的な基質輸送の分光学的観察
3. 学会等名 第21回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲胸香, 小堀康博, 鏑木基成, 城宜嗣, 杉本宏, 木村哲就
2. 発表標題 Structural Analyses of ABC Transporters in Nucleotide Bound States Investigated by CW-ESR Spectroscopy
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榛葉幹治, 松浦滉明, 平田邦生, 山本雅貴, 城宜嗣, 當舎武彦
2. 発表標題 酸素バリア性フィルムを用いた嫌気条件下での一酸化窒素還元酵素反応中間体の構造解析への挑戦
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高原教代, 杉本宏, 神戸大朋, 城宜嗣, 澤井仁美
2. 発表標題 ヒト腸管細胞モデル系を用いた鉄イオンの吸収を向上させる食品成分の探索とそれらの成分が鉄輸送関連タンパク質に作用する分子機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城 宜嗣
2. 発表標題 『生命金属科学』のめざすところ
3. 学会等名 CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城 宜嗣
2. 発表標題 分子構造を基盤にした鉄結合タンパク質の機能解明 : Functional Studies of Iron-Related Proteins on Molecular Basis
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shiro, Y.
2. 発表標題 Dynamics of Nitric Oxide in Bacterial Cellular Systems: NO Generation and Decomposition
3. 学会等名 Japan-BIOCEV Symposium: Macromolecules; Structure, Function and Beyond (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiro Y.
2. 発表標題 Dynamics of Nitric Oxide in Cellular Systems: NO Generation and Decomposition
3. 学会等名 KTJ Bioinorganic Chemistry Symposium 2019 (KTJ-BICS 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城 宜嗣
2. 発表標題 分子構造を基盤にしたヘムタンパク質の機能解明～生命金属科学への展開をめざして～
3. 学会等名 錯体化学会第69回討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城 宜嗣
2. 発表標題 ヘム蛋白質の機能を司る構造・ダイナミクスとエネルギー流：実験と理論
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. 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)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤井仁美
2. 発表標題 原子から細胞レベルの研究による鉄イオンの吸収メカニズムの理解と有効な鉄栄養強化食品成分の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤井仁美
2. 発表標題 病原菌の鉄獲得システムで機能するヘムセンサー蛋白質の多機能性とその構造的機序
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 / 第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 472
3. 書名 ヘムタンパク質の科学	

1. 著者名 城 宜嗣・津本浩平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 511
3. 書名 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	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>兵庫県立大学大学院理学研究科細胞制御 講座 https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/regulation/index-j.html 兵庫県立大学大学院理学研究科細胞膜超分子複合体機能解析学講座 http://www2.riken.jp/biometal/index.htm 兵庫県立大学大学院理学研究科細胞制御 講座 https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/regulation/index-j.html 兵庫県立大学大学院理学研究科細胞膜超分子複合体機能解析学講座 http://www2.riken.jp/biometal/index.htm 兵庫県立大学大学院生命理学研究科細胞制御 講座 https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/regulation/index-j.html</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	澤井 仁美 (Hitomi Sawai) (50584851)	長崎大学・工学研究科・准教授 (17301)	

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