

令和元年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17862

研究課題名(和文)古くて新しいブルー銅タンパク質の構造生物無機化学

研究課題名(英文)Old and new structural inorganicbiochemistry on blue copper proteins

研究代表者

福田 庸太 (Fukuda, Yohta)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：20783179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ブルー銅タンパク質(BCP)について1) タンデム型BCP(Tan-BCP)の構造機能解析、2) 新奇なBCP(CinA)の構造機能解析、3) 人工BCP酵素の構築を目指した。1)については低純度かつ銅部位が再構築できず、結晶化を試みたが結晶は得られなかった。2)では様々なコンストラクトで結晶化をおこなったが、解析可能なサイズの結晶の取得には至らなかった。3)では人工酵素鋳型として銅含有亜硝酸還元酵素(NIR)のN末ドメインの精製には成功した。計画には無かったが、CPRバクテリア由来のCPR-NIRというBCPの精製と構造機能解析をおこない、既知のNIRと性質や構造が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

構造生物学の歴史において、BCPは比較的初期の頃から構造解析がおこなわれてきたタンパク質であり、基本的なことはもう調べつくされたかに思われている。そのためか、近年のゲノム解析で新しいBCPが見つかってきているにも関わらず、それらについての構造生物学的研究はほとんど進んでいないのが現状である。本研究では、当初の計画には無かったものの、ごく最近発見されたCPRバクテリア由来の新規なBCPのひとつについて構造機能解析をおこなうことができた。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this project about blue copper proteins (BCPs) are i) structural and functional analysis of a tandem-type BCP (Tan-BCP), 2) structural and functional analysis of a new BCP, CinA, and 3) construction of an artificial BCP enzyme. i) I could purify a Tan-BCP but could not crystallize because it showed low purity and did not include a Cu ion. ii) I made several constructs. None of them gave crystals large enough to investigate with X-ray crystallography. iii) I obtained N-terminal domain of copper nitrite reductases (NIRs) as an artificial enzyme. Though my original research proposal did not include a project about CPR-NIR that is from a CPR bacterium, I purified and analyzed it to reveal that CPR-NIR is different from known NIRs.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ブルー銅タンパク質 結晶構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブルー銅タンパク質(Blue Copper Protein: BCP) は、呼吸鎖や光合成における電子伝達になう重要なタンパク質で、長年にわたり生物化学的な研究対象とされてきた。本研究では、主として構造生物学的手法を用い、BCP の、これまで知られていなかった側面に光をあてることで、銅タンパク質にかんする知識の地平を新たに拓くことを目指した。具体的な目標は、以下のとおりであった。1) 銅含有タンパク質の分子進化をひもとく“タンデム型”BCP の構造機能解析 2) 電子伝達以外の機能をもつかもしれない新奇な BCP の構造機能解析 3) あたらしい人工 BCP 酵素の構築。

1) Marshall et al.(Nature, 2009) は、金属中心周りに変異を導入することで、幅広い酸化還元電位をもつ BCP を合理的に設計できることを示した。このことから、BCP の生体模倣電子デバイスへの応用が期待されているが、新奇な BCP が天然に存在するならば、その構造機能情報はこの分野のさらなる拡張に繋がろう。そのような考えのもと申請者は、古細菌の Nitrosopumilus 属に着目した。そのゲノムに、20 以上もの BCP の遺伝子がコードされているからである (Walker et al. PNAS, 2010)。予想通り、新奇な構造を持つらしい BCP が複数見つかった。例えば、BCP が 2 つ連続して並ぶ“タンデム型” BCP (Tan-BCP)である。これは、銅タンパク質の分子進化の観点からも、興味深い。報告者がこれまで研究をおこなってきた銅含有亜硝酸還元酵素 CuNIR を含む酵素ファミリーは、BCP ドメインが遺伝子重複したあと、いっぽうのドメインがブルー銅部位を失ったり別の銅結合サイトを獲得したりして酵素機能を発達させてきた (Nakamura and GO, Cell Mol Life Sci, 2005)。この進化過程では、2 つの BCP ドメインのみからなる Tan-BCP が存在せねばならないが、そのような存在は長い間知られていなかった。新たに見つかった「分子進化の過渡的状态を反映する Tan-BCP」の構造機能解析をおこなうことで、銅タンパク質の進化についての新たな知見も得られるだろう。

2) 緑膿菌の銅耐性獲得にかかわる遺伝子のオペロン内に BCP 遺伝子が存在する。これは BCP ドメインの上流に、還元型銅イオンを運搬するタンパク質と似た、メチオニンリッチな配列を持つ BCP (CinA と呼ばれている)であった。報告者はこの CinA が銅センサーへの銅の供与にもかかわっているのではないかと推測し、この仮説を検証することで、電子移動以外の、BCP の新たな機能に関する知見を得たいと考えた。

3) 天然に見つかる BCP 以外に、あらたな構造や機能を持った BCP を作りだすことは可能だろうか。上述の CuNIR は BCP ドメインを 2 つ有するが、ブルー銅部位のある N 末ドメインのみ (Short NIR: sNIR)を組み換えタンパク質として大腸菌内で発現させると、3 量体構造をとる。この sNIR3 量体の分子界面に変異を加え、亜硝酸還元反応以外を触媒できる人工 BCP 酵素を構築しようと試みた。たとえば、銅中心により活性化された酸素を用いて C-H 結合の開裂をおこなうペプチジルグリシン -ヒドロキシル化モノオキシゲナーゼ(PHM) は、大腸菌を用いた大量発現が困難であり、反応機構が完全には解明されていない。sNIR のような取り扱いが極めて容易な「鋳型」を用いてモデル酵素を作りだせば、反応機構の解明だけでなく、応用化にもつながるかもしれない。

2. 研究の目的

1) Tan-BCP

本研究での第一目標は、2つのBCPドメインの構造解析および、各銅中心のキャラクタリゼーションを通じて、2つの銅中心がどのような機能を分担しているのか、他のBCPやブルー銅含有酵素との相違点はなにかを明らかにすることである。しかし、Tan-BCPには別の興味深い特徴もある。BCPドメインが受け取った2つ以上の電子を使い、膜貫通部位でキノンの還元($Q \rightarrow QH_2$)をおこなっていると予想されているのだ(Walker et al. PNAS, 2010, 図1)。そこで、Tan-BCPの機能を深く理解するためのもうひとつの目標として、全長構造を明らかにし、分子内電子移動についての知見も得たいと考えた。

2) CinA

X線結晶構造解析により、ブルー銅サイトおよび還元型銅運搬タンパク質様メチオニンリッチサイトの構造、両者の位置関係を高分解能で明らかにしようと試みた。

3) sNIR

sNIR中の、98番目のアスパラギン酸をメチオニンに置換する(D98M sNIR)とペプチジルグリシン-ヒドロキシル化モノオキシゲナーゼ(PHM)の活性中心と似た銅サイト(CuM)を構築できると予想される。本研究ではD98M sNIRを用い、炭素からの水素の引き抜きを触媒する安定性の高い人工酵素を構築しようと試みた。

3. 研究の方法

1) Tan-BCPは膜貫通ヘリックスを有するが、本研究はBCPドメインに着目するため、可溶性のタンデムBCPドメインのみの発現・精製を試みた。可溶化率を上げる目的でSUMOタグとタグ切断用のTEVプロテアーゼ認識サイトを付加したコンストラクトを構築し、可溶性タンパク質として発現させた。

2) 様々なコンストラクト、たとえばマルトース結合タンパク質(MBP)タグをN末端またはC末端に付加したコンストラクトなどを発現・精製し、結晶化をおこなった。

3) 人工BCP酵素の鋳型として数種類の銅含有亜硝酸還元酵素(NIR)のN末ドメイン(sNIR)を組換タンパク質として大腸菌内で発現させた。

4. 研究成果

1) Tan-BCPのタンデムBCPドメインは可溶性タンパク質として発現するものの、クロマトグラフィーによる精製を経ても純度が向上せず、また、銅部位に銅が取りこまれにくいことが明らかとなった。このことが均質なサンプルの取得を妨げている可能性が考えられた。

2) CinAではMBPタグ無しのコンストラクトは可溶性が異常に高く、結晶化に不向きであった。MBPタグ有りのコンストラクトでは、MBPタグ無しのコンストラクトと比べ、結晶核の発生率が有意に高まったが、構造解析可能なサイズの結晶の取得には至らなかった。また、MBPタグを付けたコンストラクトでは、Tan-BCP同様、銅部位に銅イオンが取りこまれにくかった。

3) さまざまなNIRのN末ドメインの発現精製を試みた結果、AxNIRのN末ドメインが可溶性タンパク質として良好に発現・精製できることが明らかになったが、結晶化条件の最適化には至らなかった。おそらく柔軟性の高いN末端部位が結晶化を妨げていると考えられるが、N末部位を削除したコンストラクトは不溶性であった。

以上、当初の計画で扱う予定だったタンパク質群の素性が芳しくなかったため、計画には

無かったが、CPR バクテリアという特殊なバクテリアを持つ BCP の発現と精製もおこなった。その結果、CPR-BCP と CPR-NIR というタンパク質の精製に成功し、CPR-NIR についてはキャラクタリゼーションと結晶構造解析もおこない、既知の NIR と性質も構造も異なる新奇なタンパク質であることを明らかにした。

また、既知の BCP ではあるが、NIR の中性子線結晶構造解析をおこない、ブルー銅周囲の精密な水素結合ネットワークを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

査読有 New molecular packing in a crystal of pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis*: a double-helical arrangement of blue copper.

Yohta Fukuda, Eiichi Mizohata and Tsuyoshi Inoue
Acta Cryst., F73 159-166 (2017)

査読有 Structural insights into a secretory abundant heat soluble protein from an anhydrobiotic tardigrade *Ramazzottius varieornatus*.

Yohta Fukuda, Yoshimasa Miura, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue.
FEBS Letters., 591(16), 2458–2469 (2017)

査読有 Crystal structure of secretory abundant heat soluble protein 4 from one of the toughest “water bears” micro-animals *Ramazzottius varieornatus*.

Yohta Fukuda, Tsuyoshi Inoue.
Protein Science. 27(5):993-999 (2018)

査読有 Crystallographic study on dioxygen chemistry in a copper-containing nitrite reductase from *Geobacillus thermodenitrificans*.

Yohta Fukuda, Takuro Matsusaki, Ka Man Tse, Eiichi Mizohata, Michael E. P. Murphy and Tsuyoshi Inoue.
Acta Crystallographica Section D. 74(8): 769-777 (2018)

査読有 Crystal structure of Kumaglobin: a hexacoordinated heme protein from an anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*.

JeeEun Kim, Yohta Fukuda, Tsuyoshi Inoue.
The FEBS Journal. 286(7): 1287-1304 (2018)

〔学会発表〕(計 1 件)

査読無 Y. Fukuda, Y. Miura, J-E. Kim, T. Matsusaki, S. K. Shin, L. Yang, T. Inoue. "Launching out into structural genomics on anhydrobiotic tardigrades" 14th International Symposium on Tardigrada. Copenhagen, Denmark, 30 July - 03 August, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。