

機関番号： 1 4 4 0 1

研究種目： 基盤研究 (B)

研究期間： 2008 ~ 2010

課題番号： 20350078

研究課題名 (和文) マルチ銅還元酵素の研究の新展開

研究課題名 (英文) Advances in Studies on Multicopper Reductases

研究代表者 鈴木 晋一郎 (SUZUKI SHINNICHIRO)

大阪大学・名誉教授

研究者番号： 70116052

研究成果の概要 (和文)：銅型亜硝酸還元酵素(NIR)は、2つの銅を含んだ単量体が3つ集まって三角形の三量体構造を形成していることが知られており、生体系や地球環境における重要性から国内外で多くの研究が行われている。最近、我々はこの NIR の N 末端あるいは C 末端に新たなドメインを結合した新しいタイプの六量体と三量体の NIR を発見した。本研究では、ニキビ菌と海洋性好冷菌由来のこの新しい NIR の構造・機能相関研究を行った。

研究成果の概要 (英文)：For the biological and environmental importance, there have been many reports on Cu-containing nitrite reductases (NIRs), which are trimers containing two copper ions in each monomer. We have recently found new hexameric and trimeric NIRs having an extra domain at the N- and C-terminus, respectively. In this project, the structure-function relationships of the new NIRs from a propionibacterium and a marine psychrophilic bacterium have been studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：亜硝酸還元酵素、銅タンパク質、脱窒菌、ニキビ菌、海洋性好冷菌、X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、地球上の窒素循環に重要な役割を演じている脱窒菌由来の金属タンパク質の研究を、嫌気呼吸(硝酸呼吸)の解明と嫌気呼吸により放出される窒素化合物(N_2O)による地球環境汚染の観点から行って来た。自然界において脱窒菌は、脱窒(NO_3^- を $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ のように N_2 まで還元)を行うことにより ATP を獲得している。この脱窒

過程のうち、亜硝酸還元酵素(NIR; ヘム鉄型と銅型があり、 NO_2^- を NO に1電子還元)は key enzyme である。これまでの銅型 NIR の研究については、国内では我々のグループ、国外ではイギリス、カナダ、スウェーデンのグループの研究があり、組換え体や変異体の機能・構造の研究で激しく競合していた。これまでの研究で用いられていた NIR は、全て図1に示したような三量体構造の酵素であった。

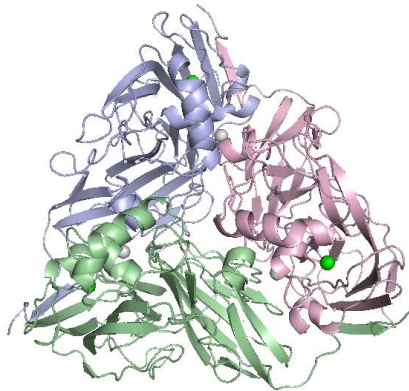


図1 従来から知られている脱窒菌由来の三量体 NIR の結晶構造 (三量体を赤、緑、青の3色で区別している)

これに対して、我々は C1 資化性脱窒菌(メタノールなどの C 原子を 1 個含む化合物を炭素源および電子供与体とし、硝酸イオンを用いて嫌気呼吸(脱窒)を行う)、*Hyphomicrobium denitrificans* A3151 から単離される NIR (HdNIR) を調べたところ、従来から報告されているものと異なった性質を示しており、2007 年に報告した結晶構造(図 2)は、新奇なものであった。この HdNIR の一次構造(図 3 b)を従来の三量体 NIR のもの(図 3 a)と比較すると、HdNIR では N 末端側にブルー銅ドメインが結合している(ドメイン融合型 NIR)。

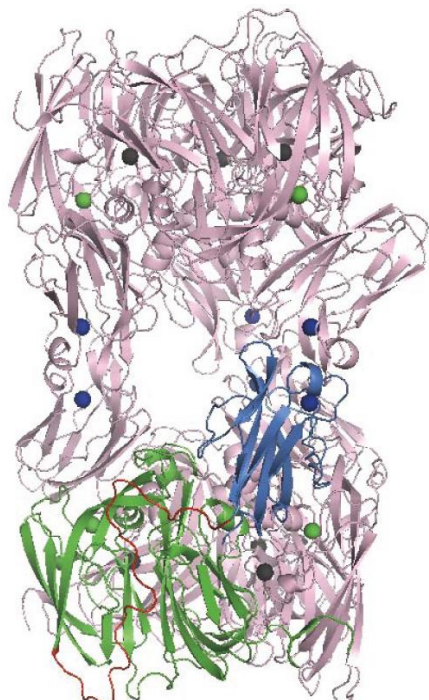


図2 六量体 HdNIR の結晶構造 (1 つのサブユニットは、緑の NIR ドメイン、赤のフレキシブルループ、青のブルー銅ドメインからなり、上下部分が三量体を形成)

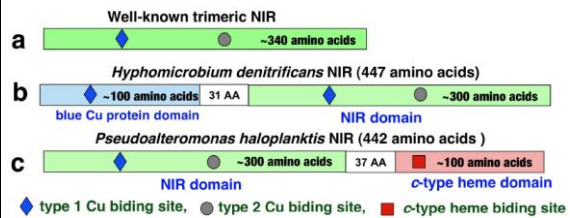


図3 3種類 の NIR 単量体の一次構造

(a, これまで知られている NIR; b, N-末端にブルー銅ドメインを融合した NIR; c, C-末端にシトクロム c ドメインを融合した NIR)

一方、最近のゲノム解析結果は、ニキビ菌の NIR も膜結合ドメインを有するものの NIR ドメインの一次構造は図 3 b のパターンをとり、基本的に図 2 のようなブルー銅ドメイン融合型の NIR 構造であることを示唆していた。さらに、海洋性好冷菌由来の NIR のゲノム解析も、C 末端側にシトクロム c ドメインを結合したドメイン融合型 NIR であることを示していた(図 3 c)。

2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では、次の(1)~(3)の項目について研究を行うことを目的とした。

(1) 脱窒菌 *Achromobacter xylosoxidans* NIR (AxNIR) とその電子供与体との複合体結晶構造解析とタンパク質間電子移動機構の研究

本研究主題の(2)と(3)のドメイン融合型 NIR の研究の前に、まず、図 1 に構造を示した通常の脱窒菌由来の AxNIR とその電子供与体、シトクロム c_{551} (Cyt c_{551}) との複合体を作製して、X 線結晶構造解析を行い、過渡的タンパク質間電子移動中間体の性質を明らかにすることを目的とした。また、同時に、これらのタンパク質間の電子移動反応の解明も行うこととした。この研究は、(2)と(3)の研究におけるドメイン間の電子移動の解明に手がかりを与える可能性を含んでいる。

(2) ニキビ菌 *Propionibacterium acnes* 由来亜硝酸還元酵素 (PaNIR) の構造・機能の研究

PaNIR は、我々がこれまでに発見した新しいタイプのドメイン融合型 NIR (HdHIR) と同様に、N-末端にブルー銅タンパク質ドメインを有しているが、さらにブルー銅ドメインの N-末端側に 10 本の α -ヘリックスからなる膜貫通ドメインが結合している。そこで、PaNIR の研究では、native 酵素の単離とその組換え体、膜貫通部分を除去した変異体を作製し、それらの構造・機能相関を研究することを目的とした。この研究は、ニキビ菌に対する薬剤のデザインに繋がるものである。

(3) 海洋性好冷菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* 由来亜硝酸還元酵素 (PhNIR) の構造・機能の研究

PhNIR は、これまでに述べた HdNIR や PaNIR と同様にドメイン融合型 NIR であるが、余分のドメインは NIR の C-末端側にシトクロム *c* (Cyt *c*) が融合している酵素である。そこで、HdNIR や PaNIR との比較として、この新奇的な PhNIR の構造・機能相関を研究することを目的とした。

3. 研究の方法

脱窒菌、ニキビ菌、および海洋性好冷菌に関しては、通常の方法で培養した。それらの菌体から文献の方法に従って、それぞれの NIR の単離・精製を行ったが、ニキビ菌の NIR (PaNIR) は得られなかった。そこで、PaNIR については、組換え体を作製して実験を行った。一方、海洋性好冷菌の PhNIR の実験では、組換え体や変異体の作製ができなかったため、菌体から直接単離した酵素や電子伝達タンパク質を用いた。

タンパク質間の電子移動反応は、当研究室設置のストップフロー分光装置を用いてデータを得た。また、タンパク質の X 線結晶構造解析については、姫路の SPring 8 において回折データを収集した。

4. 研究成果

(1) 脱窒菌 *Achromobacter xylosoxidans* NIR (AxNIR) とその電子供与体との複合体結晶構造解析とタンパク質間電子移動機構の研究

脱窒菌 *Achromobacter xylosoxidans* からの AxNIR の電子供与タンパク質として、以前からイギリスのグループがブルー銅タンパク質であるアズリン (Az) と報告していたのに対して、我々のグループはシトクロム *c*₅₅₁ (Cyt *c*₅₅₁) であるとしていた。この問題に決着をつけるべく速度論的研究と電子供与体-AxNIR 複合体の結晶構造の研究を行い、我々の主張が正しいことを証明できた。すなわち、脱窒菌中では、AxNIR への電子の流れが Az → Cyt *c*₅₅₁ → AxNIR と起こり、AxNIR が基質である NO₂⁻ を NO に 1 電子還元する。この時の Cyt *c*₅₅₁ と AxNIR の過渡的な電子移動中間体と考えられる複合体の構造を図 4 に示した。この結晶構造の分解能は 1.7 Å で、非常に高分解能であるため、両タンパク質の接触面 (接触面の中央を電子が Cyt *c*₅₅₁ から AxNIR のタイプ 1 銅へと移動する) のアミノ酸残基や水分子の詳細な性質や挙動が明らかとなった。この成果は、イギリスの雑誌 *Nature* に報告されている。

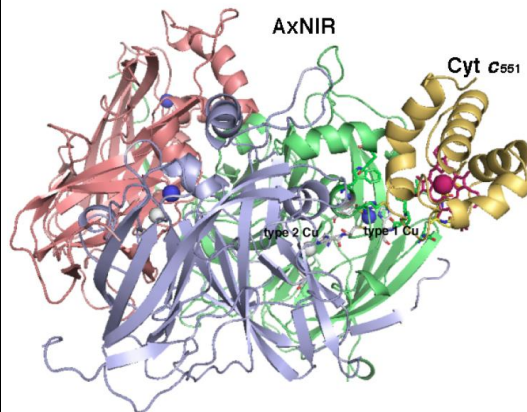


図 4 Cyt *c*₅₅₁ と AxNIR の過渡的電子移動複合体の構造

(3つの NIR サブユニットのうち、緑色のサブユニットに黄色の Cyt *c*₅₅₁ が結合している。この後に、3つのサブユニットの全てに Cyt *c*₅₅₁ が結合した複合体構造も解析された。)

(2) ニキビ菌 *Propionibacterium acnes* 由来亜硝酸還元酵素 (PaNIR) の構造・機能の研究

まず PaNIR の単離・精製のために、ニキビ菌の大量培養を行ったが、膜画分、可溶性画分のいずれから PaNIR は得られなかった。そこで、PaNIR が持つ膜貫通ヘリックス部分を除いた PaNIR 可溶性組換え体 (Δ PaNIR: 単量体の NIR ドメインの N 末端側にブルー銅ドメインを結合したもの) を、大腸菌を用いて発現させた。この実験により、多量の青緑色 Δ PaNIR を単離し、また、その単結晶を得ることに成功した。EPR 測定からは、単量体あたりに含まれる 3 個の Cu のうち、2 個は Cu(II)、1 個は Cu(I) であることが明らかになった。また、この組換え体の酵素活性は低かった。 Δ PaNIR 組換え体の構造に関しては、2.4 Å 分解能の X 線結晶構造解析に成功している (図 5)。しかし、この結晶では三量体の NIR ドメインの構造を解くことができたが、ブルー銅ドメインの構造は、結晶中でその部分が種々のコンホメーションをとっているために明らかにすることができなかった。また、3 個の Cu 部位構造を見ると、1 個のタイプ 1 銅が Cu(I) であることは明らかであった。 Δ PaNIR の低酵素活性は、この Cu(I) が安定で、酸化されないためと考えられる。これらの事実は、天然型 PaNIR と Δ PaNIR の間には膜貫通部分の有無の違いがあることを考慮しなければならないという問題を提起しており、意義深いものである。最後に、その PaNIR の膜貫通部分の効果を調べるために、N 末に膜貫通ドメインを含む本来の PaNIR 遺伝子を用いた場合と、さらに、膜貫通ドメインを *Bacillus* 由来の *Mistic* と呼ばれる膜タンパク質でドメイン置換した場合 (*Mistic*-

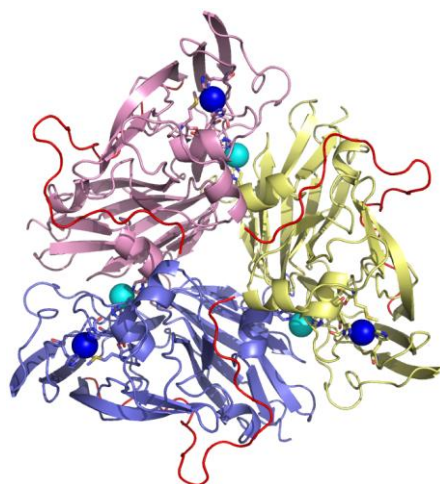


図5 ΔPaNIRの結晶構造

(三量体NIR部分の構造は明らかになったが、赤色で示した3本の長いフレキシブルループの先(三角形の中心部分)に結合しているブルー銅ドメイン構造は不明であるので示していない。)

PaNIR)の両方で、大腸菌での発現実験を行った。Misticとは、*Bacillus*種から単離・同定された膜タンパク質で、他の膜タンパク質と遺伝子工学的に融合させることで高効率に組換え膜タンパク質として発現させる際に用いられるタンパク質である。その結果として、本来のPaNIRを用いたケースは発現に成功しなかったが、Misticと融合したMistic-PaNIRにおいて高い収量で発現させる事に成功した。続いて、各種クロマトグラフィーにより膜タンパク質として、Mistic融合PaNIRの部分精製を行った。その紫外・可視吸収スペクトルでは、一昨年度に作成した膜貫通ドメインを含まないΔPaNIRと比べ、吸光係数ならびに吸収バンドピーク強度比が大きく異なる結果となった。これは、天然型PaNIRとΔPaNIRで、タイプ1銅の配位環境が異なる可能性を示唆している。

(3) 海洋性好冷菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* 由来亜硝酸還元酵素(PhNIR)の構造・機能の研究

まず始めに、PhNIRのX線結晶構造解析を1.95 Å分解能で行うことに成功した。その分子構造を図6に示す。PhNIRでは、3つのNIRドメインに、図4の場合には一カ所のみであるが、3つのシトクロムcドメインが接触している。また、これら2種類のドメインは、長いループで結ばれているというユニークな構造が見られた。PhNIRの各ドメインの詳細な構造、ドメイン間の水分子の挙動、タンパク質内電子移動経路の水分子の役割などを詳細に議論することができた。次に、PhNIRのタンパク質内電子移動反応を、パル



図6 PhNIRの結晶構造

(1つのサブユニットは、緑色のNIRドメイン、赤色のフレキシブルループ部分、茶色のシトクロムcドメインからなる)

スラジオリシスにより測定した。それによると、シトクロムドメインのヘムからタイプ1銅への電子移動反応速度は $1.0 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (pH 6.0)、次いでタイプ1銅からタイプ2銅への反応速度は基質存在下で、 $1.0 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0)であった。また、PhNIRへの電子供与タンパク質の一つは、アミノ酸90残基あたりc型ヘムを1つ含むヘムタンパク質であった。この菌株は既にゲノム解析が行われているので、そのアミノ酸配列の相同性検索から *Pseudomonas stutzeri* 由来のシトクロム c_4 の一部に29%の相同性があることが分かった。すなわち、シトクロム c_4 は190残基のアミノ酸からなり、2つのヘムを有している。190からなるアミノ酸残基配列で100番以降の90残基が、この好冷菌からのシトクロムcと相同性を持つので、我々はこのシトクロムcをシトクロム c_{4A} (Cyt c_{4A})と名付けることとした。新しいタイプのシトクロムcの発見である。このCyt c_{4A} の還元型スペクトルのピークは、414.5(Soret帯)、520.5(β帯)、549nm(α帯)であり、酸化型は407.5nm(Soret帯)であり、 $E_{1/2}$ は+230mV(vs NHE, pH 6.5)であった。また、PhNIRへの電子供与活性は、pH 6.5において *Achromobacter xylosoxidans* 由来のシトクロム c_{551} とNIRの活性と比べて、ほぼ半分であった。この結果は、電子伝達の効率としてはそれほど不適切な値ではないと考えられた。このシトクロム c_4 の分子構造を明らかにするために、そのX線結晶構造解析を進めているが、現在のところ、未だ結晶化に成功していない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- ① Hiroshi Yokoyama, Aya Masuno, Makoto Misoo, Kazuya Yamaguchi, and Shinnichiro Suzuki, Synthesis and Structural Characterization of Nitrite-Coordinating Co^{II} and Co^{III} Complexes as Models for the Reaction Center of Co-Substituted Nitrite Reductase, *Journal of Coordination Chemistry*, **63**, 762-775 (2010). (査読あり)
- ② Masaki Nojiri, Hiroyasu Koteishi, Takuya Nakagami, Kazuo Kobayashi, Tsuyoshi Inoue, Kazuya Yamaguchi, and Shinnichiro Suzuki, Structural Basis of Inter-Protein Electron Transfer for Nitrite Reduction in Denitrification, *Nature*, **462**, 117-120 (2009). (査読あり)
- ③ Hiroyasu Koteishi, Masaki Nojiri, Takuya Nakagami, Kazuya Yamaguchi, and Shinnichiro Suzuki, Cytochrome *c*₅₅₁ Is A Mediator of Electron Transfer between Copper-Containing Nitrite Reductase and Azurin in a Denitrifying Bacterium, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **82**, 1003-1005 (2009). (査読あり)
- ④ Daisuke Hira, Masaki Nojiri, and Shinnichiro Suzuki, Atomic Resolution Structure of Pseudoazurin from the Methylotrophic Denitrifying Bacterium *Hyphomicrobium denitrificans*: Structural Insights into Its Spectroscopic Properties, *Acta Cryst.*, **D65**, 85-92 (2009). (査読あり)
- ⑤ Expression, Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of the Soluble Domain of PPA0092, A Putative Nitrite Reductase from *Propionibacterium acnes*, Masaki Nojiri, Felicia Shirota, Daisuke Hira, and Shinnichiro Suzuki, *Acta Cryst.*, **F65**, 123-127 (2009). (査読あり)

〔学会発表〕(計 30 件)

- ① Shinnichiro Suzuki, Structure-Function Relationships of Copper Reductases in Denitrification, International Symposium on Chemistry of Reductases IV, 2011年1月21日, 名古屋大学. (招待講演)
- ② 野尻正樹, 脱窒反応における蛋白質電子伝達機構の構造生物化学的機構, 第64回酵素工学研究会講演会, 2010年11月19日, 東京大学. (招待講演, 酵素工学奨励賞)
- ③ 池淵紗織, 城田フェリシア, 小手石泰康, 山口和也, 鈴木晋一郎, 野尻正樹, 六量体銅型亜硝酸還元酵素におけるタイプ1銅含有N末ドメインの役割, 第10回日本蛋白質科学会年会, 2010年6月16日, 札幌コンベンションセンター. (池淵, ポスター賞)
- ④ Shinnichiro Suzuki, Masaki Nojiri, Hiroyasu Koteishi, Daisuke Hira, Kazuya Yamaguchi,

Structure-Function Relationships in Regular and N- and C-terminally Extended Copper Nitrite Reductases, The 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009年7月27日, 名古屋国際会議場. (招待講演)

⑤ Hiroyasu Koteishi, Masaki Nojiri, Kazuya Yamaguchi, Shinnichiro Suzuki, A Single Methionine Residue at the Docking Interface Dramatically Affects the Interprotein Electron Transfer from Cytochrome *c* to Cu-containing Nitrite Reductase, The 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009年7月26日, 名古屋国際会議場. (小手石, ポスター賞)

⑥ 小手石泰康, 野尻正樹, 山口和也, 鈴木晋一郎, Interprotein Electron Transfer from Cytochrome *c* to Cu-containing Nitrite Reductase: Structural and Mechanistic Insights into Interactions between the Two Proteins, 第19回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2009年6月12日, 大阪大学(小手石, ポスター賞).

⑦ 野尻正樹, 平大輔, 小手石泰康, 池淵紗織, 津田愛子, 鈴木晋一郎, 亜硝酸還元酵素と電子供与蛋白質の分子間電子移動反応機構: 複合体結晶構造を基にした分子認識と反応制御機構の構造基盤, 第9回日本蛋白質科学会年会, 2009年5月22日, 熊本大学.

⑧ Daisuke Hira, Masaki Nojiri, Kazuya Yamaguchi, Shinnichiro Suzuki, Crystal Structure of a Complex between Electron Transfer Partners, Hexameric Cu-containing Nitrite Reductase and Pseudoazurin. The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008年11月11日, Jeju Island, Korea.

⑨ Shinnichiro Suzuki, Masaki Nojiri, Hiroyasu Koteishi, Aiko Tsuda, Kazuya Yamaguchi, Intermolecular and Intramolecular Electron Transfer Processes from Heme *c* to the Type 1 Cu. The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008年11月10日, Jeju Island, Korea (招待講演).

⑩ Masaki Nojiri, Hiroyasu Koteishi, Aiko Tsuda, Kazuya Yamaguchi, and Shinnichiro Suzuki, Inter- and Intra-molecular Complex Structures of Cu-Containing Nitrite Reductase with Cytochrome *c*. XXI Congress of the International Union of Crystallography, 2008年8月26日, 大阪国際会議場.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 晋一郎 (SUZUKI SHINNICHIRO)
大阪大学・名誉教授
研究者番号：70116052

(2) 研究分担者

野尻 正樹 (NOJIRI MASAKI)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：20333346

(3) 連携研究者

櫻井 武 (SAKURAI TAKESHI)
金沢大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：90116038