

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750190

研究課題名(和文)人工電子伝達蛋白複合体の構築と分子間電子移動メカニズムの化学

研究課題名(英文)Studies on interprotein electron transfer using artificial protein complexes

研究代表者

野尻 正樹 (NOJIRI, Masaki)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20333346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：一般的に、溶液中でフリーの蛋白質分子同士の間で起こる分子間電子伝達反応では、その電子移動反応が起こる際にそれら分子同士で瞬間的に準安定な複合体を形成し、その短時間内に様々な電子移動機構に関わる反応・変化がそれぞれの分子内部で起こる。しかしながら、その不安定さから複合体状態のまま解析することが困難なため、今も未解明な部分が多い。そこで、本研究では電子伝達パートナー分子同士を人工的に共有結合で結ぶ、あるいは天然でそれらが融合した試料を用いて、そのX線結晶構造解析ならびに物理化学的解析を行い、これまで未知の領域であった“蛋白質複合体形成時に起こる電子伝達反応機構”について新しい知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Generally, the redox-partner proteins form a transient complex during the inter-protein electron transfer reaction. It has been known that there are some modulation mechanisms for effective interprotein ET due to the conformational changes in the complex structure. However, most of the details for modulation remain unknown, because it is quite difficult to determine the complex structure due to the instability. So, we planned to analyze the structures and biophysical properties for the complexes constructed artificially and the naturally fused proteins. Based on their data, we discuss and propose the unprecedented mechanism for interprotein ET reaction.

研究分野：構造生物化学、生物無機化学、生化学

科研費の分科・細目：複合化学、生体関連化学

キーワード：電子移動反応 電子伝達蛋白質 蛋白質複合体 過渡的複合体 X線結晶構造解析 ブルー銅蛋白質 シトクロムc 亜硝酸還元酵素

1. 研究開始当初の背景

一般的に、溶液中でフリーの蛋白質分子同士の電子移動では、その電子移動反応が起こる際にそれら蛋白質同士で瞬間的(半減期: $\sim \mu\text{sec}$)に準安定な複合体を形成し、その短いタイムスケール内に様々な電子移動メカニズムに関する重要な反応・変化(例: 蛋白質分子構造の変化、プロトンの結合/解離、酸化還元電位の変化、等)がそれぞれの蛋白質分子内部(特に酸化還元中心まわり)で起こるとされている。しかしながら、その半減期の短さから複合体状態のままにそれら反応(構造)を解析することは非常に困難である。それ故、現在、本分野における複合体構造情報を得る主な手段は、ドッキングシミュレーション等の計算化学的手法を用いた推測複合体モデルを用いた解析となってしまう。本計算手法を用いた場合、予想モデルを計算する際のパラメーターにも依存するが、その出力された結果が何処まで信憑性があるものなのか、さらには、今、議論しようとしている複合体形成時に起こる構造変化等まで推測することは出来るのか等の不明瞭な点が数多く問題視されている。

2. 研究の目的

電子移動(酸化還元)反応における一般的な概念として、「2つの酸化還元中心の間で酸化反応と還元反応がそれぞれ同時に起こる」という点があげられる(中間体が存在しない)。これは、蛋白質分子間の電子移動反応の場合でも同様である。すなわち、電子は離れた分子の間(空間)を瞬間的に量子トンネル効果で移動する。これまでの電子移動反応に関する様々な理論的解析から、そのトンネリングバリアの高さと幅は、電子移動に関わる酸化還元中心間の距離、そして空間に存在する構造(原子)とダイナミクスに強く依存することが示唆されている。すなわち、電子移動反応の本質を理解する上で、その立体構造(本研究の場合、酸化還元パートナー分子同士で過渡的に形成された複合体構造のことを指す)を決定することが絶対条件として挙げられる。そこで、本研究では、上述のようにその半減期が短く極めて不安定な複合体構造を、人工的に両分子を結合させた状態で、および天然に存在する融合型蛋白質の状態 \times 線結晶構造解析によって明らかにし、さらに、それら試料における電子移動に関わる基礎物理化学的・生化学的解析を行う事で、分子間電子移動反応の本質である、複合体形成時にどんな反応(変化)が起こるのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料の調製

本研究で用いる試料は、全てオリジナルのバクテリア培養菌体から直接精製したものか、大腸菌を用いた組換え体発現系で調製を

行った。

(2) X線結晶構造解析

本研究で得られた複合体結晶のX線回折実験は全て、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44XU(大阪大学蛋白質研究所 超分子構造解析ビームライン)にて測定温度 100K で行われた。

4. 研究成果

(1) 「メタノール脱水素酵素と生理的電子受容体シトクロム c との人工複合体」

C1 資化性脱窒菌が持つメタノール脱水素酵素とその生理的電子受容体シトクロム c_L を Grabarek らの方法を参考に、生理的条件下でクロスリンク反応させた。その反応生成物を陰イオンクロマトグラフィーにより精製し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により解析したところ、塩基性残基が多く存在しシトクロム c_L との相互作用に寄与している示唆されるメタノール脱水素酵素の β -サブユニットとシトクロム c_L が共有結合で結ばれている事がわかった。さらに、その人工複合体のメタノール脱水素酵素活性を測定すると天然のメタノール脱水素酵素の約半分の触媒回転数をもつことがわかり、この人工的な結合が酵素機能にさほど悪影響を及ぼしていないことが示唆された。

続いて人工複合体中のシトクロム c_L の酸化還元滴定を行ったところ、非常に興味深い事に、天然のものに比べ、その電位が約 30mV 程、正側にシフトしていることがわかった。これは、複合体を形成するとシトクロム c_L 側に何らかの構造変化が起こり、その酸化還元特性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

この仮説を証明するために本人工複合体のX線結晶構造解析を計画し、まずはその単結晶化条件の検討をした。市販のスクリーニングキットを数種類、そして結晶化温度を4度Cと16度Cの2設定で結晶化条件の探索を行ったところ、ポリエチレングリコールとフッ化カリウムの条件で図1に示す結晶を得る事に成功した。本結晶のX線回折実験を大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44XUで行ったところ、分解能 2.1 程の回折データを取得することに成功した。位相決定と構造精密化の最中である。

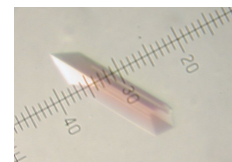


図1. メタノール脱水素酵素とシトクロム c_L の人工複合体結晶

(2) 「天然融合型シトクロム c を持つ銅含有亜硝酸還元酵素」

最近のゲノム解析データから、海洋性好冷

菌由来の銅含有亜硝酸還元酵素が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タイプであることが判明している。本研究では、まず始めに、本融合型酵素の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2に示す。結晶構造では、3つの亜硝酸還元酵素ドメインに、3つのシトクロムcドメインが各サブユニット間でスワッピングした状態で接触していた。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。本融合酵素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

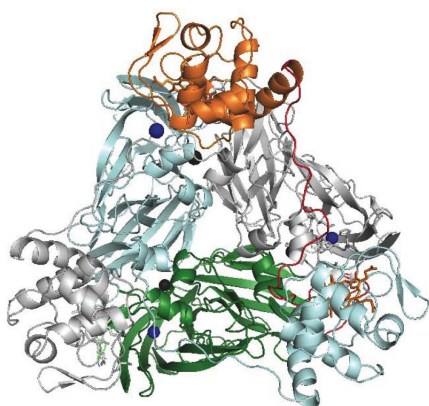


図2．天然シトクロムc融合型亜硝酸還元酵素の結晶構造(1つのサブユニットは、緑色のNIRドメイン、赤色のフレキシブルループ部分、茶色のシトクロムcドメインからなる)

を詳細に議論することができた。

次に、本融合型酵素のタンパク質内電子移動反応を、パル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。いずれの場合も、その電子移動の達成率(収量)は半分程度であり、逆電子移動が起きている可能性も示唆された。また、本酵素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と相同性を持つことがわかった。このCyt cの還元型スペクトルのピークは、414.5(Soret帯)、520.5(帯)、549 nm(帯)であり、酸化型は407.5 nm(Soret帯)であり、 $E_{1/2}$ は+230 mV(vs NHE, pH 6.5)であった。また、本酵素

への電子供与活性は、pH 6.5において従来のケースと比べて、ほぼ半分であった。また、C末端側のシトクロムドメインを欠かさせた蛋白質で、同様の酵素活性を測定すると融合したものとさほど変わらなかった。これは、生理的電子供与体のシトクロムcから本酵素内のシトクロムドメインへ電子が渡るのはなく、タイプ1銅へ直接電子供与している可能性を強く示唆させる結果だった。本シトクロムドメインの生理的な役割について今後、さらに検討していく事項である。

(3)「天然融合型キュブレドキシシンを持つ新規な銅含有亜硝酸還元酵素」

これまで当グループにより、亜硝酸還元酵素のアミノ末端側に電子伝達ブルー銅タンパク質(キュブレドキシシン)に似たドメイン構造が融合した天然融合型酵素の構造機能解析を行った経緯がある。最近のゲノム解析データにより、今回、新たにC末端側に同様のブルー銅タンパク質が融合したケースが発見された。そこで、本研究ではその新しいタイプについても解析を行った。

新タイプの融合型酵素を大腸菌で発現させ各種分光学的解析を行ったところ、タイプ1銅が2個、タイプ2銅が1個同定された。酵素活性については、これまでの既知のものと同程度であり、本蛋白質が酵素として機能することわかった。続いて結晶化を行ったところ、ポリエチレングリコールの系で良質な六角柱状結晶を得、X線回折実験を行った。結晶内の銅を用いた多波長異常分散法により位相を決定し、分解能1.9 Åで解析することに成功した。現在、これら結果を論文にまとめている最中である。

(4)「シトクロム P450cam とプチダレドキシシンの人工複合体と過渡的複合体の比較」

本研究では、亜硝酸還元酵素だけでなく他の解析事例を増やすために、代謝系の分子間電子伝達で有名なシトクロム P450cam とプチダレドキシシンの間の過渡的複合体構造の解析に取り組んだ。これまで他のグループの研究により、両分子の人工的な複合体構造はすでに決定されている。そこで、本研究では人工的につないでいない、天然の形に近い純粋な過渡的複合体結晶構造解析を計画した。丹念に結晶化条件の探索を行い、硫酸アンモニウムの系で結晶化に成功した。同様にSPRing-8での回折実験により、分解能1.7 Åで構造決定に成功し、これまで明らかになっている人工複合体の構造と比較した。その結果、人工的に繋いだ構造の方が酸化還元中心間の距離が若干短く、また両分子間の相互作用面積を広かった。また、相互作用に伴う構造変化についても、今回我々が解いた構造よりも人工的に繋いだ方が大きく変化していた。これは、他グループで解析された人工複合体において、繋ぐときに使用したリンカーの長さが短かすぎたために、本来起きなくて

もよい構造変化まで誘起している可能性が十分に示唆された。これは、人工複合体を設計する際に非常に有用な情報となり得、本研究の目的でもある、複合体形成時に起きる構造変化を議論する場合、特に注意が必要である。この点は極めて重要なポイントであり、現在、論文にまとめつつ、今後、さらに解析を継続する予定である。

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) Fukuda, Y., Koteishi, H., Yoneda, R., Tamada, T., Takami, H., Inoue, T., Nojiri, M. Structural and functional characterization of the *Geobacillus* copper nitrite reductase: involvement of the unique N-terminal region in the interprotein electron transfer with its redox partner. *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 396-405 (2014). 査読有

(2) Fukuda, Y., Tse, K. M., Lintuluoto, M., Fukunishi, Y., Mizohata, E., Matsumura, H., Takami, H., Nojiri, M., Inoue, T. Structural insights into the function of a thermostable copper-containing nitrite reductase. *J. Biochem.*, 155, 123-135 (2014). 査読有

(3) Hiruma, Y., Hass, M. A., Kikui, Y., Liu, W. M., Ölmez, B., Skinner, S. P., Blok, A., Kloosterman, A., Koteishi, H., Löhr, F., Schwalbe, H., Nojiri, M., Ubbink, M. The structure of the cytochrome p450cam-putidaredoxin complex determined by paramagnetic NMR spectroscopy and crystallography. *J. Mol. Biol.*, 425, 4353-4365 (2013) 査読有

(4) Tsuda, A., Ishikawa, R., Koteishi, H., Tange, K., Fukuda, Y., Kobayashi, K., Inoue, T., Nojiri, M. Structural and mechanistic insights into the electron-flow through protein for cytochrome *c*-tethering copper nitrite reductase. *J. Biochem.* 154, 51-60 (2013). 査読有

(5) 野尻正樹. タンパク質分子間電子伝達機構の構造基盤. (総説)「生化学」(日本生化学会), 85, 5-12 (2013). 査読無

(6) 小手石泰康、野尻正樹. タンパク質分子

間電子移動反応の構造的ならびに機構的洞察. 「生産と技術」(生産技術振興会), 64, 76-79 (2012). 査読無

(7) Fukuda, Y., Tamada, T., Takami, H., Suzuki, S., Inoue, T., Nojiri, M. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of GK0767, the copper-containing nitrite reductase from *Geobacillus kaustophilus*. *Acta Cryst.* F67, 692-695 (2011). 査読有

(8) Nojiri, M., Suzuki, S. Atomic Description of Inter-protein Electron Transfer for Biological Nitrite Reduction in the Global Nitrogen Cycle. *Annual Report of Osaka Univ., Academic Achievement 2009-2010 (10 Papers Selection)*, 12-14 (2011). 査読無

(9) Nojiri, M. Atomic Description of Inter-protein Electron Transfer Reaction for Biological Nitrite Reduction in the Global Nitrogen Cycle. *SPRING-8 Research Frontiers*, 2010, 30-31 (2011). 査読無

(10) 野尻正樹. 過渡的な生体分子間相互作用を原子レベルで見る. 「化学と工業」(“飛翔する若手研究者”欄)(日本化学会), 10月号, 790 (2011). 査読無

[学会発表](計 8 件)

(1) Nojiri, M. X-ray diffraction studies on the Protein-Protein Interaction for Interprotein Electron Transfer between Copper Nitrite Reductase and its Redox Partner. ESF-EMBO Symposium "Molecular Perspectives On Protein-Protein Interaction", 27 May, Pultusk, Poland (2013).

(2) 米田涼平、石原加奈子、永田智大、福田庸太、小手石泰康、井上豪、野尻正樹. 高度好熱菌由来の銅含有亜硝酸還元酵素の構造と機能. 第86回日本生化学会大会. 9月11日. 横浜パシフィコ (2013).

(3) 野尻正樹、米田涼平、小手石泰康、福田庸太、平大輔、井上豪. 銅含有亜硝酸還元酵素のタイプ1銅部位の原子分解能構造解析と電子伝達活性. 第40回生体分子科学討論会. 6月7日. 大阪大学 (2013).

(4) **野尻正樹**. 生体分子間電子伝達反応における特異的で多様な分子認識機構の構造生物化学. (講演証 受証講演). 第92回日本化学会年会「第25回 若い世代の特別講演会」. 3月25日. 慶応義塾大学 (2012).

(5) **野尻正樹**. 生物学的脱窒過程における蛋白質分子間電子伝達反応の構造基盤. (奨励賞 受賞講演) 第84回 日本生化学会大会. 9月21日. 京都国際会議場 (2011).

(6) **野尻正樹**. 高分解能電子伝達複合体結晶構造を用いた蛋白質分子間相互作用と電子移動反応過程の解析. (シンポジウム 依頼講演) 第84回 日本生化学会大会. 9月21日. 京都国際会議場 (2011).

(7) **野尻正樹**. 高分解能電子伝達複合体構造を用いた蛋白質分子間相互作用と電子移動反応過程の解析. (シンポジウム 依頼講演) 第49回 日本生物物理学会年会. 9月17日. 兵庫県立大学 (2011).

(8) 福田庸太、小手石泰康、井上豪、**野尻正樹**. 高分解能電子伝達複合体構造を用いた蛋白質分子間相互作用と電子移動反応過程の解析. 第11回日本蛋白質科学会年会. 6月8日. ホテル阪急エキスポパーク (2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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