

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570163

研究課題名(和文)多量体形成する重金属結合蛋白質の分子構造に関する研究

研究課題名(英文)Studies on molecular structure of metalloproteins

研究代表者

杉浦 美羽(Sugiura, Miwa)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：80312255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアのZnおよびCdの重金属耐性を調べたところ、好熱性シアノバクテリアが常温性のものに比べて約100倍高い耐性を示した。細胞内に取り込んだ過剰の重金属を結合する重金属結合の低分子蛋白質「メタロチオネイン」の構造について調べたところ、8量体を形成して50原子のZnを結合していることを見いだした。本研究では更に、この蛋白質の分子構造をX線結晶解析によって、低分子蛋白質がどのように効率的に多原子の金属を結合できるのかを明らかにすることを試みた。タンパク質の発現精製を行い、10 μmの結晶を得ることができたが、高解像度での構造解析までには期間内に至らなかったため、現在進行中である。

研究成果の概要(英文)：Zinc ion is an essential element acting as a cofactor in more than 300 enzymes. However, high concentrations of Zn<sup>2+</sup> are lethal for the cells. Thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus*, revealed higher resistance for Zn and Cd compared to other bacteria. In this study, we found that heavy-metal binding protein, metallothionein, in *T. elongatus* makes pentamer binding 50 atoms of Zn<sup>2+</sup>. Thus formation of multimer bound many Zn must be the reason of resistance to high concentration of Zn. Furthermore, we tried to analyse the molecular structure of this metallothionein by X-ray crystal structure. Although we obtained many crystals, the resolution was not high enough to know the molecular structure. Now, we are still working on crystallization for better resolution.

研究分野：生物物理

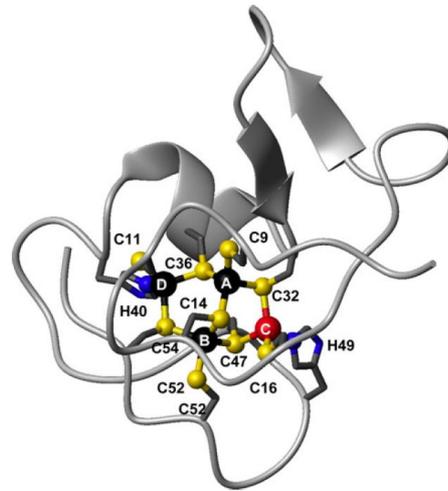
キーワード：金属タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

生命活動を行う上において生体反応の触媒である酵素は重要な働きを担う。多くの酵素は、その活性中心に金属イオンを持って触媒として機能するため、トランスポータ等によって細胞外から積極的に金属を取り込む。しかし、環境変化などによって過剰量の金属が生体内に取り込まれてしまうと、本来は金属を結合しない蛋白質などに非特異的に結合して蛋白質の構造を変えたり、金属結合蛋白質であっても別の金属種に置換され、触媒活性を低下させたり失活させてしまう。そのため、過剰の重金属によって引き起こされる種々の問題から正常な生命活動を守るために、生体は金属イオン濃度を維持する機構を保持している。

メタロチオネイン(MT)は原核生物から真核生物まで広く存在する可溶性の Zn 結合蛋白質の総称で、Cys のチオール(S)、もしくは、His のイミダゾールの N が Zn に配位している。細胞内の  $Zn^{2+}$ 濃度が高くなると MT 遺伝子が転写誘導されて、重金属毒性から生体機能を防御することが知られている。真核生物の MT は 1 分子あたり 5-7 個の Zn を結合するが、原核生物の MT は 3-4 個しか Zn を結合できない。その理由の一つは、金属を結合できる Cys と His の数の違いにある(真核生物の MT は 33%、原核生物は 16%)。動物や植物などの MT の構造は NMR で解析されており、真核生物型の MT ファミリーの構造がいくつか報告されており、金属結合部位の構造が共通することが分かっている。それに対し、原核生物ではシアノバクテリア (*Synechocystis* 7942) の MT(SmtA)が NMR で解析されているだけである(右図)。

本研究研究が始まる直前に、研究代表者は温泉から単離された好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の Zn および Cd への耐性が他の常温性シアノバクテリア *Synechocystis* 7942 よりも 50 倍以上高



*Synechococcus* 7942 のメタロチオネイン SmtA の NMR 解析による構造 [Blindauer C.A. et al. 2001, PNAS].

いことを見いだした。*T. elongatus* が他の生物種に比べて高い重金属耐性をもつ理由を調べるために、本研究では、*T. elongatus* のメタロチオネインを精製して構造を調べることをめざした。

## 2. 研究の目的

Zn や Cd などの重金属は、酵素に結合して主に酸化還元反応の機能を担うため、代謝に重要な金属であるが、一方で、必要以上量が生体内に取り込まれると、様々な代謝を阻害して重篤な疾病を引き起こす。Cd 摂取によるイタイタイ病はその代表的な例である。環境汚染物質でもあるこれらの重金属を、好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* がどのようにして蓄積するのかについて、金属結合タンパク質の構造を詳細に調べて多原子配位の構造理論を理解することは、タンパク質構造化学の学術的観点から、また、ファイトリメディエーション等への応用研究から非常に重要である。本研究では、Ca や Zn を多く取り込む *T. elongatus* の、特にメタロチオネインに着目し、この構造を明らかにすることを目的とした。

*T. elongatus* は光合成による光エネルギーの化学エネルギー変換して生育するシアノバクテリアである。*T. elongatus* は Zn や Cd

に加え、Fe の取り込みも多い。実際のところ、このバクテリアが単離された別府温泉（海地獄）は特に Fe の含有量が多い。Fe は光合成のエネルギー変換に関わる光化学系 II をはじめとするタンパク質に結合し、エネルギー変換という重要な役割を担っている。本研究では、メタロチオネインに加え、金属タンパク質、特に Fe を結合した光化学系 II のタンパク質の構造と機能の関係を明らかにすることを第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

3-1) *T. elongatus* のメタロチオネイン (TmtA) 遺伝子のクローニングと大腸菌での発現

*T. elongatus* のゲノム DNA から PCR によってメタロチオネイン遺伝子をクローニングし、RuBisCO プロモーターの下流に連結したプラスミド DNA を構築した。この組換え大腸菌を培養し、TMT を作らせた。

3-2) TmtA の精製

大腸菌組換え体を LB 培地で培養し、遠心分離によって細胞を回収した後に、フレンチプレスで細胞を破碎した。未破碎の細胞を遠心分離で除去した後に、超遠心によって水溶性画分を回収した。これを、まず陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、NaCl の濃度勾配によって溶出させ、その中から Zn を結合したタンパク質画分を回収した。このモニタリングは、質量分析によって行った。この画分を更に、ゲル濾過クロマトグラフィーに供し、TmtA を精製した。

3-3) TmtA の金属結合数の解析

照射によって順に外れる Zn 由来の分子量の差から結合する Zn の数を見積り、更に、ICP によってタンパク質あたりの Zn 結合数を測定した。

3-4) TmtA の結晶化

精製 TmtA を異なる PEG 濃度や分子量、塩の種類などの異なる結晶化条件で、結晶化を試みた。結晶化は、ハンギングドロップ法で、12 °C から 25 °C の間の温度条件を検討した。

3-5) 光化学系 II に結合する Cytb<sub>559</sub> のヘム鉄周辺のアミノ酸置換体の作製

*T. elongatus* のゲノムから Cytb<sub>559</sub> のサブユニットをコードする psbE 遺伝子をクローニングし、大腸菌プラスミドにサブクローニングした。下流に抗生物質耐性カセット遺伝子を連結した。それを鋳型にして、ヘム Fe のリガンドアミノ酸を別のアミノ酸に置換できるように、PCR 法によって変異を導入した。このプラスミド DNA を *T. elongatus* 細胞にエレクトロポレーションによって導入し、ゲノム DNA と相同組換えした *T. elongatus* 組換え体を選抜した。このとき宿主細胞には、光化学系 II のサブユニットの 1 つである CP43 の C 末端に His を 6 つ連結した 43H 株を用いた。

3-6) Cytb<sub>559</sub> 置換体の精製

*T. elongatus* 組換え体を培養し、細胞を回収した。これをフレンチプレスによって破碎し、破碎された画分を超遠心分離によってチラコイド膜画分を得た。これを、界面活性剤 - ドデシルマルトシドで可溶化し、Ni<sup>2+</sup>アフィニティクロマトグラフィーによって光化学系 II 複合体を精製した。

3-6) Cytb<sub>559</sub> 置換体の構造および機能解析

Cytb<sub>559</sub> の酸化還元はアスコルビン酸もしくはジチオナイトで行った。酸化還元の有無について、吸収差スペクトルを測定して調べた。更に、酸化還元ポテンシャルを、EPR によってヘム鉄のポテンシャル型から求めた。機能については、強光阻害条件における光合成機能への影響によって調べた。

#### 4. 研究成果

##### 4-1) 1 分子の TmtA 当たりの Zn の結合数と Cd 結合

TmtA を精製して詳細を調べたところ、構造が報告されている別の常温性シアノバクテリアの SmtA とは大きく異なり、ゲル濾過で溶出された分子量から、TmtA は 8 量体を形成しており、Zn を 8 量体あたり 50 の  $Zn^{2+}$  を結合していることが分かった。つまり、サブユニット内に加えてサブユニット間でも Zn を結合していることが考えられる。このようなサブユニット間で金属を配位することによって、シンプルなタンパク質が多くの金属イオンを配位できるタンパク質は他に報告がない。

更に、Zn を Cd に置換した培地で培養した大腸菌から TmtA を精製して同様の解析を行ったところ、全ての Zn が Cd に置換できることを確認した。

##### 4-2) TmtA の結晶化

TmtA の X 線結晶構造解析を目指して、精製 TmtA を濃縮し、ハンギングドロップ法で結晶化を試みた。温度は  $12^{\circ}C$  から  $25^{\circ}C$  の間、沈殿剤として PEG および Jeffamin、様々な塩およびバッファの組み合わせを約 300 種類の条件で調べた。スクリーニングの結果、 $0.1 M$  MES (pH6.5) /  $30\%$  Jeffamin M-600 /  $50 mM$   $CaCl_2$  の組み合わせで、 $19^{\circ}C$  の時に  $10 \mu m$  のエッジのしっかりした結晶を観察した。しかし、X 線を照射して回折像を見たところ、当初の目的としていた  $2 \text{ \AA}$  以上の解像度の結晶を得ることは出来なかった。精製条件の再検討、および、結晶条件の再検討を行っているが、期間内にはこれ以上の結晶を得ることができなかった。

##### 4-3) TmtA の構造について

これまでの分析結果から、TmtA は 8 量体を形成し、それぞれのサブユニット内で 4 原子の Zn がクラスターを形成して Cys と His に配位し、更にサブユニット間で合計少なくとも 18 の Zn を配位していると予測される。今後、解像度の高い結晶を得ることが課題である。更に、構造を改変した TmtA に対するイオン半径のより大きな金属置換体との構造の比較により、金属結合と蛋白質の分子構造の関係を一般論的に明らかにできると期待できる。

##### 4-4) Cyt<sub>b559</sub> のヘム Fe リガンドアミノ酸の置換体の構造と機能について

Cyt<sub>b559</sub> のサブユニットのリガンドは PsbE の 23 番目の His の N であるが、本研究では、金属タンパク質の構造と機能の解明の観点から、このアミノ酸を Ala および Met に変えて配位できなくなる組換え体 (PsbE/His23Ala および、PsbE/His23Met)、および、この His23 と  $3 \text{ \AA}$  の距離にある Thr を Pro に変えてヘム周辺の構造を変えた *T. elongatus* 組換え体 (PsbE/Thr26Pro) を作製した。組換え細胞から光化学系 II 複合体を精製し、酸化還元能を調べたところ、PsbE/His23Met は野生型と同様にジチオナイト ( $E_m = -420 \text{ mV}$ ) で可能であったが、アスコルビン酸 ( $E_m = +390 \text{ mV}$ ) では酸化還元できなかった。変異のない野生型の Cyt<sub>b559</sub> の酸化還元電位は約  $+330 \text{ mV}$  のハイポテンシャル型 (HP) と約  $+220 \text{ mV}$  の中間ポテンシャル型 (IP) が等量で存在するため、どちらの還元剤を使っても Cyt<sub>b559</sub> の還元は可能である。しかし、PsbE/His23Met はアスコルビン酸では還元されなかったため、Cyt<sub>b559</sub> の酸化還元電位が野生型よりもより低くなったことが考えられる。一方、PsbE/His23Ala および、PsbE/His23Met では酸化還元そのものが認められなかった。PsbE/His23Met について、EPR によってヘム Fe 由来のシグナルから、ポテ

ンシャル型を調べたところ、完全な IP であることが明らかになった。PsbE/His23Ala および、PsbE/His23Met については、酸化還元せず、シグナル自体が得られなかった。そこで、ヘム周辺の構造について調べたところ、非ヘム鉄由来のシグナルが検出され、これらのリガンド変異体では、1 つのリガンドがなくなることによって、ヘムが外れて非ヘム鉄になることが分かった。

Cyt<sub>b559</sub> は光化学系 II 複合体の一番外側に結合するヘムタンパク質で、酸化還元可能なヘム鉄を結合している。エネルギー変換に関わる光合成の電子伝達において、この Cyt<sub>b559</sub> のヘム鉄は電子伝達コファクターではない。酸化還元可能な理由として、これが、光ストレス条件下で余剰な励起エネルギーを消費するための「副次的電子移動」のコファクターの1つであるのではないかと考えられているが、明らかな証拠がなかった。本研究で得られた組換え光化学系 II を用いて、強光条件下で光化学系 II に由来する水の酸化活性を測定したところ、野生型に比べて PsbE/His23Ala および、PsbE/His23Met は著しく活性が阻害されることが明らかになった。以上の結果から、Cyt<sub>b559</sub> は光合成の副次的電子移動のコファクターである可能性が示唆された。PsbE/His23Met の分子構造については、現在、結晶化を試みており、X 線結晶解析によって明らかにする予定である。

#### 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5件:全て査読付)

1. Boussac, A., Rutherford, A.W, and Sugiura, M., Electron transfer pathways from the S<sub>2</sub>-states to the S<sub>3</sub>-states either after a Ca<sup>2+</sup>/Sr<sup>2+</sup> or a Cl<sup>-</sup>/I<sup>-</sup> exchange in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus.*, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2015) 1847,

576-585

2. Sugiura, M., Nakamura, M., Koyama, K., and Boussac, A. 'Assembly of oxygen-evolving Photosystem II efficiently occurs with the apo-Cyt<sub>b559</sub> alone but the holo-Cyt<sub>b559</sub> increases the recovery rate of a functional enzyme upon photo-inhibition.' *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2015) 1847, 276-285
3. Suga, M., Lai, T.L, Sugiura, M., Shen, J.-R., and Boussac, A., Crystal structure at 1.5 Å resolution of the PsbV2 cytochrome from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus.*, *FEBS Lett.* (2013) 587, 3267-327279.
4. Sugiura, M., Ogami, S., Kusumi, M., Un, S., Rappaport, F., and Boussac, A., Environment of Tyr<sub>Z</sub> in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* in which PsbA2 is the D1 protein, *J. Biol. Chem.*, (2012) 287, 13336-13347
5. Ogami, S., Boussac, A., and Sugiura, M. Deactivation processes in PsbA1-Photosystem II and PsbA3-Photosystem II under photoinhibitory conditions in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2012) 1817, 1322-1330

[学会発表](計1件)

1. Miwa Sugiura, Molecular structures relating regulation of electron transfer in Photosystem II, International Conference of "Photosynthesis Research for Sustainability-2013", Baku, Azerbaijan (June, 5-9, 2013) 招待講演

[図書](計3件)

1. 杉浦 美羽, 光合成のエネルギー・物質変換～人工光合成をめざして 光合成研究

を支える研究手法「部位特異的変異導入による光化学系の分子構造と機能の解析」、  
化学同人 (2015) pp. 35

2. 杉浦 美羽, 光合成研究と産業応用最前線 第5章 酸化還元反応 第2節 光合成による高効率エネルギー変換と水の酸化メカニズム、エヌティーエス (2014) pp.167-176
3. 杉浦 美羽, 光合成のエネルギー利用と環境応用 第5章 酸素発生型光合成タンパク質の構造と機能、シーエムシー出版 (2014) pp. 43-52

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 美羽 (SUGIURA Miwa)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・

准教授

研究者番号：80312255

(2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：