

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658287

研究課題名(和文)新規金属集積蛋白質の分子設計と環境浄化への応用

研究課題名(英文)Development of a new metalloprotein based on the structure and function of metalloenzymes

研究代表者

増田 太郎 (Masuda, Taro)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40395653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規金属結合蛋白質のX線結晶構造解析による構造活性相関の解明、および、既知の金属結合・集積蛋白質を基礎とした新規金属結合蛋白質の設計、という二つの視点から研究を進めた。各項目についての概要を以下に示す。  
について、甲殻類由来新規フェノールオキシダーゼ(以下P0と省略)、および、ザクロ種子由来カルシウム親和性キチナーゼのX線結晶構造解析を行った。

研究成果の概要(英文)：To establish the relationship between a protein and its metal ligand, we divided the research to the following two parts. 1. X-ray crystallographic studies on novel metal binding proteins, and 2. Designing a new metal binding protein based on the structure and function of known metalloproteins. As the results of the first approach, we determined the crystal structures of a copper binding prophenoloxidase from crustacean and a calcium accumulating class III chitinase from pomegranate. Further, we constructed a novel nickel binding protein based on the iron storage protein ferritin.

研究分野：食品生物化学

キーワード：蛋白質 立体構造 金属 リガンド

1. 研究開始当初の背景

金属元素が関わる社会・環境問題として、重金属および放射性同位元素による土壌と水域の汚染、希少金属の資源的価値の増大等が挙げられていた。本研究では、蛋白質が有する金属リガンドへの高い選択性を利用し、環境からの金属の回収を大目的とし、蛋白質と金属元素の相互作用に関する構造的基盤を確立するため、検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は、金属結合蛋白質が持つ金属リガンドへの高い選択性の構造的基盤を明らかにし、金属結合・集積能を高めた新規分子を設計する為の基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、新規金属結合蛋白質の X 線結晶構造解析による構造活性相関の解明、および、既知の金属結合・集積蛋白質を基礎とした新規金属結合蛋白質の設計、という二つの視点から研究を進めた。

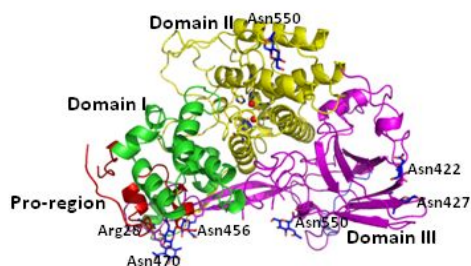
に関しては、申請者が見いだしたザクロ種子由来カルシウム集積性クラス III キチナーゼの X 線結晶構造解析を行い、そのカルシウム親和性の構造的な要因を解明する。また、申請者が見いだした新規な特徴を有するクルマエビ由来フェノールオキシダーゼについても X 線結晶構造解析を行い、銅を含む活性中心の詳細な構造を明らかにすることにより、銅を含む活性中心の配位環境に関する知見を得る。

については、生体内において鉄を選択的に大量集積する籠状蛋白質フェリチンを構造の土台とし、種々の改変を加えることにより金属特異性の異なる新規分子を構築する。

4. 研究成果

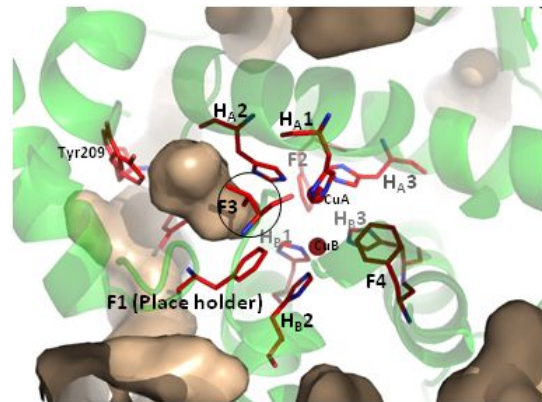
甲殻類由来新規フェノールオキシダーゼの X 線結晶構造解析

フェノールオキシダーゼ (PO) は活性中心に二核の銅を有するタイプ 3 銅蛋白質に属し、チロシンなどのモノフェノールを基質とするメラニン生合成経路の鍵酵素である。一方、同じファミリーに属するヘモシアニン (Hc) は、同様の活性中心を持つにもかかわらず、酵素活性を示さない。申請者は、両者の活性の差異をもたらす構造的な要因を明らかにするため、クルマエビ血漿より精製した新規 PO (POβ) の X 線結晶構造解析を試みた。

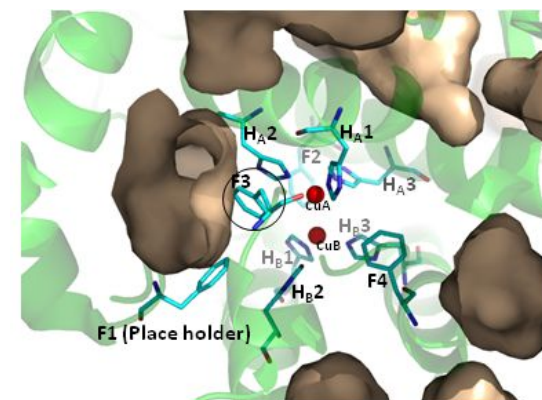


プロ型 POβの結晶を調製し、活性中心に含まれる銅原子の異常散乱を用いた SAD 法による構造解析の後、最終構造を 1.8 分解能で決定した。POβの各サブユニットは、プロ領域とドメイン I, II, III、そして C-末端ドメインから成っており、生理的条件下において 6 量体を形成することが示唆された (左下図)。

また、POβの C-末端ドメインは、他の PO にはない独特の領域で、Cys682-Cys687 間のジスルフィド結合による環状ペプチドを形成し、隣接サブユニットとの相互作用に寄与していた。POβと Hc の二核銅とその配位子である 6 残基のヒスチジンから成る活性中心の構造は非常に類似していたが、その周辺には数か所のアミノ酸残基の変異が認められ、この変異が両者の活性中心付近の cavity と、分子表面から活性中心に至る cleft の形状に変化をもたらしていることが明らかとなった (下図)。



(図) POβの活性中心



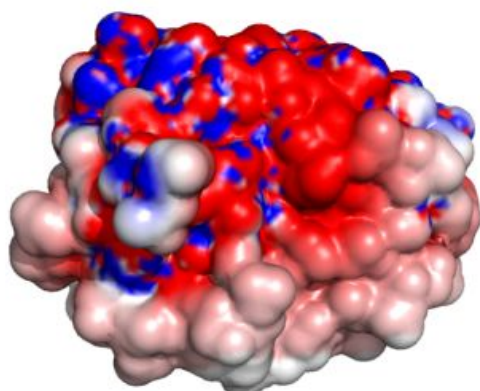
(図) Hc の活性中心

すなわち、Hc では、芳香環を持つバルキータンパク質の活性中心に対するアクセスが大幅に制限されており、このことが POβとの活性の差異をもたらしていると考えられた。

カルシウム集積性クラス III キチナーゼの X 線結晶構造解析

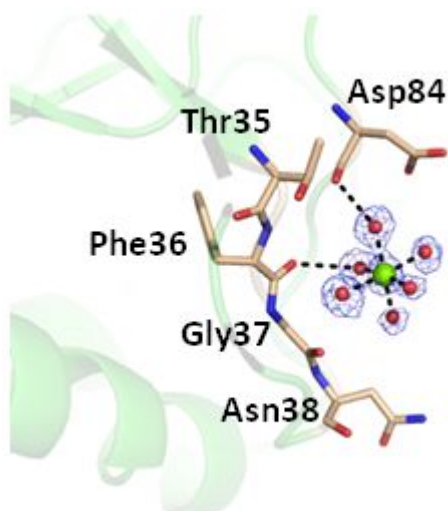
キチナーゼはキチンのβ-1,4 グリコシド結合を切断する加水分解酵素であり、植物キチナーゼは傷病関連タンパク質 (Pathogenesis related (PR)-Protein) とし

て知られている。最近、著者らはザクロ種子に存在するクラス III キチナーゼが、カルシウム貯蔵タンパク質として機能していることを見出した (Yang, H. et al. *Plant J*, **68**, 765-76 (2011))。本研究では、組換え型クラス III ザクロキチナーゼの 1.6 Å 分解能での X 線結晶構造解析に成功した。ザクロキチナーゼは、全体のフォールディング、活性中心付近の構造とも、既報の植物由来クラス III キチナーゼと類似していたが、他のクラス III キチナーゼにはない構造上の特徴を有していた。即ち、分子表面に明確な配位子を含む金属結合部位を複数有しており、分子表面の静電ポテンシャルは全体として負に偏っていた (下図、赤が負の静電ポテンシャル)。

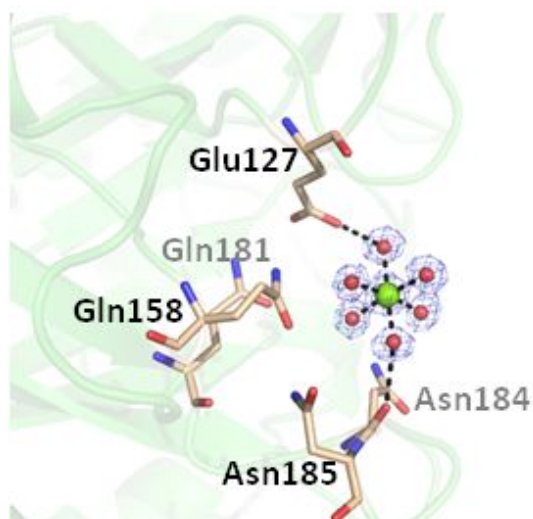


(図) ザクロクラス III キチナーゼの静電ポテンシャル

この酸性に偏った静電ポテンシャルは、構造既知のクラス III キチナーゼである hevamine と対照的であり、ザクロキチナーゼの特徴である金属親和性を与える要因となっていることが示唆された。また、分子表面に複数のカルシウム結合部位を有しており、その詳細な配位環境が明らかになった (下図および右上図)。



(図) 分子表面のカルシウム配位構造 1



(図) 分子表面のカルシウム配位構造 2

図のように、カルシウムイオン (緑) は、分子表面に位置するアスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸側鎖と主鎖の酸素との間で 6 配位構造をとっていた。

現在、一分子あたり、4-6 カ所のカルシウム結合サイトを見いだしており、更に構造の精密化を進めることで、占有率の低い結合サイトも複数同定しつつある。これらのサイトのカルシウム占有率と、配位構造の差異との関連についてを詳細に検討し、金属元素と新規金属集積蛋白質の設計に役立てる。

#### 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 6 件)

1. Masuda T., Yamamoto A., & Toyohara H. (2015) The iron content and ferritin contribution in fresh, dried, and toasted nori, *Pyropia yezoensis*. *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 79(1): 74-81 (DOI:10.1080/09168451.2014.968087)

2. Masuda T., Zhao G. & Bunzo Mikami (2015) Crystal structure of class III chitinase from pomegranate provides the insight into its metal storage capacity. *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 79(1): 45-50 (DOI:10.1080/09168451.2014.962475)

3. Taro Masuda, Kyosuke Momoji, Takashi Hirata & Bunzo Mikami (2014) Crystal structure of a crustacean prophenoloxidase provides a clue to understanding the functionality of the

type 3 copper proteins. *FEBS J.* 281: 2659-2673 doi: 10.1111/febs.12812.

4 . Hiroki Kuyama, Taro Masuda, Chihiro Nakajima, Kyosuke Momoji, Tatsuya Sugawara, Osamu Nishimura & Takashi Hirata (2013) Mass spectrometry-based N- and C-terminal sequence determination of a hepatopancreas-type prophenoloxidase from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicas*. *Anal. Bioanal. Chem.* 405: 2333–2340

5 . Morimoto S., Masuda T., Sugihara I. & Toyohara H. (2012) Identification and characterization of ferritin gene and its product from the multicellular green alga, *Ulva pertusa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(10): 1913-1919

6 Masuda T., Morimoto S., Mikami B. & Toyohara H. (2012) The extension peptide of plant ferritin from sea lettuce contributes to shell stability and surface hydrophobicity. *Protein Sci.* 21: 786-796

〔学会発表〕(計 件)

1. 増田太郎、森本晋一郎、三上文三、豊原治彦  
高等植物型フェリチンの N-末端領域の構造と機能  
日本蛋白質科学会 2012 年度年会

2 . 増田太郎、九山浩樹、大友良祐、中島千尋、百次恭祐、菅原達也、西村紀、平田孝  
クルマエビより見出した新規フェノールオキシダーゼはヘモシアニンとの過渡的分子である  
日本蛋白質科学会 2013 年度年会

3 . 増田太郎、百次恭祐、平田孝、三上文三  
甲殻類由来新規フェノールオキシダーゼの立体構造が示唆するタイプ 3 銅蛋白質の機能的差異に関する分子基盤  
日本蛋白質科学会 2014 年度年会

4 . 増田太郎、九山浩樹、大友良祐、中島ちひろ、百次恭祐、菅原達也、西村紀、平田孝  
クルマエビ血漿から見出した新規フェノールオキシダーゼはヘモシアニンの特徴を有する  
日本水産学会 2013 年度秋期大会

5 . 増田太郎、百次恭祐、平田孝、三上文三  
立体構造が示唆する甲殻類フェノールオキシダーゼとヘモシアニンの機能的差異

日本水産学会 2014 年度秋期大会

6 . 増田太郎、森本晋一郎、三上文三、豊原治彦  
N-末端ドメインが関与する植物型フェリチンの鉄放出機構  
日本農芸化学会 2013 年度大会

7 . 増田太郎、百次恭祐、平田孝、三上文三  
新規フェノールオキシダーゼの立体構造が示唆するタイプ 3 銅蛋白質の機能分化について  
日本農芸化学会 2014 年度大会

8 . Masuda, T., Momoji, K., Hirata, T., Mikami, B.  
Crystal structure of a crustacean prophenoloxidase elucidates the functional difference of the type 3 copper proteins  
12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC12), Zurich, Switzerland, 2014 Aug. 27, 2014

9 . 増田 太郎  
立体構造からみたフェリチンの機能と多様性  
鉄バイオサイエンス学会第 37 回学術集会 (2013) シンポジウム  
鉄代謝関連分子の構造と機能の新知見

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 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 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

増田 太郎 (MASUDA, Taro)  
京都大学大学院・農学研究科・助教  
研究者番号：40395653

(2) 研究分担者

三上 文三 (MIKAMI, Bunzo)  
京都大学大学院・農学研究科・教授  
研究者番号：40135611

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：