

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05771

研究課題名(和文) Geobacter属細菌の電極への電子伝達に関する構造生物学的解析

研究課題名(英文) Structural and biological study of electrode reduction by Geobacteraceae

研究代表者

井上 謙吾 (Inoue, Kengo)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：70581304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Geobacter sulfurreducensは細胞外への電子伝達能力が極めて高い。電極への高効率な電子伝達に必須な細胞外膜シトクロムOmcZの構造解明するため、OmcZの大量発現系を構築し、精製OmcZを大量調整した。精製したOmcZを用いて結晶化条件を検討したところ、結晶を得ることに成功し、X線回折データの収集を行った。最も高いもので分解能の2.2 Åのデータを得ることに成功した。さらに、Pt、Hg、Au、Pbの4種類の重原子を用いて、これらを含むクライオ溶液に結晶を浸し、結晶の重原子置換体を作成した。大型放射光施設にて、得られた結晶から位相決定のためのデータを収集した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Geobacter sulfurreducensがもつ細胞外電子伝達能力には電気伝導性ナノワイヤーが重要であることが知られている。これまでにPilA、OmcS、およびOmcZを構成するナノワイヤーが報告されており、これらのうち、OmcZのみその立体構造が明らかになっていない。本研究では、OmcZの立体構造決定を試み、構造解明に十分な分解能の反射データを得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Geobacter sulfurreducens has an extremely high extracellular electron transfer capacity. To elucidate the structure of outer membrane cytochrome OmcZ, which is essential for optimal extracellular electron transfer to the electrode, over expression system of OmcZ in G. sulfurreducens was established and OmcZ was purified. After screening crystallization conditions using the purified OmcZ, crystals were successfully obtained and X-ray diffraction data were collected. The highest resolution data of 2.2 Å was successfully obtained. Furthermore, using four types of heavy atoms, Pt, Hg, Au, and Pb, the crystals were soaked into a cryo-solution containing these atoms, and heavy-atom substituted crystals were prepared. Data for phase determination was collected from the obtained crystals.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Geobacter 細胞外電子伝達 シトクロム

1. 研究開始当初の背景

古くから鉄還元菌として研究されてきた *Geobacter sulfurreducens* は細胞外への電子伝達能力が極めて高く、金属などの導体にも電子を伝達することができる。そのため、*G. sulfurreducens* は微生物燃料電池や微生物電気化学装置における電極への電子伝達メカニズムの解明に向けたモデル生物として精力的に研究が行われている。*G. sulfurreducens* の細胞外電子伝達には、本株が生産する細胞外 *c* 型シトクロムが極めて重要であることが知られている。特に、細胞外シトクロム OmcS や OmcB は不溶性の酸化鉄への電子伝達に必須であり、細胞外シトクロム OmcZ は電極への高効率な電子伝達に必須であることが知られている。また、*G. sulfurreducens* は電気伝導性ナノワイヤーを生産することが知られており、これまでに *G. sulfurreducens* が生産する電気伝導性ナノワイヤーは PilA、OmcS、OmcZ それぞれを構成単位とする 3 種の電気伝導性ナノワイヤーが知られている。これらのうち、PilA、および OmcS を構成単位とする電気伝導性ナノワイヤーについては、その立体構造が明らかになっているが、OmcZ を構成単位とする電気伝導性ナノワイヤーについては、明らかになっていない。OmcZ は約 50 kDa の OmcZ_L と約 30 kDa の OmcZ_S の二つのサイズで存在することが知られている。OmcZ_L は細胞外に分泌された後、同様に細胞外に分泌された subtilisin 様プロテアーゼ OzpA によって分子内で切断され、N 末端側が OmcZ_S となると考えられている。OmcZ は分子内に 8 個の *c* 型ヘム結合モチーフ (通常は CXXCH) をもつが、そのうち 1 つは CX₁₄CH と特殊なモチーフを持つ。また、精製された OmcZ_S の変性温度は 94 と極めて高いことが知られている。このように複数の興味深い特徴を有する OmcZ については、以前、精製された OmcZ_S の結晶化条件のスクリーニングが試みられたが、OmcZ_S は極めて低い水溶性を示すため、良好な結晶を得ることができなかった。

2. 研究の目的

本研究では、微生物の細胞外電子伝達はどのようなしくみによって起こり得るのかを解明することを目的とし、OmcZ などの細胞外シトクロムによる細胞外電子伝達様式を原子レベルで明らかにすることを目的とした。特に、本研究では、*G. sulfurreducens* 由来の細胞外シトクロム OmcZ_L を精製し、結晶構造解析を行うことで OmcZ の立体構造決定を試みた。

3. 研究の方法

OmcZ_L の大量発現系とそれに続く精製を行うため、まずは C 末端に 6 個のヒスチジンを付加した OmcZ_L 全長を過剰発現させるための OmcZ_L 発現プラスミドを構築し、*G. sulfurreducens* *ozpA* 破壊株を形質転換することで、OmcZ_L 過剰発現株を作製した。OmcZ_L 過剰発現株を大量培養し、菌体を凍結融解法により破碎した。遠心分離後、上清について HisTrap カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製 OmcZ_L を精製した。精製した OmcZ_L について、シットィングドロップ法により 1,152 条件の結晶化条件を試みた。良好な結晶の形成が確認されていた 8 条件については、ハンギングドロップ法によって塩濃度、沈殿剤濃度、pH が異なる条件試験した。さらにそれらのうち、良好な結晶が得られた条件において、クライオ条件を検討し、良好な結晶については、放射光施設にて、

反射データの収集を試みた。

4. 研究成果

スクリーニングにより明らかになった結晶化条件において、複数の条件で良好な結晶を得ることに成功した(図)。

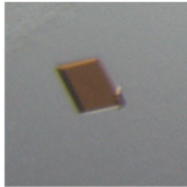


図. OmcZ_Lの結晶

得られた結晶について、X線回折データの収集を試みたところ、最も高いもので2.2の反射データを得ることに成功した。また、別の条件では、空間群の異なる結晶も得られた。構造決定に必要な位相データを得るため、高い分解能の反射データが得られた結晶化条件と同様の条件で得た結晶について、Pt、Hg、Au、Pbの4種類の重原子を用いてこれらを含むクライオ溶液に結晶を浸し、結晶の重原子置換体を作製した。大型放射光施設にて、得られた結晶から位相決定のためのデータを収集した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ayako kai, Takahiro Tokuiishi, Takashi Fujikawa, Yoshihiro Kawano, Toshiyuki Ueki, Miyuki Nagamine, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, Kengo Inoue	4. 巻 87
2. 論文標題 Proteolytic Maturation of the Outer Membrane c-Type Cytochrome OmcZ by a Subtilisin-Like Serine Protease Is Essential for Optimal Current Production by Geobacter sulfurreducens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02617-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.02617-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 啓 (Wada Kei) (80379304)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------