

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20750137

研究課題名 (和文) 4次元可視化解析法による酵素蛋白質動的反応メカニズムの同定

研究課題名 (英文) Identification of protein dynamics for enzymatic reaction using four-dimensional visualizing analysis

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：

本研究の目的は、「酵素蛋白質における緻密で巧みな触媒・制御機構」を動的 X 線結晶構造解析の技法を用いて、電子密度で確認 (可視化) することである。本研究では、銅含有亜硝酸還元酵素の単結晶 (回折分解能 1.3Å程) に放射光由来の高輝度 X 線を照射することで酵素蛋白質内部に存在する銅結合部位を還元させ、その間に起きた微細な構造変化を X 線結晶構造解析により捉えることに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

The objective for this research project is to establish the methods for visualizing the protein dynamics on enzymatic reaction mechanism. In this case, we selected a crystal for copper-containing nitrite reductase as a test case, and collected the diffraction data during high-brilliant x-ray induced reduction. As a result, we have succeeded in observation of some unambiguous structural changes at the copper binding sites in the difference fourier electron density maps.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：X線結晶構造解析、酵素反応機構、時間分解

1. 研究開始当初の背景

従来の酵素蛋白質の研究では、まず酵素と基質を混ぜて、その触媒反応後の生成物量 (あるいは基質濃度の減少) を測定することでその活性を評価し、そして酵素蛋白質の静的な X 線結晶構造情報から動的な触媒反応メカニズムについて想像 (考察) するという

ものであった。そこで、本研究ではさらにもう一步踏み込んだ、「生体内における緻密で巧みな触媒・制御機構」を動的 X 線結晶構造解析の技法を用いて、電子密度で確認 (可視化) することを計画した。これは、本来、蛋白質というものが「生体内においてリジット (剛的) な静止したものではなく、どちらかというときかんに動きまわり、ある程度の

構造変化も起こす動的（ダイナミック）な物質である」ため、様々な反応過程における“蛋白質の動き”や“原子間結合・解離”を実際の反応進行中に電子密度でモニター（観察）するという本研究における着眼点は、“現代科学”における画期的な試みとされる。

2. 研究の目的

酵素蛋白質結晶から得られた X 線回折データを用いて計算された差フーリエ電子密度では、各原子間の距離が詳細に求まるため、酵素蛋白質結晶中で反応を進行させながら回折データ収集をすると、“基質分子やアミノ酸側鎖の傾き角度や距離の変化”、“新たな共有結合の出現または結合の解離”を経時的に電子密度で確認することが出来、“反応前にははっきりと見えていた電子密度が反応進行（時間経過）とともに徐々に消失していく”様子や、“反応前には電子密度の無い領域に徐々に電子密度が出現してくる”様子等も確認できると考えられる。これは、今まで全くと言っていいほどブラックボックスであった「酵素の触媒機構」というものが、電子密度の変化で捉えられることを意味し、一般民間人にも分かりやすい視覚でうたえられる「酵素触媒機構における動的挙動」の同定を本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

標的酵素蛋白質としては“銅含有亜硝酸還元酵素”（図 1）の結晶を用い、それに基質である亜硝酸イオン（ NO_2^- ）をソーキングし

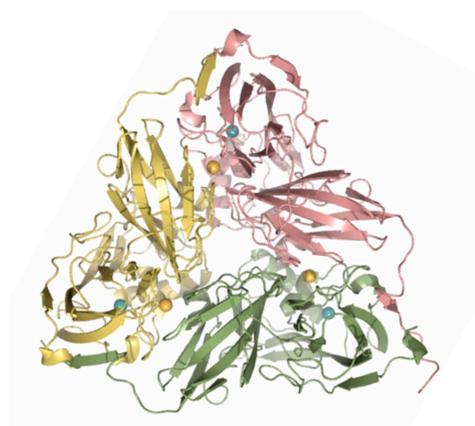


図 1：銅含有亜硝酸還元酵素

（分子量約 35-kDa のサブユニット 3 つからなるホモ三量体構造をとる。図中、黄色、緑、ピンクで色分けしている）

たものを X 線回折実験に使用した。測定は大型放射光施設 SPring-8 の大阪大学蛋白質研究所専用ビームライン・生体超分子構造解析ビームライン BL44XU で行った。

温度 100K で 360 度分回折データ（振動角 1 度）を収集し、30~90 枚で 1 データセットとして合計 28 組の時系列データセットとした。位相は分子置換法により決定した。

4. 研究成果

各データセット間での差フーリエ電子密度（ $\text{Fo}-\text{Fo}$ ）を調べたところ、銅原子結合部位に明確な位置のずれを確認できた（図 2）。

またそれに伴い、基質である亜硝酸イオンの 1 つの酸素原子にネガティブの電子密度

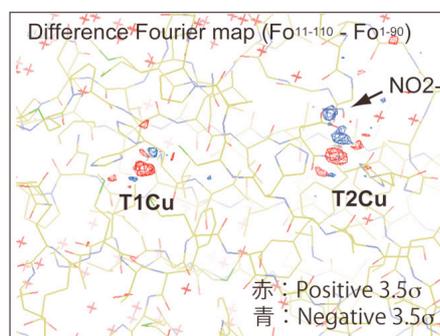


図 2：データセット間での差フーリエ電子密度マップ

が確認できた。これらは、X 線照射によって銅原子の II 価から I 価への還元反応が起こり、基質である亜硝酸イオンも還元され生成物である一酸化窒素（NO）になったことを強く示唆させる結果であった。本研究課題を遂行したことにより、従来まで本酵素における酸化還元に伴う構造変化について未解明であった部分が解消され、特に銅結合部位において微細ではあるが明確に構造が変化することを実験データから証明する事に成功した。酵素蛋白質分子の動的な挙動を原子レベルで解析するにあたり、本研究は基礎的な方法論の開発に役立つものとして位置づけられ、本研究成果を土台にさらに今後、発展していくことが期待される。

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）全て査読あり

- 1) 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., **F**, in press, ページ「未定」(2011).
 - 2) Isoda, N., Yokoyama, H., **Nojiri, M.**, Suzuki, S., Yamaguchi, K. Electroreduction of nitrite to nitrogen oxide by a copper-containing nitrite reductase model complex incorporated into collagen film. Bioelectrochemistry, **77**, 82 (2010).
 - 3) **Nojiri, M.**, Koteishi, H., Nakagami, T., Kobayashi, K., Inoue, T., Yamaguchi, K., Suzuki, S. Structural basis of inter-protein electron transfer for nitrite reduction in denitrification. Nature, **462**, 117 (2009).
 - 4) Koteishi, H., **Nojiri, M.**, Nakagami, T., Yamaguchi, K., Suzuki, S. Cytochrome c551 is a mediator of electron transfer between copper-containing nitrite reductase and azurin in a denitrifying bacterium, *Achromobacter xylosoxidans*. Bull. Chem. Soc. Jpn., **82**, 1003 (2009).
 - 5) **Nojiri, M.**, Shirota, F., Hira, D., Suzuki, S. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the soluble domain of PPA0092, a putative nitrite reductase from *Propionibacterium acnes*. Acta Cryst., **F65**, 123 (2009).
 - 6) Hira, D., **Nojiri, M.**, Suzuki, S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a complex between the electron-transfer partners hexameric Cu-containing nitrite reductase and pseudoazurin. Acta Cryst., **F65**, 116 (2009).
 - 7) Hira, D., **Nojiri, M.**, Suzuki, S. Atomic resolution structure of pseudoazurin from the methylotrophic denitrifying bacterium *Hyphomicrobium denitrificans*: structural insights into its spectroscopic properties. Acta Cryst., **D65**, 85 (2009).
 - 8) Isoda, N., Torii, Y., Okada, T., Misoo, M., Yokoyama, H., Ikeda, N., **Nojiri, M.**, Suzuki, S., Yamaguchi, K. The first example of photochemical reduction of nitrite into nitrogen monoxide by a dinuclear Ru(II)-Cu(II) complex and photoinduced intramolecular electron transfer reaction between Ru(II) and Cu(II) moieties. Dalton Trans., **46**, 10175 (2009).
 - 9) Migita, Y., Yokoyama, H., Minami, A., Mori, T., **Nojiri, M.**, Suzuki, S., Yamaguchi, K. Electrocatalytic nitrite reduction to nitrogen oxide by a synthetic analogue of the active site of Cu-containing nitrite reductase incorporated in nafion film. Electroanalysis, **21**, 2441 (2009).
 - 10) Suzuki, S., Maetani, T., **Nojiri, M.**, Yamaguchi, K., Kobayashi, K., Tagawa, S. Pulse radiolysis of hexameric nitrite reductase containing the type 1 Cu sites in a monomer. Bull. Chem. Soc. Jpn., **81**, 1525 (2008).
- [学会発表] (計9件)
- 1) **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研究. 第64回講演会(酵素工学研究会). 11月19日. 東京大学(2010). (招待講演)
 - 2) **野尻正樹**. 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における分子認識と反応制御機構の構造基盤. 第10回日本蛋白質科学会年会. 6月16日. 札幌コンベンションセンター(2010). (招待講演)
 - 3) **野尻正樹**, 稲川香, 小手石泰康, 鈴木晋一郎. 銅型亜硝酸還元酵素へのX線照射効果における結晶学的研究. 日本結晶学会2009年度年会. 12月5日. 関西学院大学(2009).
 - 4) **野尻正樹**, 小手石泰康, 津田愛子, 鈴木晋一郎. 電子伝達パートナー蛋白質同士の過渡的複合体と融合蛋白質の構造的特性化. 特定領域研究「生体超分子構造」第6回公開シンポジウム. 12月1日. 千里ライフサイエンスセンター(大阪府)(2009).
 - 5) **Nojiri, M.** Structural and Mechanistic insights into the Electron Transfer Reaction of a Copper-containing Nitrite Reductase. The 2nd International Symposium on Bioinorganic Chemistry of

the New Era, July 31th, Hida-Takayama Convention Bureau, Japan (2009). (招待講演)

6) **野尻正樹**, 銅型亜硝酸還元酵素における分子間電子伝達機構の構造基盤. 第36回生体分子科学討論会. 6月19日. 北海道大学(2009).

7) **野尻正樹**, 平大輔, 小手石泰康, 池渕紗織, 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. 5月20日. 熊本全日空ホテルニュースカイ (2009).

8) **Nojiri, M.**, Koteishi, H., Tsuda, A., Yamaguchi, K., Suzuki, S. Inter- and intra-molecular complex structures of Cu-containing nitrite reductase with cytochrome *c*. XXI IUCr Congress, August 23th, Grad Cube Osaka, Japan (2008).

9) **野尻正樹**, 小手石泰康, 津田愛子, 山口和也, 鈴木晋一郎. 銅型亜硝酸還元酵素とチトクロム *c* 間の電子伝達反応における両分子間と分子内複合体の結晶構造. 第8回日本蛋白質科学会年会. 6月10日. タワーホール船堀 (東京) (2008).

[その他]

「複合体の構造解明」、日経産業新聞 (2009年11月5日 朝刊 12面「先端技術」欄)

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・助教

研究者番号: 20333346