

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510237

研究課題名（和文）古細菌におけるチオレドキシシン系抗酸化システムの解明

研究課題名（英文） Studies on archaeal antioxidation system involving thioredoxin proteins

研究代表者

中村 努 (NAKAMURA TSUTOMU)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：10357668

研究成果の概要（和文）：生命の抗酸化機構の進化をタンパク質科学の面から追究するため、古細菌のペルオキシレドキシシン(Prx)および関連タンパク質の構造解析を行い、その特徴を明らかにした。特に、Prx と基質である過酸化水素との複合体の構造解析により、反応初期と遷移状態について議論した。また、古細菌のスーパーオキシドディスムターゼの構造解析により、その金属イオン選択性を議論した。タンパク質反応を水素原子が関与した形で明らかにするためには中性子回折データを得ることが必要である。そのためのタンパク質大型結晶の作製法を開発した。

研究成果の概要（英文）： In order to elucidate the evolution process of antioxidation system in life from the viewpoint of protein science, we structurally characterized archaeal peroxiredoxin (Prx) and related antioxidant proteins. Especially, structure determination of the complex of Prx and its substrate, hydrogen peroxide, enabled discussion on the very early stage and the transition state of the Prx reaction. Furthermore, we determined the 3D structure of an archaeal cambialistic superoxide dismutase, which revealed the relationship between metal selectivity and the local 3D structure of the enzyme. Elucidation of protein reaction mechanism involving hydrogen atoms needs collection of neutron diffraction data of the protein. We developed methods for obtaining large protein crystals for the purpose of the neutron diffraction study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構、活性酸素、抗酸化システム、反応中間体

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、我々は、好気性超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来の抗酸化タン

パク質ペルオキシレドキシシン(Prx)が過酸化水素によって酸化される際、超原子価構造をとることを明らかにしたところであった。

2. 研究の目的

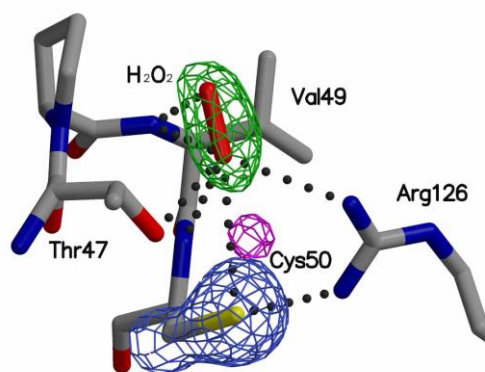
本研究の目的は、上記 *A. pernix* Prx など古細菌における抗酸化タンパク質の構造機能およびその特徴を明らかにして、それらのタンパク質科学的な知見から、生命の抗酸化システムの進化過程を理解することである。

3. 研究の方法

上記 *A. pernix* Prx および関連抗酸化タンパク質の反応機構を水素が関与した形で理解するために、中性子回折を目指した。そのために、大型結晶の作製に取り組んだ。また、*A. pernix* 由来の他の抗酸化タンパク質であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の立体構造から、その特徴を明らかにした。

4. 研究成果

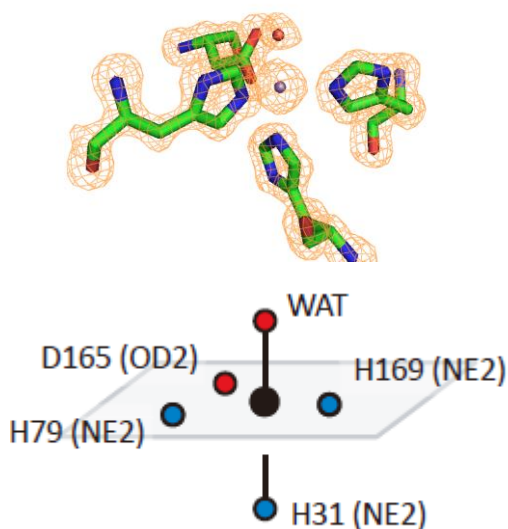
(1) *A. pernix* Prx と基質複合体の構造解析
A. pernix Prx の結晶を過酸化水素を含む溶液にソーキングすることで、酸化反応中間体の立体構造が得られ、その結果は本研究開始前に発表した。そのソーキングの時間をコントロールすることにより、活性中心のシステイン側鎖近傍に過酸化水素が結合した立体構造を得ることができた(下図)。それまで Prx に対する過酸化水素の結合は、結合したカルボン酸の2つの酸素の座標から類推せざるを得なかったが、本研究により初めて直接的な構造情報が得られた。また、下図の紫の電子密度に着目して構造精密化を進めることにより、チオール基が過酸化水素のひとつの酸素原子を攻撃する反応の遷移状態が議論することが可能になった。



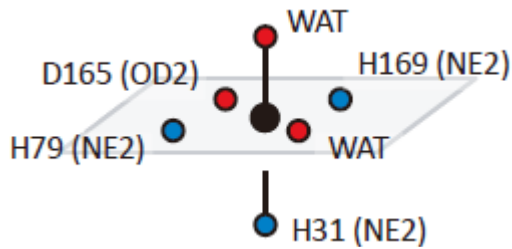
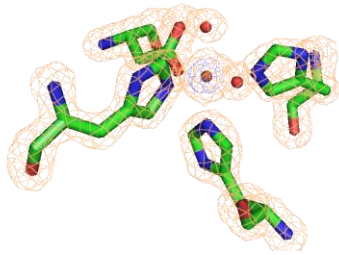
(2) *A. pernix* SOD の構造解析

SOD はスーパーオキシドを過酸化水素と酸素に不均化する反応を触媒する酵素であり、反応性の高い活性酸素であるスーパーオキシドを除去する。それにより生成する過酸化水素は、カタラーゼまたは上記の Prx を含むペルオキシダーゼによって除去される。SOD の反応サイクルは金属イオンの酸化還元プ

ロセスが関与し、その金属イオンの種類により SOD は Mn-SOD, Fe-SOD, Cu,Zn-SOD, Ni-SOD に分類される。Mn-SOD と Fe-SOD は配列・構造の相同性が高いが、それ以外の SOD は同じ反応を触媒するにもかかわらず配列・構造は相同ではない。Mn-SOD と Fe-SOD は相同性が高いものの、金属選択性があり、互いに別の金属を結合することはできても、その場合には触媒活性はない。ところが、*cambialistic* SOD と呼ばれるグループの SOD は、Mn, Fe の両方の金属を補因子として触媒活性を有する。*A. pernix* SOD は *cambialistic* SOD の一種である。本研究では、*A. pernix* SOD の立体構造を、アボ型、Mn 結合型、Fe 結合型で明らかにした。Mn 結合型において、金属原子はタンパク質側鎖由来の4原子に加え、水分子(酸素)を配位していた。この配位構造は *trigonal bipyramidal* 構造に近似することができた。一方で Fe 結合型では、同様のタンパク質側鎖4原子と水に加え、さらに1分子の水(酸素)を配位しており、その配位構造は *distorted octahedral* 構造であった。これまでの阻害剤を用いた研究の蓄積から、この6配位構造は、SOD にスーパーオキシドが結合に近似できることが示唆された。*A. pernix* SOD は Mn 結合型よりも Fe 結合型のほうが約20倍活性が低い。この活性の違いは、金属原子の赤道方向に配位した水による影響であることが示唆された。



Mn 結合型 *A. pernix* SOD の活性中心の構造

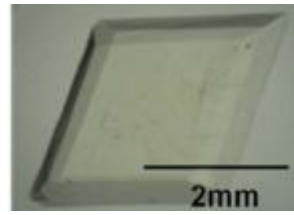


Fe 結合型 *A. pernix* SOD の活性中心の構造

(3) 大型結晶の作製

タンパク質の反応機構を詳細に解明するためには水素原子の座標を含んだ構造情報が必要である。特に上記の Prx や SOD で基質・生成物となる過酸化水素は、水素の位置情報がなければ酸素 2 個が連なるだけの構造になり、それでは酸素やスーパーオキシドとの区別がつかない。また、金属の配位水を問題とするときには当然水分子の向きが問題になるが、水素原子を考慮に入れなければ水分子は酸素原子 1 つと同じことになり、向きの情報は何も得られない。X 線結晶解析による構造解析では、よほど例外的に高分解能データが得られない限りは水素原子の構造情報は得られない。それを補う手法が中性子線結晶構造解析である。ただし、中性子回折データを得るためには、X 線結晶解析に比べて各次元方面の大きさが 10 倍以上 (体積で 1000 倍以上) の大型結晶が必要である。

そのために、本研究では *A. pernix* Prx と *A. pernix* SOD の大型結晶の作製法を開発した。*A. pernix* Prx では、結晶化に用いるドロップを大きくして不要な微小結晶を除去する方法 (large-scale hanging-drop method) を開発し、大型結晶 (2.5 mm x 2.5 mm x 1.0 mm) を得ることができた。*A. pernix* SOD では、シリンジの先に種結晶を接着し、その方向を制御した上で結晶を成長させる方法 (syringe-type top-seeded solution growth) を開発し、大型結晶を得た。



A. pernix Prx の大型結晶

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 7 件)

① Hiroyoshi Matsumura, Keisuke Kakiniuchi, Tsutomu Nakamura, Shigeru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, and Yusuke Mori

"Growth of protein crystals by syringe-type top-seeded solution growth"

Cryst. Growth Des. 11, 1486-1492 (2011)

DOI: 10.1021/cg101361n

② Tsutomu Nakamura, Kasumi Torikai, Koichi Uegaki, Junji Morita, Kodai Machida, Atsushi Suzuki, Yasushi Kawata "Crystal structure of the cambialistic superoxide dismutase from *Aeropyrum pernix* K1: insights into enzyme mechanism and stability" FEBS J. 278, 598-609 (2011)

DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07977.x

③ Keisuke Kakinouchi, Tsutomu Nakamura, Taro Tamada, Hiroaki Adachi, Shigeru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Yoshinori Takahashi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Ryota Kuroki, Yusuke Mori and Hiroyoshi Matsumura

"Growth of large protein crystals by a large-scale hanging-drop method"

J. Appl. Cryst. 43, 937-939 (2010)

DOI: 10.1107/S0021889810015967

④ Tsutomu Nakamura, Yuji Kado, Takafumi Yamaguchi, Hiroyoshi Matsumura, Kazuhiko Ishikawa and Tsuyoshi Inoue

"Crystal structure of peroxiredoxin from *Aeropyrum pernix* K1 complexed with its substrate, hydrogen peroxide"

J. Biochem. 147, 109-115 (2010)

DOI: 10.1093/jb/mvp154

〔学会発表〕（計 15 件）

① Tsutomu Nakamura, Kasumi Torikai,
Junji Morita, Yasushi Kawata, and Koichi
Uegaki

“Crystal Structure of Archaeal
Cambialistic Superoxide Dismutase”
XXII Congress and General Assembly of the
International Union of Crystallography,
Madrid、2011/08/27

② 中村 努、鳥養香澄、上垣 浩一、森田潤司
「*Aeropyrum pernix* K1由来スーパーオキシ
ドディスムターゼの立体構造解析」
第10回日本蛋白質科学会年会、札幌、
2010/06/17

③ 中村 努、門 祐示、松村 浩由、井上 豪
「古細菌ペルオキシレドキシソと過酸化水素
複合体の立体構造」
第9回日本蛋白質科学会年会、熊本、
2009/05/20

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 努 (NAKAMURA TSUTOMU)
産業技術総合研究所・健康工学研究部門・
主任研究員
研究者番号：1 0 3 5 7 6 6 8

(2)連携研究者

井上 豪 (INOUE TSUYOSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：2 0 2 6 3 2 0 4

松村 浩由 (MATSUMURA
HIROYOSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：3 0 3 2 4 8 0 9

玉田 太郎 (TAMADA TARO)
日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用
研究部門・研究主幹
研究者番号：5 0 3 9 1 2 4 8