

Hyphomicrobium denitrificans 由来亜硝酸還元酵素の構造 とチトクロム c 間の電子伝達

野尻正樹 1、謝勇 2、井上豪 2、山口和也 1、甲斐泰 2、鈴木晋一郎 1

1 大阪大学 院理、2 大阪大学 院工

nojiri@ch.wani.osaka-u.ac.jp

【序論】自然界における窒素の循環に重要な役割を担う脱窒菌は、 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ の還元過程（脱窒）によって ATP を獲得している。これらのうち、 NO_2^- を NO に還元する亜硝酸還元酵素（NIR）は、脱窒過程の key enzyme である。NIR には、1 サブユニットあたり「電子供与タンパク質から電子を受け取るタイプ 1 銅」と「基質の NO_2^- を還元するタイプ 2 銅」を 1 つずつ含んだ“銅型 NIR”とヘム鉄を含んだ“鉄型 NIR”の存在が知られており、“銅型 NIR”は 3 つの同一サブユニットからなる三量体構造をとっている。

最近、我々は従来報告されている銅型 NIR と分光学的性質が異なる NIR (HdNIR) の単離・精製に成功している。本酵素は、メタノールを唯一の炭素源として嫌気下で生育するメチロトロフ(C1 資化性脱窒菌) *Hyphomicrobium denitrificans* に存在し、サブユニットあたりタイプ 1 銅を 2 個、タイプ 2 銅を 1 個含んでいる点で従来の銅型 NIR と異なる。HdNIR の構造遺伝子のクローニングと本酵素のプロテアーゼによる限定分解により、その N 末端側にはブルー銅タンパク質のプラストシアニンと相同性のあるドメインが存在しタイプ 1 銅を 1 個含んでいた。一方、C 末端側には既知の銅型 NIR と相同性のあるドメインが存在しタイプ 1 銅とタイプ 2 銅が 1 つずつ含まれていた。つまり HdNIR は、従来の銅型 NIR に電子伝達機能を持つ銅タンパクであるプラストシアニンが余分に結合した構造をとっていることが示唆された (図 1)。

そこで、本研究では X 線結晶構造解析から本酵素の立体構造を解明し、N 末端領域がどういった配向で相互作用しているのか？、そして本酵素の生理的電子供与体であるチトクロム c との電子伝達メカニズムについて考察することを目的とした。

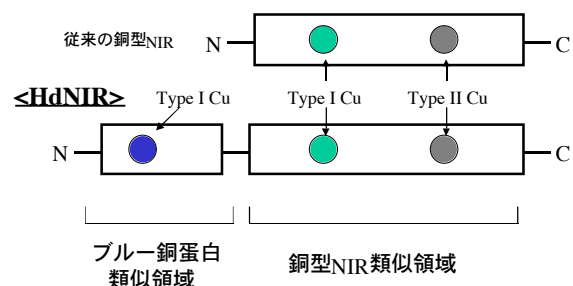


図 1、HdNIR の模式図

【結果と考察】HdNIRの結晶は、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて16% PEG4000を沈殿剤として、pH7.0の条件で再現性よく得られた。本結晶のX線回折実験をSPring-8 BL44XUにて行ったところ、分解能2.2Åまでの反射データを得ることに成功した(空間群 $P4_1$)。既知の銅型NIRの構造(PDB ID: 1nif)をSearch Modelとし分子置換法により初期位相を求めたところ、非対称単位中にHdNIR分子が6個存在することが明かとなった。さらに構造精密化を進め、最終的にR=16%、Rfree=18%となったところでrefinementを終了とした。

図2に非対称単位中に存在するHdNIRの六量体構造とその単量体サブユニット構造を示す。その構造に見られるように、本酵素のN末端領域の構造は典型的なブルー銅蛋白質に見られる β -barrel構造をとっており、その“northern”部位にタイプ1銅が存在していた。また、C末端領域は既知のNIR(1nif)と高い相同性(rmsd 1.7Å)を示し、タイプ1銅ならびにタイプ2銅部位も既知の銅型NIRとほぼ似た場所に存在していた。さらに非常に興味深いことに、それらサブユニットから突出したN末端領域間で上下に相互作用することにより六量体構造を形成していた(図2)。

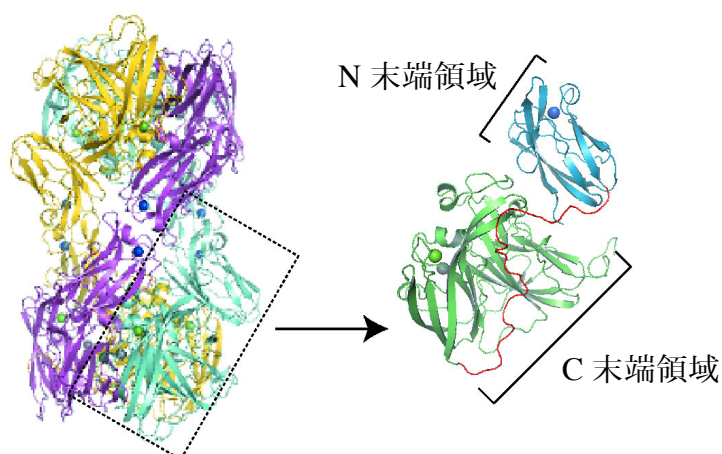


図2、HdNIRの結晶構造(左:六量体構造、右:単量体サブユニット構造)

現在、本酵素の立体構造モデルから、電子供与体であるチトクロムcとの相互作用部位、ならびに電子移動反応について検討中である。

参考文献

Yamaguchi, K. et al. Characterization of two type 1 Cu sites of *Hyphomicrobium denitrificans* nitrite reductase: a new class of copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry* **43**, 14180-14188 (2004).