Osaka University Knowledge Archive

Title	Structure and function of copper-containing nitrite reductases from thermophilic denitrifiers
Author(s)	福田, 庸太
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34468
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　福田　庸太　）	
論文題名	Structure and function of copper-containing nitrite reductases from thermophilic denitrifiers (好熱性脱窒菌由来銅含有亜硝酸還元酵素の構造と機能)

論文内容の要旨

窒素酸化物は脱窒菌と呼ばれる微生物によって段階的に還元され，分子状窒素として大気中へ放出される(脱窒)。*Gebacillus*属に分類される多くの種は高温環境下(40-70℃)で生育し，いくつかの種では脱窒を行うことが知られている。好熱菌の脱窒過程は環境的，工業的観点から重要視されているにも関わらず，その研究，特に各段階を触媒する酵素の原子レベルでの研究はほとんど行われてこなかった。本研究では*Geobacillus*属由来の脱窒過程に関わる酵素，なかでも亜硝酸イオンを気体である一酸化窒素へと還元するキーステップを触媒する酵素，銅含有亜硝酸還元酵素(CuNIR)に着目し，その構造機能相関を明らかにした。

第1章では，*Geobacillus*属由来のCuNIR(*Geo*NIR)の精密な原子分解能構造を決定し，他のCuNIRとの構造比較を行った。特にN末端付近に存在するヘリックス構造が生理的電子供与体との電子移動反応に大きく寄与していることを明らかにした。第2章では，基質である亜硝酸(NO_2^-)との複合体構造を決定し，NO_2^-が既知のCuNIRとは異なる，単座様式で銅イオンに配位することを見出した。第3章では高温高分解能結晶構造解析という新規に開発した手法を用いて，生理的環境に近い高温状態下での*Geo*NIRの構造を決定し，NO_2^-が低温での構造とは異なる様式で配位することを明らかにした。耐熱性酵素の基質複合体構造が低温と高温では異なることを，X線結晶構造解析を用いて明らかにした例はこれまでになく，本手法は他の耐熱性酵素にも応用すべき有用な解析法だと考えられる。第4章ではまず*Geo*NIRと酸素分子種の複合体構造の高分解能解析を行った。30年以上前からCuNIRが酸素を過酸化水素へと還元することは知られていたが，その構造基盤は不明であった。さらに，*Geo*NIRの触媒部位の配位残基に変異を入れ，ペプチジルグリシンα-ヒドロキシレイティングモノオキシゲナーゼ(PHM)のCu_Mサイトを模した銅中心を構築し，その性質を調べた。PHMはCu_Mサイトで酸素を用いてペプチドC末端のCH結合を活性化し，水素の引き抜きを触媒する酵素であり，神経伝達物質の生合成に関わる重要な酵素である。本研究において耐熱性タンパク質中にCu_Mサイトを構築したことで新たな人工酵素作製のための構造基盤を得たと言える。また，CuNIR中に構築された銅サイトは高分解能での構造解析が可能であり，未だ不明なPHMの反応機構の理解にも適用できるだろう。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　福田　庸太　）			
論文審査担当者		(職)	氏　名
	主 査	教授	井上　豪
	副 査	教授	林　高史
	副 査	教授	古澤　孝弘
	副 査	教授	桑畑　進
	副 査	教授	南方　聖司
	副 査	教授	今中　信人
	副 査	教授	宇山　浩
	副 査	教授	平尾　俊一
	副 査	教授	町田　憲一
	副 査	教授	安藤　陽一

論文審査の結果の要旨

本論文は、好熱菌 *Geobacillus* 属由来の銅含有亜硝酸還元酵素 (CuNIR) に関する構造生物学的研究の成果をまとめたものである。主な結果を要約すると以下の通りである。

第 1 章では，*Geobacillus* 属由来の CuNIR (*Geo*NIR) の精密な原子分解能構造を決定し，他の CuNIR との構造比較を行っている。とりわけ N 末端付近に存在する，*Geo*NIR に特徴的な α ヘリックス構造が，生理的電子供与体であるシトクロム c_{551} とのタンパク質間電子移動反応に大きく寄与していることを明らかにしている。

第 2 章では，タンパク質内電子移動反応を抑制するための変異を導入した変異型 *Geo*NIR を用いて，基質である亜硝酸イオン (NO_2^-) と *Geo*NIR の完全な複合体結晶構造を決定し，NO_2^- が既知の CuNIR 中における二座配座様式とは異なり，単座様式で銅イオンに配位することを見出している。

第 3 章では高温高分解能結晶構造解析という新規に開発した手法を用いて，生理的環境に近い高温状態下での *Geo*NIR の構造を決定し，NO_2^- が低温での構造とは異なる様式で配位することを明らかにしている。耐熱性酵素の基質複合体構造が低温と高温では異なることを，X 線結晶構造解析を用いて明らかにした例はこれまでになく，本手法は他の耐熱性酵素にも応用すべき有用な解析法だと言える。

第 4 章では，長らく不明であった「CuNIR が酸素を過酸化水素へと還元する際の構造基盤」を，*Geo*NIR と酸素分子種の複合体構造の高分解能解析を行うことによって考察している。さらに本章では，*Geo*NIR の触媒部位の配位残基に変異を入れ，ペプチジルグリシン α-ヒドロキシレイティングモノオキシゲナーゼ (PHM) の活性中心（Cu_M サイト）を模した銅中心を構築し，その性質を調べている。PHM は Cu_M サイトで酸素を用いてペプチド C 末端の CH 結合を活性化し，水素の引き抜きを触媒する酵素であり，神経伝達物質の生合成に関わる重要な酵素である。本論文では耐熱性タンパク質中に Cu_M サイトを構築し，その構造を高分解能で明らかにしており，新たな人工酵素作製のための構造基盤を得たと言える。また，CuNIR 中に構築された銅サイトは高分解能での構造解析が容易であり，未だ不明な PHM の反応機構の理解にも応用できると期待される。

以上のように、本論文は好熱菌由来の銅含有亜硝酸還元酵素の構造と機能の相関を，本研究において新しく開発された手法を含む多様な X 線結晶構造解析技術で高精度に明らかにするとともに，新規な銅含有人工酵素開発へ向けた重要な構造生物化学的知見を与えている。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。