

Title	Studies on Structure and Function of Pseudoazurin from a Methylophilic Denitrifying Bacterium
Author(s)	平, 大輔
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49717
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	ひら 平 だい 大 すけ 輔
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 6 7 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科化学専攻
学 位 論 文 名	Studies on Structure and Function of Pseudoazurin from a Methylo trophic Denitrifying Bacterium (C1 資化性脱窒菌由来のシュードアズリンの構造と機能に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鈴木晋一郎 (副査) 教 授 水谷 泰久 教 授 中村 春木 工学研究科教授 井上 豪

論 文 内 容 の 要 旨

Hyphomicrobium denitrificans はメタノールを唯一の炭素源として生育する性質「C1 資化性」と、硝酸イオン (NO_3^-) を最終的に窒素分子 (N_2) にまで還元する「脱窒 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)」の 2 つの性質を併せ持つ細菌である。本菌体内には、メタノール脱水素酵素 (MDH) から始まる電子伝達系が存在し、学位申請者のこれまでの研究により、“メタノールの脱水素反応 ($\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{HCHO} + 2\text{H}^+ + 2e^-$)”により生じた電子は、MDH の生理的電子受容体タンパク質シトクロム c_L (Cyt c_L) へと渡り、続いてもう 1 つの電子伝達タンパク質であるシトクロム c_{550} (Cyt c_{550}) へと伝達されることがわかっている。さらに Cyt c_{550} は脱窒に関わる亜硝酸還元酵素 (HdNIR) の生理的電子供与体としての性質を持ち、NIR は伝達されてきた電子を用いて亜硝酸イオンの 1 電子還元反応 ($\text{NO}_2^- + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$) を触媒する。このように本菌体内には、「メタノール脱水素から脱窒へ流れる電子伝達鎖」が存在することが示唆されている。これらの研究過程において、本菌株から新たにブルー銅タンパク質の一種であるシュードアズリン (PAz、本菌体由来のものを HdPAz と略記する。)が発見され、その単離精製に成功した。そこで本論文では、上記電子伝達系における HdPAz の機能を解明するために、まず HdPAz の遺伝子のクローニング、X 線結晶構造解析により HdPAz の立体構造を明らかにし、既知の電子伝達タンパク質との電子移動反応を観測することで、その機能を検討した。

HdPAz 遺伝子のクローニングと X 線結晶構造解析より、立体構造は PAz 特有の β バレル構造からなり、ブルー銅を 1 個含有していた。HdPAz と既知の電子伝達系タンパク質との間の電子移動反応の解析により、HdPAz は MDH から電子を受容することは出来ないが、Cyt c_L から電子を受容し還元されることが、さらに HdNIR への電子供与体として働くことが明らかとなった。すなわち、電子伝達系において Cyt c_{550} と同等の役割をしている。これにより、「メタノール脱水素から脱窒へ流れる電子伝達鎖

電子伝達系」には少なくとも 2 通りのルートがあることが明らかとなった。

さらに HdPAz と HdNIR の電子移動反応に関する知見を深めるため、両タンパク質の複合体の X 線結晶構造解析を行った。得られた複合体構造では、両タンパク質の活性中心間距離が非常に長く、両タンパク質間に比較的弱い相互作用が形成されていた。この複合体構造より、両タンパク質間電子伝達機構について考察した。

最後に、HdPAz の大腸菌発現系を構築し、これを用いて、その部位特異的変異体の作製と X 線結晶構造解析により、ブルー銅タンパク質の銅中心でよく保存されている水素結合の役割について検討した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

金属タンパク質であるシトクロム c やブルー銅タンパク質の機能は“電子伝達“であり、生体内で様々なタンパク質と分子間で電子伝達反応を行い、その電子は各種の酵素反応や代謝系に利用されている。一般的に、生体内における分子間電子伝達反応は特異的に進むことが知られており、そのため特異的な分子間相互作用が存在すると考えられている。

Hyphomicrobium denitrificans は、メタノールを唯一の炭素源として生育する性質「C1 資化性」と、「脱窒 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)」との性質を併せ持つ C1 資化性脱窒菌であり、「メタノール脱水素から脱窒へ流れる電子伝達鎖」が本菌体内に存在することが示唆されている。申請者は、本細菌が持つこれら金属タンパク質と電子伝達系に関する研究過程において、新たにブルー銅タンパク質の一種であるシュードアズリン (以下 PAz と略記し、本細菌由来の PAz を HdPAz と略記する。)を発見した。そこで本論文では、HdPAz の発見を起点として、X 線結晶構造解析により HdPAz の立体構造を解析し、本細菌がもつ既知の電子伝達タンパク質や酵素との電子移動反応を観測することで、その機能を検討した。これにより、新規な電子伝達経路の存在が明らかになり、「メタノール脱水素から脱窒へ流れる電子伝達鎖」には少なくとも 2 通りのルートがあることを解明した。また、HdPAz を用いてブルー銅タンパク質の銅中心でよく保存された水素結合を形成しているアミノ酸残基の部位特異的変異体を作製し、X 線結晶構造解析によって、この水素結合の構造・機能的役割を明らかにした。最後に、電子伝達機構に関する知見を得るための HdPAz とその電子受容体 (銅型亜硝酸還元酵素) との複合体の結晶化と、その X 線結晶構造解析に成功し、電子伝達タンパク質間の分子間相互作用について考察を行った。

本論文は、電子伝達系における PAz の構造・機能の解明に始まり、ブルー銅中心でよく保存されている水素結合の役割を明らかにし、さらに、PAz とその電子伝達パートナーとの複合体構造の初めての報告であり、電子伝達タンパク質の分子間相互作用に新たな重要な知見を加えるものである。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。