

Title	Studies on inter-protein electron transfer reaction between Cu-containing nitrite reductase and cytochrome c551
Author(s)	小手石, 泰康
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59461
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	小手石 泰 康
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 25204 号
学位授与年月日	平成24年3月22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 inter-protein electron transfer reaction between Cu-containing nitrite reductase and cytochrome ^c 551 (銅含有亜硝酸還元酵素とシトクロム ^c 551間におけるタンパク質間電子移動反応の研究)
論文審査委員	(主査) 教授 今野 巧 (副査) 教授 水谷 泰久 教授 藤原 敏道 准教授 山口 和也

論文内容の要旨

脱窒菌は、酸素の代わりに土壌や水中の硝酸イオン(NO_3^-)を分子状窒素(N_2)に還元することでエネルギーを得て生育する細菌で、地球上に広く存在する。この還元過程は「脱窒」と呼ばれ、地球上の窒素循環に必須の生物学的過程である。この過程は、4種類の酵素によって触媒される段階的な還元反応($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)により進行することがわかっているが、個々の反応については未だ不明な点も多い。亜硝酸イオン(NO_2^-)の一酸化窒素(NO)への一電子還元反応を触媒する亜硝酸還元酵素(NIR)は、脱窒関連酵素の中で最も研究が進んでいる酵素の1つであるが、その触媒反応中に電子供与タンパク質との間で起こる「タンパク質分子間電子移動反応」の分子機構については、現在もおおむね憶測が絶えず未解決なままである。そこで本研究では、研究材料に脱窒菌 *Achromobacter xylosoxidans*由来のNIR(*AxNIR*)を用い、高分解能X線結晶構造解析とストップフローキネティクスを主な解析手法として、その電子供与タンパク質との間で起こる分子間電子移動反応機構の解明に向けた構造的基盤を明らかにすることを目的とした。

最初に、*AxNIR*への電子供与タンパク質としてブルー銅タンパク質のアズリン(Az)とc型シトクロムのシトクロム_{c551}(Cyt _{c551})の2つが候補として挙げられていたため、ストップフロー法を用いた反応速度論的解析により、どちらのタンパク質が電子供与体として機能しているのかを明らかにする事にした。結果として、Azに比べCyt _{c551}が1,000倍以上効率よく*AxNIR*へ電子伝達することがわかった。さらにAzとCyt _{c551}の分子間電子移動についても検討し、Az→Cyt _{c551}→*AxNIR*という電子伝達鎖が最も効率よく電子を伝達できることを例証した。

次に、Cyt _{c551}と*AxNIR*の分子間電子移動反応機構における構造的基盤について原子レベルで解明するため、両タンパク質の複合体構造をX線結晶構造解析により、電子伝達複合体としてはこれまでに例を見ない高分解能(1.7 Å)で決定することに成功した。複合体構造において、Cyt _{c551}は*AxNIR*の電子受容部位であるタイプ1銅(T1Cu)近傍の分子表面を特異的に認識し、お互いの酸化還元中心(ヘムとT1Cu)の距離が10Å程の至近距離に位置することがわかった。また、電子が移動するべき両分子間の相互作用面では、中心を疎水性領域が占め、その周りを極性領域が取り囲む原子環境が形成されることがわかった。さらに、複合体形成に伴う微細な立体構造変化を、*AxNIR*ならびにCyt _{c551}の両分子構造において精度良く捉える事に成功し、お互いの酸化還元中心の電子状態が、複合体形成に伴って変化する

る可能性が強く示唆された。

複合体の立体構造情報に基づき、相互作用面中心の疎水性領域にあるAxNIR分子の疎水性アミノ酸残基Met135を、極性アミノ酸Serに変異させ、実際に電子移動反応に影響があるかどうかを検討した。その結果、電子移動反応の二次速度定数が約9分の1に低下した。さらにその複合体構造を解析したところ、境界面の疎水性領域に、複数の水分子が浸入した原子環境へ変化していることがわかり、さらに天然型の複合体と異なる立体構造変化を誘起していることが明らかになった。

以上の結果を総合的に評価・検討することで、AxNIRとCyt c₅₅₁分子間の電子移動反応では、過渡的な複合体状態における相互作用境界面の一定の原子配置が、分子間電子移動反応における重要な因子の1つであり、また、その不安定な分子間相互作用時に引き起こされる立体構造変化が、お互いの酸化還元中心の電子状態に影響を及ぼすことで、その後続く分子間電子移動反応をより効率よく進行させるという反応機構の存在が強く示唆された。本研究により、AxNIRとCyt c₅₅₁分子間の電子移動反応における高精度な構造的基盤を得ることに成功した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、脱窒菌 *Achromobacter xylosoxidans* 由来の銅含有亜硝酸還元酵素と、その電子供与タンパク質であるシトクロム c₅₅₁ との間のタンパク質分子間電子移動反応について、反応性と立体構造の相関についてまとめたものである。本研究は、(1) 亜硝酸還元酵素とシトクロム c₅₅₁ との分子間電子移動反応速度論解析、(2) 亜硝酸還元酵素とシトクロム c₅₅₁ との複合体の高分解能 X線結晶構造解析 (1.7 Å)、(3) 亜硝酸還元酵素の相互作用境界領域アミノ酸置換体の設計・作製および速度論解析・複合体構造解析の3部によって構成されている。本研究により、亜硝酸還元酵素とシトクロム c₅₅₁ との分子間電子移動反応では、過渡的な複合体状態の相互作用境界領域における原子配置が反応制御の重要な因子となっていることが見だしている。これらの成果は、生体エネルギー変換の根幹である蛋白質間電子移動反応の研究分野に対して基礎的かつ重要な知見を与えるものである。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。