

Title	高選択的ランタニド結合タンパク質の金属認識に関する分子機構解明
Author(s)	墨, 岳夫
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96393
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

氏名 (墨岳夫)

論文題名

Molecular mechanisms for metal recognition of the highly selective lanthanide-binding proteins
(高選択的ランタニド結合タンパク質の金属認識に関する分子機構解明)

論文内容の要旨

生体内において様々な金属、特に第一遷移金属が酵素の活性中心として広く利用され、重要な機能を担っていることはよく知られている。一方希土類金属に分類されるランタニド（以下Ln）は地球上では地殻に豊富に存在するものの、溶解性に乏しく単体で存在することは少ないため、生物は利用していないとこれまで考えられてきた。しかし、近年になってセリウムを持つ酵素が発見されるなど、生物とLnの関係についてにわかに研究されるようになってきた。そこで私は一見、生体内で利用され難いと思われる希土類金属に注目し、①希土類金属イオンがどのように生物に取り込まれ、②どのように利用されているかの2つの解明を目的としてこれまで研究を行ってきた。本研究では特に①に関わるLnの高選択性についての解明を目的とした

対象とする生物には、メタンを唯一の炭素源とするC1資化性脱窒菌である*Hyphomicrobium denitrificans* を用いた。この微生物は、当研究室で培養法が確立されているとともに、ゲノム解析によってLn含有タンパク質の構造遺伝子を複数持つことが示唆されている。

2章では、この*Hyphomicrobium denitrificans* がLnイオンを選択的に取り込み生育できるかを、培養条件中に各種Ln (=La, Ce, Pr, Nd, Sm, Ho) を加えることで調べた。その結果、La, Ce, Pr, Ndでは無事生育し、Ln含有メタノール脱水素酵素 (Ln-MDH) を単離精製することができた一方でSm, Hoを加えた際には、Ln-MDHはおろか微生物が生育できないことが分かった。C1資化性菌の生育にはMDHは不可欠のため、Sm, Hoイオンを取り込みや輸送の段階で上手く利用できなかったと考えられる。Lnイオンは主に3価で性質も似通っているが、元素番号が大きくなるに従って原子半径やイオン半径が小さくなるランタニド収縮という性質がある。今回、培養・精製に成功した4種類のランタニド元素は原子番号57~60であり、ランタニドの中では半径が大きいものであるため、*Hd*-Ln-MDHの適切な配位環境を形成するためにはランタニドの中でも半径が大きいものが必要があるといえる。さらにこれらのLn-MDHに対して活性測定を行うとともに、Ca²⁺-MDHという別のMDHのCaをLn等他の金属に置換することを試み、得られたEu²⁺の結晶構造をもとに議論を行った。

3章では*Hyphomicrobium denitrificans* の持つLanmodulin (LanM) を大腸菌を用いてクローニングし、単離精製法を確立した。このタンパク質はC1資化性菌のペリプラズム中に存在し、Lnイオンの輸送に関与していると考えられている。本タンパク質のX線結晶構造によると、このタンパク質は4つのEF-handモチーフ構造を持ち、3つのhandにおけるLnイオンとの解離定数KdがpMオーダーと、非常に高い親和性を示すことがわかっている。今回新たに得られたMBPタグ付きLanMの結晶構造にはLnイオンは入っておらず、apo体の構造であった。先行研究のCD測定の結果から、LanMはLnが結合するにつれて二次構造が形成されることが分かっており、構造を持たない（アンフォールドした）本来不安定な状態の極めて珍しい構造を得ることができた。

4章ではこのLanMを用いて、等温滴定カロリメトリー (ITC) と円二色性測定 (CD) を行った。これまでの先行研究では、LnとLanMの解離定数Kdが非常に小さいことからITC測定が行われてこなかった。今回これを克服し、LanMとLnの結合とLanMの構造変化に伴う熱変化が測定できたので報告する。さらに、限外ろ過フィルターを用いた実験からEF-handごとにLnや金属イオンとの結合に強弱があることが示唆された。さらに同じLn内でもフォールディングしやすさが異なるという結果が得られたのでこれを考察した。

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 (墨 岳 夫)

論文題名

Molecular mechanisms for metal recognition of the highly selective lanthanide-binding proteins
(高選択的ランタニド結合タンパク質の金属認識に関する分子機構解明)

論文内容の要旨

In vivo, it is well-known that various metals, particularly those from the first transition series, are extensively utilized as active centers in enzymes, playing crucial roles. On the other hand, lanthanides (hereafter referred to as Ln), categorized under rare earth metals, are abundant in the Earth's crust but are rarely found in a soluble, elemental form, leading to the previous assumption that they are not utilized by biological systems. However, recent discoveries of enzymes containing cerium have sparked interest in the relationship between biology and Ln. My research has focused on these seemingly biologically inaccessible rare earth metals, aiming to elucidate (1) how lanthanide ions are incorporated into biological systems, and (2) how they are utilized. This study particularly aimed to clarify the high selectivity of Ln related to point (1).

The organism used in this study was *Hyphomicrobium denitrificans*, a C1 compound-utilizing denitrifying bacterium that uses methane as its sole carbon source. This microorganism was chosen due to the established cultivation methods in our lab and genome analysis suggesting multiple structural genes for Ln-containing proteins.

In Chapter 2, the selective uptake and growth of *Hyphomicrobium denitrificans* in the presence of various Lns (La, Ce, Pr, Nd, Sm, Ho) were investigated under different cultivation conditions. It was found that the bacterium grew successfully and isolated lanthanide-containing methanol dehydrogenase (Ln-MDH) in the presence of La, Ce, Pr, and Nd. However, with Sm and Ho, neither Ln-MDH nor bacterial growth was observed, indicating an inability to efficiently utilize these ions. Given the essential role of MDH in C1 compound-utilizing bacteria, this suggests a problem in the uptake or transport stage with Sm and Ho ions. The phenomenon of lanthanide contraction, where atomic and ionic radii decrease with increasing atomic number, was considered, as the successful cultivation involved lanthanides with larger radii (atomic numbers 57-60). This implies the necessity of larger radius lanthanides for the appropriate coordination environment in Hd-Ln-MDH. Additionally, activity assays of these Ln-MDHs were conducted, and experiments to replace Ca in another MDH (Ca²⁺-MDH) with Ln and other metals were attempted. The crystal structure of Eu²⁺-MDH was analyzed for further discussion.

Chapter 3 focused on cloning and purifying Lanmodulin (LanM) from *Hyphomicrobium denitrificans* using *Escherichia coli*. This protein, found in the periplasm of C1 compound-utilizing bacteria, is believed to be involved in Ln ion transport. X-ray crystallography revealed that LanM has four EF-hand motifs, showing extremely high affinity (pM order) for Ln ions in three of these hands. The newly obtained crystal structure of MBP-tagged LanM was in its apo form, without Ln ions. Prior circular dichroism (CD) studies indicated that LanM's secondary structure forms upon Ln binding, enabling us to obtain a unique, inherently unstable unfolded structure.

In Chapter 4, Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and Circular Dichroism (CD) were performed using LanM. Previous studies had not conducted ITC measurements due to the very low dissociation constant (K_d) between Ln and LanM. This study overcame this challenge, reporting the thermal changes associated with LanM binding to Ln and structural changes in LanM. Additionally, experiments using size-exclusion filters suggested varying strengths of binding between EF-hands and Ln or other metal ions. Differences in folding ease within the same Ln group were also observed and discussed.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (墨 岳夫)		
	(職)	氏 名
論文審査 担当者	主 査	教授 船橋 靖博
	副 査	教授 水谷 泰久
	副 査	教授 吉村 崇
論文審査の結果の要旨		
<p>墨 岳夫 氏は、本部局の大学院博士後期課程に在籍しており、化学専攻において博士論文審査を進めた。提出された博士論文のタイトルは「高選択的ランタニド結合タンパク質の金属認識に関する分子機構解明 (Molecular mechanisms for metal recognition of the highly selective lanthanide-binding proteins)」で、内容は以下の通りである。</p> <p>近年、生命活動に寄与することがようやく明らかとなってきたランタニド (以下 Ln) が、生物にどのように取り込まれ、利用されているかについて明らかにすることを目的とした研究を行い、下記のような成果が得られていた。</p> <p>第一に、<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> (Hd)の培養において、Ln イオンを選択的な生育と Ln 含有メタノール脱水素酵素(Ln-MDH)への選択的な取り込みについて知見を得た。発現した Hd 由来の Ln-MDH を用いて基質であるメタノール転換反応についても化学的に調査し、別種の Ca 含有 MDH の Ca を Ln に置換して得られた Eu 置換 MDH の結晶構造も併せて議論した。</p> <p>第二に本研究の主たる内容として、Hd の Lanmodulin (LanM)を大腸菌でクローニングしたのち、Ln イオンの輸送に係る LanM の金属結合部位と蛋白質全体のダイナミクスに関する知見を得た。LanM は4つの金属結合部位を有し、そのうちの3つの結合部位が Ln イオンと親和性が高く、残り1つが Ln イオン選択性が弱い。それらの金属イオンの結合と連動する蛋白質のフォールディング状態も併せて、等温滴定カロリーメトリー (ITC)と円二色性スペクトルの測定 (CD)によって詳細に調査した結果が得られていた。</p> <p>この論文に対して、まず副査による予備審査を行い、本審査を受けるに値するものと認めた。さらに本審査では、化学専攻Aコースの教授全員による公開および非公開の審査会を2024年2月5日に行った。その直後に、化学専攻Aコースの教授全員による会議を開催し、博士論文および審査会における発表内容とその質疑応答に基づいて評価を行なった。その結果、本論文は学位論文として十分な価値があり、博士号を授与するに値すると認められた。</p>		