

大学院理学研究科化学専攻 生物無機化学研究室



研究室紹介

鈴木 晋一郎*

Laboratory for Bioinorganic Chemistry, Department of Chemistry, Graduate School of Science

Key Words : Bioinorganic Chemistry, Coordination Chemistry, Metal Proteins, Model Complexes

1. はじめに

我々の研究室は、銅イオンを主たるターゲットとした生体系金属の構造と機能の研究を行っている。研究室のルーツが錯体化学にあるため、金属タンパク質の遺伝子工学的な研究、X線結晶構造解析やキャラクター化の研究と共に、低分子錯体を用いる活性中心のモデル化、機能発現の研究も平行して行っている。当研究室のスタッフは、鈴木他、金属タンパク質と金属錯体の両方を扱っている山口和也助教授と、金属タンパク質を遺伝子工学的手法と結晶構造解析により研究を行っている野尻正樹助手の2名である。以下に、研究内容について紹介する。

2. 研究概要

21世紀の地球人口、約60億人を支える基盤として食料生産がある。多量の食料生産が可能になったのは、ハーバー・ボッシュのアンモニア合成法による。この方法で合成肥料が作り出される前は、人類を含めた動物は、植物を通して微生物を主役とする自然界の窒素サイクルに依存してNを得ていた。生体を構成している元素のうち、C, H, Oの3つについては生物が簡単に利用できる形で自然界に豊富に存在するのに対して、Nはその大部分が気体として大気中に存在し、しかも安定なために利用するの

は困難であった。従って、このアンモニア合成法開発の恩恵は極めて大きい。反面、多量の食料生産のための合成肥料の多量使用による環境汚染の問題が地球規模で起こりつつある。すなわち、大気中の N_2O や NO 濃度の増加であり、これは畑等に投入された合成肥料から NO_3^- を利用する脱窒菌などの微生物によるものとされている。すなわち脱窒菌は菌体内で NO_3^- を N_2 に還元して大気中に放出する嫌気呼吸（脱窒）によりATPを獲得している($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)。しかし、一部、 N_2O や NO が放出されるので、人類が食料生産のために多量に投入する肥料によって、脱窒菌の活動が活発になるとこれらのガスが多量に放出されることになる。特に N_2O は CO_2 の約200倍の温室効果があると同時に、オゾン層破壊の原因の一つと言われている。これらの現象は徐々に進行するため、現在の CO_2 やフロンなどとは違いあまり注目されていないが、今後、人類が直面する深刻な問題になるものと考えられる。脱窒菌由来の金属タンパク質の研究とそれらを含む脱窒代謝系の研究には、このような背景がある。

我々は、養豚場の排水から分離されたメタノールを炭素源とし、脱窒によりATPを獲得するC1資化性脱窒菌（メタノール、硝酸塩、微量金属塩とその他の無機塩で培養できる）、*Hyphomicrobium denitrificans* のC1資化性系と脱窒系を結びつける図1のような代謝系を見出した。すなわち、メタノールはメタノール脱水素酵素 (MDH) によりホルムアルデヒドに酸化されるが、その際に生じた電子は、2つの電子伝達ヘムタンパク質、シトクロム c_L (Cyt c_L) とシトクロム c_{550} (Cyt c_{550}) を経て、銅型亜硝酸還元酵素 (NIR) と銅型亜酸化窒素還元酵素 (N_2OR) に渡され、還元反応に用いられる。これまでの研究により、上述の全ての金属タンパク質



*Shinnichiro SUZUKI

1946年8月生

1974年大阪大学・大学院基礎工学研究科・合成化学専攻・博士課程修了

現在、大阪大学大学院理学研究科・化学専攻、教授、工学博士、生物無機化学

TEL 06-6850-5767

FAX 06-6850-5785

E-mail : bic@ch.wani.osaka-u.ac.jp

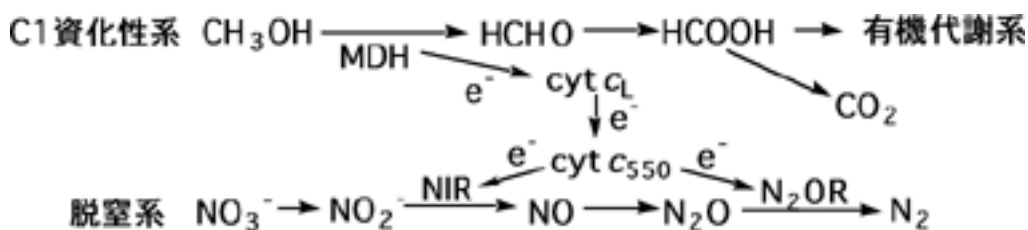


図1 C1資化性系と脱窒系を結びつける電子伝達系

のX線結晶構造解析が完成した。それぞれの分子構造が明らかになると、タンパク質間の相互作用と電子移動機構を解明する手がかりが得られるので、現在、種々の物理化学的測定により構造・機能相関を検討中である。この菌株からのMDH (Caイオンと補因子PQQを含む) と N_2OR (複核銅部位を持つ) は、従来から報告されている酵素と類似した構造であるので、ここでは、新奇的な構造であることが明らかになったNIRについて、最近の研究成果について述べる。

銅型NIRは、 NO_2^- を NO と H_2O に1電子還元する酵素で、脱窒過程において気体生成物を生じる最初の酵素であるため、脱窒のkey enzymeである。これまでに報告されている脱窒菌からのNIRは、分子量37 kDaの単量体あたり「電子供与タンパク質から電子を受け取るtype 1 Cu」と「type 1 Cuから電子を受け取り、基質を還元するtype 2 Cu」を1つずつ含んだ三角形三量体構造をとっている。これに対して、*Hyphomicrobium denitrificans*からのNIR (HdNIR) は、これまでに知られているNIRと比べて、ca. 50 kDaと大きく、さらにもう1個のtype 1 Cuを持っている。我々は、本学工学研究科の甲斐泰教授、井上豪助教授との協同研究によってHdNIRのX線構造解析 (分解能2.2 Å) に成功した。

HdNIRは、その一次構造の解析から、植物由来のプラストシアニンに類似した14 kDaのN末端領域 (type 1 Cu_N を1個含む) と、これまでに知られているNIRに類似した35 kDaのC末端領域 (type 1 Cu_C とtype 2 Cuを1個ずつ含む) からなることが明らかになっていた。図1はHdNIRの分子全体の6量体構造と、それを構成している単量体の構造を示す。

この分子は砂時計型構造であり、その上部と下部はこれまでのNIRと同様、3つのC末端領域からなる

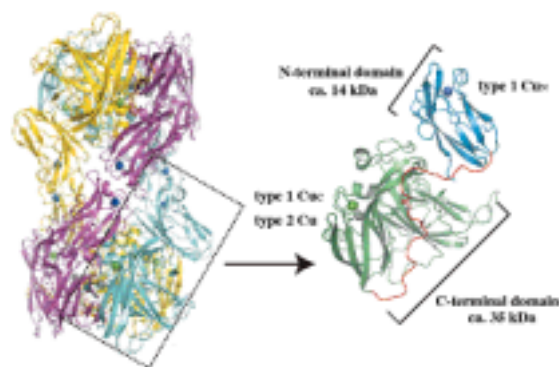


図1 HdNIRの分子全体の6量体構造と単量体構造

3量体構造をとり、それらを3つの対をなしたN末端領域が結びつけている。また、単量体中で、N末端とC末端領域を繋いでいる31アミノ酸残基からなる長いループがある。さらに、HdNIRは水溶液中でも6量体超分子構造をとっていることが、分子量測定から明らかになっている。

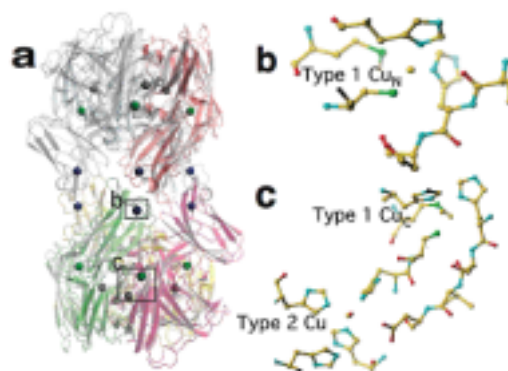


図2 銅イオンの配置と各タイプ銅の構造

図2は、18個の銅イオンの配置 (a) と、その銅部位の構造である。bに示したtype 1 Cu_N は2つのHis, Cys, MetとGlnの主鎖のカルボニル酸素が配位した三角両錐型五配位構造である。このタイプの構造は、NIRではこれまで知られていない。これに対して、cに示したtype 1 Cu_C 部位は、2つのHis,

Cys, Metが配位した平面に歪んだ四面体構造で、type 2 Cuは3つのHisと1つの水分子が結合した歪んだ四面体構造である。2つのCuの距離は12.6 Åであり、これら2個の銅原子間にタンパク質内電子移動が起こり、type 2 Cuに配位した基質が還元されると考えられる。

これらの銅部位の機能を調べるために、HdNIRへの電子供与タンパク質であるシトクロム c_{550} (Cyt c_{550}) を用いたストップフローの研究や、本学産業科学研究所の田川精一教授、小林一雄博士との協同によるパルスラジオリシスの研究を行っている。それによると、還元型Cyt c_{550} は、type 1 Cu_C の近傍のくぼみに結合し、速い電子移動過程としてtype 1 Cu_C に電子を渡すが、遅い過程としてtype 1 Cu_N にも電子を渡すことが推測された。一方、パルスラジオリシスの研究においては、メディエータとして用いたN-メチルニコチンアミドラジカルが優先的にtype 1 Cu_N に渡し、遅い過程としてtype 1 Cu_C にも電子を渡すという逆の結果が得られている。本酵素では1分子あたりの銅活性中心が多いた

めに、複雑な電子移動が起こるようであるが、今後、詳細な実験によって、酵素の電子移動機構を明らかにすると共に、脱窒菌のペリプラズムに存在しているHdNIRが、何故このような超分子構造をとっているのかを明らかにしたいと考えている。

3. おわりに

以上、今回明らかになった新奇な構造を持つNIRについて述べたが、このタイプのNIRは、最近のゲノム解析によって、病原性の微生物にも含まれていることが明らかとなっている。その一つとして、ニキビ菌のNIR遺伝子がこのHdNIRのものに極めて類似している。本研究は、環境化学的な観点から端を発しているが、今後は、創薬などの医学的な観点からも研究を発展して行きたいと考えている。また、紙面の都合で述べる事が出来なかったが、NIRのtype 2 Cu部位のモデル錯体を合成し、酵素反応の様に電子移動を伴って基質を還元する機能性錯体の研究も行っている。

