

「異化的硫酸還元酵素の構造解析による硫酸代謝機構の解明」

兵庫県立大学大学院理学研究科

緒方 英明

1 研究の背景と目的

硫酸還元細菌は、酸素からエネルギーを得るかわりに硫酸を最終的に硫化水素へ還元することでエネルギーを得ている（硫酸呼吸）。これらの過程において主に3つのタンパク質が働いている（図1）。最初の過程である硫酸イオンからアデノシンホスホ硫酸（APS）への変換はATPスルフリラーゼによって行われる。次に、APSから亜硫酸への還元はAPS還元酵素によって行われ、最終的に異化的亜硫酸還元酵素（Dsr）が亜硫酸を還元する¹。本研究の対象とする硫酸還元細菌のタンパク質群は、分子レベルでの立体構造や反応機構の詳細は不明である。硫酸還元過程がこれらのタンパク質でどのようにして起こるのか、また、それぞれのタンパク質がどのように相互作用するのか分かっていない。

本研究で対象とするタンパク質は硫酸還元細菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F株由来のアデニルニル還元酵素（APS還元酵素）と異化的亜硫酸還元酵素（Dsr）である。このタンパク質群を嫌氣的に精製・結晶化し、X線結晶構造解析を用いて立体構造を決定し、これらのタンパク質の立体構造から分子レベルでの異化的硫酸還元代謝メカニズムの総合的理解を深めることを目指した。

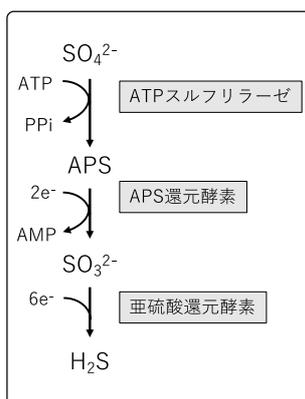


図1. 硫酸還元菌の硫酸代謝過程における3つの還元酵素

2 研究方法・研究内容

細菌の培養からタンパク質の精製、構造解析までの手法をそれぞれ以下の方法で行った。本研究では硫酸還元細菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F株を用いた。この嫌気性細菌（10 ml）を嫌氣的に37°Cで3日間培養した。この培養液を密閉できる1 L容器の培地に植菌し、嫌氣的に3日間37°Cで培養した。その後、大型培養槽で30 Lスケールでの嫌気培養を37°Cで2日間行った。培養した細菌を遠心分離によって回収し、集菌した細菌は-80°Cで保存した。

-80°Cで保存していた細菌を解凍し、Tris-HClバッファー pH 7.4で懸濁した。嫌気グローブボックス内の超音波破碎装置を用いて菌体を破碎した。破碎後の溶液を超遠心用のチューブに入れ、4°C、100,000 × gの条件で90分間遠心した。超遠心後の菌体破碎上清である可溶化成分（目的のタンパク質が含まれている）を回収した。可溶化成分に対して下記の液体クロマトグラフィーを順次行った。最初に、陰イオ

ン交換クロマトグラフィー (1 M NaCl の 5-25% 勾配) によって目的のタンパク質の分画を取得した。分取したサンプルを限外濾過装置で濃縮し、その後、サイズ排除クロマトグラフィーによって、それぞれ目的のタンパク質を分子のサイズの違いによって分取した。サンプルを再度陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて分取した。最後に、2 回目のサイズ排除クロマトグラフィーによって、それぞれ目的のタンパク質を分取し濃縮し、これを最終精製サンプルとした。

濃縮した精製サンプルを用いて嫌気グローブボックス内で結晶化を行った。2~3 週間後に単結晶が得られたが、この結晶を抗凍結剤に浸透したのち凍結し液体窒素温度で保存した。回折データは SPring-8 のビームライン BL45XU で収集した。回折データの指数付や積分は XDS、精密化は PHENIX.REFINE、COOT などを用いた。

3 研究成果

3-1 APS 還元酵素

硫酸還元細菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株を培養した結果、培養量 20 L 当たり約 90 g(wet) の菌体を得ることができた。この菌体を用いて APS 還元酵素の精製を行ったところ、約 10 mg の精製試料を得た。結晶化は嫌気グローブボックス内で行った。得られた結晶を用いて SPring-8 のビームライン BL45XU において回折データを収集した。構造解析の結果、APS 還元酵素はヘテロ 4 量体を構成している構造であることが明らかとなった (図 2)。活性部位を構成する FAD は α サブユニットに存在し、アーキア (*Archaeoglobus fulgidus*) の APS 還元酵素の場合と同様の配置であった^{2,3}。硫酸還元細菌とアーキアの APS 還元酵素で大きく異なっているのは、 β サブユニットの C 末端領域の構造であった。

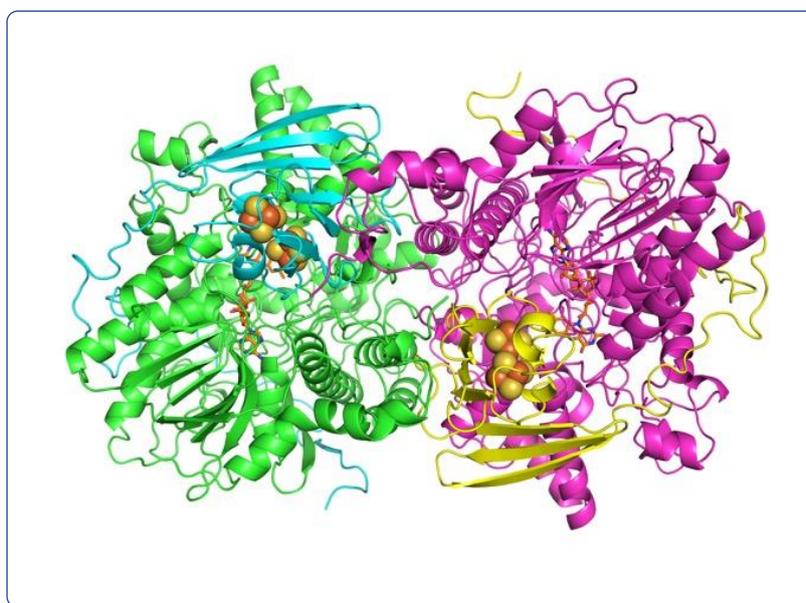


図 2. 硫酸還元菌の APS 還元酵素の立体構造。 α サブユニットはマゼンタ、緑色、 β サブユニットは黄色、青色で示す。鉄硫黄クラスターは球で、FAD はスティックモデルで表す。

β サブユニットの C 末端領域のアミノ酸配列の比較を図 3A に示す。この比較からも分かるようにアーキアの C 末端領域は硫酸還元菌に比べて 17 残基ほど短い構造と

なっている。実際に、立体構造を比較するとアーキアの C 末端構造は α サブユニットを取り巻くように配置しているが、硫酸還元菌ではさらに長く C 末端領域が伸びていた (図 2B)。硫酸還元菌である *Desulfovibrio gigas* 株由来の APS 還元酵素の酸化型の構造では、この C 末端領域が途中で α サブユニットから離れ、となり合う別の分子の活性部位のくぼみに収まるような配置をすることがわかっているが (図 2B、マゼンタ色で示す)、今回明らかとなった *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株の APS 還元酵素では C 末端まで α サブユニットの表面を取り巻くような構造であった。C 末側の 2 つのシステイン残基は S-S 結合を形成していることから、*D. gigas* の場合と同様に今回得られた *D. vulgaris* Miyazaki F 株の APS 還元酵素の構造も酸化型構造であると考えられる⁴。今後、還元型や基質結合型の立体構造を明らかにすることで、C 末端領域の役割を理解できるであろう。

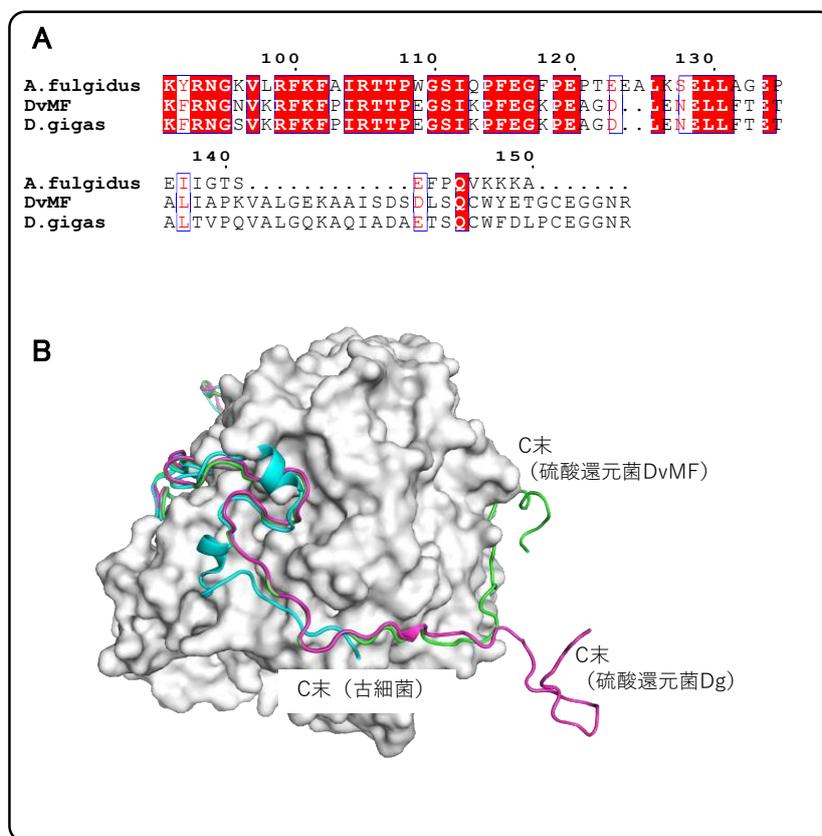


図 3 (A) β サブユニットのアミノ酸配列の比較。アーキアと硫酸還元菌の配列を比較し C 末端領域部分を示す。(B) β サブユニットの立体構造比較。

3-2 異化的亜硫酸還元酵素 Dsr

硫酸還元代謝の最後の段階で働く Dsr について、本研究では嫌気条件下での精製法を確立し結晶化を行った。これまででは好氣的に精製・結晶化を行っていたが、本研究では、精製過程と結晶化を嫌気条件下で行うことにより、より高純度試料の精製試料を得ることができた。今後、嫌気条件下で得られた結晶を用いて放射光施設での回折データ収集・構造解析を行うことで、亜硫酸還元反応機構を明らかにしていきたい。

4 生活や産業への貢献および波及効果

嫌気性細菌である硫酸還元菌は下水や汚泥などに多く生息しており、硫化水素を発生させることが知られている。これらの細菌の発生する硫化水素が金属パイプラインなどの腐食の原因とされている。硫酸還元機構が明らかとなれば、硫酸還元菌が生成する硫化水素によって起きる腐食の抑制など環境改善の研究展開などに役立つと考えられる。

参考文献

1. Oliveira, T. F., Vorrhein, C., Matias, P. M., Venceslau, S. S., Pereira, I. A., and Archer, M., *J. Biol. Chem.*, 283, 34141–34149 (2008).
2. Fritz, G., Roth, A., Schiffer, A., Büchert, T., Bourenkov, G., Bartunik, H. D., Huber, H., Stetter, K.O., Kroneck, P.M.H. & Ermler, U., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 4, 1836-1841 (2002).
3. Schiffer, A., Fritz, G., Kroneck, P.M.H. & Ermler, U., *Biochemistry*, 45, 9, 2960–2967 (2006).
4. Chiang, Y., Hsieh, Y., Fang, J., Liu, E., Huang, Y., Chuankhayan, P., Jeyakanthan, J., Liu M., Chan, SI., Chen, C., *J Bacteriol.*, 191, 7597-7608 (2009)