

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		ヒト皮膚常在性ニキビ菌が持つ膜結合型亜硝酸還元酵素の構造と機能			
研究テーマ (欧文) AZ		Structure and Function of Membrane-Bound Nitrite Reductase from <i>Propionibacterium acnes</i>			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓)ノジリ	名)マサキ	研究期間 B	2007 ~ 2009 年
	漢字 CB	野尻	正樹	報告年度 YR	2009 年
	ローマ字 CZ	Nojiri	Masaki	研究機関名	大阪大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		大阪大学大学院理学研究科・助教			
<p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>亜硝酸還元酵素 (NIR) は亜硝酸イオンを一酸化窒素に 1 電子還元する反応を触媒する水溶性酵素タンパク質であるが、最近、ヒト皮膚常在性ニキビ菌のゲノム上にも本酵素遺伝子が発見され、その N 末端にはアミノ酸約 450 残基からなる膜結合領域と推定される部分が付加していることが判明している。そこで本研究では、ニキビ菌由来の本酵素の構造を X 線結晶構造解析から解明し、これまでに例のない膜結合部位を有する亜硝酸還元酵素の構造・機能相関について解析することを目的とした。</p> <p>まず、本菌体由来亜硝酸還元酵素の膜結合部位を取り除いた可溶性領域タンパク質 (PaNIRsol) を大腸菌を用いた組み換え体として発現、精製し、その構造・機能を調べることにした。PaNIRsol では、紫外可視吸収スペクトルによりタイプ 1 銅の LMCT 遷移由来の吸収を、また EPR スペクトルよりタイプ 1 銅ならびにタイプ 2 銅に由来するピークを確認できた。推定アミノ酸配列から本可溶性領域蛋白質はタイプ 1 銅部位を 2 つ持つ事が予想されたが、その紫外可視吸収スペクトルの吸光度が小さく、2 つのタイプ 1 銅のうちいずれかが還元型を取っている可能性が示唆された。次に、PaNIRsol の結晶化を試み、分解能 2.4 Å の回折データを与える良質な結晶を得る事に成功した。初期位相の決定と構造精密化を行った結果、N 末の 120 残基程は電子密度が見られず、C 末約 350 残基 (PaNIRcdom) についてのみ、その結晶構造を決定することが出来た。PaNIRcdom はホモ三量体構造をとっており、タイプ 2 銅の配位構造は既知の NIR のものとよく似ていたが、タイプ 1 銅の配位ヒスチジンのひとつが 90 度フリップを起こしており、タイプ 1 銅が平面三配位構造を取っていることが明らかになった。この平面三配位構造は、タイプ 1 銅が還元型を取っていることを強く示唆するものであり、溶液系の実験と整合するものであった。このタイプ 1 銅の配位構造はこれまでの NIR ではみられない新規なものであり、これらの結果は、今後、膜結合領域を含む全長を構造解析し本酵素の生体中での機能を解明する上で重要な足がかりとなると期待される。</p>					
キーワード FA	銅	亜硝酸	還元酵素	結晶構造解析	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Structural basis of interprotein electron transfer for nitrite reduction in denitrification							
	著者名 ^{GA}	Nojiri et al.	雑誌名 ^{GC}	Nature (in press)					
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}	Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the soluble domain of PPA0092, a putative nitrite reductase from <i>Propionibacterium acnes</i>							
	著者名 ^{GA}	Nojiri et al.	雑誌名 ^{GC}	Acta Cryst. F					
	ページ ^{GF}	123~127	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	65
雑誌	論文標題 ^{GB}	Atomic resolution structure of pseudoazurin from the methylotrophic denitrifying bacterium <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> : structural insights into its spectroscopic properties							
	著者名 ^{GA}	Hira et al.	雑誌名 ^{GC}	Acta Cryst. D					
	ページ ^{GF}	85~92	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	65
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Propionibacterium acnes is a major inhabitant of adult human skin, where it resides within sebaceous follicles, usually as a harmless commensal although it has been implicated in acne vulgaris formation. The open reading frame (ORF) coding for a multi-copper protein has been found in the *P. acnes* genome. The ORF has been annotated as a hypothetical "Cu-oxidase domain" containing protein PPA0092. The deduced amino acid sequence (total 913 amino acid residues) exhibits significant similarities to those of copper-containing nitrite reductases (CuNIRs). The PPA0092 protein is composed of at least three domains; a transmembrane region (residues 1 to 412) consisting of ten α -helices, a cupredoxin-like domain (residues 483 to 610), and a typical CuNIR homologue region (residues 647 to 913).

The gene encoding the soluble domain (PaNIRsol) from residues 483 to 913 was amplified by PCR using the genome DNA of *P. acnes* KPA171202 as a template. The product DNA fragment was cloned into the expression vector contained an N-terminal hexa-histidine (His₆) fusion tag. His₆-PaNIRsol was expressed in *E. coli* JM109 (DE3) cells. Preliminary needle-shaped crystals of the His₆-PaNIRsol protein were obtained initially under several conditions within two weeks. Several rounds of optimization of the initial crystallization condition were set up to give optimally sized crystals. The crystal belongs to the primitive cubic space group as *P*2₁3 with unit-cell parameters, *a*, *b*, *c* = 108.63 Å. Based upon the expected molecular weight of His₆-PaNIRsol (49,534 Da), the Matthew coefficient *V*_M is calculated to be 2.1 Å³Da⁻¹ with an estimated solvent content of 42.0%. These results suggest the presence of one molecule of His₆-PaNIRsol per asymmetric unit. The structure-based functional interpretation will provide us with new information about the unique CuNIR type of protein with an additional cupredoxin domain at the N-terminus. Further crystallographic refinement and molecular-structure analysis are in progress.