

クライオ電子顕微鏡単粒子解析による亜硝酸還元酵素のパッキングフリー構造

山口峻英<sup>1,2</sup>, 安達成彦<sup>3</sup>, 守屋俊夫<sup>3</sup>, 川崎政人<sup>3,4</sup>, 小祝孝太郎<sup>3</sup>, 篠田晃<sup>3</sup>, 山田悠介<sup>3,4</sup>, 湯本史明<sup>3</sup>, 高妻孝光<sup>1,2</sup>, 千田俊哉<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>茨城大学大学院理工学研究科, <sup>2</sup>茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター,

<sup>3</sup>高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所, <sup>4</sup>総合研究大学院大学高エネルギー加速器科学研究科

Packing-Free Structure of Nitrite Reductase by Cryogenic Electron Microscopy Single Particle Analysis

Takahide YAMAGUCHI<sup>1,2</sup>, Naruhiko ADACHI<sup>3</sup>, Toshio MORIYA<sup>3</sup>, Masato KAWASAKI<sup>3,4</sup>, Kotaro KOIWA<sup>3</sup>, Akira SHINODA<sup>3</sup>, Yusuke YAMADA<sup>3,4</sup>, Fumiaki YUMOTO<sup>3</sup>, Takamitsu KOHZUMA<sup>1,2</sup>, Toshiya SENDA<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University,

<sup>2</sup>Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University,

<sup>3</sup>High Energy Accelerator Research Organization, Institute of Materials Structure Science,

<sup>4</sup>The Graduate University of Advanced Studies (Soken-dai), School of High Energy Accelerator Science

Abstract

亜硝酸還元酵素は脱窒過程において最初の気体状生成物を与える酵素である。これまでに、X線・中性子の特性を活かした構造解析が行われ、酵素反応中の構造等が決定され、反応機構の理解が進んできた。しかし、その構造特性が亜硝酸還元酵素そのものに由来するものなのか、あるいは結晶中にパッキングされることに由来するものであるかについての理解を深めることが重要となっている。溶液での構造はX線や中性子小角散乱によって低分解能構造として得られるが、詳細な酵素反応機構を解明するための構造情報として不十分である。本稿では、亜硝酸還元酵素の反応機構の理解に重要なパッキングフリー構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析によって得た最近の事例を紹介する。

1. はじめに

脱窒菌は、窒素酸化物を窒素分子へと段階的に変換する働きをもつ微生物で、地球規模での窒素循環の一端を担っている (Fig. 1)。脱窒菌によるこの反応は脱窒と呼ばれ、硝酸イオンを最終的な電子受容体としてエネルギーを獲得する嫌気呼吸の一種であるが、水資源環境や土壌の酸性化の原因である窒素酸化物の除去に利用できるという点でも重要である。また、脱窒過程の最終段階では、二酸化炭素の約 300 倍もの温室効果を有する亜酸化窒素を窒素分子に変換するが、この反応は土壌の酸性化等で阻害される。特に農耕地では窒素肥料の過剰な使用によって亜酸化窒素の排出量が増加していることが知られている [1]。脱窒過程は気候変動や食糧問題にも関わる生化学反応であり、遺伝子改変などによる脱窒菌の効率的な利用を考える上でも、各素過程を分子科学的に理解することが重要である。

この脱窒の一連の反応は、脱窒菌がもつ様々な金属酵素によって行われている。この中で亜硝酸還元酵素は、亜硝酸イオンを最初の気体状生成物である一酸化窒素へと変換する反応を担っている酵素である。亜硝酸還元酵素には大きく 2 種類に分けられ、銅イオンを利用している銅型亜

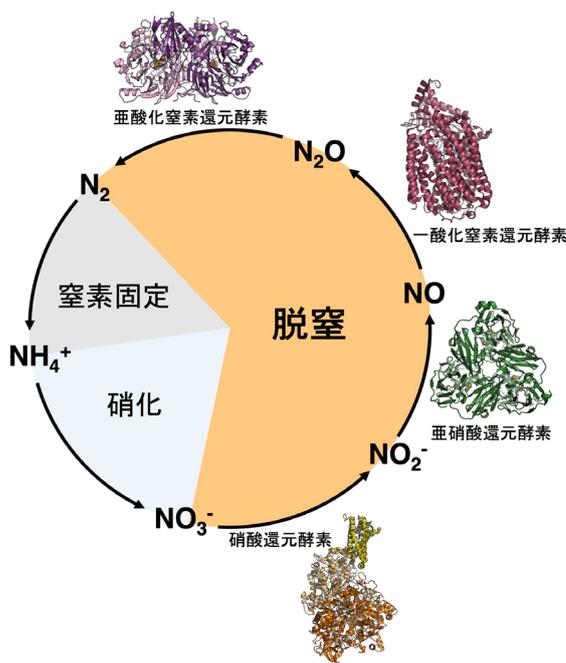


Figure 1 Nitrogen cycle and the structures of denitrifying metalloenzymes.

硝酸還元酵素 (CuNiR) と、ヘム鉄を活性中心にするヘム型亜硝酸還元酵素 (*cd*<sub>7</sub>NiR) が存在する。

名古屋大学の Iwasaki らは、1962 年に *Pseudomonas denitrificans* から見出される酵素に脱窒活性があることを見出し [2, 3], 翌年に CuNiR が初めて単離精製された [4]。その後、*Achromobacter cycloclastes* や *Alcaligenes faecalis* などからも CuNiR が単離されている。1990 年頃になると、X線結晶構造解析によって、活性中心であるタイプ 1 銅 (T1Cu) とタイプ 2 銅 (T2Cu) の構造が明らかにされた (Fig. 2)。基質である亜硝酸を還元するのは T2Cu であり、亜硝酸還元に必要な電子は、システイン 136 番 (Cys136) とヒスチジン 135 番 (His135) を介して T1Cu から供給される。また、亜硝酸を還元する際に必要なプロトンの供給源としては、T2Cu 近傍のアスパラギン酸 98 番 (Asp98) が推定されるなど、酵素反応機構の研究が展開されてきた [5]。近年では、量子化学計算や、放射光・X線自由電子レーザー・中性子を用いた精密な結晶構造解析が行われ、亜硝酸が結合する前の休止状態や、亜硝酸に電子を渡す前後の構造が明らかにされたことで、より詳細な酵素反応機構が報告されている [6-8]。しかし、結晶中では、分子どうしが接近しながら充填 (パッキング) されているため、構造の一部に歪みが生じ酵素反応が阻害される例も知られている [9]。そのため、CuNiR をはじめとする様々な酵素の構造研究において、パッキングフリー構造に基づいて反応機構の理解を得ることが重要となる。近年、KEK に設置されているクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) を利用することにより、CuNiR の近原子分解能パッキングフリー構造を初めて決定することに成功した [10]。

## 2. 銅含有亜硝酸還元酵素の cryo-EM 構造

### 2-1. 電子顕微鏡写真の撮影, cryo-EM マップの再構成

脱窒条件下で静置培養を行った脱窒菌 *Achromobacter cycloclastes* から CuNiR (*AcNiR*) を精製した。pH 6.2 と pH 8.1 にそれぞれ調製した *AcNiR* をカーボングリッドにアプライして瞬間凍結した試料を、200 kV クライオ電子顕微鏡 Talos Arctica (FEI) を用いて液体窒素温度で撮影し、単粒子解析に用いるタンパク質粒子画像を収集した。クライオ電子顕微鏡でタンパク質の粒子画像を撮影する際には、電子線が照射されることによって、グルタミン酸やアスパラギン酸などの側鎖やジスルフィド結合に損傷が生じ

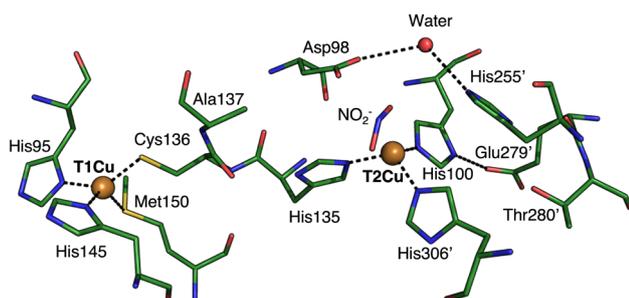


Figure 2 Active site structure of nitrite reductase (PDB ID:5D4I).

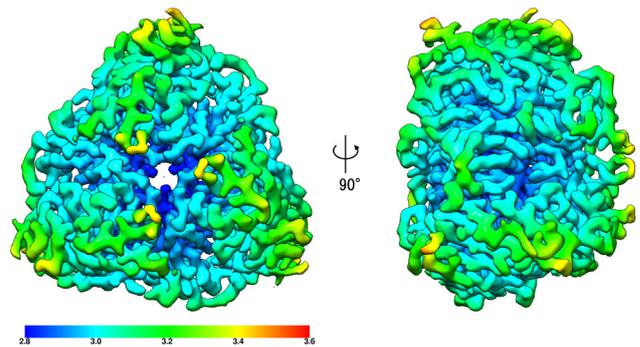


Figure 3 The cryo-EM map of *AcNiR* at pH 8.1 (resolution: 2.85 Å). The local resolution of cryo-EM map is indicated by the color scale at the bottom of figure.

るほか、特に金属含有タンパク質である *AcNiR* の場合には電子線による活性中心の還元等が想定された [11]。そこで電子線による試料の損傷を抑えるために、1 フレームあたり 1.08 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup> の低線量で撮影を行い、pH 6.2 と pH 8.1 でそれぞれ 794 枚、694 枚の電子顕微鏡画像を得た。さらに各フレームの照射線量に応じて損傷を考慮した分解能情報の重み補正をした後に、電子顕微鏡画像の中からピックアップした約 1 万個の粒子像を重ね合わせることで、Fig. 3 のような立体的な cryo-EM マップを高分解能で再構成した。cryo-EM マップを再構成する際に粒子像周辺に染み出した構造情報を含める工夫をすることで分解能を向上させ [12], 最終的な分解能は pH 6.2 で 2.99 Å, pH 8.1 で 2.85 Å になった。これは、200 kV 電子顕微鏡で撮影した分子量の小さい (110 kDa) タンパク質としては最も分解能の高い解析結果の 1 つである。

### 2-2. 亜硝酸還元酵素の cryo-EM 構造と結晶構造の差異

再構成されたマップを基に精密化を行い *AcNiR* の cryo-EM 構造を得た。*AcNiR* の cryo-EM 構造は、これまで結晶構造解析や小角散乱法によって明らかにされてきたものと同じくホモ三量体であった。cryo-EM 構造と、精密化の際に初期モデルとして用いた結晶構造 (PDB ID: 2BW4, 分解能 0.9 Å) の Root Mean Square Deviation (RMSD) は、Protein Data Bank に登録されている *AcNiR* の全 X 線結晶構造同士を重ね合わせた際に計算される RMSD (0.36 ± 0.17 Å) よりも大きく、0.697 Å であった。このことから、結晶中の構造はパッキングによる影響を受けているものと考えられる。パッキングによる影響は、全体的にホモ三量体の表面付近に分布していたが、さらに詳しくタンパク質主鎖の構造を調べたところ、*AcNiR* のバリン 185 番 (Val185) からグリシン 200 番 (Gly200) に至るループの構造が顕著に変化していることが判明した。タンパク質間の電子伝達反応においては、活性中心の酸化状態によって引き起こされる構造変化が、ドナー・アクセプター複合体の親和性を調節していることが報告されている [14]。結晶中でパッキングの影響を受ける Val185-Gly200 ループは、

T2Cu から 20 Å 以上離れているため、亜硝酸還元反応には直接関与しないものと考えられるが、電子伝達タンパク質であるシュウドアズリン (PAz) が T1Cu に電子を受け渡す際に、複合体形成の界面となるアミノ酸残基を含んでいる [13]。よって、CuNiR と PAz の電子移動反応を理解するには今回得られたパッキング構造が重要となると考えられる。

### 2-3. 亜硝酸還元酵素の活性中心とその近傍の構造

AcNiR の活性中心である T1Cu と T2Cu を調べたところ、cryo-EM 構造と結晶構造には、ほとんど違いはみられず、パッキングによる影響は分子内部の活性中心には及んでいなかった。T2Cu 近傍に存在するヒスチジン 255 番 (His255') は、O-NO 結合が切断される際にプロトンを供給すると考えられているため、His255' と周辺の水分子を含む水素結合ネットワークの構造を得ることが酵素機能理解に重要である。しかし、His255' のコンフォメーションは、X線照射によって T2Cu が還元されることで変化することが報告されている [7]。AcNiR の cryo-EM 構造では His255' のコンフォメーションが維持されていたことから、電子線による損傷のない構造が得られたものと考えられる。

また、AcNiR の酵素活性は pH 6.2 で最大になり、pH 6.2 から酸性・アルカリ性にずれると活性が低下することが報告されている [15]。Jacobson らは、pH 6.0 と pH 8.4 において *Rhodobacter sphaeroides* 由来 CuNiR (*RsNiR*) の結晶構造解析を行い、T2Cu 近傍に存在するヒスチジン 287 番 (AcNiR では His255' にあたる) の構造変化を見出している [16]。この構造変化によって、アルカリ性で T2Cu の酸化還元電位が上昇し酵素活性が低下すると説明しているが、これらの構造データは放射光 X線によって得られたものであり、実際には T1Cu と T2Cu が還元された状態であると考えられる。cryo-EM マップに基づいて精密化した AcNiR の構造は、電子線による損傷を含んでいなかった。そこで pH 6.2 と pH 8.1 における AcNiR の構造を比較したが、活性中心とその近傍に差異は認められなかった。しかし、cryo-EM マップ同士を直接比較するために作成した差分マップ (Fig. 4) では、差分 (赤色) が Asp98 と His255' の間に顕著に現れ、pH を変えた際に周辺構造が変化しているものと考えられた。この差分マップが現れた位置には、水素結合を介して Asp98 の O<sup>δ</sup> 原子と His255' の N<sup>ε</sup> 原子を繋ぐ水分子が存在する (Fig. 2)。pH 6.2 では、この水分子が揺らぎやすくなっているか、占有率が低下しているものと考えられる。CuNiR の反応機構では、基質に電子が移動する前に His255' から水分子にプロトンが移動する。通常、ヒスチジン側鎖のイミダゾール環の pK<sub>a</sub> は 6 付近であり、His255' 側鎖のプロトン化・脱プロトン化が T2Cu の活性に関係すると考えられる。電子スピン共鳴 (EPR) スペクトルを用いて T2Cu への影響を分光学的に検証した結果、pH 6.0 と pH 8.0 で T2Cu 由来のスペクトル成分が変化し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析の結果を裏付けることができた。

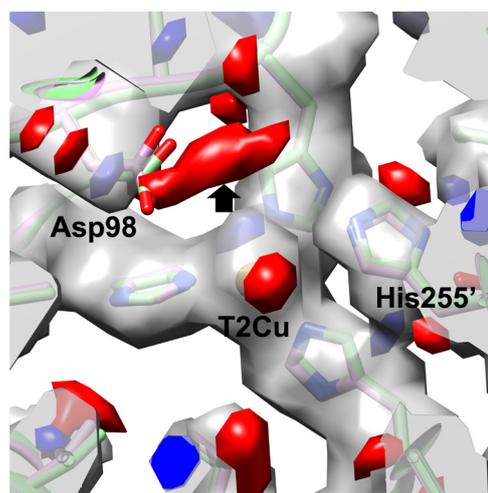


Figure 4 The equal-volume 3D difference map (pH 8.1–pH 6.2, red: positive, blue: negative) of AcNiR.

### 4. まとめ

今回、パッキングによる歪みや電子線による損傷を含まないであろう状態で、比較的分子サイズが小さい亜硝酸還元酵素の構造が明らかになったことで、クライオ電子顕微鏡を用いた金属タンパク質の単粒子構造解析の重要性が一層強調された。亜硝酸還元酵素をはじめとする金属酵素の機能を理解するためには、詳細な分子構造を与える X線・中性子単結晶構造解析と併せて、クライオ電子顕微鏡単粒子解析の結果を解釈することが酵素機能の理解に重要である。

### 5. 謝辞

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の課題番号 JP20am0101071 の支援を受けました (支援番号 1401, 1630)。

### 引用文献

- [1] D. S. Reay, E. A. Davidson, K. A. Smith, P. Smith, J. M. Melillo, F. Dentener, P. J. Crutzen, *Nat. Clim. Chang.* **2**, 410 (2012).
- [2] H. Suzuki, T. Mori, *J. Biochem.* **52**, 190 (1962)
- [3] H. Suzuki, H. Iwasaki, *J. Biochem.* **52**, 193 (1962)
- [4] H. Iwasaki, S. Shidara, H. Suzuki, T. Mori, *J. Biochem.* **53**, 299 (1963).
- [5] E. T. Adman, J. W. Godden, S. Turley, *J. Biol. Chem.* **270**, 27358 (1995).
- [6] M. Lintuluoto, J. M. Lintuluoto, *Biochemistry*, **55**, 210 (2016).
- [7] Y. Fukuda, K. M. Tse, T. Nakane, T. Nakatsu, M. Suzuki, M. Sugahara, S. Inoue, T. Masuda, F. Yumoto, N. Matsugaki, E. Nango, K. Tano, Y. Joti, T. Kameshima, C. Song, T. Hatsui, M. Yabashi, O. Nureki, M. E. P. Murphy,

- T. Inoue, S. Iwata, E. Mizohata, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **113**, 2928 (2016).
- [8] Y. Fukuda, Y. Hirano, K. Kusaka, T. Inoue, T. Tamada, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **117**, 4071 (2020).
- [9] E. G. Kovaleva, J. D. Lipscomb, Science **316**, 453 (2007).
- [10] N. Adachi, T. Yamaguchi, T. Moriya, M. Kawasaki, K. Koiwai, A. Shinoda, Y. Yamada, F. Yumoto, T. Kohzuma, T. Senda, J. Struct. Biol. **213**, (2021).
- [11] J. Hattne, D. Shi, C. Glynn, C.-T. Zee, M. Gallagher-Jones, M. W. Martynowycz, J. A. Rodriguez, G. Gonen, Structure, **26**, 759 (2018).
- [12] T. Moriya, KENBIKYO **55**, 37 (2020),
- [13] M. D. Vlasie, R. Fernández-Busnadiego, M. Prudêncio, M. Ubbink, J. Mol. Biol. **375**, 1405 (2008).
- [14] M. Senda, S. Kishigami, S. Kimura, M. Fukuda, T. Ishida, T. Senda, J. Mol. Biol. **373**, 381 (2007).
- [15] H. Iwasaki, S. Noji, S. Shidara, J. Biochem. **78**, 355 (1975).
- [16] F. Jacobson, A. Pistorius, D. Farkas, W. De Grip, Ö, Hansson, L. Sjölin, R. Neutze, J. Biol. Chem. **282**, 6347 (2007).

(原稿受付日：2022年3月24日)

## 著者紹介

山口峻英 Takahide YAMAGUCHI

茨城大学大学院理工学研究科 助教

〒310-8512 茨城県水戸市文京 2-1-1

e-mail: takahide.yamaguchi.qbs@vc.ibaraki.ac.jp

略歴：2016年茨城大学大学院理工学研究科博士課程修了  
博士（理学），茨城大学博士研究員を経て2016年より現職

最近の研究：金属タンパク質の構造・機能・物性

趣味：ウィンドサーフィン

高妻孝光 Takamitsu KOHZUMA

茨城大学大学院理工学研究科 教授

〒310-8512 茨城県水戸市文京 2-1-1

e-mail: takamitsu.kohzuma.qbs@vc.ibaraki.ac.jp

略歴：1989年 学術博士（金沢大学） 大阪大学助手，茨城  
大学助教授を経て2004年より現職

最近の研究：生物無機化学

趣味：料理，ヨット，スキューバダイビング，魚釣り