

銅を含む亜硝酸還元酵素の最近の話題から

東京大学生物生産工学研究センター 西山 真

脱窒は多段階反応により硝酸を気体状窒素へと還元する一種の嫌気呼吸である。湖沼の富栄養化を始めとする排水による環境破壊の問題を解決する方法の一つとして、これまで高い脱窒能を有する微生物の探索が行われてきたが、脱窒系の個々の酵素系についての研究は十分にされてこなかった。ようやく近年の遺伝子組換え技術の飛躍的な発展ならびに酵素精製技術の進歩などに伴い、脱窒系を構成する酵素系について精力的に解析され始めている。その中で最近特に研究が進んだのが、亜硝酸還元酵素 (NIR) である。嫌気呼吸を担う NIR には、ヘム c およびヘム d₁ をサブユニットあたり 1 分子ずつ含むチトクローム cd₁ 型のもので銅を含むものの 2 種類が存在し、両者の間にはアミノ酸配列の相同性はまったく認められない。銅含有 NIR の遺伝子を用いてさまざまな脱窒菌 DNA に対してサザンハイブリダイゼーション解析を行った結果、プローブは銅型 NIR を有することが知られている菌の DNA に特異的に結合したが、チトクローム cd₁ 型を有することが知られているものについては、1 種類の菌株を除いて結合が見られず、¹⁾したがって、個々の脱窒菌においてはどちらか一方のみの亜硝酸還元系を進化させてきたことが明らかになっている。

銅含有 NIR については、さまざまな菌から遺伝子がクローン化され、タンパク質工学的解析がなされる一方、酵素タンパク質についても X 線結晶解析により立体構造が決定され、多くのことが解明されつつある。以下、銅含有 NIR (単に NIR) について最近明らかになってきた事実を紹介する。以前、NIR のオリゴマー状態について 2 量体あるいは 4 量体の 2 つの考えが提出されており、さまざまなタイプの NIR の存在が示唆されていた。また、これらの NIR に含まれる銅原子の種類についても、NIR の青～緑の発色の原因となるタイプ 1 とよばれる銅のみを持つという報告や、タイプ 1 銅に加えて、電子スピン共鳴法によって識別可能な無色の銅原子であるタイプ 2 銅と呼ばれる銅の、2 種類の銅原子を有するという報告があり、銅原子が触媒活性を担っていること自体は明らかであったものの、どちらの銅原子が活性に必須であるかは不明であった。ここ数年の間に、これらの NIR が高いアミノ酸配列の相同性を有すること、そしてこれまでタイプ 1 銅のみを結合しているといわれていた NIR がタイプ 2 銅も結合していることが明らかにされる一方、X 線結晶解析により亜硝酸イオンがタイプ 2 銅付近に結合すること、²⁾銅のリガンドのアミノ酸残基の改変において、タイプ 2 銅のリガンド残基を改変したときにのみ活性が消失することが報告され、³⁾現在ではタイプ 2 銅が活性に関与するという結論が出されている。また、X 線結晶解析、溶液 X 線散乱から、これらの酵素が同一のサブユニット 3 つからなる三量体であることも判明している。X 線結晶解析の結果、タイプ 1 銅は各サブユニットに結合しているが、タイプ 2 銅は各サブユニットの間に存在しており、NIR ではサブユニット界面中に活性中心が存在するというユニークな構造をとっていることが明らかになった。NIR には青色のものと緑色のものが存在し、アズリンおよびシュードアズリンという青色銅タンパク質がそれぞれ青色と緑色の NIR への電子供与体として機能している。シュードアズリンは自身のタイプ 1 銅周辺に存在する多数のリジン残基を介して緑色 NIR と相互作用し、NIR のタイプ 1 銅に電子を渡すことが明らかになっているが、⁴⁾こうしたリジン残基はアズリンには存在しないことから、青色 NIR とアズリンはそれとは別の相互作用により電子の授受を行っているものと予想される。

最近、細菌以外のある種のカビにも脱窒能の存在が見いだされ、同亜硝酸還元系に銅含有 NIR が関与していること、そしてこのカビからアズリンが単離されることが報告されている。⁵⁾また、細菌における脱窒関連遺伝子上流には嫌気条件下の転写活性化因子 FNR の認識シグナルが存在するが、カビの脱窒関連遺伝子上流にもこの配列が見いだされており、転写制御系も含めた意味で脱窒系の伝搬様式に興味をもたれる。

銅原子は銅の電子状態が単純で、鉄原子で考えなければならないような複雑な電子のスピン状態が存在しない。さらに、酸化状態で強い青色 (緑色) を呈することから、タンパク質内そしてタンパク質間の電子伝達のメカニズム解明のための良い研究材料といえる。また、環境浄化という意味でも、脱窒系の制御ならびに効率化は重要であり、そのためにも脱窒系に関わるさまざまな酵素群の構造と機能に関する総合的理解が必要となってきた。

- 1) Ye, R. W. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 250 (1993).
- 2) Godden, J. W. *et al.*: *Science*, **253**, 438 (1991).
- 3) Kukimoto, M. *et al.*: *Biochemistry*, **33**, 5246 (1994).
- 4) Kukimoto, M. *et al.*: *Protein Eng.*, **8**, 153 (1995).
- 5) Kobayashi, M. and Shoun, H.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 4146 (1995).