

講演番号：3E5p08

講演日時：3月26日 15:17～ 1号館 E5 会場

細菌の金属輸送に関わる EfeUOB 系構成アルギン酸結合タンパク質のレアメタル結合性

Rare metal binding by alginate-binding protein, a component of bacterial EfeUOB metal importer system

○奥村 憲史¹、三上 文三¹、村田 幸作²、橋本 渉¹ (¹京大院農、²摂南大理工)

○Kenji OKUMURA¹, Bunzo MIKAMI¹, Kousaku MURATA², Wataru HASHIMOTO¹ (¹Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【目的】グラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は細胞表層に形成した体腔を介して、酸性多糖アルギン酸を取り込み、資化する。体腔におけるアルギン酸の結合（解離定数 $K_d=0.036 \mu\text{M}$ ）に関わるタンパク質 Algp7 は、鉄輸送 EfeUOB 系を構成する金属結合タンパク質である EfeO と相同性を示し、 Fe^{3+} や Cu^{2+} など多様な金属と結合する。EfeUOB 系は大腸菌 O157 株と枯草菌で研究が進められており、遊離の Fe^{2+} を Fe^{3+} へと酸化させて鉄を細胞内に輸送するという機構が提案されている。アルギン酸は様々な金属に対して強いキレート能を示し、アルギン酸を主要構成糖とする褐藻類にはレアメタルを含む様々な金属が濃縮されていることが知られている。A1 株では、Algp7 を含む EfeUOB 系をコードする遺伝子クラスターはアルギン酸存在下で誘導発現することから、EfeUOB 系がアルギン酸にキレートされた金属の取り込みに機能することが示唆される。そこで、A1 株のアルギン酸を介した EfeUOB 系による金属取り込み機構を明らかにするため、EfeUOB 系構成タンパク質の一つである EfeB の構造と機能を解析した。また、Algp7 のレアメタルに対する結合能を評価した。

【方法・結果】組換え大腸菌で発現させ、精製した EfeB を 15% ポリエチレングリコール 400、100 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.6) 及び 100 mM CaCl_2 の条件下で結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。分解能 2.06 Å まで得られた回折点から、大腸菌 O157 株の EfeB をサーチモデルとした分子置換法により、A1 株の EfeB の立体構造を決定した。ヘム分子が C 末端の DyP ペルオキシダーゼドメインの疎水性ポケットに結合していた。嫌気条件下で EfeB の鉄に対するペルオキシダーゼ活性を測定したところ、A1 株の EfeB は Fe^{2+} を Fe^{3+} へと酸化させるペルオキシダーゼ活性を示すことがわかった。金属との結合による Algp7 の構造安定化を示差走査型蛍光定量法によって評価したところ、レアメタルである Sm^{3+} と Pr^{3+} 存在下で Algp7 の構造が安定化し、変性温度が上昇した。レアメタルとの結合に伴うトリプトファンとチロシン残基に由来する蛍光の変化を分光蛍光光度計で測定することにより、Algp7 のレアメタル結合能を評価した。その結果、 K_d 値が Sm^{3+} で $2.30 \mu\text{M}$ 、 Pr^{3+} で $5.46 \mu\text{M}$ と決定された。Algp7 が Fe^{3+} や Cu^{2+} のみならず、レアメタルを含む様々な金属に対して結合能を示すことが明らかになった。現在、12.5% ポリエチレングリコール 8000、100 mM クエン酸ナトリウム (pH 4.1) 及び 200 mM NaCl の溶液で得た Algp7 結晶を、 $\text{Sm}_2(\text{SO}_4)_3$ を含む同溶液にソーキングし、X 線結晶構造解析を進めている。本研究により、Algp7 をレアメタルの回収に応用できる可能性が示された。

本研究の一部はヤンマー資源循環支援機構の支援を受けて行われた。

Alginate, EfeUOB, Rare metals

発表責任者：橋本 渉 (whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp)