

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570064

研究課題名(和文) 緑色硫黄細菌の光合成電子供与系・硫黄酸化マルチ酵素系の機能解明

研究課題名(英文) The study of thiosulfate oxidation multi-enzyme system in the green sulfur bacterium
Chlorobaculum tepidum

研究代表者

井上 和仁 (Inoue, Kazuhito)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：20221088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：緑色硫黄細菌Chlorobaculum tepidumはチオ硫酸酸化マルチ酵素系(TOMES)でチオ硫酸を光合成の電子供与体とする。TOMES成分のうちSoxYZはチオ硫酸を結合するシステイン残基を持つ。SoxYZを還元剤である硫化ナトリウムとDTTで前処理し、活性とMALDI-TOF MSで質量分析した。硫化ナトリウムで処理したSoxYZは活性が著しく増大し、アミノ酸配列から推定されるSoxYの質量数と一致する12852m/zの他に12,885m/z付近に2つ目のピークが現れた。一方、DTTで処理したSoxYの質量数は12,852m/zのみで活性の増大はほとんど見られなかった。

研究成果の概要(英文)：SoxYZ is the factors indispensable for thiosulfate-dependent reduction of cyt c-554 from the green sulfur bacterium Chlorobaculum tepidum. Heterodimeric SoxYZ that binds oxidized product of thiosulfate on the cysteinyl-SH residue of SoxY (SoxY-SH) as the intermediate (SoxY-S)-SSO₃⁻ to yield (SoxY-S)-SH. Some preparations of SoxYZ showed low activity, and pretreatment of SoxYZ with sulfide increased the activity. On the other hand, pretreatments of SoxYZ with DTT, thiosulfate and sulfite had no significant effects on the activity. We measured the mass of SoxY by MALDI-mass spectrometry. Compared with the sulfide-treated SoxYZ (m/z12852), the peaks of SoxY of as prepared SoxYZ with low activity in the TOMES assay had a mass number larger by about 30-80 than that of the former. The main mass peaks of both thiosulfate-treated and the sulfite-treated SoxYs also were larger by about 30-100. These results suggest that the inactive SoxY possibly binds S₂O₃ group on the cysteinyl S.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：光合成 硫黄酸化 電子供与体 緑色硫黄細菌 電子伝達系 光化学反応中心

1. 研究開始当初の背景

最初の光合成生物の誕生とそれに続く酸素発生型光合成の成立は“地球史”における最も大きなイベントの一つである。光合成に立脚した食物連鎖の成立過程、すなわち、光合成の初期進化を探るため、研究代表者は、これまでに「始源的な特徴を持つ鉄硫黄型反応中心の構造と機能(文献1,2)」、「クロロフィル合成遺伝子を分子指標とした光合成生物の系統関係(文献3,4)」の研究を実施してきた。本研究は、その一連の研究の一環である。緑色硫黄細菌の反応中心は光化学系Iと同様の鉄硫黄型に属するが、そのコア複合体はホモダイマーで始源的であり、硫化水素やチオ硫酸を光合成電子供与体とする。酸素発生型光合成生物が持つ水分分解系の出現以前の光合成電子供与系の初期進化を考える上で、緑色硫黄細菌の光合成電子供与系の解明は重要な研究課題である。

研究代表者は、緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* の光化学系への直接的な電子供与体であるシトクロム(cyt)c-554の還元活性を指標にして、チオ硫酸の酸化に必須な成分として SoxYZ、SoxB、SoxAXK を単離し、その生化学的解析を行った(文献5)。これらの成分を構成する蛋白質の遺伝子は全て *C. tepidum* のゲノムDNA上の sox (Sulfur oxidizing) クラスター内に内在している。sox クラスターは、硫黄酸化能を持つ化学合成細菌や紅色硫黄細菌などのゲノムにもみられるが、SoxAXK を構成する SoxK の遺伝子は限られた細菌種にのみ分布すること、さらに、SoxK を持つ種においてはこの成分が複合体形成に必須であることを明らかにした(文献5)。また、TOMESのチオ硫酸酸化を促進する新奇成分 SoxF を *C. tepidum* より単離した(文献6,7)。

文献(1) Photosynthesis Research. 43:107-112 (1995), (2) Photochemistry and Photobiology. 64:5-13 (1996), (3) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14851-14856 (1998), (4) Science 289:1724-1730 (2000), (5) J. Bacteriol., 190:6097-6110 (2008), (6) Biosci. Biotech. Biochem., 74:771-780 (2010), (7) Photosynth. Res. 104:163-176 (2010)

2. 研究の目的

チオ硫酸は水圏環境において最も豊富に存在する硫黄化合物であり、これを利用する硫黄酸化細菌はチオ硫酸酸化マルチ酵素系(TOMES)を持つ。緑色硫黄細菌 *C. tepidum* は始源的な光合成の特徴を有し硫化水素やチオ硫酸を光合成の電子供与体として用いるが、*C. tepidum* の TOMES は化学合成細菌や紅色非硫黄光合成細菌などの硫黄酸化細菌が持つ TOMES に比べるとユニークな特徴を持つ。例えば、*C. tepidum* は SoxCD を欠くためチオ硫酸を2電子酸化しかできない点や SoxK が SoxAXK の複合体形成に必須である点などである。SoxF は単独では硫化

水素の酸化能を示すが、*C. tepidum* の TOMES と共存すると TOMES のチオ硫酸酸化活性を大きく促進するが、その機構は不明である。本研究は *C. tepidum* の TOMES や SoxF の機能解析を行い、*C. tepidum* の光合成電子供与系を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

C. tepidum は、嫌氣的に 42 °C でハロゲンランプの光照射下 ($150 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) で、約 16 時間から 20 時間培養した。細胞を氷冷下で超音波処理で破壊し、 $10,000 \times g$ で 10 分間の遠心で未破碎の菌体を除き、さらに $160,000 \times g$ で 2 時間遠心して、可溶性画分と膜画分を分けた。可溶性画分に 35% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、遠心 (10 min、 $10,000 \times g$) 後、その上清に 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え遠心 (10 min、 $10,000 \times g$) した。得られた沈殿を少量の 20 mM Tris-HCl (pH 7.8)、1 mM チオ硫酸ナトリウムを含む溶液で懸濁し透析後、DEAE-Tyopeal 650 M (Tosoh、 $2.5 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$) に向け、非吸着画分を TOMES 成分の精製材料とし、吸着画分を Cyt c-554 と SoxF の精製材料とした。

TOMES の各成分は、10 mM MES-NaOH (pH 6.5)、1 mM チオ硫酸ナトリウムで透析し、HiTrapTMSP (GE Healthcare) に向け、0~300 mM の濃度勾配による NaCl で蛋白質を溶出させた。溶出画分に終濃度 1 mM になるようにアスコルビン酸ナトリウムを加え、10 mM Tris-HCl (pH 8.7)、1 mM チオ硫酸ナトリウムで透析し、HiTrapTMQ (GE Healthcare) にかけて部分精製を行い、SoxAXK、SoxYZ、SoxB の 3 つの蛋白質を含む画分に分けた。SoxAXK は終濃度 1 mM になるようにフェリシアン化カリウムを加え、10 mM MES-NaOH (pH 6.5) で透析し、HiTrapTMSP (GE Healthcare) に向け、0~300 mM の NaCl による濃度勾配で蛋白質を溶出させて精製した。SoxB は、脱塩後、HiTrapTMQ (GE Healthcare) に向け、0~300 mM の NaCl による濃度勾配で溶出して精製した。SoxYZ は HiTrapTMQ (GE Healthcare) に向け、NaCl により溶出された SoxYZ を含む画分を 50 mM Tris-HCl (pH 7.8)、2 M 硫酸アンモニウムになるように溶液を調整し、HiTrapTMPhenyl (GE Healthcare) に添加し、2 M~400 mM の硫酸アンモニウムの濃度勾配により溶出して精製した。

Cyt c-554 と SoxF の精製は、DEAE-Tyopeal 650 M の吸着画分を精製の出発材料とした。300 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) でカラムから溶出し、10 mM MES-NaOH (pH 6.5) で透析後、同溶液で平衡化した陽イオン交換カラム (SP Sepharose FF; Tosoh、 $2.5 \times 7 \text{ cm}$) に向け、400 mM NaCl を含む 10 mM MES-NaOH (pH 6.5) で溶出させた。次いで、陽イオン交換カラム (HiTrapTMSP; GE

Healthcare) にかけて、150 mM NaCl を含む 10 mM MES-NaOH (pH6.5) で溶出した赤色を呈した画分と 220 mM NaCl を含む 10 mM MES-NaOH (pH 6.5) で溶出させた黄色を呈した画分を得た。赤色画分を脱塩後、50 mM Tris-HCl (pH7.8) 2 M 硫酸アンモニウム含む溶液で平衡化した疎水性カラム (HiTrapTM Phenyl; GE Healthcare、容積 5 mL) に吸着させ、2 M 400 mM の直線的濃度勾配により溶出して Cyt_c-554 を精製した。黄色の画分は脱塩後、陰イオン交換カラム (HiTrapTMMQ; GE Healthcare) に吸着させ、150 mM NaCl で溶出し、SoxF を精製した。

各種硫黄化合物による SoxYZ の前処理は、まず、精製した SoxYZ を 30 μM になるように調整し、これに終濃度 1 mM になるように硫化ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、または、チオ硫酸ナトリウムを加えた。各溶液はヒートブロック (Taitec; ドライサーモユニット) を使用して 30 °C で 20 分インキュベートし、Mes-NaOH (pH6.0) で平衡化した HiTrap Desaltings で脱塩した。10 mM MES-NaOH (pH 6.0) に前処理した SoxYZ を 0.5 μM になるように調整し、さらに、0.5 μM SoxB、0.5 μM SoxAXK、最終電子受容体として 50 μM Cyt_c-554 を加え、さらに、電子供与体として 100 mM のチオ硫酸ナトリウムを加え反応を開始し、吸光度 554 nm における吸光度の変化を追跡して TOMES の活性を測定した。測定は紫外可視分光光度計 (Shimadzu; UV-1800) でセル内の試料を 25 °C に保ちながら行った。質量分析は MALDI-TOF MS (Shimadzu; AXIMA Performance) により解析した。

アフィニティカラムは Cyt_c-554 と SoxF を固定したものの 2 種類を作成した。アフィニティカラムの作成は CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare) 1.0 g を 1 mM HCl を用いて、膨潤と洗浄を 2 回繰り返す、上清を除いたのち、0.5 M NaCl、0.1 M NaHCO₃ (pH8.3) のカップリング溶液で洗浄し、穏やかに懸濁した。懸濁液を室温で放置し、上清と沈殿に分けた後、上清を取り除いた。同じカップリング溶液で透析し、外液を数度交換後、蛋白質を各々 1 mL のゲルに対し 10 mg になるように加え、室温で 2 時間穏やかに懸濁した。蛋白質とカップリングさせた Sepharose の上清を捨てた後、20 mM Tris-HCl (pH 7.8) を加えて一晩放置し、余分な活性基をブロッキングした。さらに、20 mM Tris-HCl (pH7.8) と 10 mM MES-NaOH (pH6.0) で交互に流し余分な活性基を洗浄して、アフィニティカラムを作成した。試料液は SoxYZ、SoxAXK、SoxB、SoxF、Cyt_c-554 を含むものをそれぞれ調整した。試料液をアフィニティカラムにかけた後、100 mM の NaCl で溶出し、溶出された画分に含まれる蛋白質濃度を求めた。

【結果と考察】

TOMES の活性は *C. tepidum* 反応中心への直接的な電子供与体である可溶性蛋白質 cyt_c-554 の還元を 554 nm で追跡して測定した。TOMES のコア成分である SoxYZ、SoxB、SoxAXK およびフラビン蛋白質 SoxF は細胞抽出物から各種クロマグラフィーを用いて単離精製した。また、SoxA、SoxX、SoxK の組換え蛋白質は大腸菌内による発現系を用いて作成した。質量分析は MALDI-TOF mass を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) SoxYZ の各種硫化物処理によるチオ硫酸の酸化活性と MALDI-TOF MS による SpXYZ の質量数の変化

SoxYZ はチオ硫酸を結合すると推定される保存されたシステイン残基を持つ。材料と方法に従って、SoxYZ を各種の硫黄化合物で前処理後、脱塩して過剰の硫黄化合物を除去し、その後、TOMES の活性を調べた。亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムで SoxYZ を前処理した場合、TOMES の活性は、未処理の場合と変わらなかった。一方、硫化ナトリウムで前処理した SoxYZ は未処理の場合と比較して 10 倍~20 倍程度活性が増大した。この結果より、SoxYZ は硫化ナトリウムで前処理した時に保護効果を示し、チオ硫酸多酵素系の酸化活性に大きく影響を与えることがこの結果から示された。10640 m/z 付近に出ているピークが SoxZ (10640.14 m/z) で、12856~12940 m/z 付近に出ているピークが SoxY (12856.74 m/z) である。硫化ナトリウム処理を行った SoxY は、低い活性を示した SoxY と比較して、質量数の増大を示さず、未処理の SoxY (12856.74 m/z) のピークと殆ど同じ値を示した。チオ硫酸ナトリウムと亜硫酸ナトリウムで前処理を行った SoxY については未処理の SoxY (12856.74 m/z) のピークから約 80 m/z の質量数の増加がみられた。この結果は、不活性な SoxY のシステイン残基に SO₃ が結合していることを示す。MALDI-TOF MS の分解能をさらに上げて測定したところ、硫化ナトリウムで処理した SoxY はアミノ酸配列から推定される質量数 12856 m/z 付近にピークが現れたが、亜硫酸ナトリウムとチオ硫酸ナトリウムで前処理した SoxY の質量数は、硫化ナトリウムで前処理した場合と比較して質量数が約 30~100 m/z ほど増大した。ところが、SH 基の保護剤である DTT で処理すると MALDI 活性の増大は見られなかった。MALDI の分解能を上げた測定では、硫化水素処理では 12,852 m/z と 12,885 m/z の大小 2 つのピークが現れたが、DTT 処理では主要なピークは 12,852 m/z のみであった。これらの結果から活性型の SoxYZ は 12,885 にピークが現れる SoxY を持つことが考えられる。このピークは SoxY(-SH) に S (32 m/z) が結合した SoxY(-S)-S-であると推定される。

(2) アフィニティカラムを用いた SoxF、TOMES 成分、Cyt_c 間の相互作用の解析

Cyt c-554 を固定化したアフィニティークラムを用いたタンパク質間の相互作用の結果を調べた。SoxF は MES-NaOH (pH6.0) の溶液中でカラムに吸着され、MES-NaOH (pH6.0) 100 mM NaCl により溶出された。これにより、SoxF との相互作用が示された。SoxAXK はカラムにかけると、そのまま通過することはなかったが、10 mM の MES-NaOH (pH6.0) で洗うと半分以上の SoxAXK が押し出された。さらに、100 mM NaCl を含む液に切り替えると、カラムに吸着していた残りの SoxAXK が溶出された。SoxYZ、SoxB については MES-NaOH (pH 6.0) 溶液中でカラムに吸着されなかったため、Cyt c-554 との相互作用は確認されなかった。

次に SoxF で固定したアフィニティークラムを用いたタンパク質間の相互作用を調べた。Cyt c-554 は MES-NaOH (pH6.0) の溶液中でカラムにそれぞれ吸着され、MES-NaOH (pH 6.0) 100 mM NaCl により溶出された。これにより、SoxF が Cyt c-554 と強い相互作用を持つことが示された。SoxYZ、SoxB、SoxAXK については MES-NaOH (pH6.0) 溶液中でカラムに吸着されなかったため、Cyt c-554 との相互作用を持つことは確認されなかった。

coreTOMES ではチオ硫酸は 2 電子酸化される。Ogawa ら (文献 5) は SoxAKX を構成する SoxA と SoxX がヘムを 1 個ずつ結合しているが、酸化還元電位の測定から SoxX のヘムだけがチオ硫酸からの電子を受容すると推定している。現段階では、もう 1 個の電子の受容体は不明であるが、Sauve ら (文献 8) が解いた SoxB の結晶構造解析から、SoxB は SoxYZ とリンクするモデルを提示している。Ogawa ら (文献 6) によって報告された SoxF は coreTOMES のいずれかの成分から電子を受け取り Cyt c-554 を還元することが予想され、上述の結晶構造から、その部位は SoxB である可能性が高い。本研究では、SoxF が Cyt c-554 と強い相互作用を持つ事を示したが、SoxF と SoxB の相互作用については、これを指示する結果は得られなかったが、本実験で用いたアフィニティークロマトには限界があるので、プラズモン共鳴など分子間相互作用を精密に測定できる装置を用いた研究が必要であろう。この場合、SoxB と SoxYZ を共存させるなど実験条件の工夫が必要である。

文献 (8) J. Biol. Chem. 32:21707-21718 (2009).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima and K. Inoue (2013)

Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application

Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 査読有り。2013, 17, 1-25

doi 10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001

〔学会発表〕(計 3 件)

小池祥子、本間祐紀、志賀倫子、瀬尾梯介、櫻井英博、井上和仁

Interaction of cytc and monomeric flavoprotein SoxF, which enhances thiosulfate oxidation activity of the core TOMES in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*

第 53 回日本植物生理学会年会、京都(2012)

Sakurai H., Ogawa T., Shiga M., Koike S., Seo D., Inoue K. (2012)

Inorganic sulfur oxidizing system of the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*, EMBO Symposium on Microbial Sulfur Metabolism, Noorewijkerhout, Netherlands

Koike S., Homma Y., Seo D., Sakurai H., Inoue K. (2013)

Effects of pretreatment of SoxYZ preparations with various reductants on subsequent thiosulfate oxidation activity of core TOMES in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. 第 54 回日本植物生理学会年会、岡山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
井上和仁 (INOUE Kazuhito)
神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：20221088

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：