

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780081

研究課題名(和文) フェントン反応は生体内で鉄還元反応により引き起こされるのか？

研究課題名(英文) Dose Fenton reaction occur by iron reduction in vivo?

研究代表者

佐藤 純一 (SATO, Junichi)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：70439884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内鉄還元酵素反応のフェントン反応への関与を明らかにするため、細胞内で鉄還元反応に関与すると推定される酵素、鉄貯蔵タンパク質の精製を行った。更に、鉄還元酵素反応にはタンパク質非結合フラビン(遊離フラビン)の関与が知られていることから、大腸菌とラン藻の細胞内から遊離フラビンを同定、定量した。細胞内から見いだされた遊離フラビン存在下で鉄還元反応が観察された。遊離フラビンが関与する鉄還元反応が細胞内においても起こりうることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the involvement of ferric reductase reaction in Fenton reaction, we purified ferric reductases and iron storage proteins involved in iron reduction. Additionally, we quantified non-protein bound flavin (free flavin) in cells of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. PCC6803 because free flavins were known to be involved in ferric reductase reaction. The ferric reductase reaction was observed under the concentration of the free flavins. These results suggest that the ferric reductase reaction involving free flavins may occur in vivo.

研究分野：応用微生物学、生化学

キーワード：フェントン反応 鉄 鉄還元酵素 フラビン

1. 研究開始当初の背景

生物は鉄を呼吸鎖や TCA サイクル、酸素の運搬、光合成、窒素固定、DNA 合成などで、鉄硫黄タンパク質、ヘムタンパク質などの補因子として利用しており、通常は三価鉄の状態が存在する。この三価鉄が生体内で補因子としてタンパク質に取り込まれ、機能するためには、鉄は二価鉄に還元される必要がある。しかし、還元生成物である二価鉄は強毒性の活性酸素（ヒドロキシルラジカル）を生成するフェントン反応に関与する。鉄利用を目的とした細胞内の鉄還元反応の研究において、フェントン反応に関する研究報告はあるものの、その報告例は少なかった。

2002 年に Woodmansee らは、大腸菌のフラビン還元酵素が遊離フラビン存在下で三価の鉄化合物を還元し、フェントン反応に関与することを提唱した。このフェントン反応は、大腸菌の呼吸鎖を止め、生体内を過還元状態にすることにより引き起こされた。過還元状態は、光合成生物においては、光合成で生成される電子が過剰になった場合においても起きると考えられる。我々のグループは、光合成微生物であるラン藻の無細胞抽出液中に遊離フラビン存在下で鉄キレート化合物を還元し、フェントン反応を引き起こす活性を検出し、DrgA タンパク質がこの反応に関与することを見いだした。申請者らは、大腸菌、ラン藻で既に報告されている酵素と同様の反応を示す酵素活性を真核光合成微生物であるクロレラの無細胞抽出液においても検出し、1 種類の酵素 (aldo-keto reductase) を精製した。

更に、遊離フラビン存在下のみならず非存在下においても鉄還元反応を示し、フェントン反応を引き起こす酵素を大腸菌から 2 種類 (oxygen insensitive NAD(P)H nitroreductase、ferredoxin-NADP⁺ reductase (FNR))、ラン藻から 1 種類 (FNR)、クロレラから 1 種類 (FNR) 新たに精製した。FNR は 3 生物種に共通する酵素として精製され、共に遊離 flavin 非存在下で鉄還元反応を触媒するが、遊離 flavin の添加により鉄還元活性が著しく増加する。そのため、遊離フラビンが鉄還元反応の促進効果に寄与することが示唆されている。実際、遊離フラビンが大腸菌、ラン藻、クロレラの無細胞抽出液中から検出されたことから、遊離フラビンが関与した細胞内鉄還元反応に

興味を持たれた。

2. 研究の目的

本研究は、生体内における鉄還元反応について、鉄還元酵素だけでなく、生体内微量必須物質である鉄、タンパク質非結合のビタミン (遊離フラビン) を含めた、鉄還元反応において必要な因子を取得し、これらを用いて鉄還元反応を反応性の面から明らかにするために研究を行う。

3. 研究の方法

- (1) 大腸菌、ラン藻において鉄還元反応、フェントン反応に関与する酵素の精製、および関連因子の同定、定量

遊離 flavin 存在下、非存在下における鉄還元活性を指標にして、大腸菌、ラン藻の無細胞抽出液中から未だ精製されていない鉄還元酵素精製、同定を行なった。遊離フラビン関与の鉄還元酵素はフラビン還元活性を有するとの報告もあるため、この活性も測定した。精製後、酵素学的諸性質を調べた。

細胞内鉄として鉄貯蔵タンパク質に着目し、鉄貯蔵タンパク質、鉄還元酵素、遊離フラビンとの反応を解析するため、大腸菌によるタンパク質過剰発現系を構築し、大腸菌およびラン藻由来鉄貯蔵タンパク質の大量取得を行った。

HPLC 法を用いて、大腸菌、ラン藻の生体内遊離 (非タンパク質結合) フラビンの検出及び定量を行った。

- (2) 鉄還元反応、フェントン反応に関与する酵素および因子を用いた反応解析

精製した鉄還元酵素と鉄貯蔵タンパク質、大腸菌・ラン藻の生体内から検出、定量された遊離フラビンを用いて、酵素反応速度解析や最終反応性生物の解析を行った。

遊離フラビンと各種鉄化合物を嫌気条件下で反応させ、酵素が関与しない鉄還元反応について解析した。

- (3) 大腸菌とラン藻から精製された鉄還元酵素は細胞内で鉄ストレス及び鉄利用への関与が推定される。そこで鉄濃度変化培養した大腸菌とラン藻を用いて、精製さ

れた鉄還元酵素の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 大腸菌、ラン藻において鉄還元反応、フェントン反応に關与する酵素の精製、および關連因子の同定、定量

大腸菌とラン藻における鉄還元活性を有する酵素の探索：2種類の活性測定法で鉄還元活性を測定し、鉄還元酵素の精製を試みた。更に鉄還元酵素はフラビン還元活性を有するとの報告もあることから、フラビン還元活性も併せて測定した。鉄還元活性を指標とした大腸菌の無細胞抽出の分画によって、6つの活性画分が得られた。この活性画分のうち3つの活性画分で高いフラビン還元活性が觀察された。そこで、これら酵素の精製を試みた結果、我々が鉄還元酵素として既に報告済みである ferredoxin-NADP⁺ reductase (FNR)、フラビン還元活性を示す鉄還元酵素として報告がある flavin reductase (Fre)、過酸化物質還元酵素として報告がある alkylhydroperoxide reductase subunitF (AhpF) を新たに精製した。諸性質検討の結果、Fpr は遊離フラビン非關与の鉄還元酵素であり、Fre と AhpF は遊離フラビン關与の鉄還元酵素であった。一方、ラン藻の無細胞抽出液からは2つの鉄還元活性画分が検出され、これら2つの活性画分からはフラビン還元活性が検出された。ウエスタン解析の結果、2つの画分は鉄還元酵素として報告がある、DrgA タンパク質と FNR であることが明らかになった。以上の結果から、大腸菌では三種類、ラン藻では二種類の酵素が、鉄還元酵素として機能していると示唆された。大腸菌とラン藻由来の鉄貯蔵タンパク質の大量取得：大腸菌由来の鉄貯蔵タンパク質である ferritinA (FtnA)、bacterioferritin (Bfr)、ラン藻由来の鉄貯蔵タンパク質である bacterioferritinA (BfrA)、bacterioferritinB (BfrB) を大腸菌で過剰発現させ、各種カラムとグラフィーで精製した。精製された鉄貯蔵タンパク質への鉄導入系を確立し、スペクトル変化

の觀察と導入された鉄を直接検出することにより、鉄が導入された鉄貯蔵タンパク質の取得に成功した。

大腸菌とラン藻の細胞内遊離フラビンの定量：大腸菌とラン藻の無細胞抽出液を調製し、タンパク質画分と非タンパク質画分に分画した。その後、HPLC を用いて定量を試みた結果、大腸菌からは遊離 FAD、遊離 FMN、リボフラビンを、ラン藻からは遊離 FMN を定量することに成功した。更に大腸菌では遊離 FAD が最も多く存在した。

(2) 鉄還元反応、フェントン反応に關与する酵素および因子を用いた反応解析

鉄還元酵素、鉄貯蔵タンパク質、遊離フラビンを用いた反応解析：大腸菌の遊離フラビン非關与の鉄還元酵素である Fpr と NfnB、遊離フラビン關与の鉄還元酵素である Fre と AhpF、大腸菌の鉄貯蔵タンパク質である FtnA と Bfr を用い、遊離フラビン存在下、非存在下における反応性を検討した。FtnA と Bfr 内に貯蔵された三価鉄は還元されると二価鉄として放出されることから、この二価鉄放出反応を觀察した。その結果、全ての酵素において、遊離フラビン非存在下では FtnA と Bfr からの二価鉄放出は觀察されないが、遊離フラビン存在下においては二価鉄放出反応が觀察された。この二価鉄放出速度は酵素による違いが觀察されたため、各酵素のフラビンに対する酵素反応速度論解析を行った。その結果、FAD に対する触媒効率、Fre、AhpF、Fpr、NfnB の順で高い値を示した。

遊離フラビンと鉄化合物を用いた反応解析：遊離還元フラビンを作製し、各種鉄化合物と反応させた結果、反応速度に違いが觀察された。中でも Fe(III)-EDTA が最も高速に反応した。この速度は遊離フラビンと酸素との反応速度よりも速かった。

(3) 大腸菌とラン藻の鉄濃度変化培養時における精製酵素の発現解析

大腸菌を鉄十分条件、鉄制限条件で培養し、遺伝子発現解析、タンパク質発現解析を試み

た。精製酵素の中でもフラビン還元活性を有し、既知の鉄還元酵素として報告済みの ferredoxin NADP⁺ reductase (FNR)は、鉄制限条件下でタンパク質の発現上昇が観察された。しかし、遺伝子発現解析では FNR をコードする遺伝子、それ以外の精製酵素をコードする遺伝子とも顕著な発現誘導は観察されなかった。ラン藻においても同様の実験を行ったが、DrgA、FNR において顕著な発現の差は観察されなかった。

本研究は、細胞内鉄還元反応のフェントン反応への関与を明らかにするため、細胞内で鉄還元反応に関与すると推定される酵素、鉄貯蔵タンパク質、フラビンを同定、定量し、反応解析を行ってきた。特にフラビンは一般的にタンパク質に結合し機能すると考えられることから、遊離フラビンを見だし、定量された濃度で鉄還元反応を解析したことは、非常に意義がある。遊離フラビンが関与する鉄還元反応が大腸菌とラン藻の細胞内においても起こりうる事が示唆された。特に細胞内鉄貯蔵タンパク質からの二価鉄放出反応が観察されていることから、今後は放出された二価鉄と細胞内過酸化水素と反応の有無を観察することで、フェントン反応が引き起こされるかを検討する必要がある。

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3件)

Toshiaki Arai, Shinya Kimata, Daichi Mochizuki, Keita Hara, Tamotsu Zako, Masafumi Odaka, Masafumi Yohda, Fumio Arisaka, Shuji Kanamaru, Takashi Matsumoto, Shunsuke Yajima, Junichi Sato, Shinji Kawasaki, Youichi Niimura NADH oxidase and alkyl hydroperoxide reductase subunit C (peroxiredoxin) from *Amphibacillus xylanus* form an oligomeric assembly FEBS Open Bio 査読有 vol. 5 2015 p. 124-131 DOI: 10.1016/j.fob.2015.01.005

Mochizuki D, Arai T, Asano M, Sasakura N, Watanabe T, Shiwa Y, Nakamura S, Katano Y, Fujinami S, Fujita N, Abe A, Sato J, Nakagawa J, Niimura Y. Adaptive response of

Amphibacillus xylanus to normal aerobic and forced oxidative stress conditions. Microbiology 査読有 vol. 160 no. Pt 2 2014 p. 340-352. DOI: 10.1099/mic.0.068726-0

Daichi Mochizuki, Naoto Tanaka, Morio Ishikawa, Akihito Endo, Yuh Shiwa, Nobuyuki Fujita, Junichi Sato and Youichi Niimura Evolution and diversification of oxygen metabolisms of aerotolerant anaerobes in the order Bacillales and other bacterial taxonomic groups The Bulletin of BISMis 査読有 vol.3 2011 p.1-18 DOI:なし

[学会発表](計20件)

佐藤純一、中元翔太、石井達也、武田晃治、吉村悦郎、中川純一、阿部晃、木俣真弥、川崎信治、新村洋一 大腸菌におけるフラビン還元酵素による鉄貯蔵タンパク質からの二価鉄放出反応 日本農芸化学会2015年大会 2015年3月26日～2015年3月29日 岡山大学

佐藤純一、関野滉太、田中英資、森鉄也、石井達也、武田晃治、吉村悦郎、中川純一、阿部晃、新町文絵、木俣真弥、川崎信治、新村洋一 光合成生物におけるタンパク質非結合フラビンが関与する鉄還元酵素反応 日本農芸化学会2015年大会 2015年3月26日～2015年3月29日 岡山大学

木俣真弥、富塚駿、名須川哲哉、望月大地、藤田信之、阿部晃、中川純一、佐藤純一、川崎信治、新村洋一 *Amphibacillus xylanus*における遊離フラビンが関与する好気代謝と微生物界における遊離フラビンの分布(第2報) 日本農芸化学会2015年大会 2015年3月26日～2015年3月29日 岡山大学

木俣真弥、望月大地、原敬太、松本崇、矢嶋俊介、有坂文雄、金丸周司、佐藤純一、川崎信治、新村洋一 *Amphibacillus xylanus*のNADH oxidase (Nox)-AhpC (Prx)複合体の溶液構造 日本農芸化学会2015

年大会 2015年3月26日～2015年3月29日
岡山大学

佐藤純一、関野滉太、富塚駿、田中英資、石井達也、新町文絵、木俣真弥、川崎信治、新村洋一 微生物と植物におけるタンパク質非結合フラビン 第56回日本植物生理学会年会 2015年3月16日～2015年3月18日 東京農業大学世田谷キャンパス

J. Sato, and S. Kimata. Iron release from iron storage protein by *Escherichia coli* ferric reductases in the presence or absence of free flavins. (invited speaker) 18th International Symposium on Flavins and Flavoproteins 2014年7月27日～2014年8月1日 the Regent Cha-Am Beach Resort, Thailand

Junichi Sato, Eisuke Tanaka, Tetsuya Mori, Kouji Takeda, Etsuro Yoshimura, Junichi Nakagawa, Akira Abe, Shinji Kawasaki, and Youichi Niimura; Iron release from iron storage protein by *Escherichia coli* ferric reductases in the presence or absence of free flavins. 18th International Symposium on Flavins and Flavoproteins 2014年7月27日～2014年8月1日 the Regent Cha-Am Beach Resort, Thailand

D. Mochizuki, S. Kimata, T. Matsumoto, T. Arai, K. Hara, J. Sato, S. Kawasaki, S. Kanamaru, F. Arisaka and Y. Niimura. NADH oxidase-AhpC (Prx) system functional as NADH oxidase and NADH peroxidase <Protein interaction and its physiological role in *Amphibacillus xylanus*>. 18th International Symposium on Flavins and Flavoproteins 2014年7月27日～2014年8月1日 the Regent Cha-Am Beach Resort, Thailand

佐藤純一、湯本小百合、中元翔太、石井達也、武田晃治、吉村悦郎、中川純一、西田雄三、阿部晃、川崎信治、新村洋一 大腸菌における鉄還元酵素の探索 日本農芸化学会2014年度大会 2014年3月27日～2014年3月30日 明治大学生田キャンパス

望月大地、新井俊晃、原敬太、有坂文雄、松本崇、中川純一、佐藤純一、川崎信治、新村洋一 過酸化水素分解酵素系 NADH oxidase(Nox)- AhpC(Prx)の複合体形成(第5報) 日本農芸化学会2014年度大会 2014年3月27日～2014年3月30日 明治大学生田キャンパス

木俣真弥、望月大地、富塚駿、新井俊晃、藤田信之、阿部晃、中川純一、佐藤純一、川崎信治、新村洋一 *Amphibacillus xylanus* における遊離フラビン関与の好気代謝と微生物界における遊離フラビンの分布 日本農芸化学会2014年度大会 2014年3月27日～2014年3月30日 明治大学生田キャンパス

西田俊介、川村友亮、浅石真由、望月大地、藤田信之、佐藤純一、川崎信治、新村洋一 アルカリ性嫌気条件下で生産される *Amphibacillus xylanus* の xylan 分解酵素(第3報) 日本農芸化学会2014年度大会 2014年3月27日～2014年3月30日 明治大学生田キャンパス

望月大地、新井俊晃、志波優、藤波俊、藤田信之、佐藤純一、川崎信治、新村洋一 *Amphibacillus xylanus* の好気代謝系に関する研究 第8回日本ゲノム微生物学会 2014年3月7日～2014年3月9日

佐藤純一、森鉄也、田中英資、武田晃治、安補充、吉村悦郎、中川純一、阿部晃、西田雄三、川崎信治、新村洋一 ラン藻と大腸菌の鉄還元酵素(第5報) 日本農芸化学会2013年大会 2013年3月24日～2013年3月27日 東北大学

木俣真弥、望月大地、新井俊晃、藤田信之、阿部晃、中川純一、佐藤純一、川崎信治、新村洋一 *Amphibacillus xylanus* における遊離フラビン関与の酸素代謝(第3報) 日本農芸化学会2013年大会 2013年3月24日～2013年3月27日 東北大学

西田俊介、佐藤梓、佐藤ひかる、望月大地、藤田信之、佐藤純一、川崎信治、新

村洋一 アルカリ性嫌気条件下で生産される*Amphibacillus xylanus*のxylan分解酵素
日本農芸化学会2013年大会 2013年3月
24日～2013年3月27日 東北大学

()
研究者番号：

梅澤秀幸、村岡陽介、横塚敢、田代光、
大山修平、下園建志、深谷太樹、渡邊昭
夫、佐藤純一、新村洋一 過酸化水素分解
活性を有する乳酸菌の酵素関連代謝系
日本農芸化学会2013年大会 2013年3月
24日～2013年3月27日 東北大学

望月大地、新井俊晃、田中尚人、志波優、
藤田信之、佐藤純一、川崎信治、新村洋
一 キシラン利用菌*Amphibacillus xylanus*
の網羅的手法を用いた代謝経路の解析
日本農芸化学会2013年大会 2013年3月
24日～2013年3月27日 東北大学

望月大地、新井俊晃、木俣真弥、原敬太、
佐藤純一、川崎信治、新村洋一
*Amphibacillus xylanus*の遊離フラビン関与
の酸素代謝 第16回生体触媒化学シンポ
ジウムin富山 2012年11月29日～11月30
日 富山県民会館

森鉄也、田中英資、佐藤純一、武田 晃治、
安保充、吉村 悦郎、中川 純一、阿部 晃、
川崎 信治、新村 洋一 ラン藻と大腸菌
の鉄還元酵素 日本農芸化学会2012年度
関東支部会 2012年11月29日～2012年11
月30日、新潟薬科大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 純一 (SATO, Junichi)
東京農業大学・応用生物科学部・助教
研究者番号：70439884

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者