

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19570125  
 研究課題名（和文） マルチヘム型一酸化窒素還元酵素を用いたプロトンポンプ分子進化過程の解明  
 研究課題名（英文） Studies on the molecular evolution process of proton pumps by mutations of the multiheme-containing nitric oxide reductase  
 研究代表者  
 片岡 邦重（KATAOKA KUNISHIGE）  
 金沢大学・物質化学系・准教授  
 研究者番号：40252712

研究成果の概要（和文）：プロトンポンプの分子進化過程を明らかにするために、一酸化窒素還元酵素(NOR)の異種発現系を構築し、ヘム  $b_3$ -Fe<sub>B</sub> 複核活性中心を構成する Fe<sub>B</sub> 配位残基に変異を導入した。Glu190, Glu194 及び Glu259 を対象に Ala, Asp, Gln 置換変異体を作製したところ、何れの変異体も複核中心の形成が阻害され、これらの残基が NOR の活性中心形成に重要であることが明らかになった。また、NOR の生理的電子供与体を検索し、3 種類の可溶性 Cyt *c* を単離することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the molecular evolution process of proton pump, Glu190, Glu194, and Glu259, which coordinate the non-heme iron (Fe<sub>B</sub>) center in the catalytic site of nitric oxide reductase (NOR) were replaced with Ala, Asp, or Gln residues. The intact catalytic center has not been formed in mutants presumably because these glutamate residues are intrinsic for NOR. Furthermore, three soluble Cyt *c*'s have been isolated as a candidate for the physiological electron donor of NOR.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2008年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 2009年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：酵素化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：マルチヘム型一酸化窒素還元酵素, プロトンポンプ, 分子進化

## 1. 研究開始当初の背景

地球上の窒素化合物をガス状の窒素酸化

物、最後には窒素分子に還元して大気中に放出する硝酸塩呼吸を脱窒と呼ぶ。脱窒課程の各反応はそれぞれ異なる金属含有酵素が触媒しており、その重要な酵素の1つがNOを $N_2O$ に1電子還元する一酸化窒素還元酵素 (nitric oxide reductase; NOR) である。

マルチヘム型 NOR は、可溶性シトクロム *c* からの電子受容部である C 型ヘムを含む NorC (小サブユニット) と活性中心を含む NorB (大サブユニット) からなるヘテロ二量体構造をとり、NorB は酸素還元反応を触媒する酸素呼吸鎖シトクロム *c* 酸化酵素 (C $\alpha$ 0) の属するヘム-銅オキシダーゼ (HCu0s) の触媒サブユニットと同一性がある。HCu0s では、12本の膜貫通ヘリックスの等価な位置に金属結合に重要な6残基のHisが保存されており、そのうち2残基は低スピンヘムに、1残基は高スピンヘムに配位し、残りの3残基は高スピンヘムと複核中心を形成する銅 Cu $_B$  に配位する。NorB には低スピンヘム *b* と高スピンヘム *b* $_3$  が含まれるが、HCu0s の Cu $_B$  の代わりに非ヘム鉄が (*b* $_3$ -Fe $_B$ ) 複核活性中心を形成すると考えられている。C $\alpha$ 0 は酸素還元に関与したプロトンポンプ能を有し、ATP合成のためのプロトンの電気化学ポテンシャル差の形成に関与しているが、NOR は C $\alpha$ 0 と異なりプロトンポンプ活性が無く、NO還元活性がATP合成と共役していない。このため、硝酸呼吸系の *cbb* $_3$  型 NOR が C $\alpha$ 0 に進化する過程でプロトンポンプ能を獲得したと考えられている。従って、NOR の構造・機能解析は呼吸系酵素の進化の道筋を明らかにする観点から非常に重要な課題と言える。

とりわけ、NOR が一酸化窒素還元活性の他に酸素還元活性を示すのに対し、C $\alpha$ 0 は酸素還元活性のみを示すことから、その活性中心構造と触媒反応活性の相関に興味を持たれているが、これまでに詳しい研究は行われていない。また、活性中心へのプロトン供給ルートについて、NOR はペリプラズム側 (*P*-side) からプロトンを得ると考えられているが、C $\alpha$ 0 はいわゆる D 経路と K 経路と呼ばれる2つのルートでサイトプラズム側 (*N*-side) からプロトンを汲み上げている。変異導入により NOR のプロトン輸送経路を C $\alpha$ 0 型に改変することも可能であると考えられる。NOR をベースに人工的にプロトンポ

ンプ能を付与するためには、さらにポンププロトンの排出経路と、C $\alpha$ 0 でも明らかにされていないプロトンを一方向に輸送するためのプロトンスイッチ機構を NOR に組み込まなければならないが、逆に NOR を研究材料とすることで、プロトンスイッチの本質に迫ることができると考えられる。

以上のように、マルチヘム型 NOR の発現系の構築と機能解析及び機能改変は、プロトンポンプ機能の獲得過程に多くの知見をもたらすと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、脱窒菌 *Halomonas halodenitrificans* (旧称 *Palacoccus halodenitrificans*) 由来の *cbb* $_3$  型 NOR を対象に、発現系を構築し、変異導入により NOR の構造と反応メカニズムを解析し、*cbb* $_3$  型 NOR から C $\alpha$ 0 へのプロトンポンプの分子進化過程を明らかにすることを目的としている。これまでに NOR の異種発現と変異導入は2001年にイギリスのグループが報告しているのみで続報がなく、分子生物学的手法を用いた NOR の機能解析はほとんど進んでいない。有効な発現系が構築できれば変異導入による NOR と C $\alpha$ 0 の比較研究を行うことができ、さらに、NOR へプロトンポンプ能を付与する機能改変が可能となる。そこで本研究では、以下に挙げる4つの研究課題に取り組むことを予定していた。(1) NOR への変異導入が可能である大腸菌を宿主とする異種発現系と原株を宿主とする同種発現系を構築し、(2) 非ヘム鉄の配位アミノ酸残基に変異を導入することにより *b* $_3$ -Fe $_B$  複核活性中心を C $\alpha$ 0 と等価な高スピンヘム-銅 (*b* $_3$ -Cu $_B$ ) 中心に改変し、酸素還元活性の増大を試みる。(3) NOR における切断された膜の内側 (*N*-side) からのプロトン輸送経路を変異導入により構築し、複数の経路を通じて活性中心にプロトンが供給される変異型酵素の作成を目指す。(4) NOR への生理的電子供与タンパク質を単離し、NOR の分光学的活性測定系を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換え型 NOR の発現系構築

大腸菌から C 型シトクロム成熟化因子 (*ccm*) 遺伝子群 (*ccmA, B, C, D, E, F, G, H*) をクローン化し、発現プラスミド pSTV $ccm$  を構築し

た。*H. halodenitrificans* 由来の NOR 遺伝子群 (*norC*, *B*, *Q*, *D*, *E*) を *lac* プロモーターの制御下に挿入した NOR 発現プラスミド pTVNORdSL と pSTVccm の両方を用いて大腸菌を形質転換することにより、ホロ型 NOR の異種発現系を構築した。組換え型酵素は野生型酵素と同様に精製し、その分光学的性質と NOR 活性を検討した。

*H. halodenitrificans* を宿主とする同種発現系では、*NorB* 遺伝子をテトラサイクリン分解酵素遺伝子の挿入により破壊した NOR 遺伝子群を保持する自殺ベクターを構築し、これを保持する大腸菌との異種接合と相同組換えにより NOR 欠損株を作出した。この NOR 欠損株に野生型 NOR 遺伝子を組換えることにより、組換え型 NOR 同種発現系の構築を試みた。

(2) 部位特異的変異導入による  $b_3$ -Fe<sub>B</sub> 複核活性中心から  $b_3$ -Cu<sub>B</sub> 中心への変換

*H. halodenitrificans* NOR の  $b_3$ -Fe<sub>B</sub> 複核中心を構成する Fe<sub>B</sub> 配位残基に変異を導入し、Fe<sub>B</sub> 部位を Cu<sub>B</sub> 部位に改変するため、*ccb3* 型 NOR に完全に保存されている Glu 残基のうち 3 残基、膜貫通ヘリックス VI 上に存在すると考えられる Glu190 および Glu194 とヘリックス VIII 上の Glu259 を標的に、QuikChange 法により Glu190Ala, Glu190Asp, Glu194Ala, Glu194Asp, Glu194Gln, Glu259Ala, 及び Glu259Asp の 7 種の変異型酵素遺伝子を作製した。変異体の発現は、大腸菌を宿主とする異種発現系を用いて行った。変異体を野生型 NOR と同様の操作で精製し、精製酵素の各種分光学的性質を検討した。

(3) NOR に対する生理的電子供与タンパク質の検索と分光学的活性測定法の開発

*H. halodenitrificans* 菌体を超音波破碎した後の無細胞抽出液から、イオン交換、疎水性、及びゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、3 種類の可溶性シトクロム *c* を単離精製した。これらのシトクロム *c* について分光学的性質、N 末端アミノ酸配列、及び NOR との電子移動反応について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組換え型 NOR の発現系構築

###### ① 異種発現系の構築

*H. halodenitrificans* 由来の NOR 遺伝子群 (*norC*, *B*, *Q*, *D*, *E*) は既に本研究室でクローン化され、ヘム合成能が増強された大腸菌 *E. coli* JCB7120 株を宿主に用いて、

NorC, NorB それぞれサブユニット単独での発現に成功している。NOR の成熟に必要であると考えられるアクセサリ遺伝子を含め、NOR 遺伝子群すべてをプラスミドに挿入し、同じ宿主を用いてヘム *c*, *b*, *b*<sub>3</sub>, Fe<sub>B</sub> 全ての金属中心を含むホロ NOR の発現系を構築したが、これまではヘム *c* の欠損した活性の無い酵素しか得られなかった。本研究では、C 型ヘムの挿入系 *ccm* 遺伝子群をクローン化したプラスミドとともに NOR 遺伝子群の発現プラスミドで宿主大腸菌を共形質転換することで、ヘム *c* を含むホロ体の組換え型 NOR の異種発現に初めて成功した。組換え型 NOR は、原株から精製した野生型 NOR と一致する分光学的性質を示し、野生型 NOR の約 30% の活性を保持していた。

###### ② 同種発現系の構築

原株を用いた同種発現系構築のために作製した *H. halodenitrificans* の NOR 欠失変異株の性質を検討した。欠失変異株は脱窒により生成する NO を処理できないため、脱窒条件下でほとんど生育せず、NorB サブユニット遺伝子のみを破壊したにもかかわらず、無細胞抽出液中に NorC サブユニットも検出されなかった。

次に NorB の C 末端に 6xHis Tag を付加した組換え型 NorB をコードする遺伝子を含む自殺ベクターを用いて、異種接合と相同組換えによる組換え型 NOR 発現株 (復帰株) の作製を行った。しかし、これまでに復帰株の取得には至っておらず、変異型 NOR の同種発現には成功していない。

以上の結果は、大腸菌を宿主とする異種発現系を用いて組換え型 NOR 及び変異型 NOR の作製が可能であることを示しており、NOR をプロトンポンプのモデルタンパク質とする機能改変研究に道を開いた意義は大きいと言える。

(2) 部位特異的変異導入による  $b_3$ -Fe<sub>B</sub> 複核活性中心から  $b_3$ -Cu<sub>B</sub> 中心への変換

鉄は 6 配位 8 面体構造を好むため、C<sub>60</sub> の Cu<sub>B</sub> 部位との相同性から明らかな 3 つの保存性 His 残基 (His186, His237, His238) 以外にも Fe<sub>B</sub> 配位残基が少なくとも 2 残基存在すると考えられる。保存性 His186 と同じ膜貫通ヘリックス VI 上の Glu190 と、ヘリッ

クス VIII 上の Glu259 の 2 残基は  $cbb_3$  型 NOR に完全に保存されていて、保存性 His 残基と合わせてこれらの 5 アミノ酸残基とオキソ架橋により  $Fe_8$  は 8 面体配位構造を取ると予想される。従って Glu190, Glu259 を Val, Ala などの非配位性疎水性残基に置換する変異を導入すると、残る 3 残基の保存性 His とオキソ架橋により銅に特異性の高い平面 4 配位-4 面体配位場を構築することができると予想した。さらにヘリックス VI には Glu194 が存在し、この残基も配位残基となる可能性がある。そこでこれらを非配位性残基に置換することで銅に対応する部位を作出することを試みた。

Glu190, Glu194 及び Glu259 を対象に Ala, Asp, Gln 置換変異体を作製しその分光学的性質の検討を行ったところ、これらの変異体はいずれも NorC サブユニットの C 型ヘム含量が低下し、特に Ala 変異体のヘム  $c$  含量の低下が大きかった。NorC サブユニット含量は低下していないことから、異種発現時に  $ccm$  系のシャペロン機能が低かったと考えられるが、これは今後の発現条件の検討及び同種発現系を用いることで解決可能であると考えている。

また、吸収スペクトルにおける 600 nm 付近のヘム  $b_3$ - $Fe_B$  複核中心由来の吸収から判断すると、何れの変異体も複核中心の形成が阻害されていた。従って、Glu190, 194, 259 は NOR の複核活性中心の架橋構造形成に重要な役割を果たす残基であることが明らかになった。今後、二重変異体を作製することにより、NOR の活性中心構造を  $b_3$ - $Cu_B$  複核中心に改変し、酸素還元活性を増大させることが期待される。

### (3) 生理的電子供与体の単離

NOR の分光学的活性測定系の構築を目指し、原株の *H. halodenitrificans* から NOR への電子供与タンパク質の候補である可溶性シトクロム  $c$  (Cyt  $c$ ) の検索に取り組んだ。各種クロマトグラフィーを用いて 3 種類の可溶性 Cyt  $c$  を単離することに成功し、分子量と・吸収帯のピーク波長からそれぞれ、24 kDa Cyt  $c_{549}$ , 12 kDa Cyt  $c_{554}$ , 44 kDa Cyt  $c_{554}$  とした。N 末端アミノ酸配列を解析したところ、12 kDa と 44 kDa の Cyt  $c_{554}$  はバク

テリア由来の他のシトクロム  $c$  類と相同性を示すことが明らかになった。12 kDa Cyt  $c_{554}$  は MCD 及び EPR スペクトルにより低スピン型であることが確認され、331 mV の酸化還元電位を示した。しかしながら、この 12 kDa Cyt  $c_{554}$  と NOR との電子移動反応を検討したが、速度定数は高くなかった。今後、単離した Cyt  $c$  を用いる簡便な活性測定系の開発と、NOR 変異体の活性評価が期待される。

## 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)

[学会発表] (計 5 件)

1. 正田宗大, 脱窒菌一酸化窒素還元酵素の複核中心近傍に存在する酸性アミノ酸残基の機能解析, 平成 21 年度日本化学会近畿支部会北陸地区研究発表会, 2009 年 11 月 28 日, 北陸先端科学技術大学院大学(石川県)

2. 早川慎二, 脱窒菌の可溶性 cyt  $c$  の精製と電子受容タンパク質との反応, 平成 21 年度日本化学会近畿支部会北陸地区研究発表会, 2009 年 11 月 28 日, 北陸先端科学技術大学院大学(石川県)

3. 正田宗大, 変異導入と電子供与体との反応による *Halomonas halodenitrificans* 一酸化窒素還元酵素の機能解明, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)

4. 片岡邦重, *Halomonas halodenitrificans* の一酸化窒素還元酵素欠損株の作製と性質, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 29 日, マリンメッセ福岡(福岡県)

5. 正田宗大, E190A 変異型一酸化窒素還元酵素の分光学的性質, 第 58 回錯体化学討論会, 2008 年 9 月 21 日, 金沢大学(石川県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 邦重 (KATAOKA KUNISHIGE)  
金沢大学・物質化学系・准教授  
研究者番号: 40252712