

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07099

研究課題名(和文)嫌気実験系を利用したニトロゲナーゼのレドックス制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the redox regulation of nitrogenase using anaerobic experimental system

研究代表者

野亦 次郎(nomata, jiro)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：40583216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ニトロゲナーゼは分子状窒素をアンモニアに還元する複雑な金属酵素であり、この地球上の窒素動態において極めて重要な酵素である。ニトロゲナーゼは酸素感受性の金属中心を保持しており、NifUを含む15以上の蛋白質や酵素によって活性化され、窒素固定活性を得ることが知られている。本研究では、嫌気条件下で酸素感受性タンパク質の生化学的解析を行うための研究基盤を構築し、窒素固定性ラン藻に由来するNifUおよびNifU類似蛋白質について、Trxによる活性制御機構の解明を試みた。その結果、NifU、NifU類似蛋白質はいずれも、Trxとの反応性を示すなど、レドックス制御される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anabaena sp. strain PCC 7120 (A.7120) is a diazotrophic cyanobacterium, which can fix atmospheric nitrogen by utilizing nitrogenase. NifU protein plays a crucial role as a scaffold protein for the assembly of the Fe-S clusters required for the full activation of nitrogenase. Recently, we showed NifU protein is a target of thioredoxin (Trx) in A7120, and N-terminal catalytic domain of NifU(UN) was reduced by TrxM1. In this work, based on the anaerobic biochemical analysis, we showed disulfide bond formed in the C-terminal catalytic domain of NifU(UC) was reduced by TrxM1. In contrast to the UN, disulfide bond formed in UC was reduced by glutathione. Further, we studied redox regulation of NifU-like protein, NifU2. We observed that the disulfide bonds formed in the NifU2 was reduced by Trx isoforms and glutathione with different efficiency. This result indicates that Trxs may be involved in the Fe-S cluster biogenesis by NifU2.

研究分野：嫌気生化学

キーワード：鉄硫黄クラスター チオレドキシソ シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

チオレドキシニン(Trx)はこれまでゲノムが解読されたほとんど全ての生物に普遍的に存在し、光合成をはじめ、様々な代謝系を触媒する酵素(蛋白質)の活性を調節する重要な蛋白質である。Trxは、分子量が約12kDaの蛋白質で、その活性部位には2つのシステイン残基を含む保存されたモチーフ(WCGPC)を持つ。Trxはこの2つのシステイン残基のチオール基(-SH)を利用し、標的蛋白質のジスルフィド結合(S-S)を還元し、自身は酸化型となる。Trxは、このジチオール-ジスルフィド交換反応によって標的蛋白質の活性を調節する。さらに、ペルオキシレドキシニンなどの抗酸化活性を持つ酵素へ還元力を供給して、細胞内の過酸化物の除去をはじめとする生体の防御機構にも関与するなど、抗酸化システムとしても重要な役割を担っている。

Trxが標的とする蛋白質の多くは、プロテオーム解析法『チオレドキシニンアフィニティークロマトグラフィー』によって捕捉されてきた。これまでに高等植物では500種類以上の蛋白質が標的候補として同定されている。これらには、RuBisCoやMg-キラターゼ、翻訳伸長因子、分子シャペロン、ATP合成/分解酵素、RNA polymerase、鉄硫黄クラスターの生合成に関わる酵素なども含まれており、Trxによる制御システムが光合成のみならず多くの生物の代謝において広く重要な役割を担っていることが示唆された。しかし、この方法で捕捉された多数の蛋白質の中で実際に酵素活性が制御されていることが確認されたものはまだ限られており、Trxによる制御システムの解明が急務である。

研究代表者は、チオレドキシニンアフィニティークロマトグラフィーを利用した先行研究により、窒素固定性ラン藻、*Anabaena* sp. PCC7120 (A. 7120)において、窒素固定酵素ニトロゲナーゼおよび鉄硫黄クラスターのスカフォールド蛋白質NifUがTrxと相互作用

するという結果を得た(Nomata J. et al ((2015)) J. Biochem, 158, 253-261)。ニトロゲナーゼは分子状窒素をアンモニアに還元する複雑な金属酵素であり、この地球上における窒素動態において重要な酵素である。ニトロゲナーゼは2つのコンポーネント、Fe-蛋白質(NifHホモ二量体)およびMoFe-蛋白質(NifD-NifKヘテロ四量体)から構成される。いずれの蛋白質も酸素感受性の金属中心を保持しており、NifUを含む15以上の蛋白質や酵素によって各コンポーネントは活性化され、窒素固定活性を得ることが知られている。しかし、ニトロゲナーゼおよびNifUは酸素感受性の蛋白質であるため、Trxによる活性制御を生化学的に検討することは困難であった。そこで研究代表者は、嫌気チャンバーを用いた実験系を構築することで、NifUのN-末端側にある触媒ドメイン(UN)の生化学的解析を可能にした。嫌気条件下での生化学的解析の結果、UNに形成されたジスルフィド(SS)結合がTrxM1により還元されること、UNの鉄硫黄クラスター合成活性がTrxM1により促進されることを示した(Nomata J. et al ((2015)) J. Biochem, 158, 253-261)。この結果はニトロゲナーゼの活性化を触媒するNifUがTrxによりレドックス制御される可能性を初めて示唆するものであった。

興味深いことに、NifUにはそのC-末端側にもう一つの触媒部位を含むドメイン(UC)があり、UNとは独立してニトロゲナーゼを活性化することが知られている。しかし、UCがレドックス制御を受ける可能性は検証されていない。また、窒素固定性ラン藻A. 7120のゲノムには、NifUと高い相同性を示す蛋白質(NifU2)をコードする遺伝子が見つかった。NifU2には、NifUにおいてレドックス制御に関わる2つのシステイン残基が保存されているが、NifU2がTrxによるレドックス制御を受けるのか、ニトロゲナーゼと相互作用するのか、全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、ニトロゲナーゼの Trx による活性制御機構の解明を行うため、A. 7120 に由来する Trx、NifU の C 末端ドメイン(UC)および NifU 類似タンパク質 NifU2 について、(1)嫌気条件下での生化学的解析の実験基盤を構築し、(2)生化学的なアプローチにより Trx によるレドックス制御機構を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)生化学的解析の実験基盤を構築するため、大腸菌を利用した UC、NifU2 および Trx の発現系の構築を行った。A. 7120 に由来する NifU の C 末端触媒ドメイン(UC)、NifU2 および 6 つの Trx アイソフォーム (Trx1~6) の大量発現系を構築し、精製を試みた。(2)嫌気チャンバーを活用した嫌気生化学実験系を利用し、UC および NifU2 のレドックス制御機構の解析を行った。

4. 研究成果

(1)UC の大腸菌における発現系の構築

A. 7120 に由来する UC を大腸菌において発現・精製を行うため、大量発現系を構築した。嫌気チャンバー内での精製を簡便にするため、UC の N 末端にアフィニティータグを付加した。嫌気チャンバー内で UC の発現株菌体を破碎して粗抽出液を調製した後、アフィニティータグを利用して精製を行ったところ、生化学的解析に十分な量の精製蛋白質を得ることができた。

(2)Trx アイソフォームの大腸菌における発現系の構築

A. 7120 に由来する Trx1~Trx6 を大腸菌において発現・精製を行うため、大量発現系を構築した。Trx1~Trx6 について、発現、精製を行ったところ、生化学的解析に十分な量の精製蛋白質を得ることができた (図 1)。

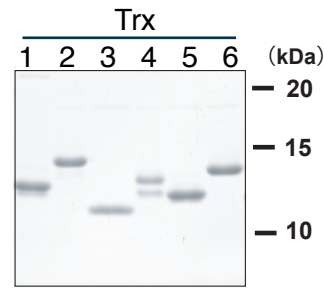


図 1. 大腸菌における Trx1-6 の精製

(3)NifU2 の大腸菌における発現系の構築

A. 7120 に由来の NifU2 を大腸菌において発現・精製を行うため、大量発現系を構築した。嫌気チャンバー内での精製を簡便にするため、NifU2 の C 末端にアフィニティータグを付加した。嫌気チャンバー内で NifU2 の発現株菌体を破碎して粗抽出液を調製した後、アフィニティータグを利用して精製を行い、解析に十分な量の精製蛋白質を得ることができた。

(4)Trx1 による UC の還元

UC の Trx1 によるレドックス制御機構を検討するため、UC に形成されたジスルフィド結合が Trx1 依存的に還元されるか検討した。酸化型 UC と Trx1 およびその再生系を反応させた後、システイン残基のチオールと反応するマレイミド分子を用いたラベリングアッセイを行い、UC の酸化還元状態を可視化した (図 2)。その結果、Trx1 と再生系の共存下でのみ UC のジスルフィド結合が還元されることが明らかとなった。

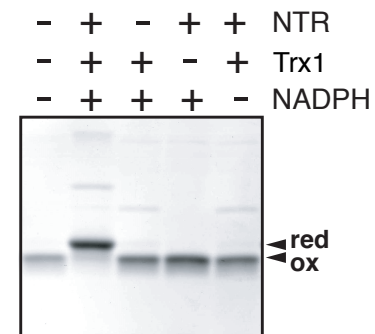


図 2. Trx1 と再生系を用いた UC の還元

また、UC のジスルフィド結合が還元型グルタチオン (GSH) によって還元されるか検討した。

UCの酸化還元状態は、マレイミド分子を用いたラベリングアッセイを行い可視化することで調べた。その結果、UCはグルタチオンと反応性を示すことがわかり、1 mM以上のGSHにより有意な還元が認められた(図3)。以上の結果から、NifUは、そのN末端触媒部位(UN)だけでなく、C末端側の触媒部位(UC)もレドックス制御を受けている可能性が示唆された。また、先行研究においてUNが5mMの還元型グルタチオンによりほとんど還元されなかったのに対し、UCは同じ濃度のグルタチオンにより高い効率で還元された。

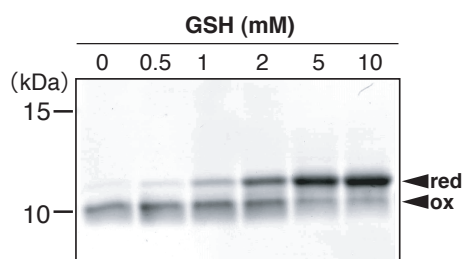


図3. 還元型グルタチオンによるUCの還元

(5) Trx1によるNifU2の還元

NifU2のTrxによるレドックス制御機構を検討するため、NifU2に形成されたジスルフィド結合がTrx1により還元されるか検討した。酸化型NifU2とTrx1およびその再生系を反応させた後、UCと同様にマレイミド分子を用いたラベリングアッセイを行い、NifU2の酸化還元状態を調べた(図4)。その結果、Trx1と再生系の共在下でのみNifU2のジスルフィド結合が還元されることが明らかとなった。

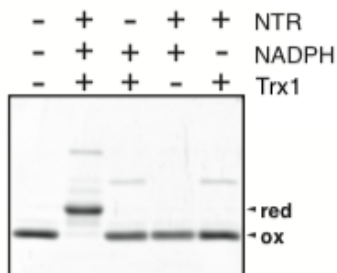


図4. Trx1と再生系を用いたNifU2の還元

(6)さらに、Trx1以外のTrxアイソフォームによっても、NifU2に形成されたジスルフィド結合が還元されるか検討した。Trxアイソフォームによる還元の効率を比較するため、酸化型NifU2とTrx1~6およびその再生系を一定時間反応させた後、マレイミド分子を用いたラベリングアッセイを行い、NifU2の酸化還元状態を調べた(図5)。その結果、NifU2のジスルフィド結合の還元効率は、Trxアイソフォームによって異なることが明らかとなった。

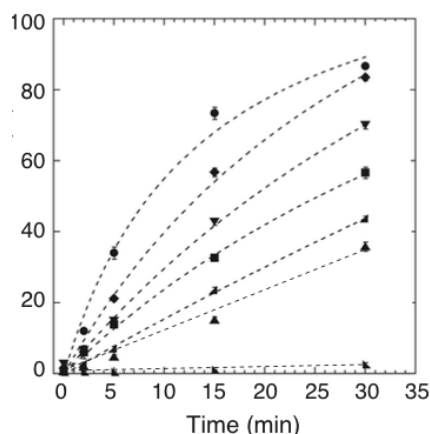


図5. TrxアイソフォームによるNifU2の還元のタイムコース(縦軸はNifU2の還元率(%))

(7)また、NifU2のジスルフィド結合が還元型グルタチオンによって還元されるか検討し、さらにTrxとの比較を行った。酸化型NifU2と還元型グルタチオン、またはTrxとその再生系を反応させた後、NifU2の酸化還元状態をラベリングアッセイで可視化して調べた。その結果、NifU2はグルタチオンと反応性を示すことがわかり、30分でほぼ全てのNifU2が還元された(図6)。Trxによる還元と比較すると、NifU2はTrx存在下で5分でほぼ全てが還元された。以上から、NifU2はTrxとグルタチオンのどちらとも反応性を示すが、Trxによってより高い効率で還元されることが明らかとなった。

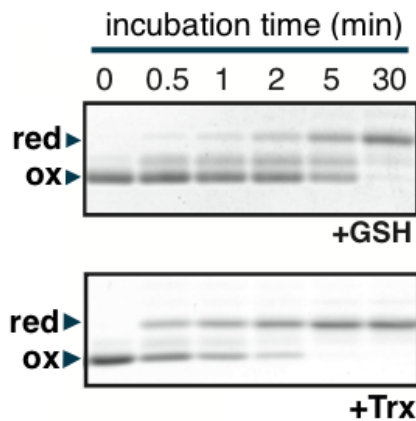


図 6. 還元型グルタチオンと Trx による NifU2 還元効率の比較

以上、本研究により、嫌気チャンバーを用いた実験系を利用することで、酸素感受性蛋白質である NifU の C 末端ドメインおよび NifU2 の生化学的解析の実験基盤を構築した。確立した実験系を活用した一連の解析から、NifU はその N 末端、C 末端いずれの触媒部位も Trx により還元されることが明らかとなった。一方で、グルタチオンに対する反応性は異なり、C 末端触媒部位がより高い反応性を示すことが示された。

NifU2 は、6 つの Trx アイソフォーム全てに還元されたが、その還元効率は異なることが示された。また、グルタチオンによる還元と比較したところ、NifU2 は Trx によって、より高い効率で還元されることが明らかとなった。今後、NifU の C 末端ドメインおよび NifU2 の酸化・還元状態がニトロゲナーゼの活性化にどう影響するのか、詳細な解析を行っていく必要がある。

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 2 件)

1. Shoko Mihara, Hitomi Wakao, Keisuke Yoshida, Akiyoshi Higo, Kazunori Sugiura, Akihiro Tsuchiya, Jiro Nomata, Ken-ichi Wakabayashi, Toru Hisabori (2018) Thioredoxin regulates G6PDH activity by changing redox states of

OpcA in the nitrogen-fixing

cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120.

Biochem. J., 475:1091-1105, 査読あり

2. Fujisawa T., Narikawa R., Maeda S., Watanabe S., Kanesaki Y., Kobayashi K., Nomata J., Hanaoka M., Watanabe M., Ehira S., Suzuki E., Awai K., and Nakamura Y. (2017) CyanoBase: a large-scale update on its 20th anniversary. *Nuc. Acid. Res.* 45:D551-D554. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. 野亦次郎、井須敦子、久堀徹、シアノバクテリアの鉄硫黄クラスター運搬タンパク質 Nfu は Trx と相互作用する、第 11 回ゲノム微生物学会年会、慶応大学湘南藤沢キャンパス (神奈川) 2017 年 3 月 2 日-3 月 4 日

2. Jiro Nomata, Atsuko Isu, Toru Hisabori Possible involvement of Trx in the iron-sulfur cluster delivery process assisted by Nfu in *Anabaena* sp. strain PCC 7120., The 4th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis & Nitrogen Fixation, Penang, Malaysia, 16-19 October, 2016

3. 野亦次郎、井須敦子、久堀徹、Possible involvement of Trx in the iron-sulfur cluster formation process assisted by Nfu in *Anabaena* sp. strain PCC 7120., 第 57 回植物生理学会年会、岩手大学(岩手) 2016 年 3 月 16 日-3 月 18 日

[その他]

ホームページ等

http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori_HomePage/nomata.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野亦 次郎 (NOMATA JIRO)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教
研究者番号：40583216