

令和元年6月14日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07703

研究課題名(和文) anammox菌のシトクロムc成熟系の反応機構解明と応用

研究課題名(英文) Elucidation of reaction mechanism of cytochrome c maturation system in anammox bacteria

研究代表者

平 大輔 (HIRA, Daisuke)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：00569890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、anammox菌等がもつc型ヘムタンパク質(シトクロムc)成熟系System IIの反応機構解明と応用を目指した。System IIではResBとResCから成る膜タンパク質複合体(ResBC)がc型ヘムの成熟を担っていると考えられている。anammox菌が有するResBCの発現・精製には至らなかったが、好熱菌由来ResBCの発現・精製方法を確立した。さらに、ResBC発現系を応用したc型ヘムタンパク質発現系を構築することができた。一方、ヘムに必要な鉄を貯蔵するナノ粒子状タンパク質についても生化学的研究を実施した。これらよりSystem IIの生化学的詳細の一端を解明することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

c型ヘムタンパク質は、細菌や古細菌に代表される多様な微生物において多様な酵素反応や電子伝達反応を担っており、ひいては地球上の多様な物質循環を担っている。c型ヘムタンパク質の成熟系はその礎となっているが、特にSystem IIについては、その研究が遅れている。本研究において、System IIの異種発現系を確立し、そのc型ヘムタンパク質発現系への応用を達成できたため、これまでに異種発現が困難であったマルチc型ヘムタンパク質の発現や変異体の作成などについて新たな方法論を提供することが可能となり、広範な基礎的・応用的研究分野への貢献が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed the biochemical studies to investigate the reaction mechanism of c-type heme protein maturation system, System II, of anammox bacteria. In System II, a membrane protein complex (ResBC) is believed to be responsible for the maturation of c-type heme protein. Although expression and purification of ResBC of anammox bacteria were not achieved, an expression and purification method for ResBC of a thermophilic bacterium was established. Furthermore, it was possible to construct a c-type heme protein expression method using the ResBC system. In addition, we characterized nanoparticle protein which is thought to be involved in intracellular iron ion storage.

研究分野：応用生物化学

キーワード：ヘムタンパク質 異種発現 c型ヘム 鉄貯蔵

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シトクロム *c* はミトコンドリアや細菌のペリプラズム等に存在し、シトクロム *bc₁* 複合体からシトクロム *c* 酸化酵素への電子伝達、細菌においては多様な呼吸における電子伝達反応を担っている。シトクロム *c* はその分子内に鉄ポルフィリン錯体であるヘムを有し、その酸化・還元を利用して機能するヘムタンパク質であるが、タンパク質の一次構造上に CXXCH という共通の配列を有し、この配列内の2つのシステイン側鎖がヘムの2つのビニル基と2つのチオエーテル結合を形成することで (*c* 型ヘム) ヘムを保持している。このような *c* 型ヘムを持つタンパク質は微生物から高等生物まで非常に様々な生物で機能しており、様々な系で電子伝達タンパク質として機能しているほか、微生物では酵素の活性中心として機能している例も多い。これら *c* 型ヘムにおけるチオエーテル結合は自発的には形成されず、ほとんど全ての生物は、この結合形成のためのシトクロム *c* 成熟系を有しており、生物種によって異なるが、代表的なものとして System I ~ III の3つの系が知られている。これらの系は、(1) タンパク質のミトコンドリアの膜間腔や細菌のペリプラズムなどの膜間領域への輸送、(2) ヘムの膜間領域への輸送、(3) ヘムとタンパク質のチオエーテル結合形成 (ヘムリアーゼ) の過程に分けて考えることができ、それぞれを担うタンパク質群が明らかとされてきた。シトクロム *c* の正常な成熟は電子伝達系の維持に必須であり、エネルギー代謝に関与する非常に重要な系であるが、その詳細については依然未解明な点が多い。特に (3) ヘムリアーゼは、ヘムを受け取り、標的タンパク質に結合させる働きを担っているが、標的タンパク質の認識機構、チオエーテル結合形成の反応機構、チオエーテル結合形成の際のヘムの立体選択の機構、など生化学的に重要な点未解明である。特に、ゲノム解析から多様な微生物が保有すると考えられている System II については、ほとんど研究が進展していない。

これまで申請者が所属する研究グループでは、嫌気性アンモニア酸化 (anammox) 菌 KSU-1 株が優占種である anammox 汚泥から、本菌に特有のタンパク質・酵素を複数種類単離・精製し、それらの生化学的詳細を明らかにしてきた。精製した特有のタンパク質・酵素の多くはシトクロム *c* であり、anammox 菌は複数種のシトクロム *c* を大量発現することが明らかとなってきた。また、複数のゲノム解析結果より、これまで知られている anammox 菌は全てシトクロム *c* 成熟系 System II を有することが報告されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、anammox 菌 KSU-1 株由来のシトクロム *c* 成熟系 System II を対象とし、その生化学的詳細を解明することを第一の目的とした。第二の目的は System II の応用によるマルチ *c* 型ヘムタンパク質発現系の実現である。シトクロム *c* の異種発現系としては、大腸菌の成熟系 System I を利用する発現系がよく使用される。一方、anammox 菌が発現するシトクロム *c* の多くは、分子内に複数の *c* 型ヘムを有するマルチ *c* 型ヘムタンパク質である。一般的にマルチ *c* 型ヘムタンパク質の場合、その成熟過程で複数回の *c* 型ヘムの結合が必要であり、成熟過程がより複雑化するため、大腸菌を用いる系では成功例はほとんどない。つまり、本研究によりシトクロム *c* 成熟系 System II の生化学的詳細を明らかにするとともに、異種発現系へと利用することが出来れば、これまで成功例が限られているマルチ *c* 型ヘムタンパク質の異種発現系を構築することが可能となる。

(2) また、ヘムに含まれる鉄原子は、その反応性が高く毒性を示すことから、細胞中ではその濃度が制御される必要がある。即ち、細胞内に鉄の貯蔵システムが必要とされ、anammox 菌は非常に多量の *c* 型ヘムを発現しているため、鉄イオンも多量に貯蔵する必要があると思われるが、その詳細については、ほとんど研究が進んでいない。代表的な鉄貯蔵タンパク質として、フェリチンが一般に知られている。一方、anammox 菌においては、フェリチンとは異なるナノ粒子タンパク質 Encapsulin が鉄貯蔵タンパク質として機能していると推定されている。本研究では、このナノ粒子タンパク質 Encapsulin についても、生化学的研究および構造生物学的研究を進展させるために、大腸菌発現系を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シトクロム *c* 成熟系 System II では ResB と ResC から成る膜タンパク質複合体 (ResBC) がヘムの膜間領域への輸送とヘムリアーゼの2つの機能を担っていると考えられているが、ResBC の単離・精製の報告がなく、その立体構造も不明であった。そこで、ResBC に着目し、その生化学的性質を解明すべく、以下の研究を実施した。

ResBC の発現・精製法の確立：anammox 菌 KSU-1 株がもつ System II 遺伝子 ResBC を PCR 増幅し、大腸菌発現用プラスミド pET28 に組み込み、ResBC 発現用プラスミドを構築した。発現用プラスミドと大腸菌 BL21 (DE3) 株等の複数株を用いて、ResBC を発現させた。培養した菌体を破碎し、SDS-PAGE とヘム染色により ResBC の発現量を確認した。さらに、好熱菌 *Thermodesulfobacterium geofontis* 由来の ResBC 遺伝子についても同様な大腸菌発現系を構築し、その発現および精製を試みた。

ResBC 発現系を応用した *c* 型ヘムタンパク質発現系の構築：最適化した ResBC 発現系に対して、別途 anammox 菌 KSU-1 株由来の *c* 型ヘムタンパク質の遺伝子を導入し、その成熟について検証した。

(2) 代表的な細胞内の鉄貯蔵タンパク質としてフェリチンが知られているが、これまでにゲ

ノムが解読された anammox 菌全てにおいて、フェリチンとは異なるナノ粒子タンパク質 Encapsulin の遺伝子が見出されており、鉄貯蔵タンパク質として機能していると推定されている。Encapsulin はいくつかの細菌および古細菌のタンパク質で研究が進められており、ホモ 60 量体もしくは 180 量体を形成するナノ粒子タンパク質である。その内部に別のタンパク質を内包することが明らかにされている。また、その内包されたタンパク質が鉄を結合する性質を有しており、全体として鉄貯蔵の機能を有していると推定されている。しかし、anammox 菌が有する Encapsulin については、その生化学的研究は全く実施されていない。そこで本研究では、このナノ粒子タンパク質 Encapsulin についても、生化学的研究および構造生物学的研究を進展させるために、大腸菌発現系およびその精製手法の確立を目指した。anammox 菌 KSU-1 株由来および好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来の Encapsulin 遺伝子を大腸菌発現用プラスミド pET20b に組み込み、発現用プラスミドを構築した。得られたプラスミドで大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し、Encapsulin を発現させた。

4. 研究成果

(1) 複数の培養条件を検討したが、おそらく ResBC が膜タンパク質のため、残念ながら活性を有する anammox 菌 KSU-1 株 ResBC の発現は確認できなかった。そこで、対象の ResBC 遺伝子を、anammox 菌 KSU-1 株 ResBC と高い相同性を有する好熱菌 *Thermodesulfobacterium geofontis* 由来のものに変更し、同様の発現系を構築し発現を試みた。その結果、膜画分にヘムを有する発現タンパク質が得られ、この発現系を用いることで、ResBC タンパク質の調製に成功した。さらに、界面活性剤 Triton X-100 もしくは CHAPS によって可溶化し、Ni カラムによって部分精製することが出来た。現在、ResBC の大量調製と結晶化を試行中である。

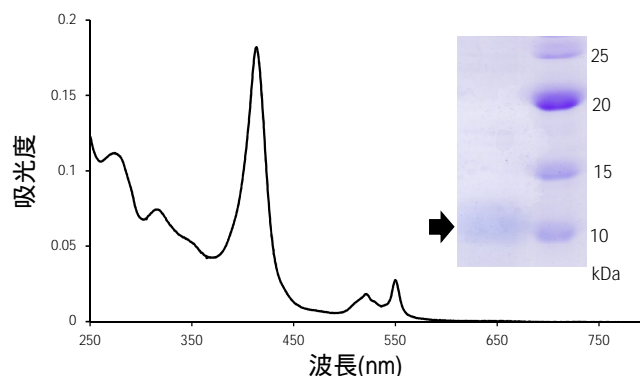


図 1 ResBC との共発現により得られた c 型ヘムタンパク質 b428 の吸収スペクトルと SDS-PAGE

好熱菌 *Thermodesulfobacterium geofontis* 由来の ResBC の大腸菌発現系を構築することが出来たため、この大腸菌 BL21(DE3, ResBC) 株のコンピテントセルを調製した。さらに、anammox 菌 KSU-1 株の c 型ヘムタンパク質遺伝子 b428 をプラスミド pET20b に組み込み、この BL21(DE3, ResBC) 株で発現させた。通常の大腸菌株を用いた場合には、c 型ヘムタンパク質を発現・精製することは出来ない。BL21(DE3, ResBC) 株を用いることで、anammox 菌 KSU-1 株の c 型ヘムタンパク質 b428 を発現・精製することが出来た。吸収スペクトルおよび質量分析によって、発現した b428 の成熟に問題無いことが確認出来た(図 1)。このことから、今後大腸菌発現系としての条件最適化を行う必要はあるが、ResBC 発現系を応用した c 型ヘムタンパク質の発現系構築が可能と考えられた。

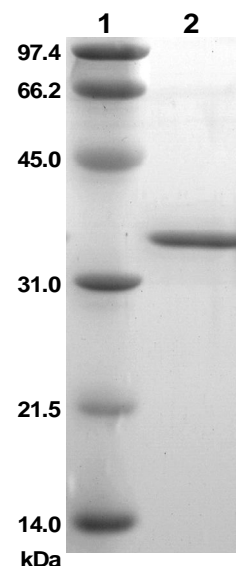


図 2 発現・精製した *Geobacillus kaustophilus* 由来 Encapsulin の SDS-PAGE レーン 1: マーカータンパク質、レーン 2: Encapsulin

(2) anammox 菌 KSU-1 株の鉄貯蔵に関わると推定されているナノ粒子状タンパク質 Encapsulin について、大腸菌発現系の構築および精製手法の確立を試みたところ、検討したプラスミドおよび大腸菌株においては、Encapsulin が大腸菌内で封入体を形成し、精製に至らなかった。そこで、anammox 菌 KSU-1 株の Encapsulin と 50% 程度の相同性を有する好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来の Encapsulin 遺伝子を用いて、同様の発現系構築を試みた。これにより、Encapsulin を可溶性画分に発現することが出来、Ni カラムによって高度に精製することも可能となった(図 2)。

現在、精製試料について、電子顕微鏡観察やその粒子内部へのタンパク質の取り込みについて調べている。

以上により、anammox 菌等が有するシトクロム c 成熟系 System II の生化学的詳細の一端を解明することが出来た。c 型ヘムタンパク質は、細菌や古細

菌に代表される多様な微生物において多様な酵素反応や電子伝達反応を担っており、ひいては地球上の多様な物質循環を担っている。c型ヘムタンパク質の成熟系はその礎となっているが、特に System II については、その研究が遅れている。本研究において、System II の異種発現系を確立し、その c型ヘムタンパク質発現系への応用を達成できたため、これまでに異種発現が困難であったマルチ c型ヘムタンパク質の発現や変異体の作成などについて新たな方法論を提供することが可能となり、広範な基礎的・応用的研究分野への貢献が可能と考えられる。

また、細胞内における金属イオンの貯蔵、その濃度調節については、これまでもさかんに研究が進められてきた。しかし、anammox 菌のように特に多量の金属イオンを要求する微生物が、高濃度の金属イオンをどのように鉄貯蔵しているか、未だ不明な点も多い。鉄貯蔵タンパク質としてはフェリチンが一般に知られているが、細菌や古細菌において鉄貯蔵の機能を有すると推定されているナノ粒子タンパク質 Encapsulin について、今後の生化学的研究を進展させるための基礎的な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hira Daisuke、Aiko Nobuyuki、Yabuki Yoshinori、他 1 名、Impact of aerobic acclimation on the nitrification performance and microbial community of landfill leachate sludge. *Journal of Environmental Management*, 査読有, 209, 2018, pp. 188 - 194, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.056>

Hira Daisuke、Kitamura Ryuji、Nakamura Teruya、他 3 名、Anammox Organism KSU-1 Expresses a Novel His/DOPA Ligated Cytochrome c, *Journal of Molecular Biology*, 査読有, 430, 2018, pp. 1189 - 1200, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.02.017>

〔学会発表〕(計 8 件)

平 大輔、anammox 反応を担う金属タンパク質、第 56 回日本生物物理学会(招待講演) 2018

平 大輔、嫌気性アンモニア酸化 anammox に関わる金属タンパク質の構造と機能、日本農芸化学会 2018 年度西日本支部大会(招待講演) 2018

亀澤 世奈、北村 龍史、平 大輔、他 1 名、Cys 配位したヘムの酸化還元に対する周辺 Arg 残基の影響、日本農芸化学会 2018 年度西日本支部大会、2018

平 大輔、北村 龍史、中村照也、他 3 名、アナモックス菌のヒドラジン合成反応、環境微生物系学会合同大会 2017、2017

平 大輔、北村 龍史、中村 照也、他 3 名、anammox のヒドラジン合成酵素タンパク質複合体、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017

平 大輔、中村照也、山縣 ゆり子、他 2 名、anammox 菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素とモノヘムシトクロム c の電子伝達反応、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017

北村 龍史、平 大輔、中村 照也、他 3 名、ヒドラジン合成反応を触媒するマルチヘムタンパク質複合体の結晶構造、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017

北村 龍史、平 大輔、中村 照也、他 3 名、anammox 菌のヒドラジン合成酵素複合体の立体構造解明、第 23 回 日本生物工学会九州支部 飯塚大会(2016)、2016

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。