

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770106

研究課題名（和文）好塩性古細菌の硝酸塩還元酵素ハイブリッド複合体に関する研究

研究課題名（英文）Molecular and functional analysis of haloarchaeal nitrate reductase hybrid

研究代表者

吉松 勝彦 (YOSHIMATSU KATSUHIKO)

静岡大学・理学部・技術職員

研究者番号：70376531

研究成果の概要：

塩田や塩湖の様な高い塩分濃度の環境にのみ生育する微生物が存在する。この様な微生物の一種である好塩性古細菌の硝酸塩を亜硝酸に還元する酵素の研究を行った。酸素のない条件で好塩性古細菌が生育するために、この酵素が必須である事がわかった。この酵素を精製し、分析した結果から、他の生物が持つ異なる酵素の一部分ずつを融合させる事によって、この酵素が生じた事がわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：(分科) 生物科学 (細目) 機能生物化学

キーワード：生体エネルギー変換

1. 研究開始当初の背景

(1) 私は今までに、好塩性古細菌を研究材料として使い、脱窒反応の最初の反応 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) を触媒する異化型硝酸塩還元酵素の精製と遺伝子クローニングを行い、好塩性古細菌の硝酸塩還元酵素が、今までにみられない特異な構造をとっている可能性を見いだした。

まず、好塩性古細菌の膜画分から、二種の

サブユニットからなり、モリブデンと鉄硫黄クラスターを含む硝酸塩還元酵素複合体 (Nar 複合体) を精製することができた。しかしながら、Nar 複合体は硝酸塩還元活性を示したが、生理的電子供与体と考えられるキノン類の酸化活性を示さなかった (Yoshimatsu *et al* (2000))。次に、遺伝子クローニングをおこなったところ、それぞれのサブユニットは9つの ORF からなる遺伝子クラスターの5番目、

6番目のORF (*narG*, *narH*) にコードされていた (Yoshimatsu *et al* (2002))。さらに、オペロンを構成する他のORFについて検討を行なったところ、2番目と3番目のORF (*narB*, *narC*) にシトクロム *bc₁* 複合体 (ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III) のサブユニットに相同なタンパク質 (リスキ型鉄硫黄タンパク質とシトクロム *b*) をコードしていた。それらのサブユニットはシトクロム *bc₁* 複合体のキノールを酸化し、Q サイクルによってプロトンの汲み出しを行うサブユニットである。

(2) 硝酸塩還元酵素遺伝子クラスターの上流には逆向きのORF (*narR*) が存在していた。NarR にはヘリックス-ターン-ヘリックスと酸素分圧を感知すると思われるシステインモチーフが存在し、*nar* 遺伝子クラスターの発現に関与する転写調節因子であると考えられた。

硝酸塩還元酵素は低酸素分圧下で、硝酸塩が存在する時に発現し、硝酸塩を酸素の代わりに最終電子受容体として用いる嫌気呼吸に関わる酵素であり、その発現制御は、引き続き起こる反応に必要な酵素類 (亜硝酸塩還元酵素やNO還元酵素) の遺伝子と共に、酸素と硝酸塩によって制御されていると予想された。また好塩性古細菌は、もう一つの嫌気呼吸系、DMSO呼吸の酵素も持っており、これら3種類の呼吸系を状況に応じて適宜利用していると考えられるが、古細菌において呼吸に関わる酵素の発現制御機構については全く明らかになっていなかった。

Yoshimatsu *et al* (2000) FEBS Lett. 470(2):216-220.

Yoshimatsu *et al* (2002) FEBS Lett. 516(1-3):145-150.

2. 研究の目的

(1) 好塩性古細菌の硝酸塩還元酵素がハイブリッド複合体を形成して働く酵素であることを証明する。

(2) 硝酸塩還元酵素融合遺伝子クラスターの発現調節機構に関わる NarR の機能を解明する。

3. 研究の方法

高度好塩性古細菌 *Haloferax volcanii* を実験材料として用いた。この古細菌は全ゲノム配列が決定されており、好塩性古細菌の中では遺伝子操作が比較的容易に行える種である。さらに *H. volcanii* H26 株は *pyrE2* (オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ) 欠損

株でウラシル要求性の株である。*pyrE2* を持つプラスミド上の変異遺伝子もしくは欠損遺伝子をシングルクロスオーバー反応で *H. volcanii* H26 株ゲノムに導入し、ウラシル欠乏培地で選択した後、さらに5-フルオロオロト酸とウラシルを含む培地で二度目のクロスオーバー反応によって野生型の遺伝子を欠損させ、変異株もしくは欠損株を単離することが出来る。

(1) ①硝酸塩還元酵素ハイブリッド複合体における、*narB* (リスキ型鉄硫黄タンパク質遺伝子) の重要性を確かめるため *narB* 欠損株の作成を行った。硝酸塩還元酵素遺伝子クラスターを含む 2.7kbp の XhoI 断片を *H. volcanii* のゲノムからクローニングし、NarB の鉄硫黄クラスター結合部位であるシステイン148に変異導入を行い、セリンに変換した (C148S)。この 2.7kbp の XhoI 断片をプラスミド pTA131 に導入した後、*H. volcanii* H26 株に形質転換した。ウラシル欠乏培地で野生型 *narB* と C148S 変異遺伝子の両方を持つヘテロ株を選択した後、フルオロオロト酸とウラシルを含む培地で、フルオロオロト酸耐性菌を選択し、PCR と制限酵素処理によって C148S 変異導入を確認し、*H. volcanii* $\Delta narB$ 株とした。

次に *H. volcanii* のゲノムから NarB の ORF を PCR 増幅した。この際、野生型の C 末端アミノ酸で翻訳終結するもの (*narB*) の他に 6 個のヒスチジンを C 末端に持つ DNA 断片 (*narBH*) も PCR 増幅した。それぞれの断片を *H. volcanii* の *nirK* プロモーター (Pnir、硝酸塩呼吸条件で発現する) に結合させた後、ノボビオシン耐性を持つ、大腸菌-好塩菌シャトルベクター pMLH32' に導入し、*H. volcanii* $\Delta narB$ 株に形質転換した。

② *H. volcanii* $\Delta narB$ 株に pMLH32' -Pnir-NarBH を導入してえられた株を硝酸塩呼吸条件下で大量培養を行った。得られた細胞を超音波破碎し、10,000xg で 20min 遠心し、未破碎細胞を取り除き、上清を 100,000xg で 60min 超遠心し、沈殿を膜画分とした。

得られた膜画分を、界面活性剤で可溶化し、超遠心した上清を可溶化画分とした。可溶化画分を Ni-Sepharose (GE ヘルスケアバイオサイエンス) に吸着させ、イミダゾールを含む緩衝液で溶出した。

精製サンプルを SDS-PAGE にかけた後、PVDF 膜に転写し、CBB 染色した後、ポリペプチドのバンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-21 (島津) で分析した。

(2) ①NarR の機能を調べるために、*narR* 遺伝子の欠損株の作成を行った。*H. volcanii* の *narR* の上流と下流の約 1kbp を PCR 増幅し

た後結合させ、*narR* を欠損させた DNA 断片を作成した。この DNA 断片をプラスミド pTA131 に導入した後、*narB* 変異株を作成したときと同様の操作を行い、*narR* 欠損株 ($\Delta narR$) を作成した。

次に、*H. volcanii* のゲノムから 6 個のヒスチジンを C 末端に結合させた NarR の ORF を PCR 増幅し *katG* プロモーターに結合させた。*katG* プロモーターは生育条件に関わらず常にタンパク質を発現させるプロモーターである。プロモーターに結合させた *narR* を pMLH32' に導入し $\Delta narR$ 株に形質転換した。

②NarR には酸素センサーとして機能すると考えられる 5 個のシステイン残基が存在する。それらのシステインをセリンに置換した変異体を作成し、同様に、 $\Delta narR$ 株に導入し、硝酸塩呼吸条件下での増殖能力を調べた。

4. 研究成果

(1) ① $\Delta narB$ 株を作成する事に成功した。 $\Delta narB$ 株は好気条件下で生育する事ができたが、硝酸塩呼吸条件下では生育する事ができなかった。 $\Delta narB$ 株に *narB* 遺伝子を含む pMLH32' を形質転換したものは、野生型 (H26 株) より生育が遅いものの生育が回復した。C 末端にヒスチジンを結合させた NarB (NarBH) を発現させた株はさらに生育が遅くなったが、回復した。コントロールプラスミド pMLH32' のみを形質転換した株は、生育が回復しなかった (図 1)。

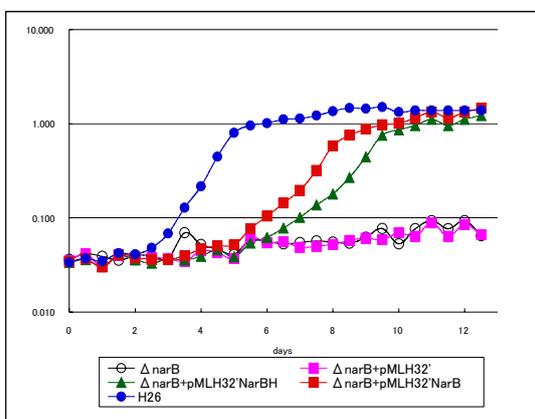


図 1 *narB* 変異株の増殖曲線

②Ni-Sephrose から溶出されてきたサンプルを SDS-PAGE にかけたところ分子量 100, 50, 35, 31, 21, 19, 17, 15k にバンドが確認され、それぞれの N 末端アミノ酸配列を解析した所 100k のバンドが NarG、50k のバンドが NarH、35k のバンドが NarD、21k のバンドが NarC、19k のバンドが NarB である事が確認された (図 2)。

NarC, NarH の N 末端は翻訳後に N 末端メチオニン残基が切断されたものであったが、

NarG, NarD の N 末端はツインアルギニントランスロケーション (TAT) のシグナルペプチドの下流で切断されたものであった。一方、NarB の N 末端は TAT のシグナルペプチドの直前から始まっており、TAT システムによって輸送された後、シグナルペプチドが切断されずに膜にアンカーとして結合している事がわかった。

今回の精製サンプルには Nar オペロンにコードされるすべての金属中心を含むサブユニットの存在が確認できた。

NarBC はキノールの酸化と Q サイクルによるプロトンの汲み出しを行うサブユニットで、NarGH は硝酸塩の還元を行うサブユニットである。今回の精製で、NarBCDGH という一つの複合体として精製する事ができた。

今回の研究で、キノールから電子を受け取り硝酸塩を還元する反応を行うと共に、Q サイクルを用いてプロトンの汲み出しを行う NarBCDGH という巨大な硝酸塩還元酵素複合体が存在する事が明らかとなった。

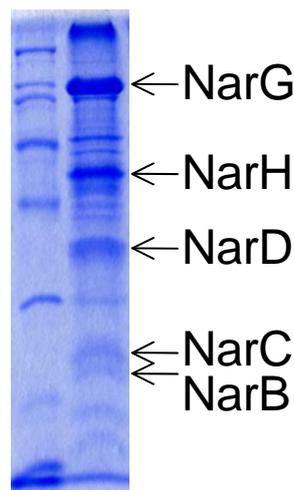


図 2 精製サンプルの SDS-PAGE

(2) ① $\Delta narR$ 株を作成する事に成功した。この株は好気条件下で生育するが硝酸塩呼吸条件下では生育しなかった。コントロールプラスミド (pMLH32') を導入しても生育は回復しなかったが、*narR* 遺伝子を持ったプラスミド (pMLH32' *narR*) を導入した株は硝酸塩呼吸条件下での生育が回復した (図 3)。この結果から NarR は硝酸塩呼吸能の発現を調節するタンパク質である事が明らかとなった。

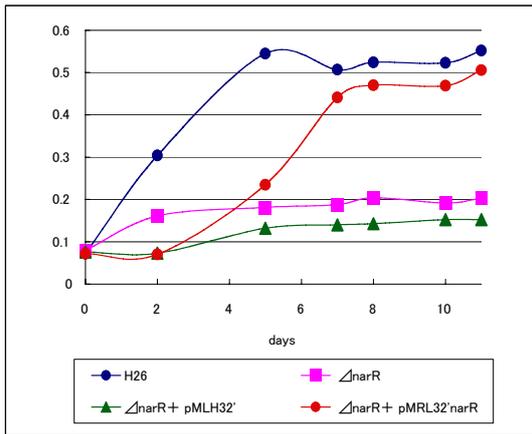


図3 NarR 欠損株の増殖曲線

②NarR の 5 個のシステインそれぞれをセリンに変えた変異タンパク質を導入した実験では、100 番目のシステインをセリンに置換した株(C100S)で生育が回復したが 17、81、83、91 番目のシステインをセリンに変えた株(C17S、C81S、C83S、C91S)では生育は回復しなかった(図4)。17、81、83、91 番目のシステインが酸素の分圧を感知するのではないかと考えている。

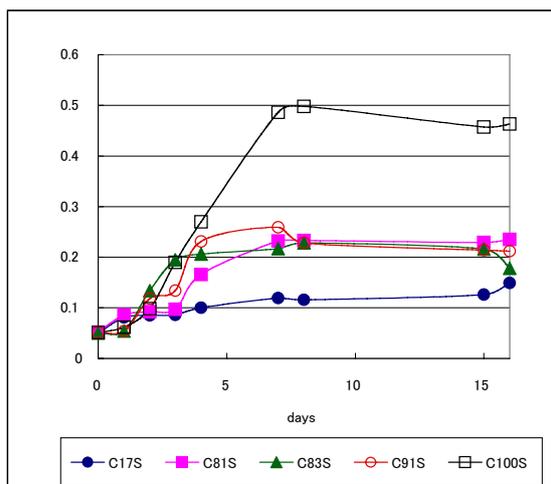


図4 NarR のシステイン変異株の増殖曲線

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

①Suzuki Y, Soga K, Yoshimatsu K, Shioi Y. (2008) Expression and purification of pheophorbide, an enzyme catalyzing the formation of pyropheophorbide during chlorophyll degradation: comparison with the native enzyme. Photochem Photobiol Sci. 7(10):1260-6.

②Ten-I T, Kumasaka T, Higuchi W, Tanaka S, Yoshimatsu K, Fujiwara T, Sato T. (2007)

Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the Met244Ala variant of catalase-peroxidase (KatG) from the haloarchaeon *Haloarcula marismortui*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 63(Pt 11):940-3.

[学会発表] (計4件)

①吉松勝彦, 藤原健智 好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素オペロンにコードされる Rieske 型鉄硫黄タンパク質 NarB の機能 BMB2008 2008年12月11日 神戸

②K.Arai, K.Yoshimatsu, and T.Fujiwara Ammonia monooxygenase activity of marine gamma-proteobacterium NS58 isolated from anoxic coastal sediment 7th International Symposium for Surface Microbiology 2008年11月21日 静岡

③吉松勝彦, 藤原健智 好塩性古細菌硝酸塩還元酵素ハイブリッド複合体の可能性 特定領域研究「生体超分子構造」第4回シンポジウム 2007年12月19日 吹田

④ T.Ohtsuka, K.Arai, K.Yoshimatsu, H. Urakawa and T.Fujiwara Biochemical analysis of ammonia-oxidizing system in marine AOB, *Nitrosococcus* sp. 第23回日本微生物生態学会、松山、2007年9月17日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉松 勝彦 (YOSHIMATSU KATSUHIKO)
静岡大学・理学部・技術職員
研究者番号: 70376531

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし