

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870009

研究課題名（和文）チオレドキシシンによる窒素固定酵素ニトロゲナーゼの活性制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of thioredoxin mediated redox-regulation of nitrogenase activity

研究代表者

野亦 次郎（NOMATA JIRO）

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：40583216

研究成果の概要（和文）：1.シアノバクテリア *Anabaena sp.* PCC 7120 株に由来する窒素固定酵素ニトロゲナーゼの還元コンポーネント、Fe-蛋白質を大腸菌において発現し、嫌気チャンバーを用いて精製することができた。2.シアノバクテリアに由来するチオレドキシシン A を大腸菌において発現、精製した。この精製蛋白質は活性型であることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：Fe-protein, a reductant component of nitrogenase, was expressed in *E.coli* and successfully purified under anaerobic condition. 2.Thioredoxin A was expressed in *E.coli* and successfully purified in active form.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：レドックス・酸素感受性・シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

チオレドキシシン(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を持つ。この2つのシステイン残基のチオール基(-SH)

は、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シンに還元力を供給して、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。

研究代表者が所属する研究室では、変異型

Trx を用いた『チオレドキシシンアフィニティークロマトグラフィー』を開発し、Trx が標的とする蛋白質を網羅的に捕捉することに成功した。それ以降、同様の手法を用いた標的蛋白質の検索が、国内外において活発に行われるようになった。このプロテオーム解析法により、高等植物ではすでに 400 種類以上の蛋白質が標的候補として同定された。これらには、RuBisco や Mg-キラーターゼ、翻訳伸長因子、分子シャペロン、ATP 合成/分解酵素、RNA polymerase など含まれており、Trx による制御システムが光合成生物のみならず多くの生物において非常に重要な役割を担っていることが示唆された。しかし、この方法でリストアップされた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は、ようやく始まったばかりであるといえる。

最近、先行研究により窒素固定性シアノバクテリア *Anabaena sp.* PCC 7120 株に由来する窒素固定酵素ニトロゲナーゼが Trx によって活性制御されることが示唆された。しかし、シアノバクテリアのニトロゲナーゼの生化学的解析はこれまでにほとんど行われておらず、Trx による活性制御を生化学的に解析することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、(1)シアノバクテリアのニトロゲナーゼを構成する 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) について嫌気条件下での生化学的解析の研究基盤を構築し、この実験系を利用して(2)生化学的にチオレドキシシンによる活性制御機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

大腸菌においてニトロゲナーゼ発現系の構築を行った。ニトロゲナーゼを構成する Fe-蛋白質 (NifH) について、C 末端にアフィニータグ(strep-tag)を付加した発現系を構築した(図 1)。さらに、分子シャペロンとの共発現を行い、大腸菌において可溶性発現を試みた。ニトロゲナーゼを構成するもう 1

つの蛋白質、MoFe-蛋白質 (NifD-NifK 複合体) については、大腸菌およびシアノバクテリアにおける発現系を構築し、組み換え株を単離した。また、シアノバクテリアのチオレドキシシンも C 末端に strep-tag を付加した発現系を構築し、大腸菌における大量発現、精製を行った。さらに、酵素活性 (ジチオール・ジスルフィド交換活性) があることを確認した。

4. 研究成果

(1) ニトロゲナーゼを構成する Fe-蛋白質を大腸菌において大量発現するため、発現系を構築した(図 1)。大腸菌の細胞から精製を試

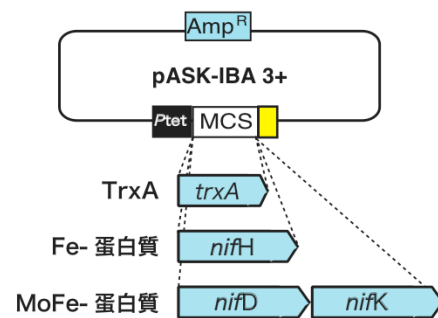


図 1. 大腸菌における TrxA、Fe-蛋白質、MoFe-蛋白質の大量発現コンストラクトの概略

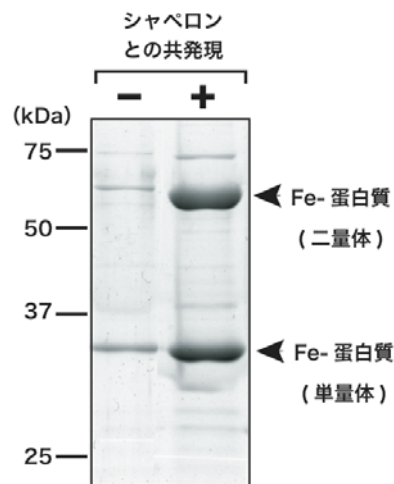


図 2. 精製した Fe-蛋白質の非還元 SDS-PAGE 解析

みたが、ほとんどが封入体を形成し、精製することが出来なかった。そこで様々な方法を試行した結果、分子シャペロンと共発現を行うと可溶化することがわかった。この方法により大腸菌の細胞内で可溶性発現した Fe-蛋

白質を、嫌気チャンバーを利用して精製することが出来た(図 2)。次に、得られた Fe-蛋白質の活性を評価することが重要であるが、それにはニトロゲナーゼを構成するもうひとつの蛋白質、MoFe-蛋白質が必須である。

(2) ニトロゲナーゼを構成するもう 1つの蛋白質、MoFe-蛋白質 (NifD-NifK 複合体) については、大腸菌において封入体を形成し、可溶性発現することは困難であった (図 3)。

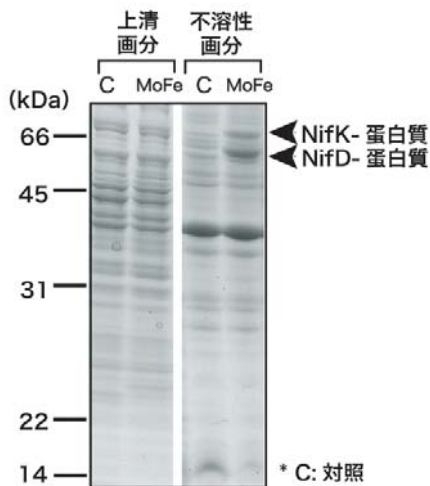


図 3. MoFe-蛋白質の大腸菌における発現

そこで、窒素固定性シアノバクテリア



図 4. シアノバクテリアにおける MoFe-蛋白質の大量発現

Anabaena sp. PCC 7120 株における発現系を構

築し、組み換え株を単離した。この株は MoFe-蛋白質を大量に発現していることが期待される。現在、この組み換え株を培養して (図 4)、MoFe-蛋白質の精製を試みている。

(3) シアノバクテリアのチオレドキシン A (TrxA) を大腸菌において大量発現するため、発現系を構築した (図 1)。嫌気チャンバー内で大腸菌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 TrxA の精製を行った (図 5)。

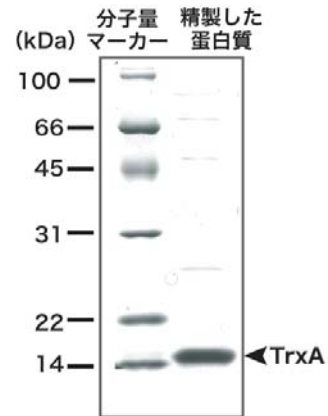


図 5. 精製したシアノバクテリアのチオレドキシン A の還元 SDS-PAGE 解析

得られた蛋白質の活性を確認するため、標的蛋白質とシステイン反応性分子を用いたラベリングアッセイを行い、ジチオール・ジスルフィド交換活性を調べた (図 6)。その結果、TrxA により標的蛋白質のジスルフィド結合が還元されていることが示され、大腸菌において発現したシアノバクテリアの TrxA には活性があることが確認された。

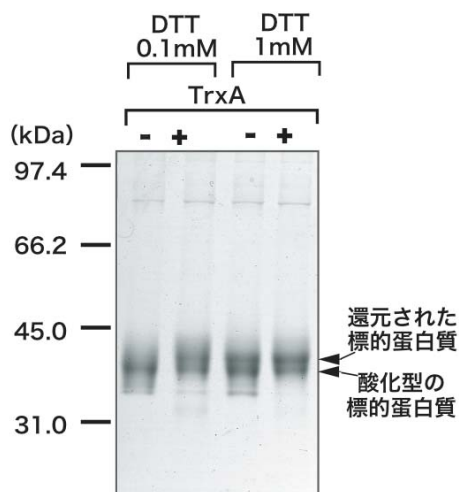


図 6. 精製したシアノバクテリアのチオレドキシシン A の酵素活性の確認

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 2 件)

1. 野亦次郎、近藤徹、溝口正、民秋均、伊藤繁、藤田祐一、ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の反応機構の解析, 日本植物生理学会 (第 53 回), 京都産業大学 (京都) 2012 年 3 月 16 日-18 日
2. Jiro Nomata and Toru Hisabori, Effect of dioxygen on the redox-study, International Symposium on Innovative Nanobiodevices2012, Nagoya univ. (Nagoya) 21-22nd, May, 2012

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野亦 次郎 (NOMATA JIRO)
東京工業大学・資源化学研究所・助教
研究者番号: 40583216

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: