

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770040

研究課題名(和文)チオレドキシンによる光合成生物のニトロゲナーゼの活性制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of thioredoxin mediated redox-regulation of nitrogenase activity in photosynthetic organisms

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Anabaena sp. PCC 7120 株(A.7120)は、光合成能と窒素固定能を併せ持つ、極めて有用な光合成微生物である。先行研究により、A.7120の窒素固定酵素ニトロゲナーゼの活性化に関わるNifU蛋白質がチオレドキシンM (TrxM) と相互作用するという結果を得た。本研究では生化学的解析によりその可能性を検討したところ、1.NifUの触媒ドメインがTrxMによって還元され、2.TrxMによりNifUのFe-Sクラスター形成がおよそ4倍に促進されることが明らかとなった。この結果は、NifUによる鉄硫黄クラスター生成にチオレドキシンが関与することを示唆する初めての成果である。

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 the solar energy. Thioredoxin (Trx) is a class of small redox proteins known to play a role in many important biological processes. Recently, NifU protein was captured in the A.7120 by using the proteomics-method named "Thioredoxin affinity chromatography" to comprehensively isolate TrxM target proteins. NifU protein plays a crucial role as a scaffold protein for the assembly of the Fe-S clusters required for the full activation of Fe-protein and MoFe-protein of nitrogenase. In this work, based on the biochemical analysis, we showed disulfide bond(s) formed in the N-terminal catalytic domain in NifU protein was reduced by Trx M. Further, we observed that the scaffold activity of the catalytic domain of NifU is enhanced in the presence of Trx-system, suggesting that TrxM is involved in the Fe-S cluster biogenesis by NifU.

研究分野：レドックス

キーワード：レドックス 金属中心 シアノバクテリア 窒素固定 プロテオミクス

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(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、Trxが標的とする蛋白質を網羅的に捕捉するプロテオーム解析法『チオレドキシシンアフィニティークロマトグラフィー』を開発した。それ以降、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なども含まれており、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、この方法で捕捉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が急務である。

生物における窒素固定は酵素ニトロゲナーゼによって触媒される。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。いずれの蛋白質も金属中心を保持しており、その生合成系を含む

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。

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利用した先行研究により、窒素固定性ラン藻、*Anabaena* sp. PCC7120において、窒素固定酵素ニトロゲナーゼおよびスカフォールド蛋白質NifUがチオレドキシシン(Trx)と相互作用することが示された。この結果はニトロゲナーゼおよび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。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。

2. 研究の目的

本研究では、ニトロゲナーゼおよびNifUのTrxによる活性制御機構の解明を行うため、A.7120に由来するニトロゲナーゼおよびNifU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

生化学的解析の実験基盤を構築するため、紅色細菌を利用した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)およびMoFe-蛋白質(NifD-NifK複合体)について、紅色細菌における可溶性発現を試みた。また、大腸菌を利用し、A.7120に由来するNifUの触媒ドメインNifU1の大量発現系を構築し、精製を試みた。さらに、構築した生化学実験系を利用し、NifU1のレドックス制御機構の解析を行った。

4. 研究成果

(1) Fe-蛋白質の発現系の構築

ニトロゲナーゼを構成するFe-蛋白質(NifH)およびMoFe-蛋白質(NifD-NifK複合体)を紅色細菌において発現・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、NifH-およびNifD-蛋白質のN末端にアフィニティータグ(strep-tag)を付加した。嫌気チャンバー内でFe-蛋白質およびMoFe-蛋白質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、Fe-蛋白質については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, purif)。一方、MoFe-蛋白質についてはほとんど得られず、発現宿主の検討を含めた、発現系の再構築が必要である。

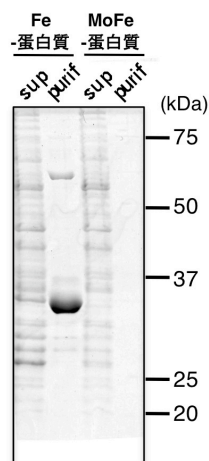


図1. 紅色細菌におけるFe-蛋白質の発現と精製

(2) NifU1の大腸菌における発現系の構築
A. 7120のNifU1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、NifU1のC末端にアフィニティータグ(strep-tag)を付加した。まず、NifU1の発現条件を検討したところ、37°Cで誘導をかけた場合は封入体が多く見られ、わずかにしか可溶化しなかった。一方、低温(18°C)で誘導をかけると、可溶化が5倍以上促進された(図2, sup)。嫌気チャンバー内でNifU1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(図2, purif.)。TrxMは既に発現系

を構築しており、NifU1と同様の方法で精製蛋白質を得た。

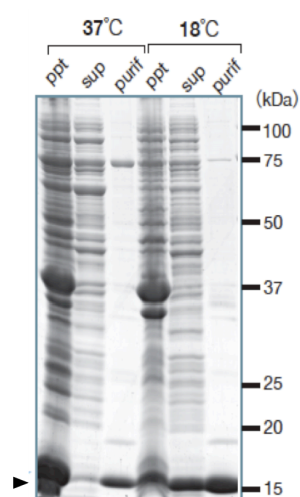


図2. 大腸菌におけるNifU1-蛋白質の発現と精製

白質を得た。

(3) TrxMによるNifU1の還元

NifUのTrxによるレドックスを介した活性制御機構を検討するため、NifU1に形成されたジスルフィド結合がTrxM依存的に還元されるか検討した。酸化型NifU1にTrxMやその再生系を作用させた後、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、NifU1の酸化還元状態を可視化した(図3)。その結果、TrxMと再生系の共存下でのみNifU1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。また、ラベリングアッセイの結果はNifU1がホモ二量体を形成することを示唆しており、次にその検討を行った。

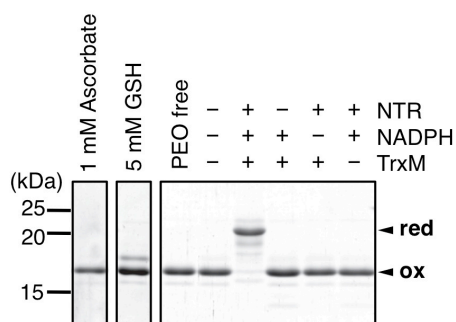


図3. TrxMと再生系を用いたNifU1蛋白質の還元

(4) 酸化型 NifU1 の検討

生体内に存在する天然の酸化剤である酸化型グルタチオン(GSSG)または、強力な酸化剤である塩化銅を作用させたNifU1を、非還元条件下でSDS-PAGE解析した。その結果、酸化処理を施したNifU1は分子量約36 kDaの位置にバンドが確認され(図4, ox)、二量体の形成が示唆された。一方、還元剤の存在下では、単量体を示唆する分子量約16 kDaのバンドが見られたことから(図4, red)、NifU1は分子間ジスルフィド結合を介したホモ二量体を形成することが強く示唆された。

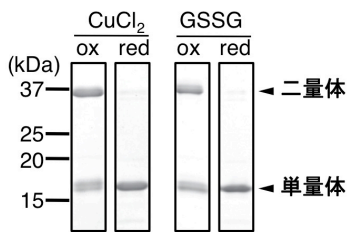


図4. NifU1の酸化

(5) TrxM による NifU1 の活性制御の検討
NifUはニトロゲナーゼの金属中心の生合成に関わる蛋白質であり、NifU1ドメインは鉄硫黄クラスター(Fe-S)を形成することが知られている。そこで、TrxMがNifU1によるFe-Sの形成にどのような影響を与えるか検討した。TrxMおよび再生系の存在下(または非存在下)でNifU1と鉄、システイン脱硫酵素および硫黄源となるシステインを一定時間反応させた後、嫌気条件下でNifU1を再精製し、吸収スペクトルを測定した(図5)。その結果、TrxMと再生系の存在下で反応した場合、Fe-Sに特徴的な吸収特性を示すスペクトルが得られた。

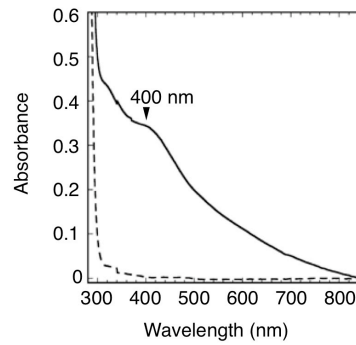


図5. 再精製したNifU1の吸収スペクトル

さらに、再精製したNifU1の鉄含量を測定した結果、NifU1によるFe-S形成活性は、TrxMの存在下で反応した場合およそ4倍に上昇することが明らかとなった(図6)。

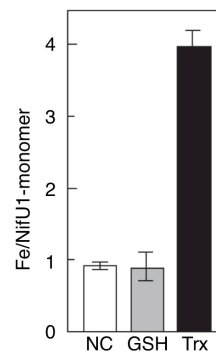


図6. 再精製したNifU1に含まれる鉄の定量

以上から、NifUはTrxMの新奇ターゲットであること、NifU1によるFe-S形成活性はTrxMにより増強されることが示された。本研究で得られた結果は、NifUによるFe-Sの形成にTrxが関与することを示唆する初めての成果である。

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 1 件)

(1) Nomata J., Maeda M., Isu A., Inoue K. and Hisabori T. Involvement of thioredoxin on the scaffold activity of NifU in heterocyst cells of the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J. Biochem. (査読有り) 2015, in press.

[学会発表] (計 5 件)

1. 野亦次郎、前田真希、井須敦子、井上和仁、久堀徹、*Anabaena* sp. strain PCC 7120 の鉄硫黄クラスター生合成蛋白質はTrxと相互作用する、第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学(東京) 2015年3月16日-3月18日

2. 野亦次郎、前田真希、井須敦子、井上和仁、久堀徹、*Anabaena* sp. strain PCC 7120 におけるNifU蛋白質によるFeSクラスター形成はTrxに依存する、第55回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス(富山) 2014年3月18日-3月20日

3. Jiro Nomata, Atsuko Isu and Toru Hisabori, Redox regulation of Iron-Sulfur clusters assembly on NifU scaffold protein from *Anabaena* sp. strain PCC 7120. 18th International Congress on Nitrogen Fixation, フェニックス シーガイアリゾート(宮崎) 2013年10月14日-10月18日

4. 野亦次郎、前田真希、井上和仁、久堀徹 窒素固定性シアノバクテリア*Anabaena* sp. PCC7120におけるチオレドキシンの標的タンパク質の網羅的探索、第4回光合成学会年会、名古屋大学(名古屋) 2013年5月31日-6月1日

5. 土屋昭洋、野亦次郎、久堀徹、窒素固定性シアノバクテリア*Anabaena* sp. PCC7120のチオレドキシンの破壊株を用いたレドックス制御機構の解析、第54回日本植物生理学会、岡山大学(岡山) 2013年3月21日-23日

[その他]

ホームページ

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・資源化学研究所・助教
研究者番号: 40583216