

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 10 年度博士課程進学
氏 名 長谷川 倫男
指導教官 五十嵐 泰夫

論文題目 脱窒菌の *c* 型シトクロムに関する研究

硝酸呼吸は酸素の代わりに硝酸を最終電子受容体とする、嫌気呼吸の一種である。そのうち、おもに硝酸を最終的に亜酸化窒素 N_2O 、あるいは分子状窒素 N_2 にまで還元し、気体として放出するものを脱窒と呼ぶ。脱窒は細菌や放線菌、カビ、酵母など微生物によって行われる。最終生成物として分子状窒素を放出する完全脱窒では、硝酸 $NO_3^- \rightarrow$ 亜硝酸 $NO_2^- \rightarrow$ 一酸化窒素 $NO \rightarrow$ 亜酸化窒素 $N_2O \rightarrow$ 分子状窒素 N_2 の順に還元される。それぞれの反応は、硝酸還元酵素 (NAR)、亜硝酸還元酵素 (NIR)、一酸化窒素還元酵素 (NOR)、亜酸化窒素還元酵素 (N_2OR) によって触媒され、NIR 以下が脱窒に特異的な酵素とされる。これらの構造遺伝子をはじめ脱窒に関連した蛋白質をコードする遺伝子は、多くの場合染色体やプラスミド上にクラスターを形成し、近接して存在している。本研究で用いた *Pseudomonas aeruginosa* においては、NIR と NOR に関連した遺伝子群が隣り合って存在し、*nir*・*nor* クラスターを形成している。このうち、NIR に関連する遺伝子は構造遺伝子を先頭としてオペロンを形成する。NIR は脱窒過程において、水溶性の NO_2^- を気体である NO に変換する反応を触媒する鍵酵素と言え、古くから非常に良く研究されてきた。*nir* オペロン中には構造遺伝子、NIR に結合し触媒中心となる heme d_1 の生合成に関与する遺伝子群、NIR への電子供与体である cytochrome c_{551} をコードする *nirM* のほか、*c* 型 cytochrome と思われる蛋白質をコードする遺伝子 *nirC*、*nirN* が存在する。

細菌の脱窒機能は、その中心となる反応については、遺伝子の立場からも蛋白質の立場からも非常に良く研究が進んでいる。一方で脱窒遺伝子群中にはいまだ機能不明のものもある。脱窒機能の発現は関連遺伝子の機能からだけでは説明しきれない部分もあり、こうした遺伝子産物や他の因子の関連も考慮した研究が必要となってきたと思われる。このような観点から、本研究では、まず当研究室で遺伝子構造が明らかにされた *P.aeruginosa* の *nir* オペロン中にある機能不明の遺伝子 *nirC*、*nirN* 産物の機能を特定し、それが NIR の反応にどのように関わっているかを明らかにすることを旨とした。

1、*nirM*、*nirC*、*nirN* 欠損株の作製と解析

nirM、*nirC*、*nirN* の欠損株を作製しそれらの生育、NIR の発現、活性を調べた。その結果、すべての欠損株において生育は低下していた。また、Western blotting によると NIR 蛋白質の発現量は野生株と変わらないものの、NIR の活性は *in vivo*、*in vitro* 共に、それぞれ約 20%、40%、80%に低下していた。これは活性型の NIR の発現量が低下していることを示している。その理由は *nirM*、*nirC* 欠損株ではオペロン中の heme d_1 合成遺伝子群より上流の遺伝子にマーカー遺伝子を挿入したことによる polar effect のため、十分量の heme d_1 が合成されなかったことによると思われる。従って、欠損株の解析からは各遺伝子の機能は特定できない。しかしながら、このとき *nirC* 欠損株においても半分弱程度ながら活性型の酵素は発現している。これまでに NirC の機能として、NIR への heme d_1 の結合の際に必要であると推定されているが、本実験の結果から、NirC は NIR の成熟化に必ずしも必要ではないと考えられた。

2、NirC、NirN の精製と NirC の機能

c 型 cytochrome のような細胞に多種類存在する蛋白質の場合、その遺伝子を欠損させても他の cytochrome、あるいは他の同様の機能を持つ蛋白質に相補され、その影響は表現型として明確にあらわれてこない。そこで NirC、NirN を精製し、性質を調べることから機能の特定を目指した。両者は *P. aeruginosa* のペリプラズム画分から精製され、N 末のそれぞれ 31 残基、18 残基がシグナル配列として機能していることが示された。cytochrome の機能としては電子伝達、気体のセンサーなどが考えられる。そこで、これらの cytochrome と NIR との電子の授受について調べたところ、NirC は physiological な電子供与体である NirM と同様に NIR へ電子を伝達し、また、膜画分によってコハク酸依存的に還元された。さらに *in vitro* で、膜電子伝達系を利用したコハク酸依存の NIR 活性を測定したところ、NirC は NirM と同様の値を示したことから、NIR への電子供与体となり得ることが示された。これらのことから、NirC の機能は NIR への電子伝達であると判断できた。一方、NirN は NIR との電子伝達、膜画分による還元のいずれも示さなかった。NirN は NirM、NirC と比較して自動酸化性が高く、

電子を保持することには適さないとわれ、これらの性質から電子伝達体ではないと考えている。

3、NirC と NIR の相互作用

NirC が NIR への電子供与体として機能することから、NIR との相互作用について調べた。本菌の NIR は *in vitro* で、cytochrome *c* oxidase 活性 (oxygen reduction) と nitrite reductase 活性を示す。cytochrome *c* oxidase 反応時の NirM、NirC に対する K_m は大きな差を示さなかった。しかし、nitrite reductase 反応においては、NirC に対する K_m は NirM に対するものと比較して著しく高かった。こうした違いは両反応における NirC の相互作用様式の違いか、あるいは NIR の構造変化等に起因するものと推定された。

一般的に cytochrome oxidase とその redox partner との反応は cytochrome 側の Lys の正電荷と、NIR 側の負電荷のアミノ酸との静電的相互作用による。NirC には NirM とは違い、正電荷のアミノ酸として Arg が多く存在する。nitrite reductase 反応における違いは、相互作用に関わるアミノ酸の違いではないかと考え、菌株間で保存性の高い Arg8、Arg13、Arg27、His14 について Ala あるいは Asp に置換し、 K_m 値の変化を調べることを試みた。しかしながら、変異体の多くは発現せず、唯一発現した Arg27Ala についても cytochrome *c* oxidase 反応の K_m に大きな変化は見られなかった。こうしたことから、これらの Arg は相互作用よりもむしろ構造の維持に重要であると考えられた。

そこで、まず立体構造が明らかになっている NirM を用いて、NIR の両反応時における相互作用について調べることにした。NirM では、heme *c* が大きく露出するヘム・クレバス周囲に疎水性のアミノ酸が多くあるが、その縁 ("north" edge) にふたつの Lys (Lys8、Lys10) が存在し、これが NIR との親和性に関わっていると考えられている。これらの Lys を Asp に置換し、NIR の両反応時における K_m 値を測定した。しかし変異蛋白において、野生型との K_m の差異はみられなかった。各変異蛋白は、Native-PAGE の結果から、野生型と比較して分子の荷電状態が負にシフトしていた。こうしたことから NirM と NIR の相互作用においては、NirM 側の電荷は NIR との親和性におおきく影響していないと結論した。NIR と NirM および NirC との特異的な親和性は、静電的な力よりも疎水的な力によると推察される。また、こうしたことから、ふたつの反応時の NIR の NirC に対する親和性の違いは、NIR の両反応において触媒部位とは別の、電子受容部位の立体構造の変化を示している可能性が考えられた。

4、膜電子伝達経路との関係

2、において膜画分による NirM のコハク酸依存的な還元は、cytochrome *bc*₁ を阻害する HOQNO による阻害を受けなかった。*P. stutzeri* では NIR への電子伝達に

関わる膜蛋白質として NirT が報告されている。そこで NirM へ電子を渡し得る他の経路の存在を検証するため、cytochrome bc_1 欠損株を作製した。しかし調製した膜画分による NirM の還元は観察されず、cytochrome bc_1 を経由する経路が唯一の経路であった。この実験からは、NirM および銅蛋白 azurin が cytochrome bc_1 から直接電子を受け取っていることが示された。azurin は NIR と電子の授受が可能なことから、NIR への電子供与体と考えられてきたが、*nirM* が脱窒クラスター中から発見されたことで、近年では生理的な機能は別のものと考えられるようになった。しかし本実験から、cytochrome bc_1 と NIR との間で電子を mediate できることが示され、多少は関与していると考えられる。これらのことから、脱窒に関与する酵素への電子伝達は、cytochrome bc_1 より下流の経路は、比較的 flexible であると考えられる。

5、転写調節について

4、で作製した cytochrome bc_1 欠損株において、*nir*・*nor* 遺伝子群の転写活性を測定した。これまでに、転写促進物質が NO_2^- であるか NO であるかについては興味を持たれてきたが、NIR を欠損させ NO の生成を止めると、各遺伝子群のプロモーター活性が落ちることから、現在では NO が有力な促進物質と考えられている。しかし、やはり NO を生成しない cytochrome bc_1 欠損株では *nir* 遺伝子群は高い転写活性を示した。さらに本株の CFE は、高い NIR 活性を示した。これらのことから、*nir* 遺伝子群は NO よりも NO_2^- による制御を受けていることが考えられた。このことから単純に判断すれば、脱窒遺伝子群は少なくともふたつ以上の基質に対応した制御系を持つと言える。

まとめ

本研究で明らかになったおもなことは、1) NirC が NIR への電子供与体として機能すること、2) NIR の触媒する oxygen reduction、nitrite reduction の両反応において、NirC に対する親和性が異なること、3) NIR と NirM との作用に、静電的な力はおおきく影響しないことである。ここから、本菌の NIR は電子供与体と疎水的な力で結合すると考察した。また 2) から、こうした親和性の違いは両反応時に、酵素の電子受容部位の立体構造が変化することによるものではないかと考察した。近年、NIR の触媒機構について、構造生物学的立場からの詳細な研究が多く報告されるようになった。NirC の立体構造に関する知見などを得ることで、NIR の反応と conformation 変化について、多角的にアプローチできるのではないかと考えている。