OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Protein engineering of plant sulfite reductase : A study on its substrate recognition and redox property
Author(s)	中山, 雅登
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2249
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

植物亜硫酸還元酵素の基質認識とレドックス特性の蛋白質工学的研究

Protein Engineering of Plant Sulfite Reductase: A Study on Its Substrate Recognition and Redox Property

博士論文

2002 年 3 月

大阪大学 大学院理学研究科

生物科学専攻

たんぱく質研究所 酵素反応学部門

中山 雅登

目 次

要約 1

要旨 3

略語 5

序章 7

第 1 章 トウモロコシ亜硫酸還元酵素組換え体作製と活性測定
序 14
結果 17
SiR 組換え体の大腸菌での発現と精製
酵素アッセイ-システイン合成酵素共役法と
NADPH 酸化モニター法
酵素反応パラメーター
還元型 SiR の吸収スペクトル
考察 30

第 2 章 高電位フェレドキシン S46G による SiR の反応特性の解析
序 33
結果 35
S46G による SiR の酵素活性
S46G と SiR の相互作用
ヒドロキシルアミン還元活性の特徴
S46G から SiR への電子移動
考察 40

第 3 章 亜硝酸還元酵素(NiR)と SiR との比較および
部位特異的改変による反応特性の解析
序 45
結果 51
NiR の酵素活性
NiR の吸収スペクトル
SiR 改変体作製
SiR 改変体の酵素活性
考察 63

第 4 章 SiR 改変体の基質親和性とレドックス特性の評価
序 72
結果 73
亜硫酸、亜硝酸のシロヘムへの親和性
還元型スペクトルの特性
Fd と分子間電子移動の比較
考察 81

実験方法 86

参考文献 92

謝辞 103

論文目録 104

付録論文

Existenece of two heme B centers in cytochrome b_{561} from bovine adrenal chromaffin vesicles as revealed by a new purification procedure and EPR spectroscopy

Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin

The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase

Mutational analysis of the substrate specificity of plant sulfite reductase

要 約

植物の亜硫酸還元酵素(SiR: E.C.1.8.7.1)は、[4Fe-4S]クラスターとシロヘムを持つ単量体酵素で、亜硫酸(SO_3^{2-})を硫化物イオン(S^{2-})へ、または亜硝酸(NO_2^-)をアンモニウムイオン(NH_4^+)へと還元する。SiR は葉緑体ストロマに存在し、反応に必要な電子をフェレドキシン(Fd)から受け取る。基質はシロヘム鉄原子に結合し、それぞれの S-O または N-O 結合が 2 電子ずつ還元され 1 本ずつ解裂し、1 分子の水を生じる。亜硫酸はこの過程が 3 回繰り返されて完全還元されると考えられる。SiR のこのような基質の還元機構や、Fd も含めた 3 つの酸化還元中心を経由する電子伝達機構、亜硫酸に対する強い親和性を決定するその構造要因については未だ詳細には解明されていない。

近年、大腸菌 SiR ヘムサブユニットの X 線結晶構造が解かれ、シロヘム活性中心近傍に 4 残基の塩基性アミノ酸が保存性され、これらが基質認識と還元反応に重要な役割を持つことが示唆された。私は SiR の基質認識と還元過程の構造-機能相関を解明するため、トウモロコシ SiR の塩基性残基を部位特異的に置換した改変体を作製し、その酵素学的解析を行った。また、Fd 野生型と共に、酸化還元電位が上昇した Fd 改変体を電子共与体として用い、SiR への電子移動や還元反応の比較解析も行った。

部位特異的置換の結果、SiR 改変体として、R193E、R193A、K276Q、K278N が得られた。活性測定の結果、全ての改変体は亜硫酸還元活性を失ったことが判明したが、改変体 R193A と R193E では、亜硝酸に対してそれぞれ強い基質親和性または酵素活性を示した。このことから、シロヘム近傍の塩基性残基は基質認識とその還元反応に強く関与していることが実験的に初めて示された。

高電位 Fd 改変体 S46G を用いた場合、SiR は、ヒドロキシルアミン以外の基質には活性を示さなかった。S46G の SiR に対する電子移動は極端に遅いが、ヒドロキシルアミンも他の基質と同様にシロヘム上で還元されることや、S46G の SiR と

の複合体形成については、Fd 野生型と有意な差はないことが実験的に証明された。さらに、SiR 改変体についても S46G を用いて解析したところ、幾つかの改変体ではヒドロキシルアミン還元活性が亜硫酸または亜硝酸によって競争的に阻害されたので、これらは基質に対する親和性をある程度保持していることが分かった。また、改変体 R193A と K276Q では、Fd 野生型よりも電子伝達能が著しく低い S46G によってむしろ速やかに還元されたので、これらの酸化還元特性が SiR 野生型よりも著しく変化したことが推測された。

以上のことから、SiR シロヘム近在の塩基性アミノ酸は、基質のシロヘムへの結合や還元反応の進行、補欠分子の電位状態や SiR 分子内の電子移動経路を調節する重要な構造因子であることが考察された。

要 旨

はじめに

植物亜硫酸還元酵素(SiR: E.C.1.8.7.1)は、[4Fe-4S]クラスターとシロヘムを持つ単量体酵素で、亜硫酸イオン(SO_3^{2-})を硫化物イオン(S^{2-})へ、また亜硝酸イオン(NO_2^-)をアンモニウムイオン(NH_4^+)へと6電子還元する。SiRは葉緑体ストロマに存在し、還元反応に必要な電子をフェレドキシン(Fd)から受け取る。基質はヘム鉄に結合した状態で、2電子還元によりS-OやN-O結合の酸素が1原子ずつ解裂して水分子として遊離し、この過程が3回繰り返されて全反応が完結すると考えられる。この還元反応過程やFd-SiRにまたがる3つの補欠分子間の電子移動の詳細、およびSiRの亜硫酸に対する強い親和性を決定する構造的要因等、SiRの反応機構を理解する上で重要な研究は殆ど報告されていない。近年、複数の生物由来のSiRのアミノ酸配列情報が利用できるようになり、また大腸菌SiRのヘムサブユニットのX線結晶構造が報告され、補欠分子周辺の活性中心のアミノ酸残基が保存されていることが判明した。特に完全に保存されていた4残基の塩基性アミノ酸は、基質認識や還元過程に関して必須の構造因子であることが考えられた(図)。私は、このようなSiRの構造-機能相関を明らかにすることを目指し、トウモロコシSiR大量発現系を応用して部位特異的変異導入を行い、得られた改変体の特性変化について酵素学的解析を行った。一方、野生型Fdに加え電子供与体として高電位Fd改変体を用いて、Fd-SiR間の電子移動や還元反応の比較解析も行った。

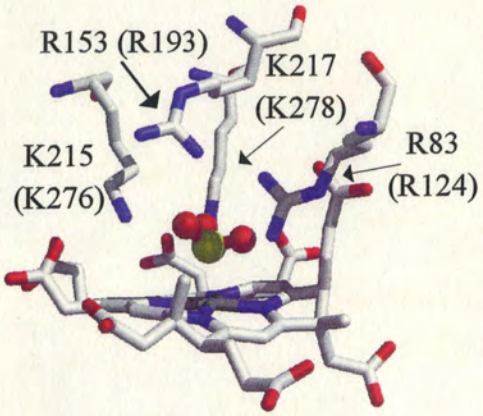


図　大腸菌SiR活性中心の立体構造
保存性の高い4つの塩基性アミノ酸は亜硫酸やシロヘムポルフィリン環のカルボキシル側鎖との間に水素結合ネットワークを形成する。トウモロコシSiRの活性中心においてこれらに対応する残基は( )内に示した。

SiR改変体の基質特異性の変化

シロヘム周辺の塩基性アミノ酸の系統的な置換の結果、補欠分子と高次構造を安定に維持したSiR改変体、R193E、R193A、K276Q、K278Nを得た。これらはそれぞれに野生型とは異なる特徴的な吸収スペクトルを示し、改変によってシロヘムの電子状態に何らかの変化が起きていると判断した。改変体の活性を調べたところ、全ての改変体は亜硫酸還元活性が失われていたが、亜硝酸還元活性については、表1に示すように消失、残存あるいは増進しているものが認められた。この結果から、SiRのシロヘム近傍の塩基性残基は基質認識とその還元に重要な

構造要因であることが実験的に初めて示された。これらの酵素反応の動力学的パラメーター変化に基づいて、SiR の反応特性を規定している構造要因を議論する。

表1 SiRの亜硫酸、亜硝酸に対するK_m

Substrate	SO_3^{2-}	NO_2^-				
Enzyme	WT	WT	R193E	R193A	K276Q	K278N
K_m (μM)	3.3	440	310	2.2	-	560
k_{cat} (e^-/min/siroheme)	460	460	910	180	-	110

高電位 Fd 改変体(S46G)による SiR の還元反応過程の解析

S46G は Fd 野生型より電位が約 180 mV 上昇した改変体である。これを電子供与体に用いた場合、SiR は亜硫酸や亜硝酸を基質とする活性を殆ど発揮できないが、興味あることにヒドロキシルアミンの還元活性はある程度検出される。S46G と SiR 間の電子移動を定常状態やパルスラジオリシスを用いた遷移状態で調べたところ、電子移動が Fd 野生型よりも著しく遅いことが判明した。従ってヒドロキシルアミンの還元反応は、Fd からの電子伝達速度が低下してもある程度は進行し、亜硫酸等のような基質とは異なる性質のものと考えた。また、この S46G に依存したヒドロキシルアミン活性は、亜硫酸や亜硝酸によって競合的に阻害されたので、基質の還元サイトは全て共通であると考えられた。さらに、S46G は、野生型の Fd と SiR の複合体形成を競争的に阻害したので、Fd-SiR の電子伝達複合体形成について 2 つの Fd 分子種の結合領域は共通であるとも考えられた。以上の結果から、S46G による現象は、分子間相互作用の問題ではなく、Fd の電位と基質化合物の種類による還元機構の違いによると結論した。

S46G を用いた SiR 改変体の解析

SiR 改変体について、S46G を用いてヒドロキシルアミンの還元活性に対する亜硫酸、亜硝酸による阻害実験を行った。結果の一例を表 2 に示す。亜硫酸の競合阻害定数は改変体により様々であった。すでに述べたように Fd 野生型を用いた酵素反応では SiR 改変体は亜硫酸還元活性を示さない。このことから、改変体の亜硫酸に対する不活性の原因として、基質結合能が大きく低下したことによる、結合力を保持していても還元反応が進行しないことによる、あるいはその両方によるものと考察した。さらに S46G を用いて SiR を電子受容体に見立てた解析から、Fd 野生型よりもむしろ S46G によって還元されやすくなった SiR 分子種が確認された。この結果は、SiR 野生型と改変体とでは、ヘム鉄の基質への結合力や基質の還元反応の進行、及び補欠分子の電位や分子内の電子移動経路が異なる事を示唆するものである。SiR 改変体それぞれにその特性を議論する。

表2 S46Gに依存したSiR改変体ヒドロキシルアミン
活性に対する亜硫酸の阻害定数

Enzyme	WT	R193E	R193A	K276Q	K278N
K_i (μM)	3.5	11900	1300	52	1000

略 語

APS	adenosine 5'-phosphosulfate
CD	circular dichroism
CSase	cysteine synthase
CT	charge transfer
DE, DEAE	diethylaminoethyl cellulose
e_{aq}^-	hydrated electron
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ENDOR	electron and nuclear double resonance
EPR	electron paramagnetic resonance
FAD	flavin adenine dinucleotide
Fd	ferredoxin
FMN	flavin mononucleotide
FNR	ferredoxin-$NADP^+$ reductase
FPLC	fast performance liquid chromatography
G6P	glucose 6-phosphate
G6PDH	glucose 6-phosphate dehydrogenase
GOGAT	glutamine 2-oxoglutarate amidotransferase (glutamine sythase)
GS	glutamine synthetase
GSH	reduced glutathione
Hepes	*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
IPTG	isopropyl 1-thio-ß-D(-)-galactopyranoside
k_{cat}	catalytic constant (catalytic centre activity)
K_d	dissociation constant
K_i	inhibitior constant
K_m	Michaelis constant
k_{obs}	observed pseudo-first-order rate constant
K-Pi	potassium phosphate
*l*FNR	leaf type ferredoxin-$NADP^+$ reductase
MV	methyl viologen
$NADP^+$	oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NiR	nitrite reductase
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	nitric oxide (nitrosyl)
NR	nitrate reductase
NT	nitrate transporter
OAS	*O*-acethyl-L-serine
2OG	2-oxoglutarate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoreisis
PAPS	3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfate
PC	phytochelatin
PCR	polymerase chain reactions

6PG	6 -phosphogluconolactone
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PSI	photosystem I
PVDF	polyvinylidene difluoride
*r*FNR	root type ferredoxin-$NADP^+$ reductase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SiR	sulfite reductase
SNiRR	sulfite, or nitrite reductase repeat
SO	sulfite oxidase
ST	sulfate transporter
TCA	trichloroacetic acid
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
Uro'gen III	Uroporphyrinogen III

序 章

硫黄は生物の必須栄養素の一つで、含硫アミノ酸、硫脂質、チアミンや CoA 等のビタミン補酵素類等の生体分子の構成要素である。植物は硫酸イオンを出発材料としてシステインを合成する硫黄同化系を備え(図 1)、含硫物質の大部分はこの一次同化システインから派生する(Höfgen *et al.*, 2001)。地中の硫酸は根細胞の原形質膜に存在する硫酸トランスポーター(sulfate transporter: ST)によって植物体内に吸収される。取り込まれた硫酸の一部は根細胞に留まり、一部は導管を通じて地上部に運ばれ、再度 ST を介して緑色組織の維管束鞘細胞や葉肉細胞に取り込まれる(Takahashi *et al.*, 1999; Saito, 2000; Watanabe-Takahashi *et al.*, 2001)。細胞内の硫酸は、葉緑体や非光合成プラスチド内で還元を受け同化される。硫酸の亜硫酸への直接の還元は、その酸化還元電位が非常に低いため(-517 mV)、この反応を直接触媒できる酵素は生物には存在しないので(Heldt, 1996)、硫酸は多段階の反応によって還元される。硫酸は、ATP sulfurylase によって ATP を付加され 5'-adenosine-phosphosulfonate (APS)へと活性化される。この APS は APS 還元酵素によって亜硫酸へと還元される(Leustek and Saito, 1999)。APS 還元酵素はチオレドキシンモチーフを持つ鉄硫黄クラスター蛋白質で、還元型グルタチオン(GSH)を生理的電子供与体に利用する(Bick and Leustek, 1998; Kopriva *et al.*, 2001a)。原核微生物では APS がさらなるリン酸化を受け 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS)となり、これが亜硫酸へと還元される経路が知られている(Kredich, 1996)。植物でも PAPS を経由する経路は存在すると考えられるが、主に、APS を経由した反応経路が利用されている。亜硫酸は亜硫酸還元酵素(sulfite reductase: SiR)によって硫化物イオン(S^{2-})へと還元され、S^{2-}はシステイン合成酵素(CSase)によって *O*-アセチル-L-セリン(OAS)と共にシステインへと合成される。システインはさらにメチオニンや還元解毒物質であるグルタチオン(GSH)、フィトケラチン(phytochelatin: PC)等の前駆体として利用される(Foyer *et al.*, 2001; Cobbett, 2000)。ヒトを含む動物は、無機硫黄の還元同化能が無いため、含硫栄養素をそのような生物に依存している。

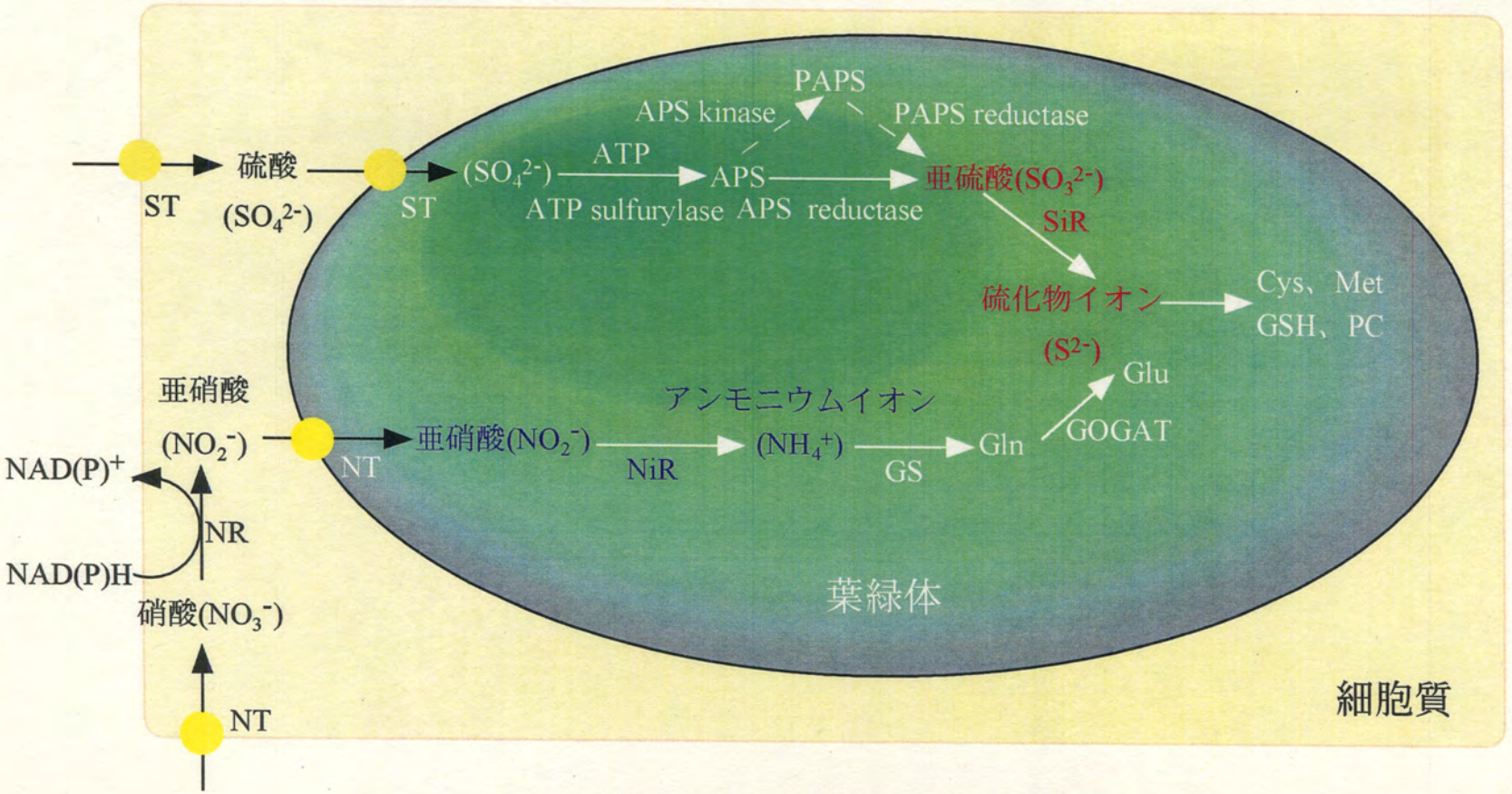


図1 植物細胞内における硫黄と窒素同化

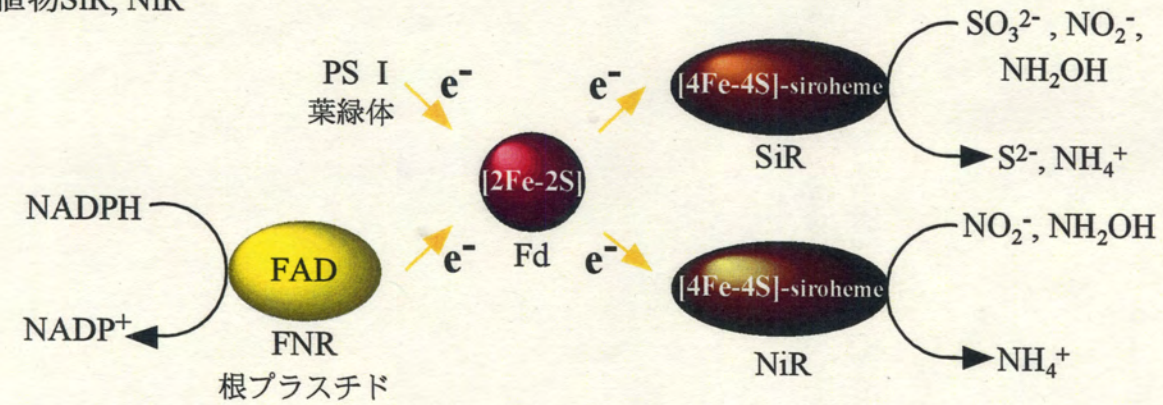
葉緑体に取り込まれた硫酸は、ATPの付加による活性化を受けAPSとなる。APSは亜硫酸へと還元され、亜硫酸はSiRによって硫化物イオンに還元される。またPAPSを経由する経路も考えられる。硫化物イオンは、Cysの合成に利用される。一方硝酸は細胞質でまずNRによって亜硝酸に還元される。葉緑体に取り込まれた亜硝酸は、NiRによってアンモニウムイオンに還元され、Gln、Gluへと同化される。

NT: nitrate transporter、ST: sulfate transporter、GSH: glutathione、PC: phytochelatine、SiR: sulfite reductase, NiR: nitrite reductase、GS: glutamine synthetase、GOGAT: glutamate synthase

SiR(E.C.1.8.7.1)はこの硫黄同化系の主要酵素の 1 つであり、高等植物(Asada *et al.*, 1969; Tamura, 1976; Krueger and Siegel, 1982; Takahashi *et al.*, 1996, 1997)や藻類(Saito and Tamura, 1971; Koguchi and Tamura, 1988, 1989)から精製され、詳細な生化学的研究が行われてきた。その結果、SiR は約 65 kDa 前後の水溶性の単量体酵素で、補欠分子として[4Fe-4S]クラスターとシロヘムを持ち、還元型 MV や Fd に依存した酵素活性が知られている。また近年、SiR 遺伝子が植物やラン藻からクローニングされている(Gisselmann *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1996; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 1998; Keaton *et al.*, 2001)。植物 SiR は核ゲノム上の単一遺伝子によってコードされている(Bork *et al.*, 1998)。SiR はまず細胞質で N 末端にプラスチド輸送配列を持つ前駆体として合成されるが(Ideguchi *et al.*, 1995a; Brühl *et al.*, 1996)、葉緑体または根プラスチドストロマに局在している(Schmutz and Brunold, 1985; Brunold and Suter, 1989)。プラスチド内へ移行した後、前駆体は延長配列を切除され、ペプチド鎖の折り畳み、補欠分子の挿入が行われ、成熟体になる。SiR は Fd を介して、葉緑体では光化学系 I(PSI)からの光還元力を、根プラスチドではピリジンヌクレオチドの化学還元力を、基質還元反応に利用する(Aketagawa and Tamura, 1980; Brunold and Suter, 1989, 図 2 (a))。最近、エンドウのプラスチドで核様体の形成に関わる 70 kDa 蛋白質が SiR であることが判明し、SiR の硫酸還元同化以外の生理的役割も示唆されている(Sato *et al.*, 2000)。

原核や真核の微生物でも植物と類似の経路で硫酸還元は行われており、ここでも微生物型の SiR が機能している(Kredich, 1996)。大腸菌 SiR は、植物酵素とは異なり、フラビン(α)サブユニットとヘム(ß)サブユニットから成る複合体である(Siegel and Davis, 1974; Zeghouf *et al.*, 2000, 図 2b)。分子量 60 kDa のαサブユニットは FMN と FAD を持ち、単体で NADPH-ジアホラーゼ活性を示す(Siegel and Davis 1974; Fader *et al.*, 1974; Eschenbrenner *et al.*, 1995a, b; Zeghouf, *et al.*, 1998)。一方、分子量 64 kDa の ß サブユニットは、補欠分子族に[4Fe-4S]クラスターとシロヘムを持ち(Murphy *et al.*, 1973; Siegel *et al*, 1978)、植物 SiR と相同な蛋白質である。大腸菌 SiR 複合体は NADPH の酸化で生じる電子を、FAD、FMN から[4Fe-4S]クラスター、シロヘムへと伝達し、シロヘムで亜硫酸を還元する(Siegel *et al.*, 1974)。

(a) 植物SiR, NiR



(b) 大腸菌SiR

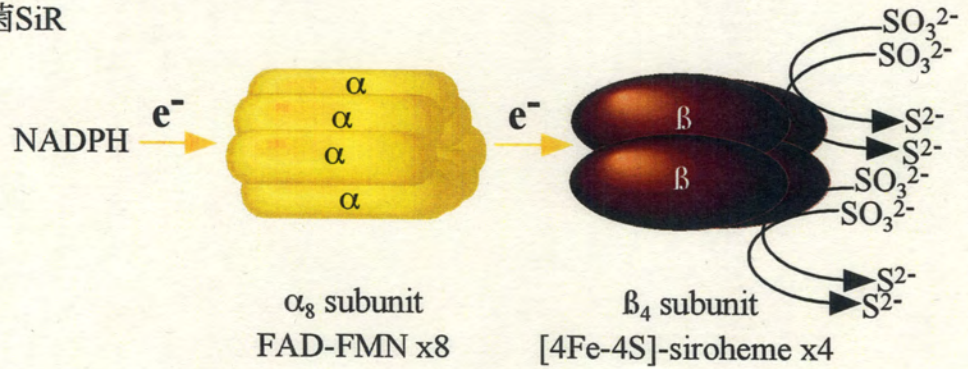


図2 植物SiR、NiRと大腸菌SiRの分子構造と反応模式図

[4Fe-4S]-シロヘムを持つ植物型SiRとNiRは、Fdから電子を受け、亜硫酸や亜硝酸、ヒドロキシルアミンの還元反応を行う。Fdは葉緑体ではPSIによって、根プラスチドではFNRによって還元される(a)。大腸菌SiRは、FAD-FMNを持つαサブユニット8個と、[4Fe-4S]-sirohemeを持つßサブユニット4個から成る(b)。αサブユニットはNADPHから得た電子を基質還元を行うßサブユニットへと伝達する。なお大腸菌SiR ßサブユニットも亜硝酸とヒドロキシルアミンの還元反応を行う。

SiR は、亜硫酸から硫化物への 6 電子還元と共に、亜硝酸とヒドロキシルアミンのアンモニアへの還元反応も行う(Siegel *et al.*, 1982)。サルモネラ菌や酵母の SiR もαと ß サブユニットから成る NADPH 依存性の複合体酵素である(Kobayashi and Yoshimoto, 1998; Ostrowski *et al.*, 1989a, b)。

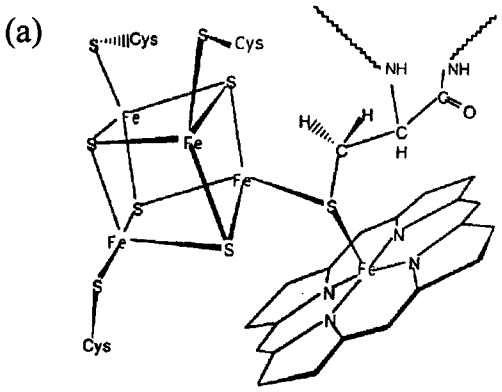
植物やラン藻は、硫酸と同様に硝酸の還元的同化も行う(図 1)。外部から取り込まれた硝酸は、細胞質で硝酸還元酵素(NR)によって NAD(P)H 依存的に亜硝酸に還元される。さらに亜硝酸はプラスチド内で NiR によってアンモニアへと還元される。アンモニアはグルタミン合成酵素(GS)によってグルタミンに、さらにグルタミンはグルタミン酸合成酵素(GOGAT)によって 2 オキソグルタル酸(2OG)にアミド基を転移し、共にグルタミン酸に変換される(Hase, 1995)。NiR (E.C.1.7.7.1)は分子量約 60〜70 kDa の単量体酵素で、SiR と同様、シロヘムと[4Fe-4S]クラスターを補欠分子として持ち(Vega and Kamin, 1977; Lancaster *et al.*, 1979)、Fd を電子供与体として亜硝酸、ヒドロキシルアミンをアンモニアへと還元する(図 2 (a))。NiR と SiR は補欠分子や基質が共通するが、両者の基質特異性は大きく異なり(Krueger and Siegel, 1982)、両者の違いを決定する詳しい構造的要因は不明である。

SiR の補欠分子シロヘムは isobacteriochlorin 型の鉄 dimethylurotetraporphyrin である。シロヘムはプロトヘムとは異なり、側鎖に 8 個のカルボキシル基を持つ Uro'gen III の誘導体で、一部のピロール環の二重結合が部分的に飽和している(Murphy *et al.*, 1973, 1974)。シロヘムが反応性の強い π カチオンラジカルを形成するという報告が、モデル化合物の研究の結果からなされている(Chang and Fajer, 1980; Chang *et al.*, 1981)。シロヘムの生合成経路を図 3 に記す。Uro'gen III は 2 つのメチル基を付加されてプレコリン 2 (PC2)に変換される。これは、ヘムやコバラミン(vitamine B_{12})の前駆体でもある(Siegel *et al.*, 1978)。PC2 のピロール環の 1 つにある NH 基が脱水素化され、さらに、鉄が配位してシロヘムとなる。この一連の反応は、大腸菌では *cysG* 遺伝子にコードされるシロヘム合成酵素によって行われる(Warren *et al.*, 1990; Spencer *et al.*, 1993)。CysG は分子量 52 kDa の多機能性酵素で、C 末端領域の $CysG^A$ と N 末端領域の $CysG^B$ ドメインから成り、それぞれのサブユニットが Uro'gen III のメチル化、PC2 の脱水素化と鉄イオンの導入反応を分担すると考えらる(Woodcock *et al.*, 1998)。原核微生物においては、シロヘム合成酵素遺伝子の

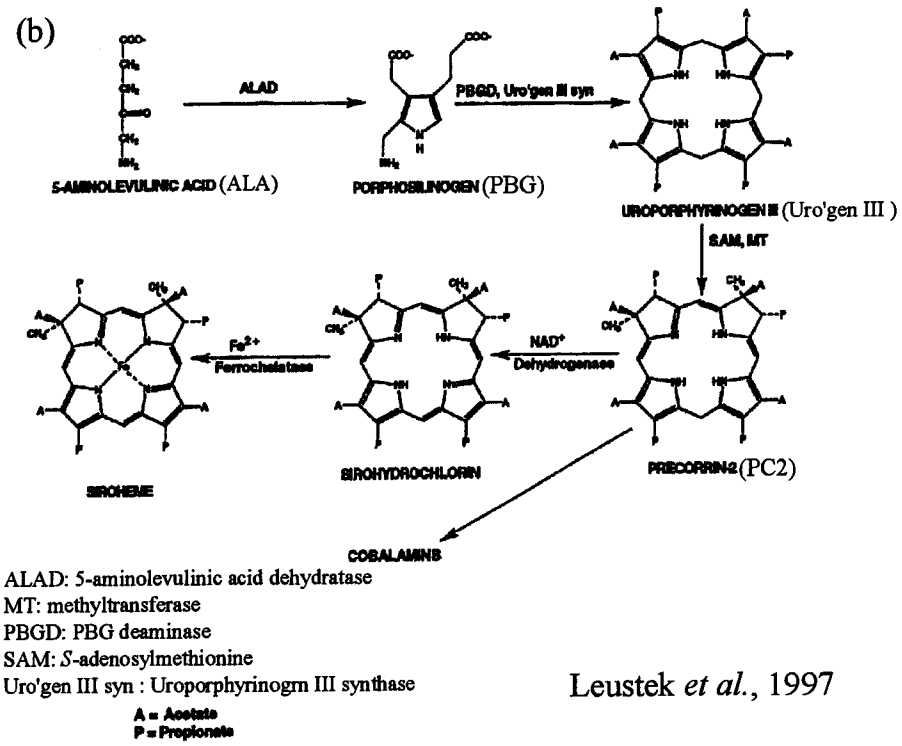
欠損が無機硫黄と窒素同化機能を低下させるという報告もある(Tate *et al.*, 1997)。また *cysG* 遺伝子は大腸菌の異化型 NiR 遺伝子と同じオペロン上にあり(Mcdonald and Cole, 1985)、シロヘム酵素とその補欠分子の生合成は転写レベルで同調的に調節されている。大腸菌で、外来生物由来の組換え体 SiR または NiR を発現させる場合、CysG の共発現がこれらのホロ型酵素の量的増加に有効であるという報告がある(Wu *et al.*, 1991; Curdt *et al.*, 2000)。このことから、シロヘムの細胞内基底量が充分であることが、SiR や NiR が機能性分子として発現するために不可欠であると考えられる。

SiR は、大腸菌や硫酸還元菌のものについては、低分子化合物還元反応のモデル酵素として、過去数十年にわたって集約的な研究が行われてきた。その一方で、植物や藻類の SiR に関しての研究例は少なく、酵素反応機構や Fd 依存性のレドックス機能についての詳細は、未だ不明である。植物をはじめ、生物の無機物同化系の分子的成り立ちを正しく理解するにはこの Fd 依存型 SiR の研究は不可欠であり、その知見は植物生理学分野の基礎的、応用的研究に大きく貢献する可能性がある。またヘムと鉄硫黄クラスターによって構成される独特な酸化還元中心を持つ SiR の構造-機能相関の解明は、cytochrome P450 や cytochrome *c* ペルオキシダーゼ、NO 合成酵素など、低分子化学物質還元を行う酵素化学の分野にも極めて重要な情報を提供するであろう。このような背景に基づき、私は博士課程で植物 SiR の研究を行った。

本論文は以下の様な構成に基づいて、植物 SiR の酵素化学について総括するものである。第 1 章ではトウモロコシ SiR 組換え体の作製と活性測定方法の確立について、第 2 章では電子供与体である Fd と SiR のレドックス特性と基質還元についての新知見を記述する。第 3 章では NiR と SiR との酵素特性の比較と、SiR の部位特異的変異がもたらした基質認識の変化について記述する。第 4 章では Fd と SiR の改変体を用いた分子間、分子内電子移動特性の新知見を記述している。



Kaufman *et al*, 1993



Leustek *et al.*, 1997

図3 SiR酸化還元中心の構造とシロヘムの生合成系

SiRの[4Fe-4S]クラスターとシロヘムは、ヘム鉄とクラスターの1個の鉄原子がCys残基のγ位のS原子によって架橋され、2つの補欠分子は電気的に共役している(a)。シロヘム生合成の概略図(b)。8分子のALAを基質として、シロヘムの前駆体Uro'gen IIIが合成される。これは2つのメチル基を付加されてPC2となり、さらに脱水素化と鉄原子配位を受けシロヘムへと加工される。この一連の反応を触媒するシロヘム合成酵素遺伝子が大腸菌やサルモネラ菌から単離されている。

第1章　トウモロコシ亜硫酸還元酵素(SiR)組換え体作製と活性測定

序

亜硫酸還元酵素(SiR)は、[4Fe-4S]クラスターとシロヘムを補欠分子として保持し、亜硫酸の還元反応を触媒する。SiR は生理的役割から、同化型と異化型に大別される(Crane and Getzoff, 1996)。無機硫黄同化系の一段階を担う同化型 SiR は、大腸菌などの原核微生物、植物やラン藻、酵母やカビなどに存在する。SiR は 1 分子の亜硫酸(SO_3^{2-})と結合し、これを硫化物イオン(S^{2-})へと 6 電子還元する(Siegel *et al.*, 1982)。また、亜硝酸イオン(NO_2^-)とヒドロキシルアミン(NH_2OH)をそれぞれ 6 電子、または 2 電子還元し、アンモニウムイオン(NH_4^+)を生成する(Siegel *et al.*, 1974, 1982; Krueger and Siegel, 1982)。一方、硫黄還元細菌に存在する異化型 SiR は desulfoviridin と呼ばれ、機能未知な複数の ß 及びγサブユニットと共に複合体を形成する。Desulfoviridin は、硫化物イオン以外に、三チオン硫酸($S_3O_6^{2-}$)やチオ硫酸($S_2O_2^{2-}$)を生成するが、これら副生成物もそれぞれ、三チオン硫酸還元酵素、チオ硫酸還元酵素によって硫化物イオンまで還元される。Desulfoviridin はこれらの酵素と共に、硫黄還元細菌の硫酸呼吸を支える重要な酵素の一つである(Wolfe *et al.*, 1994)。ここからは同化型 SiR について詳しく説明する。

同化型 SiR は、Fd 依存型と NADPH 依存型、そして低分子量型の 3 つに大別できる。Fd 依存型は主に高等植物や藻類の SiR で、葉緑体ストロマに存在し、Fd を生理的電子供与体として光還元力を触媒反応に利用する(Asada *et al.*, 1969; Tamura 1976; Akaetagawa and Tamura, 1980)。また非光合成プラスチドにおいても Fd を介した還元力の供給を受ける。一般に植物 SiR はシングルコピーの単量体として存在するが、ニラやカブではイソ型の報告もあり(Takahashi *et al.*, 1996, 1997)、ホモオリゴマーとしての存在が報告されている例もある(Aketagawa and Tamura, 1980)。藻類の SiR も基本的には植物のものと同じであるが、高等植物のように N 末端の transit 配列は存在しない(Gisselmann *et al.*, 1993)。イソ型の有無や *in vivo* での存在様態は植物によって様々であるものの、Fd 依存型の基本的な構造や機能は全て共

通すると考えられる。

NADPH 依存型については、主に原核微生物や酵母の SiR が知られている(Siegel *et al.*, 1974; Ostrowski *et al.*, 1989a, b; Kobayashi and Yoshimoto, 1998)。大腸菌をはじめこれらの SiR は、ヘム(ß)サブユニットとフラビン(α)サブユニットからなるヘテロオリゴマーである。分子量 66 kDa の SiR フラビン(α)サブユニットは、C 末端側の FAD ドメインと NADPH 結合ドメインを含む FNR 様モジュールと、FMN ドメインを含むフラボドキシン様ドメインから成り(Gruez *et al.*, 1998, 2000)、単体で NADPH 依存性還元活性を示す(Eschenbrenner *et al.*, 1995a)。NADPH から得た電子はこのフラビンサブユニットを経て、ヘムサブユニットの[4Fe-4S]クラスター、シロヘムへ移動し、亜硫酸の還元に利用される(Siegel *et al.*, 1974)。このヘテロオリゴマーは高濃度の尿素存在下で解離でき、単体のヘムサブユニットは MV や Cr(II)EDTA に依存した活性を示す(Siegel and Davis, 1974; Janick and Siegel., 1982; Madden *et al.*, 1989)。植物では、大腸菌 SiR αサブユニットのホモログは存在しないが、植物 SiR は大腸菌 SiR ß サブユニットと相同性がある。両者には電子供与体や 4 次構造上の違いはあるが、基質還元に関わる構造や機能は共通すると思われる(Crane *et al.*, 1995; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 2000)。

低分子量型 SiR は、分子量約 24 kDa で、硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* に存在し、シロヘムと[4Fe-4S]クラスターを保持するが、生理的電子供与体は不明である(Huynh *et al.*, 1984; Moura *et al.*, 1986; Tan *et al.*, 1991)。低分子量型 SiR では、2 つの補欠分子をブリッジするのはフリーの S^{2-}で、鉄硫黄クラスターの反対側の配位子は His である。低分子量型 SiR では、酸化型のシロヘム Fe^{3+}は低スピンの EPR シグナルを示すが、これは Fd 依存型や NADPH 依存型 SiR の酸化型のシロヘム Fe^{3+}が高スピンの EPR シグナルを表す点と異なる。しかし低分子量 SiR も亜硫酸や亜硝酸、ヒドロキシルアミンの還元活性を示す。

大腸菌 SiR では、ポリペプチド鎖中の特定の Cys 残基の S^{γ}原子が[4Fe-4S]クラスターの中の 1 つの鉄原子とシロヘムの鉄原子の両方に配位している(McRee *et al.*, 1986; Crane *et al.*, 1995)。2 つの補欠分子は Cys リガンドを介して電気的に共役し、この状態は SiR の酸化還元状態に関わらず常に保持される(Janick and Siegel, 1982; Christner *et al.*, 1983; Cline *et al.*, 1985, 1986; Madden *et al.*, 1989; Kaufman *et al.*, 1993)。

SiRの[4Fe-4S]クラスターとシロヘムは、それぞれ1電子ずつ保持でき、$[4Fe\text{-}4S]^{2+}$は$[4Fe\text{-}4S]^{+}$に、シロヘム鉄原子はFe^{3+}からFe^{2+}に還元される。このためSiRは、酸化型(Fe^{3+}-$[4Fe\text{-}4S]^{2+}$)、1電子還元型(Fe^{2+}-$[4Fe\text{-}4S]^{2+}$)、2電子(完全)還元型(Fe^{2+}-$[4Fe\text{-}4S]^{+}$)の3種の安定な酸化還元状態をとる(Siegel *et al.*, 1982; Janick and Siegel, 1982; Janick *et al.*, 1983)。大腸菌SiRではシロヘムと[4Fe-4S]クラスターの電位は、それぞれ-340 mV、405 mVと近似しているため(Siegel *et al.*, 1982; Janick *et al.*, 1983)、SiRの酸化-還元状態の遷移反応は平衡するものと考えられる。亜硫酸や亜硝酸はシロヘムに結合し、そのS-OやN-O結合が還元解裂されて、水分子の生成を伴って基質は最終還元物になる。酸素原子の分離には2つの電子と1個のプロトンが同時に必要で、電子は共役する2つの補欠分子から、プロトンは活性中心に配置された水分子から供給されると仮定されている(Tan and Cowan, 1991)。この様な反応モデルは、おそらく全てのSiRに共通すると思われる。

SiRまたはNiRは補欠分子シロヘムを持つ。これは側差に8個のカルボキシル基を持つポルフィリンで、2つのピロール環のC-C二重結合が部分的に飽和している。大腸菌やサルモネラ菌のCys要求性変異株の研究の結果、シロヘム合成酵素のコード遺伝子(*cysG*)が単離され(Woodcock *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 1990)、大腸菌や根粒菌*Rhizobium etli*の*cysG*欠損株が硫黄同化活性を著しく低下したことなどから、SiRの生合成へのシロヘム合成酵素の関与が示唆された(Jones-Mortimer, 1968; Tate *et al.*, 1997)。サルモネラ菌由来のCysGの共発現によって、大腸菌SiRßサブユニットやラン藻NiRの組換え体の発現量が増進したという報告もある(Wu *et al.*, 1991; Curdt *et al.*, 2000)。

SiRを含め植物の硫黄同化系は、農業への応用や環境制御、生態系への貢献も含め重要であるにもかかわらず、炭酸固定や硝酸同化に比べ、その研究は立ち後れている。また、金属蛋白質研究の観点からも、他のヘム酵素等が集約的に研究されている一方で、SiRに関する研究はあまり進展していない。植物型SiRの酵素学的研究は、植物生理学上必要な基礎的データを蓄積するのみならず、Fd依存性酵素という点からも、Fdとの分子間の電子移動も含め、NADPH依存型とは異なる独自の研究に独自のデータを提供するであろう。我々は、高等植物では初めてトウモロコシからSiR cDNAをクローニングし、その全塩基性配列を決定した

(Ideguchi *et al.*, 1995a, b)。植物 SiR の生化学、物理学的解析には、充分量の酵素の調製が不可欠である。そこで本章では、トウモロコシ SiR 組換え体の発現と精製方法の確立について述べる。また我々は、SiR に対する電子供与系としてトウモロコシ Fd と FNR の組換え体を既に得ており、これらを活用できることも本研究の有利な点である。これらを利用した酵素反応測定方法の構築と、その解析から得られた SiR の基質特異性や分光学的特徴について記す。

結果

SiR 組換え体の大腸菌での発現と精製

トウモロコシ SiR 前駆体の 53 番目の Ala からコードする領域を成熟体(分子量 64800)として、*trc* プロモーターと *lac* I^q を持つベクターpTrc99A に導入し、発現プラスミド(M17/99A)を構築した(図 1-1)。M17/99A で形質転換した大腸菌を 37 ℃で培養したところ、菌体の可溶性画分に SiR 活性は少なく、SiR に相当するポリペプチド鎖とその分解産物の大部分は封入体として回収された。菌体培養温度を 27°C に下げると SiR ポリペプチドの大部分は可溶性画分に回収されたが、酵素活性は低い状態に留まった。次に大腸菌シロヘム合成酵素 CysG と共発現させたところ(図 1-2, 表 1-1)、SiR 活性は増強された。CysG の共発現と低温度での発現誘導によって、前駆体を効率的にホロ型 SiR に変換できた。

組換え体 SiR は、図 1-3 に示す方法で精製した。菌体を超音波破砕し、その遠心上清を硫安塩析後、陰イオンカラム及び疎水カラムのクロマトグラフィーによって蛋白質を分画した。SiR 画分を Fd セファロースカラムによるアフィニティークロマトグラフィーにかけたところ、大部分の夾雑蛋白質はカラムを素通りし、NaCl の濃度勾配で SiR は単独ピークとして溶出された(図 1-4 (a))。SiR 精製標品は、SDS-PAGE で 65kDa サイズの単一バンドとして泳動された(図 1-4 (b))。この精製標品は天然型酵素と同様な可視吸収スペクトルを示し(データ未掲載)、α、soret、charge transfer (CT)バンドは、それぞれ 580、380、710 nm に確認された(図 1-4 (c))。また、EPR の結果、組換え体シロヘム鉄原子は酸化型高スピンシグナルを示し、補欠分子の形成も正常に行われていると判断した(データ未掲載)。

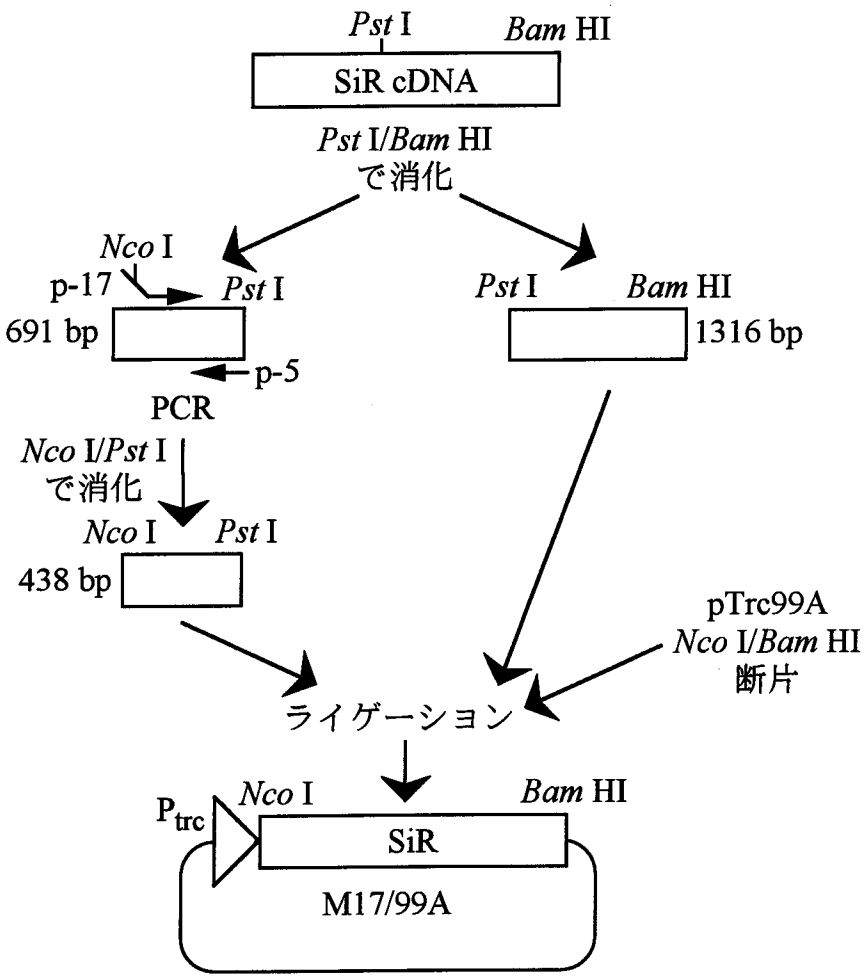


図1-1 組換え体SiR発現プラスミドの作製 (その1)
トウモロコシSiR cDNAを*Pst* Iと*Bam* HIで消化し、前半部と後半部とに分離した。前半部を鋳型として、*Nco* Iサイトを含むp-17、*Pst* Iサイトを含むp-5の両プライマーで、N末端延長配列を含まない成熟体サイズのSiR DNAをPCRで増幅した。PCR産物を*Nco* I/*Pst* Iで消化し、後半部DNAを含むサブクローニングベクターに導入し、SiR発現プラスミドM17/99Aを得た。

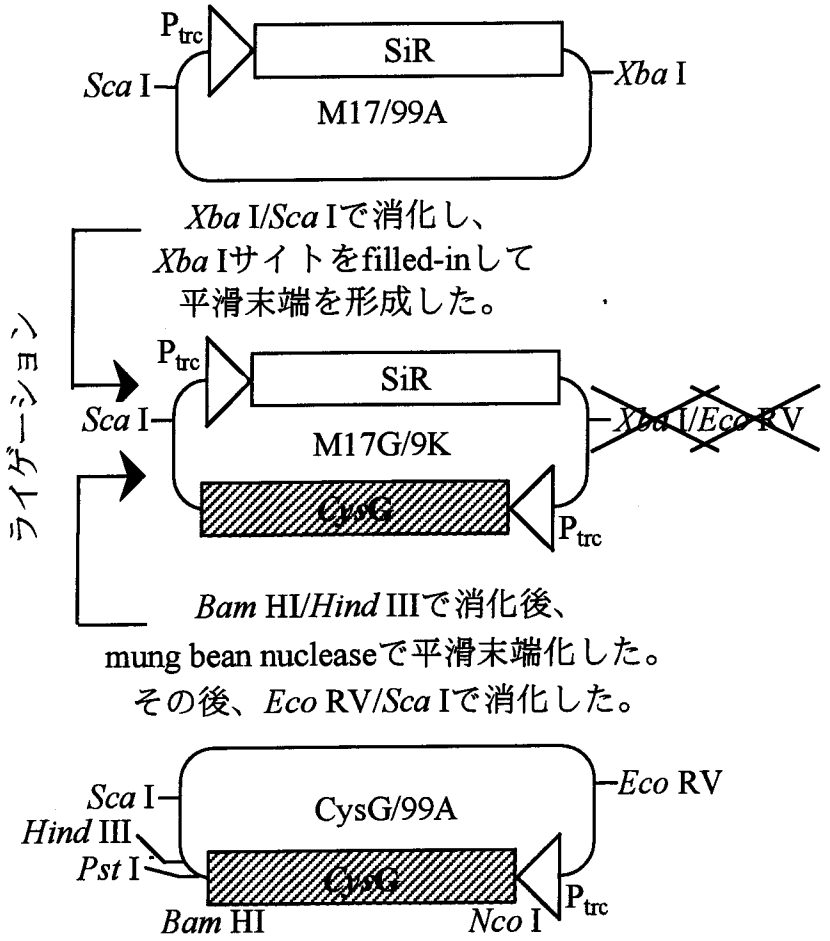


図1-2 組換え体SiR発現プラスミドの作製 (その2)

M17/99A を*Xba* I/*Sca* Iで消化し、*Xba* Iサイトにd NTPをfilled-inし平滑末端化した。別に、大腸菌ゲノムDNAを鋳型として、シロヘム合成酵素をコードする*cysG* DNAをPCRで増幅した。PCR産物は*Nco* I/*Bam* HIで消化し、pTrc99Aへと組み込み、シロヘム合成酵素発現ベクターCysG/99Aを得た。マルチクローニングサイトの*Bam* HI/*Hind* III部分を除いた後、*Eco* RV/*Sca* Iで消化したCysG/99Aの半断片を、M17/99Aのもう一方の半断片と繋ぎ、SiRとCysGの共発現プラスミドM17G/9Kを得た。

表1-1 SiR組み換え体発現ベクター作製に用いた
合成オリゴヌクレオチド

p-17 (センスプライマー)	5'-CTCCG*CCATGG*CGAAGAAGGATGCTTC-3' *Nco* I
p-5 (アンチセンスプライマー)	5'-TAAGGCG*CTGCAG*GAGC'-3' *Pst* I

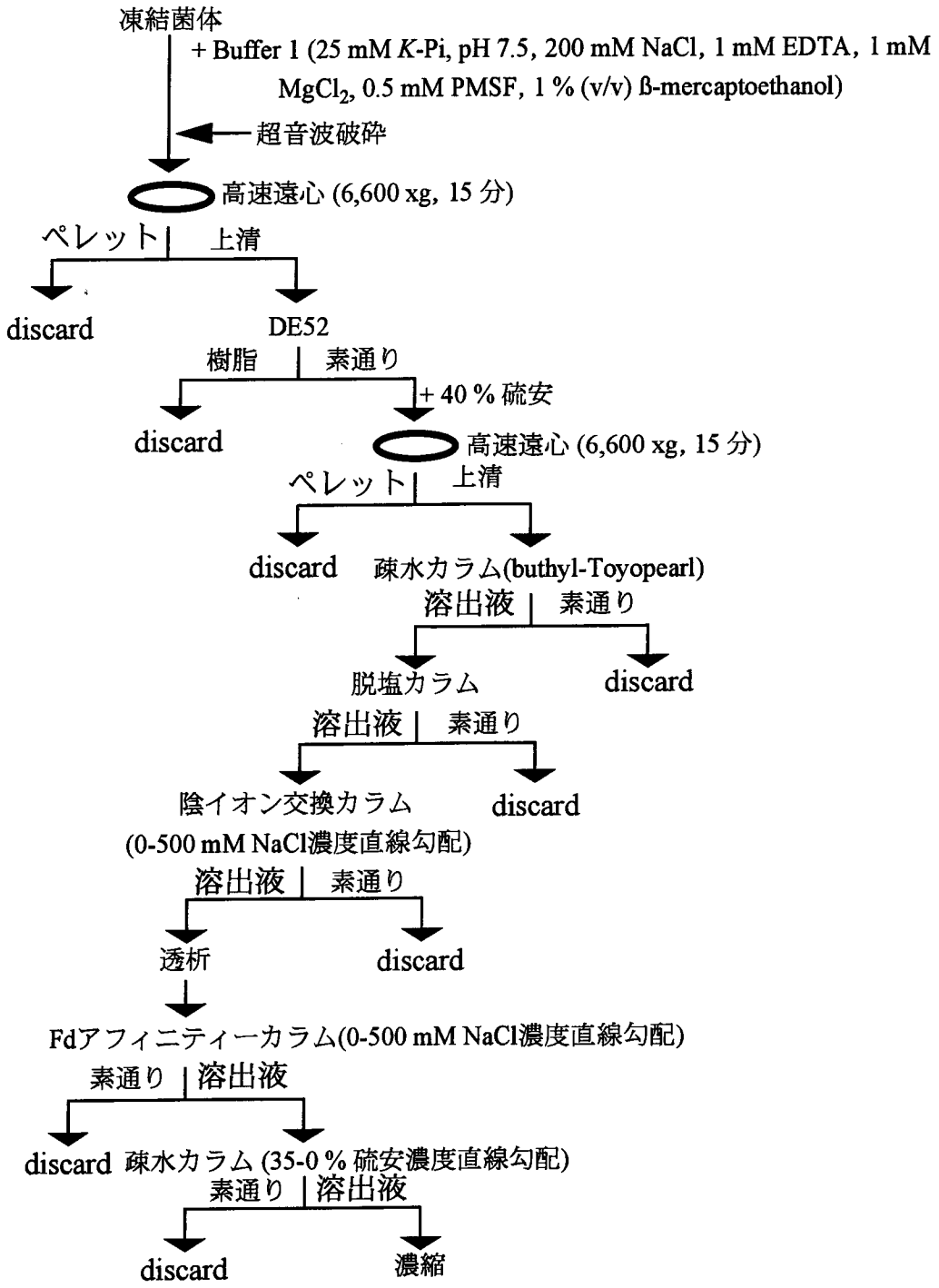


図1-3 組換え体SiR精製方法の概略図

SiR発現ベクターで形質転換した大腸菌を超音波破砕し、遠心分離して上清を得た。次にバッチワイズによる陰イオン交換、硫安塩析後、疎水カラムで素SiR画分を得た。さらにFPLCによるイオン交換カラム、Fd セファロースによるアフィニティーカラム、疎水カラムによるクロマトグラフィーで精製した。

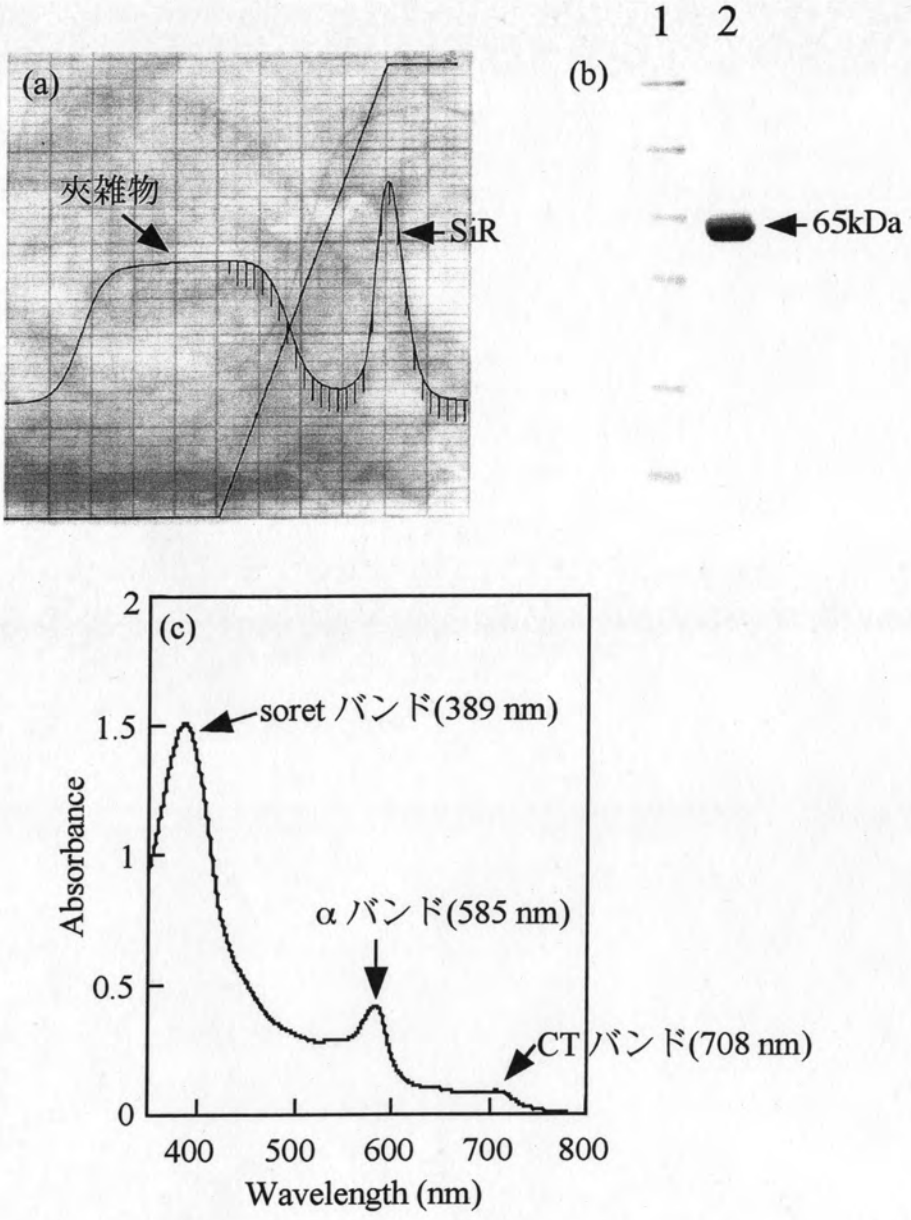


図1-4 組換え体SiRの精製と吸収スペクトル
SiRはFdセファロースカラムで単一ピークとして溶出する(a)。組換え体SiRのSDS-PAGE(b)。レーン1: Pre -Stained Marker (New England Biolabs)、レーン2: SiR。精製SiR酸化型の吸収スペクトル(c)。

酵素アッセイ-システイン合成酵素共役法とNADPH 酸化モニター法-

SiR活性はシステイン合成酵素(CSase)と共役させる方法で測定した(Okada, 1991)。このアッセイの概略を図 1-5 (a)に示す。CSase により SiR 反応の生成物である硫化物イオン(S^{2-})は、*O*-acethyl –L-serine (OAS)に転移されてシステインへと合成される。このシステインをニンヒドリン反応によって定量した。Fd を電子供与体として用いる場合には$Na_2S_2O_4$ またはNADPH と FNR で還元する 2 つの方式を、MV を用いた場合では$Na_2S_2O_4$ で還元する方式を用いた(図 1-5 (a))。この活性測定の結果を図 1-5 (b)に示す。電子供与体の種類及び還元方式により活性値は異なるが、基本的にはこれらの電子供与系は SiR 活性測定に有効な系であると判断した。$Na_2S_2O_4$ で還元した場合は、SiR は MV よりも Fd によってより強い活性を示した。一方、NADPH/FNR/Fd 還元系を用いた場合には、$Na_2S_2O_4$ で化学還元した場合に比べ活性は有意に低かった。NADPH/$NADP^+$の標準酸化還元電位(-320 mV)は SiR の補欠分子族の電位と近接しているので、反応の進行に伴い $NADP^+$の量が増加すると反応系の酸化還元電位が上昇し、これが SiR の活性を妨げたと考えた。従って、正確な反応速度を算出するためには、初速度を精度良く測定する方法が必要であると結論した。

次に我々は、NADPH/FNR/Fd 還元系を用いて、SiR 活性を NADPH の酸化速度で算出する活性測定法を考えた(図 1-6 (a))。各基質の添加に依存した 340 nm の吸光度の減少は図 1-6 (b)のように観察されたが、この減少速度は時間に対して一定ではなく徐々に低下する。これは既に述べたように、反応液中の酸化還元電位が上昇していることによるものと思われる。NADPH の酸化は経時的にモニターできるので、本研究では初期段階の吸収減少率から活性値を算出した。また、上記の CSase を用いた方法では、SiR の他の基質である亜硝酸、ヒドロキシルアミンの還元生成物であるアンモニアは定量出来ない。NADPH 酸化モニターによる活性測定方法では、図 1-6 (b)に示すように亜硫酸、亜硝酸、ヒドロキシルアミンの活性を一律に測定できることが大きな利点である。以後、SiR の活性測定にはこの方法を適用した。

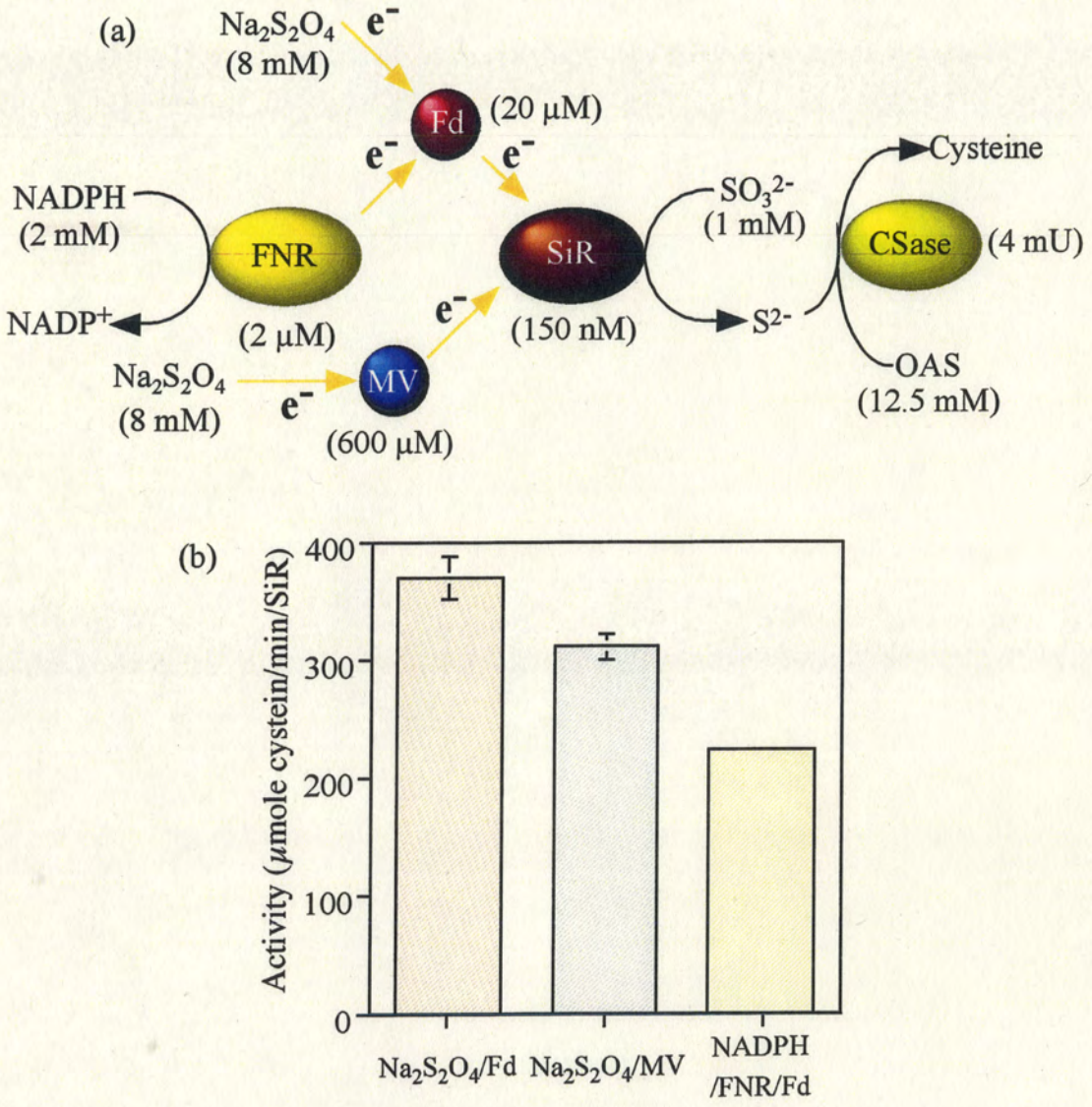


図1-5 システイン合成酵素との共役法によるSiR活性測定

SiR活性を過剰量のシステイン合成酵素(CSase)存在下で、$Na_2S_2O_4$/Fd、$Na_2S_2O_4$/MV、NADPH/FNR/Fdの3つの還元系のいずれかと組み合わせて測定した(a)。反応液(全量300 μl)の組成は100 mM Hepes-NaOH, pH 7.5、4 mU CSase、150 nM SiR、12.5 mM OAS、1 mM Na_2SO_3で、電子供与体として20 μM Fdまたは600 μM MVを含む。8 mM $Na_2S_2O_4$または 2 mM NADPHを加えて反応を開始した。25 °Cで、5分または10分間インキュベーション後、100 % TCA 15 μlを加えて反応を止めた。200 μl中のL-システイン生成量をニンヒドリン法で定量した。1分子のSiRが1分間に生成するシステインのモル数をspecific activityとした(b)。

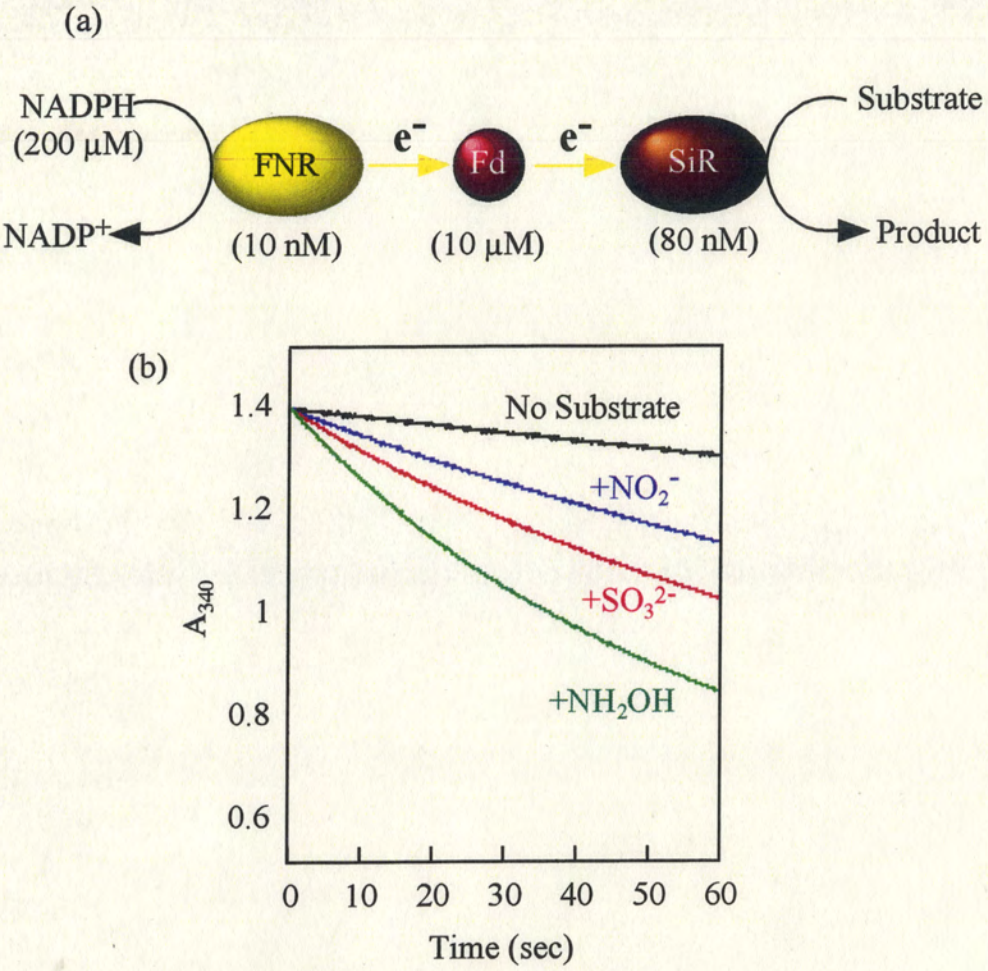


図1-6 NADPH酸化モニター法によるSiR活性測定
NADPH/FNR/Fd還元系を利用して、基質還元に消費されるNADPH量をモニターし、SiR活性を測定した。反応液(全量600 μl)の組成は、25 mM *K*-Pi, pH 7.5、80 nM SiR、10 μM Fd、10 nM FNRで、基質と200 μM NADPHを加えて反応を開始した(a)。反応の進行は25 °Cで、340 nmの吸収変化によって測定した。亜硫酸(500 μM)、亜硝酸(500 μM)、ヒドロキシルアミン(1 mM) を加えた時のSiR活性をコントロールと共に示した(b)。

酵素反応パラメーター

SiR の 3 種の基質に対する活性を調べ、その結果を図 1-7、表 1-2 に示した。活性測定の結果、SiR の亜硫酸に対する K_m は 3.3 μM と算出された。この値は、亜硝酸に対する K_m (440 μM)に比べおよそ 100 倍以下であり、SiR が亜硫酸に対し高親和性であることを確認した。また、ヒドロキシルアミンに対しては亜硫酸、亜硝酸の約 2 倍の k_{cat} が検出された。ヒドロキシルアミンの 2 電子還元反応は、多段階の還元反応を伴う亜硫酸、亜硝酸の 6 電子還元よりも速くターンオーバーすることを確認した。

還元型 SiR の吸収スペクトル

ヘム蛋白質の還元には、一般的には $Na_2S_2O_4$ の化学還元法が用いられる。$Na_2S_2O_4$ は水溶液中で分解すると亜硫酸を生成するので、この方法では亜硫酸存在下の還元状態を観察していることになる(図 1-8)。SiR は亜硫酸に対して高親和性なので、ヘム鉄に $Na_2S_2O_4$ 由来の亜硫酸が配位し、また複数の亜硫酸の還元中間体がシロヘムと複合体を形成し、様々な化合物と SiR の複合体が混在する状態になっていることが予想された。つまり、$Na_2S_2O_4$ 還元法ではレドックス状態を一義的に特定することが困難なスペクトルを観察していることになる。そこで、亜硫酸非存在下で SiR を還元するため、図 1-8 (a)に示すように、G6PDH/G6P による NADPH 再生系と NADPH/FNR/Fd による還元系の共存下で、酵素反応的に還元型 SiR のスペクトル観察を試みた。SiR 単独では、スペクトルの変化は殆ど無く、還元が起きないか、または起きてもその還元に長時間を要する遅い反応であると考えられた。一方、非還元性のリガンドである CN^- の存在下では、SiR のスペクトルは速やかに還元型になり、しかも $Na_2S_2O_4$ による還元型(図 1-8 (b)左)とは異なる吸収スペクトルを示した(図 1-8 (b)右)。大腸菌 SiR ヘムサブユニットは、酸化型に CN^- が配位することで、シロヘムと[4Fe-4S]クラスターの電位が上昇することが報告されており(Siegel *et al.*, 1982)、植物 SiR のシロヘムも CN^- の配位によって電位が上昇し、効率よく還元されたかもしれない。いずれにしろ、$Na_2S_2O_4$ 非依存的な還元型スペクトル測定が可能となり、後述する SiR 改変体もこの方法で解析した。

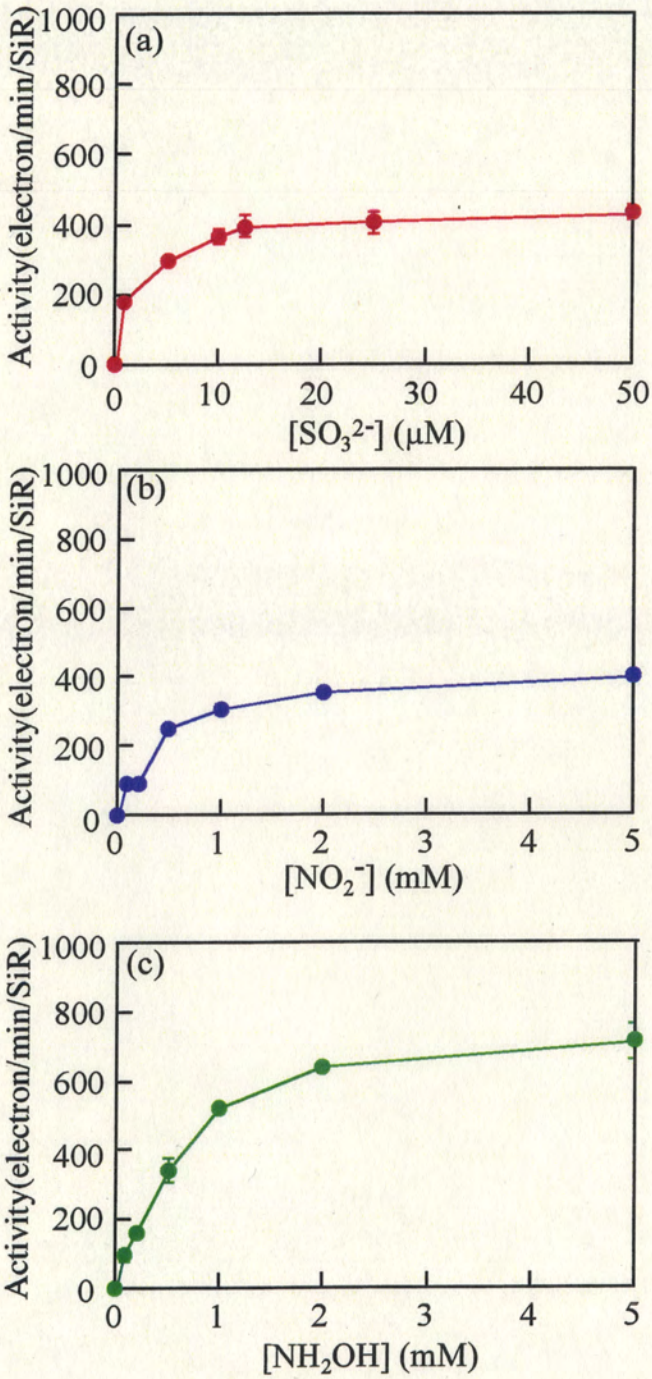


図1-7 3種の基質に対するSiR活性の基質濃度依存性
亜硫酸(a)、亜硝酸(b)、ヒドロキシルアミン(c)を基質とするSiR活性を、NADPH酸化モニター法で測定した。反応条件は図1-6と同じである。測定はそれぞれの基質濃度で3回行い、その平均値を求めた。

表1-2 SiRの酵素活性動力学的パラメーター

	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
SO_3^{2-}	3.3 ± 0.27	460 ± 17	140
NO_2^-	440 ± 38	460 ± 31	1.0
NH_2OH	270 ± 15	930 ± 130	3.4

K_m: μM, k_{cat}: electron/min/SiR

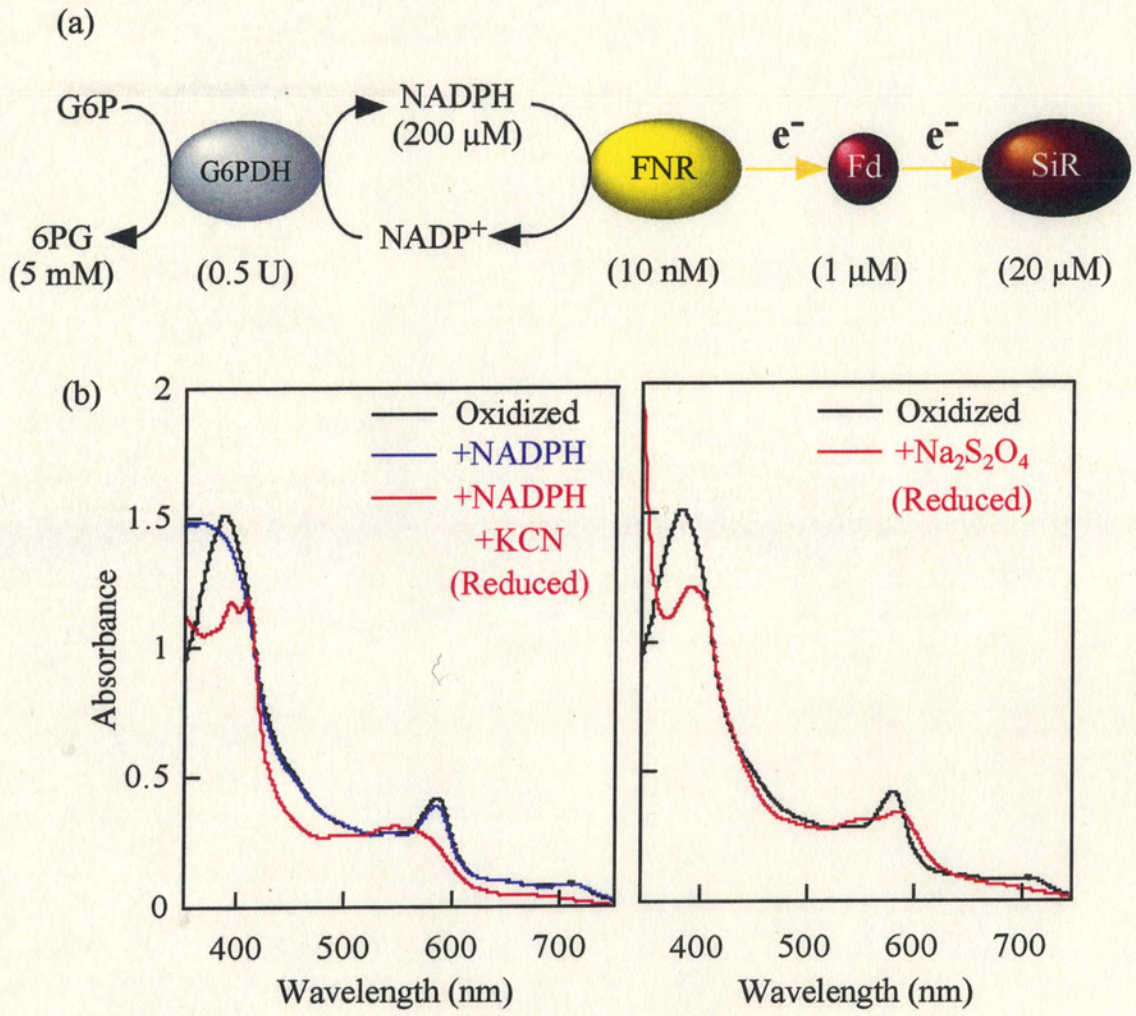


図1-8 NADPH/FNR/Fd還元系によるSiR還元

G6P/G6PDHのNADPH再生系共存下で、酵素反応的にSiRを還元した(a)。5 mM KCN存在下、非存在下でのSiRの吸収スペクトル((b)左)と、$Na_2S_2O_4$で還元したものを((b)右)に示した。反応液組成は25 mM *K*-Pi, pH 7.5、20 μM SiR、1 μM Fd、100 nM FNR、200 μM NADPH、0.5 U G6PDHと5 mM G6Pである。

考察

SiR が機能性分子として発現するには、シロヘムが適切にポリペプチド鎖に挿入されることが不可欠である。ところで、大腸菌 CysG の C 末端領域ドメイン($CysG^A$)のホモログが、酵母や植物から単離されているが(Raux *et al.*, 1999; Leustek *et al.*, 1997; Sakakibara *et al.*, 1996)、これらの報告から、大腸菌以外の生物では、CysG の N 末端領域と C 末端領域のそれぞれのドメインに相当する複数の酵素が独立して存在し、大腸菌では単一酵素が行うシロヘム合成反応は、分担して行われているようである。また、植物のシロヘム合成酵素は葉緑体に局在し、SiR へのシロヘムの挿入は葉緑体内で起こるようである。大腸菌やサルモネラ菌では、*cysG* の遺伝子発現は、NADH 依存性の異化型 NiR と同じ転写調節を受け、異化的硝酸還元と同調しているが(Macdonald and Cole, 1985; Goldman and Roth, 1993; Beale, 1996)、硝酸を還元同化する植物でも、シロヘム合成と硝酸還元は転写レベルで調節を受けるようである。今回の *sir* 遺伝子と *cysG* 遺伝子の発現では、共に上記のような発現調節とは無関係に IPTG で誘導できるように配慮している。

多くの電子伝達蛋白質や酵素が持つ鉄硫黄クラスターの生合成には、*isc* 遺伝子群の寄与が必要である(Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2000; Tokumoto and Takahashi, 2001)。ただし、今回は、[4Fe-4S]クラスター形成能を増強させなくとも、SiR の機能的発現に支障はなかった。これは[2Fe-2S]クラスターを持つ Fd の発現でも同様であり、Isc 蛋白質を共発現させない状態でも、Fd ホロ型は充分量発現する。このことから、通常の培養条件での大腸菌菌体内での鉄硫黄クラスター挿入活性は、外来の鉄硫黄蛋白質の生合成を支えるには充分高いか、あるいは、非蛋白質的なクラスター形成が起きていると考えた。

SiR の活性測定法として、かつては生成物である S^{2-}を methylene blue で反応させる方法が利用されていたが(Siegel, 1965)、これは、嫌気的条件下で行う必要があり、非常に煩雑な方法である。また反応系に蓄積した S^{2-}は、SiR の活性を阻害する事も懸念されていた。CSase との共役反応では S^{2-}の蓄積は起きず、厳密な嫌

気条件を必要としない。しかし、亜硝酸還元活性について、この方法は用いることはできず、代わりに生成されたアンモニアを Nessler 試薬で定量する方法を試みた(Morrison, 1971)。しかし Nessler 試薬は、そのアンモニアの検出限界が 0.05 μg NH_3/ml であり、鋭敏な活性測定には不向きであった。また Nessler 試薬は、ヒドロキシルアミンとも反応するので(Fishbein, 1966)、この方法はヒドロキシルアミンの活性測定にも利用できなかった。

一般に、還元型 Fd の発生と、それを利用する酵素反応は、葉緑体では、チラコイド膜上の光合成電子伝達系に依存している。一方、根などの非光合成組織の細胞内では、硝酸同化反応はペントースリン酸化によって生じる NADPH を利用するという報告されている(Oji *et al.*, 1985; Bowsher *et al.*, 1992)。また SiR を含む硫酸同化系酵素も、エンドウの根では同様な還元系によって駆動されている(Brunold and Suter, 1989)。我々が用いた NADPH/FNR/Fd 還元系はこの非光合成組織で行われている還元反応を再構成したもので、これによって、SiR の 3 種の基質に対する酵素活性を NADPH の酸化速度として定量的かつ一律測定できた。このアッセイでは FNR や Fd の量が律速とならないように配慮し、非光合成型 Fd (Fd III: -345 mV)と根型 FNR (*r*FNR)を用いた。NADPH の標準酸化還元電位が-320 mV であることから、光合成組織に存在する Fd (Fd I: -423 mV)より、Fd III の方が NADPH から $NADP^+$への酸化による還元力を利用するには適している。一方、トウモロコシの根に局在する *r*FNR と葉に局在する FNR (*l*FNR)では、それぞれ光合成、非光合成組織局在型 Fd イソ型に対する親和性が強い(Onda *et al.*, 2000)。実際に光合成型(Fd I/*l*FNR)と非光合成型(Fd III/*r*FNR)で構成したそれぞれの NADPH/FNR/Fd 還元方式で SiR 活性を調べたところ、非光合成型の組み合わせがより強く SiR 活性を駆動することが確認された(Yonekura-Sakakibara, *et al.*, 2000)。

組換え体 SiR の亜硫酸還元活性の動力学パラメーターは、植物体から直接精製された天然酵素のものとよく一致していた。今回は亜硝酸、ヒドロキシルアミンに対する動力学パラメーターも決定したが、これらは、過去に報告された植物 SiR の酵素学的パラメーターと良く一致していた(Krueger and Siegel, 1982)。

G6PDH、FNR、Fd の還元系を利用することで、非化学的還元による SiR-CN^-複合体の還元型スペクトルを、非定量的な亜硫酸の混在を気にせずに、測定できた。

CN^-非存在下では SiR の還元は起こりにくく、シロヘムに CN^-の様な強い配位子が結合することで、SiR の還元が誘起された。このように、幾つかの研究条件を工夫して、我々は植物型 SiR の大量発現と解析についての研究基盤を確立した。

第2章　高電位フェレドキシン S46G による SiR の反応特性の解析

序

植物 SiR は Fd 依存性酵素であり、電子伝達蛋白質 Fd から受け取った電子を反応に利用する。Fd は分子量 11 kDa の酸性蛋白質で、低電位の[2Fe-2S]クラスターを持ち(Arnon, 1987)、Fd 依存性酵素とは、自身の持つ酸性残基と相手側の塩基性残基との静電的相互作用によって複合体を形成し電子伝達を行う(Knaff and Hirasawa, 1991; Hurley *et al.*, 1997; Kurisu *et al.*, 2001)。葉緑体では、Fd はチラコイド膜の光化学系 I (PSI)から電子を受け取り、ストロマ内の様々な反応に必要な電子を供給している(Akashi, 1998; Setif, 2001)。SiR、NiR、GOGAT が関与する硫黄・窒素同化系を始め、FNR による $NADP^+$の光還元、Fd-キノン還元酵素(FQR)による循環的電子伝達や、炭酸固定反応系酵素の調節を行う Fd-チオレドキシン還元酵素(FTR)の還元など、Fd は葉緑体における酸化還元ネットワークの分岐点である(Knaff and Hirasawa, 1991; Hase, 1995)。この他にも Fd は、フィトクロムの化学発色団の生合成(Kochi *et al.*, 2001)やクロロフィル代謝(Wuthrich *et al.*, 2000)、脂質代謝(Schultz *et al.*, 2000)などを駆動する。光還元力が利用できない非光合成組織のプラスチドでも、Fd はピリジンヌクレオチド由来の電子を硫黄同化や窒素同化系に対し供給している(Bowsher, *et al.*, 1989, 1992)。植物はこのように異なる還元力ソースを、組織や器官特異的に使い分けている。この光合成光還元力と基質レベルの化学還元力を Fd 依存性の代謝反応に供給するため、組織局在性、発現誘導パターン、酸化還元特性が異なる複数の Fd イソ型が機能分業している(Hase *et al*, 1991; Alonso *et al.*, 1995; Matsumura *et al.*, 1999)。

トウモロコシでは、6 種の Fd 遺伝子が確認され、光合成組織に特異的に発現する Fd I と II (Kimata and Hase, 1991)、非光合成組織に発現する Fd III と IV (Nakano *et al.*, 1997)、また硝酸誘導的に根で発現する Fd VI が報告されている(Matsumura *et al.*, 1997)。*Arabidopsis thaliana* のゲノム上にも 5 種の Fd 遺伝子が存在すると報告されている([No authors listed], 2000)。光合成型と非光合成型 Fd は、その標準酸化還元

電位が異なる。葉型 Fd I の電位は-423 mV で、根型 Fd III の電位は-345 mV であるが、根プラスチド内での NADPH を還元ソースとして駆動する酵素反応では、酸化還元電位から見て Fd III がより反応に適していると考えられる(Yonekura-Sakakibara, 2000)。

このようなイソ型による還元電位の違いや Fd 依存性酵素との複合体形成に不可欠な構造要因を解明するため、当研究室では、Fd I と Fd III の改変体を用いて補欠分子の保持に重要な残基や電子を供与する相手方酵素との結合部位の探索を進めてきた(Matsumura, 1996; Akashi *et al.*, 1997)。その結果、Fd は FNR や SiR と 1:1 の複合体を形成し、その 66 と 67 番目の Asp と 93 番目の Glu が FNR と SiR との複合体形成にそれぞれ必須な残基として特定された(Akashi *et al.*, 1999)。また、Fd の鉄硫黄クラスター近傍の Ser を部位特異的にした Fd もいくつか作製された。その中で、S46G という改変体は、標準酸化還元電位が野生型よりも約 180 mV も上昇していた(Akashi *et al.*, 1997; Taniguchi *et al.*, 1997)。S46G を電子供与体とした場合、SiR は亜硫酸還元活性を発揮できない。しかし、この高電位 Fd に依存した SiR 活性を詳細に検討したところ、亜硫酸に加え亜硝酸の還元活性も著しく低下したが、興味あることに、ヒドロキシルアミン還元活性だけは保持されていた。この様に SiR に対する S46G の特性がキャラクタライズでき、SiR の基質には、Fd の電位によって影響を受けるものとそうでないものとがあることが判明した。しかし、どのような機構によってこのような現象が起きるのかは不明である。我々は SiR が触媒する 6 電子還元と 2 電子還元反応は質的に異なる反応であると仮定し、それが Fd 側の還元電位の違いによってより顕著に表れたと推察した。第 2 章では、Fd 野生型と S46G を用いた競合阻害実験、SiR 活性中心における基質同士の競合阻害実験、Fd と SiR の分子電子伝達のパルスラジオリシス実験の結果を報告し、Fd と SiR 間の電子移動と SiR の基質還元との関係について考察する。

結果

S46G による SiR の酵素活性

前章で述べたように SiR は亜硫酸、亜硝酸、ヒドロキシルアミンの 3 つの基質を還元し、いずれの基質還元でも Fd から SiR へと電子が適切に供給されていることが示された。S46G の酸化還元電位は-167 mV で、Fd 野生型よりも約 180 mV も高い。S46G の電子供与体としての機能を、亜硫酸、亜硝酸、ヒドロキシルアミンを基質とする活性で検討し、一例を図 2-1 に示した。Fd 野生型の存在下では SiR は 3 種の基質を効率よく還元できるが、S46G を用いた場合はこの特性は大きく変化し、亜硫酸と亜硝酸還元活性は殆ど検出できなかった。にも関わらず、ヒドロキシルアミンについては依然として高い活性が保持されていた。

次に、Fd の濃度条件を変えて、亜硫酸、亜硝酸、ヒドロキシルアミンに対する SiR の反応速度を調べた(図 2-2)。Fd 野生型に対する SiR の K_m はいずれの基質の場合も 1～2 μM であり、S46G のヒドロキシルアミンについても同程度の K_m が確かめられた。この結果から、Fd 野生型では 3 種の基質について、S46G ではヒドロキシルアミンについて、両 Fd による SiR の還元反応において、Fd-SiR 複合体形成に本質的な違いはないと結論した。

S46G と SiR の相互作用

上記の結果は、S46G が SiR の亜硫酸や亜硝酸の還元活性を駆動できない原因は、分子間の電子伝達過程に障害があるためで、Fd と SiR との分子間相互作用そのものには違いがないことを示唆する。これを証明するために、Fd 野生型による SiR の亜硫酸還元活性が、S46G によって阻害されるかどうか調べた。図 2-3 に示すように、Fd 野生型による SiR 活性は添加した S46G の濃度に依存して減少した。両逆数プロットから、S46G による阻害は競合的であり、その阻害定数 K_i は 2.3 μM と算出できた。この値は Fd 野生型の K_d (1.7 μM)とほぼ一致する(Akashi, 1998)。この結果は、両 Fd 分子種は SiR に対し共通な部位で結合するが、S46G は SiR に対し、その亜硫酸還元活性を駆動できる程には効率的な電子伝達ができないことを示している。

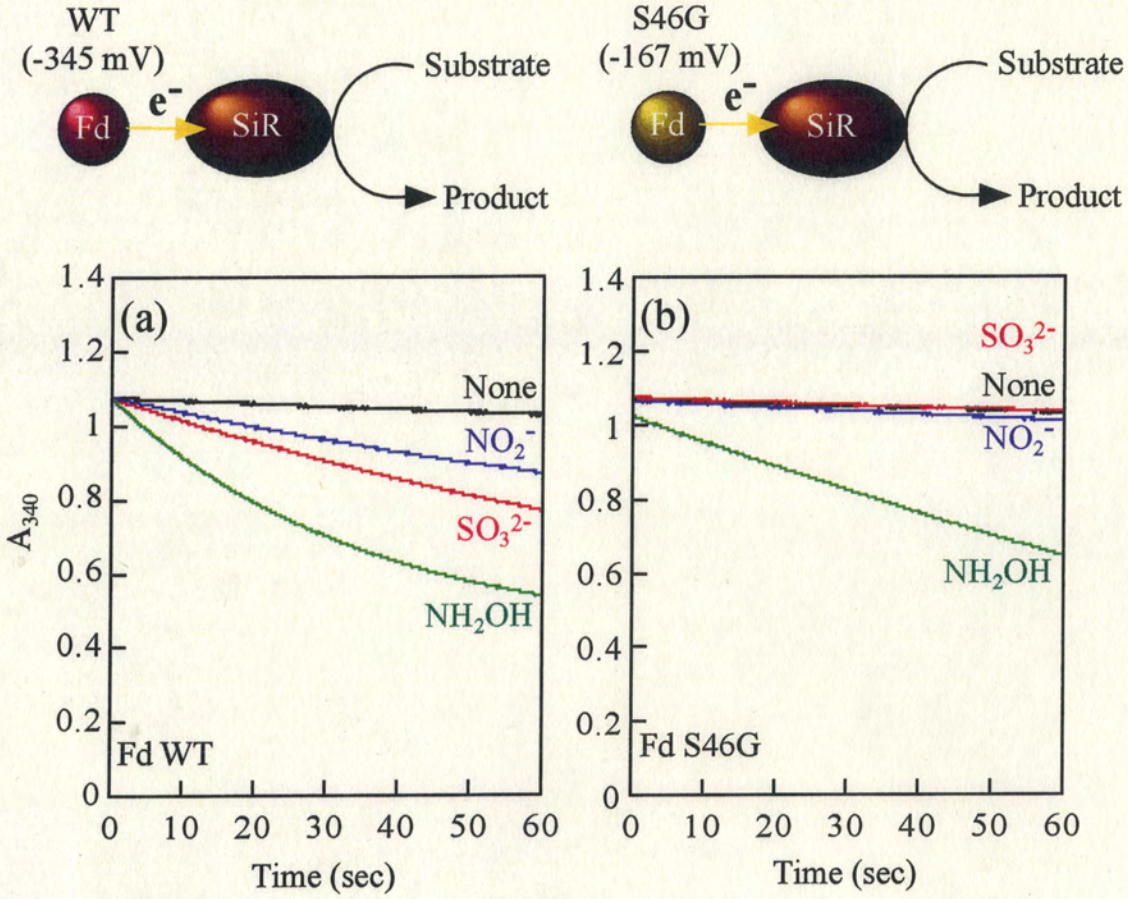


図 2-1 S46GのSiR基質還元反応に与える影響
Fd野生型(a)及び高電位型Fd改変体S46G(b)を電子供与体としてSiR活性を測定した。反応条件は図1-6と同じである。0.5 mM 亜硫酸、0.5 mM 亜硝酸、1 mM ヒドロキシルアミンに対するSiR活性を、コントロールと共に示した。

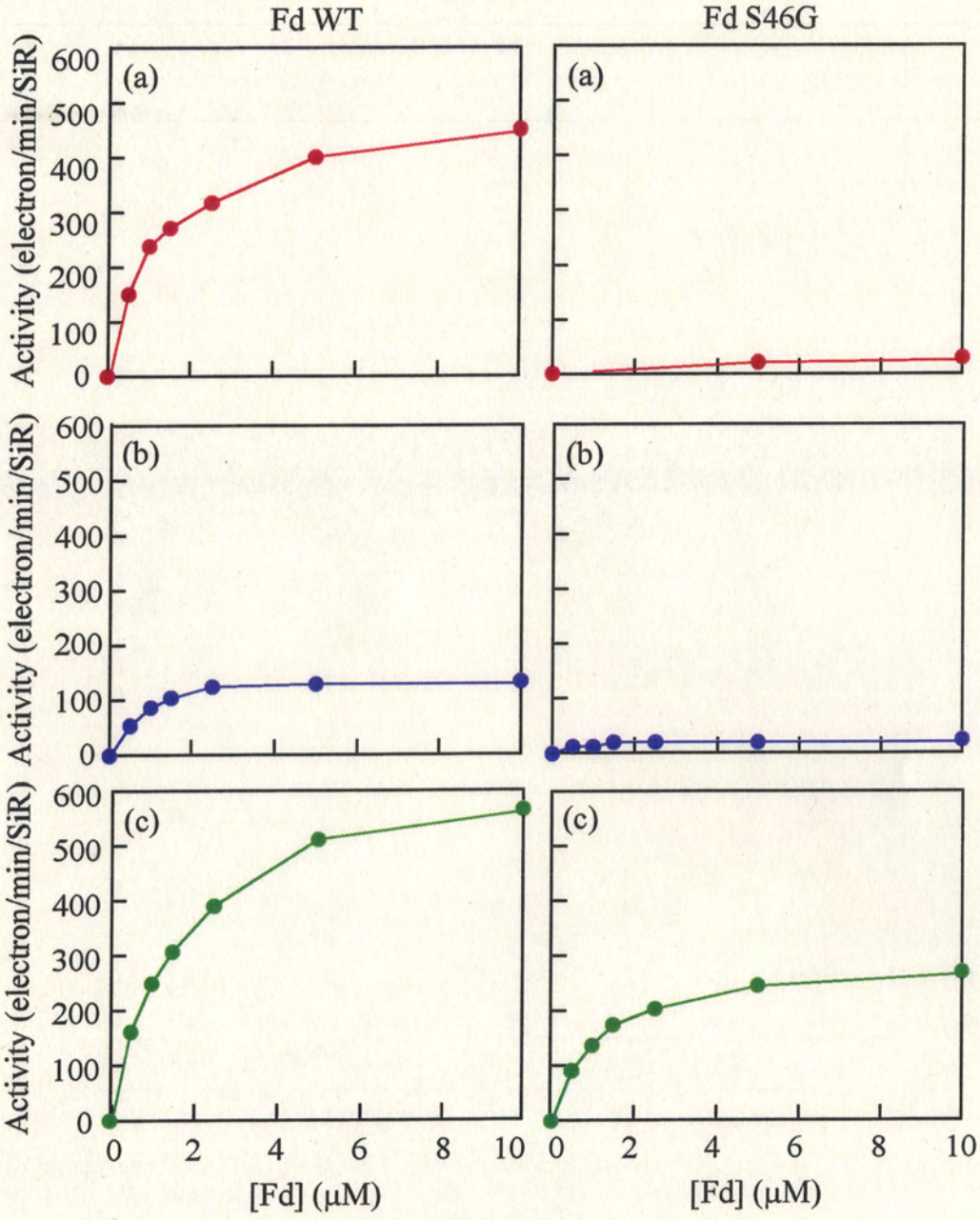


図2-2 SiR基質還元活性のFd濃度依存性

SiRの亜硫酸(a)、亜硝酸(b)、ヒドロキシルアミン(c)を基質とした活性を、Fd野生型またはS46Gの濃度をそれぞれ変えて測定した。反応条件は図1-6と同じである。

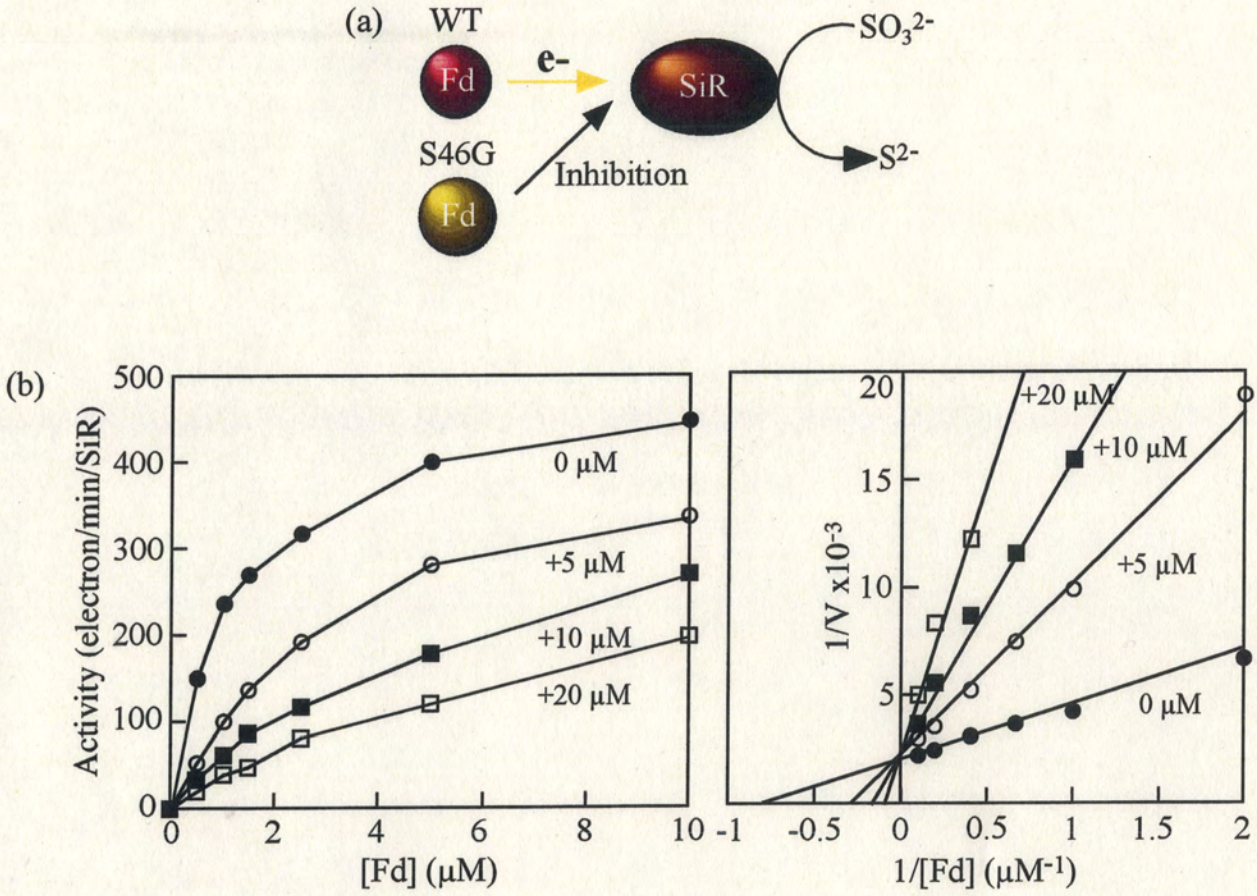


図2-3 SiR亜硫酸還元活性に対するS46Gの阻害

Fd野生型を電子供与体として用いたSiRの亜硫酸還元反応系にS46Gを加え(0 μM～20 μM)、活性の阻害を測定した(a)。反応条件は図1-6と同じである。それぞれのS46G濃度での阻害を、Fd野生型濃度と反応速度との関係からグラフにした(b)。両逆数プロットから阻害定数を 2.3 μMと算出した。

ヒドロキシルアミン還元活性の特徴

Fd 野生型及び S46G を電子供与体とした場合の SiR のヒドロキシルアミン還元反応の酵素反応学的パラメーターを算出した。ヒドロキシルアミンに対する K_m は野生型の場合は 1.5 mM、S46G 野場合は 1.7 mM であり、両者に本質的な差はなかった(データ未掲載)。この結果は、どちらの Fd の場合でもヒドロキシルアミンと SiR の親和性には差がないことを示唆している。

次に、ヒドロキシルアミンが亜硫酸、亜硝酸と共通の活性部位で還元されているかどうか確かめるために、S46G 存在下で、SiR のヒドロキシルアミン活性が亜硫酸または亜硝酸によって阻害されるかどうか調べた(図 2-4)。その結果、ヒドロキシルアミンの還元活性は、亜硫酸あるいは亜硝酸の添加濃度に依存して阻害された。両逆数プロットから、阻害様式は競合的であることが判明し、亜硫酸に対する K_i 値は 3.5 μM、亜硝酸に対する K_i 値は 75.1 μM と算出された。SiR の亜硫酸に対する K_m は 3.3 μM なので、亜硫酸の K_i と良く一致していた。しかし、亜硝酸に対する K_m は 440 μM であり、亜硝酸の K_i 値より 5 倍以上大きく、この理由は目下のところ不明である。

S46G から SiR への電子移動

NADPH/FNR/Fd の還元系と NADPH 再生系を用いて、Fd 野生型と S46G による SiR の還元状況を分光学的に調べた(図 2-5)。5 mM CN^-存在下で 5 分以上反応させると、SiR はどちらの Fd によっても完全還元された(図 2-5 (a))。このことから、CN^- 存在下で分単位の時間があれば、Fd 野生型と同様に S46G でも SiR を完全に還元できると考えた。次にこの反応条件での SiR 還元を経時的にモニターし、2 つの Fd による還元速度の違いについて確かめた(図 2-5 (b))。その結果、S46G の還元速度は、野生型よりも非常に遅いことが判明した。

Fd から SiR への電子移動をリアルタイムで観察するために、パルスラジオリシスにより、分子間の電子移動を測定した(図 2-6)。それぞれ 30 μM ずつの SiR と Fd 野生型または S46G を含む溶液に電子線を照射すると、水和電子により Fd は還元される。次に、この還元型 Fd から共存する SiR へと電子は移動し、Fd は再酸化

される。この再酸化の様子を 500 nm の吸収変化でモニターした。Fd 野生型及び S46G は単独の場合では、再酸化は観察されないが、SiR 共存下では、Fd 野生型は SiR に電子伝達し速やかに再酸化し(図 2-6 (a))、k_{obs} は 610 S^{-1} であった。一方、S46G では、SiR 共存下でも、Fd 野生型のような再酸化は殆ど見られなかった(図 2-6 (b))。このことから S46G は SiR への 1 電子伝達過程は、Fd 野生型よりも著しく遅いことが判明した。

考察

今回、高電位 Fd S46G が駆動する SiR のヒドロキシルアミン還元反応において、ヒドロキシルアミンに対する K_m や基質結合サイト、そして S46G と SiR の分子間相互作用は、Fd 野生型の場合と同じであることを実験的に確認できた。このことから、S46G に依存した SiR の亜硫酸、亜硝酸還元活性が検出できない原因は、S46G から SiR への電子移動が基質還元を行うには充分速くないためであると結論した。Fd による SiR の還元は、Fd 野生型の[2Fe-2S]クラスター(-345 mV)と SiR の[4Fe-4S]クラスター(-405 mV)の分子間と、SiR 分子内の[4Fe-4S]クラスターからシロヘム(-210 mV)間の電子移動の 2 段階からなる(Hirasawa *et al.*, 2001)。SiR の[4Fe-4S]クラスターとシロヘムは Cys チオールによって架橋され、これを介して両補欠分子間の電子移動が起きる。[4Fe-4S]クラスターとシロヘムが共に 1 電子ずつ還元されて初めて、SiR は S-O または N-O 結合解裂に必要な 2 電子を同時に基質に送ることができる(Tan and Cowan, 1991; Lui *et al.*, 1993)。S46G の場合、[2Fe-2S]クラスター(-167 mV)から SiR の[4Fe-4S]クラスターへの電子移動は逆電位差による障壁のため非常に遅く、この速度では亜硫酸や亜硝酸の多段階還元ステップの進行は困難であると考えた。しかしヒドロキシルアミンの還元については、S46G でも充分賄えるような、亜硫酸や亜硝酸とは異なる反応機構と考え、以下のような理由を考えた。それは、S46G 存在下のヒドロキシルアミン還元に必要な電子は、通常とは異なる電子移動経路によって伝達されるというものである。

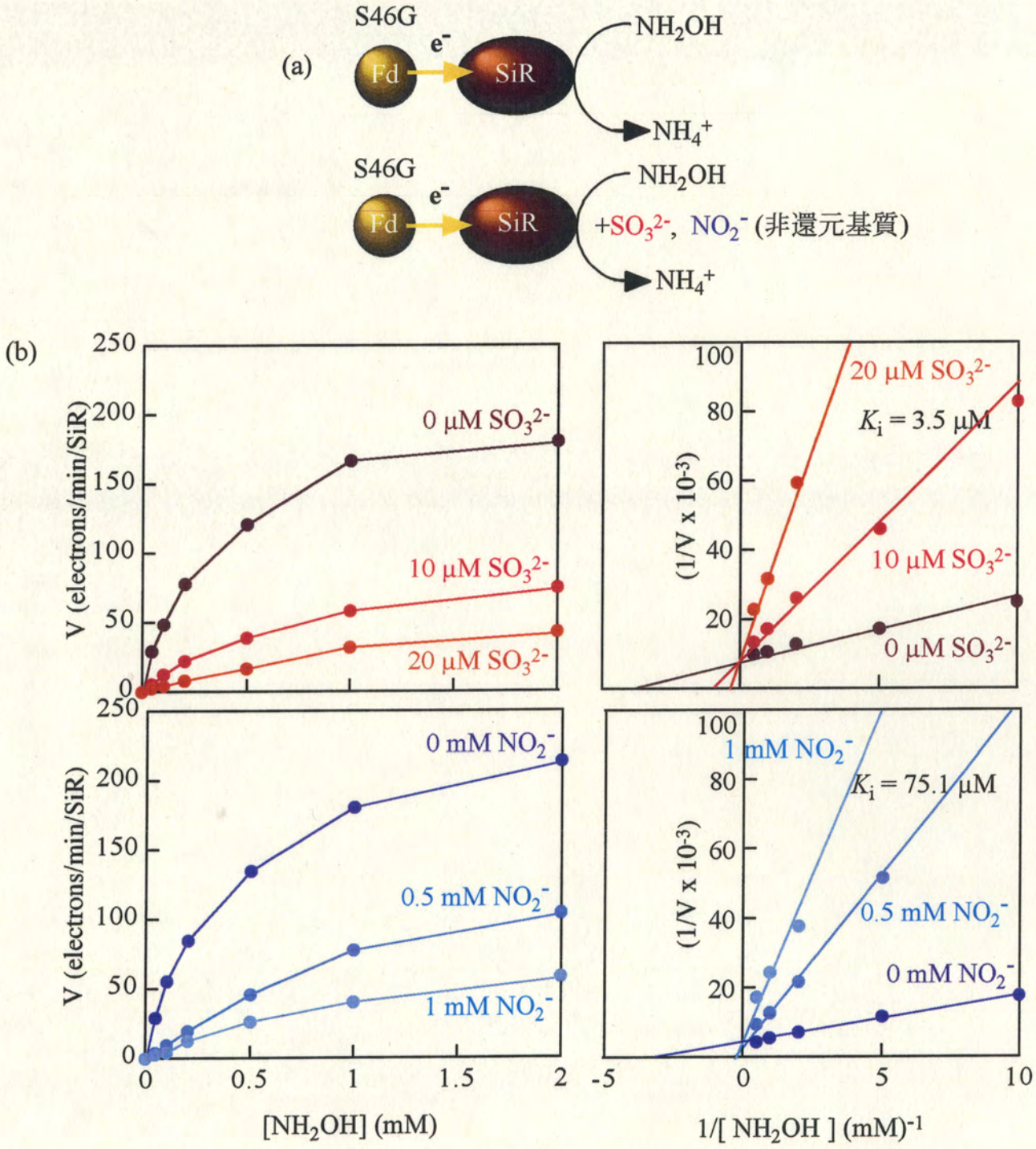


図2-4 ヒドロキシルアミン還元活性に対する亜硫酸・亜硝酸の阻害
S46Gに依存したSiRのヒドロキシルアミン還元活性を非還元基質存在下で測定した(a)。反応条件は図1-6と同じである。亜硫酸(赤)、亜硝酸(青)存在下での改変体のヒドロキシルアミン還元活性をグラフとして示した(b)。両逆数プロットから亜硫酸、亜硝酸に対する阻害定数を、それぞれ3.5 μM、75.1 μMと算出した。

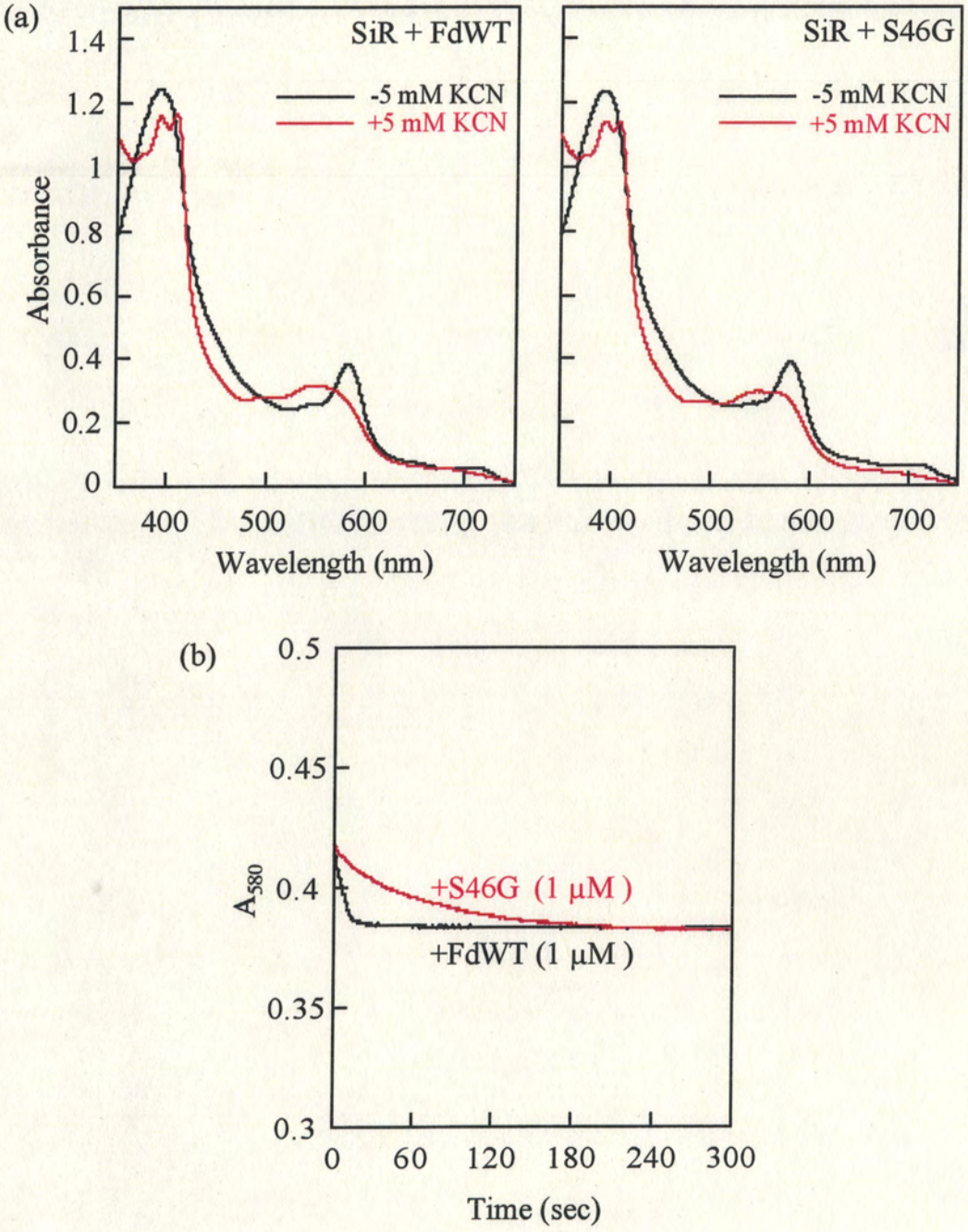


図2-5 Fd野生型とS46GによるSiR還元

図1-8に示したNADPH/FNR/Fd還元系により、Fd野生型とS46G存在下でSiRを還元した。それぞれの条件で十分な時間還元した後のSiRスペクトルを示す(a)。Fd野生型(黒)と、S46G(赤)によるSiR還元の経時進行を、580 nmの吸収変化でモニターした(b)。

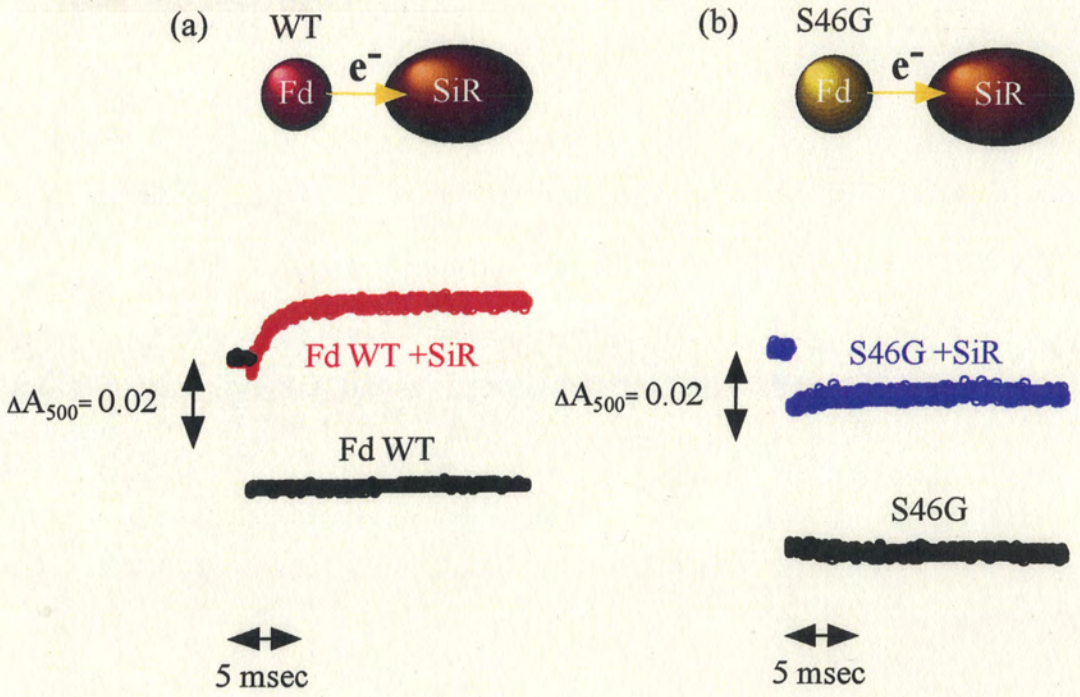


図2-6 パルスラジオリシスによるFd野生型
およびS46GからSiRへの電子移動測定

Fd野生型(a)とS46G(b)によるSiRへの電子移動をパルスラジオリシス法によってリアルタイムで測定した。反応液組成は12.5 mM *K*-Pi, pH 7.5、30 μM SiR、30 μM Fd、100 mM NaCl、0.1 % *tert*-buthanolである。電子線照射により生じる水和電子によりFdが還元され、還元型Fdがさらに SiRに電子を送りこれを還元する。この時のFdの再酸化を500 nmでモニターした。SiR存在下での野生型及びS46Gの吸収変化をそれぞれ赤と青の点描で、Fdのみの吸収変化は両方とも黒の点描で示した。Fd野生型とS46Gのk_{obs}は、それぞれ680 S^{-1}, 282 S^{-1}と算出された。

すなわち、Fd の[2Fe-2S]クラスターからの電子は、SiR の[4Fe-4S]クラスターを経由せず、シロヘムへと 1 電子ずつ直接供給されるというものである。ヒドロキシルアミンは 1 電子還元を多段階にわたって受け、アンモニアとして生成されると思われる。ところで、亜硝酸還元の中間物としては、ニトロシル(NO)がシロヘムとの複合体の EPR シグナルから同定されているが(Janick and Siegel., 1982)、ヒドロキシルアミンが還元中間体として同定された実験的証拠は無く、実際にはヒドロキシルアミンの酸素結合がどのように解消していくかその機構は確定していない。しかし、S46G に依存して SiR はヒドロキシルアミン活性を示すことから、ヒドロキシルアミンの反応では、N-OH 結合が 1 電子還元される可能性はある。

ところで、シロヘムが π カチオンラジカルを形成するという報告があり(Chang and Fajer, 1980; Chang *et al.*, 1981)、SiR は亜硫酸の還元に有利なこの反応性の高いポルフィリンを選択的に保持することが示唆されている。実際に大腸菌 SiR のヘムサブユニットのスーパーオキシド分子種も観察され、亜硫酸や亜硝酸との複合体も確認されている(Young and Siegel, 1988)。SiR では金属中心を経由した電子供給と共に、シロヘムポルフィリン環上に生じる反応性の高いラジカルも併用し、効率良い基質還元を行うのではないかと考えられ、ヒドロキシルアミン還元についてもこの π カチオンラジカルが利用されているかもしれない。

Fd-FNR 複合体の立体構造から、両蛋白質間の電子移動は、アミノ酸などを介さずに、直接 2 つの補欠分子間を電子が空間的に移動することが示唆されている(Kurisu *et al.*, 2000)。SiR と Fd 間の複合体形成と両者間の電子移動も、これに準ずるものと思われる。Fd III 野生型と S46G では、その立体構造比較の比較ではクラスター背後のポリペプチド構造は互いに異なるものの、cytochrome *c* を用いた還元実験の結果では、FNR からの電子受容能には差が無い事が確認されている(Kusunoki and Kurisu, Hanke and Kimata-Ariga, personal communications)。電子移動速度の差はあるものの、S46G と SiR 間の電子移動は Fd 野生型と本質的には同じで、むしろ SiR 分子内の電子移動がどのような経路で起きているかを把握することが、今後の SiR レドックス研究の鍵となろう。

第3章 硝酸還元酵素(NiR)とSiRの比較およびSiRの部位特異的改変による反応特性の解析

序

NiR (E.C.1.7.7.1)は、分子量約60 kDaの単量体酵素で、補欠分子としてシロヘムと[4Fe-4S]クラスターを持ち(Lancaster *et al.*, 1979)、プラスチドストロマに存在する。Fdを生理的電子供与体として利用し、亜硝酸とヒドロキシルアミンをそれぞれ6電子、2電子還元しアンモニアを生成する。NiRは様々な高等植物や藻類から精製され(Vega and Kamin, 1977; Serra *et al.*, 1982; Arizmendi and Serra, 1990)、cDNAも単離されている(Back *et al.*, 1988; Luque *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1995; Sander *et al.*, 1995)。タバコでは、複数のイソ酵素が存在することも報告されている(Kronenberger *et al.*, 1993)。一方、アカパンカビ *Neurospora crassa* の同化型NiRや大腸菌の異化型NiRでも、精製、DNAの単離が行われている。これらはシロヘムと[4Fe-4S]クラスター以外にも補欠分子にFADを持ち、NAD(P)Hを電子供与体とすることが知られている(Prodouz and Garrett, 1981; Cammack *et al.*, 1982)。一方、異化型NiRは、大腸菌のものを除けば、脱窒細菌などでは主にcytochrome cd_1 酵素とヘキサヘム酵素、銅酵素が大多数を占める。同化型NiRは、電子供与体や分子サイズは異なるが、全てシロヘムと[4Fe-4S]クラスターを持つ酵素である。このことは、これらが亜硝酸還元同化に適した化合物であり、従属型微生物NiRは植物やラン藻のNiRは共通な分子進化過程を持つが、生理的電子供与体の要求性の違いからFADを付加されたのかも知れない。

植物のNiRとSiRは分子サイズが類似し(60～80 kDa)、補欠分子と基質還元機能は共通している(Crane *et al.*, 1995; Crane and Getzoff, 1996)。一次構造の比較では、SiRとNiRとの相同性は26%であるが、2つの補欠分子のリガンドとなる残基は全て保存されている(Yonekura-Sakakibara *et al.*, 1998; 図3-1)。NiRとSiRの基質特異性は K_m にして二桁のオーダーで異なるが(Krueger and Siegel, 1982)、この違いを決定する構造的相違は不明である。そこで本章の前半部では、ホウレンソウNiR

の酵素特性を、SiRの酵素特性と比較して、2つの酵素の共通性と特異性について考察する。

大腸菌SiRヘムサブユニットについては、steady-stateの酵素解析の他、EPRやMössbauerスペクトル、ラマン分光、ENDOR、NMRによる生物物理学的な解析が進められ、補欠分子の構成とそれらの電気的な共役状態が様々な分析によって明らかにされてきた。1995年にはCraneとSiegel等によって、大腸菌SiR ßサブユニットの1.6 ÅのX線結晶構造が解かれている(図3-2 (a))。SiRの2つの補欠分子はSiRの3つのドメイン(ドメイン1/1', 2, 3)間に囲まれた表面領域に位置し、複数のßシートから成るハーネス(馬の引き綱)と呼ばれる構造によって保持されている。また、SiRはSNiRRと呼ばれるN末端領域とC末端領域が互いに対称なアミノ酸配列を持ち、これが亜対称性の立体構造を形成することも明らかとなった。還元中心の[4Fe-4S]クラスターに配位した4つのCys残基の構造も明らかとなり、そのうちの1つCys-483のγ位のS原子がシロヘムと[4Fe-4S]クラスターをブッリジしている構造も立体構造的に解析された。

酸化型のSiRでは、シロヘムは外部溶媒に露出し、ヘム鉄の第6配位子は占有されていない(McRee *et al.*, 1986)、*Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough)のSiRのstopped-flow分析から、SiRは酸化-還元状態でそのコンホメーションが大きく変化し、SiRが還元型構造をとってはじめて基質に対する親和性が増す(Lui and Cowan, 1994)。この様なSiRの酸化還元による構造変化は活性中心への基質結合を調節し、他のSiRにも共通すると考えられる。大腸菌SiRヘムサブユニットでもこれと同様な機構は判明し、酸化型状態ではシロヘムにはリン酸が配位していた(Crane *et al.*, 1995)。酸化型SiRヘムサブユニットのリン酸に対するK_dは14 μMであるが、還元状態になると速やかにリン酸は活性中心から放出され、代わりに亜硫酸や亜硝酸などの基質が結合する(Crane *et al.*, 1997a)。還元型SiRに対する亜硫酸または亜硝酸の結合反応は、酸化型SiRよりも10^5倍以上反応性に富む(Janick *et al.*, 1983)。シロヘムに結合した基質は、図3-2に示すようなプロセスで還元される。SiRの亜硝酸還元において、ヒドロキシルアミンは中間生成物として考えられているが、SiRはこの2電子還元基質を外部から加えた場合でも活性を示す(図3-2 (c))。SiRの活性中心では4残基の塩基性アミノ酸がシロヘムの周辺を取り巻くように存在し、

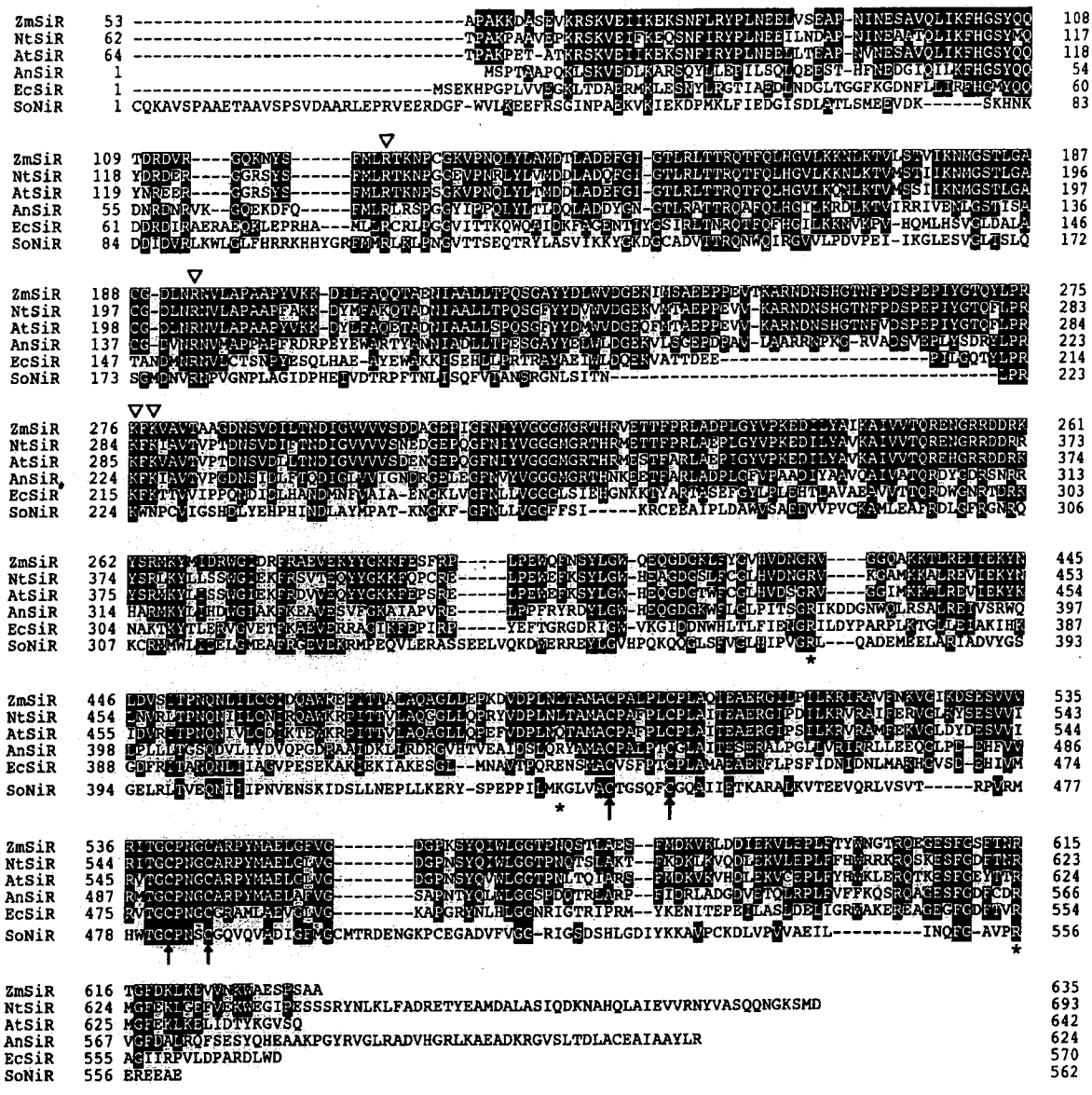


図 3-1 植物、ラン藻、大腸菌SiRとNiRとのアミノ酸配列比較

トウモロコシ(ZmSiR, Ideguchi *et al.*, 1995)、タバコ(NtSiR, Yonekura-Sakakibara *et al.*, 1998)、*Arabidopsis thaliana* (AtSiR, Brühl *et al.*, 1996)、*Synechococcus* PCC7942 (AnSiR, Gisselmann *et al.*, 1996)、大腸菌SiR ßサブユニット(EcSiR, Ostrowski *et al.*, 1989b)、ホウレンソウNiR (SoNiR, Back *et al.*, 1988)の一次構造は、それぞれギャップを導入して最大限の相同性を得た。植物のSiRは成熟体領域を示している。トウモロコシSiRの[4Fe-4S]クラスターの4残基のシステインリガンド(Cys-494, Cys-500, Cys-540, Cys-544)は矢印で、シロヘム近傍に存在し基質認識に関与すると思われる塩基性アミノ酸4残基(Arg-124, Arg-193, Lys-276, Lys-278)は三角で示した。

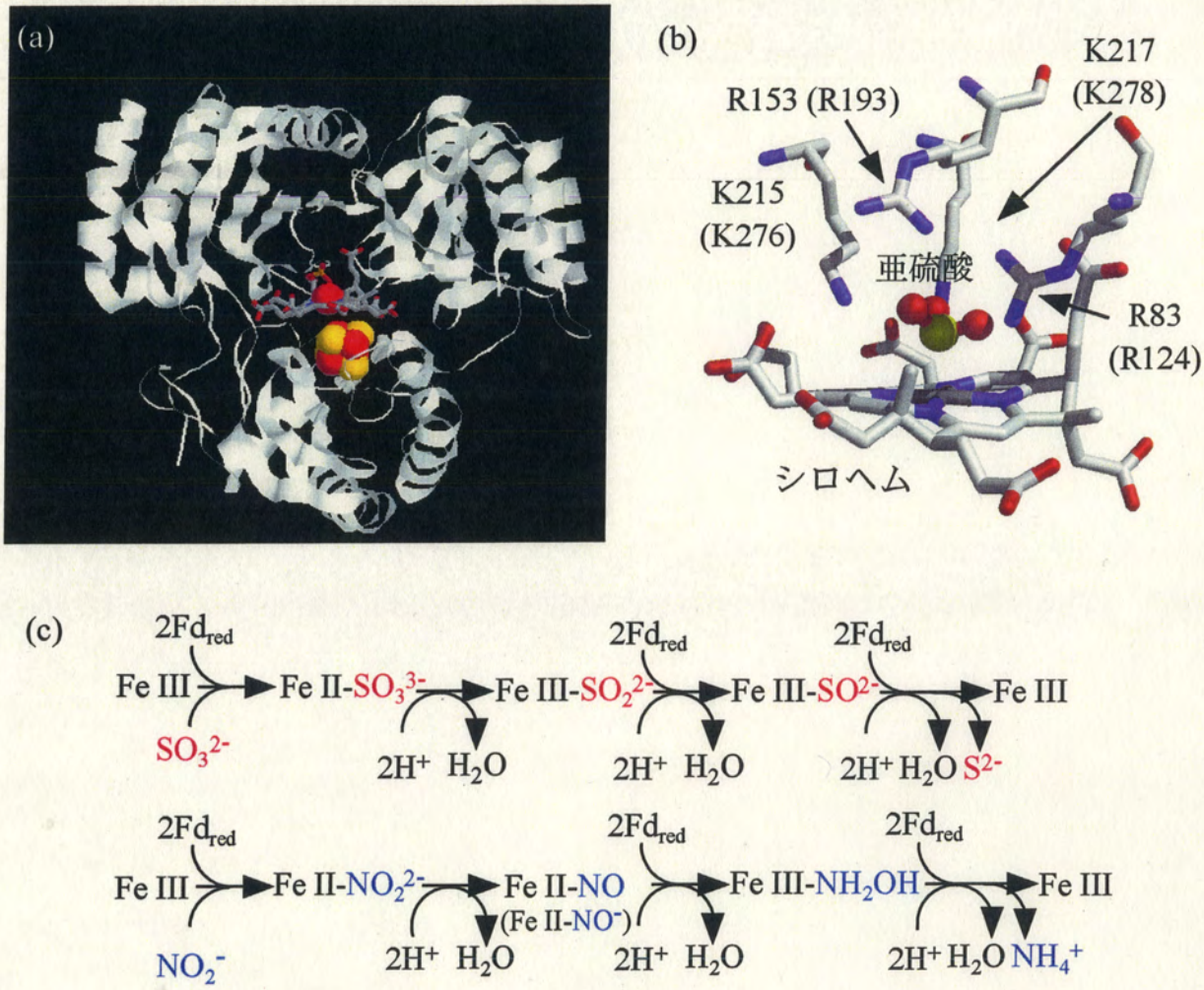


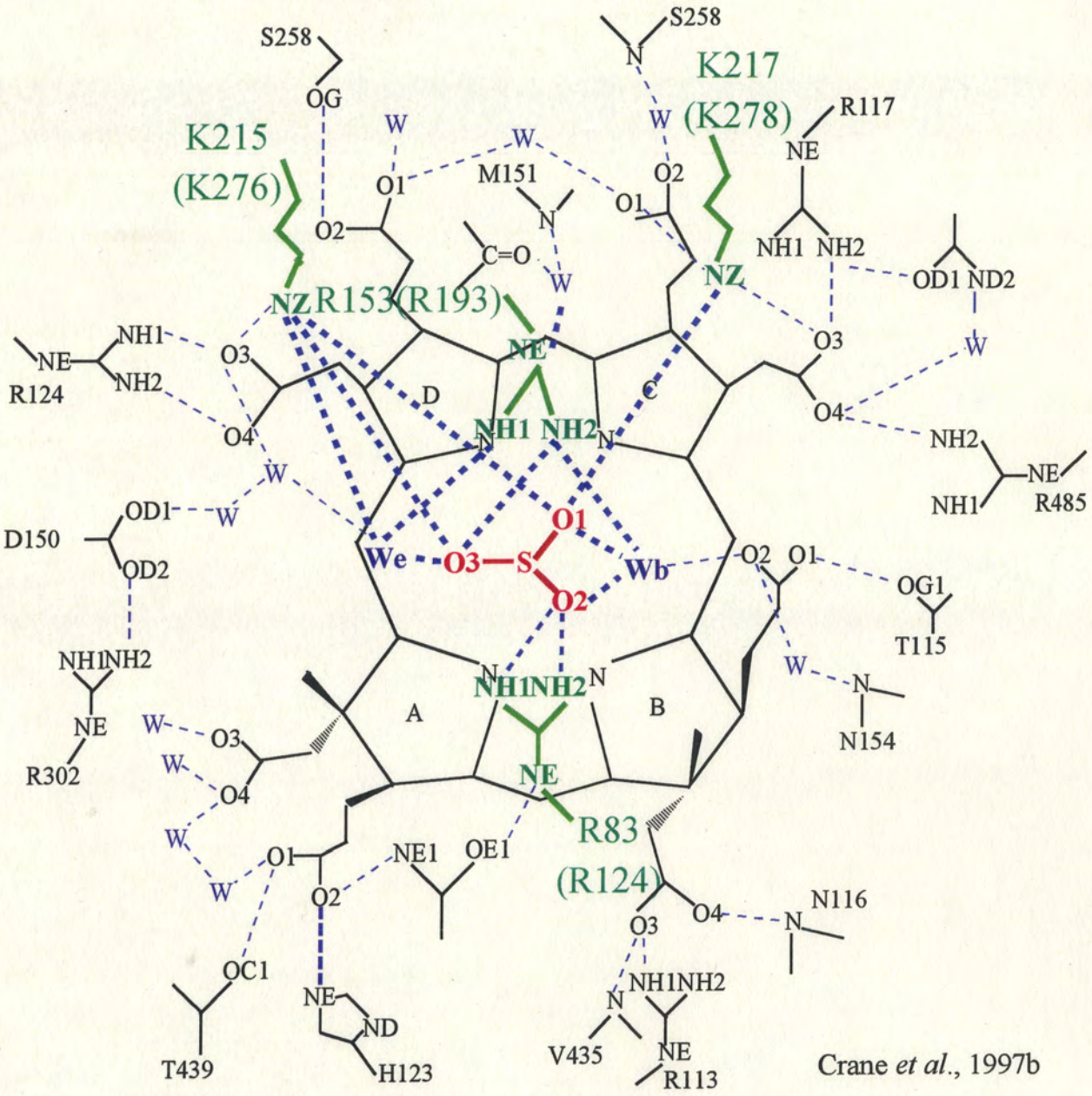
図3-2 大腸菌SiR ß サブユニットの立体構造と
基質還元機構のモデル

大腸菌SiR ß サブユニットの全体構造(a)、補欠分子シロヘム周辺の構造(b)、SiR活性中心における亜硫酸、亜硝酸還元の反応(c)をそれぞれ示す。ヘム鉄に配位した亜硫酸と亜硝酸のS-OまたはN-O結合は、1本の結合が電子とプロトンを2個ずつ用いて還元解裂され水分子が生じる。亜硝酸の還元反応では、ヒドロキシルアミンが還元中間体として生じると考えられ、外部からヒドロキシルアミンを基質として加えても還元反応が進行する。

これらは SiR の基質結合や活性中心構造の安定に重要な配位子であると推定された(図 3-2 (b))。大腸菌 SiR ヘムサブユニットについては、基質との複合体でも構造解析が行われ、その結果、活性中心近傍の Arg-83、Arg-153、Lys-215、Lys-217 が、シロヘムに結合する基質の種類(構造)に応じて、様々なコンホメーションを形成することが判明した(Crane *et al.*, 1997a, b)。これらのアミノ酸側鎖は、シロヘムのカルボキシル側鎖、活性中心に配置された水分子や、シロヘムに配位子した基質との間に水素結合のネットワークを形成するが(図 3-3)、シロヘム周辺に水分子を配置できる分子環境を作り出し、水 1 分子の生成に伴う亜硫酸や亜硝酸の還元に必要なプロトンを供給している。

大腸菌 SiR ß サブユニットと植物型 SiR との相同性はおよそ 30 %であるが、シロヘム周辺の塩基性アミノ酸、[4Fe-4S]クラスターに配位する 4 残基の Cys は完全に保存されていた(図 3-1)。これらは NiR や異化型 SiR でも保存されており、シロヘム酵素群に共通する重要な構造であると思われる。

私は、トウモロコシ SiR に、大腸菌 SiR の塩基性アミノ酸(Arg-83, Arg-153, Lys-215, Lys-217)に対応する残基が保存されていることを確かめ(Arg-124, Arg-193, Lys-276, Lys-278)、SiR の基質認識と還元反応の構造-機能相関を解明するために、これらの塩基性アミノ酸を系統的に部位特異的置換した。本章の後半部では、こうして得られた SiR 改変体の解析結果から、SiR 改変体が、SiR 野生型よりもむしろ NiR に類似した基質認識特性を示したことを報告する。



Crane *et al.*, 1997b

図3-3 大腸菌SiR ßサブユニットのシロヘム周辺の環境
シロヘムのポルフィリン環平面を直上から見下ろした図を示す。亜硫酸(赤)の硫黄原子はシロヘムの鉄原子に配位する。亜硫酸と水分子(青)、シロヘム側鎖のカルボキシル基と4つの塩基性アミノ酸(緑)の間には水素結合格子が形成される。( )内のアミノ酸番号はトウモロコシSiRの対応する残基を示す。亜硫酸のS-O結合は部位特異的な順序で解裂し、その際に1分子ずつの水を生成すると思われる。活性中心に配位した水分子We (exposed water)とWb (buried water)には、反応に必要なプロトンを供給する役割が考えられている。

結果

NiR の酵素活性

NiR の酵素特性を SiR と比較するため、ホウレンソウから精製した NiR を、NADPH/FNR/Fd 還元系によって活性測定した。その結果を図 3-4 に示す。NiR はμM オーダーの亜硝酸濃度で飽和し、最大活性は SiR の亜硝酸還元活性の 20 倍以上であった。一方 mM オーダーの基質濃度でも、NiR の亜硫酸還元活性は検出できなかった。ヒドロキシルアミン還元活性については、20 mM 以上の濃度で飽和し、NiR は SiR 野生型と異なりヒドロキシルアミンに対してかなり低親和性であることが分かった。NiR のそれぞれの基質に対する酵素反応パラメーターを算出し、SiR と比較した(表 3-1)。NiR は亜硝酸に対して高親和性であり(K_m: 2.38 μM)、SiR は亜硫酸に対して高親和性であった(K_m: 3.30 μM)。このように、両酵素の基質特異性は明確に異なっていた。また、NiR の亜硝酸とヒドロキシルアミンに対する k_{cat} は SiR よりも遙かに強く、NiR がこれらの基質をより速くターンオーバーすることも確かめられた。

NiR の吸収スペクトル

NiR と SiR の吸収スペクトルを比較したところ(図 3-5)、酸化型の NiR は SiR と同様にシロヘム特有の吸収(αバンド(572 nm), soret バンド(388 nm), CT バンド(690 nm))を示したが、これらの極大波長の位置は SiR と異なっていた。還元型では、NiR と SiR のαまたは CT バンドは消え、450 から 600 nm の波形もそれぞれ変化した。酸化型の NiR に 5 mM の CN^-を加えると、NiR の吸収スペクトルは変化した(図 3-6)。この条件で $Na_2S_2O_4$ を加えて還元したところ、CN^-非存在下とは異なる還元型の吸収スペクトルが得られた。SiR と NiR の CN^-存在下での酸化型、還元型スペクトルは、特に 480 から 580 nm 領域で異なっていた。以上のことから、電子線スペクトルの違いから、SiR と NiR のシロヘムの電子的性質が異なり、リガンドの配位によるヘム鉄原子のスピン状態の遷移は、両酵素に同様に起きると考えた。

表3-1 NiRの酵素活性動力学的パラメーター

	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
SO_3^{2-}	- (3.3 ± 0.27)	- (460 ± 17)	- (140)
NO_2^-	2.4 ± 0.29 (438 ± 38)	11000 ± 230 (460 ± 31)	4600 (1.1)
NH_2OH	11000 ± 1100 (270 ± 15)	920 ± 51 (930 ± 130)	0.084 (3.4)

( )内はSiRの数値を示す。 K_m: μM, k_{cat}: electron/min/SiR

表3-2 SiR改変体作製に使用した合成オリゴヌクレオチド

改変体	Primer	Sequence
		(antisense)
R193Q	p-51	5'-GGCG*CTGCAG*GAGCAAGTACATTCTGGTTGAGATCGC-3'
		Pst I
R193E	p-52	5'-GGCG*CTGCAG*GAGCAAGTACATTTTCGTTGAGATCGC-3'
		Pst I
R193A	p-53	5'-GGCG*CTGCAG*GAGCAAGTACATTAGCGTTGAGATCGC-3'
		Pst I
K276Q	p-54	5'-GCCGC*GGTAACC*GCAACCTTGAACTGCCTTGGTAGA-3'
		Bst EII
K278N	p-41	5'-GCCGC*GGTAACC*GCAACGTTGAACTT*CCTAGG*TAGATACTGGGTG-3'
		Bst EII *Avr* II
K278Q	p-42	5'-GCCGC*GGTAACC*GCAACCTGGAACCTCCTTGG-3'
		Bst EII
K278E	p-43	5'-GCCGC*GGTAACC*GCAACTTCGAACTTCCTTGG-3'
		Bst EII
K278A	p-44	5'-GCCGC*GGTAACC*GCAACAGCGAACTTCCTTGG-3'
		Bst EII
		(sense)
	p-17 (universal)	5'-CTCCG*CCATGG*CGAAGAAGGATGCTTC-3'
		Nco I

斜体と下線はそれぞれの制限酵素サイトを、二重下線は変異導入部位を表す。

表3-3 SiRシロヘム周辺塩基性残基改変体の発現

改変体	ホロ型	アポ型
R193Q		×
R193E	○	
R193A	○	
K276Q	○	
K278N	△	
K278Q	△	
K278A		×
K278E		×

○: 安定状態
△: 不安定状態
×: 精製できない

表3-4 SiR酸化型の吸収スペクトルの極大波長

	soretバンド	αバンド	CTバンド
WT	389	585	708
R193E	383	586	713
R193A	406	579	
K276Q	408	583	
K278N	308～408, 544	581	697
K278Q	406	583	
NiR	388	572	690

SiR 改変体作製

SiR のシロヘム近傍の塩基性残基が、基質特異性に重要であると考えたので、これらのアミノ酸を部位特異的に置換し、酵素特性の変化について調べた。大腸菌 SiR の X 線結晶構造解析によって確認されたこれらの塩基性アミノ酸は、トウモロコシ SiR では、Arg-124、Arg-193、Lys-276、Lys-278 に相当する。それぞれの残基について、Gln、Glu、Ala に置換した改変体を系統的に作製した(図 3-7, 3-8, 表 3-2)。NiR は SiR の Lys-278 に当たる残基が Asn となっているので、SiR の K278N 改変体も作製した。これらの SiR 改変体の大腸菌での発現様態を調べ、可溶性蛋白質として発現していたものについて、大スケールの精製を進めた。幾つかの改変体は、可溶性画分に存在したが、ホロ型としては精製できなかった。R193E、R193A、K276Q、そして K278N と K276Q がホロ型として得られた(表 3-3, 図 3-9)。しかし K278N と K278Q は不安定で、R193Q、R193A、K276Q と比べると収量もかなり低かった。CD スペクトルから、R193E と R193A、K276Q と K278N では二次構造が野生型と大きく変わっていない事を確認した(データ未掲載)。Arg-124 の 3 つの改変体(R124Q, R124E, R124A)は、どれもホロ型としては得られず、この残基は、SiR の高次構造形成と安定化、または補欠分子の維持に重要な部位ではないかと考えた。

改変体の酸化型及び還元型の吸収スペクトルを図 3-10 に、吸収極大波長を表 3-4 に示した。酸化型の SiR 野生型のスペクトルと比較すると、改変体のαバンドの位置はほとんど同じであった。R193E では CT バンドが野生型と同様に見られた。R193A、K276Q、K278Q では CT バンドはなく、soret バンドも様々な極大波長に現れた。K278N では soret バンドはブロードで、CT バンドもブルーシフトしていた。これらは、シロヘム周辺の塩基性残基の置換が、ヘム鉄やそのポルフィリン環の電子局在や鉄原子のスピン状態に影響していることを示している。

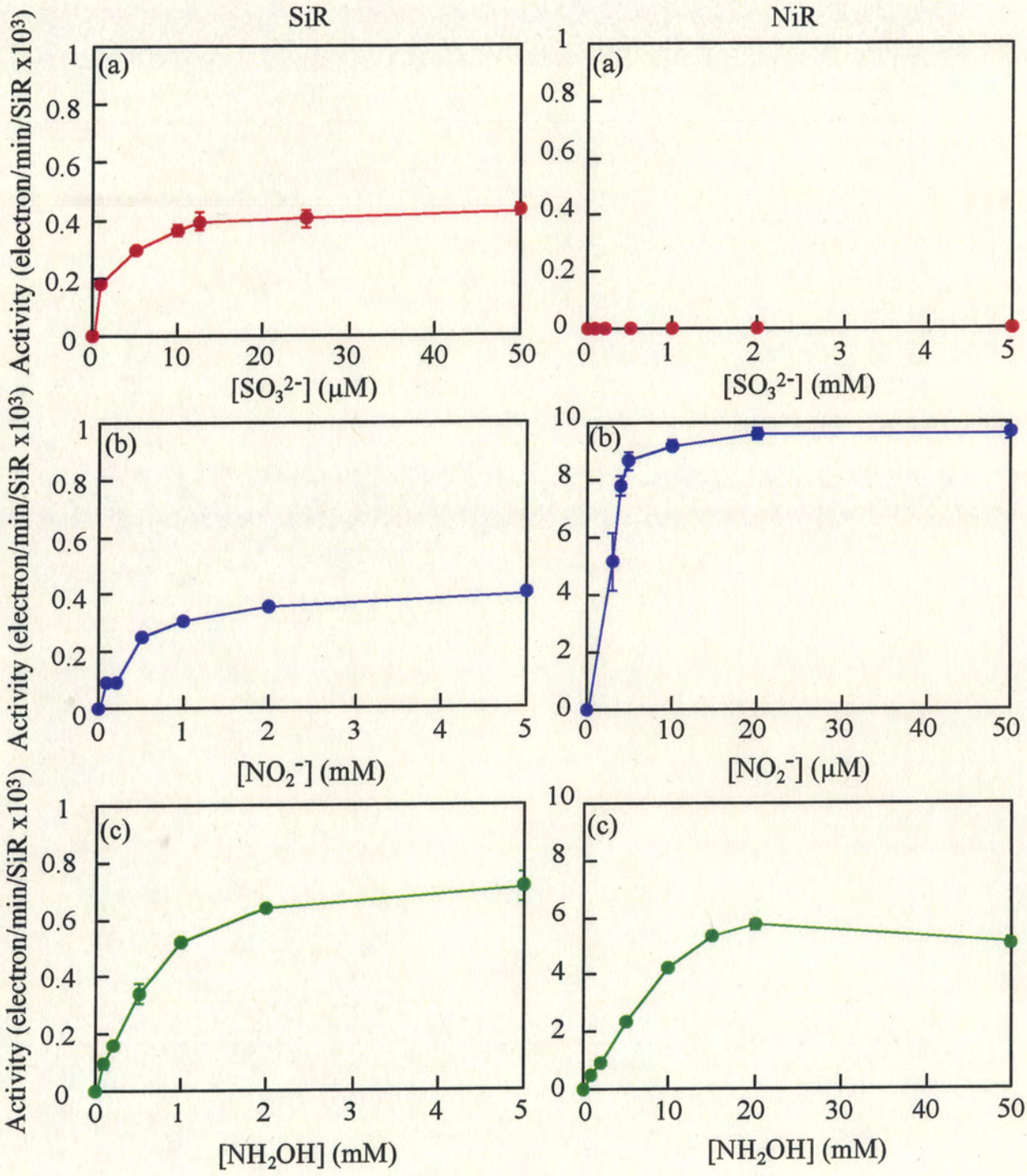


図3-4 SiRとNiRの基質特異性の比較

SiRとNiRの各基質に対する活性をNADPH酸化モニター法によって測定した。反応条件は図1-6と同じである。SiRとNiRの亜硫酸(a)、亜硝酸(b)、ヒドロキシルアミン(c)に対する活性の濃度依存性をグラフで示す。NiRの亜硝酸またはヒドロキシルアミンの活性については、縦軸の反応速度の値をSiRの10倍として表した。

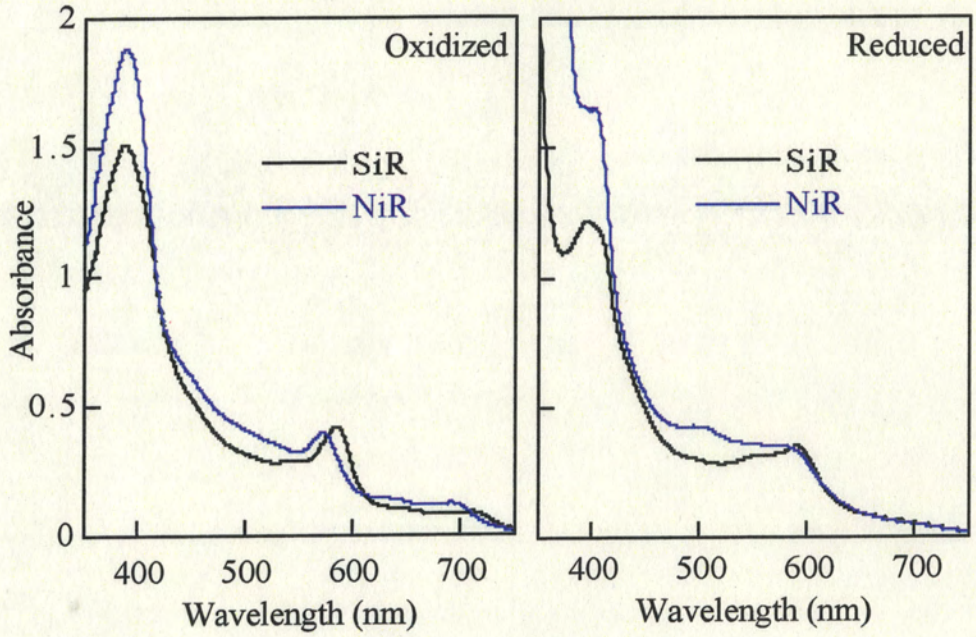


図3-5 NiRとSiRの吸収スペクトル
SiR、NiRの酸化型、および$Na_2S_2O_4$を加えて還元したスペクトルをそれぞれ示す。

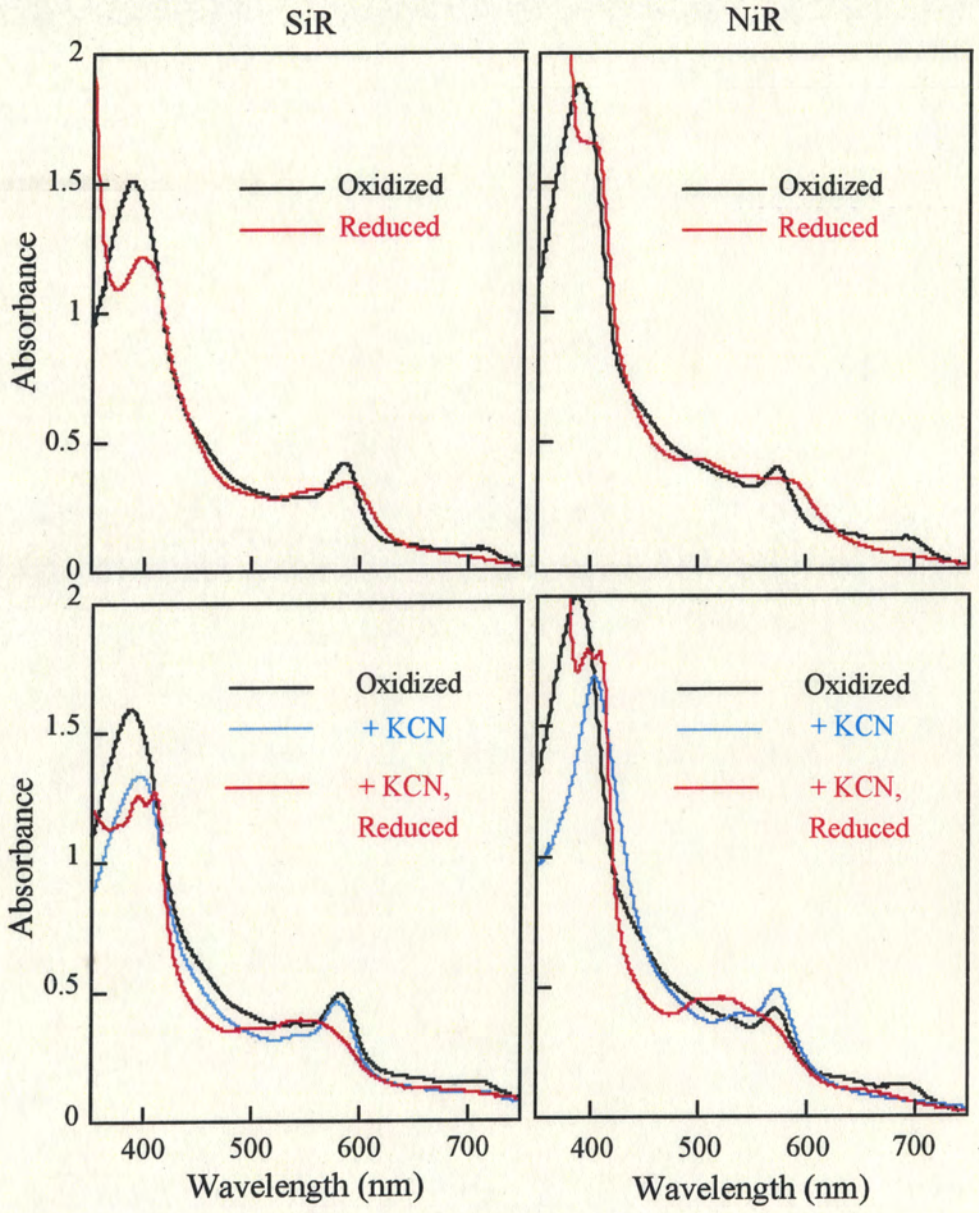


図3-6 SiR、NiRの5 mM KCN存在下、
非存在下での還元スペクトル比較

上のパネルは、KCN非存在下でのSiRとNiRの酸化還元スペクトルを示す。下のパネルはKCN存在下での各酵素の酸化還元スペクトルを示す。SiRとNiRは、$Na_2S_2O_4$を加えて還元した。2つの酵素のスペクトルはKCNの有無によって大きく異なっている。

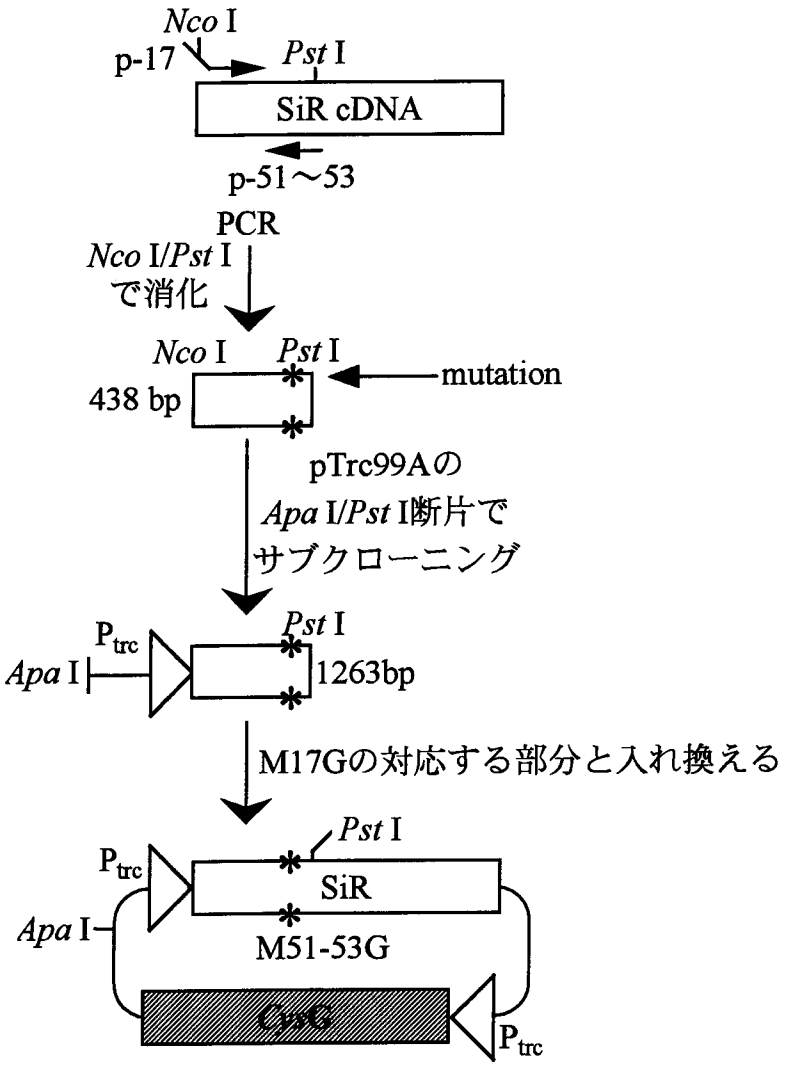


図3-7 Arg-193改変体発現プラスミドの構築
表3-2に示したミスマッチコドンを含む各プライマーでそれぞれPCRを行い、変異を導入した増幅DNAを、組換え体発現プラスミドM17Gの対応する領域と入れ換えた。

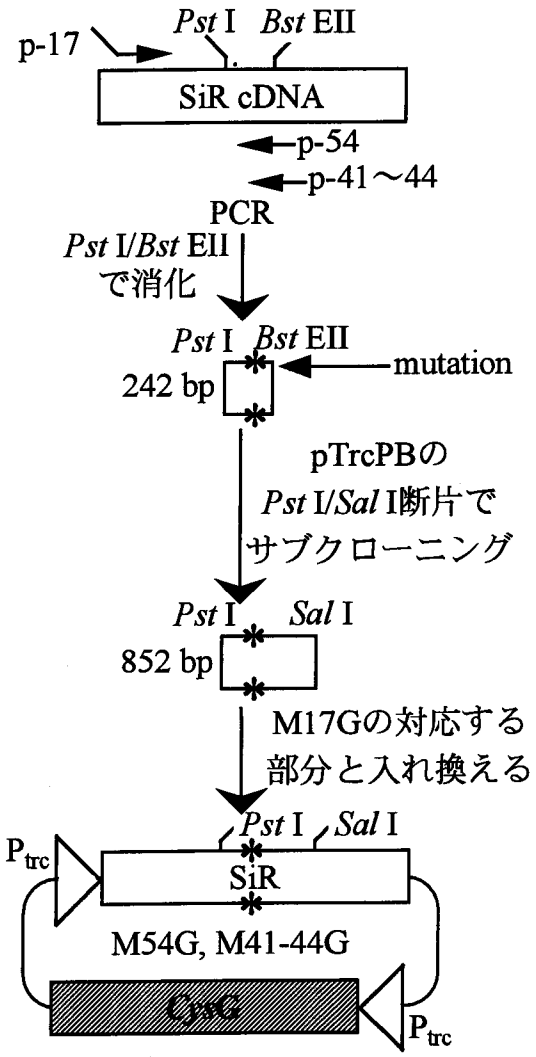


図3-8 Lys-276、Lys-278改変体発現
プラスミドの構築

Lys-276、Lys-278改変体は、図4-3と同様の方法で作製した。pTrcPBベクターによるサブクローニングを経て、変異DNAをM17Gの対応する部位と入れ換えた。

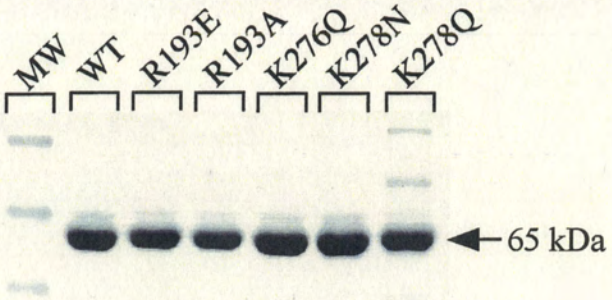


図3-9 SiR改変体精製標品のSDS-PAGE

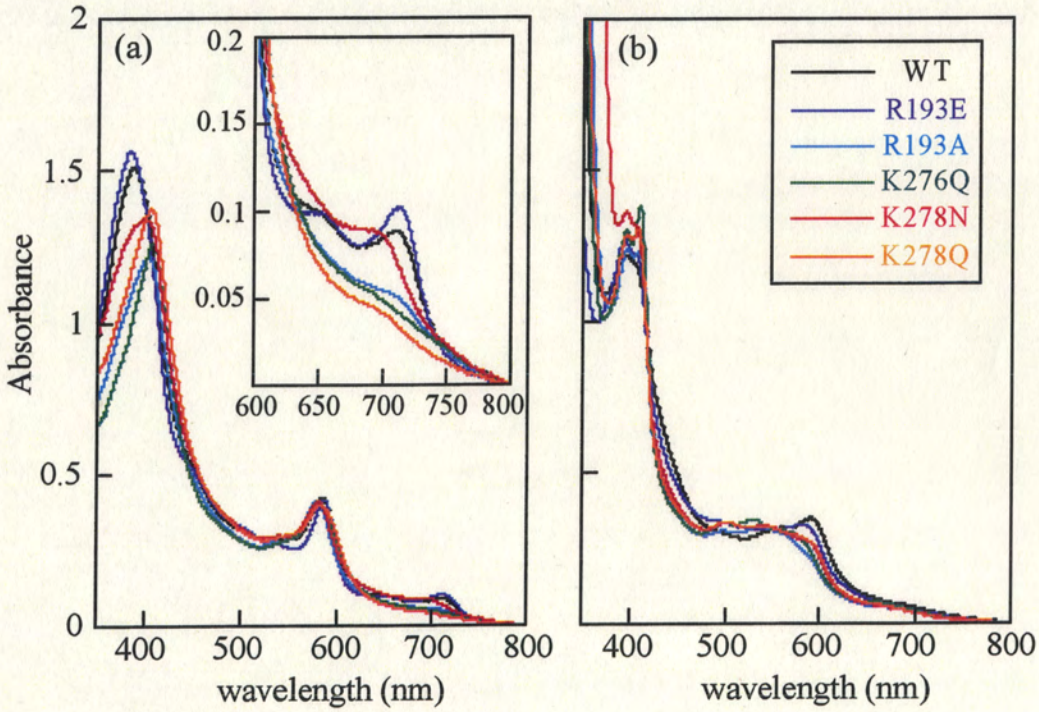


図3-10 SiR改変体の吸収スペクトル
SiRの酸化型(a)、酸化型のCTバンド((a) Inlet)、還元型((b): $Na_2S_2O_4$による)のスペクトルを示す。SiR野生型及び各改変体は凡例に示した色で表している。

SiR 改変体の酵素活性

SiR 改変体の酵素活性を NADPH/FNR/Fd の還元系を用いて測定した。一例を図 3-11 に示す。SiR 野生型は亜硫酸、亜硝酸、またはヒドロキシルアミンいずれに対しても活性がある。しかし、R193E では亜硫酸活性は消失し、K276Q では、亜硫酸、亜硝酸活性は共に検出されなかった。このように改変体はそれぞれの基質に対し様々な酵素活性の特徴を示したので、全ての改変体について各基質の還元反応を詳細に測定した(図 3-12, 3-13)。各改変体のそれぞれの基質に対する K_m と k_{cat} を表 3-5 にまとめた。全ての改変体で亜硫酸還元活性は検出されなかった。亜硝酸については、改変体 R193E では活性が野生型の約 2 倍に増加していた。また、R193A では、亜硝酸に対する K_m が 2.2 μM であり、親和性は野生型より遙かに上昇していた。この値は、NiR の亜硝酸に対する K_m (2.4 μM)と同程度のものであった。ところで、NiR との一次構造比較に基づいて作製した改変体 K278N は、SiR 野生型に比べ、その亜硝酸活性は 4 分の 1 に減少し、K_m は野生型よりも増加していた。この結果は、この Lys を Asn に置換しても、SiR は NiR の様な酵素特性を得たわけではなく、Lys-278→Asn が SiR と NiR の基質特異性を左右する要因であるという仮説は成り立たなかった。

考察

NiR は亜硝酸に対し、SiR は亜硫酸に対し、K_m がμM オーダーの高親和性を示す。NiR は亜硫酸還元活性を持たず、SiR は亜硝酸還元活性を持つが K_m および最大活性は遙かに NiR よりも低い。この基質特異性の違いから、2 つの酵素が植物細胞内で亜硫酸と亜硝酸の還元を機能的に分担していることが伺える。物理化学的には、S-O 結合の還元が N-O 結合に比べ高い活性化エネルギーを要求する化学反応なので、両酵素のターンオーバー数の差はそれに起因するものと考えられる。また、植物代謝生理の観点では、窒素同化量は硫黄同化量の約 10 倍であると見積もられるが(Heldt, 1996)、この酵素反応の特性とよく対応している。

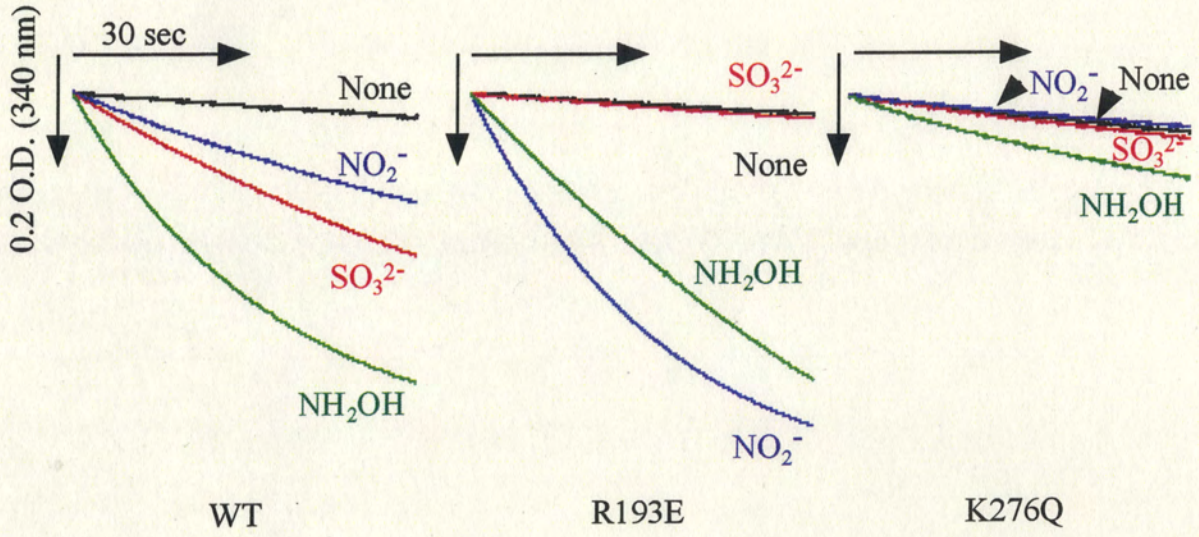


図3-11 NADPH酸化モニター法によるSiR改変体活性測定
野生型、R193E、K276QそれぞれのSiRの3種の基質に対する活性を測定した。反応条件は図1-6と同じである。0.5 mM 亜硫酸、0.5 mM亜硝酸、1 mMヒドロキシルアミン存在下の各酵素の活性を、コントロールと共に示した。

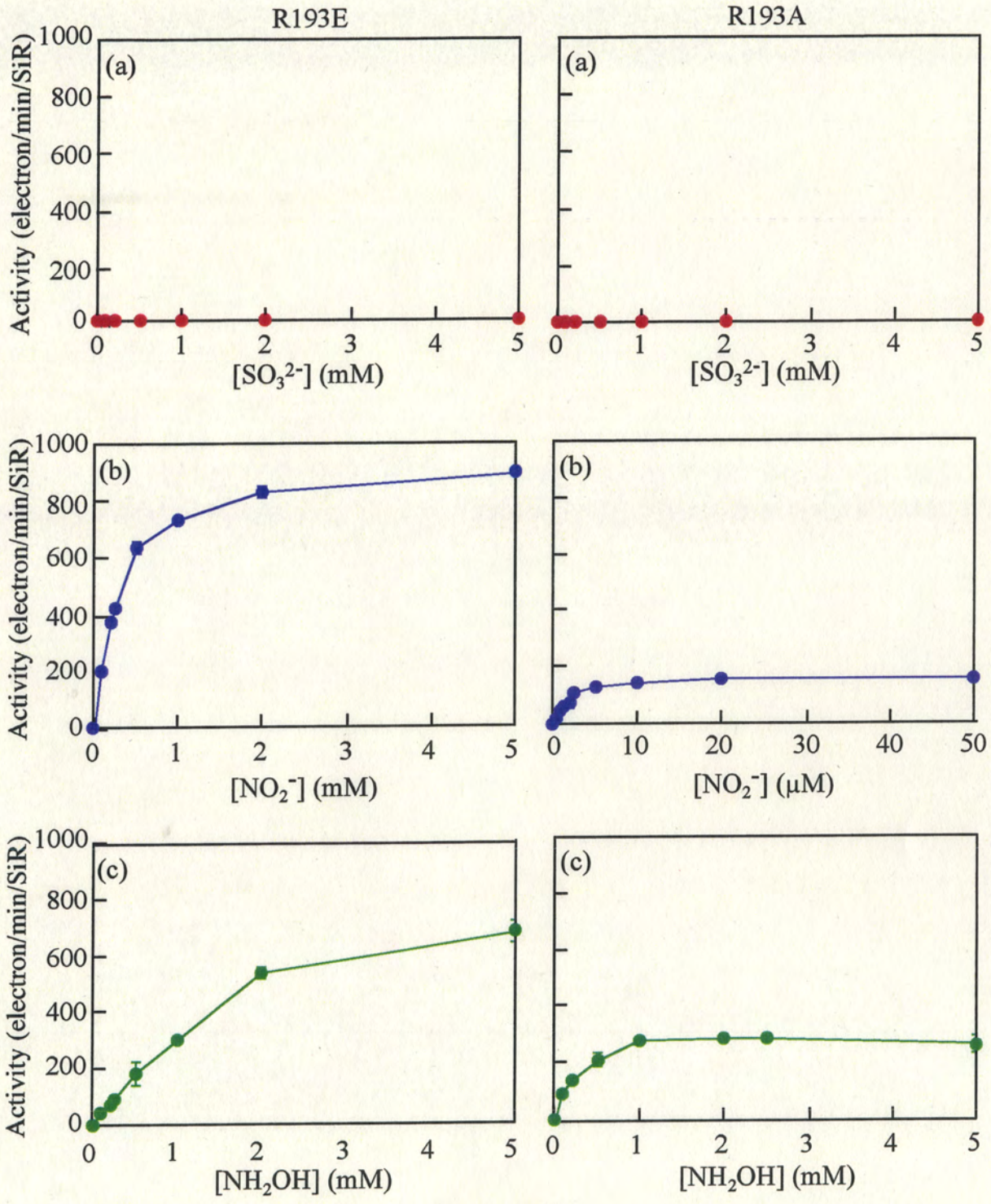


図3-12 SiR改変体R193E、R193Aの3種の基質に対する活性
R193E、R193Aの亜硫酸(a)、亜硝酸(b)、ヒドロキシルアミン(c)に対する活性の基質濃度依存性を示した。反応条件は図1-6と同じである。活性はそれぞれの基質濃度で3回測定し、平均値を求めた。

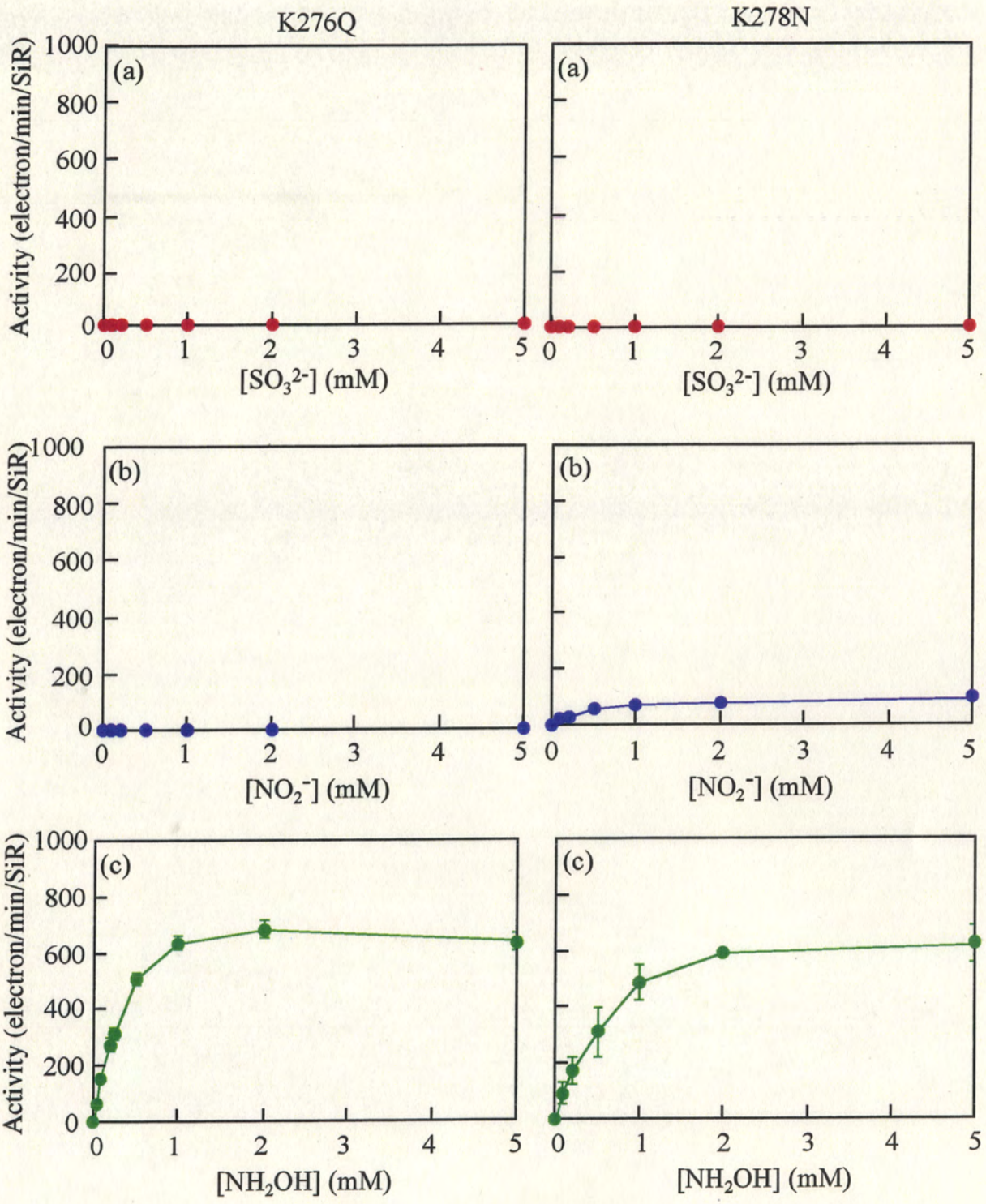


図3-13 SiR改変体K276Q、K278Nの3種の基質に対する活性
K276Q、K278Nの亜硫酸(a)、亜硝酸(b)、ヒドロキシルアミン(c)に対する活性の基質濃度依存性を示した。反応条件は図1-6と同じである。活性はそれぞれの基質濃度で3回測定し、平均値を求めた。

表3-5 SiR改変体の動力学的パラメーター

	SO_3^{2-}			NO_2^-			NH_2OH		
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
WT	3.3 ± 0.27	460 ± 17	140	440 ± 38	460 ± 31	1.0	270 ± 15	930 ± 130	3.4
R193E	-	-	-	310 ± 4.5	910 ± 7.1	2.9	1200 ± 92	740 ± 17	0.62
R193A	-	-	-	2.2 ± 0.22	180 ± 3.9	82	210 ± 7.4	290 ± 14	1.4
K276Q	-	-	-	-	-	-	460 ± 17	270 ± 8.9	0.59
K278N	-	-	-	560 ± 14	110 ± 10	0.20	610 ± 210	660 ± 42	1.1
NiR	-	-	-	2.4 ± 0.29	11000 ± 230	4600	11000 ± 1100	920 ± 51	0.084

K_m: μM, k_{cat}: electron/min/SiR

SiR と NiR の酸化型スペクトルの違いは、それぞれの持つシロヘムが、亜硫酸、亜硝酸の還元に適した異なる電気的状態を維持していることを反映している。また、NiR の酸化型および還元型の吸収スペクトルは、CN^-存在下と非存在下では異なる変化を示し、これは CN^-の配位によってヘム鉄が低スピン状態に遷移するためと推察できる。今回は確かめていないが、酸化型の SiR と NiR は、それぞれ亜硫酸、亜硝酸と結合した場合、特徴的な吸収スペクトル変化と、ヘム鉄 Fe^{3+}の低スピンシグナルを表すことが、EPR や飽和磁化実験において観察されている (Aparicio *et al.*, 1975; Fry *et al.*, 1980; Day *et al*, 1988)。

NiR と SiR の一次構造の相同性は 26%であるが、補欠分子周辺のアミノ酸はよく保存されていた。NiR では、シロヘム近傍の塩基性アミノ酸は 3 残基が保存され、残り 1 残基の Lys-278 は Asn に置き換わっている。これは、両酵素間に認められる顕著な相違点の一つである。ただし、今回の K278N の解析では、亜硫酸還元活性が消失したものの、亜硝酸に対する親和性や還元活性の増進は見られなかった。図 3-1 に示したように SiR と NiR には、一次構造に大きなギャップが存在し、SiR には NiR にない独自の領域が存在している。その一方で、大腸菌 SiR ß サブユニットの立体構造と各生物種の SiR と NiR の一次構造比較から、SNiRR という特徴のある繰り返し配列が明らかにされた(Crane *et al.*, 1995; Crane and getzoff, 1996)。SNiRR は *Arabidopsis* の硝酸還元酵素(NR)やラットの亜硫酸酸化酵素(SO)でも確認され、SiR や NiR をはじめとするある種の酸化還元酵素に必須の構造と考えられる。

ところで、それぞれの酸化型のスペクトルが多少異なっていたことから、上記の様な一次構造の類似性とは対照的に、SiR と NiR では補欠分子の電気的状態が異なっていることも考えられる。これらのことから、SiR と NiR の基質特異性の違いは、ペプチド構造の微小な差と共に、補欠分子の電気磁性的性質や電位の違いに起因しているのかも知れない。

Fd は様々な Fd 依存性酵素によって、相互作用領域を使い分けていると思われるが、NiR で報告された 3 箇所の相互作用サイトのうち(Dose *et al.*, 1997)、2 箇所は SiR にも保存されていた。ラン藻 NiR の部位特異的変異実験から、NiR には 2

つの Fd との相互作用領域があると報告され(Curdt *et al.*, 2000)、SiR と NiR 間に保存されている残基もここに含まれている。このことは、NiR と SiR の Fd との相互作用が非常に良く類似していることを示している。ところで、NiR では、Trp-92 が Fd との結合部位に近接し、Fd-NiR 間の電子伝達効率に影響すると報告されているが(Hirasawa *et al.*, 1994a, b; Dose *et al.*, 1997)、SiR ではこの残基は保存されていない。しかし SiR の蛍光吸収が、Fd を添加していくと減少することを実験で確認しているので(データ未掲載)、SiR において、ある特定部位の Trp が Fd との複合体形成におけるプローブとして働く可能性が考えられる。

活性中心の立体構造解析から、大腸菌 SiR の Arg-153 (トウモロコシ SiR の Arg-193 に対応)は、亜硫酸が結合することによって大きく flip し(Crane *et al.*, 1997b)、その還元反応において中心的な役割を果たすと考えられる。改変体 R193E では亜硫酸還元が無くなり、R193A では、亜硝酸に対する親和性が増大したことから 193 番目の Arg はやはり SiR の基質還元反応には重要であることが示唆された。一方、大腸菌 SiR の Lys-215 (トウモロコシ SiR の Lys-276 に対応)は、シロヘムに結合した亜硫酸とその近傍の 2 つの水分子に対し水素結合する(図 3-14)。そして亜硫酸還元の最初の S-O 結合解裂は Arg-193 と Lys-276 が水素結合する S-O3 から行われると考えられる。従って、R193E、R193A、K276Q の亜硫酸還元活性消失は、酸素原子の分離に要するプロトン供給と、基質の活性中心への固定が適切に起きていない状況を反映している。K276Q では亜硝酸還元活性も消失したことから、この残基については両方の基質還元に重要な役割を持つ可能性も考えられた。cytochrome P450 や西洋ワサビのペルオキシダーゼでは、ヘムに酸素分子が配位し、ヘムリガンドの Cys や His から電子が酸素に押し出され(push)、ヘムの近傍に位置する別の His のイミダゾール側鎖からプロトンが供給され、電子を得た酸素原子を引っ張り(pull)、酸素間の結合の解裂を促進する。これはいわゆる push-pull モデルとして提唱されており(Dawson, 1988)、SiR のシロヘム近傍の塩基性アミノ酸も、このような push-pull 機構に関して同様な機能を持つと思われる。

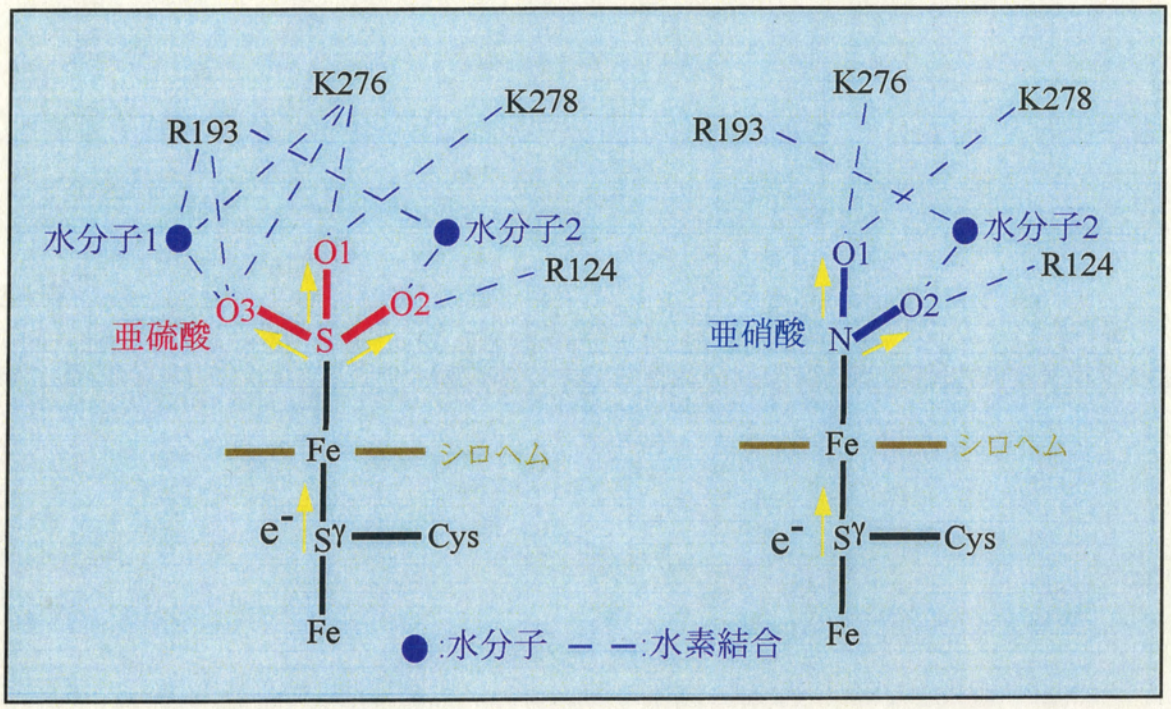


図3-14 SiR活性中心における
基質還元反応におけるシロヘム近傍塩基性残基の寄与
-水素結合による電子の引き寄せと
S-O結合、N-O結合の還元開裂の促進-

我々はSiRの鉄硫黄クラスターのCysリガンドのSerへの改変も試みたが(C494S, C500S, C540S, C544S)、このような改変体酵素は全てホロ型として精製できなかった。特にCys544(大腸菌ではCys483)はシロヘムとクラスターとを架橋し、補欠分子の保持に重要な残基であると思われる。cytochrome $P450_{CAM}$ でもヘムのリガンドはCysであるが、そのCysをHisに改変した酵素は、酵素活性が低下し、O-O結合のヘテロリシスが低下したという報告がある(Yoshioka *et al.*, 2000, 2001)。このことは、SiRや $P450_{CAM}$ 等のヘムを配位するCysリガンドは、化合物の解裂反応に応じた効率の良い電子移動に不可欠な構造因子であることを示唆する。SiRでは、Cysリガンドの改変酵素が安定に発現しなかったとことから、補欠分子間の電子移動に関与するCys544のみならず、全てのCysがSiRの活性中心または全体構造の安定化に重要であると思われた。cytochrome *c* ペルオキシダーゼのヘムリガンドはHisであるが、このHisリガンドをCysに置換し、cytochrome *c* ペルオキシダーゼをP450型の酵素にする試みがなされている(Choundhury *et al.*, 1992; Sigman, *et al.*, 1999)。このようにヘムの配位子となるアミノ酸の種類によって、それぞれの酵素の特性が決定される事もあり、SiRの場合も、そのCysリガンドがシロヘム上の亜硫酸還元に効率的の良いヘム鉄への電子供給には欠かせないのかもしれない。

改変体が亜硫酸活性を一様に失っていた理由を以下のように考えた。1)亜硫酸のシロヘムへの親和性が低下した。2)亜硫酸はシロヘムに結合するが、効率よく還元されない。3)親和性の低下と還元機能の低下の両方による。これらの原因について検証することは、SiRの基質還元機構の本質を理解することに重要である。次章では、高電位のFd、S46Gを用いてSiR改変体の基質親和性とレドックス特性について検証する。

第4章　SiR改変体の基質親和性とレドックス特性の評価

序

SiR のような、活性中心近傍の特定アミノ酸が寄与する基質認識や還元促進機構は、他のヘム酵素でも報告されている。cytochrome $P450_{CAM}$ や cytochrome *c* ペルオキシダーゼは、補欠分子にプロトヘムを持ち、それぞれ Cys または His がヘムの配位子となっている。前章の考察で述べたが、これらの酸化還元酵素では、ヘムを挟んでヘムリガンドの反対側に存在する特定の Arg のグアニジノ基や His のイミダゾール基がプロトンドナーとして働く。このように、多くの金属蛋白質では、付近に正負どちらかの電位を持つアミノ酸側差が存在し、補欠分子、基質や他のアミノ酸と協調して、化学反応に適した構造の活性中心を構成する(Dawson, 1988; Raag and Poulos, 1989; Smulevich, *et al.*, 1991)。SiR においてもシロヘム周辺の塩基性アミノ酸、鉄硫黄クラスターの配位子の Cys は、低分子化合物の還元解裂と基質-補欠分子-補欠分子間の電子移動を支える重要な構造要因である。SiR の多段階還元反応には、[4Fe-4S]クラスターとシロヘムの酸化還元が協調し(Janick and Siegel, 1982; Christner *et al.*, 1983)、還元反応に適した空間的配置で基質がシロヘムに結合し(Lui and Cowan, 1994; Crane *et al.*, 1997a, b)、Fd と SiR の分子間電子移動が一定以上の速度で行われることが重要である。SiR 改変体は、これらを実験的に検証するのに適したモデル酵素である。前章でも述べたが、全ての改変体は亜硫酸還元活性を消失していた。その原因として、亜硫酸のシロヘムへの配位、水素結合による亜硫酸の酸素原子の活性化、[4Fe-4S]クラスターとシロヘムのレドックス機能等が不全になったことを考えた。本章では、これらの可能性を実験的に確かめるため、第2章で述べた高電位 Fd S46G による SiR のヒドロキシルアミン還元反応を活用した。SiR 改変体はどれもヒドロキシルアミン還元活性を保持し、亜硫酸がこの活性に及ぼす影響を解析することで、各改変体の亜硫酸に対する親和性を調べた。また Fd 野生型と S46G からの SiR 改変体への電子移動を比較し、[4Fe-4S]クラスターとシロヘムのレドックス特性を評価した。この結果から、

SiR 改変体には、S46G によってより速く還元される分子種が存在し、その電位が変化したことによって分子内電子経路が影響を及ぼされた可能性について考察する。

結果

亜硫酸、亜硝酸のシロヘムへの親和性

第 2 章で述べたように、SiR 野生型は亜硫酸に強い親和性を持つので、S46G により駆動されるヒドロキシルアミン活性は、低濃度の亜硫酸で阻害される。この特性を利用して、亜硫酸還元活性を消失した改変体の亜硫酸とシロヘムの親和性を解析した。図 4-1 に示すように、SiR 野生型のヒドロキシルアミン活性は数十μM の亜硫酸で阻害された。一方、R193E の活性は 1 mM の亜硫酸でも殆ど影響を受けない。この結果は、R193E が亜硫酸に対する親和性を著しく低下したことを示す。他の改変体も同様の方法で測定し、亜硫酸濃度に依存したヒドロキシルアミン還元活性の低下する度合いを図 4-2 (a)にまとめた。野生型はμM オーダーの亜硫酸による顕著な阻害が認められたが、改変体では亜硫酸による阻害濃度は 100 μM から数 mM オーダーの範囲に及んだ。この結果から、R193E は親和性が大きく低下したことによって亜硫酸活性が減少したと考えた。一方、R193A、K278N は亜硫酸に対して、中程度の親和性は保持していた。特に、K276Q の活性は検出できない程低いが、亜硫酸に対する親和性は保持しており、その活性中心は亜硫酸還元が進行しない状態になったと推察した。

亜硝酸についても同様な解析を行い、結果を図 4-2 (b)に示した。阻害に有効な亜硝酸濃度域は改変体によって異なり、特に R193A では 5 μM 以下の亜硝酸でほぼ完全に活性阻害された。R193A に対する阻害濃度域はこの改変体の亜硝酸に対する K_m とよく一致していた。殆ど全ての改変体は亜硝酸還元活性は保持していたが、亜硝酸に対する K_m 値の大小とこの現象とは互いに良く一致していた。ただし、興味あることに、K276Q は有意な亜硝酸活性を示さないが、このヒドロキシルアミン活性は低濃度の亜硝酸で阻害される。これは亜硫酸の場合と同様、K276Q で

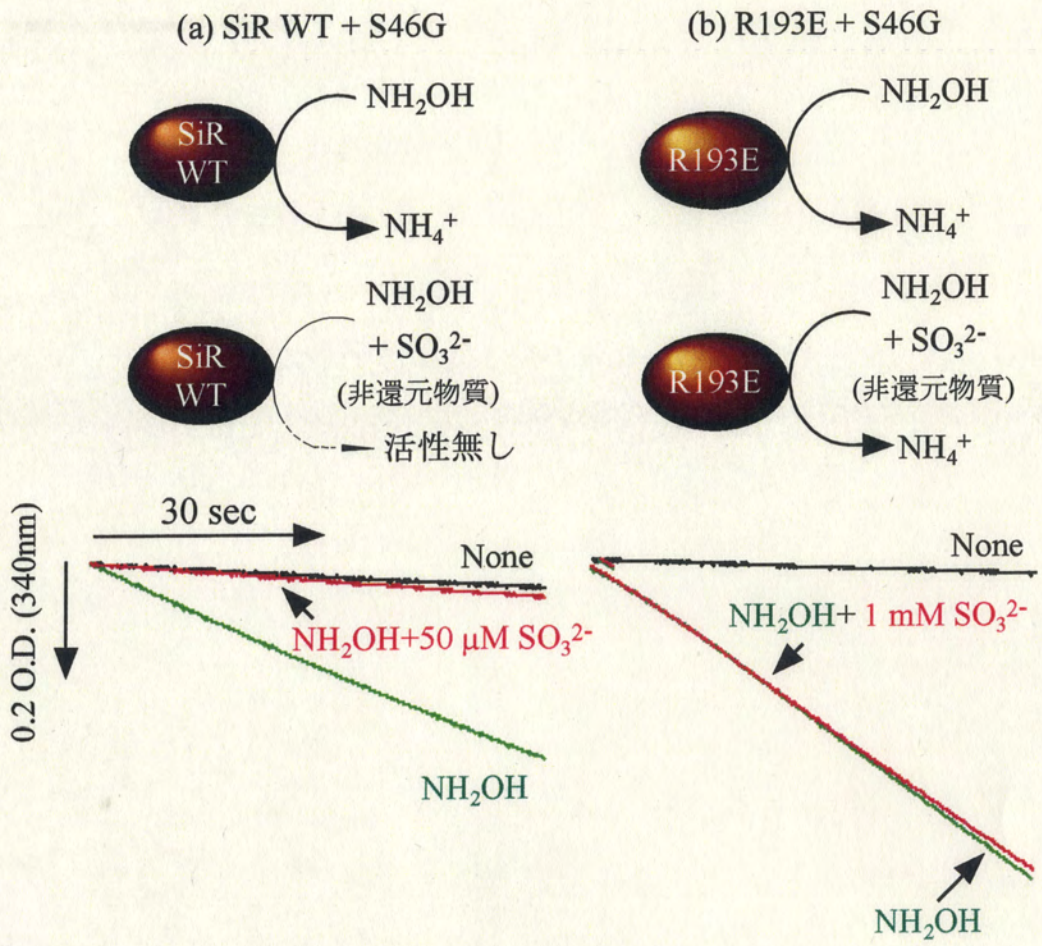


図4-1 S46Gに依存したヒドロキシルアミン
還元活性に対する亜硫酸の影響

S46Gに依存したSiR改変体のヒドロキシルアミン還元活性が、亜硫酸によって阻害されるかどうか調べた。反応条件は図1-6と同じである。野生型では50 μMの亜硫酸で阻害が見られたが(a)、R193Eでは1 mMの亜硫酸でも影響は認められなかった(b)。

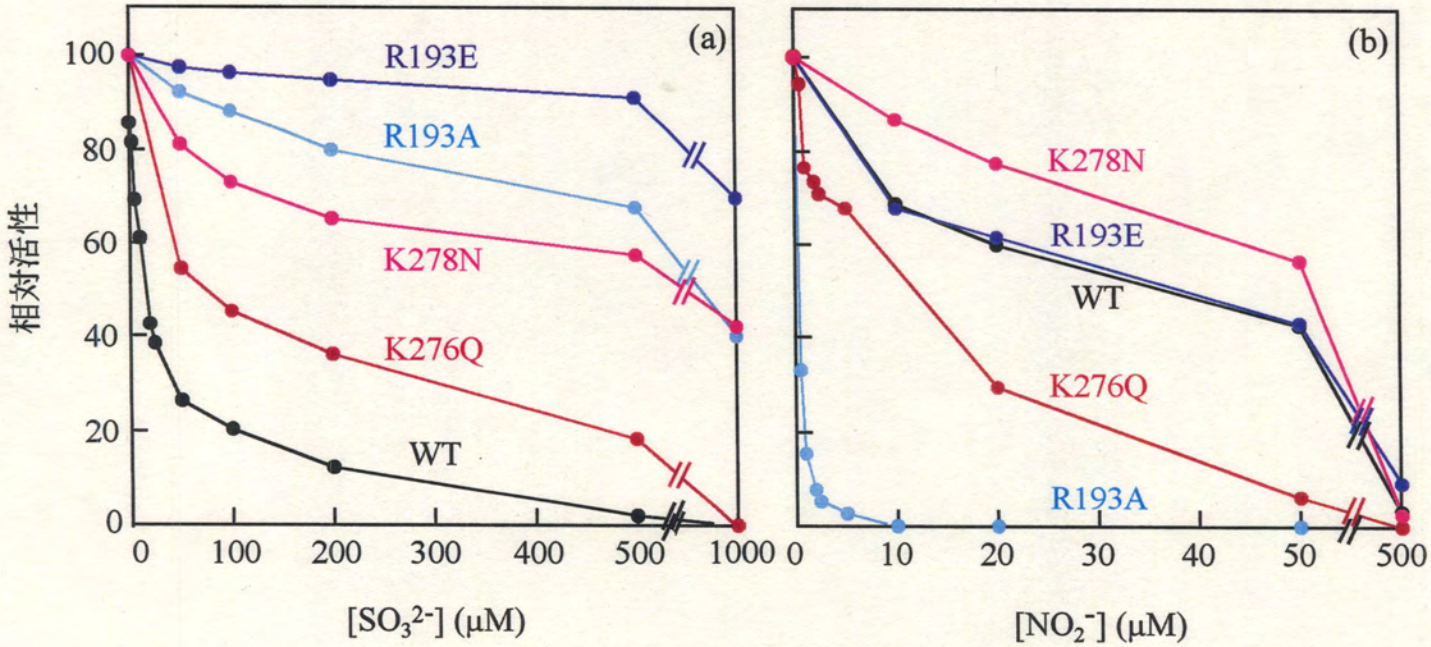


図4-2 SiR改変体のS46Gに依存したヒドロキシルアミン活性に対する亜硫酸、亜硝酸の阻害

各濃度の亜硫酸(a)、亜硝酸(b)存在下での、S46Gに依存したSiRのヒドロキシルアミン活性が阻害される程度を示した。反応条件は図1-6と同じである。亜硫酸、亜硝酸の各濃度での活性は、濃度0の時のヒドロキシルアミン還元活性を100とした相対活性で示した。

はシロヘムに基質が結合しても、一連の還元反応が進行しない機能障害を起こしたと推察した。より定量的にこれらの阻害現象を議論するため、各改変体の亜硫酸・亜硝酸による阻害反応の速度論的解析を行い(図 4-3)、K_i を算出した(表 4-1)。全ての改変体の活性は競合阻害を受け、K_i 値は図 4-2 のデータと良い対応が認められた。しかし、亜硝酸に対する K_i 値は第 2 章で議論したように K_m に比べ有意に小さいことが改めて確認された。

還元型スペクトルの特性

NADPH 再生系と NADPH/FNR/Fd 還元系を組み合わせて SiR 改変体を還元し、吸収スペクトルの変化を SiR 野生型と比較検討した。第 1、2 章で述べたように、CN^-非存在下では、SiR 野生型の還元は殆ど進行しない。今回は高電位の S46G を使用したので、SiR は基質である亜硫酸や亜硝酸を添加しても効率よく還元できない条件となっている。図 4-4 に 5 mM 亜硫酸、亜硝酸、KCN を加えた場合の SiR 野生型と改変体の還元型のスペクトルを示す。野生型、R193E は、3 つのリガンドについては、それぞれ固有の吸収スペクトルを示した。一方、R193A と K276Q は野生型と異なり、リガンドが存在するしないに関わらず、一定の還元スペクトルを示した。これは改変体のシロヘムが、リガンドの配位によって影響を受けないような性質を持ったことを示唆している。

Fd との分子間電子移動の比較

第 2 章では、Fd 野生型に比べて、S46G は SiR に対する電子伝達が遅いことは NADPH/FNR/Fd を用いた還元型スペクトルの測定とパルスラジオリシスによって確かめた。これは S46G の還元電位が SiR の補欠分子よりも遙かに高いことが、原因であると解釈した。Fd 野生型と S46G による SiR 改変体の還元速度を比較し、図 4-5 に示した。SiR 野生型と R193E は、Fd 野生型によってより速く還元された。しかし驚いたことに R193A と K276Q の場合は、S46G の方が、野生型 Fd より明らかに速く SiR を還元した。このことは、R193A と K276Q の[4Fe-4S]クラスターとシロヘムの酸化還元電位が変動し、Fd-SiR の分子間または SiR の分子内の電子移動に影響したものと推測した。そこで、改変体のレドックス特性が変化して

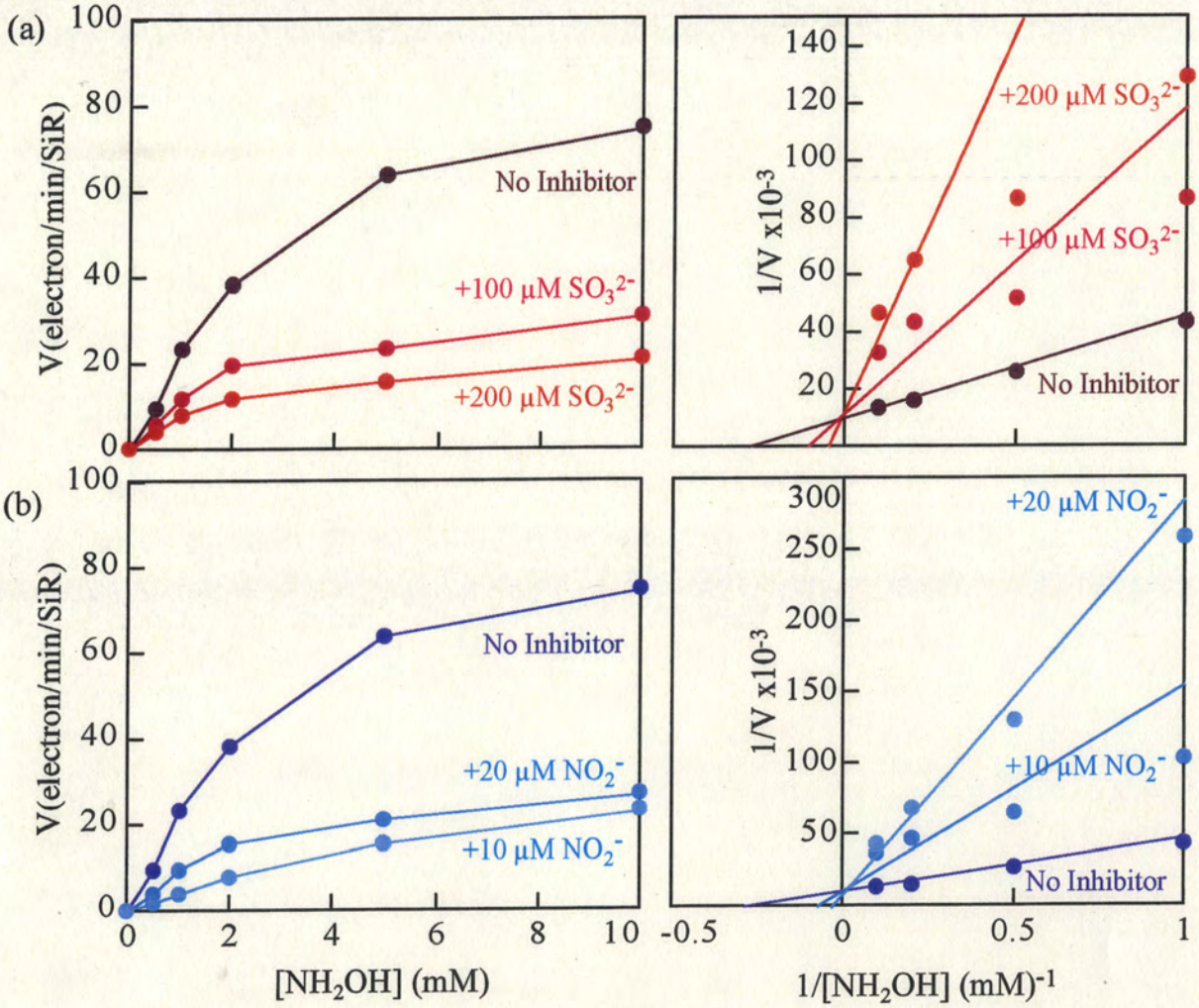


図4-3 SiR改変体ヒドロキシルアミン活性の
亜硫酸、亜硝酸による阻害

S46G存在下でK276Qのヒドロキシルアミン活性に対する亜硫酸(a)、亜硝酸(b)による阻害効果を示す。反応液組成は、25 mM *K*-Pi, pH 7.5、10 μM S46G、80 nM K276Q、10 nM FNR、1 mM NH_2OHである。温度条件25 °Cで、各濃度の阻害剤と200 μM NADPHを加え反応開始した。両逆数プロットから亜硫酸、亜硝酸のヒドロキシルアミン還元活性に対する競合的阻害が認められた。阻害定数K_iはそれぞれ52 μM、3.7 μMと算出された。

表4-1 SiR改変体のヒドロキシルアミン還元活性
に対する亜硫酸、亜硝酸の阻害定数

	SO_3^{2-}	NO_2^-
	K_i (μM)	K_i (μM)
WT	3.5	75
R193E	11900	64
R193A	1300	2.3
K276Q	52	3.7
K278N	1600	29

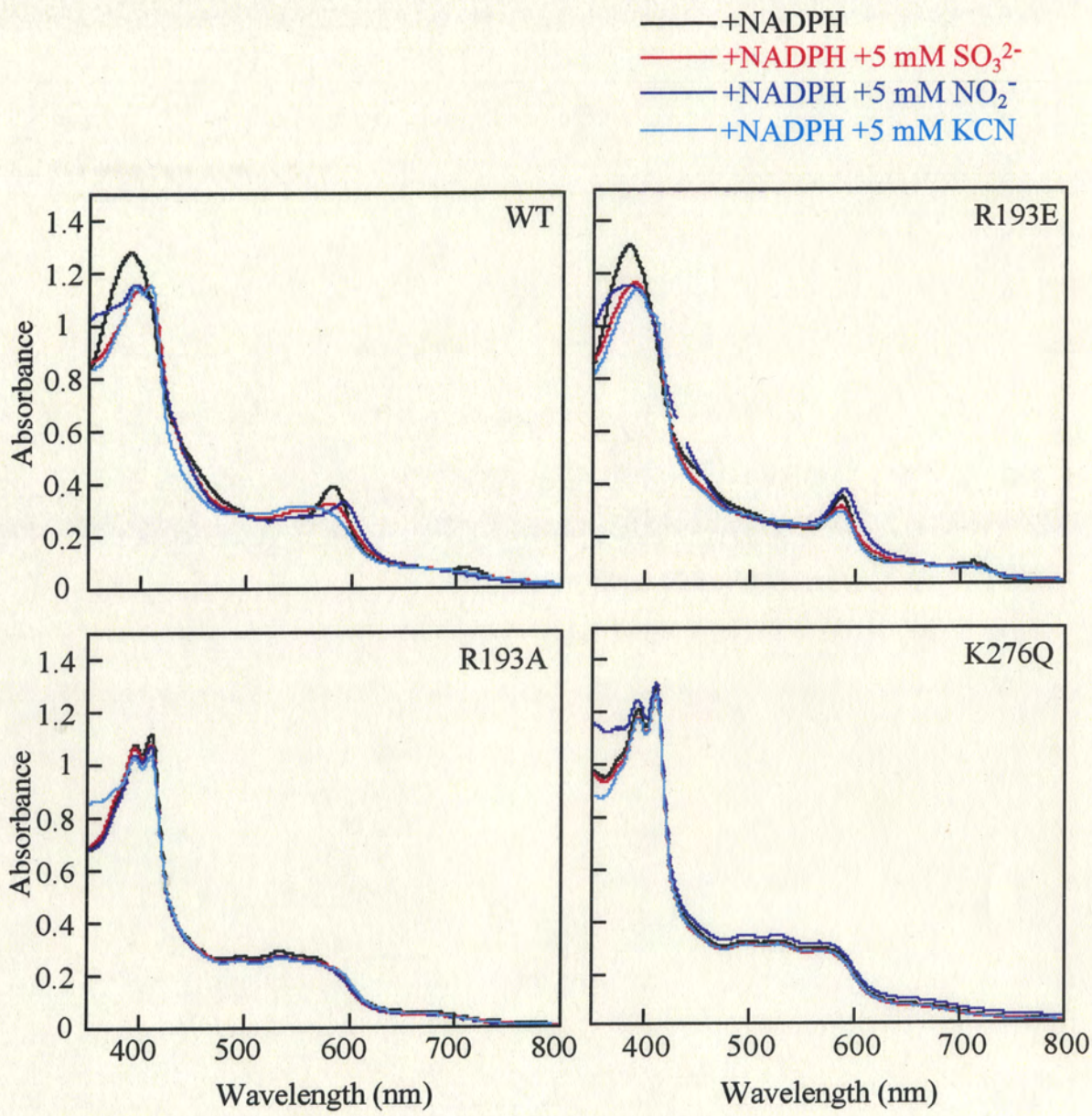


図4-4 SiR野生型及び改変体のリガンドよる
還元型吸収スペクトルの変化
それぞれ5 mM の亜硫酸、 亜硝酸、KCN存在下での
各SiRのNADPH/FNR/Fdによる還元型スペクトルを
示した。反応条件は図1-8と同じである。

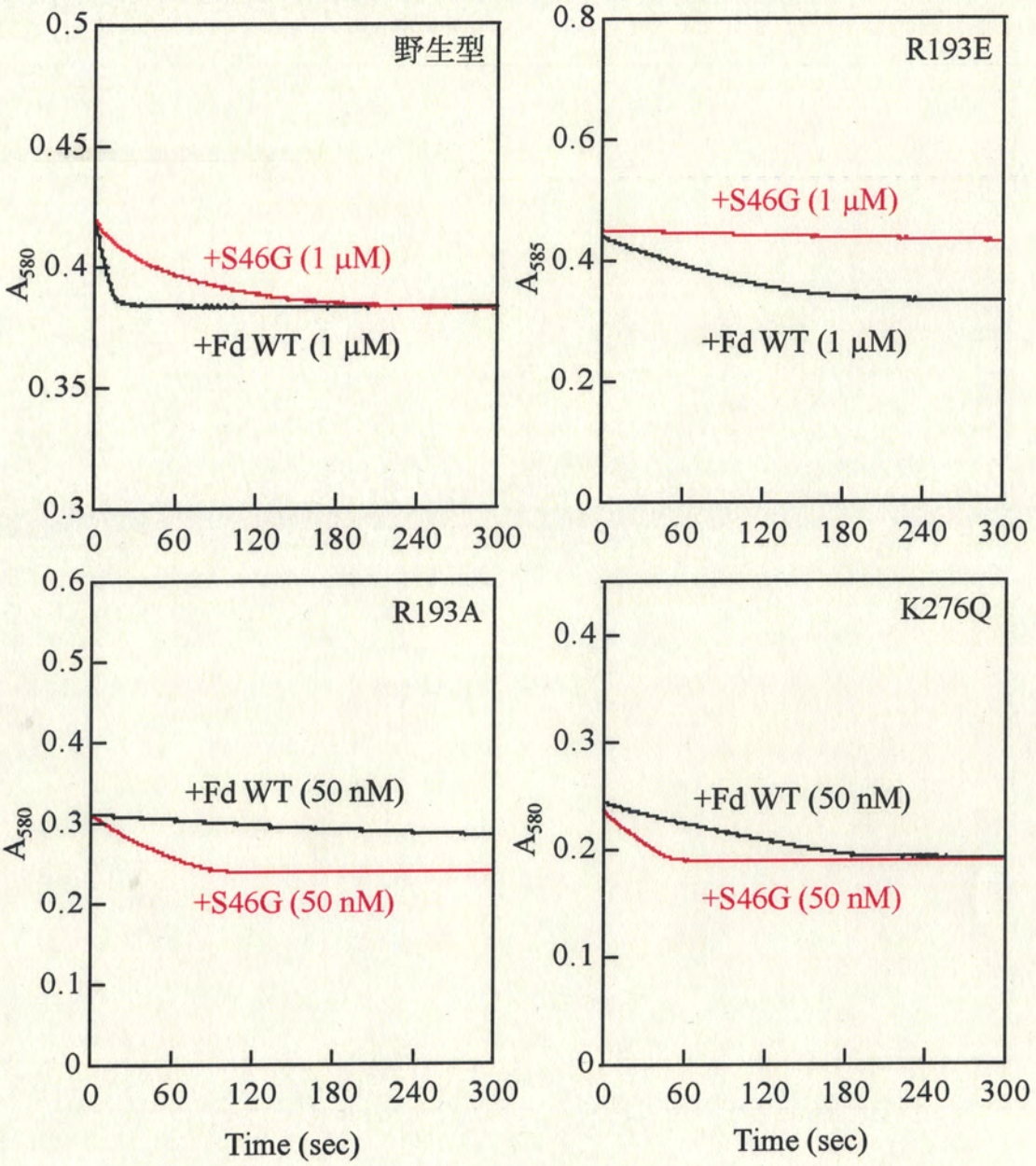


図4-5 Fd野生型またはS46GによるSiRの還元の時間経過
5 mM KCN存在下でS46GとFd野生型によってSiR野生型と改変体を還元した。それぞれのFdによる還元速度の違いを経時変化として示す。反応条件は図1-8と同じである。野生型とR193Eの還元には1 μMの、R193AとK276Qの還元には50 nMのFdを加えて測定を開始した。R193Eは585 nmで、その他のSiRは580 nmの固定波長で測定した。

いるかどうかパルスラジオ解析によって確認した(図 4-6)。その結果、野生型及び R193A の k_{obs} はそれぞれ 551 S^{-1}、1805 S^{-1} と算出された。R193A では、Fd から SiR への電子移動はミリ秒オーダーで起きていたが、R193E では、k_{obs} は 18.9 S^{-1} と算出され、SiR への電子移動は非常に遅いことが確かめられた。さらにサンプリング時間 5 mS での測定の結果、R193E は秒のオーダーで SiR を還元することが判明した。

考察

SiR 改変体の基質親和性およびレドックス特性を調べるため、高電位 Fd S46G を用いた解析を行った結果、SiR の酸化還元中心の特性や分子内電子移動に関して興味ある新規データが得られた。

改変体の亜硫酸活性の低下の原因は、改変体の種類によって様々に異なると思われる。R193E では亜硫酸に対する親和性が大幅に低下したことが原因と考えられた。一方、R193A と K278N ではある程度の親和性を保持していたので、亜硫酸に対する親和性の低下と併せて還元機能の低下が考えられた。ただし、R193A と K278N は亜硝酸に対する活性が検出できたので、これらの活性中心では、亜硫酸の S-O 結合は還元できなくとも、亜硝酸の N-O 結合の解裂には問題のない構造は維持されていると思われる。また K276Q は、亜硫酸、亜硝酸には高親和性を示すが、両基質の還元活性がなく、活性中心が基質の種類に関わり無く還元反応を進行できない状態になっていると結論した。これらの結果は、SiR は亜硫酸と亜硝酸の結合を識別できる活性中心構造を持つこと、各基質に特異的な還元反応を進行できるように分子構造が備わっていること、そして、その構造特性は 1 残基の塩基性アミノ酸側鎖の改変でダイナミックに変化することを、実験的に初めて証明するものである。

SiR 野生型と R193E は各種リガンドの結合によって還元型スペクトルは異なっていた。これはシロヘム鉄の電位状態やスピン状態が、結合する配位子に依存して変化したことが考えられる。また、野生型と R193E の還元は CN^- の添加によっ

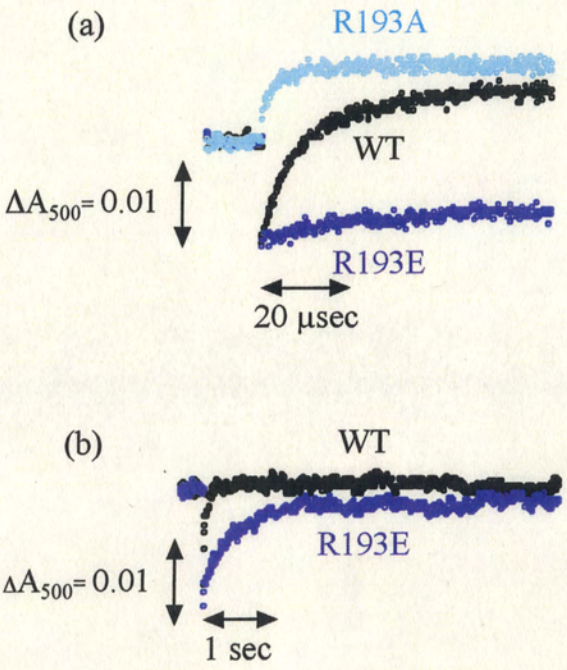


図4-6 パルスラジオリシスによる
Fd–SiR改変体への電子移動

5 mM KCN存在下でのSiR改変体とFd間の電子移動を測定した。反応条件は図2-6と同じである。サンプリング時間50 μsecの測定では(a)、k_{obs}は野生型とR193Aでそれぞれ551 S^{-1}、1805 S^{-1}、R193Eでは18.9 S^{-1}と算出された。サンプリング時間5 msecの測定では、R193Eは秒オーダーの電子移動によって還元されることが判明した(b)。

て促進された。これは第1章の考察でも述べたが、CN^-がシロヘム鉄に対し、強いπ電子受容能を持ち、ヘムの電位を上げるためかも知れない。実際に、大腸菌 SiR ßサブユニットの酸化型とCN^-との複合体では、シロヘムの電位は-340 mV から-155 mV に、[4Fe-4S]クラスターの電位は-405 mV から-490 mV へと、それぞれ変化し(Siegel *et al*, 1982)、植物 SiR でもCN^-の配位によって同様の効果があることが考慮できる。NADPH 再生システムによって反応溶液中の還元電位は一定に保たれるので、KCN は SiR の補欠分子がより還元され易い状態を惹起したと推察した。一方、R193A と K276Q では亜硫酸、亜硝酸、CN^-などのリガンドの添加による特異的なスペクトル変化は観察されなかった。その一方、これらの酵素は CN^-の有無に関わらず、SiR 野生型などに比べ、NADPH/FNR/Fd 還元系によって著しく還元されやすい現象が見られた。このことから、R193A と K276Q の両改変体では、亜硫酸や亜硝酸、CN^-の様な π 電子受容性リガンドと相互作用しても補欠分子の電子状態の変化が誘起されないある種の基底状態になっており、配位子の結合によるヘム鉄のスピン状態や電位の変化が起きなかったと結論した。他の酸化還元酵素の研究でも、活性中心近傍の特定のアミノ酸改変によって電位やスペクトルの著しい変化が起こるという報告がされている(Adak *et al.*, 2001, Miller *et al.*, 2000)。これまで述べてきた S46G も、[2Fe-2S]クラスター近傍の Ser を改変することによって、Fd の電位が大きく影響を受けたもので、金属中心を取り巻く蛋白質構造が時としてその酸化還元状態を大きく左右しうることが知られている。SiR の場合でも、シロヘム周辺の塩基性残基はそのレドックスを左右する構造要因であると考えられ、今後はこれをさらに詳しく検証するため、電気化学的な研究手法と transient kinetics を組み合わせた解析を考えている。

R193A と K276Q が高電位の S46G によって速く還元される現象は、これらのシロヘムまたは鉄硫黄クラスターの電位変化によるものと推測できる。すなわち、S46G による還元では、改変体のシロヘムの電位上昇によって以下に述べるように SiR 分子内に通常とは異なる電子経路が誘起されたというものである。Fd-SiR 複合体において、通常は[2Fe-2S]クラスターから[4Fe-4S]クラスター、シロヘムに至る電子移動が起きる。しかし、S46G と R193A または K276Q の複合体では、S46G の[2Fe-2S]クラスターと SiR の[4Fe-4S]クラスター間の大きな逆電位差が障壁とな

り、電子は[4Fe-4S]クラスターを介せず直接シロヘムに伝達される経路が利用される(図 4-7)。無論、通常の電子ルートが完全に遮断されたとも限らないが、S46Gからの電子移動は、主に[2Fe-2S]クラスター-シロヘムによるルートがドミナントになっていると思われる。おそらくこの第 2 ルートによるシロヘム還元は 1 電子ずつによって、しかも緩慢に行われるしかないが、2 章でも述べたように、ヒドロキシルアミンの N-OH 結合は 1 電子還元によって解離する可能性もあるのでS46G によっても十分駆動できる。今後、SiR の酵素反応過程に対応する微小時間での Fd と SiR のレドックス状態を詳しく解明できれば、基質還元と電子移動の関係をより深く理解できるだろう。

今研究から、SiR と NiR は分子進化上共通の祖先型酵素から分岐し、無機イオンの酸素原子の活性化に必要な[4Fe-4S]クラスターとシロヘム、繰り返し構造は共通に保持するが、それぞれに特有の基質認識や分子活性の違いは、酵素特異的に最適化された構造が後天的に出現してもたらされたと仮定できる。これを証明するには、SiR と NiR のそれぞれの詳細な立体構造解析を進めて比較し、これに併せて蛋白質工学を応用した酵素学的解析を行うことが得策であろう。

植物における硫黄と窒素の無機物代謝系の間には、互いの代謝反応物による調節、制御機構が生理学的に調べられている。SiR と NiR は異なる代謝系で機能しているにも関わらず、これらはお互いによく似た酵素分子であり、これらの特性差違を決定する要因を調べることは、無機物代謝系間の相互関係に新たな視点をもたらすものと考えている。またここ数年、植物の無機硫黄同化系は、これに関与する主要な酵素や蛋白質について、分子レベルでの解析が活発に行われている(Takahashi *et al.*, 1999; Kopriva *et al.*, 2001b)。昨年も、植物ではこれまで長く不明であった亜硫酸酸化酵素(sulfite oxidase: SO)が *Arabidopsis* ペルオキシソームに存在することが明らかとなり(Eilers *et al.*, 2001)、これは細胞内の余分な亜硫酸の無毒化に関与していると思われる。このように、SiR が関与する同化代謝のみ成らず、SO等が関わるとされる分解系を含め、植物内での硫黄循環についての研究がさらに発展し、その全容が解明されることを期待している。

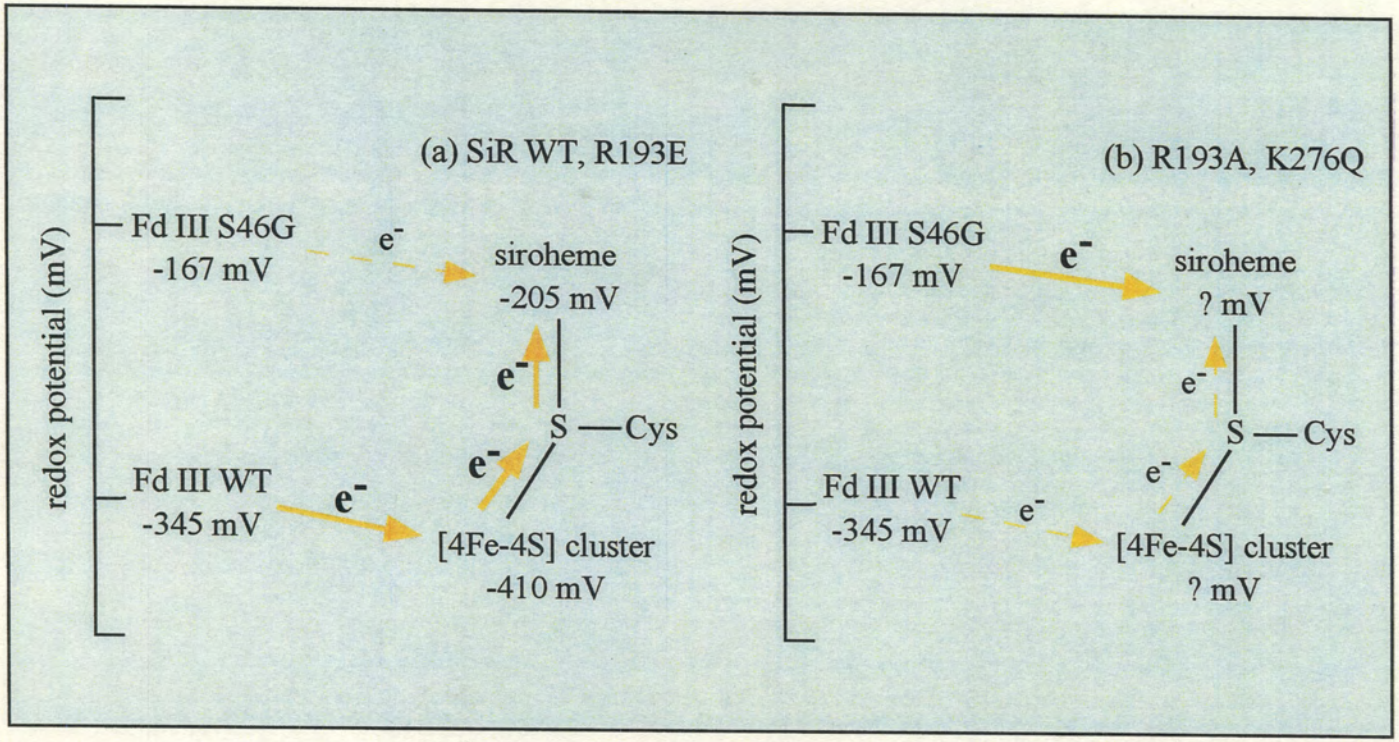


図 4-7 Fd野生型とS46Gを電子供与体とした時のSiR酸化還元中心への電子移動
第4章の結果から、SiR改変体は野生型FdよりもS46Gによって速く還元されることが判明した。この現象を論理的に解釈するために、R193AとK276Qでは通常とは異なる電子移動が行われると仮定した。野生型SiRとR193Eの場合は、電子はFdから[4Fe-4S]クラスター、シロヘムへと移動するが(a)、R193AとK276Qでは、電子はFdから直接シロヘムに移動する(b)。R193AとK276Qの改変体の正確な標準酸化還元電位は不明であるが、補欠分子族の電位変化によってこのような電子移動経路が生じると推察している。

実験方法

材料

制限酵素は主に New England Biolabs、東洋紡から購入した。化学試薬、蛋白質精製用樹脂、酵素等は半井化学、和光純薬、Amersham Pharmacia Biotech、Tosoh、Difco、同仁堂、Sigma、オリエンタル酵母から購入した。ホウレンソウは地元のスーパーから購入した。トウモロコシ緑葉は液体窒素中で凍結破砕したものを使用した。

SiR 組換体発現プラスミドの構築

SiR 組み換え体発現プラスミドは、図 1-1、図 1-2 に示す方法で構築した。トウモロコシ緑葉(*Zea mays* L. cv. Golden Cross Bantam T-51)からクローニングした SiR cDNA を、制限酵素 *Pst* I と *Bam* HI で消化し、それぞれ 691 bp と 1316 bp の前半部、後半部の DNA 断片を得た。後半部の DNA は大腸菌発現ベクターpTrc99A (Amersham Pharmacia Biotech)に直接サブクローニングした。一方、前半部は、SiR の組換え体を成熟体サイズとして truncate するため、53 番目の Ala からコードする領域を表 1 に示した制限酵素 *Nco* I のサイトを持つセンスプライマーp-17 とアンチセンスプライマーp-5 を組み合わせ、PCR を行った。この DNA 断片を *Pst* I と *Nco* I で消化して 438 bp の断片にし、pTrc99A ベクターにクローニングした。M17/99A と名付けたこのベクターは、下に述べる CysG 発現プラスミドと繋ぎ合わせるため、*Xba* I と *Sca* I によって消化した。*Xba* I 切断面はヌクレオチドを filled-in し平滑末端にした。最終的に組換え体は、N 末の約 50 残基の葉緑体輸送シグナル配列を持たない、分子量 64800 の蛋白質として発現する。

大腸菌 DNA を鋳型とし、CysG のコード遺伝子を、*Nco* I サイトを持つセンスプライマーと *Bam* HI サイトを持つアンチセンスプライマーを組み合わせて PCR を行い、全長 DNA を増幅した。PCR 産物は *Nco* I と *Bam* HI で消化して pTrc99A

に組み込み、これを CysG/pTrc99A ベクターとした。CysG/pTrc99A は、マルチクローニングサイトの *Pst* I を無くすために *Bam* HI と *Hind* III とで消化した後、mung bean nuclease 処理して平滑末端を作り、自己ライゲーションさせてベクター CysG/9K とした。CysG/9K は平滑末端を形成する *Eco* RV と *Sca* I で制限酵素消化し、M17/99A の平滑末端/*Sca* I 消化断片と共にライゲーションした。トウモロコシ SiR と大腸菌シロヘム合成酵素の共発現プラスミド M17G を得た。

培養条件

大腸菌 Y1090 (ΔpMc9)株を SiR 発現プラスミド M17G で形質転換した。50 μg/ml の ampicilin を含む 100 ml を Luria-Broth 液体培地で一晩培養した種菌を、100 μM $FeSO_4$ と 50 μg/ml ampicilin を添加した 2x YT 液体培地 8 L に移した。37 °C で 2 時間培養した後、27 °C まで冷却した。終濃度 1 mM の IPTG 存在下でさらに 8〜12 時間培養した。菌体は 3,000 xg で 10 分間高速遠心集菌し、-20 °C で冷凍保存した。

Fd セファロース調製

Fd セファロースは、以下のように調製した(Shin and Oshino, 1978)。トウモロコシ Fd I 100 mg は coupling buffer (100 mM $NaHC0_3$, 500 mM NaCl)で透析した。1 mM HCl で膨潤した CNBr-Sepharose 4B® (Pharmacia Amersham Biotech) 30 g を MilliQ で洗浄し、これを Fd I 溶液と混合し、4 °C で一晩カップリングさせた。残存する活性基のブロックと未吸着 Fd の除去も兼ねて、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl で十分に樹脂を洗浄し、これをアフィニティークロマトグラフィー用樹脂とした。

SiR 精製

組換え体 SiR の精製は、図 1-3 に示す方法で行った。菌体を氷冷した懸濁 Buffer 1 (25 mM *K*-Pi, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM PMSF, 1 % (v/v) ß-mercaptoethanol)で懸濁し、氷中で Sonifier model 350® (Brason Sonic Power Company)により、出力 9、50 % duty cycle パルスの条件で、3 分間隔で 5 回、超音波破砕した。菌体破砕液は 4 °C、6,600 xg で 15 分間高速遠心し、上清と沈殿に分けた。Buffer 2 (25 mM *K*-Pi, pH 7.5, 200 mM NaCl)で平衡化した DE52 樹脂(Whatman)

を菌体と同じ体積量加え、十分混ぜた後、miracloth® (Calbiochem)で濾過した。SiR を含む素通り液に飽和濃度 40 %になるように$(NH_4)_2SO_4$ を加え 15 分攪拌した。6,600 xg で 15 分間高速遠心した後、集めた上清は Buffer 3 (25 mM *K*-Pi, pH 7.5, 40 % $(NH_4)_2SO_4$)で平衡化した butyl-Toyopearl® (Tosoh)に吸着させた。洗浄後、SiR を Buffer 2 で溶出し、これを Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia Biotech)で脱塩した。脱塩後のサンプルは DEAE-Toyopearl® (Tosoh)陰イオン交換カラムにかけ、Buffer 4 (25 mM *K*-Pi, pH 7.5, 500 mM NaCl)で直線濃度勾配法によるクロマトグラフィーを行った。SiR 分画は一晩透析した。透析したサンプルは Fd アフィニティーカラムにかけ、Buffer 4 (25 mM *K*-Pi, pH 7.5, 500 mM NaCl)による直線濃度勾配法で溶出した。SiR を飽和硫安濃度 35 %に調製し、Buffer 5 (25 mM *K*-Pi, pH 7.5, 35 % $(NH_4)_2SO_4$)で平衡化した butyl-Toyopearl にかけ、35-0%飽和硫安濃度の直線濃度勾配によって溶出し、最終 SiR 標品は Centriprep® (Amicon, Millipore)で濃縮し、-80 °C で保存した。

SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE は常法に従った(Laemmli, 1974)。ゲル上の蛋白質は PVDF 膜 (Immobilon, Millipore)に移し、トウモロコシ SiR に対するウサギ抗体で免疫染色した(Blake *et al.*, 1984; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 1998)。

Fd、FNR 精製

組換え体 Fd III (Akashi *et al.*, 1999; Matsumura, 1996)、トウモロコシ非光合成型 FNR (Onda *et al.*, 2000)の調製は既存の方法に従った。

紫外・可視吸収スペクトル、CD スペクトル

可視吸収スペクトルは UV-vis 分光光度計 UV-2500 (Shimadzu)で測定した。SiR、FNR、Fd の各濃度は、それぞれモル分子吸光計数ε_{587} = 17,800 cm^{-1} M^{-1}、ε_{459} = 9,400 cm^{-1},M^{-1}で、ε_{422} = 9,680 cm^{-1} M^{-1}で計算した。SiR 野生型及び改変体の CD スペクトルは、J-720 WI spectropolarimeter (JASCO)で解析した。サンプルは 25 mM *K*-Pi, pH 7.5 の buffer に溶かし、終濃度を 0.2 mg/ml に調製し、紫外部領域で測定した。

システイン合成酵素(CSase)精製

システイン合成酵素(CSase)は、トウモロコシ緑葉の凍結粉末約 1 kg から精製した(Yamaguchi *et al.*, 1998)。

SiR 酵素活性 1-CSase との共役による測定

CSase による SiR の活性測定は、以下の方法で行った(Okada, 1991; von Arb and Brunold, 1983)。これは SiR の還元産物である S^{2-}を OAS 存在下で CSase によって L-システインに変換し、定量する方法である。反応液は全量 300 µl で、組成は 100 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 20 µM Fd III (または 0.6 mM MV)、1 mM Na_2SO_3、150 nM SiR、4 mU CSase、8 mM $Na_2S_2O_4$、12.5 mM OAS である。また Fd の還元には $Na_2S_2O_4$ と、別の還元系として 2 µM FNR と 2 mM NADPH を用いた。$Na_2S_2O_4$ または NADPH を加えて反応を開始し、30 °C で 10 分反応させた後、TCA で反応を停止した。生成した L-システイン量をニンヒドリン反応によって定量した。570 nm の吸光度における L-システイン検量線から、SiR 活性を算出した。上記の条件で 1 分間に 1 µmole の S^{2-}を生成する酵素、1 U として定義した。

SiR 酵素活性 2-Fd/FNR を利用した NADPH 酸化モニターによる測定

SiR 活性測定を、Fd III、FNR 存在下で NADPH の酸化をモニターする方法で測定した(Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2000)。全量 600 µl の反応溶液は 80 nM SiR、10 nM FNR、10 µM Fd、25 mM *K*-Pi, pH 7.5 とした。25 °C で、200 µM の NADPH の添加によって反応を開始した。NADPH の $NADP^+$への酸化を 340 nm の吸収で 60 秒間モニターした。酵素反応初速度は、実測データを一次微分して外挿して得た。各基質に対する K_m および k_{cat} は、Linweber-Bark 型プロットから計算した。以降の SiR 改変体、NiR の活性測定は同様の方法に従った。

NADPH 再生系による SiR 還元

上記の NADPH/FNR/Fd 還元系に G6P/G6PDH の NADPH 再生系を付加した(Oji *et al.*, 1985; Jin *et al.*, 1998)。この反応液の組成は、25 mM *K*-Pi, pH 7.5、20 µM SiR、200 µM FNR、50 µM NADPH、5 mM KCN、5 mM G6P、0.5 U G6PDH である。1 µM Fd

の添加によって SiR の還元を開始し、吸収スペクトル変化を数分間観察した。

パルスラジオリシス

パルスラジオリシス実験は大阪大学・産業科学研究所、電子線加速器施設で行った(Kobayashi *et al.*, 1998; Akashi, 1998)。パルス幅とエネルギーはそれぞれ 8 ns と 27 MeV に設定した。光路長 1 cm の石英セルにサンプル(12.5 mM *K*-Pi, pH 7.5, 30 μM Fd, 30 μM SiR, 0.1 M *tert*-buthanol)を入れ、ワクチンキャップでしっかりと栓をし、アルゴンガスを置換しながらセルを脱気した。150 W のハロゲン及び 1 kW クセノンランプを光源として用いた。透過光の強度は、Nikon モノクロメーターと R-928 フォトマルチプライヤー、Unisoku データ解析システムを組み合わせた高速分光システムによって解析、モニターした。この条件下では、主なラジカル化学種である水和電子(e_{aq}^-)、[OH•, H•]が、Fd を速やかに還元する。Fd から SiR への電子伝達速度は、IgorPro® (WaveMetrics, Inc.)を用いて curve fitting し、それぞれの k_{obs} として算出した(Akashi, 1998)。

NiR の精製、酵素学及び分光学的的解析

NiR 精製は、文献の方法に従った(Kamin and Vega, 1977)。NiR 活性は次のように測定した。反応液組成は、68 mM Tris-HCl, pH 7.0、1.8 mM $NaNO_2$、0.68 mM MV、19.5 mM $Na_2S_2O_4$ で全量 600 ml に調製した。$Na_2S_2O_4$ を加えて反応を開始し、25 °C で 30 分反応させた後、反応液 10 μl を 1 ml の MilliQ に入れ、激しく撹拌して反応停止した。これに 0.5 ml の 1 % sulfanilamide (3N HCl に溶かしたもの)、0.5 ml の 0.02 % *N*-(1-naphthyl) ethylendiamine hydrochloride (NNED)を加え激しく撹拌し、30 分後に 450 nm の吸収を測定し、残存する NO_2^- 量を定量した。

トウモロコシ SiR 活性中心への部位特異的変異導入

SiR 改変体発現プラスミドは、基本的に文献の方法に従った(Reidhaar-Olson and Sauer, 1988)。作製に用いた合成オリゴヌクレオチドプライマーは表 4-1 に示した。これらのアンチセンスプライマーは、共通プライマーである p-17 と組み合わせ、トウモロコシ緑葉から抽出した SiR の cDNA を鋳型にして PCR を行った。Arg-193

の改変は、図 4-3 に示す方法で行った。アンチセンスプライマーp-51、p-52、p-53 は、193 番目の Arg をそれぞれ Gln、Glu、Ala へと置換する。PCR 条件は以下の通りである。1 回目のサイクルは、変性を 95 °C で 2 分、アニールを 55 °C で 1 分、伸長を 75 °C、90 秒で、続く 24 回のサイクルを、変性を 95 °C で 1 分、 アニールを 55 °C で 1 分、伸長を 75 °C、90 秒で行った。増幅した DNA 断片は *Nco* I と *Pst* I で消化した。得られた 438 bp の断片は pTrc99A の *Nco* I/*Pst* I 断片とライゲーションし、さらに *Apa* I と *Pst* I とで制限酵素消化後、1263 bp の DNA 断片を得た。変異導入された DNA 断片は、SiR ベクターM17G の *Apa* I/*Pst* I 断片とライゲーションし、SiR 改変体発現プラスミドを得た。これら Arg-193 改変 SiR 発現プラスミドをそれぞれ M51G、M52G、M53G と名付けた。Lys-276、Lys-278 の改変は図 4-4 に示した。アンチセンスプライマーp-54 と p-42 はそれぞれ Lys を Gln へ、p-41 は Asn へ、また p-43 と p-44 は、Lys をそれぞれ Glu、Ala へと置換するのに利用した。PCR は、Arg-193 改変と同様の条件で行った。PCR 産物は *Pst* I/*Bst* EII によって消化し、同じく *Pst* I/*Bst* EII 消化したサブクローン用ベクター、pTrc PB 断片とライゲーションした。pTrc PB は、*Sal* I サイトを導入する為に作られた、SiR cDNA の *Afl* II/*Bam* HI 断片を含む pTrc99A ベクターである。SiR 改変体 DNA を組み込まれた pTrc PB サブクローンベクターを *Pst* I/*Sal* I 消化し、852 bp の断片を得、M17G の *Pst* I/*Sal* I 断片とライゲーションした。得られた改変体発現プラスミドはそれぞれ M54G、M42G、M41G、M43G、M44G と名付けた。

SiR DNA への変異導入は、DNA シークエンサー(Perkin Elmer Applied Bioscience System 373A)を用いて、Thermosequenase (Amershame Pharmacia Biotech)によるダイターミネーター法で確認した。

参考文献

Adak S., Santolini J., Tikunova S., Wang Q., Johnson JD., Stuehr DJ. (2001) Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 --> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *J. Biol. Chem.* **276**: 1244-1252

Akashi T. (1998) Analysis of the intermolecular electron transfer reaction between plant ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes. Ph. D. Thesis, University of Osaka.

Akashi T., Matsumura T., Ideguchi T., Hase T. (1997) Mutational analysis of the redox properties of the [2Fe-2S] cluster in plant ferredoxins. *J. Inorg. Biochem.* **67**: 255

Akashi T., Matsumura T., Ideguchi T., Iwakiri K., Kawakatsu T., Taniguchi I., Hase T. (1999) Comparison of the electrostatic binding sites on the surface of ferredoxin for two ferredoxin-dependent enzymes, ferredoxin-$NADP^+$ reductase and sulfite reductase. *J. Biol. Chem.* **274**: 29399-29405

Aketagawa J., Tamura G. (1980) Ferredoxin-sulfite reductase from spinach. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2371-2378

Alonso JM., Chamarro J., Granell A. (1995) A non-photosynthetic ferredoxin gene is induced by ethylene in *Citrus* organs. *Plant Mol. Biol.* **29**: 1211-1221

Aparicio PJ., Knaff DB., Malkin R. (1975) The role of an iron-sulfur center and siroheme in spinach nitrite reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **169**: 102-107

Arizmendi JM., Serra JL. (1990) Purification and some properties of the nitrite reductase from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1040**: 237-244

Arnon DI. (1987) The discovery of ferredoxin: the photosynthetic path. *Trends Biochem. Soc.* 13: 30-33

Asada K., Tamura G., Bandurski RS. (1969) Methyl viologen-linked sulfite reductase from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* **244**: 4904-4915

Back E., Burkhart W., Moyer M., Privalle L., Rothstein S. (1988) Isolation of cDNA clones coding for spinach nitrite reductase: complete sequence and nitrate induction. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 20-26

Beale SI. (1996) Biosynthesis of hemes. in *Escherichia coli and Salmonella typhymurium. Cellular and Molecular Biology.* (Neidhardt *et al.*, eds.) Vol. 1, pp. 731-748 American Society for Microbiology, Washington, DC.

Bick J-A., Leustek T. (1998) Plant sulfur metabolism. The reduction of sulfate to sulfite. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 240-244

Blake MS., Johnston KH., Russel-Jones GH., Gotschlich EC. (1985) A rapid , sensitive method for detection of alkaline phosphatase conjugated anti-antibody on Western blot. *Anal. Biochem.* **136**: 175-179

Bork C., Schwenn JD., Hell R. (1998) Isolation and characterizasion of a gene for assimilatory sulfite reductase from *Arabidopsis thaliana. Gene* **212**: 147-153

Bowsher CG., Boulton EL., Rose J., Nayagam S., Emes MJ. (1992) Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant J.* **2**: 893-898

Bowsher CG., Hucklesby DP., Emes MJ. (1989) Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pinus sativum* L. *Planta* **177**: 359-366

Brühl A., Haverkamp T., Gisselmann G., Schwenn JD. (1996) A cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* encoding plastidic ferredoxin:sulfite reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1295**: 119-124

Brunold C., Suter SM. (1989) Localization of enzymes of assimilatory sulfite reduction in pea root. *Planta* **179**: 228-234

Cammack R., Jackson RH., Cornish-Bowden A., Cole JA. (1982) Electron-spin-resonance studies of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* **207**: 333-339

Chang CK., Hanson LK., Richardson PF., Young R., Fajer J. (1981) π cation radicals of ferrous and free base isobacteriochlorins: models for siroheme and sirohydrochlorin. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* **78**: 2652-2656

Chang CK., Fajer J. (1980) Models of siroheme and sirohydrochlorin. π cation radicals of iron (II) isobacteriochlorin. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 848-851

Choudhury K., Sundaramoorthy M., Mauro JM., Poulos TL. (1992) Conversion of the proximal histidine ligand to glutamine restores activity to an inactive mutant of cytochrome *c* peroxidase. *J. Biol. Chem.* **267**: 25656-25659

Christner JA., Janick PA., Siegel LM., Munck E. (1983) Mössbauer studies of *Escherichia coli* sulfite reductase complexes with carbon monoxide and cyanide. Exchange coupling and intrinsic properties of the [4Fe-4S] cluster. *J. Biol. Chem.* **258**: 11157-11164

Cline JF., Janick PA., Siegel LM., Hoffmann BM. (1986) ^{57}Fe and ^{1}H electron-nuclear double resonance of three doubly reduced states *Escherichia coli* sulfite reductase. *Biochemistry* **25**: 4647-4654

Cline JF., Janick PA., Siegel LM., Hoffmann BM. (1985) Electron-Nuclear resonance studies of oxidized *Escherichia coli* sulfite reductase: ^{1}H, ^{14}N, and ^{57}Fe measurements. *Biochemistry* **24**: 7942-7947

Cobbett CS. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**: 825-832

Crane BR., Getzoff ED. (1996) The relationship between structure and function for the sulfite reductases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**: 744-756

Crane BR., Siegel LM., Getzoff ED. (1995) Sulfite reductase structure at 1.6 Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions. *Science* **270**: 59-67

Crane BR., Siegel LM., Getzoff ED. (1997b) Probing the catalytic mechanism of sulfite reductase by X-ray crystallography: structures of *Escherichia coli* hemoprotein in complex with substrates, inhibitors, intermediates, and products. *Biochemistry* **36**: 12120-12137

Crane BR., Siegel LM., Getzoff ED. (1997a) Structures of siroheme- and Fe_4S_4-containing active center of sulfite reductase in different states of oxidation: heme activation via reduction-gated exogeneous ligand exchange. *Biochemistry* **36**: 12101-12119

Curdt I., Singh BB., Jakoby M., Hachtel W., Böhme H. (2000) Identification of amino acid residues of nitrite reductase from *Anabaena* sp. PCC 7120 involved in ferredoxin binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**: 60-68

Day EP., Peterson J., Bonvoisin JJ., Young LJ., Wilkerson JO., Siegel LM. (1988) Magnetization of the sulfite and nitrite complexes of oxidized sulfite and nitrite reductases: EPR silent spin S = 1/2 states. *Biochemistry* **27**: 2126-3132

Dawson JH. (1988) Probing-structure-function relations in heme-containing oxygenase and peroxidase. *Science* **240**: 433-439

Dose MM., Hirasawa M., Kleis-SanFrancisco S., Lew EL., Knaff DB. (1997) The ferredoxin-binding site of ferredoxin: nitrite oxidoreductase. Differential chemical modification of the free enzyme and its complex with ferredoxin. *Plant Physiol.* **114**: 1047-1053

Eilers T., Schwarz G., Brinkmann H., Witt C., Richter T., Nieder J., Koch B., Hille R., Hansch R., Mendel RR. (2001) Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J. Biol. Chem.* **276**: 46989-46994

Eschenbrenner M., Covés J., Fontecave M. (1995b) NADPH-sulfite reductase flavoprotein from *Escherichia coli*: contribution to the flavin content and subunit interaction. *FEBS Lett.* **374**: 82-84

Eschenbrenner M, Covés J, Fontecave M. (1995a) The flavin reductase activity of the flavoprotein component of sulfite reductase from *Escherichia coli*. A new model for the protein structure. *J. Biol. Chem.* **270**: 20550-20555

Faeder EJ., Davis PS., Siegel LM. (1974) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. V. Studies with the *Escherichia coli* hemoflavoprotein depleted of flavin mononucleotide: distinct roles for the flavin adenine dinucleotide and flavin mononucleotide prosthetic groups in catalysis. *J. Biol. Chem.* **249**: 1599-1609

Fishbein WN. (1966) Determination of hydroxylamine with Nessler reagent. *Anal. Chim. Acta* **37**: 484-489

Foyer CH., Theodoulou FL., Delrot S. (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci.* **10**: 486-492

Fry IV., Cammack R., Hucklesby DP., Hewitt EJ. (1980) Stability of the nitrosyl-siroheme complex of plant nitrite reductase. Investigated by EPR spectroscopy. *FEBS Lett.* **111**: 377-380

Gisselmann G., Klausmeier P., Schwenn JD. (1996) The ferredoxin : sulphite reductase gene from *Synechococcus* PCC7942. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**: 102-106

Goldman BS., Roth JR. (1993) Genetic structure and regulation of the *cysG* gene in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **175**: 1457-1466

Gruez A., Pignol D., Zeghouf M., Covés J., Fontecave M., Ferrer JL., Fontecilla-Camps JC. (2000) Four crystal structures of the 60 kDa flavoprotein monomer of the sulfite reductase indicate a disordered flavodoxin-like module. *J. Mol. Biol.* **299**: 199-212

Gruez A., Zeghouf M., Bertrand J., Eschenbrenner M., Covés J., Fontecave M., Pignol D., Fontecilla-Camps JC. (1998) The FNR-like domain of the *Escherichia coli* sulfite reductase flavoprotein component: crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**: 135-136

Hase T. (1995) [Iron-sulfur electron transfer protein and assimilation of inorganic compounds in plants.] *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **40**: 282-292

Hase T., Kimata Y., Yonekura K., Matsumura T., Sakakibara H. (1991) Molecular cloning and differential expression of the maize ferredoxin gene family. *Plant Physiol.* 96: 77-83

Heldt HW. (1999) Sulfate assimilation. in *Plant Biology and Molecular Biology* pp. 289-300, Oxford University Press, Oxford.

Hirasawa M., Bick J-A., Nakayama M., Setterdahl AT., Leustek T., Hase T., Knaff DB. (2001) Oxidation-reduction properties of two enzymes involved in reductive sulfite assimilation in plants. in *Proceeding of International Conference of Photosynthesis in Brisbane 2001*: S20-024

Hirasawa M., Proske P., Knaff DB. (1994b) The role of tryptophan in the reaction catalyzed by spinach ferredoxin-dependent nitrite reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**: 80-88

Hirasawa M., Tollin G., Salamon Z., Knaff DB. (1994a) Transient kinetic and oxidation-reduction studies of spinach ferredoxin:nitrite oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1185**: 336-345

Höfgen R. (2001) Manipulation of thiol content in plants. *Amino Acids* **20**: 291-299

Hurley JK., Weber-Main AM., Stankovich MT., Benning MM., Thoden JB., Vanhooke JL., Holden HM., Chae YK., Xia B., Cheng H., Markley JM., Martinez-Julves M., Gomez-Moreno C., Schmeits JL., Tollin G. (1997) Structure-function relationship in *Anabaena* ferredoxin: correlations between X-ray crystal structures, reduction potentials, and rate constants of electron transfer to ferredoxin:$NADP^+$ reductase for site-specific ferredoxin mutants. *Biochemistry* **36**: 11100-11117

Huynh BH., Kang L., DerVartanian DV., Peck HD Jr., LeGall J. (1984) Characterization of a sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris*. Evidence for the presence of a low-spin siroheme and an exchange-coupled siroheme-[4Fe-4S] unit. *J. Biol. Chem.* **259**: 15373-15376

Ideguchi T., Akashi T., Hase T. (1995a) Expression in *E. coli* of sulfite reductase from maize. *Plant Cell Physiol.* **36** (Suppl): S100

Ideguchi T., Akashi T., Onda Y., Hase T. (1995b) cDNA cloning and functional expression of ferredoxin-dependent sulfite reductase from in *E. coli* cells. in *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Mathis, eds.) pp. 713-716, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Janick PA., Rueger DC., Krueger RJ., Barber MJ., Siegel LM. (1983) Characterization of complexes between *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit and its substrates sulfite and nitrite. *Biochemistry* **22**: 396-408

Janick PA., Siegel LM. (1982) Electron paramagnetic resonance and optical spectroscopic evidence for interaction between siroheme and Fe_4S_4 prosthetic groups in *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit. *Biochemistry* **21**: 3538-3547

Jin T., Huppe HC., Turpin DH. (1998) *in vitro* reconstitution of electron transport from glucose-6-phosphate and NADPH to nitrite. *Plant Physiol.* **117**: 303-309

Jones-Mortimer MC. (1968) Positive control of sulphate reduction in *Escherichia coli.* The nature of the pleiotropic cysteineless mutants of *E. coli* K12. *Biochem. J.* **110**: 597-602

Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okumura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe,A., Yamada M., Yasuda M., Tabata S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109-136

Kaufman J., Spicer LD., Siegel LM. (1993) Proton NMR of *Escherichia coli* sulfite reductase: the unligated hemoprotein subunit. *Biochemistry* **32**: 2853-2867

Keaton MA., Cannon GC., Heinhorst S. (2001) cDNA sequence for soybean ferredoxin: sulfite reductase. Accession No. AY017473

Kimata Y., Hase T. (1989) Localization of ferredoxin isoprotein in mesophyll and bundle sheath cells in maize leaf. *Plant Physiol.* **89**: 1193-1197

Knaff DB., Hirasawa M. (1991) Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1056**: 93-125

Kobayashi K., Tsubaki M., Tagawa S. (1998) Distinct roles of two heme centers for transmembrane electron transfer in cytochrome b_{561} from bovine adrenal chromaffin vesicles as revealed by pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* **273**: 16038-16042

Kobayashi K., Yoshimoto A. (1998) Studies on yeast sulfite reductase. IV. Structure and steady-state kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* **705**: 348-356

Kochi T., Mukougawa K., Frankenberg N., Masuda M., Yokota A., Lagarias JC. (2001) The *Arabidopsis* hy2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* **13**: 425-436

Koguchi O., Tamura G. (1989) Isolation and partial characterization of homogeneous ferredoxin-sulfite reductase from a red alga, *Porphyra yezoensis. Agric. Biol. Chem.* **53**: 1653-1662

Koguchi O., Tamura G. (1988) Ferredoxin-sulfite reductase from a cyanobacterium, *Spirulina platensis. Agric. Biol. Chem.* **52**: 373-380

Koprivova A., Melzer M., von Ballmoos P., Mandel T., Brunold C., Kopriva S. (2001b) Assimilatory sulfate reduction in $C_{(3)}$, $C_{(3)}$-$C_{(4)}$, and $C_{(4)}$ species of *Flaveria. Plant Physiol.* **127**: 543-550

Kopriva S., Büchert T., Fritz G., Suter M., Weber M., Benda R., Schaller J., Feller U., Schürmann P., Schünemann V., Trautwein AX., Kroneck PMH., Brunord C. (2001a) Plant adenosine 5'-phosphosulfate reductase is a novel iron-sulfur protein. *J. Biol. Chem.* **276**: 42881-

42886

Kredich NM. (1996) Biosynthesis of cysteine. in *Escherichia coli and Salmonella typhymurium. Cellular and Molecular Biology.* (Neidhardt *et al.*, eds.) Vol. 1, pp. 514-527, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Kurisu G., Kusunoki M., Katoh E., Yamazaki T., Teshima K., Onda Y., Kimata-Ariga Y., Hase T. (2000) Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 117-121

Kronenberger J., Lepingle A., Caboche M., Vaucheret H. (1993) Cloning and expression of distinct nitrite reductases in tobacco leaves and roots. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 203-208

Krueger RJ., Siegel LM. (1982) Spinach siroheme enzymes: isolation and characterization of ferredoxin-sulfite reductase and composition of properties with ferredoxin-nitrite reductase. *Biochemistry* **21**: 2892-2904

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lahners K., Kraner V., Back E., Privalle L., Rothstein S. (1988) Molecular cloning of complementary DNA encoding maize nitrite reductase. *Plant Physiol.* **88**: 741-746

Lancaster JR., Vega JM., Kamin H., Orme-Johnson NR., Orme-Johnson WH., Krueger RJ., Siegel LM. (1979) Identification of the iron-sulfur center of spinach ferredoxin-nitrite reductase as a tetranuclear center, and preliminary EPR studies of mechanism. *J. Biol. Chem.* **254**: 1268-1272

Leustek T., Saito K. (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* **120**: 637-643

Leustek T., Smith M., Murillo M., Pal Singh D., Smith AG., Woodcock SC., Awan SJ., Warren MJ. (1997) Siroheme biosynthesis in higher plants. Analysis of an *S*-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase from *Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem.* **272**: 2744-2752

Lui SM., Cowan JA. (1994) Conformational gating of the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Synthesis, characterization, and stopped-flow kinetics studies of 1, 5-IAEDANS-labeled desulfoviridin. *Biochemistry* **33**: 11209-11216

Lui SM., Soriano A., Cowan JA. (1993) Enzymatic reduction of inorganic anions. Pre-steady-state kinetic analysis of the dissimilatory sulfite reductase (Desulfoviridin) from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Mechanistic implication. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 10483-10486

Luque I., Flores E., Herrero A. (1993) Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant Mol. Biol.* **21**: 1201-1205

Madden JF., Han SH., Siegel LM., Spiro TG. (1989) Resonance Raman studies of *Eschericia coli* sulfite reductase hemoprotein. 2. Fe_4S_4 cluster vibrational modes. *Biochemistry* **28**: 5471-5477

Matsumura T. (1996) Biochemical and cellular analysis for functional differentiation of hifher-plant ferredoxins. Ph. D. Thesis, University of Osaka.

Matsumura T., Kimata-Ariga Y., Sakakibara H., Sugiyama T., Murata H., Takao T., Shimonishi Y., Hase T. (1999) Complementary DNA cloning and characterization of ferredoxin localized in bundle-sheath cells of maize leaves. *Plant Physiol.* **119**: 481-488

Matsumura T., Sakakibara H., Nakano R., Kimata Y., Sugiyama T., Hase T. (1997) A nitrate-inducible ferredoxin in maize roots. Genomic organization and differential expression of two nonphotosynthetic ferredoxin isoproteins. *Plant Physiol.* **114**: 653-660

Macdonald H., Cole J. (1985) Molecular cloning and functional analysis of the *cysG* and *nirB* genes of *Escherichia coli* K12, two closely-linked genes required for NADH-dependent nitrite reductase activity. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 328-334

McRee DE., Richardson DC., Richardson JS., Siegel LM. (1986) The heme and Fe_4S_4 cluster in the crystallographic structure of *Escherichia coli* sulfite reductase. *J. Biol. Chem.* **261**: 10277-10281

Miller GT., Zhang B., Hardman JK., Timkovich R. (2000) Converting a c-type to a b-type cytochrome: Met61 to His61 mutant of *Pseudomonas* cytochrome *c*-551. *Biochemistry* **39**: 9010-9017

Morrison GR. (1971) Microchemical determination of organic nitrogen with Nessler reagent. *Anal. Biochem.* **43**: 527-532

Moura I., Lino AR., Moura JJ., Xavier AV., Fauque G., Peck HD Jr., LeGall J. (1986) Low-spin sulfite reductases: a new homologous group of non-heme iron-siroheme proteins in anaerobic bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**: 1032-1041

Murphy MJ., Siegel LM., Kamin H., Rosenthal D. (1973) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. II. Identificationof a new class of heme prosthetic group: an iron-tetrahydroporphyrin (isobacteriochlorin type) with eight carboxylic acid groups. *J. Biol. Chem.* **248**: 2801-2814

Murphy MJ., Siegel LM., Tove SR., Kamin H. (1974) Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **71**: 612-616

Nakano R., Matsumura T., Sakakibara H., Sugiyama T., Hase T. (1997) Cloning of maize ferredoxin III gene: presence of a unique repetitive nucleotide sequence within an intron found in the 5'-untranslated region. *Plant Cell Physiol.* **38**: 1167-1170

Nakayama M., Akashi T., Hase T. (2000) Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin. *J. Inorg. Biochem.* **82**: 27-32

[No authors listed] (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815

Oji Y., Watanabe M., Wakiuchi N., Okamoto S. (1985) Nitrite reduction in barley root plastids: dependence on NADPH coupled with glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase, and possible involvement of an electron carrier and a diaphorase. *Planta* **165**: 85-90

Okada F. (1991) A study of maize sulfite reductase. Master's Thesis, University of Nagoya.

Ollagnier-de-Choudens S., Mattioli T., Takahashi Y., Fontecave M. (2001) Iron-sulfur cluster

assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J. Biol. Chem.* **276**: 22604-22607

Onda Y., Matsumura T., Kimata-Ariga Y., Sakakibara H., Sugiyama T., Hase T. (2000) Differential interaction of maize root ferredoxin:$NADP^+$ oxidoreductase with photosynthetic and non-photosynthetic ferredoxin isoproteins. *Plant Physiol.* **123**: 1037-1045

Ostrowski J., Barber MJ., Rueger DC., Miller BE., Siegel LM., Kredich NM. (1989b) Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **264**: 15796-15808

Ostrowski J., Wu JY., Rueger DC., Miller BE., Siegel LM., Kredich NM. (1989a) Characterization of the *cysJIH* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. DNA sequences of *cysI* and *cysH* and a model for the siroheme-Fe_4S_4 active center of sulfite reductase hemoprotein based on amino acid homology with spinach nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **264**: 15726-15737

Prodouz KN., Garrett RH. (1981) *Neurospora crassa* NAD(P)H-nitrite reductase. Studies on its composition and structure. *J. Biol. Chem.* **256**: 9711-9717

Raag R., Poulos T. (1989) The structural basis for substrate-induced change in redox potential and spin equilibrium in cytochrome $P\text{-}450_{CAM}$. *Biochemistry* **28**: 917-922

Raux E., McVeigh T., Peters SE., Leustek T., Warren MJ. (1999) The role of *Saccharomyces cerevisiae* Met1p and Met8p in sirohaem and cobalamin biosynthesis. *Biochem. J.* **338**: 701-708

Reidhaar-Olson JF., Sauer RT. (1988) Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* **241**: 53-57

Saito E., Tamura G. (1971) Studies on the sulfite reducing system of algae part II. Purification and properties of the reduced methyl viologen-linked sulfite reductase from a red alga, *Porphyra yezoensis*. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 491-500

Saito K. (2000) Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 188-195

Sakakibara H., Takei K., Sugiyama T. (1996) Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize uroporphyrinogen III methyltransferase, an enzyme involved in the synthesis of siroheme, which is prosthetic group of nitrite reductase. *Plant J.* **10**: 883-892

Sander L., Jensen PE., Back LF., Stummann BM., Henningsen KW. (1995) Structure and expression of a nitrite reductase gene from bean (*Phaseolus vulgaris*) and promoter analysis in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **27**: 165-177

Sato N., Nakayama M., Hase T. (2000) The 70-kDa major DNA-containing protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase. *FEBS Lett.* **487**: 347-350

Schultz DJ., Suh MC., Ohlrogge JB. (2000) Stearoyl-acyl carrier protein and unusual acyl-acyl carrier protein desaturase activities are differentially influenced by ferredoxin. *Plant Physiol.* **124**: 681-692

Schmutz D., Brunold C. (1985) Localization of nitrite and sulfite reductase in bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *Physiol. Plant.* **64**: 523-528

Serra JL., Ibarlucea JM., Arizmendi JM., Llama MJ. (1982) Purification and properties of the assimilatory nitrite reductase from barley *Hordeum vulgare* leaves. *Biochem. J.* **201**: 167-170

Setif P. (2001) Ferredoxin and flavodoxin reduction by photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**: 161-179

Shin M., Oshino R. (1978) Ferredoxin-Sepharose 4B as a tool for the purification of ferredoxin-$NADP^+$ reductase. *J. Biochem. (Tokyo)* **83**: 357-361

Siegel LM. (1965) A direct microdeterminantion for sulfide. *Anal. Chem.* **11**: 126-132

Siegel LM., Davis PS. (1974) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sulfite reductase of enterobacteria. IV. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: subunit structure and dissociation into hemoprotein and flavoprotein components. *J. Biol. Chem.* **249**: 1587-1598

Siegel LM., Davis PS., Kamin H. (1974) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sulfite reductase of enterobacteria. III. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: catalytic parameters and the sequence of electron flow. *J. Biol. Chem.* **249**: 1572-1586

Siegel LM., Murphy MJ., Kamin H. (1978) Siroheme: methods of isolation and characterization. *Methods Enzymol.* **52**: 436-447

Siegel LM., Rueger DC., Barber MJ., Krueger RJ., Orme-Johnson NR., Orme-Johnson WH. (1982) *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit. Prosthetic groups, catalytic parameters, and ligand complexes. *J. Biol. Chem.* **257**: 6343-6350

Sigman JA., Pond AE., Dawson JH., Lu Y. (1999) Engineering cytochrome *c* peroxidase into cytochrome P450: a proximal effect on heme-thiolate ligation. *Biochemistry* **38**: 11122-11129

Smulevich G., Miller MA., Kraut J., Spiro TG. (1991) Conformational change and histidine control of heme chemistry in cytochrome *c* peroxidase: Resonance Raman evidence from Leu-52 and Gly-181 mutants of cytochrome *c* peroxidase. *Biochemistry* **30**: 9546-9558

Spencer JB., Stolowich NJ., Roessner-Scott AI. (1993) The *Escherichia coli* cysG gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase. *FEBS Lett.* **335**: 57-60

Suzuki I., Kikuchi H., Nakanishi S., Fujita Y., Sugiyama T., Omata T. (1995) A novel nitrite reductase gene from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *J. Bacteriol.* **177**: 6137-6143

Takahashi H., Noji M., Saito K. (1999) Molecular regulation and engineering of sulfur transport and assimilation. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **44**: 2291-2298

Takahashi S., Yip WC., Tamura G. (1997) Purification and characterization of ferredoxin-sulfite reductase from turnip (*Brassica rapa*) leaves and comparison of properties with ferredoxin-sullfite reductase from turnip roots. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 1486-1490

Takahashi S., Yoshida Y., Tamura G. (1996) Purification and characterization of ferredoxin-sulfite reductase from leek (*Allium tuberosum*) leaves. *J. Plant Res.* **109**: 45-52

Tamura G. (1976) [Sulfite reductase.] in *Analysis of Plant Enzymes and Proteins. Tanpakushitsu*

Kakusan Kouso Special Edition (Morita *et al.*, eds.) pp. 356-363 Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Tokyo.

Tan J., Soriano A., Lui SM., Cowan JA. (1994) Functional expression and characterization of the assimilatory-type sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Arch. Biochem. Biophys.* **312**: 516-523

Tan J., Cowan JA. (1991) Enzymatic redox chemistry: a proposed reduction pathway for the six-electron reduction of SO_3^{2-} to S^{2-} by the assimilatory-type sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Biochemistry* **30**: 8910-8917

Tan J., Helms LR., Swenson RP., Cowan JA. (1991) Primary structure of the assimilatory-type sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): cloning and nucleotide sequence of the reductase gene. *Biochemistry* **30**: 9900-9907

Taniguchi I., Miyahara A., Iwakiri K., Hirakawa Y., Hayashi K., Nishiyama K., Akashi T., Hase T. (1997) Electrochemical study of biological functions of particular evolutionary conserved amino acid residues using mutated molecules of maize ferredoxin. *Chem. Lett.* **1997**: 929-930

Tate R., Riccio A., Iaccarino M., Patriarca EJ. (1997) A *cysG* mutant strain of *Rhizobium etli* pleiotropically defective in sulfate and nitrate assimilation. *J. Bacteriol.* **179**: 7343-7350

Tokumoto U., Takahashi Y. (2001) Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* **130**: 63-71

Vega JM., Kamin H. (1977) Spinach nitrite reductase. Purification and properties of a siroheme containing iron sulfur enzyme. *J. Biol. Chem.* **252**: 896-909

von Arb C., Brunold C. (1983) Measurement of ferredoxin-dependent sulfite reductase activity in crude extracts from leaves using *O*-acetyl-L-serine sulfhydrase in a coupled assay system to measure the sulfide formed. *Anal. Biochem.* **131**: 198-204

Warren MJ., Roessner CA., Santander PJ., Scott AI. (1990) The *Escherichia coli* cysG gene encodes *S*-adenosylmethionine-dependent uroporphyrinogen III methylase. *Biochem. J.* **265**: 725-729

Watanabe-Takahashi A., Tomoyuki Y., Takahashi H. (2001) T-DNA insertion mutants of the plastid-localizing sulfate transporter, Sultr4;1 in *Arabidopsis*. in *Proceeding of Conferrence of Japan Molecular Biology Society in Yokohama 2001*: 3P-335

Wolfe BM., Lui SM., Cowan JA. (1994) Desulfoviridin, a multimeric-dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Purification, characterization, kinetics and EPR studies. *Eur. J. Biochem.* **223**: 79-89

Woodcock SC., Raux E., Levillayer F., Thermes C., Rambach A., Warren MJ. (1998) Effect of mutations in the transmethylase and dehydrogenase/chelatase domains of sirohaem synthase (CysG) on sirohaem and cobalamin biosynthesis. *Biochem. J.* **330**: 121-129

Wu JY., Siegel LM., Kredich NM. (1991) High-level expression of *Escherichia coli* NADPH-sulfite reductase: requirement for cloned *cysG* plasmid to overcome limiting siroheme cofactor. *J. Bacteriol.* **173**: 325-333

Wuthrich KL., Bovet L., Hunziker PE., Donnison IS., Hortensteiner S. (2000) Molecular

cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. *Plant J.* **21**: 189-198

Yamaguchi T., Zhu X., Masuda M. (1998) Purification and characterization of a novel cysteine synthase isozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 501-507

Yonekura-Sakakibara K. (2000) Higher plant sulfite reductase: studies on gene structure and expression, reductant supplying system and an application to phytoremediation. Ph. D. Thesis, University of Osaka.

Yonekura-Sakakibara K., Ashikari T., Tanaka Y., Kusumi T., Hase T. (1998) Molecular characterization of tobacco sulfite reductase: enzyme purification, gene cloning, and gene expression analysis. *J. Biochem. (Tokyo)* **124**: 615-621

Yonekura-Sakakibara K., Onda Y., Akashi T., Tanaka Y., Kusumi T., Hase T. (2000) Analysis of reductant supply system for ferredoxin-dependent sulfite reductase in photosynthetic and nonphotosynthetic organs of maize. *Plant Physiol.* **122**: 887-894

Yoshioka S., Takahashi S., Hori H., Ishimori K., Morishima I. (2001) Proximal cysteine residue is essential for the enzymatic activities of cytochrome $P450_{cam}$. *Eur. J. Biochem.* **268**: 252-259

Yoshioka S., Takahashi S., Ishimori K., Morishima I. (2000) Roles of the axial push effect in cytochrome P450cam studied with the site-directed mutagenesis at the heme proximal site. *J. Inorg. Biochem.* **81**: 141-151

Young LJ., Siegel LM. (1988) Superoxide state of *Escherichia coli* sulfite reductase heme subunit. *Biochemistry* **27**: 5984-5990

Zeghouf MZ., Fontecave M., Covés J. (2000) A simplified functional version of the *Escherichia coli* sulfite reductase. *J. Biol. Chem.* **275**: 37651-376569

Zeghouf M., Fontecave M., Macherel D., Covés J. (1998) The flavoprotein component of the *Escherichia coli* sulfite reductase: expression, purification, and spectral and catalytic properties of a monomeric form containing both the flavin adenine dinucleotide and the flavin mononucleotide cofactors. *Biochemistry* **37**: 6114-6123

謝 辞

パルスラジオリシス測定と EPR スペクトル測定については、大阪大学産業科学研究所の小林一雄先生、田川精一両先生と、大阪大学基礎工学部の堀洋先生にそれぞれ御世話になりました。また長谷俊治教授には、常に適切な指導を賜り、大阪大学たんぱく質研究所酵素反応学部門のスタッフ・学生の皆様には、長らくの間御世話になりました。この場を借りて篤く御礼申し上げます。さらに、大学院生活を精神的・経済的に援助していただいた両親と家族には、心からの感謝を申し上げます。

2002 年 3 月

大阪大学 大学院理学研究科

生物科学専攻

たんぱく質研究所 酵素反応学部門

中山 雅登

論文目録

中山雅登

博士論文

1. 題名

植物亜硫酸還元酵素の基質認識とレドックス特性の蛋白質工学的研究
Protein engineering of plant sulfite reductase:
A study on its substrate recognition and redox property.

2. 数量	1 冊
3. 印刷公表（予定）年月日	2002年3月
4. 公表内容	全文
5. 出版物の種類	未定
6. 出版物の名称	未定
7. 出版物社等の名称	未定

参考論文

1. 題名	Existence of two heme B centers in cytochrome b_{561} from bovine adrenal chromaffin vesicles as revealed by a new purification procedure and EPR spectroscopy.
2.数量	1 冊
3.印刷公表年月日	1997年9月12日
4. 公表内容	全文
5. 出版物の種類	学会誌
6. 出版物の名称	Journal of Biological Chemistry
7. 出版物社等の名称	The American Society forBiochemistry and Molecular Biology, Inc.

参考論文

1. 題名	Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin.
1. 数量	1 冊
2. 印刷公表年月日	2000年5月29日
4. 公表内容	全文
5. 出版物の種類	学術誌
6. 出版物の名称	Journal of Inorganic Biochemistry
7. 出版物社等の名称	Elsevier Science B.V.

参考論文

1. 題名	The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase.
2. 数量	1 冊
3. 印刷公表年月日	2000年12月8日
4. 公表内容	全文
5. 出版物の種類	学術誌
6. 出版物の名称	FEBS Letters
7. 出版物社等の名称	Elsevier Science B.V.

参考論文

1. 題名	Mutational analysis of the substrate specifity of plant sulfite reductase.
2. 数量	1 冊
3. 印刷公表年月日	2001年9月30日
4. 公表内容	全文
5. 出版物の種類	学会誌
6. 出版物の名称	PS2001 Proceedings 12th International Congress on Photosynthesis
7. 出版物社等の名称	CSIRO publishing