

脱窒菌 *Halomonas halodenitrificans nar* 遺伝子クラスター近傍に存在する
FNR ファミリー遺伝子 *narS*

Preliminary characterization of FNR-family NarS protein from the denitrifying bacterium
Halomonas halodenitrificans

櫻井宣彦^a・中迫良子^a・Bambang Triwiyono^b

^a 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科生命情報系

^b Starch Technology Center, Agency for the Assessment and Application of Technology

Nobuhiko Sakurai^a, Yoshiko Nakasako^a, Bambang Triwiyono^b

^a Division of Biological Science, Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, Yamanohata 1,
Mizuho, Nagoya 467-8501, Japan

^b Starch Technology Center, Agency for the Assessment and Application of Technology,
Jalan Z.A. Pagar Alam No. 8/36 Bandar Lampung 35145, Indonesia

Denitrification is a phenomenon in which water-soluble nitrate or nitrite is released into the atmosphere as a gaseous nitrogen compound. Complete denitrification from nitrate to molecular nitrogen is a bacteria-limited ability and consists of four reactions that occur via nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide. The four sequential reactions are catalyzed by nitrate reductase (NAR), nitrite reductase (NIR), nitric oxide reductase (NOR), and nitrous oxide reductase (N₂OR). In this study, we report the overproduction, purification, and preliminary characterization of a fumarate and nitrate reductase regulator (FNR)-family protein of *Halomonas halodenitrificans*. In *Escherichia coli*, the FNR homologue is an oxygen-sensing transcriptional regulatory factor that controls a large regulon.

Analysis of the promoter region of the *nor-nar* gene cluster of *H. halodenitrificans* revealed two distinct FNR boxes, one upstream of the *norC* gene, which encodes the cytochrome *c* subunit of NOR, and a second upstream of the *narK2* gene, which encodes the nitrate transporter. *narS*, which encodes an FNR-like protein, was previously identified near the *nar* gene cluster based on sequence homology. We generated a construct for heterologous expression of NH-NarS, which is encoded with an NH-tag attached to the N-terminus of NarS. Immobilized metal affinity chromatography using an imidazole concentration gradient was employed for purification of the fusion protein after the removal of nucleic acid via polyethyleneimine treatment. The NH-NarS protein aggregated in 20 mM phosphate buffer, pH 7.9, and was reversibly solubilized by use of salts such as NaCl or KCl. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy of the purified protein revealed weak absorption of the Soret band while detecting the α -region of heme, suggesting that NarS may be a transcriptional regulatory factor that uses heme *b* as a prosthetic group.

1. 目的

脱窒とは、水溶性の NO_3^- や NO_2^- などの硝酸態窒素が、ガス分子状の窒素化合物として、大気中へ放散される現象である。 NO_3^- から N_2 への完全脱窒は細菌に限られた能力であり、 NO_2^- 、 NO 、 N_2O を経由する4段階の反応からなっている。無機窒素塩類を化学肥料として多用する近代農業では、作物により吸収・同化されずに残留したそれら塩類が、地下水へ侵入・汚染することが問題となっており、脱窒菌はその防止に重要な役割を果たしている。脱窒過程に関与する遺伝子群の発現調節には NO_3^- を始め、脱窒の中間過程に生ずる NO_2^- 、 NO などの各種窒素酸化物が関係している。脱窒菌 *Pseudomonas stutzeri* の研究では、大腸菌で NarXL として二成分転写制御系を構成し、そのセンサータンパク質である NarX を介して NO_3^- と NO_2^- による転写制御が行われている[1]。*Paracoccus pantotrophus* のフマル酸・亜硝酸還元酵素制御因子 (fumarate and nitrate reductase regulator) FNR 様タンパク質である NarR は嫌気下 NO_3^- の存在により硝酸還元酵素 (nitrate reductase ; NAR) の発現レベルを最大にする事が知られている[2]。*P. stutzeri* の亜硝酸還元酵素 (nitrite oxide reductase ; NIR) 欠損変異体は一酸化窒素還元酵素 (Nitric oxide reductase ; NOR) の発現レベルが低下しており、間接的に NO センサーの存在と、NO がインデューサーとしての役割を果たしていることを示している[3]。さらに、*P. stutzeri* において、FNR ファミリータンパク質に含まれる異化型硝酸塩呼吸制御因子 (dissimilatory nitrate respiration regulator) 転写調節因子 DnrD が NO によってトリガーされるシグナル伝達経路の一部を構成する事が見いだされている[4]。NtcC タンパク質は NtcB と二成分転写制御系を構成するグローバルな転写制御タンパク質として知られているが、*Ralstonia eutropha* では NO 発生試薬である Sodium nitroprusside に用いた実験により、NOR をコードする遺伝子上流に存在する NtcC ファミリータンパク質に含まれる転写調節因子 NorR が NO による制御を行っていることを示された[5]。

中度好塩性脱窒菌 *Halomonas halodenitrificans* では *nor* および *nar* 遺伝子クラスターの全塩基配列が決定されており、この両遺伝子クラスターは隣接している。一方、FNR や FNR 様タンパク質は FNR ボックスとも嫌気ボックスとも呼ばれる TTGAT-N₄-ATCAA の回文様配列を認識する。その全遺伝子の

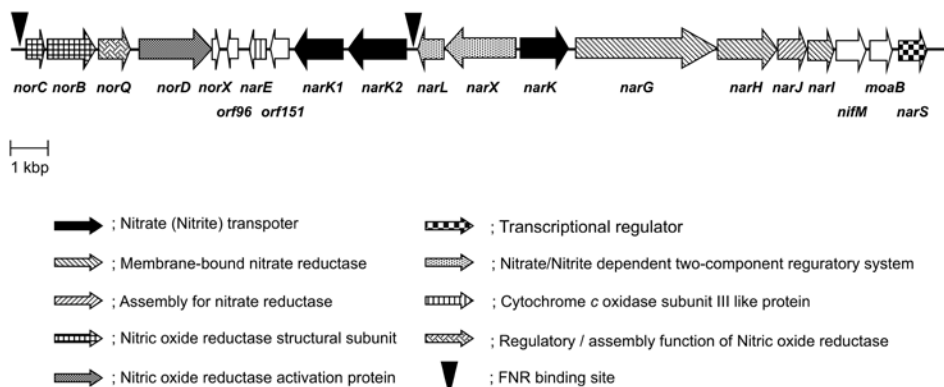


図 1. *H. halodenitrificans* の *nor-nar* 遺伝子群中の FNR タンパク質の結合部位

プロモーター領域の解析を行ったところ、硝酸トランスポーターをコードする遺伝子 *narK2* 上流には、既に知られている FNR ボックスが、NOR のチトクロム *c* サブユニットをコードする遺伝子 *norC* 上流には、よく似た回分様配列 TTGAC-N₄-GTCAA が見いだされた。また、NAR をコードする遺伝子クラスターの最下流に存在する *narS* 遺伝子上流に不完全な 2 種の FNR 様タンパク質の結合サイトが見いだされた(図 1)。今回、*narS* 遺伝子産物の大腸菌での大量発現系を構築し、さらに精製法に核酸の除去などの改良を加え、発現タンパク質を単離精製することができた。その性質を調べたところ、*H. halodenitrificans* の NarS タンパク質がヘムを持つ転写調節因子としての可能性を示すことができたため報告する。

2. 実験方法

2.1 アミノ酸配列の相同性比較とマルチプルアライメント

相同性比較やマルチプルアライメントには GENETYX-MAC (version 11.2.0) および ClustalW (<http://hypernig.nig.ac.jp/homology/clustalw.shtml>), MacVector (version 7, アクセルリス社) が用いられた。

2.2 系統樹の作成

FNR 様タンパク質のアミノ酸配列を National Center for Biotechnology Information から収集し、GENETYX-MAC あるいは MacVector を用い、近隣接合法 (Neighbor-Joining: NJ) により系統樹が作成された。

2.3 NarS および NH タグを付加した NarS タンパク質発現ベクターの構築

narS 遺伝子が含まれるクローン化されたゲノム領域を鋳型とし、*NdeI* サイトを付与したプライマー (5'-GACGCCGATACATATGTGGAGGAACAACAT-3') および *BamHI* サイトを付与したプライマー (5'-CGG GATCCTCAGTCGTCGGTCATCAT-3') を用いてポリメラーゼチェーンリアクションを行った。PCR 増幅産物をプラスミド pET11a (Novagen 社) の *NdeI*-*BamHI* 間に挿入し NarS 発現用ベクター pETnr15 を作成した。さらに、pETnr15 を *NdeI* により切断し、金属結合部位 NH-タグとエントロキナーゼ切断部位をコードする 4 本の合成 DNA (+鎖; 5'-TATGGGTCATAATCATAATCATAAT-3', 5'-CATAATCATAATCATAACGGTGGAGATAACGATGACAAGGG-3' と -鎖; 5'-TACCCTTGTCATCGTTATCTCC-3', 5'-ACCGTTATGATTATGATTATGATTATGATTATGATTATGACCCA-3') からなるインサートを挿入し、NH-NarS 発現用ベクター pET-His-NR を作成した。

2.4 NH タグ付き NarS タンパク質の精製

pET-His-NR により形質転換された *E. coli* BL21 (DE3) を Isopropyl-thio- β -D-Galactopyranoside により発現誘導し培養後、回収菌体に菌体培養液 1 L あたり精製用緩衝液 100 mL (0.2 mM threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol (DTT) および 1 M NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液

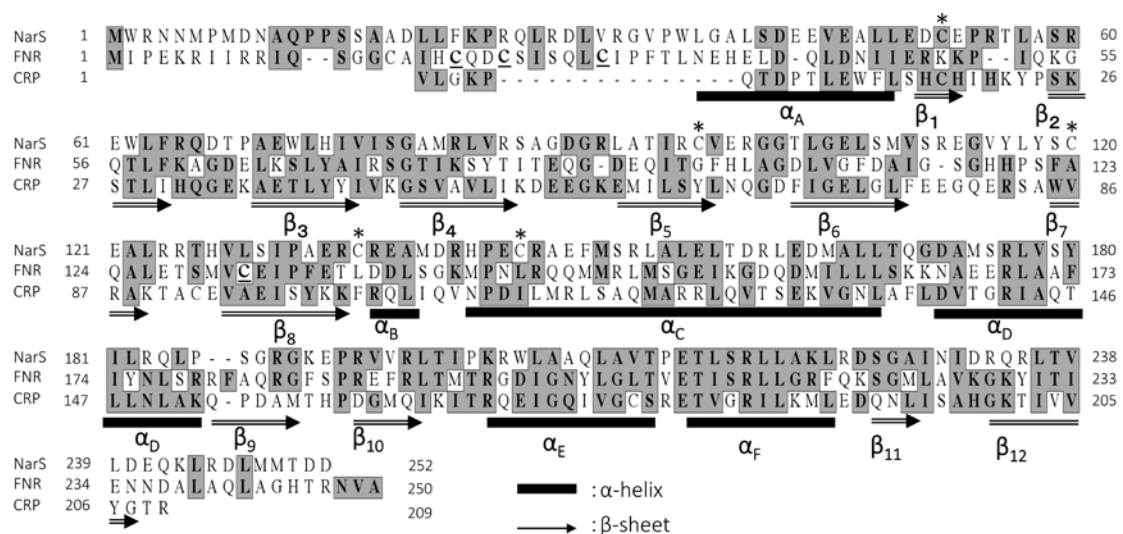
pH7.9)に懸濁し, 1 mL Protease Inhibitor Mixture(和光純薬株式会社), および 20 mg/ml になるように Lysozyme を添加し, 30 分間 37°C に加温した。超音波による菌体破碎後, 25,000 g, 20 分間の遠心分離により, 上澄み液を回収した。回収された上澄みに終濃度 0.1% になるように polyethyleneimine (PEI) を徐々に添加し, 30 分間攪拌後, 100,000g 1 時間の遠心分離により, 上澄み液を回収した。上澄み液に終濃度 60% になるように少しずつ硫酸を添加し, 30 分間攪拌後, 25,000g, 20 分間の遠心分離により, 沈殿物を回収し, 精製用緩衝液に溶解した。さらに, 硫酸を加える工程を計 2 回繰り返し行い PEI をより完全に取り除いた。続いて, HiTrap chelating HP カラム(5 mL × 2) に試料溶液を負荷し, 50 mL の結合用緩衝液(1 M NaCl および 10 mM イミダゾールを含む, 20 mM ナトリウムリン酸 緩衝液 pH7.9)にて洗浄後, 50 mL の結合用緩衝液と 50 mL の溶出用緩衝液(1 M の塩化ナトリウムおよび 500 mM イミダゾールを含む, 20 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 pH7.9)による 10 mM から 500 mM のイミダゾール直線濃度勾配を用い, 目的タンパク質を溶出した。以上の精製操作は可能な限り 4°C を保って行った。

2.4 原子吸光光度計による鉄の定量

NarS タンパク質中の鉄元素の含有量はファーンズ型原子吸光光度計(AA-6300, Shimadzu 社)を用いて測定された。バックグラウンドの補正には高速自己反転法, 測定には鉄用ホロカソードランプの輝線 248.3 nm が用いられた。

2.5 ペルオキシダーゼ活性による LDS-PAGE 上のヘムの検出

変性作用を抑え, 共有結合していないヘムも分析するために, Sodium dodecyl sulfate (SDS)の代わりに Lithium Dodecyl sulfate (LDS)を変性剤として用い, β -メルカプトエタノールを除いた試料溶液, LDS Sample Buffer(0.1 M Tris-HCl pH6.8, LDS, グリセロール, ブロムフェノールブルーを含む)を試



FNRの鉄-硫黄クラスターを形成する4つのCys残基には下線を, NarSタンパク質の5つのCys残基には*を付した。

図2. *H. halodenitrificans* NarS, *E. coli* FNR, CRP のアミノ酸配列の ClustalW アライメント

料に加えた[6]。非加熱変性試料溶液を LDS-poly-acrylamide gel electrophoresis 後, Poly vinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写し, ECL Blotting kit (Amersham Biosciences 社)と発酵基質として Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences 社)を用いて検出された。

3. 結果

3.1 分子系統樹の作成

Bradyrhizobium japonicum の窒素固定転写制御タンパク質(nitrogen fixation regulatory protein) FixK2 と NIR・NOR 制御因子(nitrite and nitric oxide reductase regulator) NnrR の研究に用いられた FNR 様タンパク質群の分子系統樹に(Fig. 5[7]), NarS タンパク質のアミノ酸配列を加え, 同様に系統樹を作成したところ, *P. denitrificans* の NIR・NOR 制御因子(nitrite reductase and nitric oxide reductase regulator) NNR と最も近縁であり, サブグループ 1D に含まれることが判明した(データを示さず)。また, 同様に Van Spanning らによる FNR ファミリーの系統樹(Fig. 3[8])に NarS の一次構造を加えると, サブグループ C に分類されることが判明した(データを示さず)。

3.2 NarS と FNR/CRP ファミリータンパク質の相同性比較

NarS タンパク質のその構造と機能を推定するために, 既に X 線結晶構造解析が行われており, FNR とホモロジーの高いサイクリック AMP 受容蛋白質(cyclic AMP receptor protein) CRP と NarS のアミノ酸配列の相同性比較を行ったところ, CRP と 43 個のアミノ酸が類似しており, 18%の相同性を持つことが判明した。また, 図2に CRP, FNR, NarS のマルチプルアライメントの結果を示す。

3.3 NarS タンパク質の精製

強力な転写活性を有する T7 プロモーター/T7 ターミネーターも持つプラスミド pETnr15 により形質転換された大腸菌 BL21(DE3)を培養, TOYOPEARL CM-650M を用いたカラムクロマトグラフィを行ったところ, 洗浄画分および NaCl による溶出画分にも SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

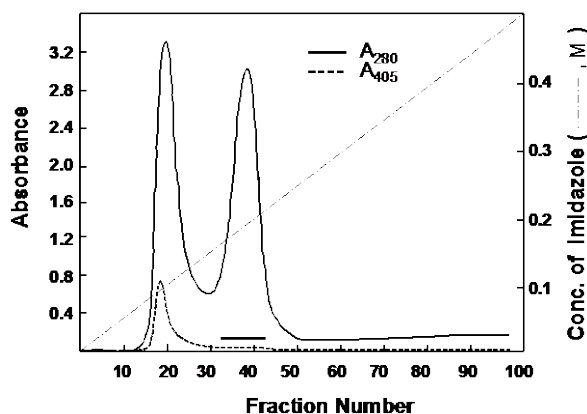


図3. PEI 処理後の Hi-Trap HP カラムクロマトグラフィー

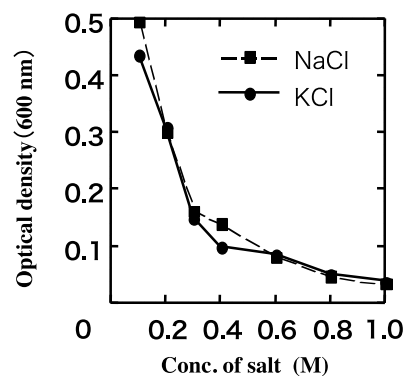


図4. NH-NarS の NaCl と KCl による可溶化

上で部分精製された NarS が見られた。さらに TSKgel G3000SW にて両画分を分析したところ、NaCl による溶出画分ではその溶出容量から約 20 ~ 30 kDa の分子量を持つ NarS を中心として、より高分子化している NarS タンパク質が見られ、洗浄画分では約 500 kDa を中心としてより低分子側にテールしているクロマトグラムが得られた(データを示さず)。また、溶出画分は 20 mM リン酸緩衝液 pH7.9 中、4°C に保存すると数日中に凝集、沈殿物となった。等電点沈殿の可能性を考え、様々な pH の緩衝液を用いて可溶化を試みた。また、S-S 結合形成による凝集とも考えられ、DTT や 2-メルカプトエタノールによる可溶化も試みた。さらに 1 M 塩化ナトリウムによる可溶化も検討したが、その全てにおいて顕著に沈殿物が溶けることは無かった。NaCl による溶出画分を 8M 尿素と 5% β -Me にて可溶化して、その紫外部の吸収スペクトルを測定したところ、209 nm および 257 nm 付近にピークを持つスペクトルが得られ核酸の共存があると推定した(データを示さず)。

3.4 NH-NarS タンパク質の精製

核酸の混在による NarS の高分子化が凝集の原因と推定し、簡便かつ変性剤存在化でも精製可能な NH タグを付加した発現ベクター pET-His-NR を構築した。さらに、PEI による核酸除去処理を加え、HiTrap chelating HP カラムにタンパク質溶液を負荷後、Ni との配位強度の差により分離するために、イミダゾール濃度を 10 mM から 500 mM の濃度勾配により溶出させた(図 3)。405 nm の吸収を有する Ni との結合力が弱いピークおよび、405 nm の吸収が弱く Ni との結合力が強い 2 つのピークが得られた。それぞれ SDS-PAGE を行ったところ、溶出の早いピークには NH-NarS 以外の複数のタンパク質が存在し、溶出の遅いタンパク質には NarS タンパク質のみが得られ、図 3 の横棒の部分回収した。1L の培養液あたり 225 mg の NH-NarS が得られる大量発現系を構築することができた。精製されたタンパク質はイミダゾールが存在下では、数日たっても凝集を起こさないのに対し、イミダゾールを含まない 20 mM リン酸緩衝液 pH7.9 に透析したところ、直ぐに沈殿した。この凝集物に対して塩化ナトリウムおよび塩化カリウムを加え、可溶化を行ったところ、図 4 に示される通り、両塩とも可逆的に可溶化が可能である事が判明した。そこで、以下の実験では 1M の塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸緩衝液 pH7.9 が用いら

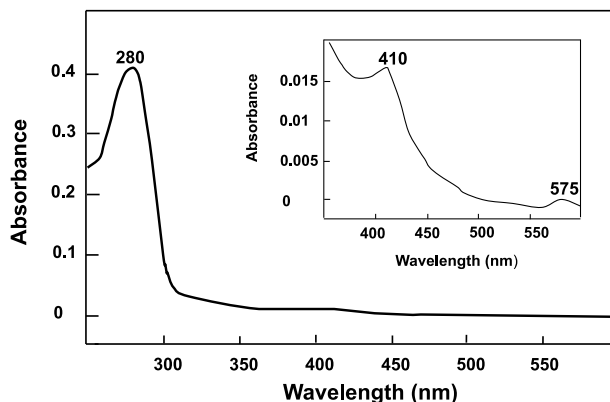


図 5. 精製された NH-NarS タンパク質の紫外-可視スペクトル

れた。

3.5 NH-NarS タンパク質の吸収スペクトルの測定

図5にNH-NarSタンパク質の吸収スペクトルの測定結果を示す。280 nmにトリプトファン残基由来の吸収、410 nm, 575 nm付近に弱いヘム由来の吸収が見られた。

4. 考察

分子系統樹で得られたサブグループ C は C 末端側に鉄-硫黄クラスターを有する *Bacillus subtilis* FNR 以外、鉄-硫黄クラスターを持たない FixK 型タンパク質である[8]。系統樹上、NarS は *B. subtilis* FNR の最も近くに存在し、近縁である(データを示さず)。NarS のシステイン残基の一次構造上の位置を確認したところ(データを示さず)、一次構造上の中央に近くに存在する2つのシステイン残基(Cys136 と Cys146)および、より N 末端側に点在する3つのシステイン残基(Cys52, Cys97 および Cys120)の5つが存在している。既に立体構造の判明している CRP との相同性から5つのシステイン残基の位置を推定したところ、Cys136, Cys146 および Cys52 が、モノマータンパク質中央の機能部位に比較的集中しており、3つのシステイン残基の α 炭素を結ぶ三角形のそれぞれの一片は 9.1 Å, 11.9 Å, 18.3 Åと予想された。その3残基間の距離が一部 10 Åをこえることや、また *B. subtilis* FNR で見られる様な C 末端側に存在するシステイン・シグネチャーが無いことから、鉄-硫黄タンパク質の可能性は低く、ヘム鉄への配位子であることが推定される。Cys97 と Cys120 はその位置、距離から二量体間の S-S 結合に関与することは無い。NH-NarS の紫外部の吸収スペクトルより、精製された試料には核酸の混入がなく、PEI 処理が有効である事を示している(図5)。微弱ではあるが、410 nm と 575 nm の極大吸収波長からヘムの存在が示唆され、575 nm の α 吸収帯の波長より Type B のヘムの存在がわかる。チトクロム *b* の α ピークは通常 554 ~ 563 nm に現れ、典型的な波長より長波長側に測定されるがその理由は不明である。ヘム *c* の存在はその一次構造にモチーフが見られないことから考えられない。しかしながら、LDS-PAGE 上のヘムの存在はコントロールとして用いられた Cyt. *c* では検出されるものの、NH-NarS では検出されず、さらに原子吸光を用いた鉄の定量でも検出限界以下であった(データを示さず)。この事は元々、存在していたヘムが取れてアポ化したか、あるいは十分なヘムの取込みが行われなかったのではないかと推定している。

H. halodenitrificans は中度好塩性脱窒菌である。中度好塩菌の細胞内塩濃度は、培養条件や菌株によって大きく異なるが、0.02 ~ 1.0 M 程度のカリウムイオンや、0.04 ~ 1.0 M 程度のナトリウムイオンを含んでいる。*H. halodenitrificans* の NarS タンパク質が塩濃度が低い状態で凝集をおこし、約 1 M の塩で可溶化されるのは(図4)、この好塩菌の塩濃度に依存した性質と関係していると推定すると、凝集が核酸結合のための二量体化がさらに進行した多量体化と考えられる。しかし、この仮定によると、NarS タンパク質はイオン濃度を検出する転写活性化因子とも考えられるが、ナトリウム特異的好塩菌である *H.*

halodenitrificans がイオン半径の大きく異なるナトリウムイオンとカリウムイオンを区別しないことには疑問がある。

近年, *P. aeruginosa* DNR の X 線結晶構造解析と NO との相互作用が報告された[9]。この転写因子は空気中の酸素による酸化にともなってヘムタンパク質のアポ化が進む, これは NarS の精製されたヘムの含有量が極端に少ないこととよく似ている。今回, *H. halodenitrificans* の NarS がヘムを持つ転写調節因子としての可能性を示すことができた。現在, 我々はさらに, *H. halodenitrificans* の FNR ファミリー遺伝子の網羅的な検索により, 鉄-硫黄クラスターを有する FNR 様タンパクをコードする遺伝子を見いだしている。脱窒菌の NO による発現調節機構の解明や酸素センサーに関する研究は現在, 盛んに行われており, *H. halodenitrificans* の脱窒過程中間体による転写制御機構を知ることは興味深い。

文献

- 1) Härtig, E., Schiek, U., Vollack, K-U., and Zumft, W.G., Journal of Bacteriology, **181**, 3658-3665 (1999).
- 2) Wood, N.J., Alizadeh, T., Bennett, S., Pearce, J., Ferguson, S.J., Richardson, D.J., Moir, J.W., Journal of Bacteriology, **183**, 3606-3613 (2001).
- 3) Palmedo, G., Seither, P., Körner, H., Matthews, J.C., Burkhalter, R.S., Timkovich, R., Zumft, W.G., Eur. J. Biochem., **232**, 737-746 (1995).
- 4) Vollack, K.-U., and Zumft, W.G, Journal of Bacteriology, **183**, 2516-2526 (2001).
- 5) Pohlmann, A, Cramm, R., Schmelz, K., Friedrich, B., Molecular Microbiology, **38**, 626-638 (2000).
- 6) Smith, A.G., and Witty, M., Heme, Chlorophyll, and Bilins Methods and Protocols, Humana Press Inc., 170-172 (2002).
- 7) Mesa, S., Bedmar, E.J., Chanfon, A., Hennecke, H., Fischer, H.-M., Journal of Bacteriology, **185**, 3978-3982 (2003).
- 8) Van Spanning, R.J.M., De Boer, A.P.N., Reijnders, W.N.M., Westerhoff, H.V., Stouthamer, A.H., Van Der Oost, J., Molecular Microbiology, **23**, 893-907 (1997).
- 9) Giardina, G., Rinaldo, S., Johnson, K.A., Matteo, A.D., Brunori, M., Cutruzzola, F., J. Mol. Biol., **378**, 1002-1015 (2008).