

(研究題目)

非共生および共生型窒素固定系における電子伝達経路の解析と改変
Analysis and engineering of electron transport pathways in non-symbiotic and symbiotic nitrogen fixation system

(研究者)

佐伯和彦 大阪大学理学部生物学科・助手
Kazuhiko Saeki Assistant Biochemist
Department of Biology
Faculty of Science.
Osaka University, Toyonaka

英文要旨

1) *Rhodobacter capsulatus* FdxN was site-specifically altered to deduce essential Cys residue. 2) *lacZ* and *phoA* fusion analysis of *R. capsulatus netA* and *netB* revealed that NetA embeds in cytoplasmic membrane with its C-terminus exposed to periplasm and that NetB exists mostly in cytoplasm. 3) *Rhizobium huakuii fixA* gene was cloned. Its product showed higher similarity to human mitochondrial electron transfer flavoprotein b-subunit than to other rhizobial FixAs.

1. 研究目的

ニトロゲナーゼへの電子供与はATP供与とともに窒素固定反応の制限要因の一つである。根粒菌や光合成細菌においてはNADH脱水素酵素や光化学系複合体など膜結合性の電子伝達成分からフェレドキシンなどの可溶性の電子供与体を経てニトロゲナーゼに至ると考えられるが、実態は不明である。本研究の目的は、a) 私達が既にクローニングした光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* のフェレドキシン遺伝子 *fdxN* およびその近傍に位置する窒素固定必須遺伝子 *netA* に着目して電子伝達経路を明らかにし、b) これらの蛋白質工学的改変により電子伝達能の増大を目指すとともに、c) レンゲソウ根粒菌 *Rhizobium huakuii* biovar *Renge* を題材として、*netA* 相同遺伝子の解析・改変を行うことである。

2. 研究経過および成果

a) フェレドキシン遺伝子 *fdxN* の改変と窒素固定能の評価：ニトロゲナーゼへの直接の電子伝達体であるとされているフェレドキシン FdxN の構造を遺伝子工学的に改変した。改変 *fdxN* のみを持つ *R. capsulatus* 株の窒素固定能を測定した結果、Cys54の機能上の必須性が確認されるとともに、Cys54と59間のアミノ酸数6を2に減じた場合若干(約10%)の窒素固定能の増大が認められた。精製可能な変異蛋白質についてCDを含む分光学的解析とEPRに

よる酸化還元適定を行なったところ、Cys54と59間のアミノ酸数が2つの4鉄4硫黄クラスターのスピン相互作用を規定していることが示された。（口頭発表，1993年10月日本生化学会大会；*J. Biol. Chem.* 投稿中）

b 1) *netAB*遺伝子産物の局在位置に関する解析：細胞質内で活性を示す大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子*lacZ*、およびペリプラズムで活性を示す大腸菌アルカリ性フォスファターゼ遺伝子*phoA*との融合実験により、*netA*および*netB*産物の細胞内局在性を調べた。この結果、NetAが細胞質膜に局在しC末端をペリプラズムに露出していること、また、NetBはほとんどの部分が細胞質に存在するがN末端で膜と相互作用することが明らかになった。（口頭発表，1994年3月日本植物生理学会年会）NetAのC末端にPhoAを付加する融合遺伝子は*netA*欠損株を相捕することから、この融合蛋白質と抗PhoA抗体を用いた化学架橋実験が可能であることが示された。

b 2) *netB*遺伝子産物の大量発現と精製：NetB産物を精製するために、N末端とC末端にニッケルと親和性を示すHis 6残基の連続配列を付加する融合遺伝子2種を作製した。大腸菌内では、N末端付加の場合には容易に発現が認められたが、C末端付加の場合はシャペロニンGroESLと共発現させる必要があった。また、*R. capsulatus netB*欠損株に導入して融合遺伝子の機能を調べた。C末端付加のものは生理活性を保っていた。しかし、N末端付加のものは示さず、6残基のHisを付加することでN末端部分と膜または膜中成分との正常な相互作用が損なわれたと推定された。（口頭発表，1994年9月日本生化学会大会）

今後は、*fdxN*・*netAB*遺伝子産物の酵素化学的性質を明らかにするために、膜と可溶性分画を再構成し、嫌氣的に光存在下でニトロゲナーゼ活性を測定するという*in vitro*実験系を構築する必要がある。その上で、各遺伝子の欠損株と大量発現産物を用いて反応機能の解析を行う予定である。

c) 根粒菌*R. huakuii*の*fdxA*と*fixAB*遺伝子のクローニング：レンゲソウ根粒菌からフェレドキシン遺伝子*fdxA*をクローニングしたが、光合成細菌の*netAB*に類似した遺伝子をクローニングすることはできなかった。そこで、他の根粒菌に既知の窒素固定遺伝子で構造上の情報等から*netAB*に比較的近い機能を持つことが期待される*fixABC*に着目した。ダイズ根粒菌等のFixBのアミノ酸配列に基づき作製したプローブにより*R. huakuii fixAB*遺伝子をクローニングした。塩基配列を決定した範囲内では、驚くべきことに、レンゲソウ根粒菌FixAのアミノ酸配列は既知の根粒菌のものとは25%程度の相同性しか示さないのに対し、脱窒菌*Paracoccus denitrificans*の電子伝達フラビン蛋白質（ETF）βサブユニットと85%、ヒト肝臓ミトコンドリアのETFβサブユニットと55%という高い類似性を示した。ETFは呼吸

鎖電子伝達複合体IIとリンクすることから、レンゲソウ根粒菌は構成的な電子伝達系と窒素固定系とを一部共有している可能性が有り、興味深い。今後、塩基配列を完全決定し、*fixAB*欠損株を作製して、窒素固定能と呼吸能を解析して行く予定である。（現在、遺伝子交換システムを構築すべく、リファンピシン耐性を持つ擬野生*R. huakuii*株の作出と接合実験を遂行中である。）

3. 発表論文リスト

論文

- K. Sacki, K. Tokuda, K. Fukuyama, H. Matsubara & S. Itoh

"Site-specific Mutagenesis of the *Rhodobacter capsulatus* Ferredoxin I, FdxN, That Functions in Nitrogen Fixation" (*J. Biol. Chem.* 投稿中)

口頭発表

- 1993年10月 日本生化学会大会（於 東京大学）

"光合成細菌の窒素固定に機能する8鉄フェレドキシンの構造改変"

佐伯和彦, 徳田賢一郎, 福山恵一, 松原央, 伊藤繁

- 1994年3月 日本植物生理学会大会（於 筑波大学）

"光合成細菌*Rhodobacter capsulatus* *fdxN* 上流に位置する2つの窒素固定必須遺伝子 ORF-U2とORF-U3の解析"

藤原武志, 佐伯和彦, 松原央