

第4章 *Nocardioides aromaticivorans* IC177 株由来 CARDO の酵素学的解析

4-1. 緒言

ROS に属する酵素の活性には電子伝達系からの電子の供給が必須である。しかし、これまでの ROS の研究は反応特性や基質特異性が中心であり、電子伝達系に焦点をあてた例は極めて少ない。CA10/J3 株、KA1 株、IC177 株が持つ CARDO (terminal oxygenase; CARDO-O、ferredoxin; CARDO-F、ferredoxin reductase; CARDO-R から構成される)の terminal oxygenase コンポーネントには機能の類似性と高い相同性が認められる一方で、電子伝達コンポーネント(CARDO-F と CARDO-R)に多様性がある。この特徴は、今まで詳細な解析がなされてこなかった ROS の電子伝達メカニズムの解明に向けた格好の研究材料であるといえる。

そこで、本章では、CARDO の電子伝達メカニズム解明に向け、IC177 株由来 CARDO の各コンポーネントの精製、characterization、及び、CA10/J3 株由来 CARDO との電子伝達鎖の互換性を解析した。以前の研究で、CA10 株の 3 つのコンポーネント各々の精製と characterization が行われ[Nam et al., 2002]、J3 株の CARDO-O (CarAa)及び、CARDO-R (CarAd)においても精製系が構築され、結晶構造解析が行われた[芦川雄二、2005]経緯もあり、本研究での電子伝達鎖の互換性の解析には、CARDO-O_{J3}、CARDO-F_{CA10}、CARDO-R_{J3} を用いることとした。なお、本章以降では、ROS に分類される酵素を呼称する場合は、2 つもしくは 3 つのコンポーネントから成るシステム全体を CARDO、NDO (naphthalene dioxygenase)、BDO (biphenyl dioxygenase)などと表記し、各コンポーネントのうち terminal oxygenase コンポーネントを CARDO-O、NDO-O、BDO-O など、ferredoxin コンポーネントを CARDO-F、NDO-F、BDO-F など、ferredoxin reductase コンポーネントを CARDO-R、NDO-R、BDO-R などと表記した。また、各酵素の由来菌株名は下付で示した(CARDO-O_{IC177} など)。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 菌株、プラスミド、及び培養液

本研究で使用した菌株及びプラスミドを Table M4-1 に示した。*E. coli* DH5 α 株は遺伝子操作の宿主として、*E. coli* BL21(DE3)株は pET ベクターの発現用宿主として用いた。*E. coli* 用の培地として LB broth [Sambrook and Russel, 2001]、及び、SB 培地[12 g tryptone/l、24 g yeast extract/l、5 ml glycerol/l、12.5 g K₂HPO₄、3.8 g KH₂PO₄/l; Nam et al., 2002]を用いた。培地には、必要に応じて ampicillin (Ap)、kanamycin (Km)、及び、X-Gal をそれぞれ終濃度 50 μ g/ml、50 μ g/ml、20 μ g/ml となるように添加した。IPTG は適当量加えた。プレート作製時には細菌培地用の寒天を終濃度 1.6% (wt/vol)になるように添加した。

4-2-2. DNA を用いた実験

DNA を用いた基本的な実験は、本論文第 2 章の材料と方法 2-2-5~6、2-2-8~12 に従って行った。

4-2-3. タンパク質発現用ベクターの構築

IC177 株由来 CARDO の各コンポーネントの精製酵素を調製するため、大腸菌体内での大量発現系を構築した。IC177 株の CarAa の N 末端側 His タグ(6 個)融合タンパク質、Native、C 末端側 His タグ(6 個)融合タンパク質発現用ベクターを構築するため、まずは pB177307 (*carAaAcAd* 発現用; 本論文 3-3-3 参照)を鋳型として PCR により目的遺伝子を含む DNA 断片を調製した。用いたプライマーを Table M4-2 に、作成したプラスミドのインサートの模式図を Fig. M4-1 に示した。*carAa*、*carAc*、*carAd* それぞれの N 末端、C 末端 His タグと native のタンパク質発現用の DNA 断片を調製し、pT7Blue ベクターに組み込んだ(pT177401~pT177409; TableM4-1)。各遺伝子の開始コドンは *NdeI* サイト(5'-CATATG-3')になるよう作成した。次に、pT177402、pT177403、pT177406、pT177409 の *NdeI*-目的遺伝子-*HindIII* インサートを用意し、pET-26b(+)を *NdeI* と *HindIII* で処理した断片を CIAP で脱リン酸化したものに組み込んだ(それぞれ pE177502、pE177503、pE177506、pE177509 と命名)。ここでは pT177402、pT177403、pT177406、pT177409 のインサートについてのみ pET-26b(+)に組み込んだが、これらの DNA 断片を用いて構築した発現系が良好でなかったときのために N 末端 His タグ融合タンパク質用の pT177401、pT177404、pT177407、native タンパク質用の pT177405、pT177408 は予備的に作成したからである。pE177502、pE177503、pE177506、pE177509 のインサートの向きと開始コドン周辺の塩基配列はシーケンス解析によって確認した。なお、これらのプラスミドによる発現タンパク質は、本来の終止コドンが His 6 個と置き換わるかたちで翻訳されるよう作成されている。

4-2-4. タンパク質発現条件の検討

IC177 株由来 CARDO-O の C 末端側 His タグ融合タンパク質(以降、CARDO-O_{IC177} とする)、IC177 株由来 CARDO-F の C 末端側 His タグ融合タンパク質(CARDO-F_{IC177})、IC177 株由来 CARDO-R の C 末端側 His タグ融合タンパク質(CARDO-R_{IC177})、の精製タンパク質を大量に調製するため、発現条件の検討を行った。

操作

- ①作成した各 CARDO コンポーネント(C 末端 His 融合タンパク質)発現用プラスミド、pE177503、pE177506、pE177509 で大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し、各々についてグリセロールストックを作成した。
- ②グリセロールストック 5 μ l を 5 ml の LB 培地+Km に加え、8 h 30°C で培養した。
- ③②の培養液 50 μ l を新しい 5 ml の LB 培地+Km に加え、2 h 25、30、もしくは 37°C で培養した。

Table M4-1. 本章で用いた菌株およびプラスミド。

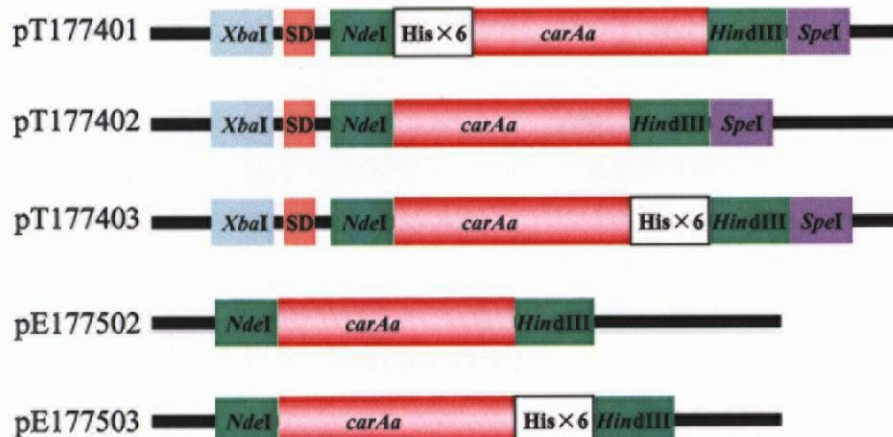
Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> ($\phi 80$, <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Toyobo
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> (lon) <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> B834(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal met</i> (DE3)	Novagen
Plasmids		
pB177307	Ap ^r , pBluescript II SK(-) with 2.8-kb insert containing <i>carAaAcAd</i> genes of IC177	本論文第 3 章
pET-26b(+)	Km ^r , pBR322 origin, <i>lacI</i> , T7 promoter	Novagen
pE177502	Km ^r , pET-26b(+) with 1.2-kb <i>NdeI-HindIII</i> insert containing <i>carAa</i> _{IC177}	This study
pE177503	Km ^r , pET-26b(+) with 1.2-kb <i>NdeI-HindIII</i> insert containing CAC×6- <i>carAa</i> _{IC177}	This study
pE177506	Km ^r , pET-26b(+) with 0.4-kb <i>NdeI-HindIII</i> insert containing CAC×6- <i>carAc</i> _{IC177}	This study
pE177509	Km ^r , pET-26b(+) with 1.2-kb <i>NdeI-HindIII</i> insert containing CAC×6- <i>carAd</i> _{IC177}	This study
pECAC1	Km ^r , pET-26b(+) with 1.2-kb <i>NdeI-XhoI</i> insert containing <i>carAc</i> _{CA10} -CAC×6	Nam et al., 2002
pECAD1	Km ^r , pET-26b(+) with 1.2-kb <i>NdeI-XhoI</i> insert containing <i>carAd</i> _{CA10} -CAC×6	Nam et al., 2002
pEJ3AaC	Km ^r , pET-26b(+) with 1.2-kb <i>NdeI-XhoI</i> insert containing <i>carAa</i> _{J3} -CAC×6	Nojiri et al., 2005
pEJ3AdN	Km ^r , pET-26b(+) with 1.2-kb <i>NdeI-XhoI</i> insert containing <i>carAd</i> _{J3} -CAC×6	Uchimura et al., unpublished.
pT177401	Ap ^r , pT7Blue(R) with 1.2-kb PCR-amplified DNA fragment containing CAC×6- <i>carAa</i> _{IC177}	This study
pT177402	Ap ^r , pT7Blue(R) with 1.2-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAa</i> _{IC177}	This study
pT177403	Ap ^r , pT7Blue(R) with 1.2-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAa</i> _{IC177} -CAC×6	This study
pT177404	Ap ^r , pT7Blue(R) with 0.4-kb PCR-amplified DNA fragment containing CAC×6- <i>carAc</i> _{IC177}	This study
pT177405	Ap ^r , pT7Blue(R) with 0.4-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAc</i> _{IC177}	This study
pT177406	Ap ^r , pT7Blue(R) with 0.4-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAc</i> _{IC177} -CAC×6	This study
pT177407	Ap ^r , pT7Blue(R) with 1.2-kb PCR-amplified DNA fragment containing CAC×6- <i>carAd</i> _{IC177}	This study
pT177408	Ap ^r , pT7Blue(R) with 1.2-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAd</i> _{IC177}	This study
pT177409	Ap ^r , pT7Blue(R) with 1.2-kb PCR-amplified DNA fragment containing <i>carAd</i> _{IC177} -CAC×6	This study
pT7Blue(R)	Ap ^r , <i>lacZ</i>	Novagen

* 下付の英文字は由来菌株名を示す。また、his タグ融合タンパク質として発現するよう作成された遺伝子においては、CAC×6 が遺伝子の左側、右側に表記されているものは、それぞれ N 末端側、C 末端側に His タグが 6 個付加されたタンパク質が発現するよう設計されていることを示す。

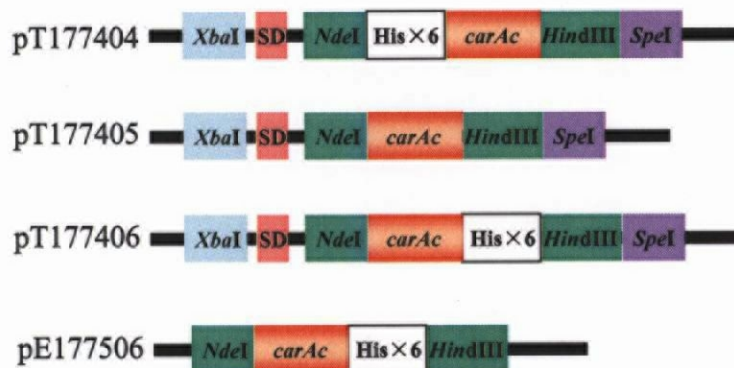
Designation	Sequence (5'-3')
XbaI-SD-NdeI-His6-carAa	TCTAGAGTAAGGAGGTGTT <u>CATATGC</u> ACCACCACCACCACAGCACCTCTCAGGAAATCTC
SpeI-HindIII-Aa	ACTAGTA <u>AAGCTTT</u> CACGACATTTCCTACTCGGG
XbaI-SD-carAa	TCTAGAGTAAGGAGGTGTTCATATGAGCACCTCTCAGGAAAT
SpeI-HindIII-His6-carAa	ACTAGTA <u>AAGCTTT</u> CAGTGGTGTTGGTGTTGGTGCGACATTTCCTACTCGGGC
XbaI-SD-NdeI-His6-carAc	TCTAGAGTAAGGAGGTGTTCATATGCACCACCACCACCACAACAGGCATTTCGGCGGGTCA
SpeI-HindIII-Ac	ACTAGTA <u>AAGCTTT</u> CAGTCTGCCTCCTTCGGCG
XbaI-SD-carAc	TCTAGAGTAAGGAGGTGTT <u>CATATGA</u> ACAGGCATTTCGGCGGG
SpeI-HindIII-His6-carAc	ACTAGTA <u>AAGCTTT</u> CAGTGGTGTTGGTGTTGGTGTTGCTGCCTCCTTCGGCGCCA
XbaI-SD-NdeI-His6-carAd	TCTAGAGTAAGGAGGTGTT <u>CATATGC</u> ACCACCACCACCACCACCGCCGCCATTACGAGTACCT
SpeI-HindIII-Ad	ACTAGTA <u>AAGCTTT</u> CATATGCGATCAGCGACGTCA
XbaI-SD-carAd	TCTAGAGTAAGGAGGTGTTCATATGCGCCGCCATTACGAGTA
SpeI-HindIII-His6-carAd	ACTAGTA <u>AAGCTTT</u> CAGTGGTGTTGGTGTTGGTGTTGCGATCAGCGACGTGAGCA

^a 下線の配列は *Nde*I もしくは *Hind*III サイトを示す。

CARDO-O発現用



CARDO-F発現用



CARDO-R発現用

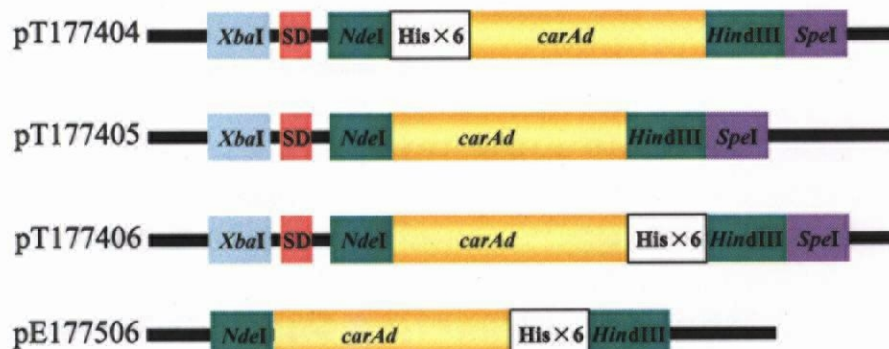


Fig. M4-1. CARDO-O_{IC177}、CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177}発現用ベクターのインサートの模式図。pTシリーズはpT7Blue(R)ベクターを、pEシリーズはpET26b(+)を基本構造とした。His × 6はCACが6つ連続して並んだ塩基配列を示す。

- ④③の培養液に IPTG を終濃度 1、0.5、もしくは 0.1 mM になるよう添加し、それぞれから 1 ml を分取して OD₆₀₀ を測定し、OD₆₀₀ = 0.4~0.6 であることを確認した。
- ⑤残りの 4 ml の培養液を引き続き 25、30、もしくは 37℃で 8 h 培養した。
- ⑥培養液を 6,000 rpm、4℃、10 min 遠心し、上清を取り除いた。
- ⑦菌体ペレットを CNF buffer (本論文 3-2-9 参照) 1 ml で懸濁し、6,000 rpm、4℃、10 min 遠心し、同じ操作をもう一度行った。
- ⑧500 µl の TG buffer (20 mM Tris-HCl、10% glycerol、pH 7.5)で懸濁し、超音波破碎した。
- ⑨15,000 rpm、4℃、15 min 遠心し、上清を可溶性画分、ペレットを不溶性画分とした。

4-2-5. タンパク質の定量

タンパク質の定量は、protein assay kit (Bio-Rad Lab.)を用いて、bovine serum albumin (BSA)を標準タンパク質としてスタンダードアッセイ法により行った[Bradford, 1976]。

操作

- ①標準試料として、BSA を 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml になるよう調製した。
- ②サンプルを dH₂O で希釈して 0.1~0.5 mg/ml の範囲内の濃度にした。
- ③Dye reagent を dH₂O で 5 倍に希釈した。
- ④希釈した dye reagent 1 ml に対し希釈したサンプルを 20 µl 加えて vortex で 2~3 sec 攪拌した。
- ⑤室温で 5 min 静置した後、標準試料における波長 596 nm での吸光度を測定して(分光光度計は Beckman Coulter 社製 DU7400 もしくは DU800 を用いた)検量線を作成した。
- ⑥サンプルにおける波長 596 nm での吸光度も同様に測定して⑤で作成した検量線よりタンパク質濃度を算出した。

4-2-6. SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (1970)、Tricine-SDS-PAGE は Schagger ら (1987)の方法に従って、acrylamide 濃度はそれぞれ 12%、15%として Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad)を用いて行った。

試薬

- ・ 30% (w/v) acrylamide/bisacrylamide (19:1) (Bio-Rad)
- ・ 4×Tris-HCL/SDS (pH6.8) (濃縮ゲル buffer)

6.05 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)
0.4 g	SDS

まず Tris を dH₂O 40 ml に溶かし、1 N HCl で pH 6.8 に調整し、その後、SDS を加えた。

- ・ 4×Tris-HCL/SDS (pH 8.8) (分離ゲル buffer)

91 g	Tris
2 g	SDS

まず Tris を dH₂O 300 ml に溶かし、1 N HCl で pH 8.8 に調整し、その後、SDS を加えた。

- ・ Tricine-SDS-PAGE 用ゲル buffer

36.4 g	Tris
0.3 g	SDS

まず Tris を dH₂O 100 ml に溶かし、1 N HCl で pH 8.45 に調整し、その後、SDS を加えた。

- ・ N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)

- ・ 10% (w/v) Ammonium persulfate (APS)
- ・ 2×SDS sample buffer

20 ml	4×Tris-HCl/SDS buffer (pH6.8)
20 ml	Glycerol
2 ml	2-mercaptoethanol
1 mg	Bromophenol blue

 dH₂O 100 ml に溶かした。
- ・ Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis (GE healthcare Bio-Sciences, USA)(分子量マーカー)
- ・ XL-Ladder Low (APRO Science)(分子量マーカー)
- ・ Low-Range Rainbow Markers (GE Healthcare Bio-Sciences)
- ・ 5×SDS/electrophoresis buffer

15.1 g	Tris
72.0 g	Glycine
5.0 g	SDS

 dH₂O 1000 ml に溶かした。
- ・ Tricine-SDS-PAGE 用 anode buffer

Tris 24.2 g を 1000 ml の dH₂O に溶かし、1 N HCl で pH 8.9 に調整した。
- ・ Tricine-SDS-PAGE 用 cathode buffer

Tris 12.1 g、tricine 17.9 g を 1000 ml の dH₂O に溶かし、1 N HCl で pH 8.25 に調整し、その後、SDS 1 g を加えた。
- ・ SimplyBlue SafeStain (Invitrogen)(染色液)

<SDS-PAGE>

操作

- ① 6 ml の 30% (w/v) acrylamide/bisacrylamide (19:1)、3.75 ml の分離ゲル buffer、5.25 ml の dH₂O を混合し、20 min アスピレーターで脱気した。
- ② ①の溶液に 10%APS 溶液 50 µl と TEMED 10 µl を加えて穏やかに攪拌し、組み立てた Mini-Protean II Electrophoresis Cell に流し込んだ。このとき、ゲルの水面が平らになるよう上から dH₂O を適量流し込んだ。
- ③ 30～60 min 室温で静置した。この間、0.65 ml の 30% (w/v) acrylamide/bisacrylamide (19:1)、1.25 ml の濃縮ゲル buffer、3.05 ml の dH₂O を混合し、20 min アスピレーターで脱気した。
- ④ ③の溶液に 10%APS 溶液 25 µl と TEMED 5 µl を加えて穏やかに攪拌し、分離ゲルの上に流し込み、コームを差し込んだ。
- ⑤ apply するサンプルに等量の 2×SDS sample buffer を加え、100℃で 5 min boil した。
- ⑥ well にサンプルを apply し、100V で電気泳動を行った。泳動には両極とも 5 倍希釈した 5×SDS/electrophoresis buffer を適量満たして使用した。
- ⑦ 泳動が完了したら、ゲルをゲル板から分離して濃縮ゲルを取り除き、約 200 ml の dH₂O に浸し、そのまま電子レンジにて沸騰するまで加熱した。
- ⑧ dH₂O を捨て、新しく dH₂O を加えて⑦同様電子レンジで加温し沸騰させた。
- ⑨ dH₂O を捨て、ゲルを SimplyBlue SafeStain に浸し、電子レンジで加温・沸騰させた。
- ⑩ ゲルを dH₂O に浸し、30 min～1 h 室温で振とうした。この操作をもう一度繰り返した。
- ⑪ ゲルドライヤーにてセロファンに挟んだゲルを 2 h ほど乾燥させた。

<Tricine-SDS-PAGE>

操作

- ① 5 ml の 30% (w/v) acrylamide/bisacrylamide (19:1)、3.33 ml の tricine-SDS-PAGE 用ゲル buffer、1.1 ml の glycerol、0.57 ml の dH₂O を混合し、20 min アスピレーターで脱気した。
- ② ①の溶液に 10%APS 溶液 50 μ l と TEMED 5 μ l を加えて穏やかに攪拌し、組み立てた Mini-Protean II Electrophoresis Cell に流し込んだ(分離ゲル)。このとき、ゲルの水面が平らになるよう上から dH₂O を適量流し込んだ。
- ③ 30～60 min 室温で静置した。この間、0.67 ml の 30% (w/v) acrylamide/bisacrylamide (19:1)、1.24 ml の tricine-SDS-PAGE 用ゲル buffer、3.09 ml の dH₂O を混合し、20 min アスピレーターで脱気した。
- ④ ③の溶液に 10%APS 溶液 25 μ l と TEMED 5 μ l を加えて穏やかに攪拌し、分離ゲルの上に流し込み、コームを差し込んだ(濃縮ゲル)。
- ⑤ apply するサンプルに等量の 2×SDS sample buffer を加え、100℃で 5 min boil した。
- ⑥ well にサンプルを apply し、100V で電気泳動を行った。泳動 buffer として負極には cathode buffer、正極には anode buffer を適量満たして使用した。
- ⑦ 泳動が完了したら、ゲルをゲル板から分離して濃縮ゲルを取り除き、約 200 ml の dH₂O に浸し、そのまま電子レンジにて沸騰するまで加熱した。
- ⑧ dH₂O を捨て、新しく dH₂O を加えて⑦同様電子レンジで加温し沸騰させた。
- ⑨ dH₂O を捨て、ゲルを SimplyBlue SafeStain に浸し、電子レンジで加温・沸騰させた。
- ⑩ ゲルを dH₂O に浸し、30 min～1 h 室温で振とうした。この操作をもう一度繰り返した。
- ⑪ ゲルドライヤーにてセロファンに挟んだゲルを 2 h ほど乾燥させた。

4-2-7. 精製用タンパク質を含む粗酵素抽出液の大量調製

目的タンパク質の本培養の温度、添加した IPTG 濃度、宿主大腸菌を以下に示した。

タンパク質名	本培養の温度(℃)	添加した IPTG の終濃度 (mM)	本培養開始から IPTG 添加までの時間(h)	IPTG 添加後の培養時間	宿主大腸菌
CARDO-O _{IC177}	30	0.5	2	8	BL21(DE3)
CARDO-F _{IC177}	25	0.5	5	10	BL21(DE3)
CARDO-R _{IC177}	25	0.5	2	8	BL21(DE3)
CARDO-R _{J3}	25	0.5	2	8	B834(DE3)
CARDO-R _{CA10}	30	0.5	2	8	BL21(DE3)

CARDO-R_{CA10} は Nam ら(2002)、CARDO-R_{J3} は 芦川(2006)による良好な発現が確認された条件に従った。

操作

- ① 目的タンパク質が発現するよう作成された大腸菌のグリセロールストック 5 μ l を 5 ml LB + Km 液体培地に加えたものを必要数用意し、30℃で 6～8 h 振とう培養した。
- ② ①の培養液を 1.5 l SB + Km 液体培地に対し、15 ml (①の培養液 3 本分)を加え、各培養温度で各目的タンパク質に応じた時間に IPTG を添加した。
- ③ 培養液を 6,000 rpm、4℃、10 min 遠心し、菌体を集め、TG buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5、10% glycerol)で洗菌を 2 回行い、bufferA (組成は 4-2-8 参照)に懸濁した。
- ④ 超音波破碎した後、25,000 rpm、4℃、1～2 h 遠心した。
- ⑤ 上清を孔径 0.45 μ m のフィルターで濾過した。

4-2-8. タンパク質の精製

タンパク質の精製の操作は 4℃で行い、fast protein liquid chromatography (FPLC)には ÄCTA (GE Healthcare Bio-Sciences)を用いた。波長 280 nm の吸光度でタンパク質のモニタリングを行った。なお、本研究において CARDO-O_{J3}、及び、CARDO-F_{CA10}の精製酵素は宇佐美裕亮氏(本年度、博士論文)より供与していただいた。また、CARDO-R_{CA10}、CARDO-R_{J3}の精製酵素においてはそれぞれ SDS-PAGE にてほぼ単一のバンドになるまで精製されていることを確認した。

<Metal chelation chromatography>

本研究で精製したタンパク質は全て His タグ融合タンパク質である。それぞれのタンパク質における metal chelation chromatography の溶出条件を以下に記した。

	グラジエント開始 buffer の imidazole 濃度	グラジエント
CARDO-O _{IC177} 、CARDO-F _{IC177} 、CARDO-R _{IC177} CARDO-R _{J3} 、CARDO-R _{CA10}	0 mM	0 mM～300 mM
CARDO-O _{J3}	60 mM	60 mM～195 mM
CARDO-F _{CA10}	0 mM	0 mM～165 mM

試薬

- ・ Buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、0.5 M NaCl)
- ・ Buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、0.5 M NaCl、0.3 M imidazole)
- ・ 0.1 M NiSO₄

各々孔径 0.22 µm のフィルターで濾過した後、脱気してから使用した。

操作

- ①HiTrap affinity column (column volume 5 ml; GE Healthcare Bio-Sciences)に 26 ml の milliQ 水を流速 2 ml/min で流し洗浄した。
- ②0.1 M NiSO₄を流速 1 ml/min で 2 ml 流しカラムに Ni²⁺をチャージさせた。
- ③26 ml の milliQ 水を流速 2 ml/min で流し洗浄した。
- ④Buffer A (CARDO-O_{J3} 精製時は 60 mM imidazole の bufferA)を流速 2 ml/min で 26 ml 流し、カラムを平衡化した。
- ⑤サンプルを 1 ml/min で apply した。
- ⑥流速 2 ml/min で上記溶出条件にて、溶出させ、目的タンパク質が含まれるフラクションを回収した。各フラクションは 5 ml とした。

<Gel filtration chromatography>

カラムは Superdex 200 (column volume 320 ml; GE Healthcare Bio-Sciences)を用い、ゲル濾過 buffer の組成は 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.2 M NaCl、10% glycerol とした。まず、カラムを 0.5 ml/min で 2 h 以上洗浄した後、サンプルを apply して流速を 0.5 ml/min とした。各フラクションは 2 ml づつとした。

4-2-9. タンパク質の分子量の推定

精製したタンパク質の分子量の推定は **Superdex 200** を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで行った。分子量マーカーとしては、**vitamine B₁₂** (MW:1,355)、**cytochrome c** (MW:12,384)、**Chymotrypsinogen A** (MW:25,000)、**Ovalbumin** (MW:43,000)、**BSA** (MW:67,000)、**Aldolase** (MW:158,000)、**Blue Dextran 2000** (MW:2,000,000)を用い、ゲル濾過クロマトグラフィーは 4-2-8 に従って行った。マーカー分子は各々 **5 mg** ずつ **apply** した。カラム内部の体積(担体の体積 + 排除体積)を **V_t** とし、**Blue Dextran** は担体と一切相互作用をしないと仮定して **Blue Dextran** の溶出に要した体積を排除体積 **V_o** とした。タンパク質の溶出に要した体積を **V_e** とし、まずは各々のマーカー分子の分配係数 **K_{av}** を次式で算出した。

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

各タンパク質の **K_{av}** に対し、各々のマーカーの分子量の対数値(**log₁₀MW**)を算出し、それぞれを **x**、**y** 軸にプロットすることで検量線を作成した。精製した目的タンパク質の **K_{av}** を同様に求め、検量線上の位置から推定分子量を算出した。

4-2-10. 吸光スペクトルの測定

精製した酵素の吸光スペクトルは **Beckman Coulter** 社製 **DU 800** を用いて波長 **200～800 nm** で測定した。セルは **1 ml** 容石英セルを用いた。測定した溶液 **1 ml** 中の各タンパク質、及び、化合物のモル数を以下に示した。なお、各サンプルは **TG buffer** を溶媒として用い、サンプル添加時の混合はピペッティングにより行った。

タンパク質 or 化合物	1 ml 中のモル数
NADH	400 nmol
FAD	80 nmol
CARDO-R_{IC177}	80 nmol
CARDO-R_{IC177} + NADH	80 nmol + 400 nmol
CARDO-F_{IC177}	80 nmol
CARDO-F_{IC177} + CARDO-R_{IC177}	80 nmol + 2 nmol
CARDO-F_{IC177} + CARDO-R_{IC177} + NADH	80 nmol + 2 nmol + 400 nmol
CARDO-O_{IC177}	80 nmol
CARDO-O_{IC177} + CARDO-F_{IC177}	80 nmol + 2 nmol
CARDO-O_{IC177} + CARDO-F_{IC177} + CARDO-R_{IC177}	80 nmol + 2 nmol + 2nmol
CARDO-O_{IC177} + CARDO-F_{IC177} + CARDO-R_{IC177} + NADH	80 nmol + 2 nmol + 2nmol + 400 nmol

4-2-11. 再構成系での CARDO 活性の測定

再構成系での **CARDO** の活性は、まず、**IC177** 株由来 **CARDO** が再構成系でも活性を有するのかどうかを **GC-MS** を用いた系にて反応生成物の同定を行うことで評価した。また、**CA10/J3** 株の **CARDO** の各コンポーネントとの互換性は **HPLC** で残存 **carbazole** を定量することで活性評価を行った。

<GC-MS を用いた系>

GC-MS は 2-2-15 と同様の操作を行ったが、本実験では内部標準物質として **xanthene** を用いた。**GC-MS** に供するサンプルの調製は以下のように行った。

操作

- ① 下表の組成の反応液を調製した。容器は酢酸エチルに耐えられるようガラス製のマイクロチューブとした。

添加する試薬・タンパク質名	200 μ l の反応系中の量	終濃度
100 mM Fe(NH ₄)(SO ₄)	1 μ l	500 μ M
100 mM NADH	1 μ l	500 μ M
1 mM FAD	1 μ l	5 μ M
CARDO-O _{IC177}	200 pmol	1 μ M
CARDO-F _{IC177}	1000 pmol	5 μ M
CARDO-R _{IC177}	1000 pmol	5 μ M
50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer	全体が 195 μ l になるよう fill up	

5 μ l の 1 mM carbazole を添加し(終濃度 25 μ M)反応をスタートさせた。

- ②10 min、30℃で incubate した後、速やかに 1 N HCl を 10 μ l 添加して、5 μ l の 1 mM xanthene を加えた。
- ③200 μ l の酢酸エチルを加えて 1 min vortex で撹拌した。
- ④3,000 rpm、室温、10 min で遠心し、上清を別のチューブへ移した。
- ⑤硫酸ナトリウムを添加し、vortex で撹拌した。
- ⑥100 μ l をマイクロチューブに分取し、アスピレーターで dry up した。
- ⑦10 μ l の MSTFA (TMS 化剤)を加えて密閉し、70℃で 20 min incubate した。
- ⑧490 μ l の酢酸エチルを添加し、全体で 500 μ l とし、そのうちの 10 μ l を GC-MS に供した。

< HPLC に供するサンプルの調製>

操作

- ①下表の組成の反応液を調製した。容器は 1.5 ml 平底チューブを用いた。

添加する試薬・タンパク質名	200 μ l の反応系中の量	終濃度
100 mM Fe(NH ₄)(SO ₄)	1 μ l	500 μ M
100 mM NADH	1 μ l	500 μ M
1 mM FAD	1 μ l	5 μ M
CARDO-O	200 pmol	1 μ M
CARDO-F	1000 pmol	5 μ M
CARDO-R _{IC177} / CARDO-R _{CA10/J3}	500 pmol / 1000~5000 pmol	2.5 μ M / 5~25 μ M
TG buffer	全体が 195 μ l になるよう fill up	

5 μ l の 1 mM carbazole を添加し(終濃度 25 μ M)反応をスタートさせた。

活性測定の結果、CARDO-R_{CA10}、CARDO-R_{J3} の活性は CARDO-R_{IC177} よりも低く不安定なタンパク質であったため、反応系での添加量を多くした。また、CARDO-R_{CA10}、CARDO-R_{J3} は上記の反応系のように最初から NADH を含む系では活性が落ちてしまうことを示唆する結果を得たため、反応開始を NADH の添加することに変更した新たな系を構築した。その系を以下に示す。但し、両反応系も 1 N HCl を添加する行程以降はすべて同じ操作を行った。

添加する試薬・タンパク質名	200 μ l の反応系中の量	濃度
100 mM Fe(NH ₄)(SO ₄)	1 μ l	500 μ M
1 mM FAD	1 μ l	5 μ M
1 mM carbazole	5 μ l	25 μ M
CARDO-O	200 nmol	1 μ M
CARDO-F	1000 nmol	5 μ M
CARDO-R _{IC177} / CARDO-R _{J3}	500 pmol / 5000 pmol	2.5 μ M / 25 μ M
TG buffer	全体が 190 μ l になるよう fill up	

10 μ l の 10 mM NADH を添加し反応をスタートさせた。

- ②10 min、30℃で incubate した後、速やかに 1 N HCl を 10 μ l 添加した。

③15,000 rpm、4℃、15 min で遠心し、上清を別のチューブへ移した。

④50 µl を HPLC に供した。

反応系に加えた各 CARDO コンポーネントの組み合わせを以下に示した。枠内には由来菌株名を記した。
CA10 株と J3 株の各 CARDO コンポーネント間の相同性は高く (Table 1-1、1-2、1-3)、CARDO-O においては機能に違いがないことが示されている。

CARDO-O	CARDO-F	CARDO-R
IC177	IC177	IC177
IC177	IC177	J3
IC177	CA10	J3
J3	CA10	J3
J3	CA10	IC177
J3	IC177	IC177
IC177	CA10	IC177
J3	IC177	J3

休止菌体反応の基質変換効率は、2-2-15 同様、「反応生成物の 2'-aminobiphenyl-2,3-diol のピークエリア値 / (carbazole のピークエリア値 + 2'-aminobiphenyl-2,3-diol のピークエリア値) × 100 (単位は%)」として算出した。結果は 3 連で行った平均と標準偏差を示した。

<HPLC>

HPLC は Waters 600E Multisolvent Delivery System (Waters, Ltd., USA) を用い、カラムは Senshu-Pak PEGASIL-B ODS column (4.6 by 250 mm) を用いて 30℃ に保って測定を行った。送液のプログラムを以下に示した。

開始からの時間(min)	流速(ml/min)	%蒸留水(HPLC 用)	%acetonitrile
0	0	60	40
10	1	60	40
25	1	0	100
35	1	0	100
35.1	1	60	40
45	1	60	40
45.1	0	60	40

carbazole のピークは購入した標品としての carbazole の保持時間と吸光スペクトルを比較し、carbazole に特徴的な吸収を示す波長 232 nm、及び、291 nm の波長でのピークのエリア値を carbazole の残存量の算出に用いた。本実験は全て 3 連以上で行った。

4-2-12. Cyclic voltammetry

C 末端 His タグ CARDO-F_{IC177} の酸化還元電位を調べるため基本的には Couture ら(2001)の方法に従って行った。測定は ALS/CHI electrochemical analyzer Model 832A (BAS, Inc., USA) を用い、作用極は pyrolytic graphite working electrode (BAS, Inc.) を、対極には白金電極を、参照極には Ag/AgCl reference electrode (Cypress Systems, Inc., USA) を使用した。Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM dithiothreitol) 500 µl 中には CARDO-F_{IC177} を終濃度 190 µM になるよう添加した。CARDO-F_{IC177} から電極への電子の伝達を促進するプロモーターとして neomycin (終濃度 2 mM) を系に加えた。測定は、掃引速度 10 mV/sec で行い、-50 ~ -750 mV の範囲で掃引した。まず、CARDO-F を含まない blank を測定して background を測定し、次に CARDO-F を含むサンプルを測定し

て、その結果から **background** を減算した。実測値の酸化還元電位に+199 mV (本実験では参照電極に Ag/AgCl を用いたため)を加えることで標準水素電極を用いた場合の酸化還元電位の値に換算した。なお、本実験で使
用した機器は東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻分析化学研究室のものを使用させて頂いた。

4-3. 結果と考察

4-3-1. IC177 株由来各 CARDO コンポーネントの発現系の構築

CA10 株、J3 株の CARDO の精製された各コンポーネントにおいて、C 末端側に His タグを付加したものでも機能面で影響が少ないことが示されていた[Nam et al., 2002、Nojiri et al., 2005]。そこで、IC177 株由来のもの(それぞれ CARDO-O_{IC177}、CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177}とする)においても、それぞれの C 末端側に His が 6 個付加された融合タンパク質として発現するよう、pET-26b(+)を基本構造とした発現用プラスミドを構築した(それぞれ pE177503、pE177506、pE177509)。これら発現用プラスミドを保持する大腸菌 BL21(DE3)株について目的タンパク質の発現条件を検討するため、培養温度を 25、30、37℃の 3 通り、添加する IPTG 濃度を 0.1、0.5、1.0 mM の 3 通り、すなわち各タンパク質につき 9 通りの条件で検討した。各条件での粗酵素抽出液を SDS-PAGE (CARDO-F_{IC177}に関しては tricine-SDS-PAGE)に供した結果を Fig. 4-1 に示した。CARDO-O_{IC177}は培養温度 30℃、IPTG 濃度 0.5 mM で、CARDO-F_{IC177}は培養温度 25℃、IPTG 濃度 0.5 mM で、CARDO-R_{IC177}は培養温度 25℃、IPTG 濃度 0.5 mM で良好な発現が観察されたので、今後これらの条件で大量培養・精製を行うこととした。

4-3-2. IC177 株由来各 CARDO コンポーネントの精製

大腸菌を用いて大量に発現させた CARDO-O_{IC177}、CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177} 各々を含む粗酵素抽出液を調製し、第一段階目の精製として、His タグを利用した metal chelation chromatography にてアフィニティー精製を行った。HiTrap カラムに吸着させた各酵素の溶出プロファイルを図 4-2 に示した。目的タンパク質を含むフラクションを回収・濃縮したサンプルを第二段階目の精製としてゲル濾過クロマトグラフィーに供した。ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロファイルを図 4-3 に示した。各精製段階のサンプルを SDS-PAGE に供した。但し、CARDO-F_{IC177}においては Tricine-SDS-PAGE に供し、結果をまとめて Fig. 4-4 に示した。3 つの酵素すべてにおいて、ゲル濾過クロマトグラフィーまで行うことでほぼ単一のバンドになる程度に精製されていることが示された。

各精製酵素は、より native に近い状態で多量体を形成するのかなどを明らかにするため、ゲルろ過クロマトグラフィーにて分子量の推定を行った。CARDO-O_{IC177}と CARDO-R_{IC177}の分子量の推定には Chymotrypsinogen A (MW:25,000)、Ovalbumin (MW:43,000)、BSA (MW:67,000)、Aldolase (MW:158,000)、Blue Dextran 2000 (MW:2,000,000)を(Fig. 4-5A)、CARDO-F_{IC177}の分子量の推定には vitamine B₁₂ (MW:1,355)、cytochrome c (MW:12,384)、Ovalbumin (MW:43,000)、Blue Dextran 2000 (MW:2,000,000)をマーカー分子として用いて検量線を作成した(Fig. 4-5B)。その結果、CARDO-O_{IC177}、CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177}はそれぞれ 123.6、5.5、36.5 kDa と推定された。塩基配列から予想された CARDO-O_{IC177}、CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177}の monomer としての分子量は、それぞれ、44,694、13,129、42,447 であったことから、CARDO-O_{IC177}においては native の状態では trimer (α_3)を形成していることが予想された。立体構造が明らかになっている J3 株の CARDO-O では 3 つのサブユニットで trimer を形成することが明らかになっている[Nojiri et al., 2005、本論文第一章]。また、現在までに立体構造が明らかになっている 8 種の ROS の terminal oxygenase コンポーネントは、全て α_3 もしくは $\alpha_3\beta_3$ である[Ferraro et al., 2005]。CARDO-F_{IC177}においては monomer として存在していることが推定され、現在までに詳細な解析がなされ、かつ

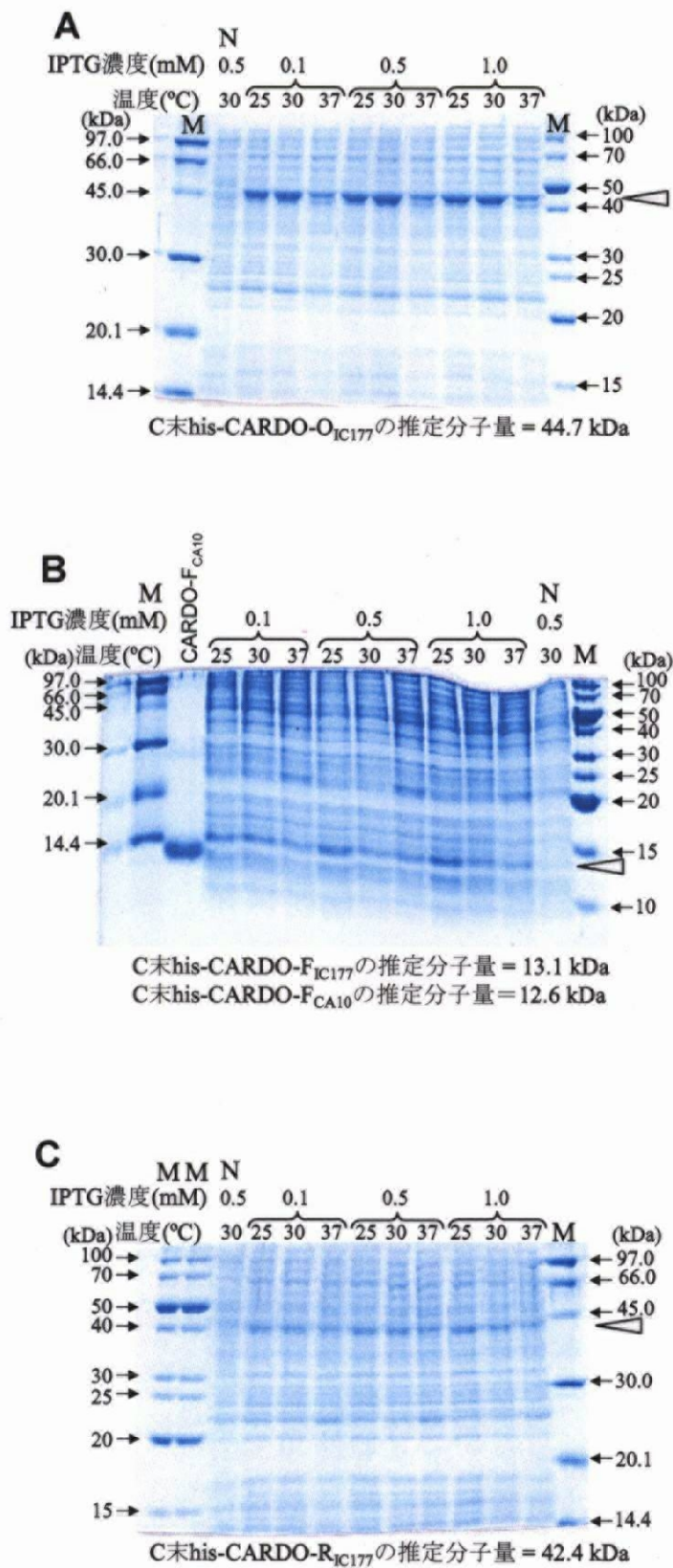


Figure 4-1. IC177株由来CARDOコンポーネント発現条件の検討。Mはmarker、NはネガティブコントロールのpET-26b(+)を保持するBL21(DE3)株の可溶性画分。目的タンパク質のバンドの位置は◀で示した。サンプルは全て可溶性画分。(A) C末his-CARDO-Oを発現させた大腸菌の粗酵素のSDS-PAGEの結果。泳動に供したタンパク質量は全て6 μ gとした。(B) C末his-CARDO-Fを発現させた大腸菌の粗酵素のTricine-SDS-PAGE結果。泳動に供したタンパク質量はCARDO-F_{CA10}が6 μ g、その他のサンプルは全て8 μ gとした。(C) C末his-CARDO-Rを発現させた大腸菌の粗酵素のSDS-PAGEの結果。泳動に供したタンパク質量はすべて8 μ gとした。

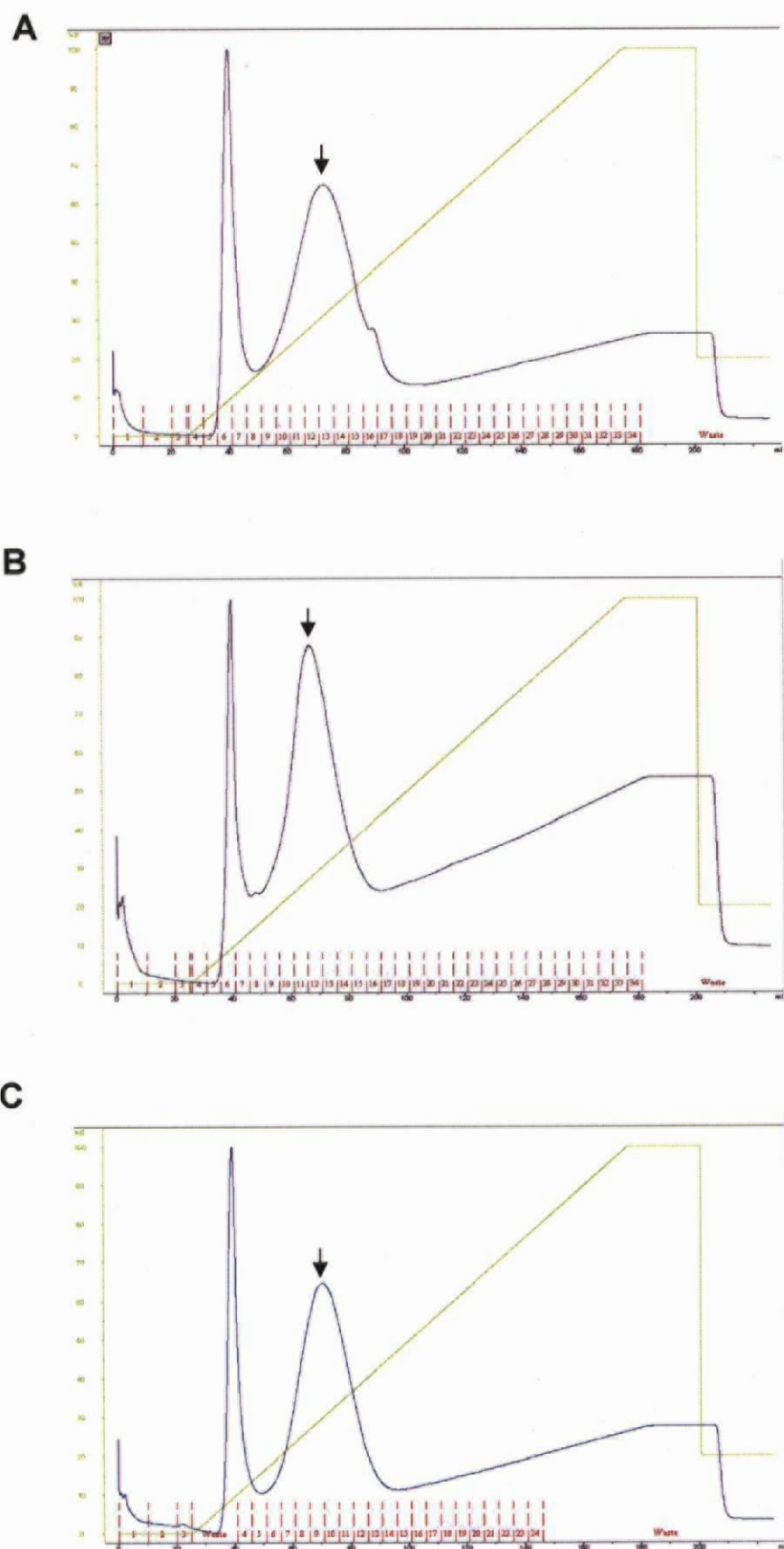


Figure 4-2. IC177株由来CARDO-O (A)、CARDO-F (B)、CARDO-R (C)のアフィニティークロマトグラフィーの溶出プロファイル。目的タンパク質のピークは矢印で示した。青い線がタンパク質由来の波長 280 nmの吸光度、黄緑色の線はbuffer B (300 mMimidazoleを含む)の割合(縦軸)、赤の線と数字はフラクションを示す。目的タンパク質を含む一部のフラクションのみを回収した。

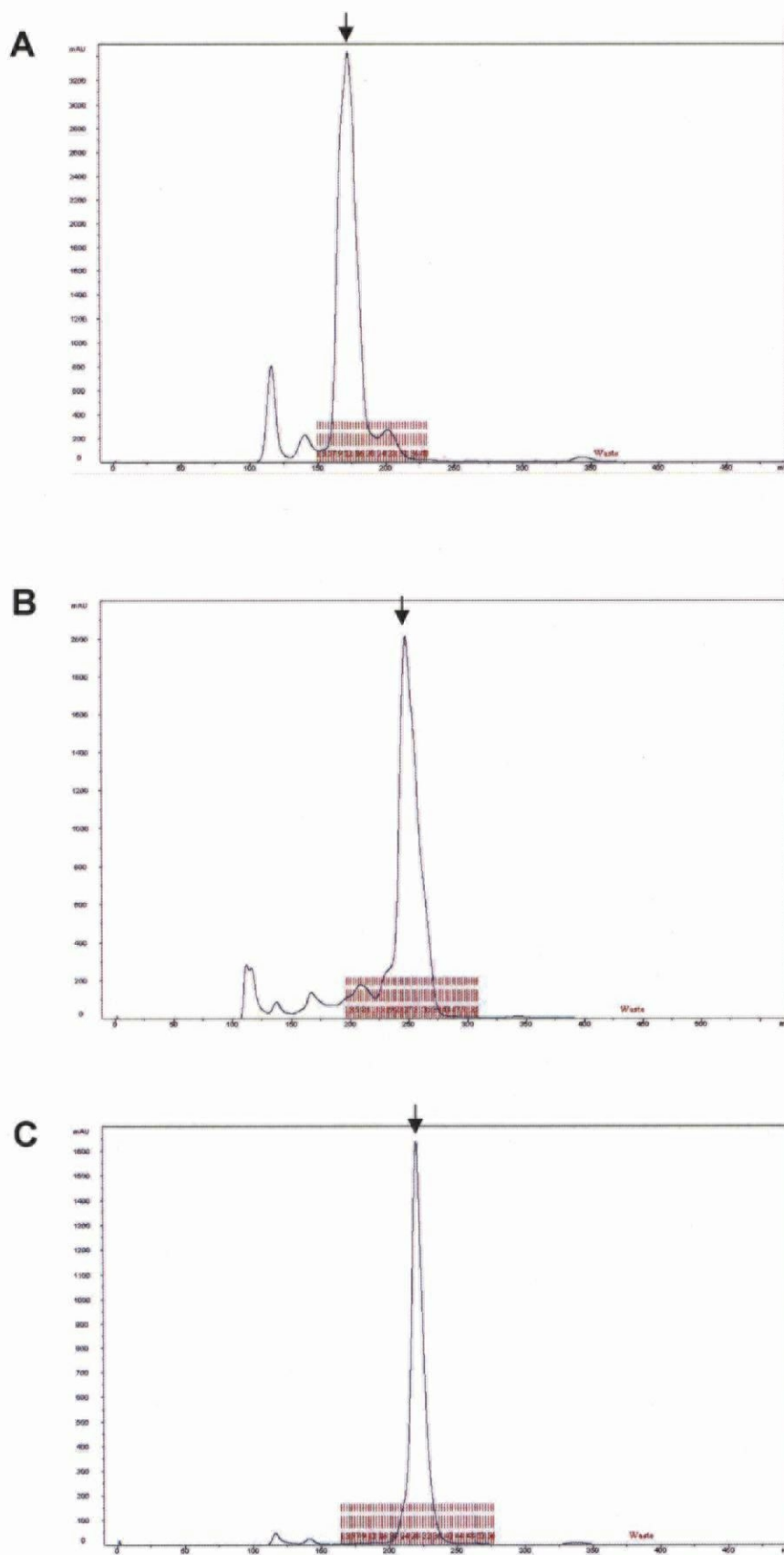


Figure 4-3. IC177株由来CARD-O (A)、CARD-F (B)、CARD-R (C)のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロファイル。目的タンパク質のピークは矢印で示した。曲線はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度(縦軸)、赤の線と数字はフラクションを示す。目的タンパク質を含む一部のフラクションのみを回収した。

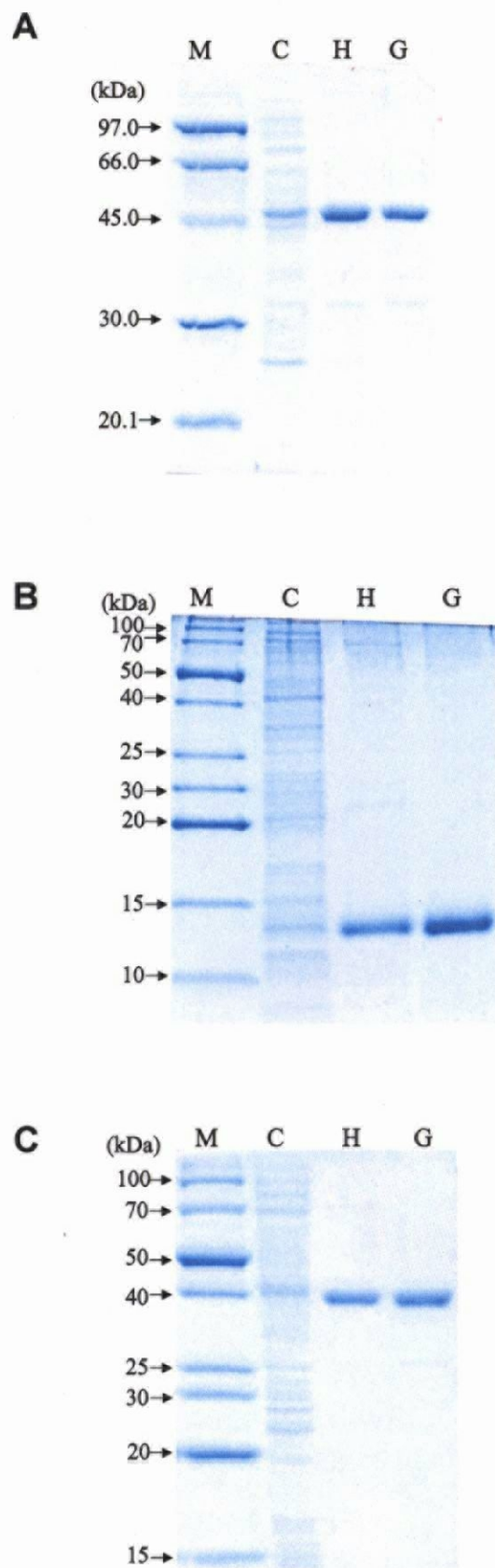
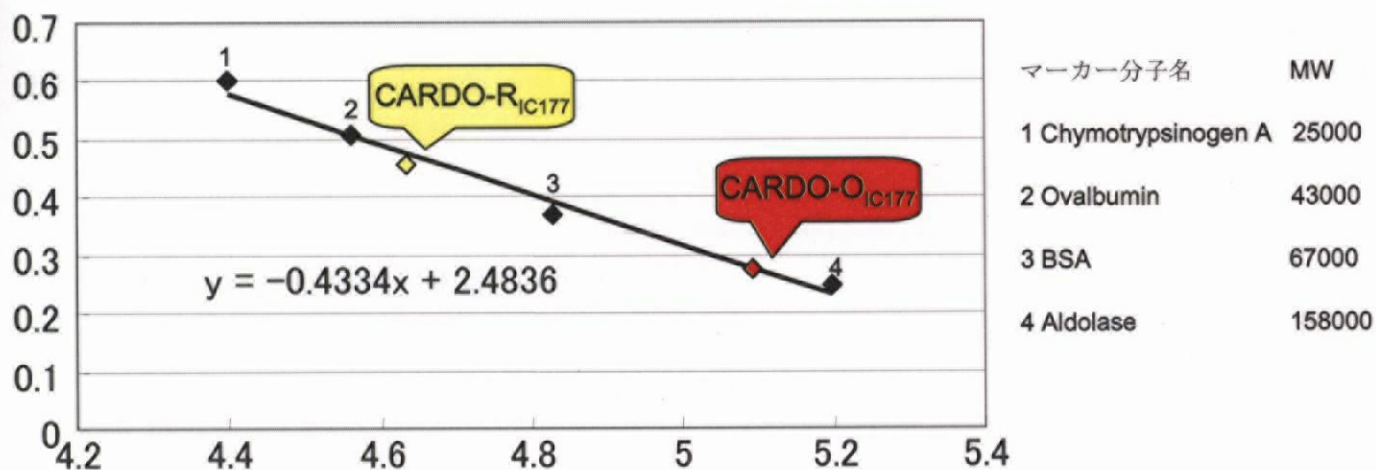


Figure 4-4. IC177株由来CARDOコンポーネントの精製状態の確認。Mはmarker、C、H、Gはそれぞれ粗酵素抽出液(crude)、HiTrapカラムによるアフィニティー精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製後のサンプル。(A) CARDO-OのSDS-PAGEの結果。サンプルは2 μ g供した。(B) CARDO-FのTricine-PAGEの結果。サンプルは2 μ g供した。(C) CARDO-RのSDS-PAGEの結果。サンプルは1 μ g供した。

A



B

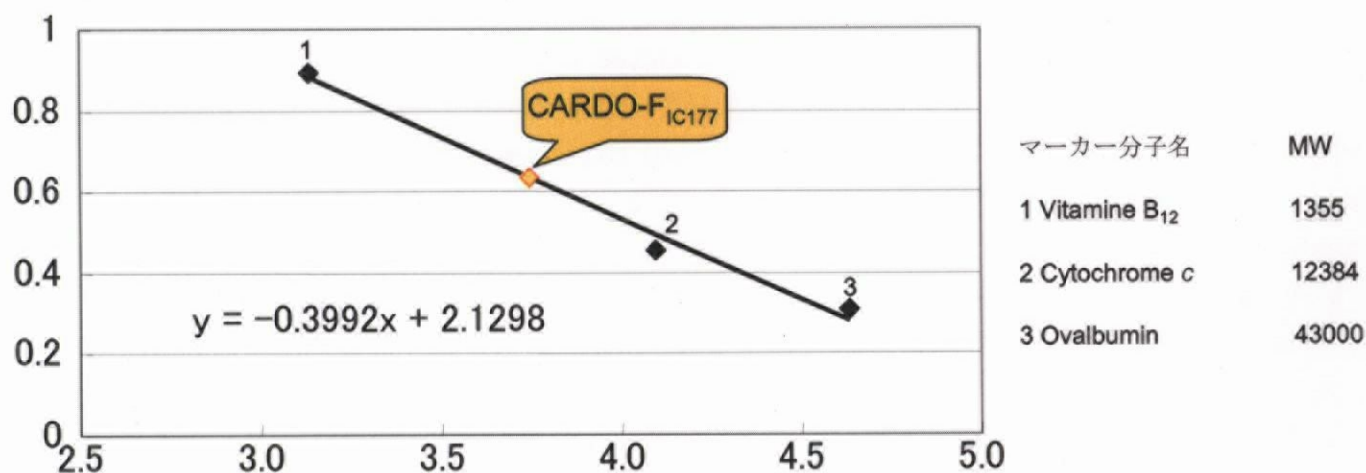


Figure 4-5. ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量の推定のための検量線。横軸は $\log_{10}(\text{MW})$ 、縦軸は分配係数(K_{av})を示す。各検量線の数式も示した。精製されたCARDO-O_{IC177}、CARDO-R_{IC177}は(A)、CARDO-F_{IC177}は(B)の検量線にて分子量を推定した。

構造が明らかになっている ROS の ferredoxin (BDO-F_{LB400} と CARDO-F_{CA10})は共に monomer として機能することが明らかになっている[Colbert et al., 2000、Nam et al., 2005]。CARDO-R_{IC177}においても monomer であることを示唆する結果が得られた。*Acidovorax* sp. KKS102 株由来 BDO-R の立体構造が解明されており[Senda et al., 2000]、BDO-R_{KKS102} のゲル濾過クロマトグラフィーの結果からは dimer を形成する結果が得られているが[Senda et al., 2000]、立体構造は dimer ではなく monomer の構造として明らかになっている。但し、BDO-R_{KKS102} と同じモチーフを持ち、高い立体構造での類似性を示す①glutathione reductase family に属する酵素[Shculz et al., 1978、Karplus et al., 1987]や②apoptosis-inducing factor と呼ばれるミトコンドリア内の flavoprotein [Maté et al., 2002]では、共に dimer で活性型酵素として機能することが示されている。IC177 株の CARDO-R が monomer か dimer どちらで活性型酵素として機能するかは、今後、活性測定に用いた buffer などでの 4 次構造の解析、及び、立体構造解析により明らかになると考えられる。

4-3-3. 各 CARDO コンポーネントの UV/可視吸収スペクトル

推定アミノ酸配列とこれまでの知見から、CARDO-O_{IC177}、CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177} はそれぞれ[2Fe-2S]クラスターと 1 つの Fe イオン(Fe²⁺もしくは Fe³⁺で酵素の酸化還元状態による。活性中心の非ヘム鉄。)、[2Fe-2S]クラスター、FAD を持つと予想された(本論文 3-3-1)。このようなタンパク質は酸化状態で、補因子に由来する特徴的な可視吸収スペクトルを示すことが知られており、IC177 株の CARDO-O、CARDO-F、CARDO-R においても目視でそれぞれ特徴的な色の観察ができた(Fig. 4-6)。また、酸化還元酵素は酸化状態、還元状態によってその吸収スペクトルが変化することも知られている。そこで、精製した IC177 株の CARDO-O、CARDO-F、CARDO-R がそのような補因子を保持した状態で精製されているかどうか、酸化還元能を有しているのかどうか、を確認するため、各コンポーネントの UV/可視吸収スペクトルを測定した。

空気酸化された状態の CARDO-R_{IC177} (80 μ M 溶液)の吸収スペクトルは、384、453 nm に最大吸収が、477 nm にショルダーピークが観察された(Fig. 4-7)。これらの吸収スペクトルは flavoprotein とよばれるタンパク質に特徴的な吸収スペクトルと一致した。CARDO-R_{IC177} の補因子と考えられた FAD (80 μ M)についても吸収スペクトルを測定したところ(Fig. 4-7)、CARDO-R_{IC177} の 384、453 nm とほぼ同じ波長での吸収が観察された(Fig. 4-7)。よって、CARDO-R_{IC177} は補因子として FAD を保持し、384、453 nm の吸収は補因子である FAD に由来するものであると考えられた。CARDO-R_{IC177} (80 μ M 溶液)に終濃度 400 μ M となるように NADH を添加したところ、それら 384、453、477 nm のピークが観察されなくなった。これにより、CARDO-R_{IC177} は電子供与体である NADH からの電子の供給により、補因子の FAD が還元されたことが示唆された。ROS の分類において IC177 株の CARDO と同じ class IIB に分類される biphenyl dioxygenase (BDO)やtoluene dioxygenase (TDO)における ferredoxin reductase でも同様の吸収スペクトルの結果が得られている[Subramanian, et al., 1981、Hurtubise et al., 1995]。しかし、CARDO-R_{CA10} では観察された plant-type [2Fe-2S] cluster 由来の 550 nm 付近のショルダーピーク[Nam et al., 2002]は観察されなかったことから、CARDO-R_{IC177} は補因子として[2Fe-2S] cluster を持たないことが示唆された。

CARDO-F_{IC177} (80 μ M 溶液)の吸収スペクトルは、326、461 nm に最大吸収が、591 nm に広いショルダーピークが観察された(Fig. 4-8)。これらのピークは Rieske-type [2Fe-2S] cluster に特徴的な吸収である。CARDO-F_{IC177} 溶液に CARDO-R_{IC177} を少量(終濃度 2 μ M)加えても吸収スペクトルに

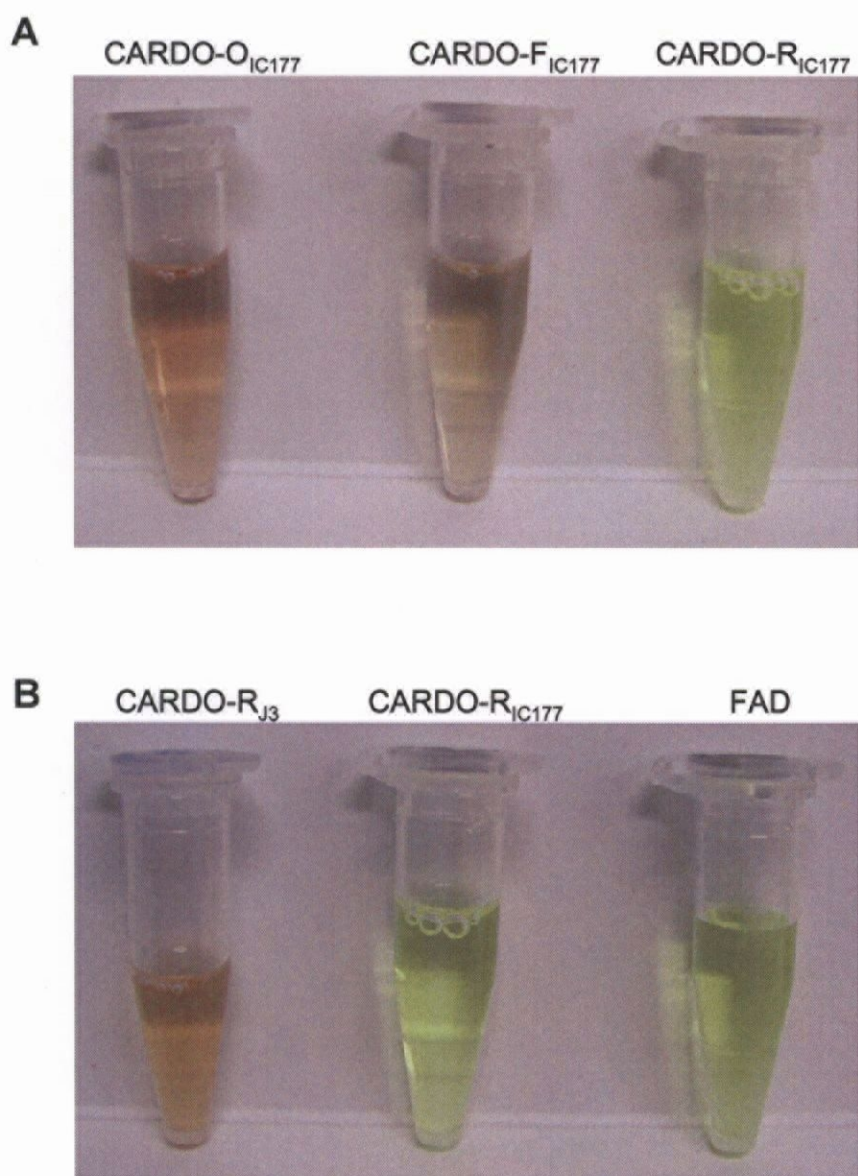


Figure 4-6. 精製された各CARDOコンポーネント溶液の写真。(A) 精製されたIC177株由来のCARDO-O、-F、-R溶液はそれぞれ茶褐色、茶色、黄色を示した。溶液濃度は80 μ M。(B) 精製されたJ3株由来CARDO-R、IC177株由来CARDO-R、及び、FAD溶液。溶液濃度は80 μ M。CARDO-R_{J3}はCARDO-R_{IC177}と異なり、FAD以外に補因子として[2Fe-2S]を含むため、茶褐色を示すと考えられる。

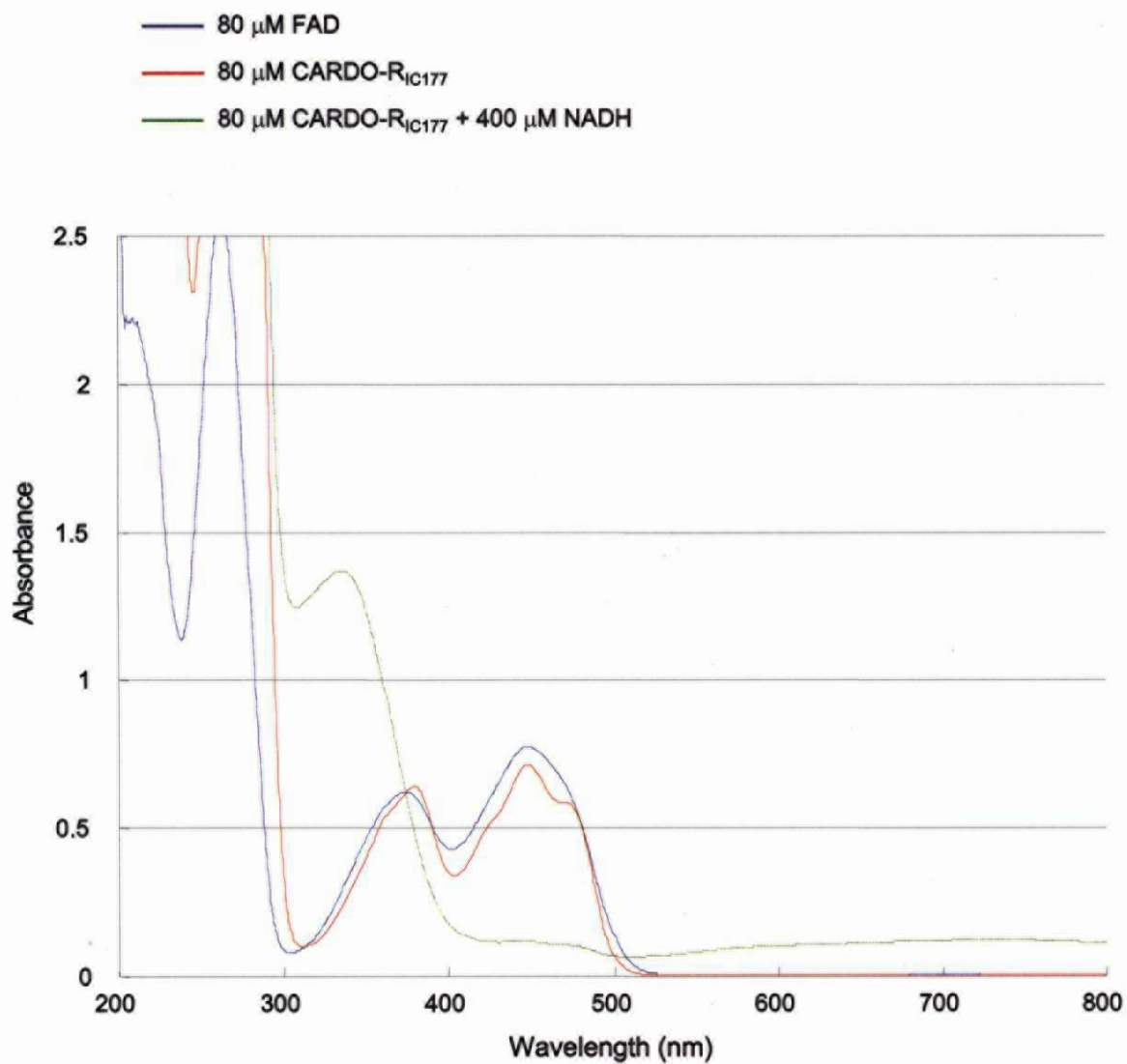


Figure 4-7. 精製されたCARDO-R_{IC177}(酸化状態)、FAD、及びNADHにより還元されたCARDO-R_{IC177}の吸収スペクトル。縦軸は波長280 nmの吸光度、横軸は波長を示す。

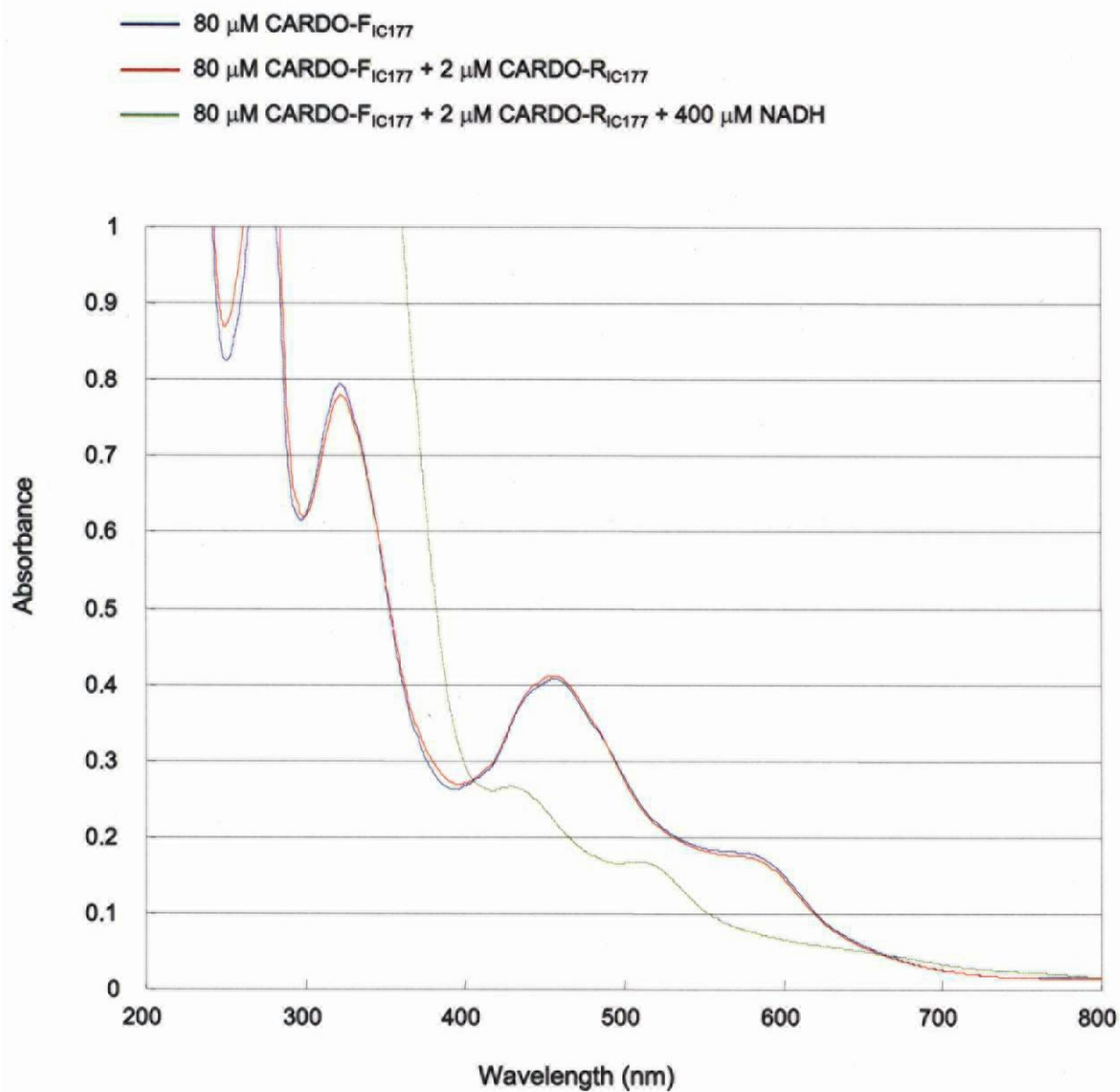


Figure 4-8. 精製されたCARDO-F_{IC177}(酸化状態)、CARDO-F_{IC177}(酸化状態)にCARDO-R_{IC177}を添加したもの、及び、NADHとCARDO-R_{IC177}により還元されたCARDO-F_{IC177}の吸収スペクトル。縦軸は波長280 nmの吸光度、横軸は波長を示す。

変化は見られなかったが、さらに NADH (終濃度 400 μM) を添加したところ、吸収スペクトルは大きく変化し、Rieske-type [2Fe-2S] cluster 由来の吸収と思われるピークは消失し、それらとは異なる波長、441、522 nm に新たなピークが現れた(Fig. 4-8)。これにより、CARDO-F_{IC177} は NADH により還元された CARDO-R_{IC177} から電子を受け取って還元されたことが示唆された。BDO、TDO、CARDO_{CA10} における ferredoxin においても同様の結果が得られている[Subramanian et al., 1985、Hurtubise et al., 1995、Haddock, et al., 1997、Nam et al., 2002]。

CARDO-O_{IC177} (80 μM 溶液)の吸収スペクトルは、CARDO-F_{IC177} 同様、Rieske-type [2Fe-2S] cluster 由来と思われる、327、463 nm に最大吸収が、560 nm に広いショルダーピークが観察された(Fig. 4-9)。CARDO-O_{IC177} 溶液に CARDO-F_{IC177}、及び、CARDO-F_{IC177} と CARDO-R_{IC177} を少量(各々終濃度 2 μM ずつ)加えても吸収スペクトルに変化は見られなかったが、さらに NADH (終濃度 400 μM) を添加したところ、吸収スペクトルは変化し、Rieske-type [2Fe-2S] cluster 由来の吸収と思われるピークは消失し、それらとは異なる波長、457、538 nm に新たなピークが現れた(Fig. 4-9)。これにより、CARDO-O_{IC177} は NADH から CARDO-R_{IC177}、CARDO-F_{IC177} を介して電子を受け取り、還元されたことが示された。CARDO-O_{CA10} [Nam, et al., 2002]、や BDO-O [Hurtubise et al., 1995、Haddock et al., 1995]においても同様の吸収スペクトルが得られている。

以上の結果より、精製された CARDO-O_{IC177}、CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177} の His タグ融合タンパク質は予想された補因子を保持することが示唆された。また、CARDO-R_{IC177} は NADH からの電子を CARDO-F_{IC177} に伝え、CARDO-F_{IC177} は CARDO-O_{IC177} への電子を伝達できることが示された。

4-3-4. GC-MS による再構成系での CARDO 活性の測定

精製された CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177} が NADH からの電子を CARDO-O_{IC177} に伝達できることが示されたので、精製された CARDO-O_{IC177} が実際に carbazole に対して酸素添加反応を触媒出来るのかどうかを *in vitro* の再構成系にて検証した。Nam ら(2002)による carbazole を基質とした CARDO の再構成系を基に構築した反応系と GC-MS による反応生成物の検出により、IC177 株の CARDO 活性の有無を調べた。

反応系には、各 CARDO コンポーネント以外に、補因子として Fe イオンを供給するため $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ と FAD を添加し、NADH は 500 μM (基質の carbazole [終濃度 25 μM] の 20 倍量[mol 比])添加した。Carbazole (終濃度 25 μM) を添加した時点で反応開始とし、10 分間 30°C で反応させた後、1 N HCl を添加することで停止させた。反応液を酢酸エチル抽出し、TMS 化後 GC-MS に供したところ、angular dioxygenation 産物である 2'-aminobiphenyl-2,3-diol が検出され、基質変換効率は 54.6 (± 9.0)%であった。CARDO-O_{J3} の変異酵素(I262V など)では検出されている反応生成物である 1-hydroxycarbazole [Uchimura et al., unpublished data、宇佐美, 本年度博士論文]は全く検出されなかった。反応系内に CARDO-O、-F、-R、carbazole、NADH、 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ いずれか 1 つのみを加えなかった場合、反応生成物である 2'-aminobiphenyl-2,3-diol は検出されなかった。この結果のうち、CARDO-F を系に加えなかった場合に活性が検出されなかったことから、CARDO-R から CARDO-O に直接電子が伝達される(CARDO-F を介さずに電子伝達が行われる)ことがないことが示された。

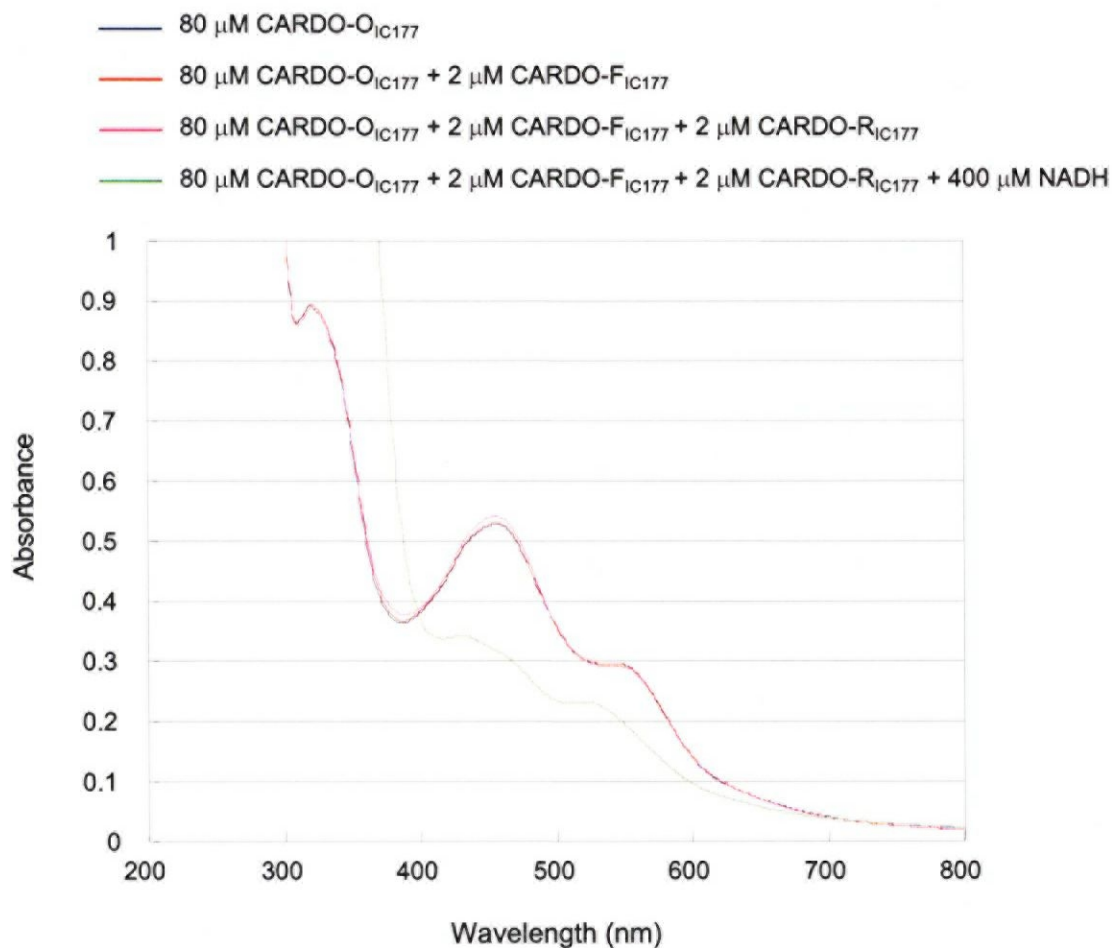


Figure 4-9. 精製されたCARDO-O_{IC177}(酸化状態)、CARDO-O_{IC177}にCARDO-F_{IC177}を添加したもの、CARDO-O_{IC177}にCARDO-F_{IC177}とCARDO-R_{IC177}を添加したもの、及び、NADH、CARDO-F_{IC177}、CARDO-R_{IC177}により還元されたCARDO-O_{IC177}の吸収スペクトル。縦軸は波長280 nmの吸光度、横軸は波長を示す。

4-3-5. IC177 株と CA10/J3 株由来 CARDO の電子伝達鎖の互換性の解析

これまでの研究により、J3 株由来 CARDO-O の単体と CA10 株由来 CARDO-F の単体とこれらの複合体の X 線結晶構造解析が行われ立体構造が明らかになっている[Nojiri et al., 2005、Nam et al., 2005、Ashikawa et al., 2006]。また、J3 株由来 CARDO-R についても X 線結晶構造解析が試みられ、分解能 2.9 Å の反射データが得られている[芦川, 平成 17 年度博士論文]。CARDO-O_{J3} と CARDO-F_{CA10} の複合体から、両者において相互作用するアミノ酸残基が示されている(Fig. 1-8)。そこで、IC177 株の CARDO との比較から、CARDO のアミノ酸レベルでの違いがどの程度電子伝達の可不可に影響を与えるのかを明らかにするため、CARDO-O_{J3}、CARDO-F_{CA10}、CARDO-R_{J3} と IC177 株由来の各 CARDO コンポーネントとの互換性を解析した。なお、これまでの解析により CA10 株と J3 株由来 CARDO 間で機能面での違いはないことが示されているため、以下、CA10 株と J3 株の CARDO をまとめて class III 型 CARDO とした。また、アミノ酸レベルの identity として、CARDO-O_{IC177} と CARDO-O_{J3} が 45%、CARDO-F_{IC177} と CARDO-F_{CA10} が 31%、CARDO-R_{IC177} と CARDO-R_{J3} が 15%である(Table 1-1、1-2、1-3)。

前項にて IC177 株の精製酵素を用いた再構成系での CARDO 活性は GC-MS を用いて確認したが、GC-MS での系では、酢酸エチル抽出、TMS 化の操作を行わなければならない、煩雑になってしまうため、互換性の解析では HPLC による残存 carbazole を定量することで CARDO 活性を評価した。結果を Fig. 4-10 に示した。IC177 株由来の CARDO の CARDO-R のみを class III 型の CARDO-R に置き換えて活性を測定したところ、残存 carbazole はネガティブコントロールの 32.9%であり、本来のもの(2.4%)よりも弱いながらも有意な CARDO 活性が認められた。しかし、IC177 株の CARDO の CARDO-F と CARDO-R の 2 つを class III 型のものに置き換えたところ、95.5%であり、殆どの carbazole が変換されなかった。今度は、class III 型の CARDO の CARDO-R のみを IC177 株の CARDO-R に置き換えて活性を測定したところ、43.6%であり、本来のもの(7.5%)よりも弱いながらも有意な CARDO 活性が認められた。しかし、class III 型 CARDO の CARDO-F と CARDO-R の 2 つを IC177 株のものに置き換えたところ、81.7%と、一部の carbazole が変換された程度であった。また、IC177 株、class III 型それぞれの CARDO-F のみを入れ替えた場合も CARDO 活性は認められなかった。以上の結果から、本来の組み合わせで最も活性が高いことが明らかになった。また、CARDO-R 同士を入れ替えた場合には有意な活性があったことから、CARDO-F と CARDO-R 間の特異性は低く、CARDO-R に互換性があることが明らかになった。しかし、CARDO-F を入れ替えた場合は活性が殆ど認められないことから、CARDO-O と CARDO-F 間の特異性が高いことが明らかになった。

これまでに、ROS に分類される酵素について生化学的な解析がなされた報告例が多数あり、その中で電子伝達コンポーネントを別の電子伝達タンパク質と置き換えて互換性についての解析を行った幾つかの例が報告されている。IC177 株と同じ class IIB に分類される ROS の 1 つである、*Pseudomonas putida* F1 株由来 toluene dioxygenase (TDO)においては、TDO-R をほうれん草由来由来 ferredoxin reductase に置き換えても活性を有していたが[Gibson et al., 1982]、TDO-F をほうれん草由来 ferredoxin [Matsubara et al., 1968]、*Clostridium pasteurianum* 由来 ferredoxin [Lovenberg et al., 1963]、*Pseudomonas putida* 由来 putidaredoxin [Gunsalus and Lipscomb, 1973]、牛の副腎由来 adrenodoxin [Omura et al., 1966]に置き換えても活性は検出されなかった[Subramanian et al., 1985]。別の class IIB の ROS である *Comamonas testosteroni* B-356 株由来 biphenyl dioxygenase (BDO)においても、同様に、BDO-R をほうれん草由来 ferredoxin reductase に置き換えると活性が

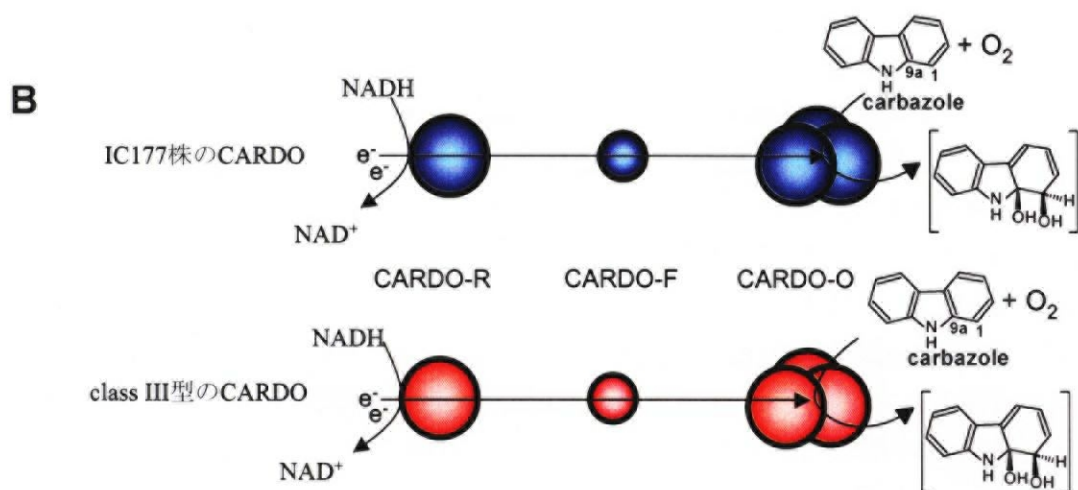
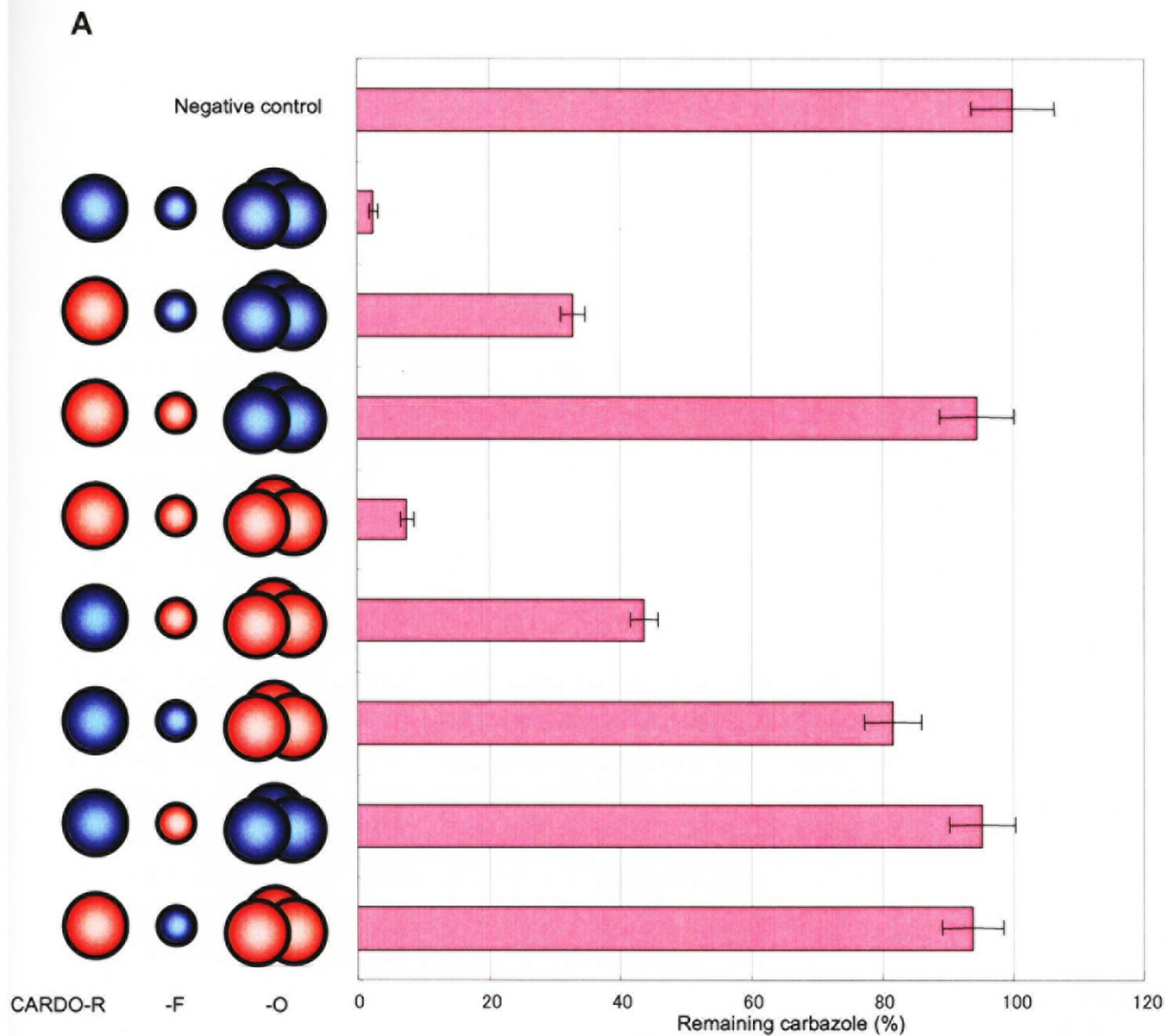


Figure 4-10. IC177株とCA10/J3株(class III型)由来CARD-Oの電子伝達鎖の互換性の解析。(A)再構成系でのCARD-O活性測定の結果。HPLCにより残存carbazole量(特徴的な波長232 nmでのピーク面積)を示した。ネガティブコントロールを100%とした。青がIC177株由来、赤がclass III型CARD-Oのコンポーネントを示した。(B) CARD-Oシステムにおける電子の伝達方向を表わした模式図。

検出されたが、BDO-F をほうれん草由来 ferredoxin や clostridial ferredoxin に置き換えた場合は活性が検出されなかった[Hurtubise et al., 1995]。また、BDO においては BDO-R を *Pseudomonas putida* G7 株由来 naphthalene dioxygenase (NDO) の NDO-R [Simon et al., 1993] と置き換えた場合には活性が検出されたが、NDO-F と -R を BDO-F と -R に置き換えたものでは活性が検出されなかった[Barriault and Sylvestre, 1999]。当研究室で以前行われた CA10 株の CARDO における解析でも、CARDO-R_{CA10} をほうれん草由来 ferredoxin reductase に置き換えた場合は活性が検出されたのに対し、CARDO-F_{CA10} をほうれん草由来もしくは *C. pasteurianum* 由来 ferredoxin に置き換えても活性は殆ど検出されなかった[Nam et al., 2002]。以上の報告例はいずれも、本研究の結果同様、ferredoxin reductase コンポーネントと ferredoxin コンポーネント間の特異性は低く、terminal oxygenase コンポーネントと ferredoxin コンポーネント間の特異性は比較的高いことを示していた。最近の研究例として、class III に属する ROS の 1 つである *Acidovorax* sp. JS42 株の 2-nitrotoluene dioxygenase (2NTDO) がある。2NTDO システムにおける 2NTDO-F を NDO-F (2NTDO-F とはアミノ酸レベルでの identity は 72%)、BDO-F (40% identity)、TDO-F (36% identity) に置き換えた場合、NDO-F と入れ替えたときのみ活性が検出された[Parales, 2005]。すなわち、アミノ酸レベルで 72% と高い identity を持つタンパク質同士でようやく terminal oxygenase と ferredoxin 間に互換性が生まれるという結果を示していた。当研究室においても現在結晶構造が明らかになっている KA1 株由来の CARDO-O_{KA1} (*carAaII* の翻訳産物; Katsuki et al., unpublished) は CARDO-O_{J3} と 57% と高い identity を有しているにもかかわらず、本章と同様の解析により、KA1 株と class III 型の CARDO 間での電子伝達鎖の互換性は CARDO-O と CARDO-F 間では厳密な特異性があるのに対し、CARDO-F と CARDO-R 間では互換性が存在したことが明らかになっている[浦田雅章, 2004]。今後、KA1 株の CARDO-F の立体構造解析を行うことで、電子伝達のための相互作用に必要なアミノ酸残基や 3 次元的な構造学的特徴などが明らかになっていくものと考えられる。

4-3-6. IC177 株由来 CARDO-F の酸化還元電位の測定

呼吸鎖や光合成系の研究で知られるように、電子伝達タンパク質は各々決まった酸化還元電位の値を持ち、一般に、酸化還元電位の低いタンパク質から高いタンパク質へと電子が伝達される。1 つのタンパク質内に複数の電子伝達中心がある場合はその電子伝達中心毎に酸化還元電位がある。CARDO においても各コンポーネントに酸化還元電位があり、電子伝達に重要な意味を持つ。これまで報告されている Rieske-type の ferredoxin の立体構造では、Rieske [2Fe-2S] cluster は分子表面にむき出しになっていた(Fig. 1-7, [Colbert et al., 2000, Nam et al., 2005])。この特徴は cyclic voltammetry による酸化還元電位の測定に向いており、CARDO-F 分子が直接電極に電子を渡すことができる可能性が高い。そこで、CARDO-F_{IC177} の characterization の一貫として、CARDO-F の酸化還元電位を cyclic voltammetry により測定した。Cyclic voltammograph を Fig. 4-11 に示した。酸化還元電位は 3 回掃引して得られた酸化還元電位の値の平均を算出し、一般的な標準水素電極による標準酸化還元電位に換算したところ、-185 mV であった。以前の研究により、CA10 株の CARDO-F と *Burkholderia* sp. LB400 株由来の BDO-F の酸化還元電位が測定されており、それぞれ、-169 mV、-157 mV であった(共に標準水素電極による標準酸化還元電位に換算した値)。IC177 株の CARDO-F はこれらよりも若干低い値であったが、大きな違いではなかった。これまでに、ROS に分類される酵素における terminal oxygenase コンポーネントの [2Fe-2S] cluster の酸化還元電位は -50 ~ -150 mV 程度と報告されており[Correl et al., 1992, Rosche et al., 1995,

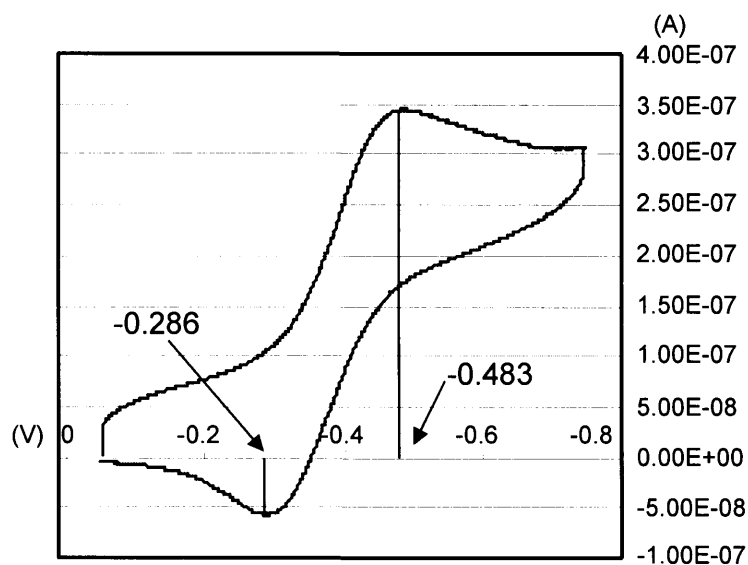


Figure 4-11. IC177株由来CARDO-Fのcyclic voltammetryによる測定結果。横軸が電位、縦軸が電流。このデータから得られる酸化還元電位は $(-0.286 + -0.483)/2 = -0.3845$ Vとなり、この値に0.199を加えた -0.1855 V = -185.5 mVを標準水素電極を用いた場合の標準酸化還元電位とした。

Riedel et al., 1995、Beharry et al., 2003、Tarasev et al., 2006]、IC177 株の CARDO-O も同様の酸化還元電位とすると、CARDO-F が -185 mV なので、それよりも高いことが予想され、十分に電子伝達が可能であると考えられた。今後、実際に IC177 株の CARDO-O 及び、CARDO-R、J3 株の CARDO-O と CARDO-R の酸化還元電位の値も測定することによって、前項で明らかになった互換性を決める要因がより明確になるものと考えられる。