

硫酸還元菌の酸化還元蛋白質の遺伝子工学的研究

北村昌也

博士論文

硫酸還元菌の酸化還元蛋白質の
遺伝子工学的研究

指導教官：渡辺 公綱 教授

工学系研究科工業化学専攻 97143

北村 昌也

(1994年3月)

目 次

第1章 緒言

1-1 硫酸還元菌の生物学	2
1-2 硫酸還元菌酸化還元タンパク質とタンパク質工学	4

第2章 シトクロム c_3

2-1 シトクロム c_3 の性質	13
2-2 実験方法	14
2-2-1 シトクロム c_3 遺伝子のクローニング	14
2-2-2 アミノ酸配列分析	16
2-2-3 シトクロム c_3 遺伝子の発現系の構築	17
2-3 実験結果	19
2-3-1 シトクロム c_3 遺伝子のクローニング	19
2-3-2 アミノ酸配列分析	19
2-3-3 シトクロム c_3 遺伝子の発現	19
2-4 考察	20
2-4-1 シトクロム c_3 遺伝子のクローニング	20
2-4-2 アミノ酸配列の確認	21
2-4-3 シトクロム c_3 遺伝子の発現	22
2-5 シトクロム c_3 の遺伝子工学的研究の今後	24

第3章 シトクロム c_{553}

3-1 シトクロム c_{553} タンパク質としての性質	39
3-2 実験方法	40
3-2-1 シトクロム c_{553} 遺伝子のクローニング	40
3-2-2 翻訳産物の相同タンパク質の解析	41
3-3 実験結果	41
3-3-1 シトクロム c_{553} 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定	41
3-3-2 シトクロム c_{553} 遺伝子より下流の遺伝子構造	42
3-3-3 ORF-4 の検討	42
3-4 考察	43
3-5 シトクロム c_{553} の遺伝子工学的研究の今後	46

第4章 FMN結合タンパク質

4-1 フラビンタンパク質	64
4-2 実験方法	66
4-2-1 FMN結合タンパク質遺伝子のクローニングと塩基配列の決定	66
4-2-2 FMN結合タンパク質の精製	66
4-2-3 補欠分子族の同定	67
4-2-4 ペプチド部分のアミノ酸配列決定	68
4-2-5 FMN結合タンパク質の <i>in vitro</i> での活性	68
4-2-6 FMN結合タンパク質の存在確認	69
4-2-7 FMN結合タンパク質の高発現系の構築	70
4-3 実験結果	72
4-3-1 FMN結合タンパク質遺伝子のクローニングと塩基配列の決定	72
4-3-2 FMN結合タンパク質の精製	73
4-3-3 補欠分子族の同定	73
4-3-4 ペプチド部分のアミノ酸配列決定	73
4-3-5 FMN結合タンパク質の <i>in vitro</i> での活性	76
4-3-6 FMN結合タンパク質の存在確認	77
4-3-7 FMN結合タンパク質の高発現系の構築	77

4-4 考察	77
4-4-1 FMN結合タンパク質遺伝子のクローニングと塩基配列の決定	77
4-4-2 FMN結合タンパク質の精製	78
4-4-3 補欠分子族の同定	80
4-4-4 ペプチド部分のアミノ酸配列決定	80
4-4-5 FMN結合タンパク質の <i>in vitro</i> での活性	80
4-4-6 FMN結合タンパク質の存在確認	81
4-4-7 FMN結合タンパク質の高発現系の構築	81
4-4-8 FMN結合タンパク質の構造的知見	82
4-5 現在進行しているFMN結合タンパク質の研究	82
4-6 追記	83

実験条件

5-1 硫酸還元菌からのゲノムDNAの抽出	113
5-2 制限酵素によるDNAの切断	114
5-3 サザンハイブリダイゼーション・コロニーハイブリダイゼーション	115
5-4 大腸菌の形質転換	116
5-5 大腸菌からのプラスミッドDNAの抽出	117
5-6 欠失変異体の作成	118
5-7 ダイデオキシ法による塩基配列決定法	120
5-8 部位特異的変異法	121
5-9 SDS-PAGEとイムノプロテイング法	123
5-10 試薬・溶液	124

参考文献	129
結び	140
謝辞	143
論文リスト	146

第1章 緒言

生物の原形質には、0.4%から1%程度イオウが有機化合物の形で存在している。すなわち、例えば、メチオニンやシステインといった含硫アミノ酸やビオチンやパントテン酸といった補酵素であるが、このようにイオウが生物に利用されるためには、窒素の場合と同じく還元状態になければならない。今日の地球上では、緑色植物や酵母なども硫酸塩を還元して使う（同化型）こともできるが、少なくとも5億年前までは、酸化された形が支配的であり、さらに、地球上にまだ酸素が少なかった27億年前には、絶対嫌気性細菌である硫酸還元菌が硫酸塩を還元することにより（異化型）、イオウ循環の一端、すなわち硫酸イオンを硫化物イオンに変える反応のすべてを担っていたと考えられている¹⁾（図1-1）。

硫酸還元菌には、還元するイオウの同位体を選択的に利用するという興味深い性質を持っている。イオウは、天然に ^{32}S と ^{34}S という同位体が存在する。その存在比は、火成岩や隕石では22.21:1である。ところが、このバクテリアは、 ^{34}S よりも ^{32}S の方を還元する速度が早いので、それを利用した年代測定が可能になる。つまり、 ^{32}S と ^{34}S の比が

22.21:1からずれていれば、それは、硫酸還元菌の作用を受けたと判断される²⁾。最近、東北大学の大本教授らのグループは、その方法で、34億年前の地層中から取り出された黄鉄鉱中に含まれるイオウが、硫酸還元菌の作用を受けたものであることを明らかにし、そのころから、地球上には、現在の1/10程度の酸素があったという仮説を発表していた³⁾。

もちろん酸素の存在は、部分的・地域的なものかもしれないが、新規な考え方である。生命の誕生は35億年前から40億年前といわれており⁴⁾、それ以降の地球環境を考える上で興味深い情報である。硫酸還元菌はそのような太古の昔から地球上に存在していた生物である。現在の研究では、硫酸還元菌は、35億年前には存在していなかったが、30億年前には少ないながら存在し、20億年前には、すでに現在と同数程度存在していたといわれている。地球上には、大規模なイオウ鉱が点在しており、例えば、ルイジアナ州やテキサス州のイオウ鉱は、二疊紀ないしジュラ紀に作られたといわれているが、これは、水中の硫酸イオンを硫酸還元菌が還元し、発生した硫化水素を、クロロビウムなどの紅色イオウ光合成細菌が酸化し、イオウ鉱を作ったと考えられる。その証拠に、リビアのAin-ez-Zaia湖では、

硫酸カルシウムが飽和状態で存在し、浅いところには、ゼラチン状の光合成細菌が生息している。このシステムを使って、元素イオウを製造する計画も提案されている。

現在でも、硫酸還元菌は、私たちの身の回りで見つけることができる。例えば、汚れて流れの遅い河川（いわゆる“どぶ”）から硫化水素のにおいがするのはこのバクテリアの産物のためであるし、地中に埋めた鉄製パイプを錆びから守るためにアスファルトやコンクリートで覆ってもそれが腐食するのは、このバクテリアにより還元された硫化水素がさらに空気のあるところまで拡散してイオウ酸化細菌により酸化され生産された硫酸によっていわれている。これを防ぐため、まわりに砂や砂利を敷き、通気を良くするという方法が使われているが、湿地などではこの方法は使えず、このためパイプにマグネシウムを結合させ、負に帯電させておくという方法がとられている。また、稲作では、“土用干し”と呼ばれることが行われる。これは、水田に肥料として硫酸などを大量に投入するために硫酸還元菌が発生する。水田は、水の流れがない硫酸還元菌にとって絶好の場所である。これをそのままにしておくと、発生した硫化水素により稲が枯れる“秋落ち”が起こる。これには、他から鉄分の多い土を運んでくるか（客土）、土を掘りかえすと良いのだが、それを防ぐため水田の水を一時的に抜き嫌気的环境をこわし（土用干し）、バクテリアの成長を防ぐというものである。

硫酸還元菌は、硫酸塩を最終電子受容体とし、乳酸やピルビン酸などの有機酸あるいは水素を酸化してエネルギーを獲得しているバクテリアの一種であり、その電子伝達鎖・呼吸鎖に関与すると考えられるc型シトクロム、非ヘムタンパク質、フラビンタンパク質の機能が明らかにされるに伴い、その生態が徐々に解明されつつある。すなわち、このバクテリアは、2分子の乳酸から酢酸まで酸化を行うに伴い、ATP（アデノシン三リン酸）を2分子合成する一方で、その合成されたATPを、1分子の硫酸イオンを硫化物イオンにまで還元するために消費する。生育に必要なエネルギーは、それらの反応に共役した電子伝達系により獲得している。その電子伝達系は、ヒドロゲナーゼとシトクロム c_3 を核とした系により構成されている。これらの反応を図1-2に模式的に表わした⁵⁾。また、その細胞内の存在位置に着目して、模式的に表わしたのが図1-3である⁶⁾。

硫酸還元菌は、電子顕微鏡で見ると、図1-4のようである^{7, 8)}。実際の菌体は、薄茶色らしいが、発生する硫化水素が周りの金属イオン（多くの場合、鉄イオン）と反応して

沈殿するため、黒色にみえる。また、この菌体を、培養する化学培地も調製されており、その組成は図1-5のようである。硫酸や鉄が、他のバクテリアを培養する場合より多くなっている。硫酸還元菌には、以下に示す7種の株がおもに研究に用いられているが、当然のことながら、もっと多くの種類が、スクリーニングされている⁹⁾。

Desulfovibrio vulgaris (Miyazaki F)

Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough)

Desulfovibrio vulgaris (Marburg)

Desulfovibrio gigas

Desulfovibrio desulfuricans (Norway 4)

Desulfovibrio desulfuricans (El Agheila 2)

Desulfovibrio salexigens (El Agheila C)

以下、*Desulfovibrio*は*D.*と略記する。本研究に用いた*D. vulgaris* (Miyazaki F)は、その名の通り、宮崎県都城の老朽化水田より岩崎修一氏が、単離したものをルーツとし、その後、北海道大学、静岡大学、味の素株式会社をへて、横浜国立大学工学部物質工学科阿久津秀雄助教授（当時）のグループにより培養していただいたものを使用した。

1.2 硫酸還元菌酸化還元タンパク質とタンパク質工学

この研究のもう1つの柱となる技術・考え方は、遺伝子操作とタンパク質工学である。特に、近年の遺伝子工学の進歩には、目を見張るものがある。バイオテクノロジーという言葉が使われ始めて、ほぼ15年の歳月が経つが、遺伝子操作は、その中心技術として、まさに完成しつつある。制限酵素の発見や、DNA連結酵素の精製などプラスミッドを使った遺伝子組換えは、特定の遺伝子の単離精製を可能にしたし、遺伝子の配列決定には、マクサム・ギルバート法¹⁰⁾、さらにサンガーのダイデオキシ法¹¹⁾が開発されるにいたり、非常に容易に行えるようになった。さらに、部位特異的変異法やPCR (Polymerase Chain Reaction) 法¹²⁾ は、1993年度のノーベル化学賞受賞対象になったが、これらの技術により、生体内に存在する、微量にしか存在しないにもかかわらず生体を動かしているタンパク質の構造・機能相関という、タンパク質工学の分野に多大な影響を与えた。あるタンパク質の1次構造がわかったとしても、そのタンパク質がどういった活性をもつタン

パク質であるかを特定することは、我々には困難である。逆に、何らかの反応を酵素反応として行いたいと考えたとき、そのような活性をもつ酵素をどのような配列にし、どのように発現させるかを設計することは現時点では不可能である。このギャップを埋める学問がタンパク質工学だと考えている。それには、そのタンパク質の立体構造を調べることも大切であるし、生体内で、どのように作られるか、どのようにすれば効率良く生産することができるか、も大切なテーマである。そういった中で、私は、ヘムタンパク質およびフラビンタンパク質に着目した。これらのタンパク質は、その生理活性ともいべき酸化還元反応（電子のやりとり）は、もっぱらその補欠分子族に任せ、ペプチド部分はその枠組みをしているだけのようにも見える。しかし、それならばペプチド部分は、無用の長物でしかない。補欠分子族だけで生体反応を行えばよいことになる。やはり、そのペプチド部分に何らかの重要な意味が隠されていると考えられる。

硫酸還元菌の一種 *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株由来のシトクロム c_3 は、107アミノ酸残基からなる単量体電子伝達タンパク質であり、生体中では電子をヒドロゲナーゼから非ヘムタンパク質であるフェレドキシンやフラビンタンパク質であるフラボドキシンへと受け渡す役割を果たしている（図1・2、1-3参照）。また、1分子あたり c 型ヘムを4個共有結合している多ヘム型シトクロムであって、その4つあるヘムの軸方向の配位子は両方向ともヒスチジン残基である、硫酸還元菌に特有のマーカートンパク質である。このタンパク質は、X線結晶構造解析やNMRによる構造研究が詳細に行われており、このタンパク質のもつ構造・機能相関、すなわちヘム周辺環境が、このタンパク質の酸化還元電位に及ぼす影響、分子内分子間の電子移動速度について解析する基盤となっている。また、シトクロム c_{553} は、このバクテリアが有機酸を酸化する際の最初の反応である乳酸のピルビン酸へ酸化、すなわち乳酸デヒドロゲナーゼの電子受容体となるアミノ酸79残基からなる c 型シトクロムであり、このシトクロムに1個含まれるヘムの軸方向の配位子は、メチオニンとヒスチジンであるが、このタイプの c 型シトクロムは、広く生物界に存在している。さらに、フラビンタンパク質は、このバクテリアの特徴である硫酸塩の還元反応に関与しているという報告もあり、このバクテリアの生態を研究する上で、重要となっている。

私は、常々遺伝子は情報の貯蔵庫であって、生体内のダイナミズムは、すべてタンパク質が握っていると考えてきた。核酸が重要といっても、その遺伝情報を伝えるためには、数多くの酵素の力なくしては伝えられない（もちろん、その酵素の情報は、DNAが保存

しているのだが)。すなわち、現代の生物において最も重要な役割を果たしうるのはタンパク質であると考えている。世の中で、“遺伝”として人々の考えの中で片付けられてきたことは、保存されてきたDNAの情報に従い作られたタンパク質の性質によるのではないだろうか。その様な考えに基づき、私は、タンパク質の研究を行ってきた。

本研究では、硫酸還元菌のエネルギー代謝系の分子機構を解明することを最終目標として、硫酸還元菌 *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株よりヘムタンパク質としてシトクロム c_3 およびシトクロム c_{553} 、フラビンタンパク質としてFMN結合タンパク質を取り上げ、その遺伝子の構造を明らかにするとともに、その発現系の構築、さらに発現タンパク質の遺伝子工学的・分子生物学的研究を行った結果である。

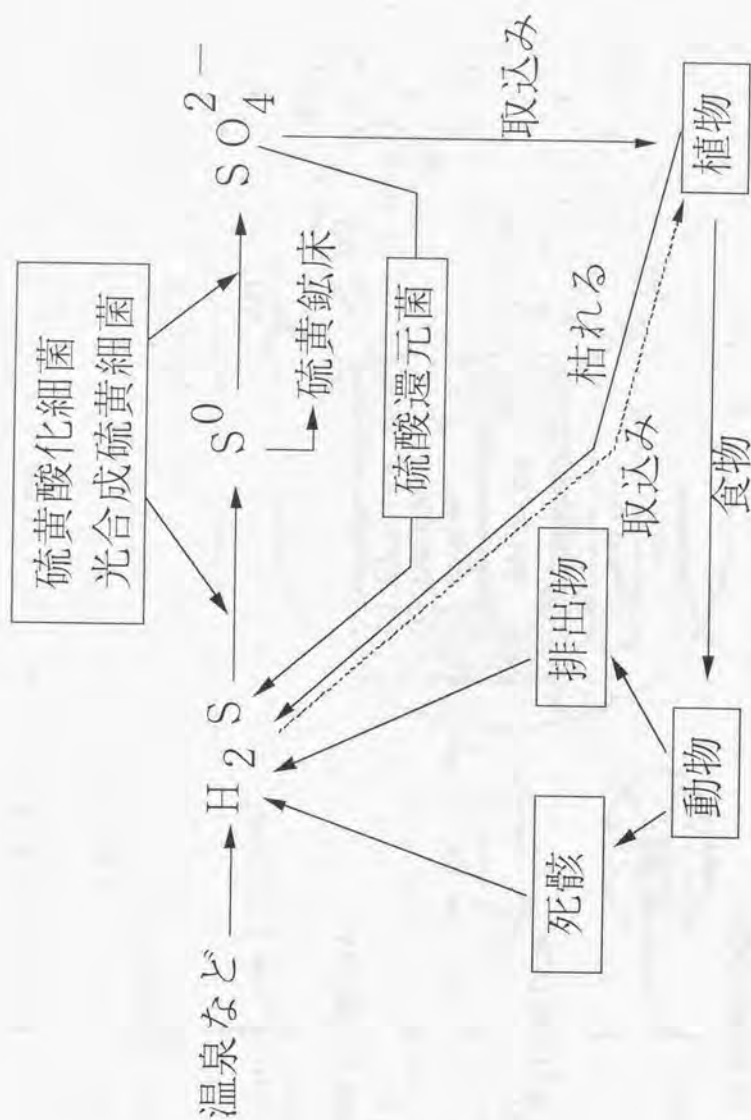


図1-1 自然界における硫黄の循環

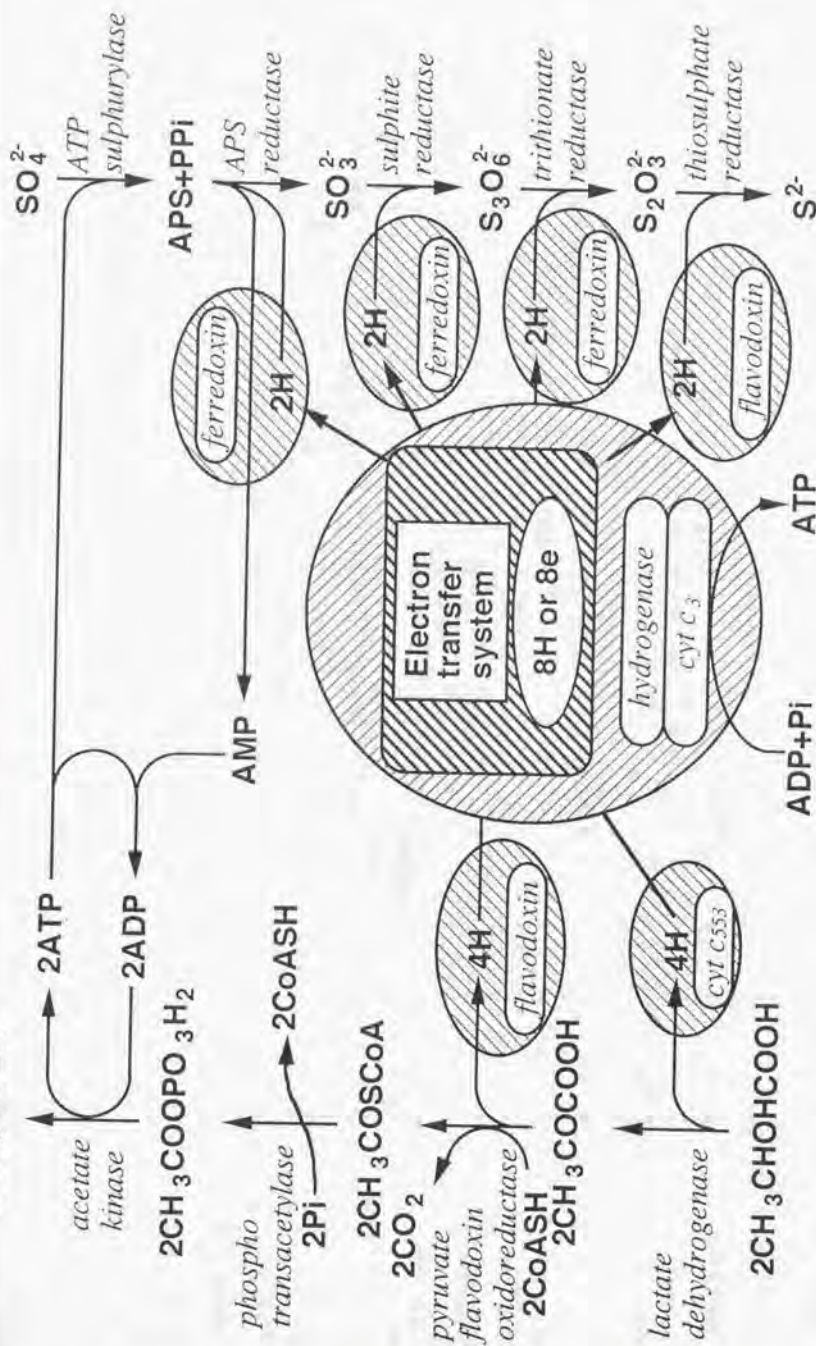


図1-2 乳酸塩を用いた硫酸還元反応およびエネルギー獲得の模式図

FDH 非酸アピドクグナーゼ
 4HC3 シトクロムc
 FdI, FdII フェレドキシンI, II
 TC 鉄-硫黄中心タンパク質
 FUMR フマル酸還元酵素
 TS 硫黄還元酵素
 8HC3 高分子量シトクロムc
 Fldx フラボドキシン
 APS アデノシンリン酸硫酸
 APSR APS還元酵素
 SIR 硫酸還元酵素
 MK6 メナキノン6
 CYTB シトクロムb
 HASE ヒドロゲナーゼ
 ATPASE ATP合成酵素
 L-LDH L-乳酸脱水素酵素
 Rb ルブレドキシン
 DRDX デスルブレドキシン
 Mo(2Fe-2S) モリブデン含有鉄-硫黄中心タンパク質

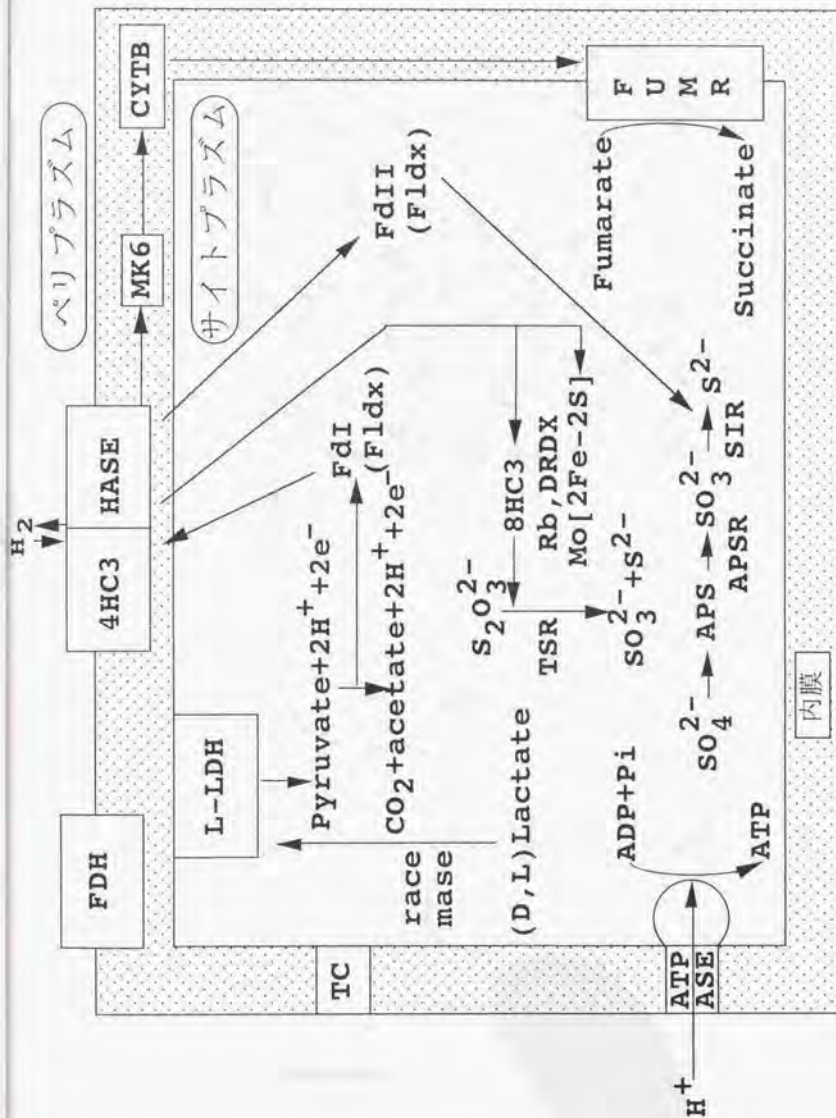


図1-3 電子伝達タンパク質と酵素の配置の模式図

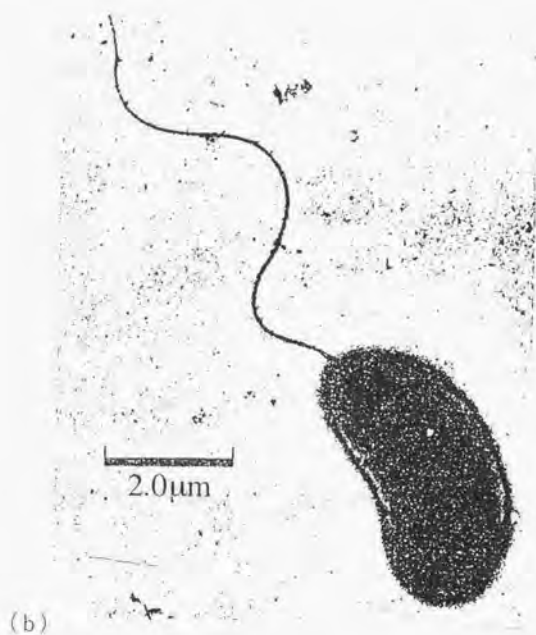
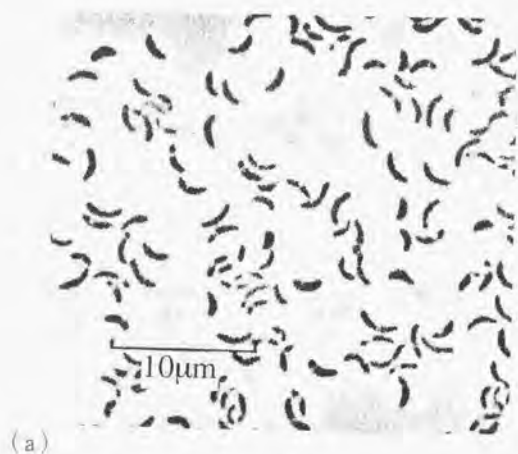


図1-4 硫酸還元菌の顕微鏡観察

(a) *D. vulgaris* 位相差 $\times 2,850$

(b) *D. sapovorans* ネガティブ染色 $\times 12,500$

Medium B

KH_2PO_4	0.5
NH_4Cl	1
CaSO_4	1
$\text{MgSO}_4-7\text{H}_2\text{O}$	2
Sodium lactate	3.5
Yeast extract	1
Ascorbic acid	0.1
Thioglycollic acid	0.1
$\text{FeSO}_4-7\text{H}_2\text{O}$	0.5

Medium C

KH_2PO_4	0.5
NH_4Cl	1
Na_2SO_4	4.5
$\text{CaCl}_2-6\text{H}_2\text{O}$	0.06
$\text{MgSO}_4-7\text{H}_2\text{O}$	0.06
Sodium lactate	6
Yeast extract	1
$\text{FeSO}_4-7\text{H}_2\text{O}$	0.004
Sodium citrate- $2\text{H}_2\text{O}$	0.3

Medium D

KH_2PO_4	0.5
NH_4Cl	1
$\text{CaCl}_2-2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MgCl}_2-6\text{H}_2\text{O}$	1.6
Yeast extract	1
$\text{FeSO}_4-7\text{H}_2\text{O}$	0.004
Sodium pyruvate or choline chloride	1

図1-5 硫酸還元菌の培養用化学培地 (単位は、g/ℓ)

第2章 シトクロム c_3

2-1 シトクロム c_3 の性質 ～本研究前に解明されていたこととタンパク質工学～

シトクロム c_3 は、硫酸還元菌中に存在する、酸化還元タンパク質であり、1954年 Postgate と石本がそれぞれ独立に発見している^{13)、14)}。その菌体内での生理活性は、ヒドロゲナーゼが水素から取り出した電子をフェレドキシンないしはフラボドキシンに受け渡すというものであり、ピルビン酸がアセチルリン酸へ酸化される際に生じる電子を、ピルビン酸デヒドロゲナーゼから、シトクロム c_{553} を経て、フェレドキシンに受け渡すが、これをヒドロゲナーゼに受け渡すという活性もある(図1-3参照)。このように、シトクロム c_3 は、このバクテリアのエネルギー循環の中心的な役割を果たしている¹⁵⁾。現在までに、6つの株から単離され、その1次構造が決定されているが^{16)、17)、18)、19)、20)、21)、22)}、その相同性は、限られた範囲でしか存在していない(図2-1)。1分子中にc型ヘムを4分子含み、各々ペプチド鎖とチオエーテル結合をしている。その各々のc型ヘムには固有の酸化還元電位が存在し、微妙に異なっているが、それぞれほぼ-0.29Vである²³⁾。そのヘムの軸方向の配位子はすべて両方向ともヒスチジンであって、この点は、他の生物種に含まれるシトクロムc類と大きく異なっている。

硫酸還元菌 *D. vulgaris* (Miyazaki F) 由来のシトクロム c_3 の1次構造は、1980年 Shinkai らによって決定されており²²⁾、その立体構造は、樋口らによってX線結晶構造解析により、1.8Åでリファインされている²⁴⁾。その立体構造を、図2-2に示す^{24)、25)}。また、Fanらによって、¹H-NMRにより、4つのヘムの酸化還元ポテンシャルの全割当てがなされている²⁶⁾。それらの結晶解析の結果から、各々のヘムはほぼ垂直に位置し、そのヘム間の距離は、最も短いヘム3-4間で11.3Å、最も長いヘム1-3間で18.1Åしかなく、非常に近接していることがわかっている。そのため、ヘム同士が何らかの相互作用をしているか、または、何らかの役割分担をしつつ各ヘム間を電子が行き交うといったことが考えられる。その仲介をしているのが、そのヘムの間に位置した芳香環を側鎖にもつフェニルアラニンでありチロシンであると考えられている。特に20番のフェニルアラニンは、ヘム3の配位子である22番のヒスチジンとヘム4の配位子である25番のヒスチジンの間に存在し、

そのヘム間の電子の“ジャンプ”を助けているとされている(図2-3参照)。

このタンパク質の遺伝子の情報には、このMiyazaki F株由来のものは、全くわかっていなかった。そもそも、私がこの研究を始めた時には、シトクロム c_3 に限らず、この株由来の遺伝子は何一つ決められておらず、最初になるはずであった。しかし、結果的には、この株由来のヒドロゲナーゼ遺伝子に、先を越されてしまった²⁷⁾。このバクテリア種について全く遺伝子の情報がなかったわけではない。例えば、*D. vulgaris* (Hildenborough) 株由来のタンパク質遺伝子が最もよく解明されており、シトクロム c_3 ²⁸⁾ 以外にも、数種のヒドロゲナーゼ²⁹⁾、³⁰⁾、³¹⁾、³²⁾、ルブレドキシン³³⁾、フラボドキシン³⁴⁾、³⁵⁾ などかなりの数にのぼり、他の株由来のタンパク質遺伝子においても数種類程度発表されていた³⁶⁾、³⁷⁾、³⁸⁾。つまり、この菌株のタンパク質についての研究においては、遺伝子工学的な研究が、最も遅れていたわけである。

2-2 実験方法

2-2-1 シトクロム c_3 遺伝子のクローニング

この遺伝子をクローニングするにあたって、まず、合成DNAプローブが必要であった。その配列は、既に塩基配列が発表されていたHildenborough株由来のシトクロム c_3 遺伝子を参考にした。すなわち、1次配列上、Miyazaki F株由来のシトクロム c_3 と

Hildenborough株由来のシトクロム c_3 は、例外的に相同性が高く、アミノ酸の長さも同じで、全体の90%にまで上る(図2-1)²²⁾。そこで、全く同じ配列をしているアミノ酸10残基程度の領域で、その中にメチオニン残基または、トリプトファン残基を含むことを条件に、2箇所を選び出した。メチオニン残基およびトリプトファン残基は、遺伝子上必ず、ATGおよびTGGであるからである。そして、その2箇所はアミノ酸配列が同じであれば遺伝子の塩基配列も同じであろうと想像し、アミノ酸番号1番のアラニンから11番のメチオニンまでに対応するよう33量体(probe No. 1)と55番のメチオニンから65番のチロシン

までに対応するよう33量体 (probe No. 2) をホスホアミダイト法により合成した。その塩基配列を図2-4に示す。

一方、硫酸還元菌 *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株から、ゲノムDNAを抽出した。これは、斎藤・三浦の方法³⁹⁾により、この菌体3.17 g からゲノムDNA 55mgを抽出できた。このゲノムDNA 5 μ gずつを数種類の制限酵素で消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、分離した断片を、ナイロニフィルターにトランスファーした。トランスファーバッファーとしては、0.9M NaCl/0.1M Tris-HCl (pH 9.5)を用いた。サザンハイブリダイゼーション法により、シトクロム *c₃* 遺伝子の位置を特定した。ハイブリダイゼーションの温度は60℃で8時間以上、6xSSC中で50℃30分のwashを2回行った。その結果を図2-5に示すが、この結果は、probe No. 1を使ってもprobe No. 2を使っても同じ結果になったので、その後は、probe No. 1を使うことにした。この結果は、probe No. 1およびprobe No. 2がハイブリダイズする領域の間に、使用した制限酵素サイトが存在しないことを示している。さて、これらの結果から、制限酵素 *Sma* Iにより消化した断片が、最も短く約3.6kbp (キログラム塩基対) 程度であったので、さらに、他の制限酵素と二重消化を行うことにした。同様の操作の結果、制限酵素 *Nsi* Iによる消化産物が、2kbp程度の断片となることがわかった (図2-6)。そこで、ゲノムDNA 100 μ gを *Sma* Iにより消化し、約3.6kbpの位置のDNAを電気的に抽出し、その断片をさらに *Nsi* Iにより消化した。この混合物を、あらかじめ、*Sma* Iと *Pst* Iで消化したpUC18に繋いだ。*Nsi* Iと *Pst* Iは、消化後同じコヘシブエンドを生じるので連結可能である。この連結した混合物で、大腸菌JM109株を形質転換し、選択するためLB/Amp, IPTG, X-galプレートに播き、一晚培養した。IPTGは、isopropyl β -D-thiogalactosideであり、X-galは、5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosideである。白いコロニー88個から、コロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングを行い、1つのポジティブコロニーを見つけた。この組換え体を培養し、プラスミッドをアルカリ-SDS法により抽出した (これらの方法については、実験条件参照)。その後、このプラスミッドpKM-1の挿入断片の塩基配列を調べたところ、不幸なことに、*Nsi* Iサイトは、この遺伝子のコーディング領域にあったことがわかった。そこで、このタンパク質のカルボキシ末端に近い87番のアラニンから96番のグルタミン酸までの10アミノ酸残基に対応するよう29量体のprobe No. 3を合成した。この領域は、Miyazaki F株由来のシト

クロム c_3 と Hildenborough 株由来のシトクロム c_3 の1次配列はほぼ一致しているが、領域中にメチオニン残基トリプトファン残基は含んでいなかったため、当初の計画から除外していた領域である。その配列も、図2・4に示す。これを利用して、先程の88個の組換え体からスクリーニングしたところ、3つのポジティブなシグナルを検出した。このクローンからプラスミッドを取り出し、pKM-2と名付け、これも先程と同じように塩基配列を調べた。このようにして、前半後半に分けてクローニングできたわけだが、元々あった *Nsi* I サイトは、*Pst* I サイトを介して pUC18 に繋いだため、これらのクローンをを使って、直接繋ぎ直すことはできない。そこで、2つの方法を考えた。1つは、それぞれの元々 *Nsi* I サイトがあった位置に、もう一度部位特異的変異法を用いて *Nsi* I サイトを作るというものであり、もう1つは、再度別の酵素で、クローニングをやり直すというものである。私は、後者を選択した。すでに、アミノ末端側は制限酵素サイト *Aat* II が、カルボキシ末端側は、制限酵素サイト *Sph* I があることが、pKM-1 および pKM-2 の遺伝子構造からわかっていたからである。そこで、先程と同様ゲノム DNA 100 μ g を *Sma* I により消化し、約 3.6 kbp の位置の DNA を電気的に抽出し、その断片をさらに *Aat* II および *Sph* I で消化し、あらかじめ *Aat* II および *Sph* I で消化した pUC18 に連結した。制限酵素サイト *Aat* II は、pUC18 のポリリンカー領域には存在しないが、pUC18 中に1箇所存在する制限酵素サイトである。これにより、シトクロム c_3 遺伝子全長が含まれる“はず”であった pKM-3 が作られた。同様の操作により、約 300 個の白コロニーから、1つのポジティブコロニーを見つけた。

クローニングできてから1年半ほどして、もう1度塩基配列を決定したオートラジオグラフィーを見直して見たところ、nt. 267 から nt. 271 の A が、5つ並ぶところが、pKM-3 では、4つしかないことに気付いた。そこで、pKM-3 を制限酵素 *Aat* II と *Pst* I で消化し、ベクター側と挿入断片側に分け、挿入断片側をさらに、*Taq* I で消化した。一方、pKM-1 も、制限酵素 *Aat* II と *Hin* dIII で消化し、挿入断片をさらに、*Taq* I で消化した。これらを繋ぎあわせ、nt. 267 から nt. 271 の位置に A が5つ並び、正しくクローニングできたプラスミッド pKM300 を得た。

2・2・2 アミノ酸配列分析

コーディング領域中に、既発表のアミノ酸配列と1箇所一致しない点が存在した。そこ

で、この点を明らかにするため、この菌体からシトクロム c_3 を抽出し、アミノ酸レベルで確認を行った。まず、シトクロム c_3 500 μ g を 0.1M HCl/8M urea 中で、HgCl₂ を 90 分作用させ、システイン残基に結合しているヘムとの結合を切断除去した⁴⁰⁾。これを、透析後、凍結乾燥させ、6M グアニジン塩酸/0.1M Tris-HCl/1mM EDTA (pH 8.3) 中で、ヨウ化酢酸ナトリウムを作用させることにより、カルボキシメチル化した⁴¹⁾。これを、逆相系 HPLC により精製した。カラムは、Asahipak C4P-50、0.46x15cm を使い、0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 中で、アセトニトリルの濃度勾配をかけ、流速は、0.8ml/min であった。これにより分取したペプチド (アポシトクロム c_3) は、凍結乾燥後、1M urea/40mM Tris-HCl (pH 8.0) 200 μ l 中で、ペプチド分解酵素であるキモトリプシンをアポシトクロム c_3 のモル比で 1/40 量加え、37°C 4 時間処理する。処理したサンプルは、さきほどと同じ条件で、逆相系 HPLC により精製した。そのカラムパターンを図 2-7 に示す。その中で、矢印を付けたフラクションについてアミノ酸配列分析を行った。アミノ酸配列分析には、アブライドバイオシステム社のモデル 473A プロテインシーケンサーを用いた。

2-2-3 シトクロム c_3 遺伝子の発現系の構築

シトクロム c_3 遺伝子がクローニングできたので、この遺伝子の^{大腸菌}での発現系を構築した。まず、直接発現系として、プラスミッド pKM300 を考えた。シトクロム c_3 遺伝子の調節領域は、2-3 実験結果の項で述べるが、^{大腸菌}のそれと高い相同性を示していたので、シトクロム c_3 遺伝子がクローニングされているプラスミッド pKM300 によって形質転換された^{大腸菌} JM109 株の発現タンパク質の分析を行った。分析には、SDS-15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (以下、SDS-PAGE と略記する) を用いた。

また、^{大腸菌}の *tac* プロモーターの下流にこの遺伝子を繋ぎ、発現誘導をかけられる発現ベクターを構築した。まず、成熟体の最初のアミノ酸であるアラニンの前に、開始コドンに対応するようメチオニン残基をつけ、その直前に *Eco* RI サイトを導入するように部位特異的変異法を用いて、遺伝子に変異を導入した。変異導入プライマーとしては、mutation primer E を合成し、Inouye 法⁴²⁾ により、1 度に 7 塩基変更することにした。こ

の変異が導入されたプラスミッドをpKM800とした。このプラスミッドをEco RIとPst Iで消化し、その挿入断片を大腸菌の発現ベクターpKK223-3をあらかじめ同じ酵素で消化したものと繋いだ(図2-8)。できあがったプラスミッドpTCKM800は、IPTGにより、発現が誘導されるはずである。

また、大腸菌中で、融合タンパク質として発現させる系を確立した。大腸菌中で、ブタアデニル酸リン酸化酵素(ADK)を大量に発現できるベクターpMKAK3を使い⁴³⁾、ADKのアミノ末端から80番までと、血液凝固因子Factor Xaの認識部位を介して、シトクロム c_3 の成熟体が連なるといふ融合タンパク質としての発現系である。この発現系を用いれば、おそらく不溶性となる目的ペプチドを可溶化した後、Factor Xaまたは、シトクロム c_3 中にアルギニンがないことを利用して、アルギニルエンドペプチダーゼにより消化することにより、シトクロム c_3 の成熟体を得ることができると考えた。まず、プラスミッドpKM3に変異を導入することにした。プレシトクロム c_3 のシグナルペプチドが切断されるプロセッシングサイトをまたぐように制限酵素サイトApa Iを導入すべく、mutation primer Dを合成した。その配列は、図2-4に示した通りであり、2塩基に変異をかける。この変異が導入されたプラスミッドをpKM32と、名付けた。一方、別に合成したリンカーDNA、Linker No.1とLinker No.2を5'リン酸化し、100℃5分熱したあと、徐冷しアニリングさせた。その塩基配列も、図2-4に示す。このリンカーと、pKM32をApa IとPst Iで消化した断片、およびpMKAK3をNco IとPst Iで消化したベクター側とを繋げる(図2-9)。できあがったプラスミッドpMKCYによって形質転換されたJM109株の全タンパク質を、SDS-PAGEにより分析した。

また、その他の発現系も検討した。すなわち、酵母、放線菌、光合成細菌、硫酸還元菌を用いた発現系である。これらは、各々のバクテリアと大腸菌とのシャトルベクターを用いるか、広宿主域ベクターを用いて発現系の構築を行った。

2-3 実験結果

2-3-1 シトクロム c_3 遺伝子のクローニング

2-2-1の方法により、シトクロム c_3 遺伝子を含んだ *Aat* II-*Sph* I断片をpUC18の *Aat* II-*Sph* Iサイトに連結することにより、プラスミッドpKM300を得た。クローニングした *Aat* II-*Sph* I断片の塩基配列決定の概要を図2-10に、その塩基配列を図2-11に示す。35/-10領域は、nt.187からnt.192のTTGACA/nt.210からnt.215のTACCATと考えられる。SD配列(Shine-Dalgarno配列、つまり、リボソームと結合しうる配列)は、nt.248からnt.253のAGGAGGである。また、シトクロム c_3 遺伝子にはシグナルペプチドがついており、その開始コドンATGが、nt.264に、終止コドンTAGが、nt.654に存在する。シグナルペプチドは、メチオニンに続いて塩基性アミノ酸であるリジンが2つ続き(この位置のAが1つディレーションしたのがpKM-3である)、途中のスレオニンを除き、疎水性アミノ酸が続いていた。

2-3-2 アミノ酸配列の確認

42番のアミノ酸は、既発表のデータでは、アスパラギンであったが、遺伝子上は、その位置はアスパラギン酸をコードしているコドンGACであった。そこで、アミノ酸配列分析を行った。その結果を、表2-1に示す。これからもわかるように、このフラクションは、26番目のリジンから43番目のチロシンまでのペプチドであって、42番のアミノ酸(表2-1のサイクルでは、17番目)は、確かにアスパラギン酸であり、塩基配列と一致した。

2-3-3 シトクロム c_3 遺伝子の発現

シトクロム c_3 遺伝子の発現の様子を図2-12に示す。プラスミッドpKM300によって形質転換された大腸菌JM109株では、シグナルペプチドを含めたペプチドの位置(分子量約13,600、計算上は、13,644)にバンドが現われていた。pTCKM800によって形質転換された大腸菌には特異なタンパク質の発現は見られなかった。また、pMKCYによって形質転換さ

れた大腸菌は、目的の大きさのタンパク質（分子量20,753）よりやや大きなタンパク質を発現していることが確認できた。

表2-1 精製したフラクションのアミノ酸配列分析の結果

Cycle No.	Amino acid	Yield (pmol)	Cycle No.	Amino acid	Yield (pmol)
1	Lys	28.4	10	His	18.9
2	Ala	81.4	11	Pro	7.7
3	Val	54.0	12	Val	7.2
4	Lys	32.8	13	Asn	6.8
5	CmCys	N.Q.	14	Gly	10.1
6	Gly	29.0	15	Lys	8.9
7	Asp	14.1	16	Glu	N.Q.
8	CmCys	N.Q.	* 17	Asp	7.7
9	His	11.5	18	Tyr	3.9
Positions 26-43		N.Q. ; not quantified CmCys ; S-carboxymethylcysteine			

2-4 考察

2-4-1 シトクロム c_3 遺伝子のクローニング

この遺伝子のクローニングの最終段階において、Aが5つ並ぶもの (pKM300) と Aが4つ並ぶもの (pKM-3) の2種類ができるが、同様の操作をしているにもかかわらず、pKM300で形質転換したJM109株は、非常に成長が悪かった。このことは、2-4-3節で触れるが、この遺伝子を、プロモーター領域から完全な形でクローニングすると、大腸菌内で発現して菌体を殺してしまい、普通に成長できるのは、遺伝子中に変異を起こしたもののだけなのかもしれないと考えた。私が得たプラスミッドpKM300は、成長半ばであるので、まだ、変異がかからないままだったのかもしれない。このことは、この遺伝子をゲノムDNAからクローニングする時に、制限酵素 *Sma* I と *Nsp* V を用いて行った時に1つのポジティブクローンを得

たのだが（この制限酵素の組み合わせでもシトクロム c_3 遺伝子をクローニングできることは、図2-6の結果から明らかである）、そのクローンのみプレート上での成長が悪く、試験管培地中に生やすことができなかった。すなわち、シトクロム c_3 遺伝子を完全な形で大腸菌内で維持した場合、そのまま発現し、菌体に悪影響を及ぼす。その結果、シトクロム c_3 遺伝子中に変異を起こしたもののだけが、十分に成長することができる、と考えた。言い換えれば、pKM300を得るのに、pKM-1, 2, 3といった挿入断片を分断されたプラスミッドや一部欠失したプラスミッドが先に得られたのは、当然のことで、そのままでは成長が悪く、スクリーニングの対象にはならなかったであろうと考えられる。

シグナルペプチドについて、このシグナル配列の比較を図2-13に示した⁴⁴⁾。

Hildenborough株由来のそれとも非常によく似ているが、アミノ酸配列は、Miyazaki F株由来のものの方が22残基と、1残基長い。他の大腸菌由来膜透過型タンパク質のシグナルペプチドと比較すると、同様の傾向を示しているので、このタンパク質も、膜を透過し、ペリプラズムに存在することを示唆した。

2-4-2 アミノ酸配列の確認

私がクローニングした遺伝子の塩基配列を元にアミノ酸配列に翻訳したものでも、アミノ酸配列分析の結果においても42番目のアミノ酸はアスパラギン酸であった。しかし、既発表のアミノ酸配列決定の論文²²⁾においては、*Staphylococcus aureus* V8プロテアーゼにより消化されており、それが、アスパラギンであることの根拠にもなっている。すなわち、グルタミン酸とアスパラギン酸の間のペプチド結合は、V8プロテアーゼによっては、分解されないで、他の結果から考えても、この位置のアミノ酸は、アスパラギンである、ということである。私は、おそらくShikaiらの決定した菌株と私が使っている菌株が違うのであろうと想像している。しかし、この違いは、その他のデータ、例えば、X線結晶構造解析や酸化還元電位などの結果には、ほとんど影響しないであろうと考えている。おそらく、もともとのその位置の遺伝子の配列は、AACであり、最初のAがGに置換され、アスパラギン酸になったのではないかと考えた。しかし、この点変異は、クローニングできたクローンがたまたまそうだったわけではなく、他のクローンにおいてもこの位置の

塩基配列はGACであったので、結論的には、今使われているMiyazaki F株由来のシトクロム c_3 の42番のアミノ酸はアスパラギン酸である、と結論した。

2-4-3 シトクロム c_3 遺伝子の発現

クローニングされたシトクロム c_3 遺伝子を発現させるには、4つのポイントがある。それは、(i) 遺伝子が翻訳されるか、(ii) 膜(内膜)を通過するか、(iii) シグナルペプチドは切断されるか、(iv) ヘムが挿入されるか、という点である。これらの点を考慮に入れて、大腸菌の系について検討した。大腸菌は、遺伝子工学的な研究において最も汎用されており、その有効性について今さら触れるまでもないが、シトクロム c_3 遺伝子の発現系としてのメリットは、以下の様であろうと考えた。まず、扱いやすさである。それは、宿主-ベクター系が揃っていることもあるが、形質転換の方法も容易であり、発現制御の良いシステムも存在している。また、成長が早く(細胞分裂は、約20分に一回)、また、大量発現にも向いている。しかし、この系で最も問題になるのは、翻訳後の修飾であって、翻訳後にc型ヘムが挿入された例がほとんどないということである。しかし、その点も、全くないわけではなく、大腸菌にc型ヘムを挿入する能力がないというわけではない、と考えた。例えば、b型シトクロムのように、ペプチド鎖中にヘムが配位するだけなら、単純な平衡により挿入がなされるであろうし、実際にそういった例はたくさん存在する⁴⁵⁾。しかし、c型ヘムの挿入、すなわち、c型ヘムとペプチド間をチオエーテル結合を作るには、その反応に関与する酵素の存在が示唆されている⁴⁶⁾。よって、たとえ、ヘムを作る能力をバクテリアが持っていようと、その補欠分子族を挿入する能力(酵素)がなければ、c型シトクロムを作ることは不可能であろうし、その基質特異性が非常に厳密であればシトクロム c_3 は、そのヘムの軸方向の配位子が他のc型シトクロムと違っているという点からも、シトクロム c_3 の生産には向かないかもしれない。そういった点を踏まえ、大腸菌を使った発現系の構築を行った。

Hildenborough株由来のシトクロム c_3 では、大腸菌中で発現がみられるものの、ヘムは挿入されなかったという報告があった⁴⁷⁾が、プラスミッドpKM300によって形質転換され

た大腸菌JM109株においては、シグナルペプチドを含めたペプチドの位置（分子量約13,600、計算上は、13,644）にバンドが現われていた。しかしこれは、ヘムを含んでいないと思われた。その根拠は、（i）ヘムの挿入は、シグナルペプチドの切断の後に起こると考えられること、（ii）ヘムを含んでいれば、バンドを形成せず、流れた様になること、からである。（ii）の根拠は、例えば、ウマ由来シトクロムcでは、特に流れた様になる様子はないが、硫酸還元菌由来のシトクロムc₃では、必ず、流れた様になる。この違いは、単純にヘムの数の違いによると思われるが、確かにはわからない。しかし、このバンドは、標準物質として同時に泳動したリゾチームよりも分子量的に大きく、リゾチームの分子量は14,300であるから、ヘムの挿入ないしは、システイン残基に何らかの修飾があった可能性も考えられる。ちなみに、ヘムの挿入が起これば、分子量は16,111である。この遺伝子産物は、この菌体にとって、有毒であるらしく、非常に菌の成長が良くなかった。このことは、この菌を植え継ぐといった操作を行い培養時間を長くすると、菌の成長は通常の場合と同様な成長曲線を与えるが、菌体の全タンパク質のSDS-PAGEを行うと目的産物のバンドは消失している。その場合の遺伝子に、変化はないようではあるが、おそらくどこかに何らかの変異を起こしているものと考えた。つまり、この発現系は大量発現に向かないと結論づけた。発現制御が確実にできるプロモーターの下流にその遺伝子を繋ぐことが必要だと考えた。

そこで、この遺伝子を大腸菌内で確かに制御できるtacプロモーターの下流に繋いだ発現ベクターでの発現の様子を調べた。この直接発現系では、シトクロムc₃は、発現しなかった。これは、プロモーターからの“もれ”による発現と、それによる遺伝子の変異があったのかもしれないし、遺伝子操作を行っている間に変異を起こしたのかもしれない。しかし、この発現系でも、ヘムの挿入は起こらないと思われた。理由は先と同じである。

大腸菌内での融合タンパク質としての発現系でも、確かに目的のペプチドを得ることはできるようであるが、この場合、得られた成熟体に、*in vitro*でヘムの挿入という翻訳後修飾が必要である。つまり、硫酸還元菌から酵素抽出液（粗抽出液で構わないのではないかと）と基質となるc型ヘムを混ぜれば、完全なシトクロムc₃ができると考えた。SDS-PAGEの結果から、予定された大きさ（計算上の分子量20,753）よりやや大きい融合タンパク質が発現していることが確認されたが、これは、ADKの分子量が21,500であり、それよりも大きな位置であるという根拠からである。この場合においても、何らかの

修飾を受けている可能性がある。もし、ヘムの挿入があったなら、分子量は23,220である。しかし、まだ、ここから目的タンパク質をとりだし、酵素処理するところまでは至っていない。

その他の発現系として、酵母⁴⁸⁾、49)、50)、51)、52)、53)、放線菌⁵⁴⁾、55)、光合成細菌⁵⁶⁾、57)、58)、59)、60)、さらに、ホモな系として硫酸還元菌の発現系⁶¹⁾、62)、63)、64)、65)、中程度好熱菌⁶⁶⁾を検討した。それぞれの発現系には、それぞれ有利な点、不利な点があるので表2・2に実験状況と共にまとめた。結論から言えば、未だに有効な発現系を構築するには至っていない。

2・4 シトクロム c_3 の遺伝子工学的研究の今後

遺伝子工学的には、発現系の構築が最重要課題となる。この段階が克服されないと、その後の研究は何もできない。すなわち、タンパク質工学的な計画があつて、その計画を達成するのに技術的な問題がなくても、発現系がなければ、机上の空論でしかない。なんとか、ヘムを含んだ成熟型シトクロム c_3 の発現系を構築しなければならない。

その段階さえ克服できれば、2・1節で述べた、フェニルアラニン20番の改変体だけでなく、例えば、軸方向の配位子については、シトクロム c_3 は、両方ともヒスチジンであるが、これを普通のシトクロム c のように片方をメチオニンに変えたり、環が必要なのであれば、チロシンやフェニルアラニンへの変異体を作り、その酸化還元電位を測定してみるのも、このタンパク質の構造と機能の相関を知る上で、重要なことだと思われる。

表2-2 シトクロム c_3 の発現系の比較

発現系	有利な点	不利な点	実験状況
酵母菌	ヒト由来シトクロム c の発現例あり 分泌系としての発現系が確立している	コドン使用頻度が異なる 発現量が少ない	遺伝子に変異をかけ、発現ベクター構築中
放線菌	シトクロム P-450 の発現例あり 分泌系としての発現系が確立している コドン使用頻度が似ている	c 型シトクロムの発現例がない	発現ベクター構築中
光合成細菌	<i>D. vulgaris</i> (Hildenborough) 株由来のシトクロム c_3 の発現例あり 形質転換法がいくつかある	形質転換法が難 発現量が少ない	発現ベクターは構築できた。 形質転換系を構築中
硫酸還元菌	調節領域、コドン使用頻度などが問題ない 翻訳後修飾も期待できる	形質転換系がなかった培養、選択、精製に難	検討中

1. ¹APKAPADGLKMD KTKQP
2. APKAPADGLKME ATKQP
3. VDV PADGAKIDFIA G EKNL
4. ADAPGDDYVISAP E GMKAKPKGDKPGALQKT
5. VDAPADMVIAKAPAGAKVTKAP
6. VDAPADMVLKAPAGAKMTKAP

26

	²¹	Heme 3	⁴¹	Heme 2
1.	VVFNHSTHKAVK	CGDC	HHPVNGKENYQK	CATAGC
2.	VVFNHSTHKS VK	CGDC	HHPVNGKEDYRK	CGTAGC
3.	VVFNHSTHKDV K	CBBC	HHZPGBKQ YAG	CTTDGC
4.	VPFPHTKHATVE	CVQC	HHTLADGGAVKK	CTTSGC
5.	VAFSHKGHASMD	CKTC	HHKWDGAGAIQ P	CQASGC
6.	VDFSHKGHAALD	CTKC	HHKWDGKAEVKK	CSAEGC

1. HDNMD KK DKS AKGY Y HAMHDKGTFK S
2. HDSMD KK DKS AKGY Y HVMHDKNTFK S
3. HNILD KA DKS VNSW Y KVVHDAKGGA KPT
4. HDSLEFRDKANAKDIKLVESAFHTQ
5. HANTESKKGDDS FY MAFHER KSEK S
6. HVBTS KKGKKS TPKFY SAFHS KSDI S

Heme 4

Heme 1

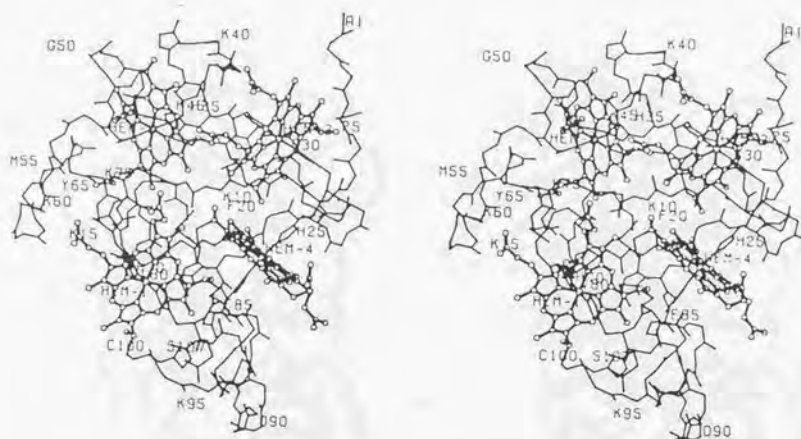
	⁸¹		¹⁰¹	
1.	CVGC	HLETAGADA AKKKE	LTG	CKGSKC HS
2.	CVGC	HVEVAGADA AKK KD	LTG	CKKSKC HE
3.	CISC	HKDKAGDDKELKKK	LTG	CKGSAC HPS
4.	CIDC	HALKKKD	KKPTGPTA	C GKC HTTN
5.	CVGC	HK	SMKK GPTK	C TEC HPKN
6.	CVGC	H	KALKKATGPTK	C GDC HPKKK

1. *D. vulgaris* (Miyazaki F)
2. *D. vulgaris* (Hildenborough)
3. *D. gigas*
4. *D. desulfuricans* (Norway 4)
5. *D. desulfuricans* (El Agheila 2)
6. *D. salexigens*

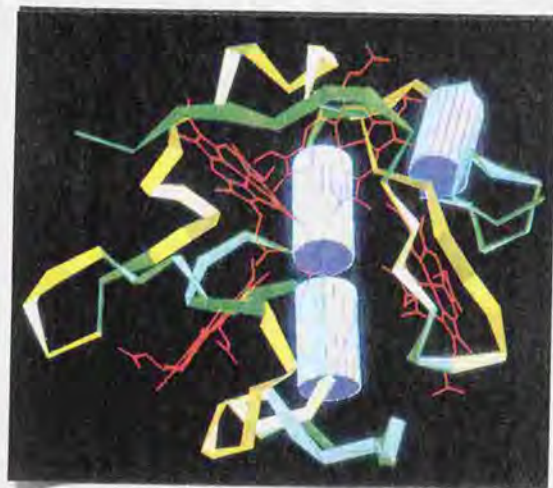
アミノ酸番号は、*D. vulgaris* (Miyazaki F) に付けた。

A, alanine; B, aspartic acid or asparagine; C, cysteine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine; Z, glutamic acid or glutamine

図2-1 今までに決定されたシトクロム c_3 の1次配列比較

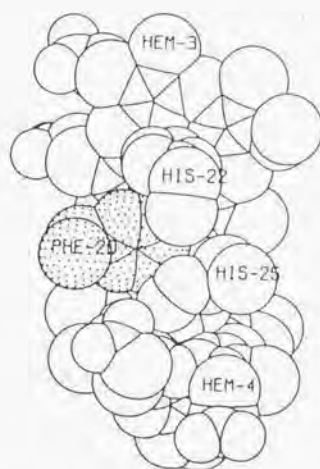
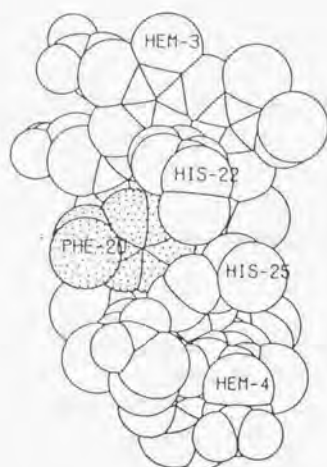


ステレオビュー 24)

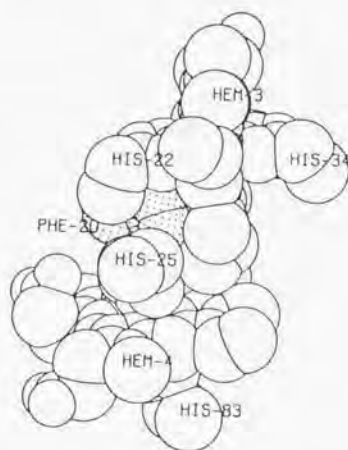
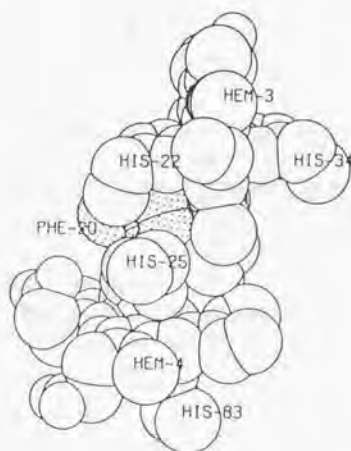


α ヘリックスは円筒で、
 β ターンは黄色のリボンで、
 ヘムは赤色の直線で、
 その他は、緑色のリボンで示した

図2-2 シトクロム c_3 の立体構造²⁵⁾



(a)



(b)

図2-3 20番フェニルアラニン付近の構造²⁴⁾

probe No.1(33mer)

5'-GCTCCCAAGGCCCTGCCGACGGCCTGAAGATG-3'

¹A P K A P A D G L K M

probe No.2(33mer)

5'-ATGGACAAGAAGGACAAGTCCGCGAAGGGCTAC-3'

⁵⁵M D K K D K S A K G Y

probe No.3(29mer)

5'-GCCGGTGCCGATGCCGCCAAGAAGAAGGA-3'

⁸⁷A G A D A A K K K E

mutation primer C(21mer) *Bsp* HI site導入, pKM350

(酵母菌を用いた発現系の構築に用いたので本文中には登場しない。)

Bsp HI

5'-GGTATTCTGTCATGAAAAAG-3'

M K K

mutation primer D(20mer) *Apa* I site導入, pKM32

Apa I

5'-CCTTGCCGGGGGCCCCGAAG-3'

A P K

mutation primer E(30mer) *Eco* RI site, 開始コドン導入, pKM800

Eco RI

5'-GCCATGCCCCGGAAATTCATGCCCCGAAG-3'

M A P K

Linker No.1(22mer)

5'-CATGGTGATCGAGGGCCGGGCC-3'

M V I E G R A

Linker No.2(14mer)

5'-CGGCCCTCGATCA-3'

図2-4 本章の研究で使用した合成DNAの塩基配列

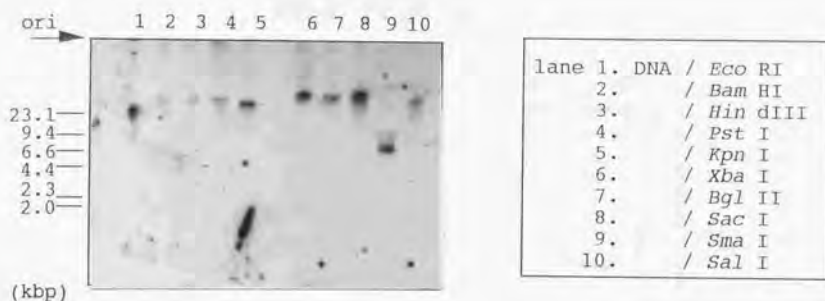


図2-5 サザンハイブリダイゼーションの結果 (1)

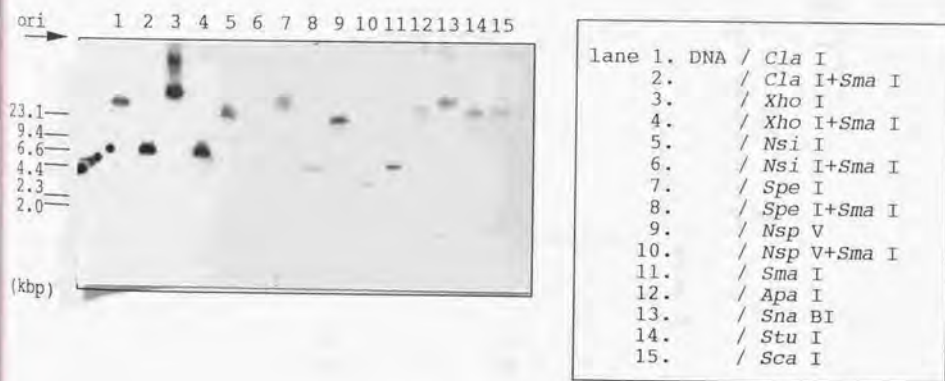


図2-6 サザンハイブリダイゼーションの結果 (2)

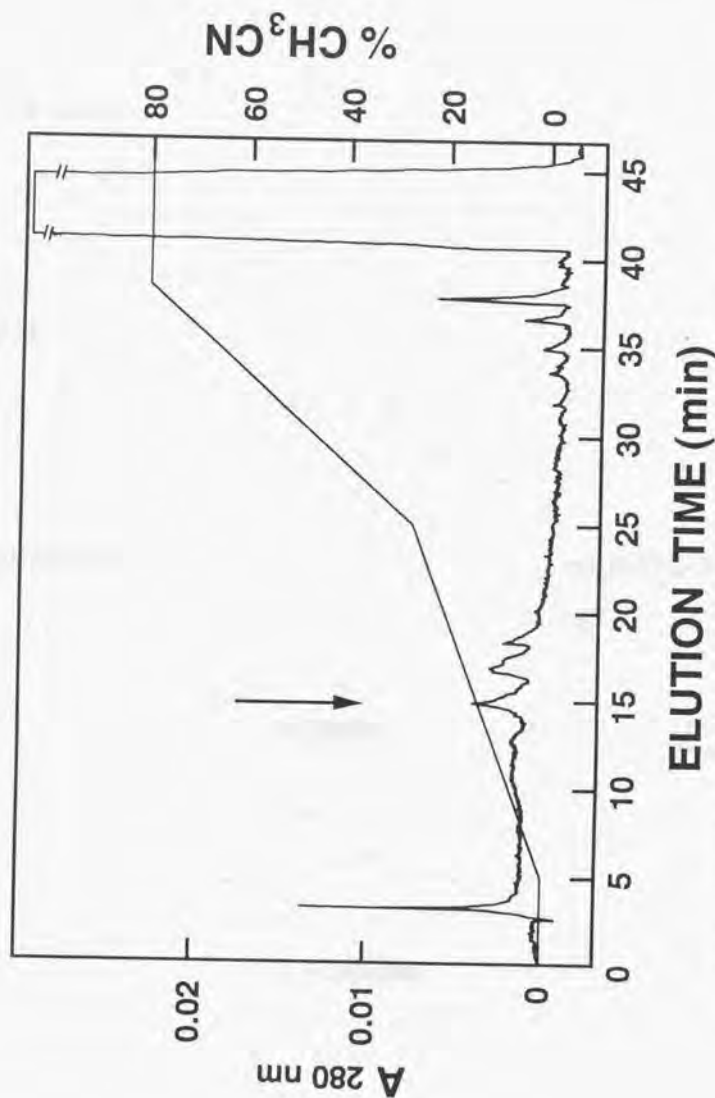


図2-7 V8プロテアーゼ処理したアボシクロムc₃の逆相系HPLCパターン
矢印がアミノ酸配列分析したフラクシオン

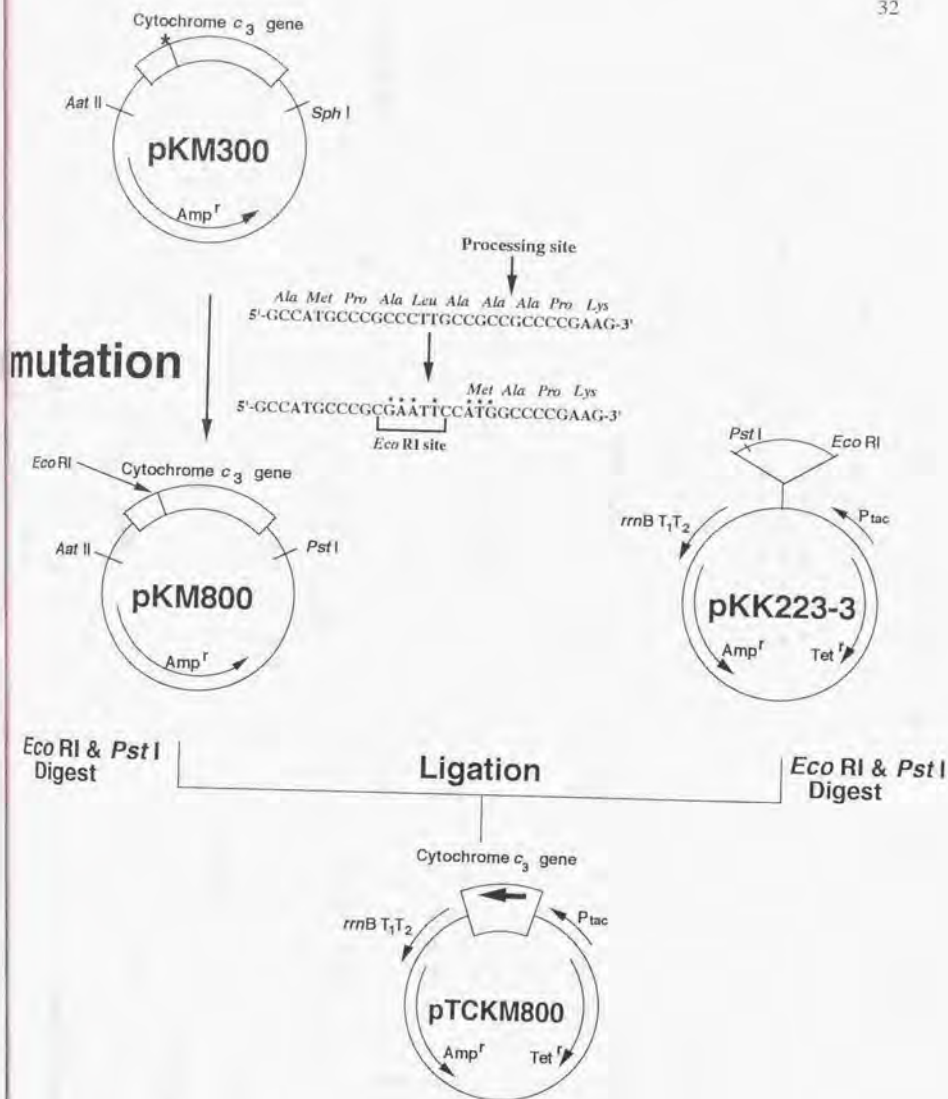


図2-8 大腸菌を用いた直接発現を目的とした発現ベクターのコンストラクション

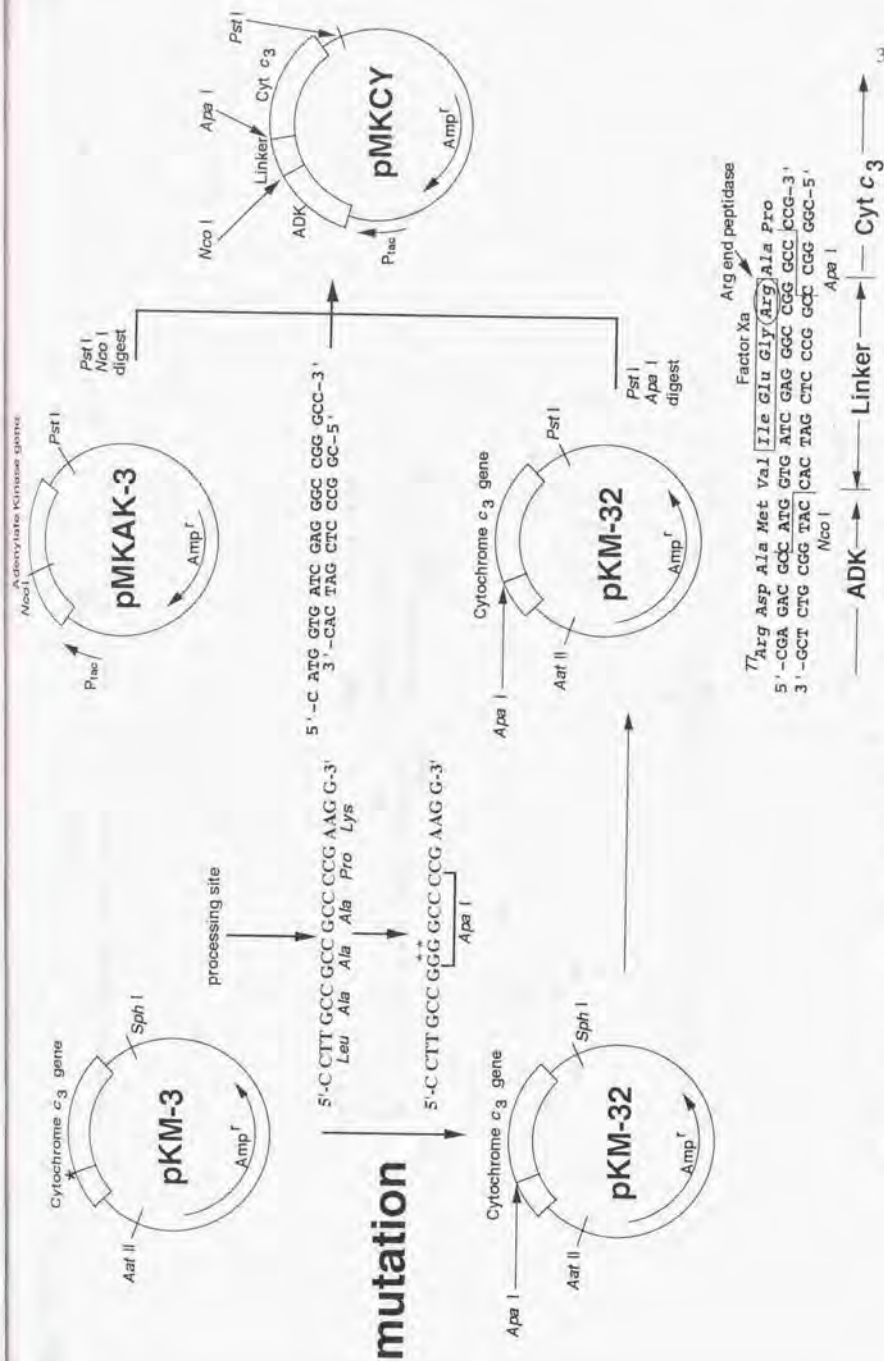


図2-9 大腸菌を用いた融合発現を目的とした発現ベクターのコンストラクション

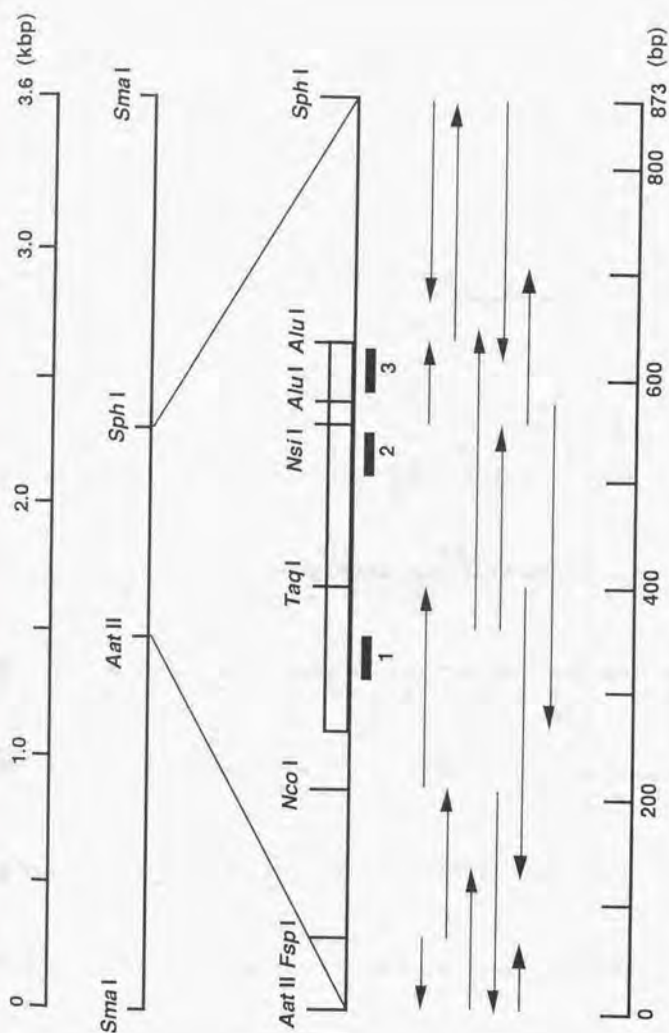


図2-10 シトクロム *c3* 遺伝子の塩基配列決定の概略
太線は、プローブを表す。

10 20 30 40 50 60 35
 GACGTCCAATGGCGCAGGAATCCGCAGAAATCCGTCTGTGGCCAGTACCCCGCCACATTTGCCGCCAAT
 Aat II

80 90 100 110 120 130 140
 GCGCATTTCTAATGGACATCCGGCCACCTTGTGCGGCACGGCACACGCGGCGGCTTCGGAATGAGGCAAC

150 160 170 180 190 200 210
 GTTTACCCCTAACCCACCAAGATTGCGCCGATTTTCCCGGCCGTCTTGACACCGCGAAACGCGACCTACT
 -35 region

220 230 240 250 260 270 280
 ACCATGGCGCTTGGGAAATCCTTAACATGCTTGTGAAGGAGGTATTCTGCGGATGAAAAAGATGTTCCT
 -10 region SD sequence M K K M F L

290 300 310 320 330 340 350
 CACCGGTGTGCTCGCGCTGGCGCTTGCCATCGCCATGCCCGCCCTTGCCGCCGCCCGCGAAGGCCCTTGCC
 T G V L A L A V A I A M P A L A A A P K A P A

360 370 380 390 400 410 420
 GACGGTGTGAAGATGGACAAGACCAAGCAGCCCGTGGTCTTCAACCACTCGACCCACAAGGCCGTGAAGT
 D G L K M D K T K Q P V V F N H S T H K A V K C

430 440 450 460 470 480 490
 GTGGCGACTGTCAACACCCGGTCAACGGCAAGGAAGACTACCAGAAGTGCGCCACCGCCGGTGTGCCACGA
 G D C H H P V N G K E (D) Y Q K C A T A G C H D

500 510 520 530 540 550 560
 CAACATGGACAAGAAGGACAAGTCCGCCAAGGGCTACTACCACGCCATGCATGACAAGGGCACCAAGTTT
 N M D K K D K S A K G Y Y H A M H D K G T K F
 Nsi I

570 580 590 600 610 620 630
 AAGAGCTGCGTGGGCTGCCACCTTGAAACCGCCGGCGCCGACGCCGCAAGAAAAAGAACTGACGGGCT
 K S C V G C H L E T A G A D A A K K K E L T G C

640 650 660 670 680 690 700
 GCAAGGCTCCAAGTGCCATAGCTAGGCACTGCCGTCATTTTCCCGGCTTTCTGGGCGCTCCCTTCGGGG
 K G S K C H S *

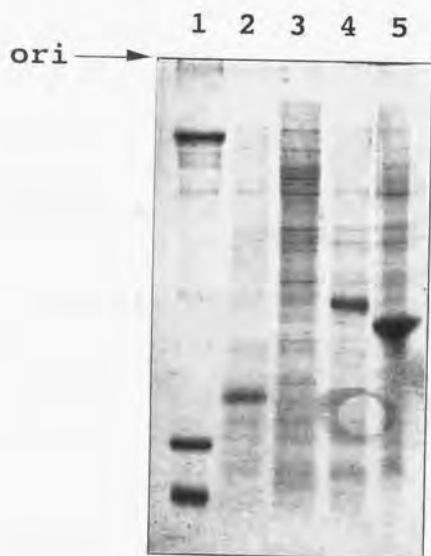
710 720 730 740 750 760 770
 CGCCTTTGCGTTTCCGGGCCGAATCAGGCCGGACCGAACTGGACCGGATCGAACTGGACCGGACCGAGCG

780 790 800 810 820 830 840
 GGGCCGGGCGGTACCGAGTCGGGCCGCGCCGACATTCATACAGGCGGGCCAGCCGGACGGCGCGTTT

850 860 870
 CGGAGCGGGAGGGGTACGCGCCATGTGGCATGC
 Sph I

図2-11 クローニングしたAat II-Sph I断片の塩基配列

プロセシングサイトは矢印で、42番の位置は、丸印で示した。



lane 1; marker protein BPTI(Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor, Mw=6,500)
 Lysozyme(from egg white, Mw=14,300)
 BSA(Bovine serum albumin, Mw=69,000)
 2; pKM300 / JM109
 3; pTCKM800 / JM109
 4; pMKCY / JM109
 5; pMKAK3 / JM109 (The main band is ADK, Mw=21,500.)

図2-12 SDS-15%PAGEによるシトクロム c_3 の発現確認

Cyt c_3 (Miyazaki F)	++ MKKMFLTGVVAVAIAMPALAAAP	↑
Cyt c_3 (Hildenborough)	++ MRKLFFCGVLALAVAFALPVVAAP	↑
Omp F	++ MMKRNILAVIVPALLVAGTANAA	↑
Bla	+ MSIQHFRVALIPFFAAFCCLPVFAH	↑
Lam B	++ MMITLRKLPLAVAVAAGVMSAQAMAV	↑

図2-13 シグナル配列の比較

上2段は、硫酸還元菌由来、下3段は、大腸菌由来の膜透過型タンパク質

第3章 シトクロムc₅₅₃

3-1 シトクロム c_{553} -タンパク質としての性質

シトクロム c_{553} は、硫酸還元菌中に含まれる c 型シトクロムの1つである。その生理活性は、ギ酸デヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼからの電子を受容するというものであるといわれている⁶⁷⁾。すなわち、乳酸を炭素またはエネルギー源として用いてこのバクテリアを生育させた時、その代謝の最初の反応に関与しているタンパク質であるといえるかもしれない。受け取った電子をシトクロム c_3 へ運ぶ(図1-2)が、この反応の *in vitro* での活性は非常に低く⁶⁷⁾、他の何らかの因子が存在するのか、もしくは、本来の生体内での活性とは異なるのか、といった疑問がもたれた⁶⁸⁾。そもそも、このタンパク質を精製するには、その分光学的な性質のみに着目すればよいので、生体内での正しい生理活性を示唆している必要はないのである。一方、その構造は、他の多く生物種から単離されているミトコンドリア型シトクロム類と相同性があり、その1次構造は、1983年 Nakanoらによって決定されている⁶⁹⁾(図3-1)。やや負の酸化還元電位(-0.26V)を持ち、1分子中に c 型ヘムを1分子含んでいるが、その軸方向の配位子は、メチオニン残基とヒスチジン残基である。ペプチド部分は、アミノ酸79残基からできており、比較的小さいタンパク質分子である。これらの点から、最も原始的な c 型シトクロムの1つであるといわれている。また、 c 型シトクロムは、多くの生物種に共通に存在しているので、その観点による分類も行われている⁷⁰⁾。シトクロム c_{553} は、分子量(分子の大きさ)から、S-classに分類されるが、この中には、*Pseudomonas aeruginosa*由来のシトクロム c_{551} や、*Azotobacter vinelandii*由来のシトクロム c_5 も含まれる。しかし、そのX線結晶構造解析の結果⁷¹⁾ は、それらは必ずしも同様の構造をしていないことを示唆した⁷²⁾。また、近年NMRによる構造解析が、Hildenborough株由来のシトクロム c_{553} についておこなわれた⁷³⁾。

そこで私は、このバクテリアから、シトクロム c_{553} 遺伝子をクローニングして、そのタンパク質の存在位置(ペリプラズムなのか、サイトプラズムなのか、)を確定することにより生理活性に対する傍証を与えるとともに、その遺伝子の下流などに他のタンパク質

遺伝子が存在し、それが、シトクロム c_{553} と相互作用をするといった、オペロンの形成の可能性を考え、この研究に着手した。すなわち、*in vitro*での活性が非常に低いのは、そういった未同定のタンパク質が存在していて、そのタンパク質が、活性化を行うかないしは中間電子伝達タンパク質として働くのではないかという仮説をたて、実験を行った。シトクロム c_3 の場合でも触れたが、もちろんc型シトクロムのタンパク質工学的研究は例が少なく、このタンパク質もその構造機能相関の好材料になると考えた。

3.2 実験方法

3.2.1 シトクロム c_{553} 遺伝子のクローニング

クローニングの手法は、シトクロム c_3 の場合と同様に行った。ゲノムDNAの抽出は、シトクロム c_3 の時のサンプルを使った。プローブは、図3-1に示した1次配列中で、シトクロム c_3 の時と同じく、メチオニンまたはトリプトファン残基を含む10残基程度の部分を選ぶこととした。また、その遺伝暗号は、この菌体で、よく使われているものを使うことにした。そこで、69番のメチオニンから76番目のメチオニンまでの8残基に対応するよう24量体のDNAを合成した。その配列は、図3-2に示すとおりであった。これを用いて、前章と同様にサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの温度は52℃、washは37℃で行い、検出には、富士フィルム社製バイオイメージングアナライザーBAS1000を用いた。その結果を図3-3に示した。これにより、6.9kbp程度ではあったが、*Eco* RIで消化したものが最も短い位置にシグナルを与えた。そこで、*Eco* RIで消化したものをさらに他の制限酵素で消化したところ、*Xba* Iで消化したものが最も短く、3.5kbp程度に、シグナルを与えた(図3-4)。そこで、ゲノムDNA100μgを*Eco* RIおよび*Xba* Iで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動により分離し、3.5kbp程度の断片を電気的に抽出した。これを、クローニングベクターpUC18を同じ酵素で消化したものに繋いだ。この混合物で、大腸菌JM109を形質転換し、LB/Amp, IPTG, X-galプレートに播いた。白いコロニー11個から、プラスミッドを取り出し、先程のプローブとハイブリダイズするものをスクリーニングしたところ、1つに、シグナルがあった。そこで、そのプラスミッドをpEX3000と

した。

3-2-2 翻訳産物の相同タンパク質の解析

クローニングした断片の塩基配列を決定したところ、シトクロム *c*₅₅₃ 遺伝子の下流領域に3つのオープンリーディングフレーム (ORF) が存在していた。この遺伝子の翻訳産物は硫酸還元菌から今までに単離精製されているタンパク質とは異なっていたので、他の生物種を含め、相同なタンパク質を検索した。データベースとしては、国立遺伝学研究所のデータを使用した。

3-3 実験結果

3-3-1 シトクロム *c*₅₅₃ 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

目的の約3.5kbpの *Eco* RI-*Xba* I のゲノムDNA断片をpUC18中にクローニングすることができた。図3-5にこの挿入断片のシークエンスの概略を、図3-6にその塩基配列を示す。クローニングした断片の中には、最初のORFの上流に、-35/-10領域と思われる領域は存在しなかった。この *Xba* I-*Eco* RI断片には、4つのORFが存在していた。ここで、ORFは、そのそれぞれの読み枠に対して独自のSD配列を持つものと定義した。それぞれのSD配列や読み枠の大きさなどをまとめたのが表3-1である。

表3-1 *Xba* I-*Eco* RI フラグメント中に含まれるORF

	SD配列の 位置 (nt.)	SD配列	開始コドンの 位置 (nt.)	ORFの大きさ (アミノ酸残基数)
ORF-1	62-67	AGGAGA	74	102
ORF-2	381-385	AGGAG	393	191
ORF-3	1146-1151	AGCAGA	1166	157
ORF-4	1709-1714	AGGAGA	1722	541

nt. 74のATGを開始コドンとし、nt. 380のTAGを終止コドンとするORF-1が、シトクロム c_{553} をコードしている遺伝子であった。コーディング領域は、既発表のアミノ酸配列と、完全に一致していた⁶⁹⁾。シトクロム c_{553} 遺伝子のSD配列は、nt. 62のAGGAGAであると思われる。開始コドンに続いて、23残基からなるシグナルペプチド遺伝子が存在した。この配列は、シトクロム c_3 の場合と同じく、開始コドンに対応したメチオニンに続き、塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニン残基が存在し、2つのセリン残基を除いて疎水性アミノ酸が続いていた。プロセッシングサイトは、アラニンとアラニンの間であって、これもシトクロム c_3 の場合と同じである。

3.3-2 シトクロム c_{553} 遺伝子より下流の遺伝子構造

さらに、シトクロム c_{553} 遺伝子の終止コドンに重なるように、次のORFのSD配列が存在しており、そのSD配列はnt. 381からnt. 385のAGGAGである。その後8塩基あいて、開始コドンと思われるATGが存在し、nt. 966のTGAが終止コドンとなる191アミノ酸残基からなるORFである。このORF-2にコードされているタンパク質は、既にアミノ酸配列が決定されている硫酸還元菌中のタンパク質とは異なっていたので、さらにデータベースから、この遺伝子産物と相同性のあるタンパク質を調べた。しかし、分子量や由来などの点を考慮すると、適当なタンパク質は見いだせなかった。

さらに下流に、ORF-3が存在していた。ORF-3のSD配列はnt. 1146からnt. 1151のAGCAGAである。その後14塩基あいて、開始コドンと思われるATGが存在し、nt. 1637のTAGが終止コドンとなる157アミノ酸残基からなるORFである。このORF-3にコードされているタンパク質もORF-2と同様、硫酸還元菌中に存在して、既にアミノ酸配列が決定されているタンパク質とは異なっており、さらにデータベースからもこの産物と相同性のあるタンパク質は見いだせなかった。

3.3-3 ORF-4の検討

ORF-4のSD配列はnt. 1709からnt. 1714のAGGAGAであると考えられる。その

後7塩基あいて、開始コドンと思われるATGが存在し、nt. 3345のTGAが終止コドンとなる541アミノ酸残基からなる読み枠が存在している。このORF-4にコードされているタンパク質もORF-2と同様、硫酸還元菌中に存在して、既にアミノ酸配列が決定されているタンパク質とは異なっていた。そこでさらに、データベースからこの産物と相同性のあるタンパク質を検索したところ、いろいろな種由来のシトクロムcオキシダーゼサブユニットIと、タンパク質の大きさやその配列という観点からも相同性があった。最も相同性が高かったのは、トウモロコシミトコンドリア由来のシトクロムcオキシダーゼサブユニットI⁷⁴⁾で、そのアミノ酸配列との比較を図3-7に示した。その他、イネミトコンドリア⁷⁵⁾、マウスミトコンドリア⁷⁶⁾、ウシミトコンドリア⁷⁷⁾、ヒトミトコンドリア⁷⁸⁾、ショウジョウバエミトコンドリア⁷⁹⁾、酵母ミトコンドリア⁸⁰⁾、大豆ミトコンドリア⁸¹⁾、サクラソウミトコンドリア⁸²⁾、アカパンカビバエミトコンドリア⁸³⁾、アフリカツメガエルミトコンドリア⁸⁴⁾、などミトコンドリア由来のシトクロムcオキシダーゼサブユニットIと相同性があった。また、ミトコンドリアを持たない原核生物でその配列が決めており、データベース上相同性が高いと判断された、根粒細菌の一種 *Bradyrhizobium japonicum*⁸⁵⁾ との相同性を図3-8に、上記12種のシトクロムcオキシダーゼとORF-4の産物（以下、シトクロムcオキシダーゼ様タンパク質、Cytochrome c Oxidase Like Protein、COLP）との相同性の比較を行ったのが、図3-9である。

3-4 考察

目的とした約3.5kbpのEco RI-Xba IのゲノムDNA断片をpUC18中にクローニングすることができた。このクローニングした断片中に確かにシトクロムc₅₅₃遺伝子が存在した。シトクロムc₅₅₃のシグナル配列は、すでにクローニングされていたHildenborough株由来のシトクロムc₅₅₃のそれと非常によく似ており、また、Miyazaki F株由来のシトクロムc₃とも相同性があった⁸⁶⁾（図3-10）。

コドンの使用頻度を次章表4-6にまとめたが、特にコドン3文字目についてGまたはCの

場合が多く、この位置におけるG、Cの出現頻度は、シトクロム c_3 遺伝子および次章で触れるFMN結合タンパク質では88%、[NiFe] ヒドロゲナーゼ遺伝子では90%、シトクロム c_{553} 遺伝子では87%であった。

プロモーター領域は、シトクロム c_{553} 遺伝子のさらに上流に存在しているのかもしれないが、その領域とシトクロム c_{553} 遺伝子の間に、別のORFが存在しているのかもしれない。もしそれが、ORFであれば、その終止コドンはnt.41のTAAかnt.3のTAGであろうと思われる。また、下流にはnt.998からのTATTAという配列があり-10領域のように見えるが、それと対になりうる-35領域が存在していないように見える。相同性からこの断片中のプロモーター領域を検索した。しかし、先の領域よりもプロモーターとして働きうる領域が、いくつか存在していたが、そのうちのどれかが機能しているのかは疑問であった。実際、プロモーター領域の検索を行った結果、そのうちの一つは、シトクロム c_{553} 遺伝子中に存在している。もちろんシトクロム c_{553} 遺伝子中に存在していることがプロモーター領域ではない根拠とはならないが、クローニングしたXba I-Eco RI断片中に含まれる遺伝子群の調節領域を確定するためには、mRNAを調べる必要がある。しかし、今のところこれらの遺伝子群がORF-1よりもさらに上流に存在するプロモーター領域によって、全て調節されているのではないかと考えている。

転写の終結領域については、Hildenborough株の場合、シトクロム c_{553} 遺伝子の下流に明かなステムループ構造が存在し転写の終結を示唆しているが⁸⁶⁾、Miyazaki F株の場合もnt.493からnt.521の領域で、2塩基のはみ出しを許せば、ステムの部分⁹⁾塩基対、ループの部分⁶⁾塩基のステムループ構造をとることができる。実際に、この領域で転写が終結しているか今のところ全くわかっていないが、この点についても細胞内からmRNAを抽出して調べればわかるかと考えている。さらに下流のCOLP遺伝子のことを考え合わせると、定常状態では先のステムループ構造が転写の終結を行い、酸素の刺激があった場合さらに転写が続きCOLPまで転写されるのではないだろうか。

COLPについては、その存在意義について考察したい。シトクロム c オキシダーゼは、ミトコンドリアに存在し、その遺伝子はミトコンドリア内にコードされている。また、この酵素は、図3-11に表したように呼吸鎖の末端に存在する膜タンパク質であって、補欠分子族として、2分子のヘム a (ボルフィリンA)、2分子の銅イオンを含んでおり、真核細

胞では約7個、原核生物では2から3個のサブユニットからなり、それぞれの分子量は5,000から42,000である。シトクロム *c* から受け取った電子を酸素に渡すが、酸素は、水素イオンと反応し水に変わる。また、そのアミノ酸配列を比較したところ、シトクロム *c* オキシダーゼ中に含まれる構造的な特徴、すなわちヘム *a* および銅イオンに配位するヒスチジン残基が6個完全に保存され、また、12個の膜貫通領域をもっている。これらの特徴をCOLPと比較してみると、今までにその酵素活性から単離された、図3-9に示した12個のシトクロム *c* オキシダーゼのうち、そのアミノ酸配列とCOLPのアミノ酸配列が共通であったのは、541アミノ酸残基中、先ほどの6個のヒスチジン残基を含む130アミノ酸残基にのぼる。さらに、12個のシトクロム *c* オキシダーゼうち9個以上のシトクロム *c* オキシダーゼのアミノ酸とCOLPのアミノ酸が一致しているものを加えると202アミノ酸残基となり、全体の37%にまでのぼる。しかし、一方で、12個のシトクロム *c* オキシダーゼのアミノ酸に共通に存在するにもかかわらず、COLPにおいて異なったアミノ酸であったものは、59残基と11%にまでのぼった。図3-9中に、保存されているヒスチジン残基の上には!で、12個のシトクロム *c* オキシダーゼのうち、そのアミノ酸配列とCOLPのアミノ酸配列が共通であったものを*で、12個のシトクロム *c* オキシダーゼうち9個以上のシトクロム *c* オキシダーゼのアミノ酸とCOLPのアミノ酸が一致しているものを#で、12個のシトクロム *c* オキシダーゼのアミノ酸に共通に存在するにもかかわらず、COLPにおいて異なったアミノ酸であったものを+で示した。また、膜を貫通すると予想される領域に下線をつけた。これらの比較から、COLPもこれらの酵素とほぼ同様の構造をしていると考えられる。一般に、この酵素群の多様性は膜から外にでている領域にあるといわれているが、COLPの場合、膜中の領域にも一致しないアミノ酸残基が存在している。

ところで、このCOLPが1次構造のみならず2次構造上もシトクロム *c* オキシダーゼと相同であるとして、その活性については2つの可能性が考えられる。1つは、酸素に対する酵素であるという仮説である。つまり、好気性細菌や一部の嫌気性細菌から単離されているスーパーオキシドジムスターゼのような、酸素に対する一種の防御タンパク質であるという仮説である。硫酸還元菌は絶対嫌気性細菌であって、生活する環境下に酸素は存在せず、有毒である。そこで、生活環境下に酸素が現れた時、酸素を水素イオンとシトクロム *c*₅₅₃からの電子によって速やかに水に変えてしまうストレスタンパク質として存在する、というものである。この仮説であれば、遺伝子の構造も無理なく説明できる。

もう1つは、あくまで硫酸還元系ないし一般代謝に関与しているとするものである。そ

の根拠は、酸素から水への酸化還元電位はかなり高い ($E_0' = +816\text{mV}$, pH7.0, 30°C) ⁸⁷⁾ 事である。そこで、おそらく他の分子 (硫酸塩から還元されていく経路に存在する分子) に電子を渡すというものである。遺伝子の構造からシトクロム c_{553} と直接ないし非常に近い関係で反応するのであるから、シトクロム c_{553} が乳酸デヒドロゲナーゼから得た電子は、シトクロム c_3 へ渡るのはではなく、COLPに渡し、さらに細胞質内に存在する分子に渡る事になる。

もちろん、この遺伝子が硫酸還元菌内でタンパク質として翻訳されているかどうかは、全くわかっていないし、遺伝子上だけ存在しているのかもしれない。菌体にはそれなりの“備え”があったのであって、それが使われるかどうかは別であるという考えもある。しかし、シトクロム c_{553} はミトコンドリア型のシトクロムであって、それに対応するようにその下流にまたミトコンドリア中に含まれるシトクロム c オキシダーゼによく似たタンパク質の遺伝子が存在するという事実は、非常に示唆的であって分子進化の上からも、非常に興味深い結果だと考えている。つまり、地球上がまだ嫌氣的雰囲気であった時には十分に使われなかったCOLPは、藻類などにより地球上に酸素が増加し、この遺伝子を受け継いだ生物が酸素呼吸を行うようになった時、このタンパク質を積極的に使ったのではないだろうか。さらにそれがミトコンドリアに受け継がれたのではないか。現在のシトクロム c オキシダーゼの祖先は、脱窒に関与する亜硝酸還元酵素であるといわれている¹⁾ が、このCOLPの可能性も否定できないと考えている。

3.5 シトクロム c_{553} の遺伝子工学的研究の今後

シトクロム c_{553} 遺伝子およびその下流領域の遺伝子構造を決定し、さらにCOLP遺伝子を見いだした。このことは、当初の目的であった、シトクロム c_{553} の *in vivo* の本来の活性に対する示唆を与えたと考えている。しかし、COLP遺伝子が実際に硫酸還元菌内で発現しているか、その電子供与体は何かなどの疑問点は存在している。これらの疑問点は、例えば、*D. vulgaris* (Miyazaki F) 株からmRNAを抽出して分析することにより、転写段階における調節の証明になるであろう。また、大腸菌はヘム a を合成することがで

きないと言われているが⁸⁸⁾、現在COLP遺伝子の大腸菌内での発現を研究中である。その発現タンパク質を精製し、その性質を明らかにすると共に、それを抗原とした抗体を作りイムノブロット法により菌体内の存在確認ができると思う。もちろん菌体内からCOLPを精製すれば、さらに直接的な証明になるだろう。

また一方で、シトクロム *c*₅₅₃ 遺伝子が大腸菌の系で発現させる試みもシトクロム *c*₃ 遺伝子の場合と同様進行中である。しかし、未だ発現タンパク質は得られていないが、さらに発現系の検討をさらに続けていく予定である。

¹Ala-Asp-Gly-Ala-Ala-Leu-Tyr-Lys-Ser-Cys-Val-Gly-Cys-His-Gly-
¹⁶Ala-Asp-Gly-Ser-Lys-Gln-Ala-Met-Gly-Val-Gly-His-Ala-Val-Lys-
³¹Gly-Gln-Lys-Ala-Asp-Glu-Leu-Phe-Lys-Lys-Leu-Lys-Gly-Tyr-Ala-
⁴⁶Asp-Gly-Ser-Tyr-Gly-Gly-Glu-Lys-Lys-Ala-Val-Met-Thr-Asn-Leu-
⁶¹Val-Lys-Arg-Tyr-Ser-Asp-Glu-Glu-Met-Lys-Ala-Met-Ala-Asp-Tyr-
⁷⁶Met-Ser-Lys-Leu

図3-1 シトクロム c₅₅₃の1次配列

probe c-553(24mer)

5'-ATGAAGGGCATGGGCGACTACATG-3'

⁶⁹M K A M A D Y M

mutation primer 553A(19mer) Eco RI site導入、pEXM3000

(大腸菌を用いた発現系の構築に用いたので本文中には登場しない。)

Eco RI

5'-ACAGGAGAATCGCATGAA-3'

M K

図3-2 本章の研究で使用した合成DNAの塩基配列

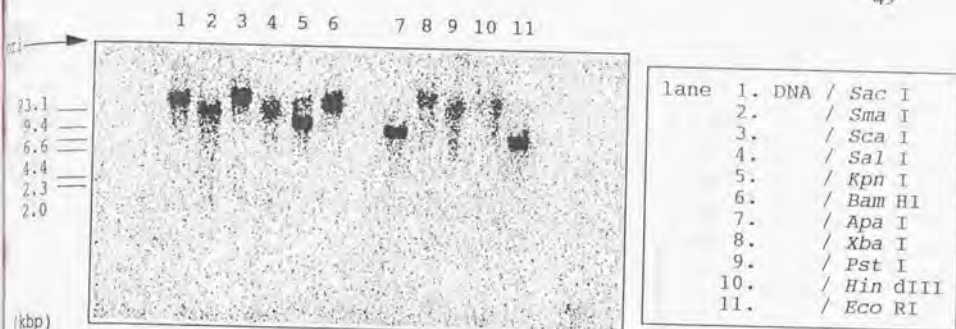


図3-3 サザンハイブリダイゼーションの結果 (1)

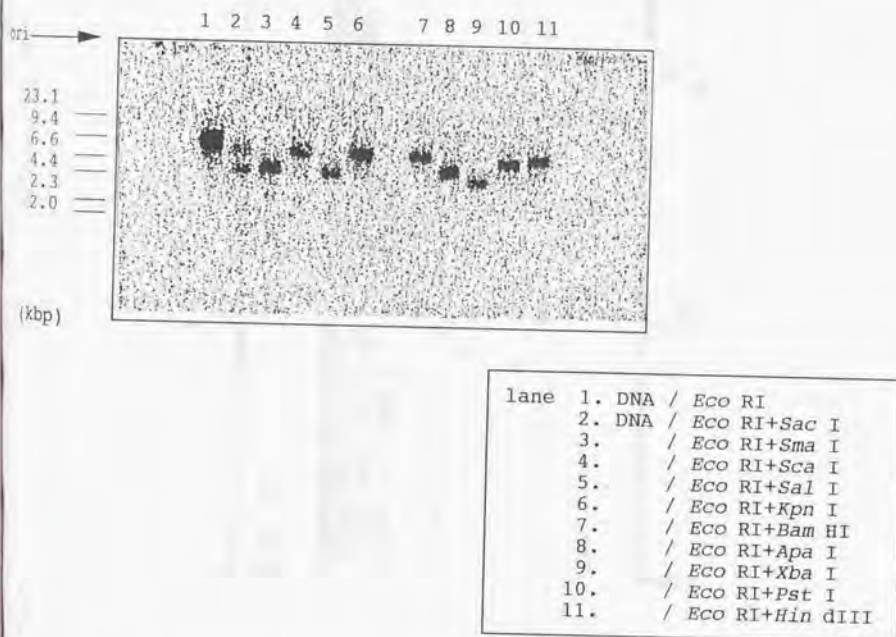


図3-4 サザンハイブリダイゼーションの結果 (2)

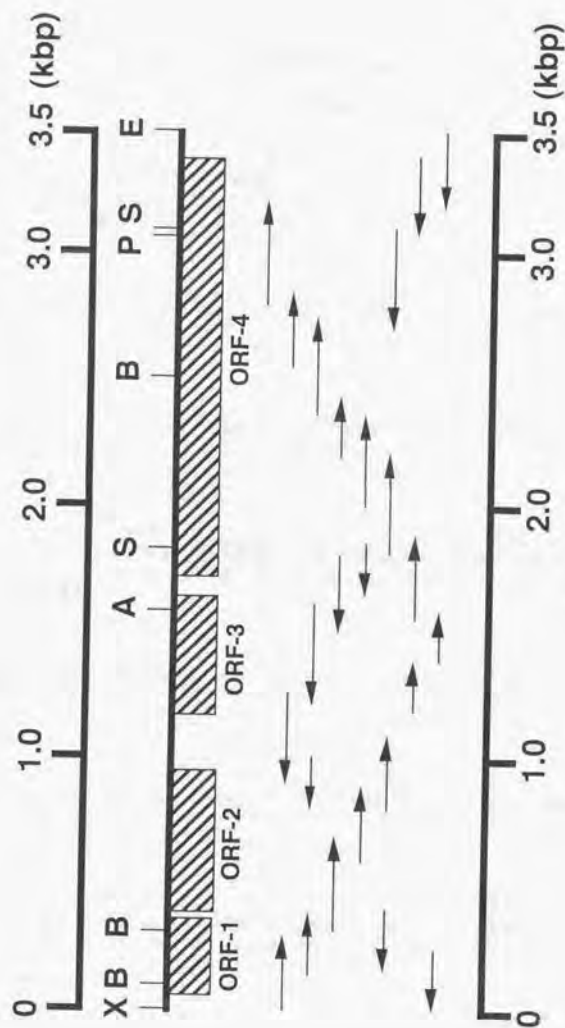


図3.5 シトクロム *c553* 遺伝子の塩基配列決定の概略

10 20 30 40 50 60
 TCTAGACCGATCCGGCGGGTGC GCCCGCGCGTTATCGGGTAAACCCGACATCACCAGAA
 Xba I

70 80 90 100 110 120
 CAGGAGAACTCGCATGAAACGCATTCTTGTGGTCATGAGCATCTGTGCCGCCCTTGCCCTT
 SD M K R I L V V M S I C A A L A F
 Bsp HI

130 140 150 160 170 180
 TGGCGTTTCCGCCGCCATGGCCGCCGATGGTGC GGCCCTGTACAAGTCGTGCGTGGGCTG
 G V S A A M A A D G A A L Y K S C V G C
 Nco I

190 200 210 220 230 240
 CCACGGGGCCGACGGCTCCAAGCAGGCCATGGCGTGGGCCACGCCGTAAAGGGCCAGAA
 H G A D G S K Q A M G V G H A V K G Q K
 Nco I

250 260 270 280 290 300
 GGCCGACGAAGTGTCAAGAAGCTGAAGGGCTACGCCGACGGCAGCTACGGCGCGCAGAA
 A D E L F K K L K G Y A D G S Y G G E K

310 320 330 340 350 360
 GAAGGCCGTCATGACCAACCTCGTCAAGCGCTACTCCGACGAGGAAATGAAGGCCATGGC
 K A V M T N L V K R Y S D E E M K A M A
 Bsp HI Nco I

370 380 390 400 410 420
 CGACTACATGTCCAAGTTGTAGGAGCAGGGCGATGCGCGTGCCTTTTCATTCCGCGACGG
 D Y M S K L * SD M R V R F H S A T V

430 440 450 460 470 480
 TTGCCGGTGTACGCGCGTTCGTGCGCCACAGCCTTGCTGACTTGTCTGTTTGGCATGTGCG
 A G V R A F V A T A L L T C L F G M C A

490 500 510 520 530 540
 CCACGTGGGGCAGGGCGCGGTTTCGACCGCGGTTCCGCCCCACGTTTGTCTCCCGTTC
 T W G R A A V S T A V P P H V L S P V L

550 560 570 580 590 600
 TGCTGGCCGCCCGCATGGTGC GCCCGTCCGCCACGGCCCTGCGGGGTATGCTACGGCCA
 L A A A D G A P S A T A P A G Y A T A I

図3-6-1 3,468bpのXba I-Eco RI断片の塩基配列

610 620 630 640 650 660
 TTGACGGGCATGGCGGGCACGGCAGTCCCGCCATGCCCCAGGCTCTGGCGGGCCAGGACG
 D G H G G H G S P A M P Q A L A A Q D G

670 680 690 700 710 720
 GAGGCGCGGGACACGCGGGGACCCCCGGCGGATGCCGCCCGGCGCAGGATTCCCATG
 G A G H A G H P P A D A A P A Q D S H A

730 740 750 760 770 780
 CCGGCCACGGCGCCGAGAAACCGCCAGCCCCGGCGGAGACGTGCACCCGGTGCCCCC
 G H G A A E T A Q P P A E T C T R C P R

790 800 810 820 830 840
 GCCCACCACGGGCAAGCTGGGGCAACCCGGTCAGCCGATTACAGGCGATTACGCCGGGGCA
 P P R A S W G N P V S R F R R F S R G R

850 860 870 880 890 900
 GGGCGCTTCCGGCGATCCATCAGCCAGACTCCCTTGCAGGCGTTGACGAGCGTCTCGG
 A L P A I H Q P R L P L Q A L T S V S A

910 920 930 940 950 960
 CGACATCATCCCCGAGGGCATTCTGCTGCGCGACGAGTCGGGCAGCCCCATCGACCCGCG
 T S S P R A F C C A T S R A A P S T R A

970 980 990 1000 1010 1020
 CACCTGATGGACGTTCCGGTGATCATCGCGCCCATCTATTATTCTGCCCCACCGTGTG
 P *

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CAACATGCTGC AAAGCTCGCTGGCGCGGGTGTGCGCAGGTTTCGCTGCAACCCGGCAA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GGACTACCGGGTCTGTCCGTGAGCTTTGACGAGACGGACACTCCGCAACTGGCAGCGG

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AAAGAAGCAGAACTATTTGCGGCCATGAATTTGCCTATCCGGAAGACGGCTGGCGCTT
 SD M N F A Y P E D G W R F

図3-6-2 3,468bpのXba I-Eco RI断片の塩基配列

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CCTGTCCGGCGACCTCGCATCCATCAACAGGTTTCATGGACGCCATCGGGTTCGGTTTCAC
 L S G D L A S I N R F M D A I G F R F T

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CCGGCAGGGGCGCGACTTCATCCATCCCGTGGTGGTGGTCACCGCGCCGGGCGGCAA
 R Q G R D F I H P V V L V V T A P G G K

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 EGTGGTGGCTACCTGTACGGCCAGAACTTCATGCCCTTCGACCTGACCATGGCCGTCAC
 V V R Y L Y G Q N F M P F D L T M A V T

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GGAAGCCTCGCACGGCACCATCGGCCTGTCGGTGAAGCGCGTGCTGTCGTACTGCTTCAC
 E A S H G T I G L S V K R V L S Y C F T

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CTACGACCCGGAAGGGCGGCGCTATGTGTTGACTTCATGCGCATAGCGGGAATGATCAT
 Y D P E G R R Y V F D F M R I A G M I I
 Bcl I

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 CCTGTTCGGCGCGCGGTGCTGCTGTTGCTGCTGTTGCGGGGCGGCGCCGCGCAGGAAGGA
 L F G A A V L L F V L L R G G P R R K E

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 ACGCAAGGGGCGCGAGGGCCCGCCATCGTCCAAGGCGCGCGGACCGACCCGCCACCGCC
 R K G A E G P P P S S K A P P T D P P P P
 Apa I

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGGTTCATCGCAGGGATAGCCGCCGTTCCGGCGTGCGCGCCCCGTCCCGTTCATCGTCCA
 G S S Q G *

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 TTCGTGCTCCACTGCCCGCACCAGACACAGGAGACCATCGCATGAGCGCAGACGCGCACG
 SD M S A D A H D

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ACCACCCGAACCTCTTCAGCCGTTGCCCGGCACGAAGGGCGGGATTGCGCTCGTGGATT
 H P N F F Q P L P G T K G G I A S W I F

図3-6-3 3,468bpのXba I-Eco RI断片の塩基配列

1810 1820 1830 1840 1850 1860
 TCAGCACCCGACCACAAGCGCATCGGCATGCTGTACCTGTACTGCATCGTCGCCATGTTCC
 S T D H K R I G M L Y L Y C I V A M F L
Sph I

1870 1880 1890 1900 1910 1920
 TGGTGGGGCTGACACTCGGCTTCCTGATCCGGCTGGAATCATCGCGCCGGGGCGCACCA
 V G L T L G F L I R L E L I A P G R T I

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 TCATGGGGCAGCAGACCTACAACGCGCTGTTACCCCTGCACGGGTGGTGATGATCTTCC
 M G Q Q T Y N A L F T L H G V V M I F L

1990 2000 2010 2020 2030 2040
 TGGTGGTCATCCCCAGCATTCCCGCCGCTTCGGCAACATCTTCTGCCCATCCAGATCG
 V V I P S I P A A F G N I F L P I Q I G

2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GGGCGGAGGACGTGTCTTTTCCCGGCTGAACATCTTTTCGTGGTGGCTGTACGTCACCG
 A E D V S F P R L N I F S W W L Y V T G

2110 2120 2130 2140 2150 2160
 GCGCGGTGCTGGCCGTGGTCTCGCTGGTCACCGGCAAGGGCGCGCCGACACCGGCTGGA
 A V L A V V S L V T G K G A P D T G W T

2170 2180 2190 2200 2210 2220
 CCTTCTACGTGCCCTTCAGCGCGGTGACCACCACCAACGTGGACGTGGCCGTGCTGCGCG
 F Y V P F S A V T T T N V D V A V V A V

2230 2240 2250 2260 2270 2280
 TGTTTCATCTGGGCTTTTCGTCCATTCTACCGGGCTGAACCTTCATCACCACCCTGCACC
 F I L G F S S I L T G L N F I T T L H R

2290 2300 2310 2320 2330 2340
 GGCTGCGCGCCCCCGCATGACCTGGACGCGCCTGCCGCTGTTCTGCTGGTGGTGTACG
 L R A P G M T W T R L P L F C W S L Y A

2350 2360 2370 2380 2390 2400
 CCACCGGATGGATTCAAGGTGCTGGCCACGCCGGTGTGGGCATCACCCTGCTGCTCATCT
 T G W I Q V L A T P V L G I T V L L I F

2410 2420 2430 2440 2450 2460
TCGTGAGCGCGTGTGGGCGTGGGCGCTGTTCGATCCCTCGCGCGGGGGCGACCCCATCC
V E R V L G V G L F D P S R G G D P I L

2470 2480 2490 2500 2510 2520
TGTACCAGCACCTGTCTGGATCTATTTCGACCCGGCGGTGTACATCATGATCCTGCCCG
Y Q H L F W I Y S H P A V Y I M I L P A
Bsp HI

2530 2540 2550 2560 2570 2580
CCATGGGCGTTATCTCCGAGATTCTGCCGGTGTTCGCGCGCAAGCCCATCTTCGGCTACA
M G V I S E I L P V F A R K P I F G Y K
Nco I

2590 2600 2610 2620 2630 2640
AGATGATCGCCTTCTCCAGCCTTGCCATCGCCTTCGCCGGGTTCGCTGGTGTGGGCGCACC
M I A F S S L A I A F A G S L V W A H H

2650 2660 2670 2680 2690 2700
ACATGTTGTCAGCGGCATGAGCGACACGGCGGTGATGGTCTTTTCGTTCTTGACCTTCG
M F V S G M S D T A V M V F S F L T F V

2710 2720 2730 2740 2750 2760
TGGTTGCCATTCCGTCGGCCATCAAGGTCTTCAACTGGGTGTCCACGCTGTACAAGGGGT
V A I P S A I K V F N W V S T L Y K G S

2770 2780 2790 2800 2810 2820
CCATCCGGGTGGAACCGCCCCTGTGGTACGCGCTGGCGTTCATCTTCCTGTTCTCCATCG
I R V E P P L W Y A L A F I F L F S I G

2830 2840 2850 2860 2870 2880
GCGGGCTGACGGGCGCTTGTGCTGGGCGCGGGCGGACCGACGTGCACGTGCACGACACCT
G L T G L V L G A A G T D V H V H D T Y

2890 2900 2910 2920 2930 2940
ACTTCGTGGTGGCGCAITTCACCTACGTGATCTTCGGCGGGCTGGGCTTCGGGCTGTTCG
F V V A H F H Y V I F G G L G F G L F G

2950 2960 2970 2980 2990 3000
GGGCCATGCACTACTGGTTCCCAAGGTCTACGGCGCATGTACGACAAGCGCATCGCCA
A M H Y W F P K V Y G R M Y D K R I A N

図3-G-5 3,468bpのXba I-Eco RI断片の塩基配列

3010 3020 3030 3040 3050 3060
 ACTGGTCGTGCCTGGTCGCCTTCGTGGGCTTCAACATCCTGTACTTCCCATGTTCAATC
 W S C L V A F V G F N I L Y F P M F I L

3070 3080 3090 3100 3110 3120
 TGGGGCTGCAGGGCATGCCGCGCCGCTACTACGACTACCTGCCCAAGTATGCCGAGGGGC
 G L Q G M P R R Y Y D Y L P K Y A E G H
Pst I Sph I

3130 3140 3150 3160 3170 3180
 ACTTCATCTCCACCATGGGCTCGTGGGTGCTGGCGACGGGGCTACTGCTGATGTTCTGGA
 F I S T M G S W V L A T G L L L M F W N
Nco I

3190 3200 3210 3220 3230 3240
 ATCTCTGGCGGGGCATCCGCCACGGCAAGCCCGTGGGCCGCAACCCGTGGGGCGCGGCCA
 L W R G I R H G K P V G R N P W G A A T

3250 3260 3270 3280 3290 3300
 CCCTGGAGTGGACGGTGCCTTCGCCGCCCGCCGACCACTTCGAGGCCGAGCCCGTGG
 L E W T V P S P P P H H N F E A E P V V

3310 3320 3330 3340 3350 3360
 TCACCCATGGTCCCTACGACTACACGGGGGTGAAGCCCGATGCATGAGCACCGCGACTAT
 T H G P Y D Y T G V K P D A *
Nco I

3370 3380 3390 3400 3410 3420
 GAAGGCGCAAGATCGGCATGTGGCTCTTCCTGTTACGGAAGTGTGCTGTTTCGGCGGG

3430 3440 3450 3460
 CTGTTCTCTGCTATGCCGTGTACCTGCACCGCTACCGGCGGAATTC
Eco RI

図3-6-6 3,468bpのXba I-Eco RI断片の塩基配列

COLP ; MSADAHDPNFEQPLPCTKG GIASWIFSTHKKRIGMLYLY CIVAMFLVGLTLGLRLLEL IAPGRTIM-G-QQYNAIFTLH
 Cyt c oxidase chain I ; MT NLVRWLFSTNHKDKITLYFI FGAIAGVMTCTFSLIRMEI ARPGDQILGNGHQLYNVLTIAH
 GVVMIFLVVPISIPAAFGNI FLPIQIGAEVSEFRLNIFS WWLYVTGAVLAVVSLVTKG APDTGWTFFYVFPFSAVTTTV DVAVVAVFIL--GFSSILTGLN
 AFLMIFWVPAMIGGFNGW FVPILGAPDMAFFRLNNIS FWLLPPSLLLLSSALVEVG -SGTGWTVVPLSGITSHSG GAVDLAIFSLHLSGVSSILGSIN
 FITTLHRLRAPGMTWTRLPL FCWSLYATGWIQVLA TPVLG ITVLLIFVERVLGVGLFDPG RGGDPILYQHLFWIYSHPAV YIMILPAMGVISEILPVFAR
 FITFIENMRGPGMTMHLRPL FVWSVLVTAFLLLLSLPVLA GAITMLLTDNRNFTTFDPA GGGDPILYQHLFWFEGHPEV YILILPGFGLIISHIVSTFSR
 KPLFGYKMIASFSSLAIAFAG SLVNAHHMFVSGMSDTAV MVFSFLTFFVVAIPSAIKVFN WVSTLYKGSIRVEPPLWYAL AFIFLSIGGLTGIVLGAAGTD
 KPVFGYLGMYAMISIGVLG FLVWAHHMFTVGLDVTDR AYETAATMLIAVPTGIKIFS WIATMGGSIQYKTPMLFAV GFIFLFTTIGGLTGIVLANSGLD
 VVHVDTYFVVAHEHYVIFGG LGFGLFGAMHYWFPKVYGRM YDKRIANWSCLVAFVGFNLL YFPMFILGLQGMPPRYDYVL PKYAECHFISTMGSWLATG
 LALHDTYVVAHFHYVLSMG AVFALFAGFYVWVKIFGRT YPETLGOIHFWITFFGVNLT FFPMHFLGLSGMPRRIPDYP DAYAGWNALSSFGSYISVVG
 L--LLMFNWLNRGIRHGKPVGR NPWG---AATLEWTVPSPPHN FEAEPVVTHGPDYTGKPD A
 V. ^
 IRRFFVVVAITSSSGKNKRCAE SPWAVEQNPTLEWLVSPPAFHT FGELPTIKETRNOQSC

図3-7 COLPとトウモロコシミトコンドリア由来シトクロムcオキシダーゼのアミノ酸配列比較

COLP

;

MSADAHDPNFFQPLPGTKG GIASWIFSTDHKKRIGMLYLV CIVAMFLVGLTGLFLRLLEL IAPGRTIMQ-OTYNALFTLH
Cyt c oxidase chain I ; MATSAAAHGHDHAQDHGDEHAHPT GWRRYVYSTNNHKDGTMYLI FAVIAGVIGAMSIAIRAEI MYPGVQIFETHETYNVFTVTS

GVVMIFLVVIPSIPAAFGNI FLPIQIGAEVDSFPRINIFS WMLVVTG-AVLAVSLVTGKG APD---TGWTFFVPPFSVAV--TTTNV DVAVVAVFILGFSSILTGLN
GLIMIFFVMVPMIGGFGNW FVPLMIGAPDMAFPRMNNIS FWLLPASFCGLLLMSTFVEGEP GANGVGAGTMYVPLSSSGHPGPAV DEALLSILHAGASSILGAIN

FITLHRLRAPGWTWTRLPL FCWSLYATGWIQVLATPVLG ITWLLIFVERVLGVGLFDPS RGGDPILYQHLFWTYSHPAV YIMILPAMGVISEILPVFAR
FITTFNMRAPGWTLHKMPL FVWSILVTVFLLLSLPVLA GAITMLLTDRNFGTTFTAPD GGGDPVLFOHLFWFFGHPEV YIILLPFGCMISQIVTFSR

KPLFGYKMIASFSLAIAFAG SLVWAHHMEVSGMSDPAV MVFSLTFVVAIPSAIKVEN WVSTLYKGSIRVEPPLWYAL AFIFLSIGLTLGLVGAAGTD
KPVFGYLGMAVAMVAIGGIG FVWVAHHMYTVGMSSATQ AYFVAATWIAVPTGVKIFS WIAIMWGGSIFFRAPMIWAV GFIFLFTVGGVTGVLANAGVD

VHVHDTYFVVAHFHYVIFGG LGFGLFGAMHYWFPKVIYGRM YDKRIANWSCLVAFVGFNIL YFPMFILGLQMPRRYDYL PRYAEGHFISTMGSWLATG
RVLQETVYVVAHFHYVLSLG AVFAIFAGWYWFEPKMTGYM YNETLAKAHFWFFIGVNLV FFPQHFLGLSGMPRRYVDYP DAFAGNVLVSSVGSYISGFG

LLLMFWNLWRGIRHGKPVGR NPW--GAATLEWTVPSPPPHHN FEAEFVTHGPDYDTGVKRPD A
VLIFLYCVIDAFAKKVPAGD NPWGAGATTLEWLPSPPPFHQ FEVLPRVQ

図3-8 COLPとBradyrhizobium japonicum由来シクロムcオキシダーゼのアミノ酸配列比較

下線は、Bradyrhizobium japonicum由来シクロムcオキシダーゼにおいて、膜中に存在するとされた領域。

[illegible][illegible]

oudal :	トモロコシミドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
ouzel :	イヌミコシコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
ouzel :	炭酸樹由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
oudal :	マウスミドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
oudal :	ワシミコシコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
oudal :	ヒラミコシコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
ouzel :	シヨウジョウバエミドリコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
oudal :	酵母ミコシコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
oudal :	大豆ミコシコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
oudal :	サツウウミミコシコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
oudal :	アカガカビミコシコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン
oudal :	アフリカビエガエミコシコドリア由染シトクロム、オキシダー、ヒチチニイン

- * : すべてに一巻
- + : 75%以上のシントクロムとホキシダゲルゼチエニールとCOLPが一致
- + : すべてのシントクロムとホキシダゲルゼチエニールで一巻しているにもか
- + : かかわらず、COLPでは異なる
- ! : ベームと銅に配位する保存されたホキシダゲルゼチエニール残基
- ! : COLPと一致
- ! : キヤットアップ

表3-9-2 COLPと12種のシトクロムcオキシダーゼチエンIのアミノ酸配列比較

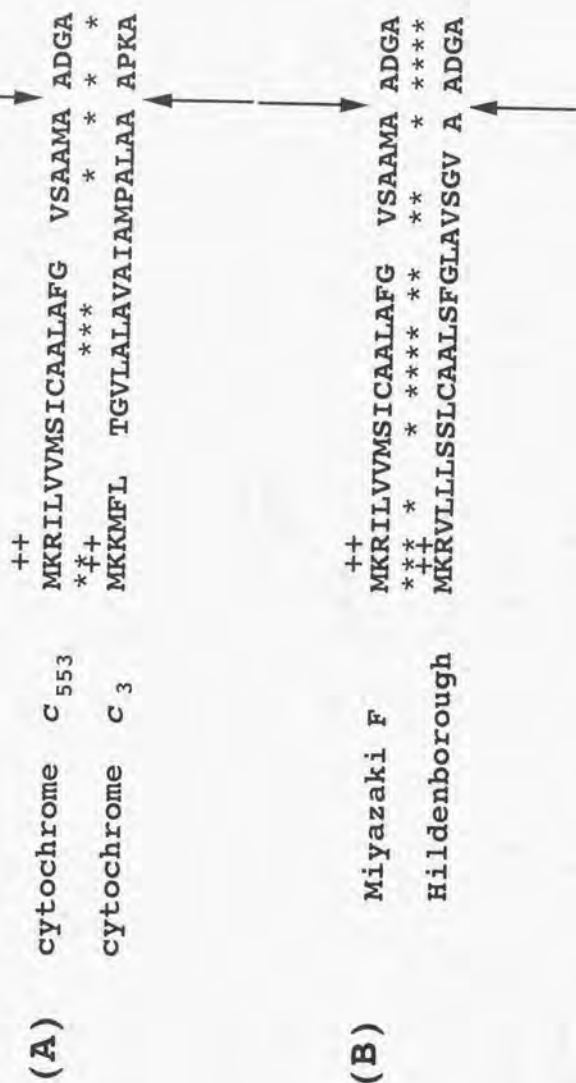
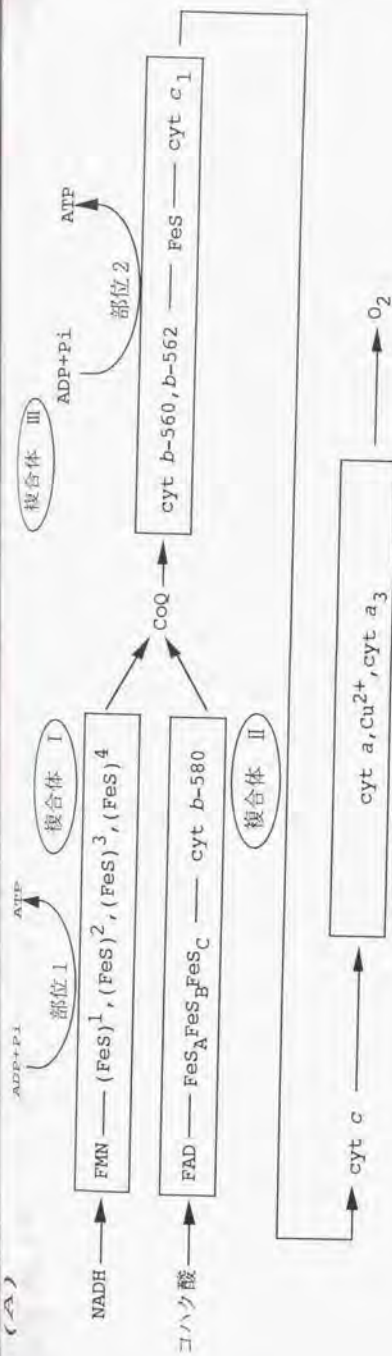


図3-10 シダナルペプチドの比較

(A) *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株由来のシトクロム c_{553} とシトクロム c_3

(B) *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株由来のシトクロム c_{553} と *D. vulgaris* (Hildenborough) 株由来のシトクロム c_{553}



(B)

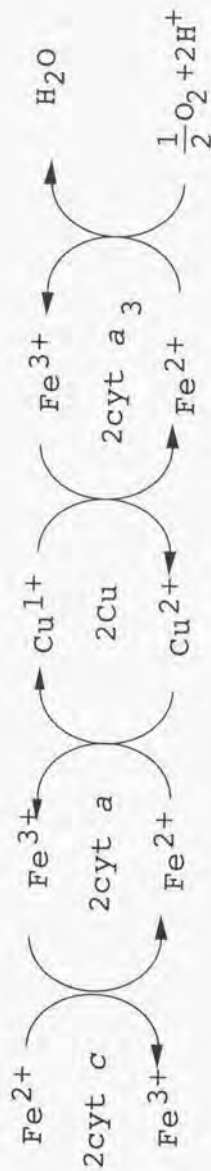


図3-11 ミトコンドリアの電子伝達系

(A) 複合体 I、II、III、IV とその成分

(B) 複合体 IV 内の電子キャリアーの反応順序

第4章 FMN結合タンパク質

4-1 フラビンタンパク質 ～FMN結合タンパク質発見の経緯～

硫酸還元菌内には、何種類かのFMN（フラビンモノヌクレオチド）を含むタンパク質が含まれていることが予測されているが、実際にそのアミノ酸配列が決定されているものは、唯一フラボドキシンだけであった⁸⁹⁾。フラボドキシンは、フェレドキシンと同じくシトクロム c_3 を仲介としてヒドロゲナーゼから電子を受け取る電子受容体タンパク質であって、補欠分子族としてFMNをポリペプチド1分子あたり1分子含んでいる⁹⁰⁾。培地中に鉄が不足している状態では、フェレドキシンよりもフラボドキシンが多く発現しているという報告もある⁹¹⁾が、必ずしもそうではないらしい⁹²⁾。ほかの多くの生物種からフラボドキシンが精製され⁹³⁾、その1次構造が決定されたり⁹⁴⁾、⁹⁵⁾、⁹⁶⁾、⁹⁷⁾、⁹⁸⁾、⁹⁹⁾、¹⁰⁰⁾、立体構造が決められたりしている¹⁰¹⁾、¹⁰²⁾、¹⁰³⁾、¹⁰⁴⁾が、それらにはある程度の共通性が見られる。特に、硫酸還元菌由来のフラボドキシンにおいては、すでに5種の株からその1次構造が決定されている⁸⁹⁾、¹⁰⁵⁾、¹⁰⁶⁾、¹⁰⁷⁾が、それらは、5種すべてに共通するアミノ酸が全体の28%にまでのぼり、その相同性は非常に高い（図4-1）。

また、硫酸還元菌由来の他のフラビンタンパク質が、そのバクテリアの性質の本体ともいえる硫酸還元経路に存在している可能性が、八木らによって示唆されている¹⁰⁸⁾。このタンパク質の補欠分子族は、FMNではないらしいが、少なくとも、電子伝達系や硫酸還元系を形成するタンパク質中には、数個のフラビンタンパク質を含んでいると想像されている。

当初、私は、フェレドキシン遺伝子のクローニングを試みた。*D. vulgaris* (Miyazaki F) 株からは、今まで2種類のフェレドキシンが単離され、その1次構造が決められている¹⁰⁹⁾、¹¹⁰⁾。その各々の遺伝子に対応した、2つの合成オリゴヌクレオチドを用意した。すなわち、フェレドキシン I 遺伝子に対しては、2番目のトリプトファンから12番目のスレオニンまでに対応するよう32量体（この合成DNAをFer-Iと名付けた）を、フェレドキシン II 遺伝子に対しては、21番目のシステインから27番目のメチオニンまでに対応するよう21量体（この合成DNAをFer-IIと名付けた）である。その配列を図4-2に、各々の

合成DNAを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果を図4-3に示す。Fer-Iについては、ハイブリダイゼーションの温度を60℃とし、Fer-IIについては、50℃とした。また、washは、各々50℃、37℃とした。この結果から、フェレドキシン I 遺伝子は、約700bpの *Eco* RI-*Sma* I フラグメント中に、フェレドキシン II 遺伝子は、約1.4kbpの *Kpn* I-*Sma* I フラグメント中に含まれるものと推定した(表4-1)。そこでこれらの断片をシトクロム *c₃* の場合と同様に同じ酵素で消化したクローニングベクターpUC18に連結し、得られたプラスミッドを各々pFE1-1およびpFZ1-7と名付けた。

表4-1 予想したフェレドキシン遺伝子のマッピング(単位はbp)

	Ferredoxin I gene	Ferredoxin II gene
DNA / <i>Sma</i> I	8020	3330
DNA / <i>Eco</i> RI	1090	11000
DNA / <i>Kpn</i> I	13400	13400
DNA / <i>Sma</i> I + <i>Eco</i> RI	730	3330
DNA / <i>Sma</i> I + <i>Kpn</i> I	8020	1380
DNA / <i>Eco</i> RI + <i>Kpn</i> I	1090	4370

まず、pFE1-1について *Rsa* I、*Taq* I、*Alu* I を用いてサブクローニングすると同時に、*Exo* nuclease III、*Mung* Bean Nucleaseを用いた欠失変異体を作成し、その遺伝子構造を決定したが、予想された塩基配列、すなわちフェレドキシン遺伝子は存在しなかった。図4-4に決定した塩基配列の一部と、おそらく合成DNAがハイブリダイズしたであろう領域を示す。このタンパク質遺伝子については、この章末に、初期的なデータではあるが、その遺伝子の構造を決定したので、参考に付け加える。

次に、pFZ1-7については、予測した約1.4kbpの *Kpn* I-*Sma* I フラグメントがクローニングされているのではなく、約2.0kbpの *Sma* I-*Sma* I フラグメントが、pUC18の *Sma* I サイトに挿入されたものであったので、まず、このプラスミッドを *Kpn* I で消化して再び、*Kpn* I で消化したpUC18に連結したところ、いくつかのクローンが黄色を呈色しており、何らか

のタンパク質が発現しているか、ないかは、この黄色の物質を作るタンパク質が発現しているものと考えて、このクローンについて、研究を行うこととした。

4-2 実験方法

4-2-1 FMN結合タンパク質遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

得られたプラスミッドpFZ1-7の挿入断片(約2.0kbpのSma I-Sma Iフラグメント)の塩基配列を決定した。このフラグメントを、pFE1-1の場合と同じく4塩基認識の制限酵素*Rsa* I、*Sau* 3A I、*Alu* Iを用いてサブクローニングし、また一方でExo nuclease III、Mung Bean Nucleaseを用いて作成した欠失変異体により塩基配列を決定した。

4-2-2 FMN結合タンパク質の精製

まず、精製するときの目印にするため、細胞破砕液の可視紫外吸収スペクトルを測定した。これは、アルカリ・SDS法によるプラスミッドの抽出時に行う操作の途中段階である、*Solu* IIIを加え氷冷後沈殿物を遠心除去した上清をサンプルとしたもので、その結果を図4-5に示す。これにより、440nm付近に吸収極大を持つことがわかった。

これを利用して、カラムによる精製を試みた。まず、この物質を大量に得るため、pFZK-2でJM109を形質転換し、これを30mlのLB/Amp培地(アンピシリン濃度は、50~100μg/ml)に植え、これをLB/Amp培地1ℓに植え継ぎ(500mlずつ2本の2ℓの三角フラスコを使った。)、一晩37℃で好氣的に培養した。菌体を4℃、6000rpmで10分遠心することにより集菌後約70mlのTE緩衝液に懸濁した。これを、超音波破碎した。これには、KUBOTA社製Model201Mソニケーターを用い、200Wで10分処理した。これを、4℃、10,000rpmで20分遠心することにより細胞残さ(debri)を沈殿させた。この上清を、さらに、4℃、45,000rpmで2時間遠心することによりリボソームを取り除いた。これを、50mM Tris-HCl(pH 8.0)に対して4℃で一晩透析した。透析したサンプルは、陰イオン交換カラムDE-52(Whatman社製、ジエチルアミノエチルセルロース、2.2x18cm)により精製した。このカラムは、50mM Tris-HCl(pH 8.0)で平衡化しており、サンプルを吸着させた後、同じ緩衝液200mlで洗った。その後、50mM Tris-HCl(pH 8.0)から200mM NaCl/50mM Tris-HCl(pH

8.0)への200mlずつの直線濃度勾配をかけた。各フラクションの280nmと440nmの吸光度を測定し、その比が、15より小さい画分を集め、凍結乾燥した。これを、少量の50mM Tris-HCl (pH 8.0)に溶かし、ゲルろ過カラムにより精製した。樹脂として、セファクリルS 200 (2.6x60cm)を、システムは、ファルマシア社製FPLCシステムを用いた。緩衝液は、200mM NaCl/50mM Tris-HCl (pH 8.0)である。また、この精製タンパク質の可視紫外吸収スペクトルを図4-6に示した。

また、FMNが結合した状態での分子量を測定するために、ゲルろ過カラム、セファデックスG-75 (1x35cm)を用いた測定を行った。標準物質として、BSA (Bovine Serum Albumin, Mr=69,000)、STI、BPTIを用い、緩衝液として、500mM NaCl/100mM Tris-HCl (pH 7.5)、流速は0.7ml/minである。一方で、SDS-PAGEによる分子量を測定した。分離ゲルの濃度は、18.8%である。標準物質として、STI (Soybean Trypsin Inhibitor, Mr=20,100)、Cyt c (Cytochrome c, Mr=12,500)、BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor, Mr=6,500)を用いた。

4.2.3 補欠分子族の同定

図4-6の377nmおよび448nmに可視部の吸収極大をもつ可視紫外吸収スペクトルから、この黄色い物質は、“フラビンないしその誘導体”であることが示唆されたので、ジチオナイトによる還元実験を行った。フラビンないしその誘導体は、ジチオナイトにより可視部の吸収がなくなり時間が経過すると、空気により再酸化され、再び可視部の吸収が戻る(111)、(112)。これは、酵素溶液中に、粉末のジチオナイトを加え、可視紫外吸収スペクトルの変化を測定することにより行った。

さらに、この補欠分子族が、どのようなフラビンであるかを決定するため、HPLC (高速液体クロマトグラフィー)を利用して分析を行った。カラムは、C18 (M&S PAK C-18, 0.46x25cm)を用い、溶媒系は、0.1%TFA (トリフルオロ酢酸)中で、アセトニトリルによる直線濃度勾配、流速は0.8ml/minであり、検出は280nmの紫外吸収により行った。まず、市販のFMN (フラビンモノヌクレオチド)とFAD (フラビンアデニンヌクレオチド)の混合溶液を作り、先の条件で流した。次いで、同じ条件でサンプルを注入すると、酸性条件下では、フラビンを配位結合しているフラビントタンパク質は、速やかにペプチド部分

とフラビン部分に別れるので、溶出されてきたフラビンのリテンションタイムにより、同定した。

加えて、軽微な修飾の可能性を否定するため、LC/MS（液体クロマトグラフィー/質量分析）による補欠分子族の分析を行った。先ほどのHPLCによる分析により溶出されてきたサンプルを減圧下で乾燥させ、LC/MS（Hitachi社製M-1000）による分析を行った。

4.2.4 ペプチド部分のアミノ酸配列決定

ペプチド部分の1次構造を決定した。1次構造を決定するには、ゲルろ過後のサンプルでは精製が不十分であったので、逆相系HPLCによりさらに精製した。カラムは、ブチル基を修飾したカラム（Asahipak C4P-50, 0.46x15cm）を用い、溶媒系は、0.1%TFA中で、アセトニトリルによる直線濃度勾配、流速は0.8ml/minであり、検出は280nmおよび215nmの吸収により行った。この操作により、SDS-PAGEにおいて、単一のバンドを与えるまで精製できた（図4-7）。

精製したペプチドを用いて、アミノ酸組成分析を行った。約30μgのアボタンパク質を5.7N HClで24時間110℃で完全に加水分解した。アミノ酸組成分析には、Hitachi社製L-8500アミノ酸自動組成分析機を用いた。

また、アミノ酸配列分析によりアミノ末端から25残基の配列を決めた。アミノ酸配列分析は、アプライドバイオシステム社のmodel 473A自動分析機を用いた。

さらに精製したペプチドをトリプシンにより消化断片化し精製した。約50μgのアボタンパク質を2M 尿素/10mM Tris-HCl (pH 8.0)/1mM CaCl₂中で1μgのトリプシンと37℃6時間反応させ、そのサンプルを先ほどの精製に用いたのと同じ条件で精製した。そのフラクションの配列分析も先ほどと同様に行った。

4.2.5 FMN結合タンパク質の *in vitro*での活性

このタンパク質の活性は、全くわかっていなかった。通常の場合、まず、何らかの活性を指標として細胞からタンパク質を精製し、その1次構造を決定してから遺伝子構造がわ

かるものである。ところが、このタンパク質は、まず遺伝子が存在し、発現が確認されたという経緯であるから、活性に対する知見は、皆無であった。

まず、今まで発見されているすべてのタンパク質のデータベースを利用し、アミノ酸配列の相同性から、活性の検討を行った。これらの中で由来、分子量の点で合致すると思われるのは、フラボドキシン以外にはなかった。そこで、フラボドキシン活性を調べる目的で、この菌体由来のヒドロゲナーゼ、シトクロム c_3 を使い、リン酸緩衝液中で、水素による還元の様子を可視吸収の減少を指標として測定した。フラボドキシンであれば、この反応系で還元されるはずである。次に、何らかの有機酸の酸化活性の可能性を考え、乳酸、ビルビン酸、エタノール、アセトアルデヒドとの反応を、同様に可視吸収の減少を指標として測定した。リン酸緩衝液中のタンパク質溶液に、それぞれを乳酸、ビルビン酸については、ナトリウム塩の形で、その他はそのまま数滴下し、可視吸収スペクトル変化を観察した。

一方で、このタンパク質は、補欠分子族としてFMNをもつことがわかっているので、電気化学的な測定を行い、その酸化還元電位を *in vitro* の活性として、測定することにした。電極に吸着した形での酸化還元電位測定、ポテンシャルモジュレーテッドUV/VISリフラクタン分光分析を行うため、サンプルは30mMリン酸緩衝液中、150 μ Mタンパク質溶液とし、電極は4種類、すなわち2種類のバイロリティックグラファイト電極、HMD E (Hanging Mercury Drop Electrode) およびグラッシーカーボン電極を用いた。バイサルプレーンバイロリティックグラファイト (BPG) 電極の表面に吸着したFMN結合タンパク質は、吸着しなかったサンプルを取り除いた後、直流サイクリックボルタモグラムの+0.8Vから-0.6Vの範囲でpH 7.1で測定した。ディファレンシャルパルス電位測定には、ポテンシオスタット (Fuso model 1312) を使った。参照電極には、KCl溶液で飽和させたAg/AgCl電極を使い、白金をカウンター電極に用いた。測定は25℃で行い、電位は、標準水素電極に対する値として得た¹¹³⁾。

4-2-6 FMN結合タンパク質の存在確認

このタンパク質が、硫酸還元菌 *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株内に実際に存在することを確かめた。このことは、遺伝子上存在し大腸菌中では発現しても、実際の菌体内では、生

産されていないタンパク質であるという可能性を否定するためである。まず、大腸菌内で発現したFMN結合タンパク質をイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーを使って精製したサンプルを用意した。これを、ウサギに定期的に注射することにより抗FMN結合タンパク質抗体を含む抗血清を得た。この操作は、宝酒造株式会社バイオ研究所カスタムサービスセンターに委託した。通常の培地で生やした *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株および鉄を1/10に減らした培地で生やした *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株について、イムノブロット法を用いて、この抗FMN結合タンパク質抗体に反応するバンドの検出により、発現を確認した。

4-2-7 FMN結合タンパク質の高発現系の構築

このタンパク質は、クローニングした状態で十分な発現が見られたが、これをさらに高発現させるべく、*lac*プロモーターをもつpKK223-3およびそのコピー数を上昇させた、pMK2⁽⁴³⁾に、この遺伝子を繋ぐことにした。

pFZK-2からORF-3以外の不要な部分を取り除くため、まず、3'末端側をExo-nuclease IIIおよびMung Bean Nucleaseを使って削除した。この操作は、この遺伝子の配列を決定するために作った欠失変異体の中から、最も終止コドンの近くまで削除できていた、pFZKDL-5を選んだ。この欠失変異体は、図4-10に示した塩基配列上では、nt.627からnt.1279の挿入断片を含んでいる。さらに、5'末端側は、開始コドンATGの上流3塩基の位置にEco RIサイトを導入するために、部位特異的変異法を用いた。mutation primerとしてF-pro Mut1を合成した。その配列は、図4-2に示す通りである。この変異によって作成したプラスミッドpFZKDL-M5をEco RIにより消化し、セルフライゲーションすることにより、プラスミッドpBT-100を得た。このプラスミッドは、結果として、nt.861からnt.1279を挿入断片として含んでいる。このプラスミッドをEco RIとHind IIIにより消化して、挿入断片を取り出した。この断片を、発現ベクターpKK223-3およびpMK2を同じ酵素で消化したものに繋いだ。でき上がったプラスミッドをそれぞれpKKBT-100、およびpMKBT-100と名づけた。また、pFZKDL-5を同様に繋いだものも作成し、各々pKKDL-5、pMKDL-5と名付けた。これらのプラスミッドの作成スキームを図4-8に、まとめた表を表4-2に示す。

表4-2 本章で作製したFMN結合タンパク質関連のプラスミッド

プラスミッド	構造・作製法など
pFZ1-7	約2.1kbpの <i>Sma</i> I- <i>Sma</i> I ゲノムDNA断片がpUC18の <i>Sma</i> I部位に挿入されたプラスミッド
pFZK-1	pFZ1-7を <i>Kpn</i> I消化後、自己連結させたプラスミッド。pFZ1-7の約0.7kbpの <i>Sma</i> I- <i>Kpn</i> I断片がpUC18の <i>Sma</i> I- <i>Kpn</i> I部位に挿入されたプラスミッド。
pFZK-2	pFZ1-7を <i>Kpn</i> I消化して得られた約1.4kbpの <i>Kpn</i> I- <i>Kpn</i> I断片をpUC18の <i>Kpn</i> I部位に挿入したプラスミッドのうちFMN結合タンパク質の遺伝子の方向とpUC18の <i>lac</i> プロモーターが同一方向のもの。
pFZK-3	pFZK-2とほとんど同じであるが、挿入方向が逆のもの。
pFZKDL-5	pFZK-2の <i>Bam</i> HI及び <i>Pst</i> I部位を利用して作製した欠失変異体のうちFMN結合タンパク質遺伝子の終止コドン直後まで削除できたプラスミッド。挿入断片は、ORF-2とORF-3を含む約650bp。
pFZKDL-M5	pFZKDL-5中のORF-3の開始コドンの直前に <i>Eco</i> RI部位を部位特異的変異法により導入したプラスミッド。
pBT-100	pFZKDL-M5を <i>Eco</i> RIにより消化し、自己連結させたプラスミッド。挿入断片は、ORF-3のみを含む約400bp。
pKKDL-5	pFZKDL-5を <i>Eco</i> RIと <i>Hin</i> dIIIにより消化して得られた約400bpの挿入断片を発現ベクターpKK223-3の <i>Eco</i> RI- <i>Hin</i> dIII部位に挿入したプラスミッド。
pMKDL-5	pFZKDL-5を <i>Eco</i> RIと <i>Hin</i> dIIIにより消化して得られた約400bpの挿入断片を発現ベクターpMK2の <i>Eco</i> RI- <i>Hin</i> dIII部位に挿入したプラスミッド。
pKKB-100	pBT-100を <i>Eco</i> RIと <i>Hin</i> dIIIにより消化して得られた約400bpの挿入断片を発現ベクターpKK223-3の <i>Eco</i> RI- <i>Hin</i> dIII部位に挿入したプラスミッド。
pMKBT-100	pBT-100を <i>Eco</i> RIと <i>Hin</i> dIIIにより消化して得られた約400bpの挿入断片を発現ベクターpMK2の <i>Eco</i> RI- <i>Hin</i> dIII部位に挿入したプラスミッド。

4-3 実験結果

4-3-1 FMN結合タンパク質遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

図4-9に、この約2.0kbpのSma I-Sma I断片の塩基配列決定の概略を、図4-10に、その塩基配列を示す。まず、+35/-10領域と思われる領域は、他の生物種との相同性からnt. 219からnt. 224のTTGCGA/nt. 242からnt. 247のGATGCTであると推定された。しかし、nt. 301からnt. 306のTTTACA/nt. 325からnt. 330のTCTAATの可能性も存在する。また、この両方が使われているのかもしれないと考えた。

次に、ORFは、SD配列および、その下流に開始コドンと終止コドンが同一フレームに存在することを条件に検索すると、図4-10の塩基配列を(+)鎖とする4つのORFが存在した。それらを、前から、ORF-1、ORF-2、ORF-3、ORF-4と名付けた。各々をまとめると、下の表4-3のようになる。このうちORF-1は、プラスミッドpFZK-2中に含まれないので、直接黄色を呈する物質と関係はないと考えられた。

また、このFMN結合タンパク質とは結果的に関係なかったが、プローブFer-IIとハイブリダイズしたのは、nt. 1527からnt. 1547の5'-GCCCCGGAAGGCTTCGGGGTT-3'であり、5'末端の3塩基と3'末端の2塩基は、相補鎖を作らないが、残り16塩基は、完全に一致していた。

表4-3 Sma I-Sma Iフラグメント中に含まれるORF

	SD配列の位置	SD配列	アミノ酸残基数
ORF-1	378-383	AGGTGG	55
ORF-2	695-699	AAGGG	43
ORF-3	853-856	AGGA	122
ORF-4	1568-1573	AGAAGG	68

4-3-2 FMN結合タンパク質の精製

陰イオン交換カラムのカラムパターンを図4-11に示す。また、ゲルろ過カラムのカラムパターンを図4-12に示す。

また、分子量測定のためのゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出時間と分子量の関係を、図4-13に示す。この結果からは、分子量は、17,500と見積もられた。

SDS-PAGEによる分子量の測定の結果を図4-7に示す。この結果からは、分子量は、11,500と見積もられた。

4-3-3 補欠分子族の同定

ジチオナイトによる還元実験の結果を図4-14に示す。空気による再酸化の過程で、セミキノン状態のスペクトルは観測されなかった。

フラビン誘導体とこの補欠分子族の溶出時間を比較したHPLCチャートを図4-15に示す。これにより、明らかに、この補欠分子族は、FMNであることがわかった。

LC/MSの結果、質量数456に親ピークが現われ、このサンプルが、未修飾のFMNであることが確認された（図4-16）。

4-3-4 ペプチド部分のアミノ酸配列決定

逆相系HPLCによる精製パターンを図4-17に示す。またこの精製操作により、補欠分子族であるFMNは、ペプチドから脱離した。

アミノ酸組成分析の結果を、表4-4に示す。また、トリプシン消化物のカラムパターンを図4-18に、そのフラクションおよびアミノ末端のアミノ酸配列分析の結果を表4-5に示す。ピーク4は、2つのペプチドの混合物であり、ピーク9は、カルボキシ末端ペプチドであった。

これらの結果から、このタンパク質はORF-3の翻訳産物であることが確認された。また、最初のアミノ酸はメチオニンであり、タンパク質合成開始後、脱離していなかった。アミノ酸レベルでの確認は、122残基中76残基におよび、全体の62%まで確認した。

表4-4 アポFMN結合タンパク質のアミノ酸組成分析

アミノ酸	Protein analysis	DNA sequence
Asn+Asp	10.0	10 (6+4)
Thr	8.0	9
Ser	3.2	4
Glu+Gln	10.3	10 (8+2)
Pro	4.9	5
Gly	14.1	14
Ala	13.0	13
Cys	not determined	0
Val	13.5	14
Met	2.3	3
Ile	4.6	4
Leu	10.3	10
Tyr	0.8	2
Phe	5.8	6
Lys	4.8	5
His	2.1	2
Arg	8.6	9
Trp	not determined	2
Total		122

表4-5 FMN結合タンパク質のペプチド部分のアミノ酸配列分析の結果

Cycle No.	N-terminus		Peak-1		Peak-3		Peak-4-a		Peak-4-b		Peak-5		Peak-9	
	Amino acid	Yield (pmol)	Amino acid	Yield (pmol)	Amino acid	Yield (pmol)	Amino acid	Yield (pmol)	Amino acid	Yield (pmol)	Amino acid	Yield (pmol)	Amino acid	Yield (pmol)
1	Met	288	Ile	176	Val	330	Phe	554	Thr	239	Asn	250	Ala	275
2	Leu	159	Val	112	Leu	281	Lys	489	Asp	570	Gly	237	Ala	287
3	Pro	200	Val	111	Met	305	Trp	255	Gly	719	Pro	208	Leu	206
4	Gly	320	Pro	68	Thr	77	Ala	511	Pro	569	Gly	217	Val	245
5	Thr	65	Val	88			Arg	220	Glu	96	Thr	30	Ile	230
6	Phe	248	Gly	79					Phe	584	Gly	150	Thr	44
7	Phe	256	Gly	91					Glu	28	Phe	133	Val	202
8	Glu	118	Met	71					Ala	541	Leu	90	Val	211
9	Val	220	His	N.Q.							Ile	108	Ser	24
10	Leu	90	Lys	46							Arg	50	Ala	133
11	Lys	66											Glu	121
12	Asn	93											Gln	85
13	Glu	54											Thr	138
14	Gly	173											Leu	27
15	Val	151												
16	Val	148												
17	Ala	76												
18	Ile	105												
19	Ala	70												
20	Thr	N.Q.												
21	Gln	44												
22	Gly	97												
23	Glu	N.Q.												
24	Asp	N.Q.												
25	Gly	75												
Positions 1-25		44-53	64-71	104-108	93-103	77-86	109-122							

N.Q.; Not quantified

4-3-5 FMN結合タンパク質の *in vitro*での活性

データベースを用いた相同性の検討は、何も有効な情報を与えなかった。すなわち、相同性が高いと判定されたタンパク質は、FMNを補欠分子族としてもっていないかつたし、由来は高等動物のものであった。そこで、FMNを補欠分子族としてもっているタンパク質をデータベースから抽出し比較検討をした。しかし、FMNを補欠分子族としてもっているタンパク質は、意外に少なく、以下の5つに分類できることがわかった。

(i) ルシフェラーゼおよびそのサブユニット¹¹⁴⁾、¹¹⁵⁾、¹¹⁶⁾、¹¹⁷⁾

(ii) 同時にヘムを持つもの(シトクロム b_2 ¹¹⁸⁾、¹¹⁹⁾ またはP-450類¹²⁰⁾、¹²¹⁾、¹²²⁾、¹²³⁾)

(iii) 2-Hydroxy-acid oxidase類¹²⁴⁾

(iv) フラボドキシン⁸⁹⁾、⁹⁴⁾、⁹⁵⁾、⁹⁶⁾、⁹⁷⁾、⁹⁸⁾、⁹⁹⁾、¹⁰⁰⁾、¹⁰⁵⁾、¹⁰⁶⁾、¹⁰⁷⁾

(v) その他(Dihydroorotate oxidase¹²⁵⁾ Glycerol-3-phosphatedehydrogenase¹²⁶⁾、Sulfite reductase¹²⁷⁾)

この中では、由来やタンパク質の大きさからもフラボドキシン以外には、相同であると判断できなかったので、フラボドキシン活性を測定したが、結果的には可視吸収に変化はなかった。さらに有機酸の酸化の実験においても、可視吸収に変化はなかった。

一方、ベイスルブレンパイロリティックグラファイト(BPG)電極の表面に吸着したFMN結合タンパク質の直流サイクリックボルタモグラムのピークから、-326mVと計算された。さらに、ポテンシャルモジュレーテッドUV/VISリフラクタンス分光分析の結果、-324mVに最大応答を示し、これは、フリーのFMNより85mV卑であることが示された。ただし、フリーのFMNの値は、電極に吸着した状態であって、溶液状態の酸化還元電位とは異なる¹²⁸⁾。これらの結果から、BPG電極に吸着したFMN結合タンパク質の酸化還元電位は-325mVと求められた。

ディファレンシャルパルス電位測定では、BPG電極の場合、メインピークの他に-240mVにも小さな肩のピークが見られ、エッジブレングラファイト(EPG)電極の場

合では、明らかな2つのピークが現われた(図4-19)が、これはタンパク質から脱離し吸着したフリーのFMN由来であると思われた。メインピークから求めた酸化還元電位は、 -324mV であった(図4-20)。

4-3-6 FMN結合タンパク質の存在確認

イムノブロッキングの結果を、図4-21に示す。通常の培地で生やした *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株および鉄を1/10に減らした培地で生やした *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株においてもほぼ同様の結果が得られた。*D. vulgaris* (Hildenborough) 株においては、さらに高分子量のところにバンドが現れた。

4-3-7 FMN結合タンパク質の高発現系の構築

作製したプラスミッドにより形質転換されたJM109の発現量を比較した図を、図4-22に示す。この定量は、細胞破碎液の、 440nm の吸光度から計算した。また、その定量性は、SDS-PAGEにより確認した(図4-23)。

4-4 考察

4-4-1 FMN結合タンパク質遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

Sma I-*Sma* Iフラグメントは、表4-1によれば、約 3.3kbp であって、クローニングした断片は、約 2.0kbp であった。この理由については、もともとクローニングしようとした断片ではないか、または、物理的にないしは制限酵素のスター活性により切れた断片が、クローニングされたものと考えた。しかし、次節で述べるが、塩基配列上ほぼ一致する領域が存在するので、先の可能性は低くおそらく後者であると思われる。その場合、両末端の *Sma* Iサイトのうちどちらかは、存在していないと思われる。

調節領域を含め(・)鎖について言及しないのは、以下の理由による。すなわち、*pFZ1-7*の *Kpn* I消化した後、セルフライゲーションさせたもので、4-3-1節で述べたプロモーター領域を含むプラスミッドを *pFZK-1*、挿入断片をあらかじめ *Kpn* Iで消化した *pUC18*に連結

し、黄色の呈色を見せたものをpFZK-2、無色であったものをpFZK-3と名付けた。これにより、pFZK-1には、図4-10におけるnt.1からnt.632の断片部分を含むプラスミッドとなり、また、シーケンスの結果、pFZK-2は、pUC18の*lac*プロモーターの下流に図4-10のnt.627からnt.2053の断片を正方向に、pFZK-3は、逆方向に挿入したプラスミッドとなっていることがわかった。すなわち、黄色を呈しているクローンがもつプラスミッドpFZK-2は、その挿入断片自身にはプロモーター領域を持たず、また、pFZK-3により、形質転換された大腸菌JM109では、黄色を呈しないことから、pUC18の*lac*プロモーターと同方向の遺伝子により、この黄色い物質の生成を誘導したと考えられる。したがって、(-)鎖には、この現象に関与する遺伝子は存在しないと考えた。

また、この論文を構成している3つの遺伝子および、4-14追記のフェレドキシンI遺伝子および[NiFe]ヒドロゲナーゼ遺伝子²⁷⁾のコードン使用頻度を表にしたのが、表4-6である。コードン3文字目はGまたはCが多いことは、他でも述べたが、例えば、ロイシンに対してTTA、イソロイシンに対してATA、セリンに対してTCA、プロリンに対してCCAは、今のところ使われた例がない。また、Hildenborough株由来の遺伝子を含めグルタミン酸のコードンだけは、GAAがGAGよりも高頻度で使用されているのが通例であったが、FMN結合タンパク質においては逆転していた。このことも、この遺伝子の発現調節に何らかの影響を与えているのかもしれない。

4-4-2 FMN結合タンパク質の精製

ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の測定値は、計算値よりもかなり大きくなった。この理由ははっきりしないが、BPTIが、かなり早く溶出されているのかもしれない、または、このタンパク質が、球形ではない可能性もある。SDS-PAGEによる分子量の測定については、電気泳動中FMNは脱離しているのかもしれないが、少し小さく見積もっているのかもしれないと考えられる。

このタンパク質の分子量は、遺伝子配列より翻訳したアミノ酸配列より、ペプチド部分は、13,200と計算された。FMNの分子量は、約500であり、ペプチド1分子あたりFMN1分子が結合していることは、可視紫外吸収スペクトルから決められている。合わせて、このタンパク質の分子量は、13,700と計算される。

表4-6 硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) 株由来のタンパク質遺伝子のコドン使用頻度

	T					C					G					A				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
T	TTT	1		1		TCT	1	1	1		TAT	2				TGT	2	2	1	2
	TTC	3	5	3	1	TCC	2	9	4	1	TAC	3	2	3	5	TGC	6	19	2	5
	TTA					TCA					TAA	1				TGA		1		
	TTG			1		TCG	1	1	12	1	TAG	1	1	1	1	TGG		2	11	1
C	CTT	2		6	2	CCT	1				CAT	2	1	3		CGT		1		
	CTC	2	1	8	1	CCC	2	1	30	2	CAC	7	1	27	2	CGC	6	32	2	
	CTA			1		CCA					CAA					CGA		1		
	CTG	3	9	4	3	CCG	2	4	28		CAG	2	2	24	2	CGG	2	4		
G	ATT		3	1		ACT		1		2	AAT		2			AGT	1	1		
	ATC	1	4	15	1	ACC	6	6	44	1	AAC	3	6	33	1	AGC	2	1	10	2
	ATA					ACA		1			AAA	2			2	AGA		1		
	ATG	6	3	17	8	ACG	1	1	10		AAG	20	5	50	11	AGG		1		
A	GTT	1	1	5	1	GCT		2		1	GAT		1	6	1	GGT	3	2	5	1
	GTC	2	2	15	3	GCC	18	8	64	16	GAC	9	3	37	5	GGC	8	7	62	10
	GTA				1	GCA		3			GAA	3	3	36	2	GGA		1	1	
	GTG	4	11	51	3	GCG	1	5	27	1	GAG		5	14	2	GGG	4	5	1	

a; cytochrome *c*₃ gene
b; FMN-binding protein gene
c; [NiFe]hydrogenase gene
d; cytochrome *c*₅₅₃ gene
e; ferredoxin I gene

いずれにしても、このFMN結合タンパク質は、現在までに発見されているFMNを結合しているタンパク質のなかで、最も小さい分子であることが明らかになった。

4-4-3 補欠分子族の同定

可視紫外吸収スペクトルおよびジチオナイトによる還元反応から、この補欠分子族がフラビンないしその誘導体であることがわかった。しかし、この還元反応が、瞬時に起こる2段階反応であるか、2電子反応であるかはわからなかった。

HPLCおよびLC/MSによる分析によりこの補欠分子族は未修飾のFMNであることが明らかになった。

4-4-4 ペプチド部分のアミノ酸配列決定

ORF-3の翻訳産物は、シグナルペプチドらしい配列をもっており、また、水に可溶性であったので、細胞質に存在していることが示唆された。ただし、C18カラムからペプチド部分は、アセトニトリル濃度を80%まで上げて溶出されなかったため、多少疎水性が強く、内膜への膜結合性があるのかもしれない。

4-4-5 FMN結合タンパク質の*in vitro*での活性

このFMN結合タンパク質にフラボドキシン活性を見いだすことはできなかった。しかし、フラボドキシン、特に硫酸還元菌由来のフラボドキシンは、非常に相同性が高く(図4-1)、Miyazaki F株由来のフラボドキシンは、単離されていないとはいえ、この株由来のフラボドキシンだけ相同性が低いとは考えにくかった。しかし、可視吸収に変化がないことは、反応系に問題があるのかもしれない(さらなる補因子が必要なのか、酵素の活性が十分であったか、溶存酸素などの脱気が不十分だったのではなど)、このタンパク質がフラボドキシン活性を持たない証拠にはならないと考えている。このことは、有機酸の酸化実験の結果にも、同様のことが言えると思う。

電気化学的測定においては、グラファイト電極に吸着したFMN結合タンパク質の酸化還元電位は-325mVであることがわかった。HMDE電極とグラッシーカーボン電極を用い

て、電極表面に吸着したFMN結合タンパク質の液相での電極反応は、応答が現われず観察できなかった。これらの実験により、確かにFMN結合タンパク質が、酸化還元反応を行うことができることが証明された。

4-4-6 FMN結合タンパク質の存在確認

この結果から、明らかにFMN結合タンパク質がこの菌体内において発現し、培地の鉄の含量にかかわらず、一定の働きをしていることを示している。また、*D. vulgaris* (Hildenborough)株の場合も明らかなバンドが現われたが、このバンドは分子量的にかなり大きな位置であり、同じタンパク質であるのか不明であるが、少なくとも、抗FMN結合タンパク質抗体に反応するタンパク質が、*D. vulgaris* (Hildenborough)株にも存在することが示唆された。

4-4-7 FMN結合タンパク質の高発現系の構築

もともとFMN結合タンパク質の発現が確認できたプラスミッドpFZK-2により形質転換されたクローンを1とすると、pFZKDL-5では、0.89とほとんど変わらない値を示したのに対して、pBT-100では、0.81とやや少量であった。これは、pFZK-2やpFZKDL-5においては、これらのプラスミッドの持つプロモーターである*lac*プロモーターからメッセンジャーRNAが合成され、*lacZ*とFMN結合タンパク質の直前までの配列にしたがった融合タンパク質遺伝子(*lacZ::X₁* geneとする)とその下流のFMN結合タンパク質遺伝子を同時に転写するが、発現段階においては、*lacZ::X₁* geneを翻訳していた同じリボソームが翻訳し、加えて、FMN結合タンパク質遺伝子の翻訳にはその遺伝子由来のSD配列を認識したりリボソームが翻訳しているのに対して、pBT-100では、*lacZ::X₂*遺伝子の翻訳が終わらない前に、FMN結合タンパク質遺伝子が開始しており、さらに、FMN結合タンパク質遺伝子由来のSD配列が存在しないことが原因であると考えた。発現ベクターに繋いだpKKBT-100およびpMKBT-100は、ともに、高発現を示し、pFZK-2の場合の3.3~3.4倍程度となった。これは、プロモーターが強力であることによるものであると考えた。プラスミッドのコピー数の効果は、若干しか現われなかった。また、pKKDL-5、pMKDL-5の場合でも、pKKBT-

100およびpMKBT-100の場合には及ばないにしても高発現を示しており、5'末端を取り除いた効果は、この発現ベクターに繋いだ場合、14%程度の上昇でしかなく、pFZK-2の場合の2.9倍程度であった。

この高発現系の構築においては、高発現プロモーターへの組換えが、最も効果的であったことを示した。

4.4.8 FMN結合タンパク質の構造的知見

FMN結合タンパク質の1次構造を決定したので、ChouおよびFasmanによる2次構造予測法¹²⁹⁾に、このタンパク質を当てはめた。その結果を図4.24に示す。他のFMNを結合しているタンパク質において、1次構造上はそれほど相同性は高くなくても、解かれた高次構造解析の結果においては、 β - α - β - α - β といった構造をしていることがわかっているが¹³⁰⁾、¹³¹⁾、この結果からは、このタンパク質も β - α - β - α - β といった、典型的なFMNを結合しているタンパク質の2次構造と同様の構造をしていることを示唆した。しかし、1次構造においては、このタンパク質は全く新規であることも同時に示している。また、次節で触れるが、最初の β -シートを形成している中に、Thr-Trp-Asnという配列が存在しており、この配列に注目している。

4.5 現在進行しているFMN結合タンパク質の研究

まず、このタンパク質の結晶構造解析が進んでいる。このタンパク質は、脱塩後、高濃度にして低温(4℃)にしておくだけで、結晶が得られることがわかり、このタンパク質のX線結晶回折により、その3次元構造の解明を検討している。

さらに、このタンパク質が、今まで得られているFMNを結合しているタンパク質の中で、最も小さい分子であることから、タンパク質がFMNを結合するための最小単位は何なのか、というタンパク質工学的研究を行っている。具体的には、FMNを結合しているタンパク質であるフラボドキシンのうち、いくつかは、Thr-Trp-Asnという配列が存在しており(図4.25)、また、結晶構造が提出されているフラボドキシンでは、この配列中のトリプトファン残基が、FMNのリピチル基付近と相互作用しているように思われる(図

4-26)。このFMN結合タンパク質でもその配列が存在しているので、この位置に部位特異的変異をかけ、FMNとの結合の変化を解析するとともに、その酸化還元電位の変化を調べるという実験を行っている。さらに、FMNのイソアロキサジン環と相互作用をする残基（おそらくは、101番のチロシン残基だと思われる）が特定できれば、その残基も同様な変異をかけ、その効果を調べる予定である。

そもそも、このタンパク質には、システイン残基が存在していない。このことは、タンパク質分子としては、弱くなりがちである。しかし、それだけに、非常に単純なタンパク質であるといえる。つまり、酸化還元というタンパク質としての役割はその配位子に任せ、ペプチド部分はその枠組みをし、配位子を安定化しているだけに見える。それだけ、このタンパク質が、原始的なタンパク質であるといえるかもしれない。タンパク質工学的な考え方をすれば、適当な位置にジスルフィド結合を導入することにより、このタンパク質をさらに安定化することができるかもしれない。

また、このタンパク質は、補欠分子族をもち大量発現させることができる。この補欠分子族は、ヒトの目で見てわかる“黄色”という色がついている。この特徴をいかして、例えば、この遺伝子中にポリリンカーをつけ、何らかの遺伝子の挿入があれば、菌体の色を見ればわかるといった現在遺伝子工学で汎用されている青白選択法に似たものができないかと考えている。また融合タンパク質のホストとしても、その可視吸光という単純な測定で精製できうる有効な発現系であると考えている。

4-6 追記

このFMN結合タンパク質を発見するにあたり、真にクローニングしなかったのは、フェレドキシン遺伝子である。これについて、少し触れておきたい。

まず、フェレドキシン I 遺伝子は、図4-2に示したプローブでは、クローニングできなかった。そこで、さらに、47番のシステインから53番のアラニンまでに対応するようにF-I-1プローブを、55番のアラニンから61番のアスパラギンおよび終止コドンに対応するようにF-I-2プローブを合成した。それらの配列を、図4-2に示す。これらも、それまでにわかっていた、この菌体の使用するコドンのうち最も多く用いられたコドンを用いた。しかし結果的には、これらのプローブでは、良好なハイブリダイゼーションの条件を見つけることはできなかった。そこで、さらに、F-I-1と同じ部分に対応し、F-I-1とは相補的な配

列のプロープ (F-I-1R) を合成した。この配列も、図4-2に示す。しかし、これ自身をプロープとして用いても、良好なハイブリダイゼーションの条件を見つけることはできなかった。そこで、PCR (Polymerase chain reaction) 法のプライマーとして、FerI と F-I-1R を用いることにした。プライマーとのアニーリング温度は37℃、反応は65℃で、25サイクル行った。これにより、フェレドキシン遺伝子の内部の情報がわかったのもその配列を元にさらに、プロープを合成し、NewFer-I と名付けた。その配列も図4-2に示す。これを用いて、フェレドキシン I 遺伝子を決定した。その塩基配列を図4-27に示す。この結果は、本論文を構成する主要なテーマではないので、詳細な検討は省略するが、Fer-I プロープは、全長32merのうち6箇所一致していなかったことがわかった (表4-7)。アミノ末端に近い部分は、全体的に見ると、マイナーなコドンを使用していることが多いようで、この機構が、この遺伝子の発現を調節しているのだろう。なお、既発表のアミノ酸配列と、1箇所一致しない点が存在していた。なお、フェレドキシン遺伝子のクローニングは、硫酸還元菌由来では、2番目の例である¹³²⁾。

表4-7 フェレドキシン I 遺伝子と合成プロープのミスマッチ

Fer-I は、pFZ1-7 中で、ミスマッチは5カ所であった。

プロープ名	鎖長 (mer)	ミスマッチ数
Fer-I	32	6
F-I-1	23 (3カ所、2種のミクスチュア)	1 (1/8)
F-I-2	20 (4カ所、2種のミクスチュア)	0 (1/16)
F-I-1R	23	3
NewFer-I	33	0

結果的に FMN 結合タンパク質遺伝子をクローニングしたが、フェレドキシン II 遺伝子については、まだクローニングがなされていないので、残念ながら、今のところまったく情報が無い。今後、この遺伝子もクローニングする予定である。

1

1. MPKALIVYGS TTGNT EYTAE TIARELADAG YEVD SRDAAS
2. MSKSLIVYGS TTGNT ETAAE YVAEAFENKE IDVELKNVTD
3. MSKVLIVPGS STGNTESIAQ KLEELIAAGG HEVTLLNAAD
4. MPKALIVYGS TTGNT EGVAE AIAKTLNSEG METTVVNVAD
5. MGKALVVFGS TTGNT ETVAE VVAKVLEESG MAVDLKNATK

41

1. VEAGGLFEGF DLVLLGCSTW GDDSI ELQDD FIPLFDSLEE
2. VSVADLGNGY DIVLFGCSTW GEEEI ELQDD FIPLYDSLEN
3. ASAENLADGY DAVLFGCSAW GMEDLEMQDD FLSLFEEFNR
4. VTAPGLAEGY DVVLLGCSTW GDDEI ELQED FVPLYEDLDR
5. VKAAGLAEGY DLVVFGCSTW GDDEI ELQED FIPLYDDLGA

81

1. TGAQGRKVAC FGC GDSSEY FCGAVDAIEE KLKNLGAEIV
2. ADLKGKXVSF FGC GDS DTY FCGAVDAIEE KLEKMGAVVI
3. IGLAGRKVAA FASGDQEYEH FCGAVPAIEE RAKELGATII
4. AGLKDKKVG V FGC GDS SYTY FCGAVDVIEK KAEELGATLV
5. AGLGGRKVAV FGC GDS SYTH FCGAVDAIAE KAASLGAKVI

121

1. QDGLRIDGDP RAARDDIVGW AHDVRGAI
2. GDSLKIDGDP --ERDEIVGW GSGIADKI
3. AEGLKMEGDA SNDPEAVASF AEDVLKNL
4. ASSLKIDGEP --DSAEVLDW AREVLARV
5. DLPLKIDGAP --DTAEARDW AKEVLRSA

1. *D. vulgaris* Hildenborough
2. *D. salexigens*
3. *D. desulfuricans* [Essex 6]
4. *D. gigas* (ATCC19364)
5. *D. gigas* (ATCC29494)

図4-1 硫酸還元菌由来のフラボドキシンの1次構造比較
 アウトラインは、5つの株で完全に一致していることを表わす。

Fer-I (32mer)

5'-TGGACCGTGACCGTGGACACCGACAAGTGCAC-3'

2W T V T V D T D K C T

Fer-II (21mer)

5'-TGCCCCGAAGCCTTCCGGATG-3'

21C P E A F R M

F-pro Mut1 (23mer) Eco RI site導入、pBT-100

Eco RI

5'-GCACGGAGGAATTCAAAAATGCTG-3'

M L

F-I-1 (23mer)

5'-GCCATCACCGTGAAGAAAATA-3'

C G G

55A I T V E E N *

F-I-2 (20mer)

5'-TGCGTGGAAGTGTGCGAAGC-3'

C G C G

47C V E V C E A

F-I-1R (23mer) F-I-1の (-) 鎖である

5'-TAGTITTTCTTCCACGGTATGGC-3'

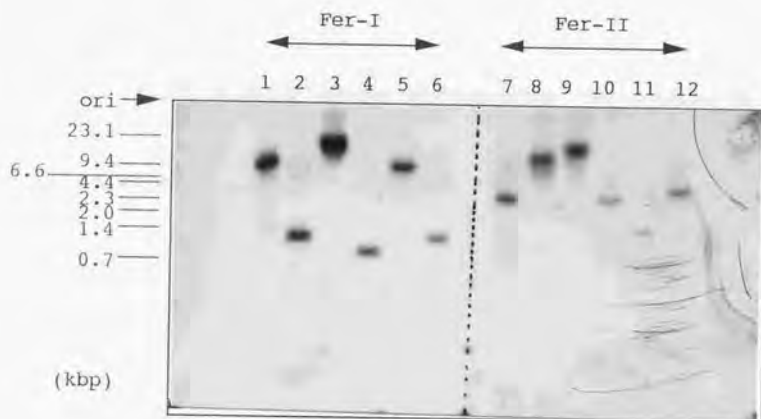
* N E E V T I A⁵⁵

NewFer-I (33mer)

5'-GACGGCGAATGCGTGGACGTGTGCCCCGTGAA-3'

14D G E C V D V C P V E

図4-2 本章の研究で使用した合成DNAの塩基配列



lane	1.	DNA / Sma I
	2.	DNA / Eco RI
	3.	DNA / Kpn I
	4.	DNA / Sma I + Eco RI
	5.	DNA / Sma I + Kpn I
	6.	DNA / Eco RI + Kpn I
	7.	DNA / Sma I
	8.	DNA / Eco RI
	9.	DNA / Kpn I
	10.	DNA / Sma I + Eco RI
	11.	DNA / Sma I + Kpn I
	12.	DNA / Eco RI + Kpn I

図4-3 Fer-IおよびFer-IIプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果

```

      10      20      30      40      50      60
CGAACGCAGGAGTCCCTGGGGGGTGGGAGGATGCGGGAAACGGGGCGAATAGGGGAGCGG

      70      80      90      100     110     120
GGGACGGTGCGCGCTATTCTCGCCAGCAGGTTGGCCTACGTCGTCGGGGTCCACGGGC
      3'-CACGTGACAGCCACAGGTCACAG
      130     140     150     160     170     180
ACGGCCAGCATCAGCAGCAGGCCGTCGGGTCGCGCCGCACGTGCAGCAGGCAGCTCAGG
TCCCAAGT-5'

      190     200     210     220     230     240
TCGCGGGCCAGCTTGTAGCTGACGGCCAGCGGCTGCGGTCCCTGCTGGTCGCCGAAGGCA

      250     260     270     280     290     300
TCAGCGAAAGTTCCTGTCTGTGGCCAGGGCGATTCTGTGCGCAGCAGCACCTCCACCAAC

      310     320
TGGCCACGGCCCCGCTCCCGGCAGCGC

```

図4-4 Fer-1とハイブリダイズしたEco RI-Sma Iフラグメントの塩基配列の一部

アウトラインをつけた領域でハイブリダイズしたと考えられる。

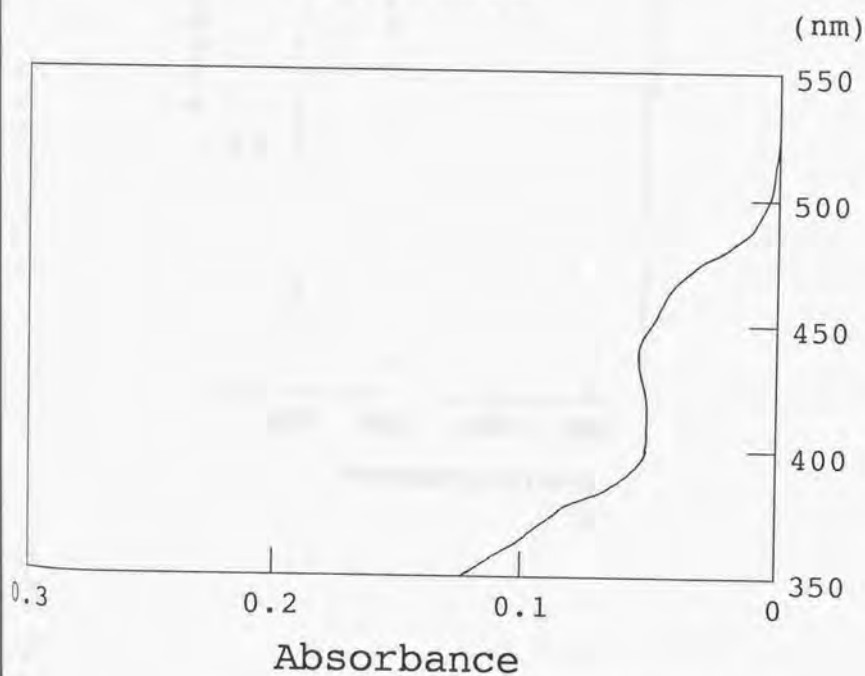
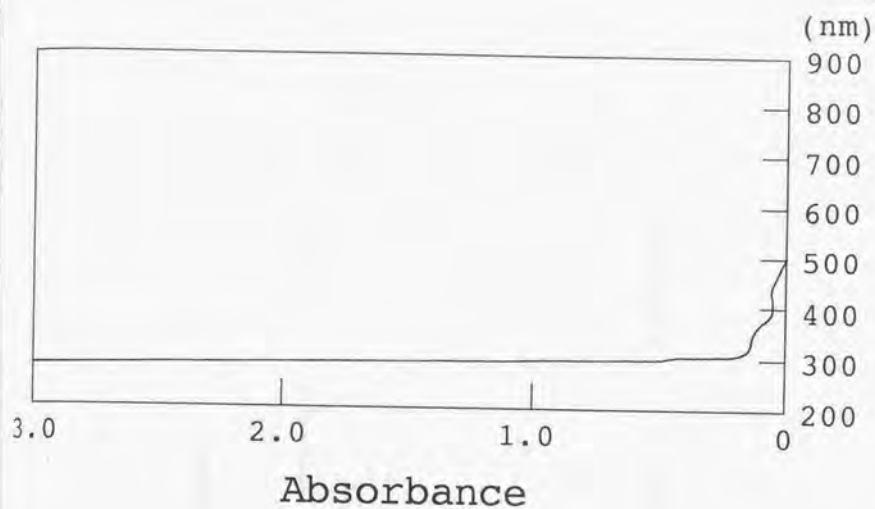


図4-5 粗抽出物の可視紫外吸収スペクトル

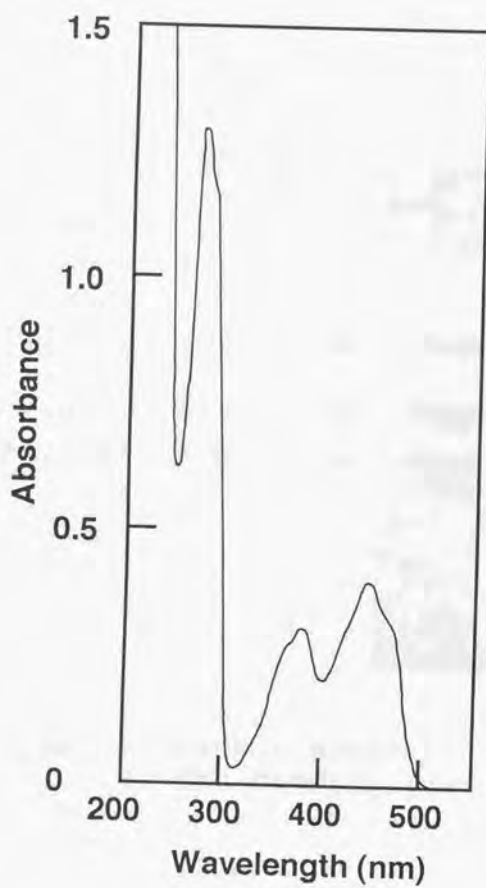
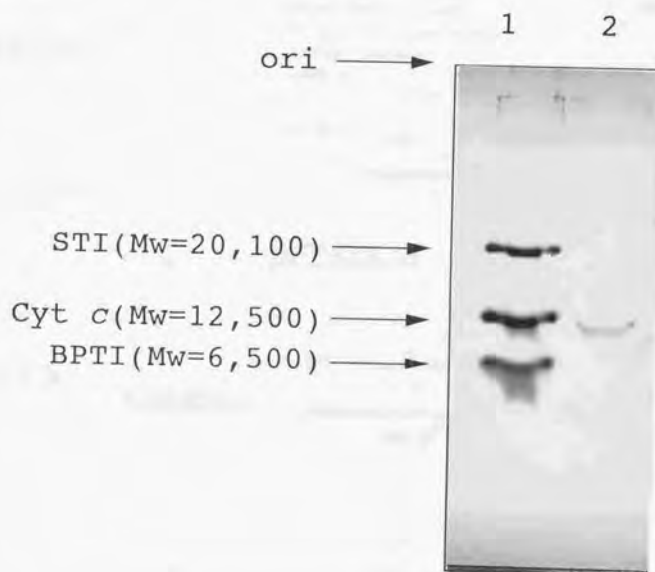


図4-6 精製したFMN結合タンパク質の可視紫外吸収スペクトル



lane 1. marker protein
2. FMN-binding protein

図4-7 SDS-PAGEによる精製確認と分子量の測定

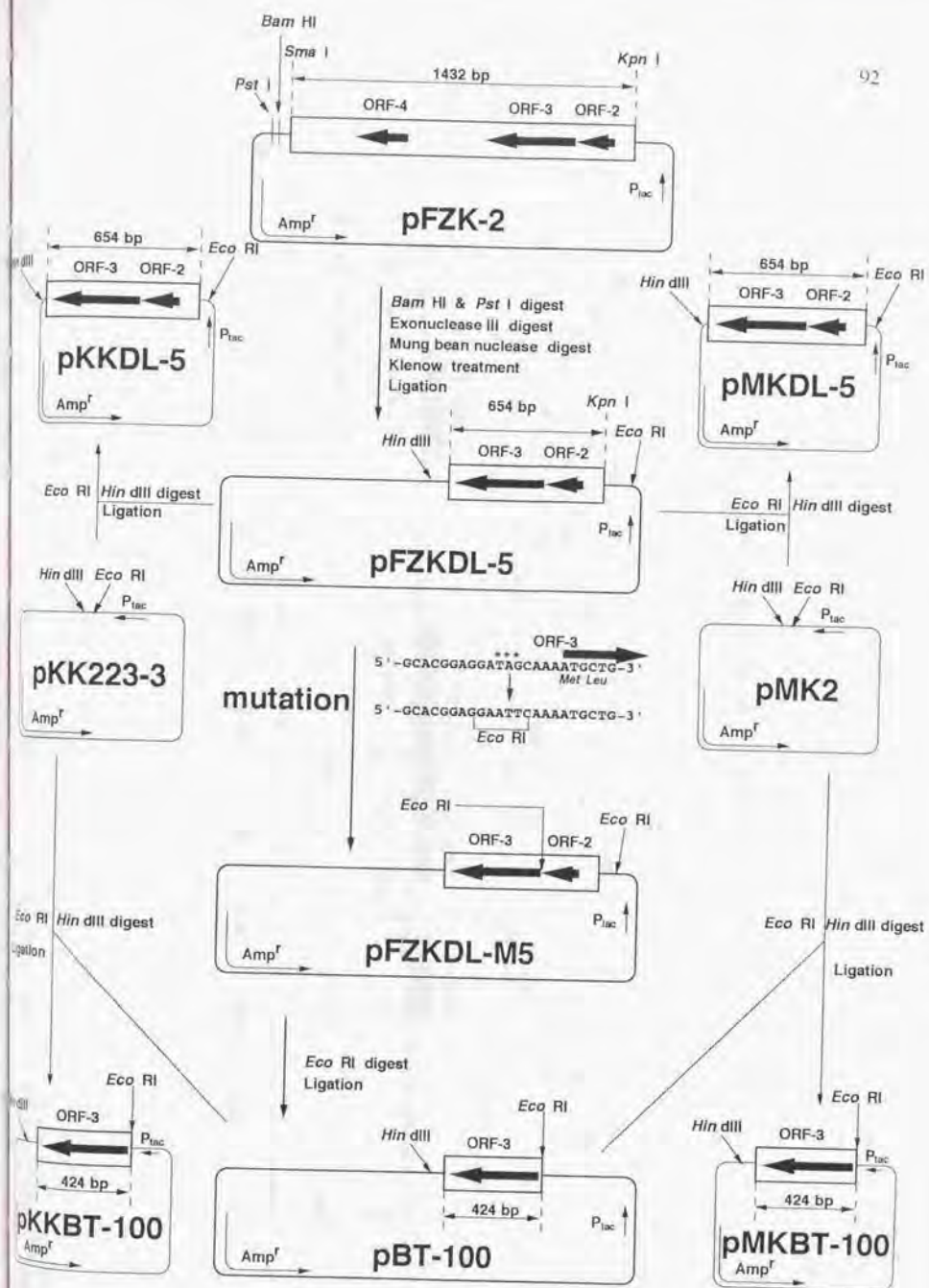


図4-8 FMN結合タンパク質の発現ベクターのコンストラクション

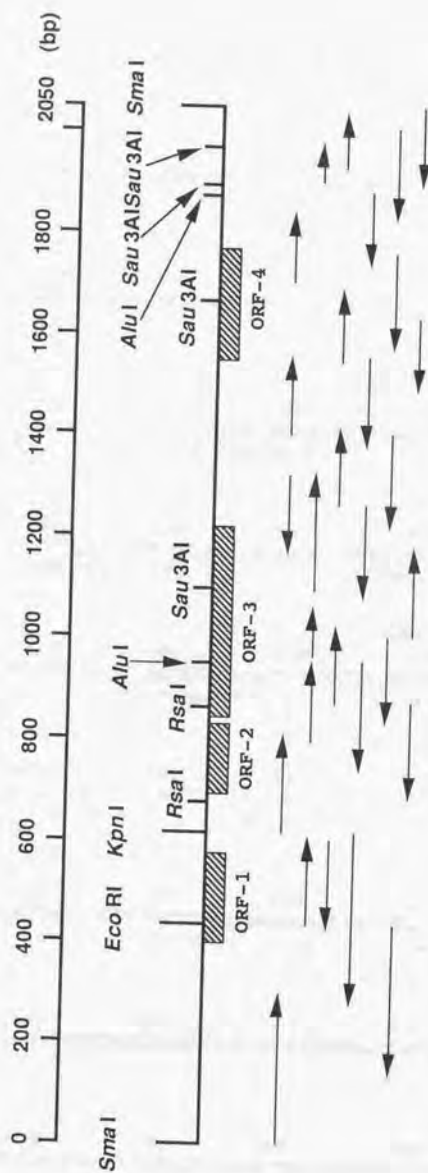


図4-9 2053bp Sma I-Sma I断片の塩基配列決定の概略

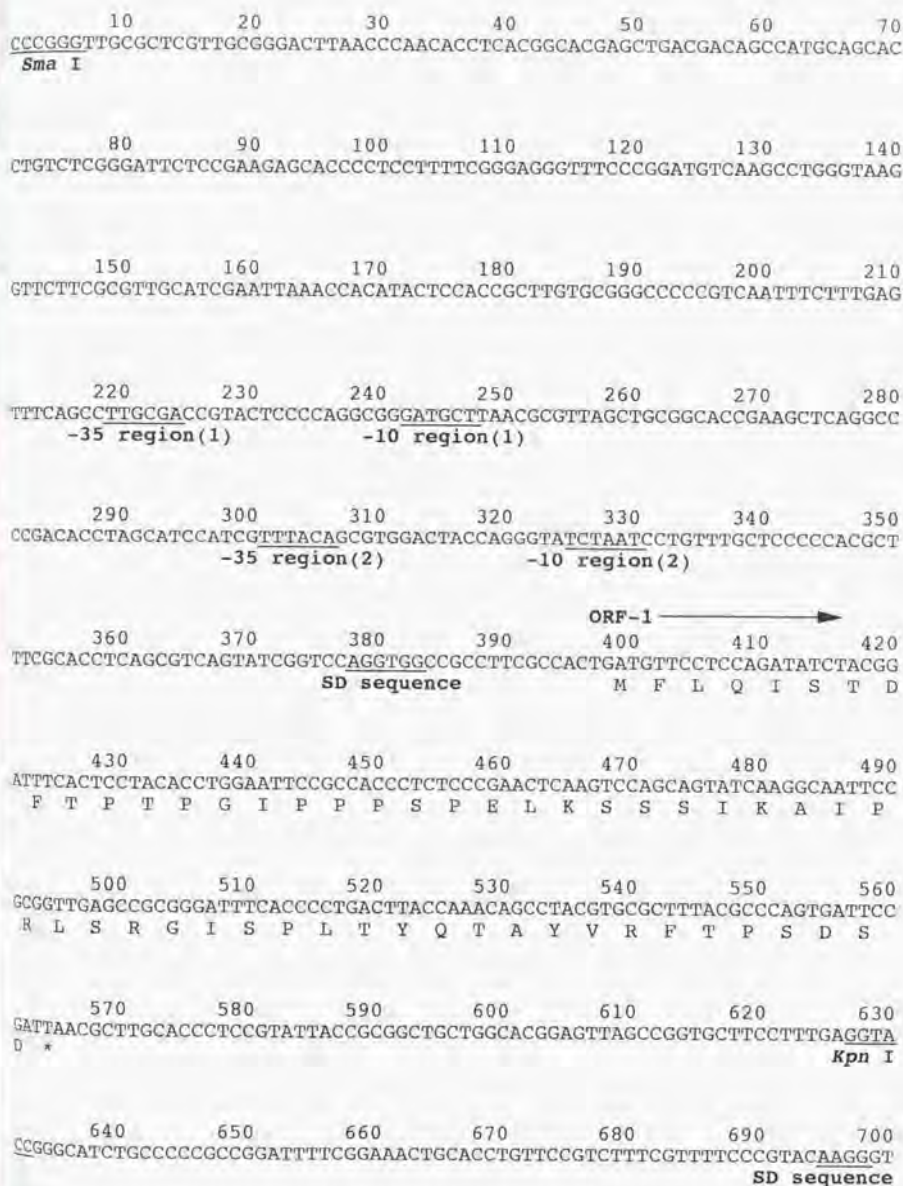


図4-10-1 2053bpのSma I-Sma I断片の塩基配列

ORF-2 →

710 720 730 740 750 760 770
 AGGCATGACAGTCGGATTGGCGGCGAACC CGCAGGCAAAATCCGCCTGACAGGCACGCCCCGATACGCCCGT
 M T V G L A A N P Q A N P P D R H A R Y A R

780 790 800 810 820 830 840
 CTGGCAGACCCGGCTGGCCCCGCCAGCCGGAGTCTTCCGCCGACTGGCCGGGCGCGCCGCGTGACGCA
 L A D P A G P A S R S L P P D W P G R A A *

ORF-3 →

850 860 870 880 890 900 910
 CACACCGCACGGAGGATAGCAAAATGCTGCCGGGTACATTTTCGAAGTGCTGAAGAACGAAGGGGTCTGT
 SD sequence M L P G T F F E V L K N E G V V

920 930 940 950 960 970 980
 GGCCATCGCCACCCAGGGCGAGGACCGCATCTCGTCAACACCTGGAACAGCTACCTGAAGGTGCTG
 A I A T Q G E D G P H L V N T W N S Y L K V L

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 GACGGCAACCGCATCTGGTGGCCGTGGGGGGCATGCACAAGACCGAGGCCAACGTTGCCCGCGACGAAC
 D G N R I V V P V G G M H K T E A N V A R D E R

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GGGTGCTGATGACTCTGGGCACTCGCAAGGTGGCGGGTCGCAACGGGCGGGCACGGGCTTCCTGATCCG
 V L M T L G S R K V A G R N G P G T G F L I R

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 GGGCTCTGCGGCGTTCCGCAACCGATGGGCGGAGTTCGAGGCCTACGCCCCTTCAAGTGGGCCCCGCGCG
 G S A A F R T D G P E F E A Y A R F K W A R A

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCCCTGGTGATCACCCTGGTGTGCGGCGGAGCAGACCCGTGTAGGCGGGCGCGCTCTGCCTGAAGGGCCGAC
 A L V I T V V S A E Q T L *

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TGGACTGATTGGGACCTGCACGAGGCGCTGTGCCCGGTCGGGCGGCGAGCCCGACAGATGATTATTCGG

1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 GTGGGGCCGGGCGTGATCGCCCGGCCCGTGCCTTTCATCGGGCGCGGGGAAAGCAGGCGCGGTGACG

図4-10-2 2053bpのSma I-Sma I断片の塩基配列

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 TTGCGCCACGCCCTGTTCCAGTTCGTGCGGGGCGATGCCGCCGAAGCCGAGCAGCAGAGGGGGCCGTCA

1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TTGGAAGTGTTCCTGATCCGTGGGGAGCGCTGGCAGGAGGACTGGCAGGTGGGCGCCCGGAAGGCTT

1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 CGGGGTTGTCCGTCAGCCGGGTTTCGGAGAGGGCAGCAGGCGGATGCCCGCGCGCCCGCAGGGCCAG
 SD sequence M P A R R R R A S

1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 TTCCCGCTCGTCGCATCCGTGCCGTGCAGTCGGACCACACGTGCAGCCCCGCCCTGTCCGATCACGG
 S R S S H P C R A V G P P R A A P P P V R S R

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 TGGCCCGCCCGCCGAAGTGGGTGTCGATGGCGCGCCAGATGGCGTTCGTGGCGCTGCCGGTATACCGTGGC
 W P A R R S G C R W R A R W R R G A A G I P C A

1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATGCGCGCACGTGGCGGTCCAGTGCCCGCGCGCCATGAACCGGGCCAGCACCCGCTGCTCCAGCAGG
 C A A R G G P S A R A P *

1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 GGGACCATGGCGTGGTGGTGGCGGTGGCGTTGCCGGTAGACCTGAAGCAGCGCGGCGGCAGCACCATGTA

1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 GCTCATGCGCAGGGCCGGGAGAGGATCTTGAAAAAGGTGCCGTGTAGACCACGGCCCCGTCCAGTCCGT

1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030
 CAGGACTGTCTTGTCCGTTTGGCTTGCTGATCCGGCTGGCCCGGCTGGCCCGGCTGGGTGTTCAGGTCC

2040 2050
 GGCTGCCTGCCCCGCTCCCGG
 Sma I

図4-10-3 2053bpのSma I-Sma I断片の塩基配列

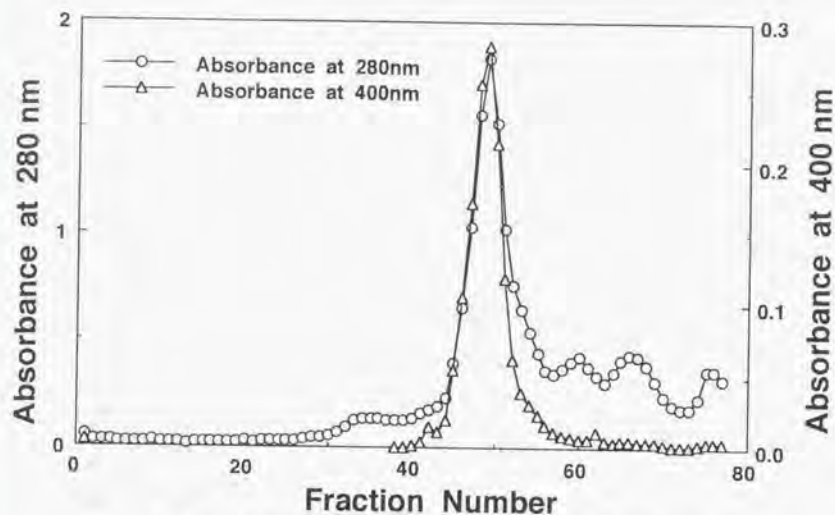


図4-11 DE-52によるFMN結合タンパク質の精製パターン

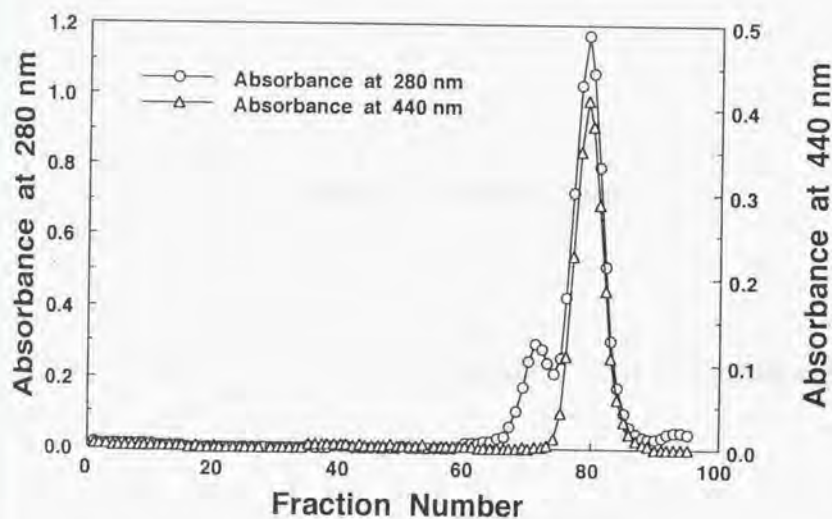


図4-12 セファクリルS-200によるFMN結合タンパク質の精製パターン

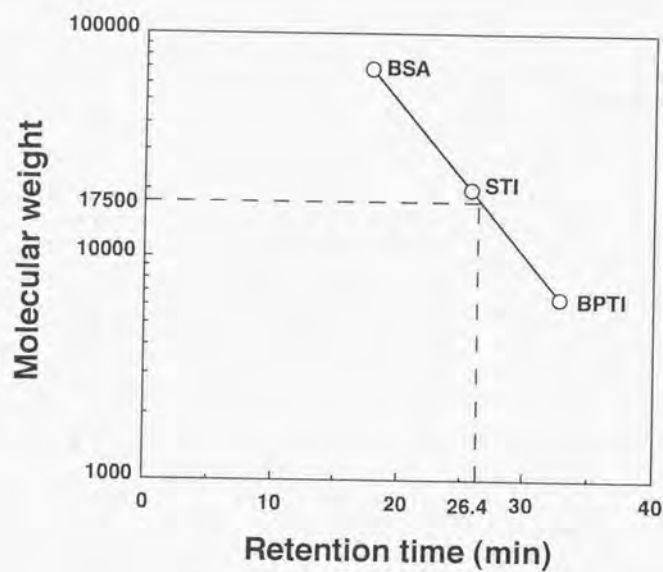


図4-13 セファデックスG-75によるFMN結合タンパク質の分子量測定の結果

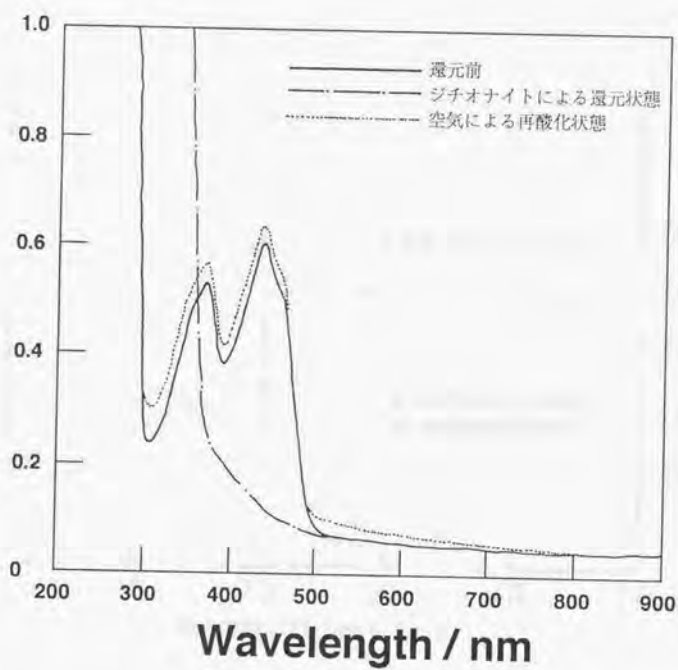


図4-14 ジチオナイトによるFMN結合タンパク質の還元、空気による再酸化に伴う可視紫外吸収スペクトル変化

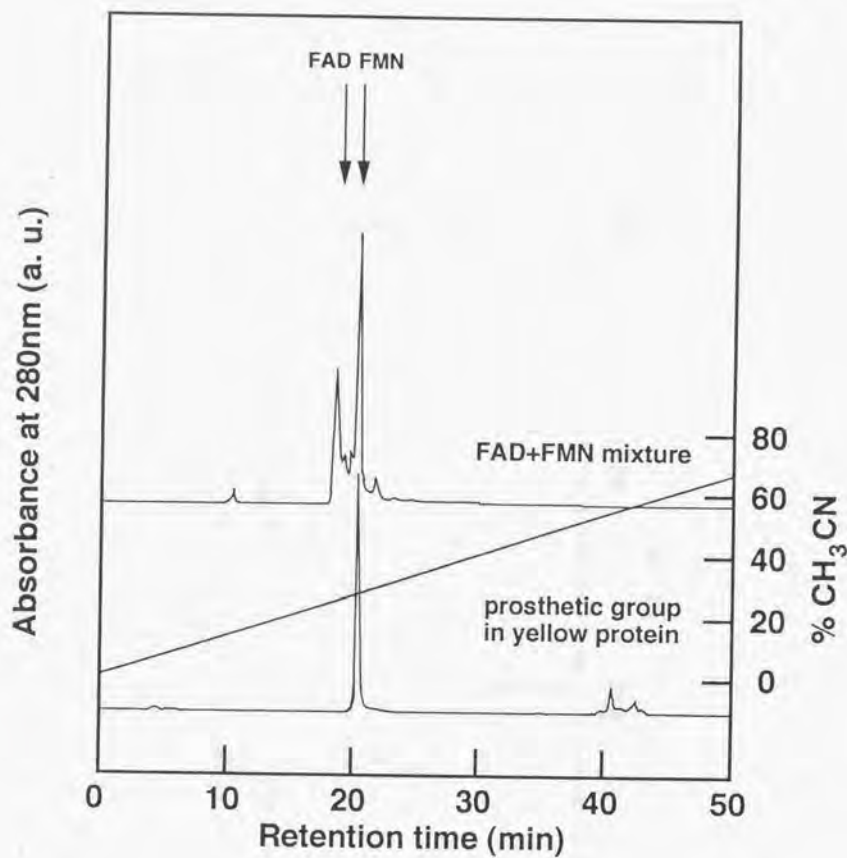


図4-15 HPLCによる補欠分子族の同定

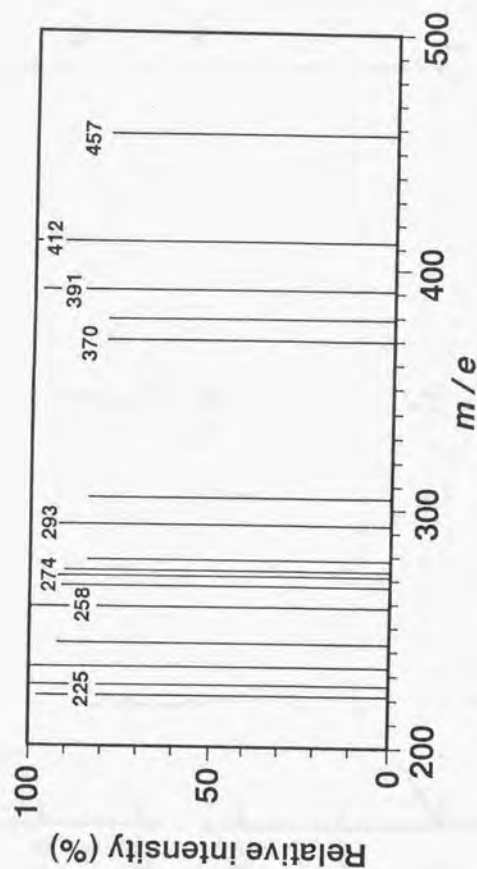


図4-16 LC/MSによる補欠分子族の同定

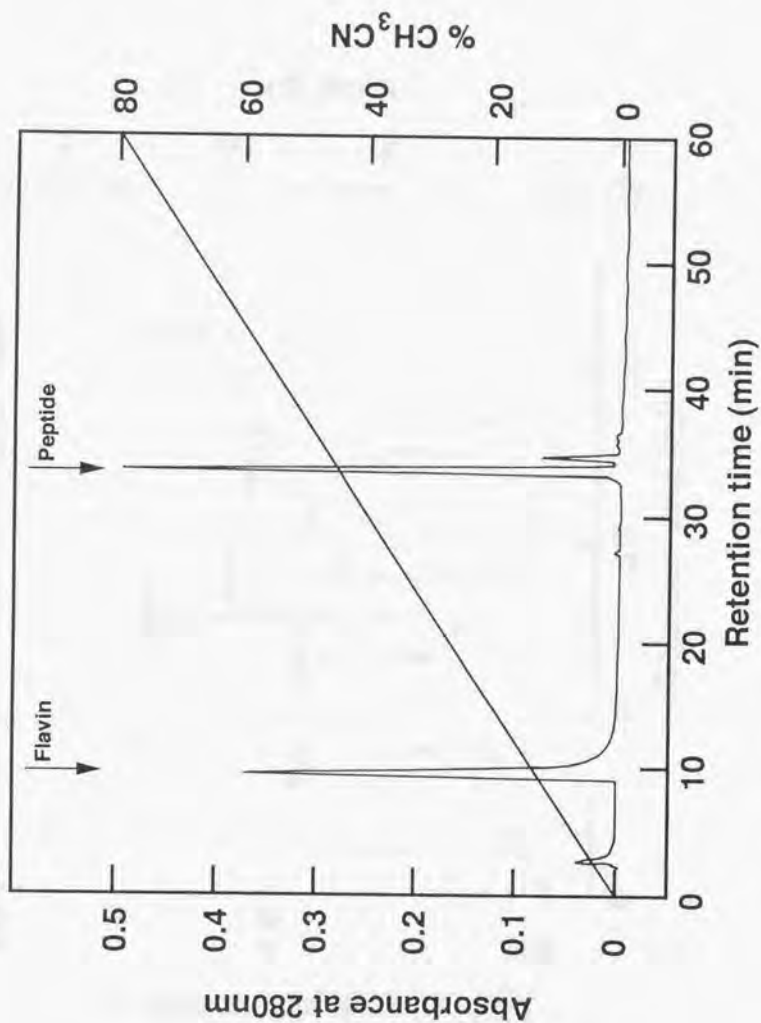


図4-17 逆相系HPLCによるFMN結合タンパク質の精製

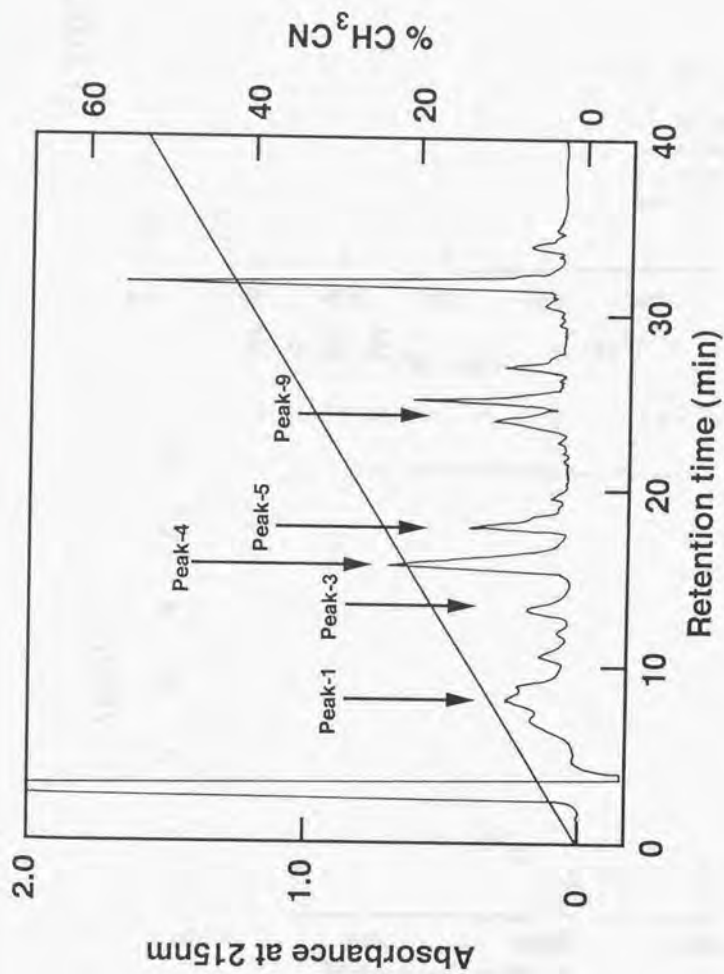


図4.18 トリプシン消化したFMN結合タンパク質のペプチド部分の逆相系HPLCによる精製パターン

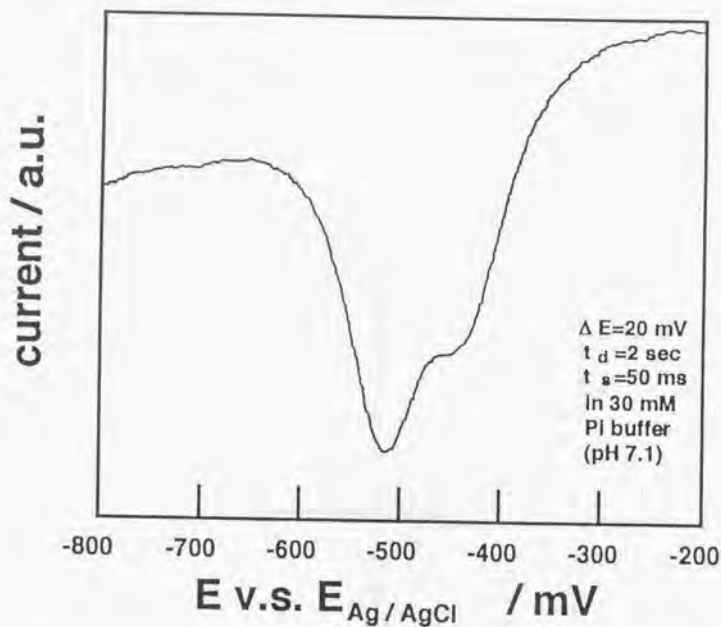


図4-19 FMN結合タンパク質のディファレンシャルパルス電位測定

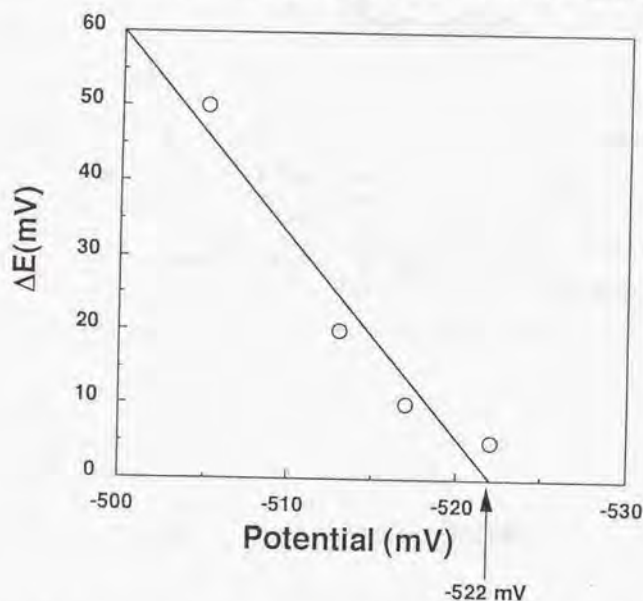
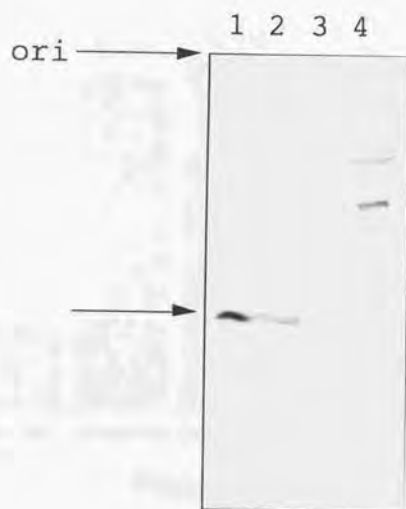


図4-20 ディファレンシャルパルス電位測定により求めたFMN結合タンパク質の酸化還元電位

標準水素電極を参照電極とした場合、 -325 mV と計算される。



- lane 1. purified FMN-binding protein from *E. coli*
2. full protein from *D. vulgaris* (Miyazaki F)
under ordinary condition growth
3. full protein from *D. vulgaris* (Miyazaki F)
under poor iron condition growth
4. full protein from *D. vulgaris* (Hildenborough)

図4-21 イムノプロットティングの結果

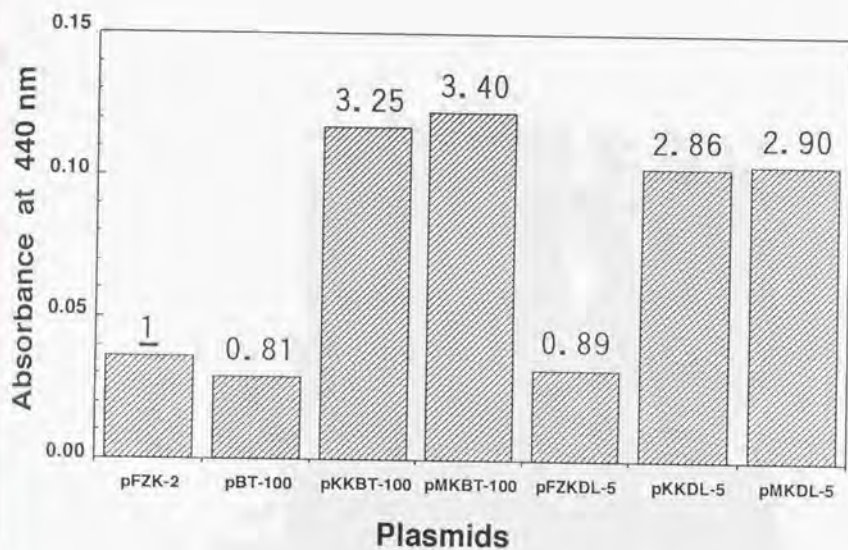
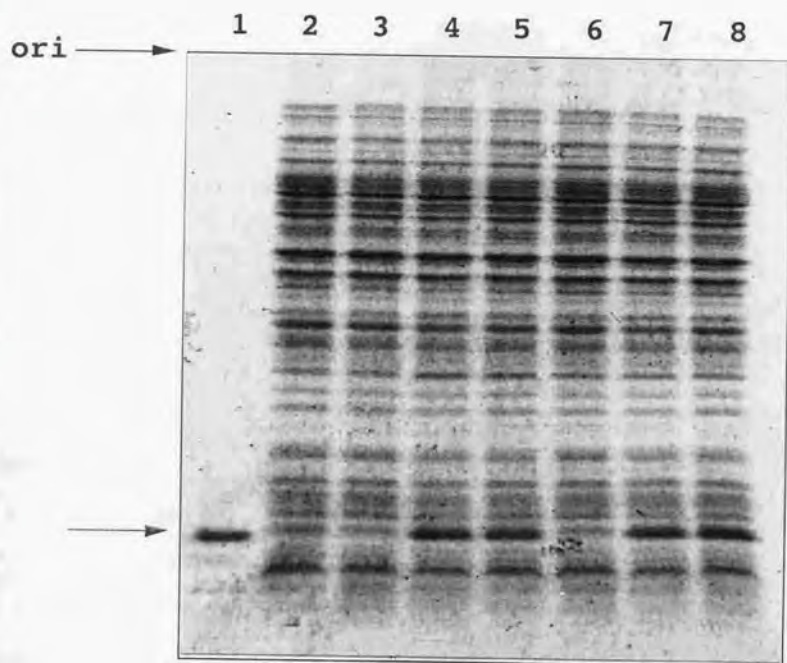


図4-22 各プラスミッドにより形質転換されたFMN結合タンパク質の発現量の比較



lane 1. purified FMN-binding protein
 2. pFZK-2 / JM109
 3. pBT-100 / JM109
 4. pKKBT-100 / JM109
 5. pMKBT-100 / JM109
 6. pFZKDL-5 / JM109
 7. pKKDL-5 / JM109
 8. pMKDL-5 / JM109

図4-23 SDS-15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による
 各形質転換体のFMN結合タンパク質の発現量の比較

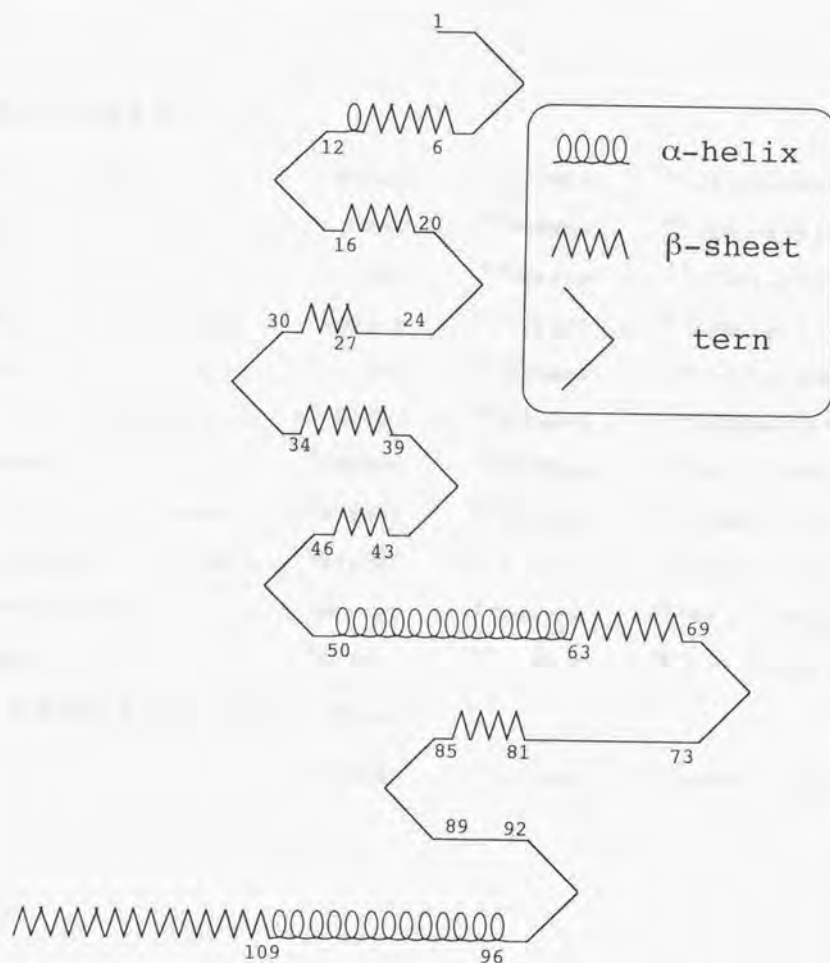


図4-24 Chou-Fasman法によって予測されたFMN結合タンパク質の2次構造のダイアグラム

Flavodoxin 104)

<i>Chondrus crispus</i>	⁸ TSTGNT..... ⁵⁴ PTWNTG..... ⁹² LGDAEGYPDNFC
<i>Anacystis nidulans</i>	⁹ TQTGVT..... ⁵⁵ PTWNVG..... ⁸⁸ AGDQVGYSDFNQ
<i>Anabaena</i> PCC 7120	¹⁰ TQTGKT..... ⁵⁵ PTWNIG..... ⁸⁸ TGDQIGYADNFQ
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	⁹ TQTGVT..... ⁵⁵ PTWNVG..... ⁸⁸ AGDQVGYSDFNQ
<i>Azotobacter vinelandii</i>	⁹ SNTGKT..... ⁵⁵ PTLGEG..... ⁹⁶ LGDQVGYPENYL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	¹⁰ TDTGKT..... ⁵⁵ PTLGDG..... ⁹⁶ LGDQRGYPDNFV
<i>Escherichia coli</i>	⁹ SDTGNT..... ⁵⁴ PTWYYG..... ⁸⁷ CGDQEDYAEYEC
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	¹⁰ STTGNT..... ⁵⁸ STWGDD..... ⁹³ CGDSS-Y-EYFC
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	¹⁰ STTGNT..... ⁵⁸ STWGEE..... ⁹³ CGDSD-Y-TYFC
<i>Clostridium</i> MP	⁷ SGTGNT..... ⁵⁴ SAMGDE..... ⁸⁷ SYG---WGDGKW
<i>Megasphaera elsdenii</i>	⁸ SGTGNT..... ⁵⁵ PAMGSE..... ⁸⁶ SYG---WGSGEW

FMN-binding protein

²⁰TQGEDG.....³⁰NTWNSY.....⁹⁷EFEA---Y-ARFK

図4-25 FMNを結合するタンパク質の1次構造比較

10 20 30 40 50 60
GAATTC~~CCGCGTCTCGCAACGATGAGAATTTGCGTCAAAGCTTGACACCCCGGTGCCCCG~~
-35 region

70 80 90 100 110 120
CAGCTATCTGCAATTTTCGATGGTAAGCCGTCAAACCTGTGGTGACGCGGTTTTTTCGCA
-10 region

130 140 150 160 170 180
ATCACGACAGGGAATTGTTCCCAAAAGCCGACTACGTCGGCTGAAAAACACGCCTG

190 200 210 220 230 240
GAGGATGACATGGGTGGACTGTTACTGTTGACACCGATAAGTGTACCGGCGACGGCGAA
SD M G W T V T V D T D K C T G D G E

250 260 270 280 290 300
TGC GTGGAC GTG CCCC GTG CAA GTT TAC GAG CTG CAG GAC GGC AAG GCT GTT CCG GTG
C V D V C P V E V Y E L Q D G K A V P V

310 320 330 340 350 360
AACGAAGAAGAAATGCCTGGGCTGTGAATCCTGCGTGGAAGTCTGCGAAGCGGCGCGATC
N E E E C L G C E S C V E V C E A G A I

370 380
ACCGTCGAAGAGAACTAG
T V E E N *

図4-27 フェレドキシン I 遺伝子の塩基配列

実 験 条 件

5-1 硫酸還元菌からのゲノムDNAの抽出

硫酸還元菌 *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株から、ゲノムDNAを抽出した方法について述べる。基本的には、斎藤、三浦の方法を用いた³⁹⁾。ゲノムDNAの抽出には、長いゲノムDNAを傷つけずに抽出する一方で、大量に得るという相反する目的がある。この方法は、リゾチームとSDSを用い凍結融解して溶菌させ、タンパク質はフェノールにより変性させ、RNAはRNA分解酵素により切断、除去するという方法で、長いゲノムDNAを比較的多量に抽出できる点で、私の目的に合致していた。

-80℃中で凍結していた *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株3.17gを適当量の0.15M NaCl / 0.1M EDTAで懸濁し、最終的に、16mg Lysozymeを含む8mlの溶液とした。この溶液を、37℃ 20分程度加温した。大腸菌の場合、この操作により十分に溶菌するが、硫酸還元菌では、菌体内外に存在する金属硫化物コロイドのためか、膜構造が硬いのか、完全には溶菌しなかった。そこで、さらに適当量のLysozymeを加え弱く振盪しながら、さらに20分反応させた。まだ、溶菌していない菌体が確認できたが、これを、ドライアイス / エタノールで凍結させた。これに1% SDS / 0.1M Tris-HCl (pH9.0) / 0.1M NaClを16ml加え懸濁後、65℃で数分加温した。溶菌が不十分だったので、再び凍結させ湯浴した。これを、4回繰り返したのち、溶菌している溶液を分注し、等量の上記溶液で飽和したPhenolを加えた。これを、4℃で10分振盪した後、6,000rpm 4℃ 10分遠心し、3層に分離した。上層の水層をピペットで取った。このとき、中間層の変性タンパク質層を取らないよう注意した。この操作を、変性タンパク質が出なくなるまで行った。私は、この操作も4回行った。SDSは、層の分離を悪くすることに加え、4℃で結晶してしまうので、PhenolはSDSを除いた溶液で飽和させれば良いかもしれない。少し含まれているPhenolや変性タンパク質を除くため、水層を12,000rpm 4℃ 10分遠心した。このDNAが含まれている水溶液に滅菌したガラス棒を入れ、静かにそして徐々に-20℃に冷やしたEthanolを体積比で2倍量加えていき、ガラス棒に巻きとっていった。これを、室温で減圧にすることなく風乾した。十分に乾いたら、10mlの0.1×SSCに浸し、4℃に一晩放置することにより、徐々に溶解させた。この溶液に1mlの10×SSCを加えた後、10mg/mlのribonuclease Aを10μlと0.5units/μlのribonuclease T₁を20μlを加え、37℃で40分処理した。等量の1×SSCで飽和したPhenolを加えて懸濁後、6,000rpm 室温 10分遠心して、水層を分注した。この溶液を、前と同様に

冷Ethanolを徐々に加えてガラス棒に巻き取り、5mlのTE緩衝液に溶解した。50倍希釈した溶液の350nmから200nmの吸収スペクトルを測定し、260nmの吸光度から元の溶液の濃度を求めた。結果的に、5.5mgのゲノムDNAを抽出することができた。

5-2 制限酵素によるDNAの切断

制限酵素の反応条件は、T. Maniatisらの緩衝液¹³³⁾を基本的には用い、宝酒造株式会社¹³⁴⁾および東洋紡株式会社¹³⁵⁾、株式会社ニッポンジーン¹³⁶⁾の条件を参考にした。その緩衝液組成を表5-1に示す。実際は、この10倍の濃度の10×Digestion用緩衝液を用意し、反応系の1/10量を加えて用いた(書き忘れていた酵素は、文献の条件に従った)。

(L)を用いた酵素

Acc I, Alu I, Apa I, Kpn I, Nsp V, Sac I

(M)を用いた酵素

Cla I, Eco RI, Hin dIII, Rsa I, Sna BI, Xba I

(H)を用いた酵素

Bam HI, Bgl II, Mbo I(Sau 3AI), Nco I, Nsi I(Eco T22 I), Pst I,

Sca I, Spe I, Sph I, Stu I, Taq I(Tth HB8 I), Xho I

(S)を用いた酵素

(K)を用いた酵素

(A)を用いた酵素

Sal I

Sma I

Aat II

表5-1 制限酵素の反応条件

	NaCl	KCl	Tris-HCl(pH7.5)	MgCl ₂	Dithiothreitol
Low (L)	0 mM	0 mM	10 mM	10 mM	1 mM
Medium (M)	50 mM	0 mM	10 mM	10 mM	1 mM
High (H)	100 mM	0 mM	50 mM	10 mM	1 mM
Sal I用(S)	150 mM	0 mM	50 mM	10 mM	1 mM
Sma I用(K)	0 mM	20 mM	10 mM	10 mM	1 mM
Aat II用(A)	0 mM	60 mM	10 mM	10 mM	1 mM

5-3 サザンハイブリダイゼーション・コロニーハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションは、DNAとDNAを雑種形成させ、何らかの方法で検出する方法である。その点で、コロニーハイブリダイゼーションは、サザンハイブリダイゼーションの一種と考えられる。

まず、ゲノムDNA中の目的遺伝子の検出のために行った方法について述べる。まず、ゲノムDNA 5 μ gを適当な制限酵素により、全量を10または15 μ lで消化した。この操作は、完全消化しなければ正しい結果が得られないので、酵素量を通常の λ -DNAで示されるユニット数の2から3倍量の酵素を使用した。また、酵素反応を十分に行うため、一晩行うことを原則とした。反応溶液の1/5量の6 \times Dye Solutionと混ぜて反応を停止させ、0.8% アガロースゲルにより分離した。マーカーには λ -DNAをHind IIIで消化したものを用いた。このゲルを一旦Ethidium Bromide溶液に浸して染色し、紫外光を照射することにより発色させながら、写真にとった。このゲルを0.9M NaCl / 0.5M NaOH溶液に浸し、緩やかに15分振盪した。これを2度行った後、この溶液を捨て、次に、0.9M NaCl / 0.1M Tris-HCl (pH9.5)に浸し30分振盪した。その後、このゲルからナイロン膜に移した。これは、図5-1のようなピラミッドを作ることにより、膜に吸着させる¹³⁷⁾が、この時ゲルの天地を逆にし、ゲルと下の濾紙との間に空気が入らないように注意した。移動用緩衝液は、0.9M NaCl / 0.1M Tris-HCl (pH9.5)を用いた。このトランスファーは、一晩8時間以上行った。移動が完全に行われたかは、再びゲルをEthidium Bromide溶液により染色し、紫外光を照射することにより発色させて確認した。大抵の場合、 λ -DNA / Hind IIIの23.1kbpのバンドは、十分には移動しなかった。さて、ナイロン膜は、紫外光を3から5分照射し、完全に膜に結合させた。これを、熱で留めることができる袋に入れ、0.1% SDSを加えたHybridization Solution約20mlに浸し、37 $^{\circ}$ C 1時間温浴した（プレハイブリダイゼーション）。その後、一度Hybridization Solutionは捨て、再び0.1% SDSを加えたHybridization Solution約20mlを加え、プローブDNA 5から7.5 μ lを加え、適当な温度で一晩加温した。プローブDNAは、1pmole/ μ lの合成DNA 4 μ lと10 \times kination用緩衝液 3 μ l、H₂O 6 μ l、 $[\gamma$ -³²P]ATP (185TBq/mmol) 1 μ l、T4 polynucleotide kinase 1 μ lを混ぜ、37 $^{\circ}$ Cで1.5時間以上反応させて放射能標識したものを、精製せずに用いた。ハイブリ

ダイゼーションを行った温度より10℃程度低い温度で洗いをを行った。洗いには6×SSCを用い30分加温したが、これを2度行った。風乾の後、濾紙に張り付け、オートラジオグラフィにより検出した。シトクロム c_{553} の場合は、検出にバイオイメージングアナライザーを用いた。

コロニーハイブリダイゼーションの場合は、まず形質転換体をグリッドの付いたニトロセルロースフィルターで覆ったLB / Ampプレート2枚に植え換え、一晚生やした。これらは、1枚は以下の実験に、1枚は実験の結果シグナルのあったクローンを生やすために用いた。ニトロセルロースフィルターをプレートから剥がした後、10% SDSを染み込ませた濾紙上に3分置いた。続いて、0.5M NaOH / 1.5M NaClを浸した濾紙上に移し、5分放置した。さらに、1.5M NaCl / 0.5M Tris-HCl (pH8.0)を浸した濾紙上に移し、5分放置した後、2×SSPEを浸した濾紙上に移し5分放置した。風乾の後、バキュームオープン中で真空下80℃2時間放置することにより、膜にDNAを結合させた。これを、0.1% SDSを含む6×SSCの溶液20mlに浸し、65℃で30分放置した。刷毛を使って、菌体のかす(debris)を除いた後、6×SSCで2回洗った。この後は、サザンハイブリダイゼーションと同様で、プレハイブリダイゼーションから同様の操作を行った。

5.4 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換は、 Ca^{2+} 法¹³⁸⁾ が一般的であるが、この研究の初期には、Hanahanの方法¹³⁹⁾ を用いていた。しかし、手順の容易さや効率の点で、私は、Chungらの方法¹⁴⁰⁾ を用いたので、これについて述べる。

まず、宿主となる菌体をプレートから1コロニーとり、LB培地で一晚37℃で培養した。このうち1mlを100mlのLB培地に植え継ぎ2時間ほど培養した。600nmの吸光度が0.3程度に達したら、10分間氷冷した後、6,000rpm 4℃ 10分遠心して集菌した。培地を捨て、培地の1/10量のTSS溶液で懸濁した(コンピテントセルの完成)。出来上がったコンピテントセルの溶液は、200μlずつ分注した。コンピテントセルの保存は、ドライアイス / エタノール中か、液体窒素中で凍結させ-80℃で保存すれば、2ヶ月程度十分な効率を保った。このコンピテントセルの溶液に、プラスミッドの溶液を最大20μl入れた。氷中に5分静置し、適当な抗生物質を含んだプレートに蒔いた。このプレートを37℃で一晩培養した。こ

の方法では、効率は $1\mu\text{g}$ のpUC18あたり 10^6 後半から 10^7 程度であったが、時々 10^5 程度のときもあり、凍結したものは、やはり徐々に効率は下がって行った。

この方法では、使用する菌体は、プレート上に生やしてから間もないものさらに、PEGの溶液は、新しいものを使うことが肝要であった。また、氷中に置く時間は適当で良く、その後のヒートショックやキュアリングなどの操作は、必要なかった。効率を少しでもあげたい場合は、氷中40分の後、 42°C に90秒つけ、再び氷中5分の後、LB培地 $800\mu\text{l}$ を加え、 37°C で1時間静かに培養した後、 $6,000\text{rpm}$ 室温 5分遠心して集菌し、上清を軽く捨てたあと、残りの培地で懸濁してその溶液をプレーティングした。

5-5 大腸菌からのプラスミッドDNAの抽出

この操作は、遺伝子操作の中で最も多く使う操作であり、多くの変法がある¹⁴¹⁾、自動化されたものもあるが、簡単かつ純度よく加えて安価であるのは、アルカリ-SDS法¹³³⁾であったので、これについて述べる。

1.7ml のLB培地中で一晩生やした改変体をサンプルチューブに培地ごと移し、 $12,000\text{rpm}$ 室温 5分遠心することにより、菌体と培地を分けた。培地を完全に除き、 $100\mu\text{l}$ のSoln Iで懸濁した。完全に懸濁した後、 $200\mu\text{l}$ のSoln IIを入れて混ぜ、氷中で5分放置すると、菌体は、完全に溶解した。さらに、 $150\mu\text{l}$ の冷Soln IIIを入れゲノムDNAを沈澱させた。10分氷中で放置した後、 $12,000\text{rpm}$ -10°C 10分遠心し、溶液のみをピペットで吸い取った。これと、等量のTEで飽和したPhenol / Chloroform (1:1, v/v)と5分程度混ぜ、タンパク質を変性させた。 $12,000\text{rpm}$ 室温 5分遠心し、上層をさらに、等量のChloroform / Isoamylalcohol (24:1, v/v)と5分程度混ぜ、余分なPhenolを完全に除去した。 $12,000\text{rpm}$ 室温 5分遠心し、上層にEthanolを 1ml 加え、 -20°C に10分静置して、プラスミッドDNAを沈澱させた。 $12,000\text{rpm}$ -10°C 10分遠心した後、上層を捨て、 $500\mu\text{l}$ から 1ml の70% Ethanolでリンスし、再び遠心した。溶液を除いた後、15分減圧にして完全に乾燥させた。これに、 $50\mu\text{l}$ のTE緩衝液を加えて溶解させ、 0.5mg/ml のribonuclease Aを $1\mu\text{l}$ 加え混ぜた後、 37°C で40分反応させた。反応後、20% PEG6000 / 2.5M NaCl溶液を $31\mu\text{l}$ 加えよく混ぜ氷中1時間放置した。 -10°C $12,000\text{rpm}$ 10分遠心した後、上層をピペットで吸い取り、

200 μ lの70% Ethanolでリンスし、再び遠心した。溶液を除いた後、15分減圧にして完全に乾燥させた。これに、40 μ lのTE緩衝液を加えて溶解させ、サンプル（プラスミッド溶液）とした。

細かな改良点や注意点は書き出せばきりがないので省略するが、溶菌させる際に、Lysozymeをスモールスケールの時は使用しない点が、既報の文献と異なっている。また、ラージスケールでは、Chloroform / Isoamylalcohol処理の後0.6倍量のIsopropylalcoholを加えDNAを沈澱させ、さらに等量の5M LiCl / TEによりRNAを沈澱させた。使用した試薬の量もミニスケールの場合と少し変えた。

5-6 欠失変異体の作成

塩基配列を決定するためには、目的の断片をさらに制限酵素などで細分化するか、Exo nuclease IIIを用いて、欠失変異体を作らなければならない。なぜなら、判読できる塩基配列は、プライマーからR1を用いたマニュアル法で200base、自動シーケンサーで350base程度であって、pFZ1-7の場合の約2kbpや、pEX3000の約3.6kbpは、一度には判読できない。目的の断片をさらに4塩基認識の制限酵素などで細分化する方法は、いわゆる“切って貼る”操作であって特別に変わった操作はないのでここでは触れず、欠失変異体の作成法について述べる。

pFZK-2の場合を例にとると、まず、100 μ gのpFZK-2を6塩基認識の制限酵素Bam IIIとPst Iで、完全に消化した。これらの酵素は同じ反応条件で切断できるが、切れ残ったプラスミッドがあるとその後の反応の阻害が起こるので別々に反応を行い、また、切断が完全であることを0.8% アガロースゲル電気泳動法により確認した。この反応溶液200 μ lのうち10 μ lは別に保存しておき、残りの190 μ lを、Phenol / Chloroform (1:1, v/v)処理およびChloroform / Isoamylalcohol (24:1, v/v)処理した後、一旦2倍量のEthanolと1/10量の3M NaOAcを混ぜ沈澱させた。12,000rpm・10℃ 10分で遠心することにより沈澱を集めさらに、70% Ethanolでリンスしてから減圧下で15分乾燥後、95 μ lのH₂Oに溶解した。このうち15 μ lを以下の反応に使った（つまり、1度で6回分のサンプルを作ることになる。これは、反応条件が微妙なため、試行錯誤する必要があるためである）。このサンプルに

7.5 μ lの10 \times Exo III用緩衝液と250units/ μ lのExo nuclease IIIを1.5 μ l、 H_2O を51 μ l加えて、23 $^{\circ}C$ で反応させた。制限酵素Bam IIIとPst Iは、pFZK-2中に単一のサイトであり、Bam IIIは5' 突出型Pst Iは3' 突出型の切口を作る酵素である。Exo nuclease IIIは、5' 末端が突出している（3' 末端が中に入っている）方の末端の3' 末端から順次削る酵素であるので、Bam III側から挿入断片の方へ削って行くことになる。全量75 μ lを1分ごとに5 μ lずつ分取し、5分ごとに1つのサンプルチューブにまとめた。サンプルチューブには、5 \times Mung Bean Nuclease用緩衝液 20 μ lと H_2O 54 μ lを入れて氷中におき、分注すると反応が止まるようにした。15分後、3つのサンプルチューブすべてを65 $^{\circ}C$ で5分処理することにより、酵素を完全に失活させた。そこへ、66 units/ μ lのMung Bean Nuclease 1 μ lを加え、37 $^{\circ}C$ で30分反応させた。Mung Bean Nucleaseは、DNAの1本鎖部分を切断する酵素である。全量100 μ lのうち5 μ l取って、先に分注しておいたサンプルのうち5 μ lおよび、ベクターのみ（pUC18）を適当な酵素で1カットいれたものと一緒に0.8% アガロースゲル電気泳動法により長さを確認した。このとき階段状のバンドが見られなければ、最初からやり直した。残り95 μ lは、Phenol / Chloroform (1:1, v/v)処理およびChloroform / isoamylalcohol (24:1, v/v)処理した後、2倍量のEthanolと1/10量の3M NaOAcを混ぜ沈澱させた。12,000rpm -10 $^{\circ}C$ 10分で遠心することにより沈澱を集めさらに、70% Ethanolでリンスしてから減圧下で15分乾燥後、19.5 μ lの H_2O に溶解した。これに10 \times Digestion用緩衝液 (II)を4 μ l、5mM dNTPsを4 μ l、10mM ATPを4 μ l加え混ぜた後、2units/ μ lのDNA polymerase large fragment (Klenow fragment) 2.5 μ l混ぜ1分ほど室温放置した後、T4 DNA Ligaseを2 μ l加え、16 $^{\circ}C$ で一晩連結反応させた。この後は、形質転換、プラスミドの抽出を行い、挿入断片の長さを調べて、適当なものを次節のダイデオキシ法による塩基配列決定法により、塩基配列を決定した。

なお、Exo nuclease IIIやMung Bean Nucleaseは、その製造会社、ロットによりかなりのばらつきがあったので、各々の場合について条件を検討する必要があると思った。また、この反応では、いわゆる“削りやすい領域”と“削り難い領域”があるようである。

5-7 ダイデオキシ法による塩基配列決定法

塩基配列の決定は、当初、DNA分子を4種の塩基特有の切断反応を行うことにより決定するMaxam-Gilbert法⁹⁾により決められていたが、現在は、DNAポリメラーゼを用いたSanger法¹⁰⁾が、試料調製や反応手順の容易さから汎用されている。もちろん、Maxam-Gilbert法は、直接DNA分子から配列を決定するという観点から捨て難い利点があることは確かであるし、両方法ともポリアクリルアミドゲルによる塩基長と泳動度の違いを利用している点では、同じといえるかもしれない。しかし、少なくとも現在使われている最も一般的な方法はSangerのダイデオキシ法による塩基配列決定法であり、これについて述べる。

まず、ミニスケールで培養した大腸菌から取り出し40 μ lのTE緩衝液に溶解したプラスミッド溶液のうち、38 μ lをこの反応に使った。この鋳型となるDNAの純度と量が塩基配列決定には最も重要なファクターである。これに2N NaOHを2 μ l加え、室温で5分放置し、DNA分子を1本鎖に変性した。その後、5M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ を8 μ l加え中和し、150 μ lの冷Ethanolを加え-80℃に20分放置した後、12,000rpm -10℃ 10分で遠心して沈澱させた。70% Ethanolでリンスした後、減圧下で15分乾燥させた。ここに、10 μ lの H_2O と1.5 μ lの10 \times Klenow用緩衝液と1pmole/ μ lのプライマー溶液0.5 μ lを混ぜて完全にDNAを溶解させた。これを、60℃で20分から40分保温し、プライマーとDNAが十分にハイブリダイズさせた。さらに、室温で20分放置した後、-20℃で一晩保存した。この12 μ lのサンプルに1 μ lのKlenow fragmentと $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dCTP}$ または、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (15TBq/mmol) を1 μ l混ぜた。一方で、サンプルチューブに各々のジデオキシ体を適当量含んだdNTPの溶液を4種各々2 μ lずつ分注しておき、これらに3.2 μ lずつ分注していった。ただし、“C mix”は、15倍希釈して用いた。これを、42℃で20分インキュベーションし、さらに、1mM dNTPの溶液であるChase Solutionを各1 μ lずつ加えさらに42℃で20分インキュベーションした。Klenow fragmentの最適温度は37℃であるが、*D. vulgaris*の遺伝子はG+C含量が多いのでそれより高い温度で反応させることにより、コンプレッションができるだけ起こらないようにした。その後、Stop Solutionを6 μ lずつ加えて反応を停止させ、100℃で5分煮沸し、すばやく

氷中に5分入れることにより再び一本鎖化した。これらを、7M Urea 7% ポリアクリルアミドゲルにロードすることにより分離した。泳動後、10% CH_3COOH / 10% Methanol溶液に浸けることにより、Ureaを除き定着させた。このゲルを、濾紙上に置き、熱をかけながら減圧にして乾燥し、この濾紙をオートラジオグラフィーを行うことにより、バンドを検出して、配列を決定した。原則的には、Toyobo社のシーケンシングキットを用いて行った。

また、シトクロム c_{553} の場合は、ファルマシア社製のオートリードシーケンサーを用い、プライマーは蛍光標識したものを、酵素はT7 DNA polymeraseを使った。反応は、37°Cで5分反応を行った。その他もかなりの点で変更したが、原則的にこの場合は、ファルマシアのマニュアルに従った。蛍光を用いた自動シーケンサーには、いくつも利点がある。例えば、夾雑物の阻害を気にしなくてよい点である。つまり、プラスミッドの溶液中に処理しきれなかったRNA分子や断片化したDNAが、RIを使った場合プライマーとして反応しバックグラウンドとなるが、蛍光を用いた自動シーケンサーでは、蛍光標識されているのは加えたプライマーだけであるから、それらの物質はバックグラウンドとはならない（しかし、一方で試薬中に含まれる蛍光物質がバックグラウンドとして現れるため純度の良い試薬を使う必要があり、試薬は割高になった）。また、配列決定においてゲルの解像度が重要なポイントになるが、常に十分な長さを泳動した同一点での検出であるからマニュアル法よりも、より長く判読できる。もちろんこの方法もさらに進歩している、発展途上の方法であることも確かである。

5-8 部位特異的変異法

発現ベクターに適当な位置で組み込むために、開始コドン付近や、プロセシングサイト付近に部位特異的変異法により、制限酵素サイトを導入した。部位特異的変異法には、さまざまな方法があるが、私は、Inouye法⁴⁵⁾を用いた。この方法は手間がかかるが、操作自体は単純で、安価にできるという特徴を持つ。

pFZKDL-5に、部位特異的変異法により、開始コドンの直前にEco RIサイトを導入した実験を例にとる。まず、5 μg ずつのpFZKDL-5をSca IとEco RIで完全に消化した。Sca Iは、アンピシリンに耐性を持つ β -ラクタマーゼ遺伝子の中にある単一のサイトであり、Eco RIは、変異を起こさせたい部位の約300塩基上流に存在する。完全に消化されたことをア

ガロースゲル電気泳動法により確認した後、Phenol / Chloroform (1:1, v/v) 処理および Chloroform / Isoamylalcohol (24:1, v/v) 処理した後、一旦2倍量のEthanolと1/10量の 3M NaOAcを混ぜ沈澱させた。12,000rpm・10℃ 10分で遠心することにより沈澱を集めさらに、70% Ethanolでリンスしてから減圧下で15分乾燥後、50 μ lのH₂Oに溶解した。このうち、4 μ lは保存しておき、サンプル46 μ lに18 μ lの5 \times Bal 31用緩衝液と21 μ lのH₂Oを加えて混ぜ、1.5unitsのBal 31の溶液5 μ lを加え、Sca I処理した方は16℃で、Eco RI処理した方は30℃で、20分処理した。これらを、Phenol / Chloroform (1:1, v/v) 処理および Chloroform / Isoamylalcohol (24:1, v/v) 処理した後、一旦2倍量のEthanolと1/10量の 3M NaOAcを混ぜ沈澱させた。12,000rpm・10℃ 10分で遠心することにより沈澱を集めさらに、70% Ethanolでリンスしてから減圧下で15分乾燥後、40 μ lのH₂Oに溶解した。それぞれサンプルSとサンプルEとする。これらをアガロースゲル電気泳動法により、Sca I処理した方はほんの少し、Eco RI処理した方は600bp程度短くなっていることを確認した。一方で、合成した変異導入プライマー250pmole分に5 μ lの10 \times kination用緩衝液と5 μ lの1mM ATP、T4 polynucleotide kinaseを2 μ l加え、H₂Oを適当量加えて全量25 μ lとして、37℃で1.5時間反応させた。0.1pmole分のサンプルSとサンプルE、6 μ lの10 \times Digestion用緩衝液 (II)、リン酸化した変異導入プライマーを5 μ lに、H₂Oを適当量加えて全量34.8 μ lとして、100℃で5分煮沸した。室温で30分置いた後、30℃で10分保温し、さらに4℃で30分置いた。この溶液23.2 μ lに、H₂Oを5.8 μ l、5mM dNTPsを4 μ l、10mM ATPを4 μ l加え、一旦遠心して混ぜた。5units分のKlenow fragment 1 μ lを加えて遠心した後、室温で1分程度してから、T4 DNA Ligaseを2 μ l加えて遠心し、16℃で連結反応を行った。形質転換し、普通は、コロニーハイブリダイゼーションの後、そのスクリーニング（一次スクリーニング）で、陽性の信号があったものから、プラスミッドを取りだし、再び形質転換として、コロニーハイブリダイゼーションを行った。そのスクリーニング（二次スクリーニング）により陽性の信号があったものを、変異体とした。この場合、pFZKDL-M5である。

この変異導入では、スクリーニングにコロニーハイブリダイゼーションを用いず、直接プラスミッドを取り出して制限酵素（Eco RI）で消化するという方法を行った。また、二次スクリーニングには、コロニー6個程度を調べれば十分であった。また、この方法では、

二量体化したものが生成する場合があるので注意が必要である。

5-9 SDS-PAGEとイムノプロテイング法

発現したタンパク質の分析およびタンパク質の精製度の確認には、SDS-PAGE (142) とイムノプロテイング法を用いた。

まず、大腸菌の総タンパク質をSDS-PAGEにより分析する場合のサンプル調製法について述べる。大腸菌を生やした培地200 μ lを12,000rpm 室温 5分で遠心することにより集菌した。完全に培地を取り除いた後、145 μ lの H_2O に懸濁し、さらに、2 \times SDS-PAGE Sample用緩衝液 150 μ l、 β -Mercaptoethanol 5 μ lを加え混合した。これを、洗浄用の超音波発生器で15分処理し、細胞を破碎した。さらに、100℃で3から5分煮沸し、10 μ lから20 μ lを電気泳動に用いた。ゲルは、検出したいタンパク質の大きさにより、15%から20%まで適当に使い分けたが、バンドの位置こそ多少変わったが、分離の度合は、それほど変わらなかった。また、*D. vulgaris*の場合は、膜構造が硬いためか、同じ条件では十分に細胞が破碎されなかったので、200Wの強力超音波破碎器を用いた。泳動後は、ゲル染色溶液に1時間浸し、脱染溶液により徐々に色を抜いて、バンドを確認した。

また、イムノプロットを行う場合には、泳動したゲルを、ニトロセルロース膜に電気的に移した。この膜をまず、10mlの3% BSA (Bovine Serum Albumin)を含むWestern blotting用緩衝液 Aで30分振盪してタンパク質の無い部分を覆った。この溶液を完全に除いた後、10mlのWestern blotting用緩衝液 Aで10分振盪した。これを3回繰返した後、Western blotting用緩衝液 Aで1,000倍に希釈したポリクローナル抗体を含む抗血清10mlを入れ、30分振盪した。再び、この溶液を捨て、10mlのWestern blotting用緩衝液 Aで3回洗浄した。さらに、goat anti-rabbit IgG conjugateしたアルカリフォスファターゼ1 μ lを含む10mlのWestern blotting用緩衝液 Aを加え、30分振盪した。この溶液を捨て、10mlのWestern blotting用緩衝液 Aで2回洗浄した。続いて、10mlのAlkaline phosphatase用緩衝液を入れ振盪した後、その溶液を捨て、10 μ lずつのnitroblue tetrazoliumと5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphateをふくむ5mlのAlkaline phosphatase用緩衝液を加え振盪して、バンドの出現させた。適当な濃さになったところで、 H_2O により洗浄し風乾した。二

トロセルロース膜は、退色を防ぐため、アルミホイルに包んで保存した。

5.10 試薬・溶液

試薬は、原則的に和光純薬社またはナカライテスク社の特級または生化学用、電気泳動用を使用した。また、酵素は、宝酒造、東洋紡、ニッポンジーン、ペーリンガー・マンハイム、バイオラボ、シグマなどから購入した。Radio Isotopeは、アマシャムから購入した。

溶液は、組成を本文中に書かなかったもののみ、以下に述べた。書き落としている溶液もあるかもしれないが、原則的にMolecular Cloning¹³³⁾に従った。

1) TE緩衝液

10mM	Tris-HCl (pH8.0)
1mM	EDTA

2) 10×kination用緩衝液

500mM	Tris-HCl (pH7.6)
100mM	MgCl ₂
50mM	dithiothreitol
1mM	EDTA

3) 1×SSC

150mM	NaCl
15mM	クエン酸ナトリウム

(0.1×SSC、10×SSCは、それぞれ1×SSCの1/10、10倍の濃度の溶液である)

4) 10×ligation用緩衝液

667mM	Tris-HCl (pH7.6)
50mM	MgCl ₂
50mM	dithiothreitol
10mM	ATP

5) 10×Exo III用緩衝液

667mM	Tris-HCl (pH8.0)
50mM	MgCl ₂
100mM	dithiothreitol
770mM	NaCl

6) 5×Mung Bean Nuclease用緩衝液

150mM	CH ₃ COONa (pH4.8)
500mM	NaCl
10mM	ZnCl ₂
50%	Glycerol

7) E緩衝液(TAE緩衝液)

40mM	Tris-Acetate
1mM	EDTA(pH8.0)

8) Solu I

50mM	Glucose
10mM	EDTA
25mM	Tris-HCl (pH8.0)

9) Solu II

200mM	NaOH
1%	SDS

10) Solu III

5M	CH ₃ COO ⁻
3M	K ⁺

11) LB培地

1%	Bactotryptone
0.5%	Yeast extract
1%	NaCl(pH7.0)

12) Hybridization Solution

900mM	NaCl
90mM	クエン酸ナトリウム
0.1%	Ficoll
0.1%	Polyvinylpyrrolidone
0.1%	BSA(Bovine Serum Albumin)

13) TSS溶液

1%	Bactotryptone
0.5%	Yeast extract
1%	NaCl(pH7.0)
10%	PEG4000
50mM	MgCl ₂
5%	Dimethyl sulfoxide

14) 10×Klenow用緩衝液

500mM	Tris-HCl (pH7.6)
100mM	MgCl ₂
50mM	dithiothreitol
1mM	EDTA

15) 5×Bal 31用緩衝液

3M	NaCl
60mM	CaCl ₂
60mM	MgCl ₂
100mM	Tris-HCl (pH8.0)
1mM	EDTA

16) 2×SDS-PAGE Sample用緩衝液

100mM	Tris-HCl (pH7.0)
200mM	Dithiothreitol
4%	SDS
0.2%	Bromophenol blue
20%	Glycerol

17) 6×Dye Solution

0.25%	Bromophenol blue
0.25%	Xylene cyanol FF
30%	Glycerol

18) Western blotting用緩衝液 A

10mM	Tris-HCl (pH8.0)
150mM	NaCl
0.5%	Tween20

19) Alkaline phosphate用緩衝液

100mM	Tris-HCl (pH9.5)
5mM	MgCl ₂

20) 2×SSPE

360mM	NaCl
20mM	NaH ₂ PO ₄
20mM	EDTA(pH7.4)

21) TBE緩衝液

90mM	Tris-Borate
2mM	EDTA

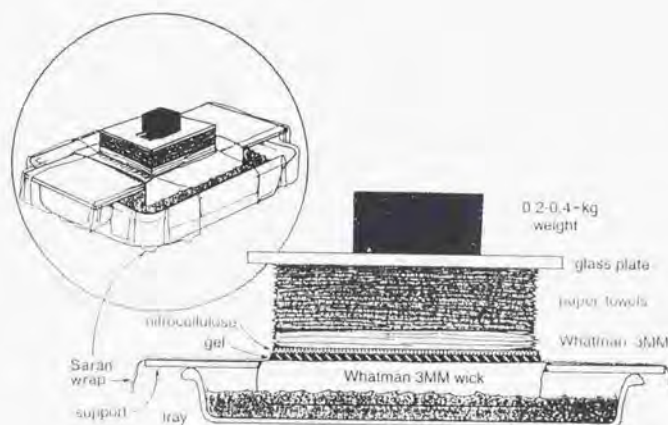


図5-1 サザンプロテイングのためのトランスファーピラミッド¹³⁷⁾

私は、ニトロセルロースではなくナイロンメンブレンを、
20×SSCではなく0.9M NaCl / 0.1M Tris-HCl (pH9.5)を用いた。

参 考 文 献

- 1) 山中、 (1992) 入門生物地球化学、 pp72、 学会出版センター (東京)
- 2) 山中、 (1987) 無機物だけで生きていける細菌、 pp50-63、 共立出版 (東京)
- 3) Ohmoto, H., Kakegawa, T., and Lowe, D. R. (1993) *Science*, **262**, 555-558
- 4) 柳川、 (1991) 生命はいかに創られたか、 pp430-434、
TBSブリタニカ (東京)
- 5) 山中、 (1986) 微生物のエネルギー代謝、 pp45-47、
学会出版センター (東京)
- 6) Alexander J. B. Zehnder ed., (1988)
Biology of Anaerobic Microorganisms, pp622, Wiley (New York)
- 7) スタニエ、イングラム、ウィーリス、ペインター著、高橋、斎藤、手塚、水島、
山口訳、微生物学 [下]、 pp136、 培風館 (東京)
- 8) Alexander J. B. Zehnder ed., (1988)
Biology of Anaerobic Microorganisms, pp485, Wiley (New York)
- 9) J. R. Postgate, (1984) *The sulphate-reducing bacteria* 2nd ed.,
pp155-162, Cambridge University Press (Cambridge)
- 10) Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
74, 560-564
- 11) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 5463-5467
- 12) Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987) *Methods Enzymol.*, **155**,
335-350
- 13) Postgate, J. R. (1954) *Biochem. J.*, **56**, XI-XII
- 14) Ishimoto, M., Koyama, J., and Nagai, Y. (1954)
Bull. Chem. Soc. Jpn., **27**, 564-565
- 15) Postgate, J. R. (1984) *The sulphate-reducing bacteria* 2nd ed.,
pp75-76, Cambridge University Press (Cambridge)
- 16) Ambler, R. P. (1968) *Biochem. J.*, **109**, 47-48P
- 17) Trousil, E. B., and Campbell, L. L. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**,
386-393

- 18) Ambler, R. P., Bruschi, M., and LeGall, J. (1969) *FEBS Lett.*, **5**, 115-117
- 19) Ambler, R. P., Bruschi, M., and LeGall, J. (1971) *FEBS Lett.*, **18**, 347-350
- 20) Haser, R., Pierrot, M., Frey, M., Payan, F., and Astier, J. (1979) *Nature*, **282**, 806-810
- 21) Pierrot, M., Haser, R., Frey, M., Payan, F., Astier, J., Bruschi, M., and LeGall, J. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 14341-14348
- 22) Shinkai, W., Hase, T., Yagi, T., and Matsubara, H. (1980) *J. Biochem.*, **87**, 1747-1756
- 23) Niki, K., Yagi, T., Inokuchi, H., and Kimura, K. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3335-3340
- 24) Higuchi, Y., Kusunoki, M., Matsuura, Y., Yasuoka, N., and Kakudo, M. (1984) *J. Mol. Biol.*, **172**, 109-139
- 25) Matsuura, Y. (1989) 蛋白質核酸酵素, **34**, 1757
- 26) Fan, K., Akutsu, H., Kyogoku, Y., and Niki, K. (1990) *Biochemistry*, **29**, 2257-2263
- 27) Deckers, H. M., Wilson, F. R., and Voordouw, G. (1990) *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2021-2028
- 28) Voordouw, G., and Brenner, S. (1986) *Eur. J. Biochem.*, **159**, 347-351
- 29) Voordouw, G., Walker, J. E., and Brenner, S. (1985) *Eur. J. Biochem.*, **148**, 509-514
- 30) Voordouw, G., and Brenner, S. (1985) *Eur. J. Biochem.*, **148**, 515-520
- 31) Prickril, B. C., Czechowski, M. H., Przybyla, A. E., Peck, Jr. H. D., and LeGall, J. (1986) *J. Bacteriol.*, **167**, 722-725
- 32) Stockermans, J., van Dongen, W., Kaan, A., van den Berg, W., and Veeger, C. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.*, **58**, 217-222

- 33) Brumlik, M. J., and Voordouw, G. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 4996-5004
- 34) Krey, G. D., Vanin, E. F., and Swenson, R. P. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 15436-15443
- 35) Curley, G. P., and Voordouw, G. (1988) *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**, 295-299
- 36) Sznyter, L. A., Slatko, B., Moran, L., O'Donnell, K. H., and Brooks, J. E. (1987) *Nucl. Acids Res.*, **15**, 8249-8266
- 37) Brumlik, M. J., Leroy, G., Bruschi, M., and Voordouw, G. (1990) *J. Bacteriol.*, **172**, 7289
- 38) Voordouw, G., Strang, J. D., and Wilson, F. R. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 3881-3889
- 39) Saito, H., and Miura, K. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619-629
- 40) Ambler, R. P. (1968) *Biochem. J.*, **109**, 47p-48p
- 41) Crestfield, A. M., Moore, S., and Stein, W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622-627
- 42) Inouye, M., and Inouye, S. (1987) *in synthesis of DNA, RNA, and Their Application* (Narang, S., ed) pp.181-206, Academic Press, New York
- 43) Kumagai, I., Takeda, S., Hibino, T., and Miura, K. (1990) *Protein Engineering*, **3**, 449-452
- 44) Benson, S. A., Hall, M. N., and Silhavy, T. J. (1985) *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 101-134
- 45) von Bodman, S. B., Schuler, M. A., Jollie, D. R., and Sligar, S. G. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9443-9447
- 46) Nicholson, D. W., Stuart, R. A., and Neupert, W. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 10156-10168

- 47) Pollock, W. B. R., Chemerika, P. J., Forrest, M. E., Beatty, J. T., and Voordouw, G. (1989) *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2319-2328
- 48) Pielak, G. J., Mauk, G., and Smith, M. (1985) *Nature*, **313**, 152-154
- 49) Hampsey, D. M., Das, G., and Sherman, F. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 3259-3271
- 50) Dumont, M. E., Ernst, J. F., and Sherman, F. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 15928-15937
- 51) Das, G., Hickey, D. R., McLendon, D., McLendon, G., and Sherman, F. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 496-499
- 52) Nakai, M., Ishiwatari, H., Asada, A., Bogaki, M., Kawai, K., Tanaka, Y., and Matsubara, H. (1990) *J. Biochem.*, **108**, 798-803
- 53) Kumagai, I., and Miura, K. (1989) *J. Biochem.*, **105**, 946-948
- 54) Horii, M., Ishizaki, T., Paik, S. Y., Manome, T., and Murooka, Y. (1990) *J. Bacteriol.*, **172**, 3644-3653
- 55) Kojima, S., Obata, S., Kumagai, I., and Miura, K. (1990) *Biotechnology*, **8**, 527-530
- 56) Cannac, V., Caffrey, M. S., Voordouw, G., and Cusanovich, M. A. (1991) *Achv. Biochem. Biophys.*, **286**, 629-632
- 57) Marrs, B. L. (1983) In *studies in Microbiology*, Vol. 4, *The Phototrophic Bacteria: Anaerobic Life in the Light* (Ormerod, J. G., ed.) pp. 186-214, Oxford / London / Edinburgh / Boston / Melbourne: Blackwell
- 58) Suwanto, A., and Kaplan, S. (1992) *J. Bacteriol.*, **174**, 1124-1134
- 59) Matsunaga, T., Matsunaga, N., Tsubaki, K., and Tanaka, T. (1986) *J. Bacteriol.*, **168**, 460-463
- 60) Matsunaga, T., Tsubaki, K., Miyashita, H., and Burgess, J. G. (1990) *Plasmid*, **24**, 90-99

- 61) Rapp, B. J., and Wall, J. D. (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 9128-9130
- 62) Powell, B., Mergeay, M., and Christofi, N. (1989)
FEMS Microbiol. Lett., **59**, 269-274
- 63) Voordouw, G., Pollock, W. B. R., Bruschi, M., Guerlesquin, F.,
Rapp-Giles, B. J., and Wall, J. D. (1990) *J. Bacteriol.*,
172, 6122-6126
- 64) van den Berg, W. A. M., Stokkermans, J. P. W. G.,
and Dongen, W. M. A. M. (1989) *J. Biotech.*, **12**, 173-184
- 65) Seyedirashti, S., Wood, C., and Akagi, J. M. (1991)
J. Gen. Microbiol., **137**, 1545-1549
- 66) 小沢、三好、北村、熊谷、三浦、阿久津 (1993)
第16回日本分子生物学会年会講演要旨集 pp390
- 67) Yagi, T. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **548**, 96-105
- 68) Ogata, M., Arihara, K., and Yagi, T. (1981) *J. Biochem.*, **89**,
1423-1431
- 69) Nakano, K., Kikumoto, Y., and Yagi, T. (1983) *J. Biol. Chem.*,
258, 12409-12412
- 70) Moore, G. R., and Pettigrew, G. W. (1990) *Cytochromes c
Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*,
pp155-159, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- 71) Nakagawa, A., Nagashima, E., Higuchi, Y., Kusunoki, M.,
Matsuura, Y., Yasuoka, N., Katsube, Y., Chihara, H.,
and Yagi, T. (1986) *J. Biochem.*, **99**, 605-606
- 72) Nakagawa, A., Higuchi, Y., Yasuoka, N., Katsube, Y.,
and Yagi, T. (1990) *J. Biochem.*, **108**, 701-703
- 73) Marion, D., and Guerlesquin, F. (1992) *Biochemistry*, **31**,
8171-8179
- 74) Issac, P. G., Jones, V. P., and Leaver, C. J. (1985) *EMBO J.*,
4, 1617-1623
- 75) Kadowaki, K. I., Suzuki, T., Kazama, S., Oh-fuchi, T.,
and Sakamoto, W. (1989) *Nucl. Acids Res.*, **17**, 7519

- 76) Bibb, M. J., van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W., and Clayton, D. A. (1981) *Cell* 26, 167-180
- 77) Anderson, S., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Eperon, I. C., Sanger, F., and Young, I. G. (1982) *J. Mol. Biol.*, 156, 683-717
- 78) Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., and Young, I. G. (1981) *Nature*, 290, 457-465
- 79) de Bruijn, M. H. L. (1983) *Nature*, 304, 234-241
- 80) Bonitz, S. G., Coruzzi, G., Thalenfeld, B. E., Tzagoloff, A., and Macino, G. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 11927-11941
- 81) Grabau, E. A. (1986) *Plant Mol. Biol.*, 7, 377-384
- 82) Hiesel, R., Schobel, W., Schuster, W., Brennicke, A. (1987) *EMBO J.*, 6, 1617-1623
- 83) Burger, G., Scriven, C., Machleidt, W., and Werner, S. (1982) *EMBO J.*, 1, 1385-1391
- 84) Roe, B. A., Ma, D. P., Wilson, R. K., and Wong, J. F. -H. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 9759-9774
- 85) Bott, M., Bolliger, M., and Hennecke, E. (1990) *Mol. Microbiol.*, 4, 2147-2157
- 86) van Rooijen, G. J. H., Bruschi, M., and Voordouw, G. (1989) *J. Bacteriol.*, 171, 3575-3578
- 87) ドーズ著、中馬、岩坪、山野、久保訳、生物物理化学II、pp258、共立出版(東京)
- 88) Yoshihiro Fukumori, personal communication
- 89) Dubourdieu, M., and Fox, J. L. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 1453-1463
- 90) J. R. Postgate, (1984) *The sulphate-reducing bacteria* 2nd ed., pp81, Cambridge University Press(Cambridge)

- 91) Knight, E., and Hardy, R. W. F. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 2752-2755
- 92) Alexander J. B. Zehnder ed., (1988)
Biology of Anaerobic Microorganisms, pp622, Wiley(New York)
- 93) Mayhew, S. G., and Ludwig, M. L. (1975) *The Enzyme*
(Boyer, P. D., ed) 3rd Ed., Vol.12, pp57-118, Academic Press,
New York
- 94) Laudenbach, D. E., Reith, M. E., and Straus, N. A. (1988)
J. Bacteriol., **170**, 258-265
- 95) Wakabayashi, S., Kimura, K., Matsubara, H., and Rogers, L. J.
(1989) *Biochem. J.*, **263**, 981-984
- 96) Leonhardt, K. G., and Straus, N. A. (1989) *Nucl. Acids Res.*,
17, 4384
- 97) Tanaka, M., Haniu, M., Yasunobu, K. T., and Yoch, D. C. (1977)
Biochemistry, **16**, 3525-3537
- 98) Arnold, W., Rump, A., Klipp, W., Priefer, U. B., and Puhler, A.
(1988) *J. Mol. Biol.*, **203**, 715-738
- 99) Tanaka, M., Haniu, M., Yasunobu, K. T., and Mayhew, S. G.
(1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 4393-4396
- 100) Tanaka, M., Haniu, M., Yasunobu, K. T., Mayhew, S. G.,
and Massey, V. (1974) *J. Biol. Chem.*, **248**, 4354-4366
- 101) Andersen, R. D., Apgar, P. A., Burnett, R. M., Daring, G. D.,
Lequesne, M. E., Mayhew, S. G., and Ludwig, M. L. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 3189-3191
- 102) Smith, W. W., Pattridge, K. A., Ludwig, M. L., Petsko, G. A.,
Tsernoglou, D., Tanaka, M., and Yasunobu, K. T. (1983)
J. Mol. Biol., **165**, 737-755
- 103) Burnett, R. M., Darling, G. D., Kendall, D. S.,
Lequesne, M. E., Mayhew, S. G., Smith, W. W.,
and Ludwig, M. L. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 4383-4392
- 104) Fukuyama, K., Matsubara, H., and Rogers, L. J. (1992)
J. Mol. Biol., **225**, 775-789

- 105) Helms, L. R., Krey, G. D., and Swenson, R. (1990)
Biochem. Biophys. Res. Commun., **168**, 809-817
- 106) Helms, L. R., and Swenson, R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*,
1089, 417-419
- 107) Helms, L. R., and Swenson, R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*,
1131, 325-328
- 108) 八木, 山下, 田村, 佐野, 尾形 (1993) 第66回日本生化学会大会発表抄録集
pp1064
- 109) Ogawara, N., Ogata, M., Yagi, T., Wakabayashi, S.,
and Matsubara, H. (1988) *J. Biochem.*, **104**, 196-199
- 110) Ogawara, N., Ogata, M., Yagi, T., Wakabayashi, S.,
and Matsubara, H. (1988) *Biochimie*, **70**, 1815-1820
- 111) Mayhew, S. G., Foust, G. P., and Massey, V. (1969)
J. Biol. Chem., **244**, 803-810
- 112) Mayhew, S. G. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 276-288
- 113) Sagara, T., Igarashi, S., Sato, H., and Niki, K. (1991)
Langmuir, **7**, 1005-1012
- 114) Cohn, D. H., Mileham, A. J., Simon, M. I., Nealson, K. H.,
Rausch, S. K., Bonam, D., and Baldwin, T. O. (1985)
J. Biol. Chem., **260**, 6139-6146
- 115) Johnston, T. C., Thompson, R. B., and Baldwin, T. O. (1986)
J. Biol. Chem., **261**, 4805-4811
- 116) Illiarinov, B. A., Prtotoopopova, M. V., Karginov, V. A.,
Mertvetsov, N. P., and Gitelson, J. I. (1988)
Nucl. Acids Res., **16**, 9855
- 117) Soly, R. R., Mancini, J. A., Ferri, S. R., Boylan, M.,
and Meighen, E. A. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
155, 351-358
- 118) Guiard, B. (1985) *EMBO J.*, **4**, 3265-3272
- 119) Risler, Y., Tegoni, M., and Gervais, M. (1989)
Nucl. Acids Res., **17**, 8381

- 120) Porter, T. D., and Kasper, C. B. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 973-977
- 121) Haniu, M., Iyanagi, T., Miller, P., Lee, T. D.,
and Shively, J. E. (1986) *Biochemistry*, **25**, 7906-7911
- 122) Katagiri, M., Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T.,
Okamoto, M., Yamano, T., and Ohkawa, H. (1986) *J. Biochem.*,
100, 945-954
- 123) Ruettinger, R. T., Wen, L. -P., and Falco, A. J. (1989)
J. Biol. Chem., **264**, 10987-10995
- 124) Volokita, M., and Somerville, C. R. (1988) *J. Biol. Chem.*,
262, 15825-15858
- 125) Larsen, J. N., and Jensen, K. F. (1985) *Eur. J. Biochem.*,
151, 59-65
- 126) Cole, S. T., Eiglmeier, K., Ahmed, S., Honore, N., Elmes, L.,
Anderson, W. F., and Weiner, J. H. (1988) *J. Bacteriol.*,
170, 2448-2456
- 127) Ostrowski, J., Barber, M. J., Rueger, D. C., Miller, B. E.,
Siegel, L. M., and Kredich, N. M. (1989) *J. Biol. Chem.*,
264, 15796-15808
- 128) Ksenzhek, O. S., and Petrova, S. A. (1983)
Bioelectrochem. Bioenerg., **11**, 105-127
- 129) Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978) *Ann. Rev. Biochem.*,
47, 251-276
- 130) Lindqvist, Y., and Branden, C. -I. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 6855-6859
- 131) Xia, Z. -X., Shamala, N., Bethge, P. H., Lim, L. W.,
Bellamy, H. D., Xuong, N. H., Lederer, F., and Mathews, F. C.
(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2629-2633
- 132) Stockermans, J. P. W. G., Pierik, A. J., Wolbert, R. B. G.,
Hagen, W. R., van Dongen, W. M. A. M., and Veeger, C. (1992)
Eur. J. Biochem., **208**, 435-442

- 133) Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1989)
Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd ed.,
Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York)
- 134) (1993) Biotechnology Catalog, 宝酒造株式会社 (京都)
- 135) (1991) 遺伝子工学研究用試薬総合カタログ、東洋紡績株式会社 (大阪)
- 136) (1993) 遺伝子工学研究用試薬総合カタログ・マニュアル、
株式会社ニッポンジーン (富山) 和光純薬工業株式会社 (大阪)
- 137) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D.,
Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. ed., (1987)
Current Protocols in Molecular Biology,
John Wiley & Sons (New York)
- 138) Lederberg, E. M., and Cohen, S. N. (1974) *J. Bacteriol.*,
119, 1072-1074
- 139) Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580
- 140) Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2172-2175
- 141) He, M., Wilde, A., and Kaderbhai, M. A. (1990)
Nucl. Acids Res., 18, 1660
- 142) Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-684

結 び

硫酸還元菌は、絶対嫌気性細菌であり、硫酸呼吸という普通の細菌にはない呼吸系により、エネルギーの変換を行っている。しかしながら、この硫酸呼吸に関わる酵素、タンパク質類で、*in vivo*における確かな活性とともに、その存在位置、反応機構、構造などにわたって研究された例は皆無であった。このような呼吸系、エネルギー変換系の研究は、さらに遺伝子工学の分野で汎用されている好気的な細菌（例えば、大腸菌や枯草菌など）においても、まだまだ解明されていない点が多い。もちろん、ヒトの場合でも例外ではない。本論文の第1章で、この細菌の代謝経路について図示したが、この経路が完全な形で解明されているわけではない。実際のところ、精製され性格付けされているタンパク質は、ごく一部でしかない。こういった経路の研究に、遺伝子工学的・分子生物学的な研究手法は、非常に有効である。遺伝子の構造から膜を透過するか細胞質にとどまるか示唆されるし、その遺伝子を欠損させ相補できる物質を与えることで、そのタンパク質の活性を明らかにできるからである。

本研究は、硫酸還元菌 *D. vulgaris* (Miyazaki F) 株における酸化還元タンパク質（本研究では、広義の電子伝達系、エネルギー変換系タンパク質と言ってもよいかもしれないが）の最初の本格的な遺伝子工学的・分子生物学的研究が行えたものと考えている。シトクロム c_3 は、この細菌に特徴的なタンパク質であって、電子伝達系において中心的な役割を果たしている。第2章において、私はその遺伝子の構造を決めることにより、このタンパク質が前駆体の形で発現することおよび、既発表のアミノ酸配列と一致しない点を見いだした。さらに、このことを菌体からシトクロム c_3 を抽出し、アミノ酸配列を確認した。これらの結果により、このタンパク質の構造と機能相関といったタンパク質工学的な研究を行うための基礎的な情報を手に入れることができた。発現系の構築によりさらなる発展的な研究、例えば、ヘムまわりのアミノ酸置換による酸化還元反応の解析などが可能となるだろう。第3章のシトクロム c_{553} は乳酸デヒドロゲナーゼなどから受けとった電子を第2章で触れたシトクロム c_3 に渡す電子伝達タンパク質であるが、その遺伝子の構造を決めることにより、このタンパク質が前駆体の形で発現することを見いだした。このことは、他のグラム陰性菌のシグナルペプチドとの比較により、シトクロム c_3 およびシトクロム c_{553} のどちらの場合も、ペリプラズムに輸送されることが示唆された。さらに、下流の隣接した領域に COLP 遺伝子を発見した。この遺伝子が確かに硫酸還元菌内で発現機能

しているかを明らかにする必要があるが、硫酸還元菌のエネルギー変換系における新規な要素の存在を示唆するものであった。さらに、COLPがいかなる活性を持つタンパク質なのか、どのような形で発現しているかを研究していくことにより、硫酸還元菌の代謝について新規な考えが提出できると考えている。第4章のFMN結合タンパク質については、発見の新規性に加え、そのタンパク質の性質について十分に議論した。まず、その補欠分子族がFMNであって、ペプチド鎖1分子あたり1分子結合していることを証明した。また、そのペプチド部分がクローニングした断片中のORF-3の産物であることを、断片の塩基配列を決定することおよび精製したペプチドのアミノ酸配列分析により証明した。さらに、高発現系を構築し、発現タンパク質が酸化還元反応に寄与し得ることを証明した。また、このタンパク質が、実際に菌体内に存在することを抗原抗体反応により証明した。このタンパク質は、今までに単離されているタンパク質と1次構造上の相同性が低いいため、その生理的な活性はわからないが、逆に言えば、ごく限られた生物にしか存在しないため、今までに単離されているタンパク質と1次構造上の相同性が低いのかもかもしれない。つまり、硫酸還元という特殊な反応系に関与している可能性がある。また、フラビンタンパク質に必要な最小単位、つまり、FMNを結合するために必要な構造は何かといった研究は、まだほとんど行われていない。また、FMNとペプチド鎖の相互作用についてもまだほとんど情報がない。そういった、タンパク質工学的研究の良いモデルとなりうると考えている。さらに私は、このタンパク質の結晶をすでに得ており、その3次構造をX線結晶構造解析法により決定するという研究の途上である。

この研究が発展し、さらに硫酸呼吸の新たな代謝過程を提出することができれば、このバクテリアの生理をさらに理解できるであろうし、一方で、ヘムタンパク質やフラビンタンパク質といった酸化還元タンパク質のタンパク質工学的研究の礎となれば幸いである。

謝 辭

この論文を終えるにあたり、この研究の機会を与えてくださった、東京大学名誉教授三浦謙一郎博士（現、学習院大学生命分子科学研究所所長）ならびに、横浜国立大学工学部教授阿久津秀雄博士に感謝いたします。また、親切なご指導を賜りました東京大学工学部教授渡辺公綱博士、同助教授熊谷 泉博士に感謝いたします。具体的な実験指導を、東京大学工学部小島修一博士（現、学習院大学生命分子科学研究所助教授）にいただきました。感謝いたします。大阪市立大学に参りましてからも快く研究を続けさせていただいたのは、大阪市立大学工学部教授仲矢忠雄博士のおかげであります。

横浜国立大学工学部から外研究生として共同研究を行った、小沢 潔氏ならびに、藤本貴也氏に感謝いたします。DNAの合成などには、東京大学工学部平尾一郎博士ならびに、上田能孝氏にお世話になりました。感謝いたします。

シトクロム c_3 の抗体は、静岡大学教育学部教授八木達彦博士ならびに、北海道大学名誉教授石本 真博士（現、東京家政大学教授）ならびに北海道大学薬学部関 康秀博士に恵与していただき感謝いたします。また、この遺伝子の発現に関しまして、酵母を用いた発現系では、東京大学工学部砂田 太氏（現、日本石油株式会社）前仲勝実氏、放線菌を用いた発現系では、東京理科大学田口精一博士および前出の上田能孝氏に、光合成細菌を用いた発現系では、東京大学農学部教授矢野圭司博士（現、長岡科学技術大学工学部）、東京農工大学工学部教授松永 晃博士およびJ. グラント バージェス博士さらに、大阪大学理学部教授松原 央博士、佐伯和彦博士にご助言ご指導等をいただき感謝いたします。

シトクロム c_{553} に関しまして、実験に協力してくれた大阪市立大学工学部水貝和也氏、谷口昌弘氏に感謝いたします。また、相同性の検索には、前出の上田能孝氏、前仲勝実氏に加え、東京工業大学総合理工学研究科林 宣宏氏に感謝いたします。また、その前出静岡大学教育学部教授八木達彦博士、および東京工業大学生命理工学部助教授福森義宏博士には、親切なご指導ご助言を賜りました。感謝いたします。

FMN結合タンパク質に関しましては、ペプチド部分のアミノ酸組成分析では、東京大学工学部佐藤至弘氏（現、トヨタ自動車株式会社）フラビンのLC/MSでは、東京大学生産技術研究所助教授高井信治博士ならびに内山秀文氏（現、東京大学工学部）にお世話になりました。また、遺伝子の欠失変異体の作成には、慶応義塾大学医学部浅川修一博士に御指導していただきました。また、電気化学的測定には、横浜国立大学工学部教授仁木克美博士および相楽隆正博士（現、長崎大学工学部助教授）、加野勝宏氏にお世話になり

ました。また、高発現系の開発には、大阪市立大学工学部小笠原一克氏に感謝いたします。フェレドキシン I 遺伝子に関しましては、大阪市立大学工学部小西孝昇氏に、PCRにつきまして京都薬科大学生命薬学研究所河野享子博士に感謝いたします。

そのほか、実験上、また精神的な面からも、研究室の多くの先輩諸氏、後輩諸君のお世話になりました。特に、前出の前仲勝実氏、東京大学工学部津本浩平氏にはお世話になりました。ここに深く感謝いたします。

最後になりましたが、博士課程における研究生活を精神的・経済的に支えていただいた、両親、ならびに、すべての面で精神的に支えてくれた多くの友人、特に東京工業大学生命理工学部横川隆志博士には、原始生命体や分子進化などさまざまなテーマで議論していただき、自分の研究上の仮説を固める事ができました。ここに深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

論文リスト

- ① The primary structure of pre-cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) as determined by nucleotide sequencing of its gene and partial amino acid sequencing
Masaya Kitamura, Kiyoshi Ozawa, Shuichi Kojima, Hideo Akutsu, and Kin-ichiro Miura
Protein Seq. Data Anal., (1993) **5**, 193-196
- ② A gene encoding a cytochrome c oxidase-like protein is located closely to the cytochrome c -553 gene in the anaerobic bacterium, *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F)
Masaya Kitamura, Kazuya Mizugai, Masahiro Taniguchi, Hideo Akutsu, Izumi Kumagai, and Tadao Nakaya
Microbiol. Immunol., (199x) **39**(1), in press
- ③ Novel FMN-binding protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F)
Masaya Kitamura, Shuichi Kojima, Kazuyoshi Ogasawara, Tadao Nakaya, Takamasa Sagara, Katsumi Niki, Kin-ichiro Miura, Hideo Akutsu, and Izumi Kumagai
J. Biol. Chem., (1994) **269**(8), 5566-5573



