

Cyanidioschyzon merolaeにおける 亜硝酸を選択的に還元する新規亜硫酸還元酵素[§]

¹東京大学 教養学部 教養教育高度化機構 生命科学高度化部門

²大阪大学蛋白質研究所

³東京大学 大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

関根 康介^{1,*}、榊原 由希子²、長谷 俊治²、佐藤 直樹³

1. はじめに

酸素発生型光合成生物が行う硝酸同化と硫酸同化の中間反応に、それぞれ亜硝酸をアンモニアに亜硫酸を硫化物に還元する反応がある。亜硝酸還元酵素 (NiR) と亜硫酸還元酵素 (SiR) がそれらの反応を担っているが、この二つの酵素は構造学的にも機能的にも類似点が多い¹⁻³⁾ (図1)。例えば、補欠分子族として[4Fe-4S]クラスターとシロヘムを1個ずつもち、シアノバクテリアではサイトゾル、真核光合成生物では葉緑体ストロマに局在し、フェレドキシンを介して光化学系Iから電子を受け取り、1個の基質の酵素反応に6電子が必要であることなどが挙げられる⁴⁾。よく似た酵素ではあるが、基質特異性が異なり、それぞれ生理的な基質に対して高い触媒活性を示し、明確に区別できる⁵⁾。しかしながら、NiRとSiRの基質特異性の違いを決めている機構ははっきりと理解されてい

い。

Cyanidioschyzon merolae は、酸性温泉に生息する単細胞性の紅藻である。*C. merolae* は2004年にゲノム情報が公開された⁶⁾。その中から、NiRとSiRについて相同検索すると、2個のSiR相同タンパク質をコードする遺伝子が見つかる。ところが驚くべきことにNiRの相同タンパク質をコードする遺伝子が見つからなかった。*C. merolae* は硝酸を唯一の窒素源とする培地でも生育することから、亜硝酸を還元する酵素が存在しないというのは考えにくく、おそらく類似酵素であるSiRがNiRの役割を果たしていると考えられる。

本稿では、*C. merolae*がもつ新しい基質特異性をもつSiRについての生化学的解析の結果と、それが*C. merolae*において亜硝酸還元を担いする酵素であることを検討した結果を紹介する。

2. NiR候補探索

C. merolae のゲノム塩基配列上には、SiR相同遺伝子 *CmSiRA* (CMJ117C) と *CmSiRB* (CMG021C) が存在するが、NiR相同遺伝子は存在しない。一般的にフェレドキシン依存性SiRは弱い亜硝酸還元活性をもつことから、*CmSiRA* と *CmSiRB* のどちらかが NiR の役割を果たしている可能性がある。しかしながら、*CmSiRA* と Bのアミノ酸配列の類似性は70%と高く、光合成生物のNiRおよびSiRのアミノ酸配列をもとにした分子系統解析の結果 (図2) からは *C. merolae* の2個のSiRは、明らかにSiRのグループに属する。したがって、一次構造の情報からどちらがNiRの役割を果たすのかを推定することは難しい。

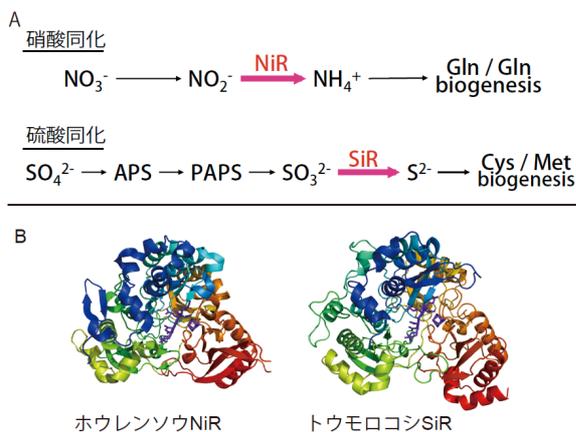


図1 A. 硝酸同化系と硫酸同化系の反応の流れ B. ホウレンソウNiRとトウモロコシSiRの立体構造モデル

[§] 第1回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: co-suke@csls.c.u-tokyo.ac.jp

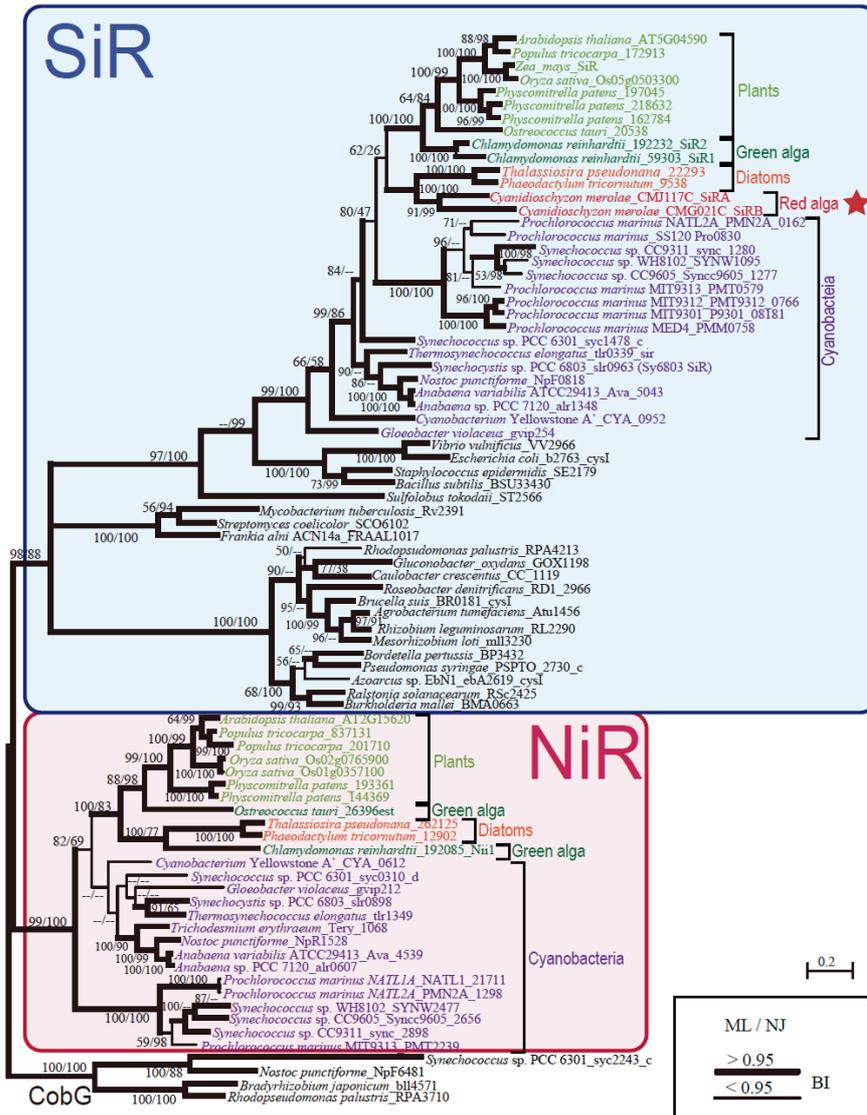


図2 酸素発生型光合成生物のNiRとSiRのアミノ酸配列をもとにした分子系統樹
 系統樹はベイズ法による推定に基づいて作製した。CmSiRAおよびCmSiRBの位置を星印で示した。分岐群の信頼値が高い枝を太線で示した。分岐上の数字は、最尤法 (ML) と近隣結合法 (NJ) によって求められた信頼度をパーセンテージで示している。

しかしながら、CmSiRB遺伝子は7番染色体上にあり、すぐ下流には硝酸還元酵素と硝酸トランスポーターという硝酸同化に関わるタンパク質をコードする遺伝子が並んでいる。さらに、窒素源としてアンモニアを含む培地と硝酸を含む培地で培養した細胞で、CmSiRAとCmSiRBタンパク質の蓄積量を比較した。その結果、CmSiRAでは、窒素源による変化は見られなかったが、CmSiRBは、アンモニアを含む培地ではタンパク質の蓄積はほとんど見られず、硝酸を含む培地で蓄積が見られた (図3)。この結果は、CmSiRBが硝酸同化系に関与することを示唆しており、NiRの役割を果たす最有力候補と考えた。

3. CmSiRBの酵素活性測定法

CmSiRBが高い亜硝酸還元活性をもつかどうかを確かめるために、組換えタンパク質を調製し、反応速度論的解析を行った。組換えタンパク質は大腸菌発現系を用い、また、SiRの活性に必要な補欠分子族であるシロヘムの不足を補うために、大腸菌シロヘム合成酵素を大量共発現させる方法を用いた⁷⁾。

NiRやSiRの酵素活性を測定する方法として、酵素に電子を供給するためにフェレドキシンを加える。フェレドキシンの還元剤として、当初ジチオナイト ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) を用いたが⁸⁾、この方法では酵素活性を測定することができなかった。フェレドキシンを還元する別の方法として、フェレドキシン-NADP(H)酸化還元酵素 (FNR) と NADPHを加えることで、 $\text{NADPH} \rightarrow \text{FNR} \rightarrow$ フェレドキシンという電子の流れを再現した⁹⁾。FNRは光合成条件下では、これとは逆に

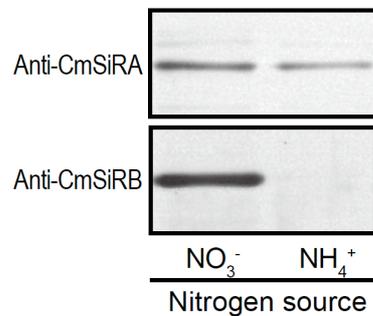


図3 硝酸培地とアンモニア培地でそれぞれ培養した *C. merolae* 細胞の粗抽出液に対する抗CmSiRA抗体と抗CmSiRB抗体を用いた免疫プロット解析

光化学系Iから電子を受け取ったフェレドキシンによって還元され、NADPHを生産する酵素として有名であるが、非光合成条件下では逆反応が行われ（実際には非光合成型のアイソザイムが働く）、FNRによってフェレドキシンが還元され、さまざまなフェレドキシン依存性酵素に電子が分配されている⁹⁾。この方法により、CmSiRBの酵素活性を測定することが可能になった。また、還元剤としてジチオナイトが利用できない理由は、後述するCmSiRBの基質特異性によって説明できる。さらに、FNRによって生成されたNADP⁺は、グルコース-6-リン酸脱水素酵素とグルコース-6-リン酸によってNADPHに再還元し持続的に還元力を供給するようにした。

NiRの酵素活性は、基質である亜硝酸の減少量を測定することで活性とし、SiRは、反応液にシステイン合成酵素とO-アセチル-L-セリンを加え、システインの蓄積量を測定することで活性とした。システイン合成酵素は、O-アセチル-L-セリンとSiRの触媒産物である硫化物を基質としてシステインを合成する酵素である。

4. CmSiRBの基質特異性

CmSiRBの亜硫酸還元活性の反応速度論的解析を行った（図4A、表1）。比較のために一般的なフェレドキシン依存性NiRおよびSiRとして、それぞれシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 NiR (SyNiR) とトウモロコシSiR (ZmSiR) を用いた。CmSiRBの亜硫酸に対する K_m 値は $8.7 \mu\text{M}$ と低く親和性が高いことが示された。これはSiRとしては納得できる値である。しかしながら、触媒中心活性（代謝回転数）を示す k_{cat} 値が ZmSiR と比較して46分の1と極めて低かった。この値からCmSiRBがSiRとしては生理的に機能していないと推察される。

同様に亜硝酸を基質した場合の反応速度論的解析を行った（図4B、表1）。CmSiRBの亜硝酸に対する K_m 値は、 $221 \mu\text{M}$ と ZmSiR と比較すると約2分の1低い値であるが、SyNiRと比較すると6倍と明らかに高く、親和性は低いことが示された。しかし、触媒中心活性は、SyNiRと比較すると約4分の1と低いものの、ZmSiRと比較すると約4倍の高い値を示した。この結果は、CmSiRBが *C. merolae* 細胞中でNiRの役割を果たす可能性を強く示唆するものである。

ここで、反応液に亜硝酸とともに亜硫酸を加えると、亜硝酸還元活性の k_{cat} 値はほとんど変わらず、 K_m 値が $918 \mu\text{M}$ に上昇した。このことは、亜硫酸が拮抗

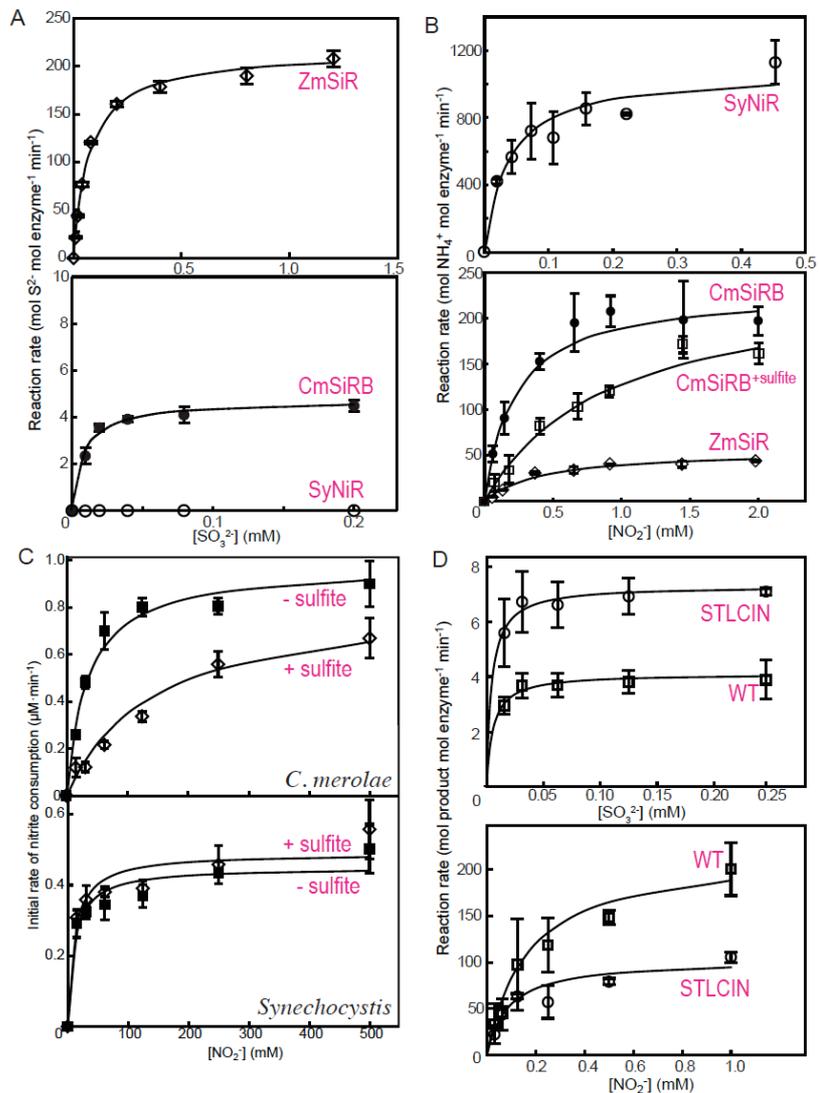


図4 ミカエリス・メンテンプロット

(A) CmSiRB、SyNiRおよびZmSiRの亜硫酸還元活性。(B) CmSiRB、SyNiRおよびZmSiRの亜硝酸還元活性。添加した亜硫酸の濃度は $250 \mu\text{M}$ 。(C) *C. merolae* 細胞と *Synechocystis* 細胞による亜硝酸消費速度。添加した亜硫酸の濃度は $250 \mu\text{M}$ 。(D) CmSiRBの野生型と変異酵素STLCINの亜硫酸還元活性と亜硝酸還元活性。

表1 CmSiRB、ZmSiR、SyNiRおよびSTLCIN (CmSiRB変異酵素) の反応速度論的パラメータ

独立した3回の実験の測定値から非線形重み付き最小二乗法により K_m 値と k_{cat} 値とそれぞれの標準偏差を求めた。ハイフンは検出限界以下を表す。括弧内は250 μM の亜硫酸存在下での値。

Substrates	K_m (μM)		k_{cat} (mol product·mol enzyme ⁻¹ ·min ⁻¹)	
	NO ₂ ⁻	SO ₃ ²⁻	NO ₂ ⁻	SO ₃ ²⁻
CmSiRB	221 ± 36	8.7 ± 1.6	243 ± 13	4.7 ± 0.2
(+ sulfite)	(918 ± 203)	-	(244 ± 28)	-
ZmSiR	416 ± 92	74 ± 5.6	56 ± 5.2	216 ± 5.8
SyNiR	37 ± 6.3	-	1077 ± 53	-
STLCIN	95 ± 13	6.4 ± 0.5	106 ± 13	8.0 ± 0.2

的に阻害していることを示している。つまり、CmSiRBが亜硫酸に対して強い親和性をもつ一方で、代謝回転数が極端に低いため、亜硫酸が阻害剤になり得、これはCmSiRBがもつ特性である。また、還元剤として当初ジチオナイトを用いたときに酵素活性が測定できなかった理由を考えると、ジチオナイトが酸化分解されて生成する亜硫酸が阻害剤として作用したためと考えられる。

5. 無傷細胞におけるCmSiRBの役割

C. merolae 細胞中において CmSiRB の特性が再現されるかを確かめた。まず、窒素源としてアンモニアを含む培地と硝酸を含む培地で培養した *C. merolae* 細胞の亜硝酸の消費速度を比較した。硝酸培地の細胞はアンモニア培地の細胞に比べ、約3倍の速度で亜硝酸を消費した。この結果は、CmSiRBが硝酸培地で生育した細胞でのみ検出される結果 (図3) とよく合致している。次に、硝酸培地で培養した *C. merolae* 細胞と *Synechocystis* 細胞による亜硫酸存在下での亜硝酸消費量を測定し、見かけ上の反応速度論的パラメータを求めた (図4C、表2)。 *Synechocystis* 細胞では見かけの V_{max} と K_m ともに、亜硫酸の存在による影響は見られなかったが、*C. merolae* 細胞では亜硫酸の存在により V_{max} がわずかな減少にとどまるのに対し、 K_m 値が34 μM から 141 μM に大きく増加した。この結果は、*in vitro* 実験系での CmSiRB の亜硝酸還元活性に

対する亜硫酸の影響とよく一致しており、*C. merolae* 細胞内で CmSiRB が亜硝酸の消費に関与していることを強く示唆するものである。

6. CmSiRBの特性を決める構造因子の探索

光合成生物のNiRおよびSiRのアミノ酸配列を比較すると、NiRとSiRのそれぞれでよく保存されている部位のうち、CmSiRBだけに特異的な6

個のアミノ酸が集中している箇所が存在する (図5)。CmSiRBのこの6個すべてのアミノ酸をSiRに保存されているアミノ酸に置換した組換えタンパク質 (STLCIN) を作製し、基質特異性を調べた (図4D、表1)。その結果、STLCINは野生型 CmSiRB に比べ、亜硫酸に対して約2倍、亜硝酸に対して約2分の1の触媒中心活性を示した。STLCINの活性は、基質により野生型と比較して逆の変化を示すことから、この6個のアミノ酸の全て、あるいは一部が基質の選択性に関与していることが示唆された。

ZmSiRの結晶構造 (データは未公表) からSTLCINの変異部分に相当するアミノ酸は、基質結合部位を挟んでシロヘムおよび[4Fe-4S]クラスターの反対側に位置することから (図6)、CmSiRBのこれらのアミノ酸が活性中心周辺の立体構造の形成に深く関与し、活性中心への基質の結合や補欠分子族から基質への電子の受け渡しの効率に影響を与えているのかもしれない。

7. おわりに

CmSiRBは、分子系統解析上は明らかにSiRに属

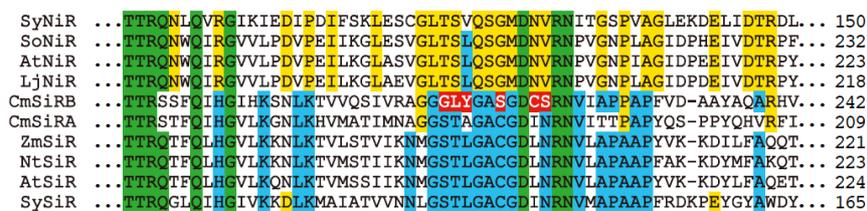


図5 光合成生物のNiRおよびSiRのアミノ酸配列をもとにしたアラインメントの一部。NiRに保存されたアミノ酸を黄色、SiRに保存されたアミノ酸を水色、両方に保存されたアミノ酸を緑色のボックスで示した。他種のSiRとNiRでそれぞれよく保存されているが、CmSiRBで特異的である6個のアミノ酸を赤色のボックスで示した。

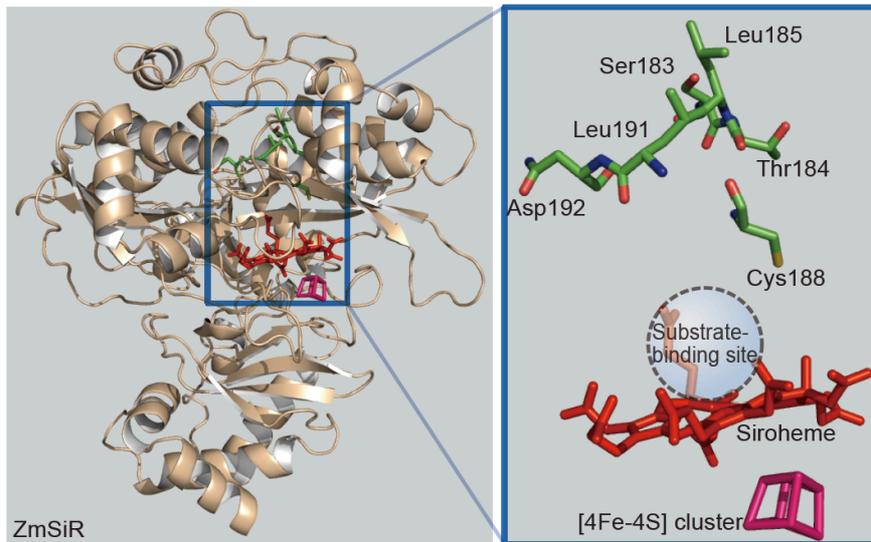


図6 ZmSiRの立体構造モデル

左側は全体像で、シロヘムを赤色、[4Fe-4S]クラスターをピンク、CmSiRB特異的な6個のアミノ酸に相当するアミノ酸を緑色で表した。右側は活性中心付近を拡大して、補欠分子族と6個のアミノ酸のみを表示し、基質結合部位を示した。

し、反応速度論的にもSiRの特徴を強く残している。しかし、既知のSiRとは2種類の基質に対する優位性

が決定的に異なる。つまり、CmSiRBは構造上のわずかな変化によってSiRからNiRに機能的に進化したユニークな酵素であると考えられる。系統樹(図2)を見ると、光合成生物のNiRとSiRは、真核生物が現れる以前に、どちらかの(あるいは全く別の)酵素から分岐したと考えられるが、CmSiRBの機能的分岐は、それとは別の進化であると考えべきである。しかしながら、このユニークな基質特異性をもつCmSiRBは、未だ解明されていないNiRとSiRの基質特異性決定機構を解明するための絶好の材料と考えている。本報告で示したCmSiRBの基質特異性に興味深い変化をもたらした6個のアミノ酸を中心に、現在更なる構造

表2 *C. merolae* 細胞と *Synechocystis* 細胞による亜硝酸消費の見かけ上の反応速度論的パラメータ

独立した3回の実験の測定値から非線形重み付き最小二乗法により K_m 値と k_{cat} 値とそれぞれの標準偏差を求めた。括弧内は250 μM の亜硫酸存在下での値。

	Apparent K_m (μM)	Apparent V_{max} ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)
<i>C. merolae</i>	34 ± 4.0	0.98 ± 0.037
(+ sulfite)	(141 ± 29)	(0.84 ± 0.082)
<i>Synechocystis</i>	11 ± 4.3	0.45 ± 0.052
(+ sulfite)	(11 ± 4.8)	(0.49 ± 0.061)

学的な解析を進めている。

本研究成果の一部は、2009年の原著論文¹⁰⁾で発表し、CmSiRBが*C. merolae*におけるNiRとしての役割を果たす生化学的な証拠を示した。これに加え、2010年にImamura等¹¹⁾によって、CmSiRB遺伝子がNiR遺伝子欠損シアノバクテリアの障害を相補することや、CmSiRB遺伝子欠損*C. merolae*が硝酸培地で増殖が遅くなることなどが報告された。この事実は、我々の提言を遺伝学的に支持するものである。

今後、CmSiRAの特徴が理解されれば、*C. merolae*における硝酸同化機構の全容がつかめるものと期待される。

謝辞

本研究は、大阪大学蛋白質研究所共同研究員制度を利用して行われた。また、2009年度日本科学協会笹川科学研究助成の支援を受けて行われた。

Received July 15, 2011, Accepted July 21, 2011, Published August 31, 2011

参考文献

- Crane, B. R., and Getzoff, E. D. (1996) The relationship between structure and function for the sulfite reductases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 744-756
- Moreno-Vivián, C, Ferguson, S. J. (1998) Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways, *Mol. Microbiol.* 29, 664-666
- Simon, J. (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification, *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 285-309
- Nakayama, M., Akashi, T. and Hase, T. (2000) Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin, *J. Inorg. Biochem.* 82, 27-32
- Krueger, R. J., and Siegel, L. M. (1982) Spinach siroheme enzymes: isolation and characterization of ferredoxin-sulfite reductase and comparison of properties with ferredoxin-nitrite reductas,

- Biochemistry* 21, 2892-2904
6. Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-i, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S.-Y., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., and Kuroiwa, T. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Nature* 428, 653-657
 7. Ideguchi, T., Akashi, T., Onda, Y. and Hase, T. (1995) cDNA cloning and functional expression of ferredoxin-dependent sulfite reductase from maize in *E. coli* cells, in *Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol II* (Mathis, P., ed.) pp. 713-716. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
 8. von Arb, C., and Brunold, C. (1983) Measurement of ferredoxin-dependent sulfite reductase activity in crude extracts from leaves using *O*-acetyl-L-serine sulfhydrylase in a coupled assay system to measure the sulfide formed, *Anal. Biochem.* 131, 198-204
 9. Yonekura-Sakakibara, K., Onda, Y., Ashikari, T., Tanaka, Y., Kusumi, T., and Hase, T. (2000) Analysis of reductant supply systems for ferredoxin-dependent sulfite reductase in photosynthetic and nonphotosynthetic organs of maize, *Plant Physiol.* 122, 887-894
 10. Sekine, K., Sakakibara, Y., Hase, T., and Sato, N. (2009) A novel variant of ferredoxin-dependent sulfite reductase having preferred substrate specificity for nitrite in *Cyanidioschyzon merolae*, *Biochem. J.* 423, 91-98
 11. Imamura, S., Terashita, M., Ohnuma, M., Maruyama, S., Minoda, A., Weber, A.P., Inouye, T., Sekine, Y., Fujita, Y., Omata, T., and Tanaka, K. (2010) Nitrate assimilatory genes and their transcriptional regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: genetic evidence for nitrite reduction by a sulfite reductase-like enzyme, *Plant Cell Physiol.* 51, 707-717.

A novel variant of sulfite reductase preferentially reducing nitrite in *Cyanidioschyzon merolae*

Kohsuke Sekine^{1,*}, Yukiko Sakakibara², Toshiharu Hase², Naoki Sato³

¹Division of Life Sciences, Komaba Organization for Educational Excellence,
College of Arts and Sciences, the University of Tokyo

²Institute for Protein Research, Osaka University

³Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, the University of Tokyo