

■短 報■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 極低温 ESR による金属タンパク質及び金属錯体の機能解析 —光合成細菌 *Heliobacillus mobilis* のフェレドキシンの性質—

羽田野敦史<sup>1</sup> 北島正治<sup>1</sup> 瀬尾悌介<sup>2</sup> 片岡祐介<sup>3</sup> 川本達也<sup>4,5</sup>  
櫻井英博<sup>1,5</sup> 井上和仁<sup>1,5,6</sup>

Analysis of Metal Proteins and Metal Complexes by Cryogenic ESR  
-Characterization of Ferredoxins from the Photosynthetic  
Bacterium *Heliobacillus mobilis*-

Atsushi Hatano<sup>1</sup>, Masaharu Kitashima<sup>1</sup>, Daisuke Seo<sup>2</sup>, Yusuke Kataoka<sup>3</sup>,  
Tatsuya Kawamoto<sup>4,5</sup>, Hidehiro Sakurai<sup>1,5</sup> and Kazuhito Inoue<sup>1,5,6</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Division of Material Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kanazawa City, Ishikawa 920-1192, Japan

<sup>3</sup> Institute of Environmental Systems Science, Shimane University, Matsue City, Shimane 690-8504, Japan

<sup>4</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>5</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>6</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: inoue-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Two ferredoxins, FdA and FdB, were purified from the photosynthetic bacterium *Heliobacillus mobilis*. Their absorption spectra were typical of the 2[4Fe-4S] cluster with absorption peaks at 385 and 280 nm and with a shoulder at 305 nm. Fd-B was sensitive to oxygen, and its A385 values decreased by about 50% in 2 hours at 4°C under aerobic conditions. In contrast, A385 of Fd-A remained unchanged for up to 24 h under the same conditions. Cryogenic ESR measurements indicated that Fd-A had ESR signals around  $g = 2.05$ , 1.94 and Fd-B around  $g = 2.05$ , 1.92. Both ferredoxins were fully reduced by dithionite at pH 8.0.

**Keywords:** iron-sulfur center, ferredoxin, ESR, metalloprotein

### 序論

フェレドキシン (Fd) は鉄原子と硫黄原子から構成される鉄硫黄クラスター (Fe-S) を補因子として持つ可溶性の鉄硫黄タンパク質の一つで、Fe-S には、2 個の鉄原子と 2 個の硫黄原子からなる 2Fe-2S 型、3 個の鉄原子と 4 個の硫黄原子からなる 3Fe-4S 型、4 個の鉄原子と 4 個の硫黄原子からなる 4Fe-4S 型が存在する<sup>1)</sup>。Fd は原核生物から高等生物まで広く存在し、様々な代謝系で電子伝達成分として重要な働きをしている<sup>1)</sup>。光合成細菌ヘリオバクテリアはグラム陽性菌に属する絶対嫌気性の細菌で、主要な光合成色素としてバクテリオクロフィル (BChl) *g* を持つ。BChl*g* はテトラピロールの A 環の C の 3

位にビニル基を持つ点で BChl*a* よりも、むしろ植物のクロロフィル (Chl) *a* に化学的構造が似ている<sup>2)</sup>。また B 環の C の 8 位のエチリデン基が、酸素存在下で光異性化され Chl*a* と同じエチル基に変換される<sup>2)</sup>。ヘリオバクテリアの光化学反応中心は光化学系 I や緑色硫黄細菌と同様の鉄硫黄型であり、可溶性蛋白質である Fd を光還元することができる<sup>3)</sup>。還元型 Fd は Fd-NAD(P)<sup>+</sup>還元酵素 (FNR) を介して、電子を NAD(P)<sup>+</sup>に渡し NAD(P)H を生成する。このような特徴を持つヘリオバクテリアは、酸素発生型の光合成を行うシアノバクテリアや葉緑体の光合成系の進化を考える上で、大変興味深い研究対象であ

る<sup>4,5)</sup>。本研究はタイの水田土壌から単離されたヘリオバクテリアである *Heliobacillus mobilis*<sup>6)</sup> から Fd を単離し、その性質を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 細菌株と培養条件

*H. mobilis* (ATCC No. 43427) は American Type Culture Collection より入手した。培養は PYE 培地を用いた。寒天培地はアクリル製の嫌気ジャー (BBL GasPak Anaerobic Systems, Becton Dickinson) 内に置き、ジャー内部に微量に含まれる酸素を嫌気ガスパック (アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学) を用いて除去した。密栓した培養瓶や嫌気ジャーは白熱灯の光 ( $90 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) を当てながら  $40^\circ\text{C}$  で培養した。

### フェレドキシンの抽出と精製

定常期に達した培養液に酸化防止剤として  $0.5 \text{ M}$  ジチオナイト溶液を  $500 \mu\text{l}$  加え  $8,000 \times \text{g}$  で 10 分間遠心し、菌体を沈殿として得た。これを圧力範囲  $1,000 \sim 1,400 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  でフレンチプレスセル (Aminco) 破壊後、 $20,000 \times \text{g}$  で 20 分、次いで、 $160,000 \times \text{g}$  で 1 時間の遠心を行い可溶性画分を得た。硫酸アンモニウムを 40% 飽和となるように可溶性画分に加え、攪拌しながら  $4^\circ\text{C}$  で 2 時間置いた。これを  $20,000 \times \text{g}$ 、20 分間遠心し、上清に、さらに硫酸アンモニウムを加え 80% 飽和とした。 $4^\circ\text{C}$  で一晩置いた後、これを  $20,000 \times \text{g}$  で 20 分間遠心し沈殿を得た。沈殿を少量の  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH7.8) に懸濁し、同じ緩衝液で透析を行い、硫酸アンモニウムを除き、これを Fd 粗抽出物とした。Fd の培養、単離、精製の操作は内部を窒素置換した嫌気ボックス内で行い、試料を外部に持ち出すときは気密性の高い容器に移した。また用いる緩衝液などの溶液はすべて脱気後窒素置換し、精製に用いたカラム類は窒素置換した嫌気ボックス内に 3 日間置いて精製に用いた。最初に、Fd 粗抽出物を DEAE セルロースカラムにかけ、 $200 \text{ mM}$  NaCl、さらに  $500 \text{ mM}$  の NaCl を含む DEAE 緩衝液で溶出させ Fd を含む画分を集め、限外ろ過 (ウルトラフリー 4, Amicon) で濃縮後、Sephadex G-50 カラムにかけ、ゲルろ過緩衝液で展開した。Fd を含む画分を集め濃縮後、 $2 \text{ M}$  の硫酸アンモニウムを含む  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH7.8) で平衡化した疎水性クロマトグラフィー用カラム Phenyl Superose 10/10 (ファルマシア) に Fd を吸着後、 $2 \sim 0 \text{ M}$  の硫酸アンモニウムの直線的な濃度勾配を持つ  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH7.8) により溶出した。溶

出した画分を限外ろ過により脱塩後、 $50 \text{ mM}$  Tris (pH7.8) で平衡化した陰イオン交換カラム Mono Q 10/10 (ファルマシア) に吸着させ、 $0 \sim 1 \text{ M}$  の NaCl の直線的な濃度勾配を持つ  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH7.8) により溶出し、最終的な精製標品とした。

### 吸収スペクトルと ESR スペクトルの測定

吸収スペクトルは分光光度計 (UV 2500 PC, SHIMADZU) を用い、ESR スペクトルは液体ヘリウム温度可変装置 (LES-LTR5X, JEOL) を装着した ESR スペクトルメーター (JES-RE2X, JEOL) を用いた。

## 結果と討論

細胞破砕液に 40% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、沈殿を除去後、さらに 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて得られた沈殿を少量の  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH7.8) に懸濁し、これを透析して脱塩し可溶化させたところ、緑がかった濃褐色の試料が得られた (Fd 粗抽出物)。Fd 粗抽出物を DEAE カラムにかけ  $200 \text{ mM}$  の NaCl を含む DEAE 緩衝液で溶出させたところ、まず暗緑色の画分が溶出し、さらに NaCl 濃度を  $500 \text{ mM}$  にすると濃赤色の画分が溶出した。この画分を Sephadex G-50 カラムでゲルろ過したところ、ごく薄い茶色の画分と濃茶色の画分が分離した。このうち濃茶色の画分を集めて Phenyl Superose 10/10 にかけ、 $2 \sim 0 \text{ M}$  の硫酸アンモニウムの直線的な濃度勾配を持つ  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH 7.8) で溶出したところ、硫酸アンモニウム濃度が  $0.7 \text{ M}$  と  $0.6 \text{ M}$  のときに、波長  $380 \text{ nm}$  に吸収を持つ画分がそれぞれ溶出された (図 1)。この 2 つの画分をそれぞれ Mono Q 10/10 に吸着後、

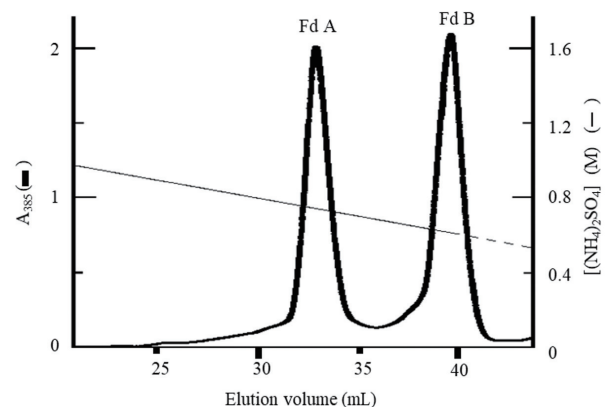


図 1. 疎水性クロマトグラフィーからの溶出パターン。疎水性クロマトグラフィー (Phenyl Superose 10 / 10, ファルマシア) に吸着後、 $2 \sim 0 \text{ M}$  の硫酸アンモニウム濃度の直線的な濃度勾配をかけた  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH7.8) で溶出した。

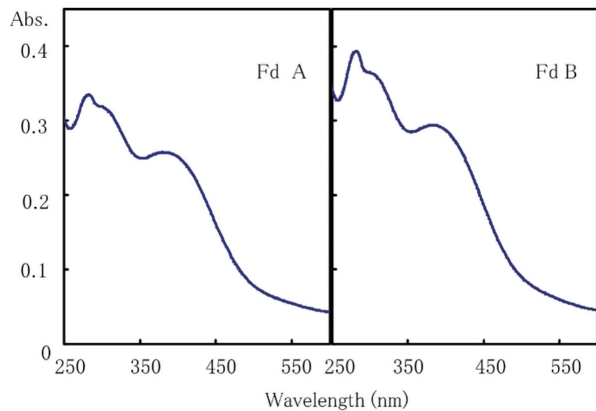


図2. 精製された Fd の吸収スペクトル.

0 ~ 1 M の NaCl の濃度勾配を持つ 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) で溶出し、濃茶色の画分を得た。図2にこれらの画分の吸収スペクトルを示す。どちらのスペクトルも 385 nm と 280 nm に吸収極大を、300 nm に肩を持つ 4Fe-4S 型の Fd に典型的な吸収スペクトル<sup>1)</sup>を示した。硫酸アンモニウム濃度 0.7 M で溶出した Fd を Fd-A、0.6 M で溶出した Fd を Fd-B とそれぞれ命名した。SDS-PAGE にかけたところ、FdA も FdB も約 15 kDa 付近にバンドが検出された。

Fd の精製過程では全操作にわたり嫌気条件を保つように留意した。これは嫌気性の細菌からの Fd には酸素感受性を持つものが報告されており、ヘリオバクテリアの Fd も酸素感受性を持つ可能性が考えられたためである。Fd の酸素感受性を調べるために、精製した Fd 試料の緩衝液を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、300 mM NaCl に交換後、4°C に保ち、空気を通気したものと、嫌氣的に保ったものについて分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定した。8.3 μM の FdA に空気を通気後、4°C で 24 時間置いたが、嫌気条件に保った FdA と吸収スペクトルに差は見られなかった。一方、9.7 μM の FdB を同様に空気を通気後、4°C に置いて吸収スペクトルを測定したところ、空気通気後 2 時間で波長 385 nm における吸収が半減し、20 時間で約 1/4 に減少した (表 1)。この結果から FdA は酸素感受性ではないが、FdB は酸素感受性であると結論される。酸素感受性を持つ Fd では、空気下で 4Fe-4S クラスタが酸化され、3Fe-4S クラスタに変化し、電子伝達活性が失わ

表 1. 精製フェレドキシンの酸素感受性

	反応時間	
	0 h	2 h
Fd-A	0.25	0.25
Fd-B	0.30	0.15

れ、385 nm の吸収も減少する事が報告されている<sup>7)</sup>。FdB の場合も空気下で 4Fe-4S クラスタが破壊され 3Fe-4S クラスタに変化したものと推定される。

ESR 試料管中で Fd を 4°C で 50 mM Tris-HCl (pH7.8) でインキュベート後、液体窒素中で凍らせ ESR 測定を行った。この条件では EPR スペクトルに顕著なシグナルは見られなかった。次に、ジチオナイトを 5 mM 含む条件下で ESR シグナルを測定したところ、FdA の ESR スペクトルは  $g = 2.04, 1.94$  付近に 2 つのシグナルを示し、FdB では  $g = 1.94 \sim 1.92$  付近に 1 つのシグナルを示し (図 3)、FdA、FdB 共に pH7.8 の条件下においてジチオナイトで還元されることがわかった。この測定条件では、酸化還元電位は  $-400 \sim -500$  mV に達する<sup>8)</sup>ので、両 Fd ともに、この範囲の酸化還元電位を持つと考えられる。この値は、これらの Fd が鉄硫黄型光化学反応中心から電子を受容し NADP<sup>+</sup> へ電子を伝達するという仮定と矛盾しない。

シアノバクテリアや葉緑体の光化学系 I では、反応中心色素 P700 から光エネルギーによって励起された電子が末端の電子受容体である F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub> へと伝達される。Fd が F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub> 結合蛋白質である PsaC に接すると、F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub> から電子が Fd の Fe-S に伝達され、Fd は FNR の存在化で NADP<sup>+</sup> を還元し NADPH を生

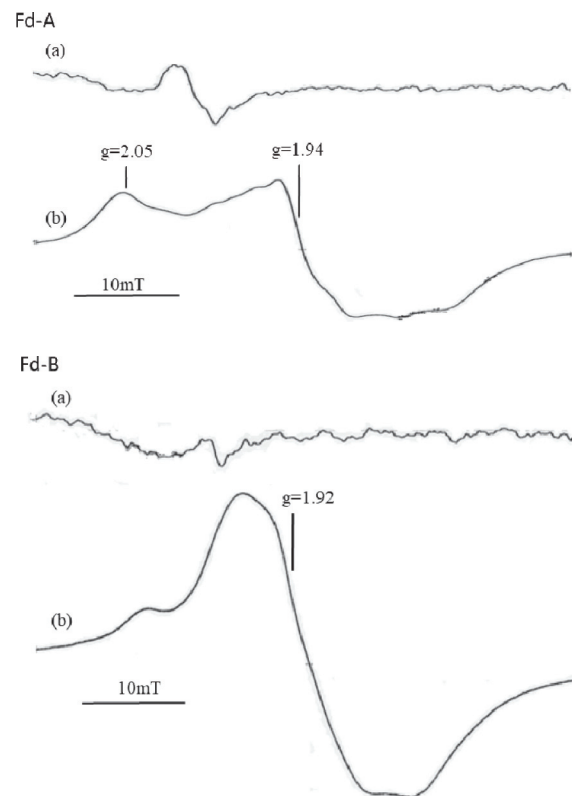


図3. 精製フェレドキシンの ESR スペクトル. (a) 酸化状態, (b) ジチオナイト 5 mM による還元状態.

成する。同じ鉄硫黄型反応中心をもつ緑色硫黄細菌では反応中心色素 P840 から光エネルギーによって励起された電子が F<sub>M</sub>/F<sub>B</sub> 蛋白質である PscB へと伝達され、Fd が還元される。ヘリオバクテリアの光化学系 I の PsaC や緑色硫黄細菌の PscB のような光化学反応中心複合体を構成する鉄硫黄ペプチドが存在するのかどうか明確ではない。界面活性剤を用いて光化学系 I の PsaC を複合体から分離することが可能であるが、分離された PsaC の Fe-S は高い酸素感受性を持つ<sup>9)</sup>。このことから今回単離された Fd のうち酸素感受性を持つ FdB と、光化学系 I の PsaC に関連性があるのかもしれない。

## 謝辞

本研究は 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201709) を受けて行った。

## 文献

- 1) Matsubara H and Saeki K (1992) Structural and functional diversity of ferredoxins and related proteins, In: *Advanced in Inorganic Chemistry*, Cammack R, eds., Academic press, California. pp. 223-280.
- 2) Gest H (1994) Discovery of the heliobacteria, *Photosynth. Res.* **41**: 17-21.
- 3) Sakurai H, Kusumoto K and Inoue K (1996) Function of the reaction center of green sulfur bacteria. *Photochem Photobiol.* **64**: 5-13.
- 4) Xiong J, Inoue K and Bauer C (1998) Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14851-14856.
- 5) Xiong J, Fischer W, Inoue K, Nakahara M and Bauer C (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science* **289**: 1724-1730.
- 6) Beer-Romero P and Gest H (1987) *Heliobacillus mobilis*, a peritrichously agellated anoxyphototroph containing bacteriochlorophyll *g*. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**: 109-114.
- 7) Tilley GJ, Camba R, Burgess BK and Armstrong FA (2001) Influence of electrochemical properties in determining the sensitivity of [4Fe-4S] clusters in proteins to oxidative damage. *Biochem J.* **360**: 717-726.
- 8) Inoue K, Fujii T, Yokoyama E, Matsuura K, Hiyama T and Sakurai H (1989) The photoinhibition site of photosystem I in isolated chloroplast under extremely reducing conditions. *Plant Cell Physiol.* **30**: 65-71.
- 9) Golbeck J (1999) A comparative analysis of the spin state distribution of *in vitro* and *in vivo* mutants of PsaC. *Photosynth. Res.* **61**: 107-144.