

好圧性細菌 *Shewanella violacea* からの キノールオキシダーゼの発現における圧力制御

加藤 千明^{*1} M. Hassan Qureshi^{*1}

山田 光則^{*1, *2} 仲宗根 薫^{*1}

宇佐美 論^{*2} 掘越 弘毅^{*1, *2}

深海微生物の呼吸系における加圧適応機構の解析を目的として, Moderately な好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株より, 加圧下の培養時でのみ発現する呼吸系末端酸化酵素, キノールオキシダーゼを精製しその性質を調べた。その結果, 本酵素は, 酵素 1 分子あたり約 1 分子のプロトヘムまたはヘム *o*, 1 分子のヘム *c* を含み, 少なくとも 4 つの分子量の異なるサブユニットから構成されていた。次に, 本酵素をコードする遺伝子を, *S. violacea* DNA のファージライブラリーからクローン化し, 得られたクローンの全塩基配列を決定した。塩基配列の解析から, キノールオキシダーゼをコードする遺伝子は, 5 つの ORF を含むひとつのオペロンとして存在することが明らかとなり, 相同性検索の結果, 大腸菌の *bo* タイプキノールオキシダーゼをコードする遺伝子群 *cyoA*, *cyoB*, *cyoC*, *cyoD*, *cyoE* オペロンと高い相同性が見られた。そしてそれぞれの ORF が同酵素のそれぞれのサブユニットを構成する蛋白質をコードしているものであることが示唆された。ノーザンブロッティングによる解析の結果, *S. violacea* におけるキノールオキシダーゼの発現は, 転写のレベルで加圧応答していることが確認され, 本酵素の発現が加圧ストレスに対する応答の結果制御されていることが明らかとなった。

キーワード: 高圧力, 好圧性細菌, *Shewanella violacea*, 呼吸系, キノールオキシダーゼ, 遺伝子発現, 圧力制御

Pressure regulation of quinol oxidase expression in Piezophilic *Shewanella violacea*

Chiaki KATO^{*3} M. Hassan QURESHI^{*3}

Mitsunori YAMADA^{*3, *4} Kaoru NAKASONE^{*3}

Ron USAMI^{*4} Koki HORIKOSHI^{*3, *4}

We cloned and sequenced the gene for quinol oxidase enzyme, with the subsequent partial purification and characterization of an intact enzyme complex from a deep-sea moderately piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* strain DSS12, grown at 50 MPa pressure. Based on the deduced amino acid sequences, the enzyme quinol oxidase seems to consist of five kinds of subunits with molecular masses of 74, 43.2, 36.6, 23.2 and 12.4 kDa, respectively. The enzyme contained 0.88 mol protoheme or heme *o* and 0.92 mol covalently-bound heme *c* per mol of enzyme. Protoheme in the enzyme seems to react with carbon-monoxide and cyanide, and catalytic activity was 50 % inhibited by 5 μ M cyanide. Nucleotide sequence analysis of the region neighboring the subunit I gene (*cyoB*) revealed that the genes (*cyoA*, *cyoC*, *cyoD* and *cyoE*) coding for the other four subunits (II, III, IV and V) were clustered upstream and downstream of the *cyoB* gene in order of *cyoA*, *cyoB*, *cyoC*, *cyoD* and *cyoE*, respectively. Analysis of the deduced amino acid sequence of *cyo* subunits showed that this oxidase is structurally related and has a high similarity with that of *Escherichia coli bo*-type quinol oxidase. Northern-blotting analysis of the RNAs, from DSS12 bacterium grown at several pressure conditions, showed that this enzyme expresses in high level when bacterium grown at elevated pressure conditions.

key words : High Pressure, Piezophilic bacteria, *Shewanella violacea*, Respiratory system, Quinol oxidase, Gene expression, Pressure-regulation

* 1 海洋科学技術センター・深海環境フロンティア

* 2 東洋大学・工学部

* 3 The DEEPSTAR Program, Japan Marine Science and Technology Center

* 4 Department of Engineering, Toyo University

1 はじめに

本研究室では、深海微生物の環境圧力ストレスに対する適応機構を分子生物学的に解明する仕事を行っているが、本研究の遂行にあたり、琉球海溝深度5,110 m底泥より分離された深海微生物DSS12株が非常に使い易い菌として選ばれた。というのは、本菌は、Moderateな好圧性細菌であり、大気圧下の生育と高圧下での生育にそれほど大きな違いはなく¹⁾、環境圧力ストレスの影響を生育速度を考慮に入れることなく調べられるメリットがある。近年、本DSS12株の分類学的検討を行った結果、本菌が好圧性*Shewanella*属ブランチ²⁾に属する、新種の細菌であることが明らかとなり、*Shewanella violacea*と命名し、報告した³⁾。

我々はこれまで、本菌より加圧に応答して発現する遺伝子オペロン「加圧応答オペロン」をクローン化し、その発現における圧力制御のメカニズムを詳細に検討し、報告してきた^{4), 5)}。その際、本加圧応答オペロンのさらに下流に、もうひとつの加圧応答する遺伝子オペロンを見だし、塩基配列の相同性の比較からその第2のオペロンが、呼吸系末端酸化酵素のチトクローム*bd*複合体のアッセムブリーに参与する遺伝子、*cydD*、*cydC*オペロンであることが判明した。そしてこれらの遺伝子の存在が、加圧下における微生物の生育の安定性に深く関与していることが示唆された^{4), 6), 7)}。

こうした研究の経緯から、呼吸系のコンポーネントが圧力適応機構にエッセンシャルに参与している可能性が考えられた。そこで我々は、一般的に細菌における呼吸系末端酸化酵素として知られる、キノールオキシダーゼに着目し、別の好圧性細菌*Shewanella benthica* DB172F株^{3), 8)}より同酵素を精製しその性質を調べた。その結果、本酵素は、ヘム*ccb*を含む新しいタイプのキノールオキシダーゼであること、加圧に応答して発現し、大気圧下では、本酵素が存在しない事等が示された⁹⁾。そして、本菌において、高水圧下での呼吸系は、大気圧下とは全く異なる系を形成している可能性を示唆した¹⁰⁾。

今回は本研究室で、もっともよく研究材料として使われている*S. violacea* DSS12株より、キノールオキシダーゼを精製しその性質を調べ、同時に遺伝子の解析、圧力下における発現制御等について検討を行ったので、ここに報告する。

2 材料と方法、結果

2.1 *S. violacea* DSS12株からのキノールオキシダーゼの精製

S. violacea DSS12株を8℃にて、大気圧下並びに高圧下(50 MPa)で培養後、細胞膜画分を調整しキノールオキシダーゼ活性を比較したところ、高圧下の培養でのみ同活性が検出された。そこで、本菌を加圧下(50 MPa, 8℃)で大量に培養し、膜画分を調整し図1に示す方法により、キノールオキシダーゼの精製を行った。

本キノールオキシダーゼはイオン交換カラムにて、NaCl 濃度が0.1-0.2 M程度の時に特徴的に溶出された(図2)。本酵素の各精製ステップと収量、また分光光学的に得られたヘム*c*とプロトヘム(ヘム*o*)の量を表1に示した。

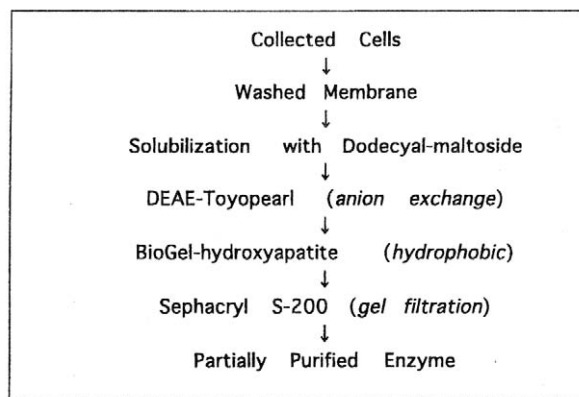


図1 *S. violacea* DSS12株からのキノールオキシダーゼの精製手順
Fig. 1 Purification procedure of quinol oxidase from *S. violacea* strain DSS12

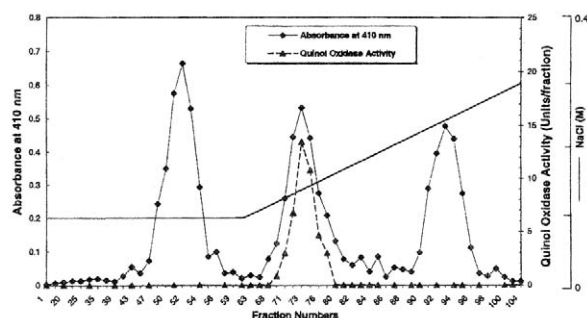


図2 DEAE-Toyopearl カラムによる、ヘム蛋白質の溶出パターンとキノールオキシダーゼ活性
Fig. 2 Elution profile obtained upon ion-exchange chromatography of the solubilized membrane proteins from strain DSS12 cells grown at 50 MPa pressure

表1 50 MPaで培養した*S. violacea* DSS12株からのキノールオキシダーゼの精製表

Experimental Steps	Total Protein (mg)	Heme c (nmol)	Heme c (nmol/mg)	Protoheme (nmol)	Protoheme (nmol/mg)	QH ₂ Activity* (μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
Washed membrane	95	396.3	4.2	192.3	2.0	—
Membrane extract	74	347.2	4.7	158.2	2.1	2.1
DEAE-Toyopearl	38	190.5	5.0	114.0	3.0	6.8
BioGel-hydroxyapatite	9.9	53.9	5.4	44.5	4.5	22.7
Sephacryl S-200	2.2	12.3	5.6	11.9	5.4	29.2

*Quinol oxidase activity was measured using decylubiquinol as substrate.

*Since the typical activity assays run under detergent conditions, no value is given here.

部分精製されたキノールオキシダーゼを2%SDSによる変成処理後、SDS-PAGEにより電気泳動したところ4本のバンドが得られた(図3)。それぞれの分子量は、約72.5, 41.3, 32.1, 18.5 kDaと計算され、ヘム染色の結果、32.1 kDaの蛋白質バンドが染色され(図3)、このサブユニット(サブユニットIII)にヘムが結合していることが示された。

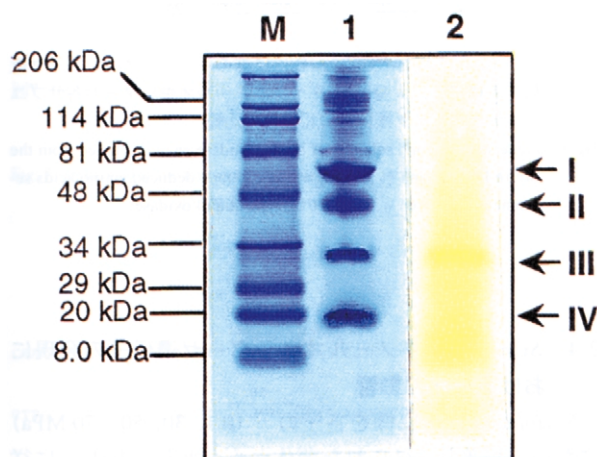


図3 部分精製されたキノールオキシダーゼのSDS-PAGEパターン
1; クマシーブルー染色, 2; ヘム染色
M; 分子量マーカー

Fig. 3 SDS-PAGE of the strain DSS12 quinol oxidase. The purified enzyme (33 μ g of protein) was treated with 2% SDS for 20 min at room temperature and then loaded on a 12% Tricine-SDS gel. Lane 1, stained with Coomassie Brilliant Blue; lane 2, stained with heme staining reagents. M, molecular mass marker proteins (Myosin [206 kDa], α -galactosidase [114 kDa], bovine serum albumin [81 kDa], ovalbumin [48 kDa], carbonic anhydrase [34 kDa], soybean trypsin inhibitor [29 kDa], lysozyme [20 kDa], and aprotinin [7.2 kDa]). The molecular masses of four subunits of DSS12 quinol oxidase were estimated to be (I) 72.5, (II) 41.3, (III) 32.1 and (IV) 18.5 kDa, respectively

2.2 精製されたキノールオキシダーゼの分光光学的性質

本キノールオキシダーゼの酸化された状態の吸収スペクトルを見ると、409 nmにピークをもち、還元状態では、417, 522, 551 nmにピーク、561 nmにショルダーが観察された(図4)。このスペクトルプロファイルから、本酵素は、ヘムcとヘムbまたはヘムoを含むことを示唆した。

次に、酵素とリガンドの複合体の差スペクトルを図5に示した。CO差スペクトルでは、398 nmにブロードなピークが見られ、414, 563 nmにショルダーが観察された。また、423, 522, 551 nmに下方向のピークを確認した。また、CN差スペクトルでは、CN濃度を2 μ M, 4 μ M, 8 μ Mと変化させて測定した結果、2 μ Mで418, 431 nmの下方向ピークが見られ、8 μ Mでは、416, 522, 551 nmの下方向ピーク、423 nmのショルダーが観察された。これらの結果は、酵素中のヘムcよりはむしろヘムoにリガンドのCO及びCN⁻が結合している可能性を示した。

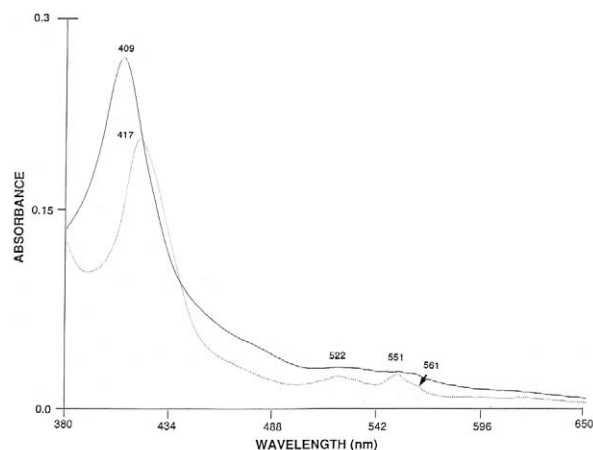


図4 *S. violacea*キノールオキシダーゼの絶対吸収スペクトル。

——; 酸化状態, - - - - -; dithioniteによる還元状態

Fig. 4 Absolute absorption spectrum of the strain DSS12 quinol oxidase at room temperature. The enzyme was suspended in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), containing 0.5 g/l dodecyl maltoside.

——, oxidized state; - - - - -, reduced with dithionite

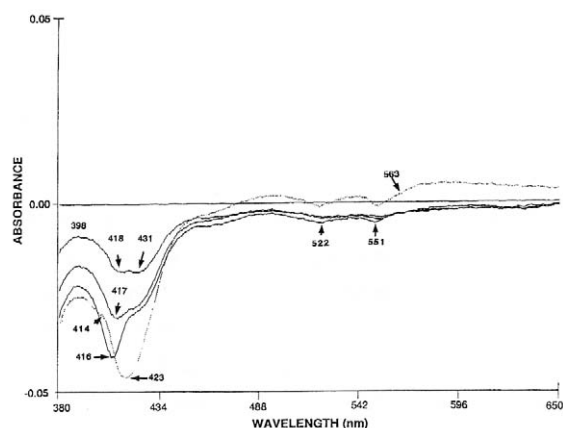


図5 *S. violacea*キノールオキシダーゼのCO, CN⁻差スペクトル

——; CN⁻差スペクトル, CN⁻濃度は、上から、2.4, 8 μ M, - - - - -; CO差スペクトル

Fig. 5 Carbon-monoxide and cyanide binding spectra of the strain DSS12 quinol oxidase. The purified enzyme preparation (around 1.7 μ M heme c) was dissolved in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM EDTA and 0.5 g/l dodecyl maltoside and was fully reduced by the addition of a small amount of solid dithionite. The reduced enzyme was incubated under a 100% CO atmosphere for 5 min and the difference spectrum, reduced +CO minus reduced, was recorded (dashed line). The cyanide-difference spectrum, reduced +CN⁻ minus reduced, was recorded after incubating the reduced enzyme with 2 μ M, 4 μ M and 8 μ M cyanide for 3 min, respectively (solid line)

大気圧下で培養された、DSS12株の膜画分からは、高いチトクロームcオキシダーゼ活性が確認されているが、加圧下の培養より調整された本キノールオキシダーゼは、チトクロームcオキシダーゼ活性は全く示さず、また、5 μ M CN⁻により強く阻害された。

2.3 *S. violacea* DSS12株DNAのラムダファージライブラリーからのキノールオキシダーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

S. violacea DSS12株のDNAラムダファージライブラリーをStratagene社のラムダDash IIファージライブラリーキットを用いて作成し、所定の方法¹¹⁾に従い、キノールオキシダーゼ遺伝子を含む組み換え体ラムダファージのスクリーニングを行った。精製された酵素の性質が、既知の*aa3*タイプ、及び*bo*タイプの末端酸化キノールオキシダーゼと比較的類似していたことから、これらの酵素のサブユニットIに含まれる、もっともよく保存された領域のアミノ酸配列に基づき、以下のプライマーを設計した。

Primer I:

5'-GTNTGGYTNCAYCAYTTYTTYAC-3'

Primer II:

5'-NACNCCNCCDATDATNACRTTTRTG-3'

本プライマーを用いDSS12株DNAをテンプレートとして、PCR増幅を行ったところ、シングルバンドが得られ、ダイレクトシーケンスの結果、それが目的の酵素の塩基配列を含んでいることが明らかとなり、本PCR産物をプラークハイブリダイゼーション実験のプロープとして用いた。スクリーニングの結果、いくつかのポジティブプラークが得られ、そこからキノールオキシダーゼ遺伝子断片を幅広く含むものを、最終的に得ることに成功した。

得られたファージレコンビナントを精製し、5'側及び、3'側のクローニングサイトの塩基配列に従い設計されたプライマー（Stratagene社）により、ロングPCR法（LA-Taq, 宝酒造）にて、約20kbの挿入フラグメントを増幅し、ショットガンシーケンシング法により、本キノールオキシダーゼ遺伝子を含む全DNA塩基配列を決定した。塩基配列の解析から、約5 kbの領域に、5つのORF(*cyoA-E*)を含む、キノールオキシダーゼ各サブユニットをコードすると思われる配列を見いだした。図6に、得られた塩基配列から推定された各ORFの配列と、大腸菌の*bo*タイプキノールオキシダーゼのアミノ酸配列との相同性を示した。また併せ、部分精製標品から確認された本酵素の各サブユニットI-IVの分子量と、各ORFから推定されたアミノ酸配列から得られた分子量との比較を示している。その結果、*S. violacea* キノールオキシダーゼ各サブユニットは、大腸菌のものと同じ遺伝子構造をもち、約46-65%のアミノ酸配列の相同性（identity）を示した。

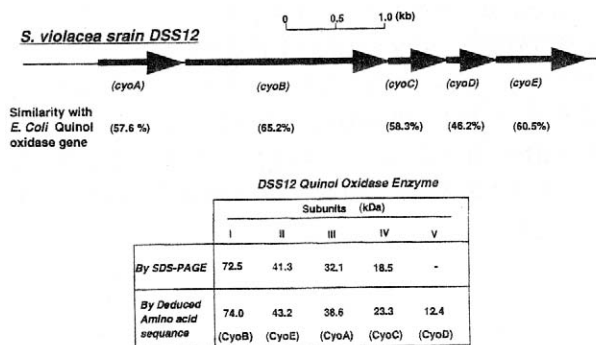


図6 クローン化された*S. violacea* DSS12株のキノールオキシダーゼ遺伝子の構造と、大腸菌*bo*タイプキノールオキシダーゼ各サブユニットとのアミノ酸配列の相同性の比較

Fig. 6 Gene structure and subunits of quinol oxidase enzyme cloned from the strain DSS12, and % identity of the subunits deduced amino acids sequences compared with *E. coli bo* type quinol oxidase

2.4 *S. violacea* キノールオキシダーゼ遺伝子の発現における加圧の影響

S. violacea DSS12株を各圧力下（0.1, 30, 50, 70 MPa）において培養し、得られた菌体から、所定の方法¹¹⁾に従いRNAを抽出した。得られたRNAを用い、ファージライブラリーのスクリーニングで用いたのと同じ、PCRプロープを用い、ノーザンブロッティング解析を行った。図7（A）にその結果を示す。本オペロンのmRNAと思われる全長約4.7 kbの転写産物が、加圧応答して発現していることが示され、大気圧下ではこの位置にほとんどバンドが見られないのに対し、30-50 MPaにおいてよりアバンダントに発現している現象が確認された。また、得られた塩基配列より、転写開始点を同定するための、プライマーを設計し、プライマーイクステンション法による、転写の解析を行った。その結果を、図7（B）に示す。本解析においても、ノーザンブロッティングと同様な結果が得られ、本キノールオキシダーゼの遺伝子発現における圧力応答は、加圧にポジティブに応答して、転写のレベルで発現調節されていることが示された。

プライマーイクステンション解析により同定された転写開始点、並びに、キノールオキシダーゼ遺伝子、*cyo*オペロン上流域のDNA塩基配列を図8に示した。転写開始点の上流に一般的に見いだされる、シグマ70 RNAポリメラーゼが認識する、-10配列（TATAAT）、-35配列（TTGACA）は見いだされなかった。以前に、*S. violacea*の加圧応答オペロンの上流域の解析により、加圧応答の転写に密接に関連すると思われる、AAGGTAAGの13回にわたる繰り返り配列の存在について報告したが、本*cyo*オペロンの上流域においても、それと高い相同性を持つ配列が2ヶ所見いだされた。図中Pressure Box?として示した部分がそれである。現在のところ、どのような転写因子がこうした配列を認識しているかは不明である。

Laboratory Press, New York. (1989)

- 12) V. Chepuri, L. Lemieux, J. Hill, J. O. Alben, and R. B. Gennis "Recent studies of the cytochrome *o* terminal oxidase complexes of *Escherichia coli*." Biochim.

Biophys. Acta., **1018**, 124-127. (1990)

(原稿受理: 1999年8月6日)