

化学合成独立栄養細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* 由来 アコニターゼの遺伝子解析と大腸菌での発現

金原 陽平・田村 隆・徳田 千束^{a)}・中村 淳雄^{a)}
松川 寛和^{a)}・稲垣 賢二

(生物資源化学講座)

Genetic Analysis, Expression in *Escherichia coli* of Aconitase from Chemolithotrophic *Acidithiobacillus thiooxidans*

Yohei Kanahara, Takashi Tamura, Chizuka Tokuda^{a)}
Atsuo Nakamura^{a)}, Hirokazu Matsukawa^{a)} and Kenji Inagaki

An aconitase from *Acidithiobacillus thiooxidans* was purified and characterized, and its gene was cloned. The cloned aconitase gene (*acn*) was expressed in *Escherichia coli* JM 109; aconitase activity was found in the cell extract. The *acn* gene encodes a 646-amino acid polypeptide and is located upstream of the isocitrate dehydrogenase gene (*icd*). *A. thiooxidans* aconitase showed high sequence similarity to pig heart aconitase and *E. coli* aconitase B. Twenty-five of twenty-seven active site residues assigned in pig heart aconitase are conserved in *A. thiooxidans* aconitase. The enzyme was purified by DEAE-Toyopearl 650M column chromatography. The purified enzyme had an optimum pH of 7.5 and an optimum temperature of 60°C. Thermal inactivation studies of the purified enzyme revealed the enzyme activity to be uninfluenced after one hour incubation at 40°C. Enzyme activity was retained 100% after incubation of the enzyme at pH 6.0-9.0 for 60 min. The *A. thiooxidans* aconitase was composed of a single polypeptide chain with a molecular mass of 66 kDa.

Key words : Aconitase, *Acidithiobacillus thiooxidans*, Isocitrate dehydrogenase

緒 言

化学合成独立栄養細菌である *Acidithiobacillus thiooxidans* は pH 0.5-3.0 の強酸性下で生育でき、元素硫黄、及び還元型無機硫黄化合物をエネルギー源とし、二酸化炭素を炭素源として利用できる極限環境微生物である。本細菌は元素硫黄、還元型無機硫黄化合物を硫酸にまで酸化し、この硫酸が河川に流れ込み酸性汚染の原因にもなるが同時に、その独立栄養性、耐酸性、金属耐性などの性質も備えているため鉱業的にバクテリアリーチング（生物的湿式冶金法）に利用されている。最近では本細菌を固定化することにより、ワイン中に含まれる亜硫酸濃度の測定のためのバイオセンサーとして用いられ、利用面も拡がりつつある。

細菌細胞を構成している炭素を空気中の炭酸ガスの固定で賄うことのできる細菌を一般に独立栄養細菌と呼んでいる。この中には、光合成細菌、硝化細菌、硫黄酸化細菌、鉄酸化細菌、水素酸化細菌、一酸化炭素酸化細菌、メタン生成細菌などが含まれている。これら独立栄養細菌の中で旧 *Thiobacillus* 属に属する細菌は、地球の硫黄

および鉄を含めて多種類の貴金属の循環に重要な役割を果たしている。

「硫黄化合物を酸化できる桿菌」という意味合いから命名された旧 *Thiobacillus* 属細菌は、生理学的性質の異なった多彩な微生物群を包含しているが、いずれもサルファイド、元素硫黄、チオ硫酸、ポリチオン酸、亜硫酸などの還元型無機硫黄化合物の酸化で生成するエネルギーを増殖のためのエネルギーとして利用することができる。旧 *Thiobacillus* 属細菌は再分類され、現在は *Acidithiobacillus* 属、*Thermithiobacillus* 属、*Halothiobacillus* 属、*Thiobacillus* 属に分類される。

アコニターゼは一般に鉄硫黄クラスターを有する酵素であり^{1,2)}、クエン酸とイソクエン酸の可逆的変換を触媒し、TCA 回路において重要な役割を果たしており³⁾、医療分野（血清鉄の測定）に応用されている。本酵素は種々の生物種から単離されているが、微生物由来の本酵素で

Received October 1, 2004

a) オリエンタル酵母工業株式会社
(Oriental Yeast Co., Ltd.)

結晶化され構造解析等、詳細に研究されている例は少ない。我々は、化学合成独立栄養細菌 *A. thiooxidans* 中に NAD^+ 依存型のイソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) の存在を見出し、研究を行ってきたが、その過程で ICDH の ORF 上流にアコニターゼ遺伝子と推測される ORF が、下流にスクシニル-CoA シンターゼと推測される ORF の存在を見出したことから、オペロンの存在が示唆された⁴⁾。微生物由来アコニターゼの報告例は少なく、*A. thiooxidans* 由来アコニターゼの構造機能解析を行うことにより、種々の有用な知見が得られると考えられる。そこで今回アコニターゼ遺伝子全長を含むと考えられる pLWD1 プラスミドを使用し、塩基配列の決定を行うとともに大腸菌での発現系構築、酵素の部分精製及び若干の性質検討を行った。

材料と方法

使用菌株、プラスミド及び培地

プラスミドは *A. thiooxidans* のイソクエン酸脱水素酵素遺伝子 (*icd*) を保有する pLWD1¹⁾、発現ベクター pKK223-3 及び *A. thiooxidans* のアコニターゼ遺伝子を含有した pKacn を使用した。宿主菌は *Escherichia coli* JM109 を使用した。大腸菌の培養は LB 培地 (1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH7.4) を用い、37°C で行った。pKK223-3 及び pKacn を保有する *E. coli* JM109 を培養する際は、アンピシリンを終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。誘導物質として IPTG を使用し、終濃度 1 mM になるように培地に添加した。

アコニターゼ遺伝子のクローニング

A. thiooxidans の DNA を制限酵素 *Bam*HI で部分消化し、ZAP express (Stratagene) に連結した。Ex Assist helper phase (Stratagene) を使用し、ポジティブブランクから pLWD1 を獲得した⁴⁾。アコニターゼ遺伝子を含有すると推測される pLWD1 を用いてダイデオキシ法により、アコニターゼの塩基配列決定をした。

アコニターゼ発現プラスミドの構築

EX-Taq DNA polymerase (宝バイオ) を使用し、pLWD1 を鋳型とした PCR により、アコニターゼ遺伝子を増幅させた。96°C, 1分, 55°C, 1分, 72°C, 2分の反応を30サイクル行った。使用したプライマーは5'末端に *Eco*RI, 3'末端に *Hind*III 切断部位が出来るように設計した (5'-ATCAGAGAATTCATGGCTATGAAC-GTCACC-3', 5'-GTAACAAGCTTGGTTTCT-GAATATGGGTCG-3')。そして強力な *tac* プロモーターを有する pKK223-3 に連結し、発現プラスミド pKacn を構築した。

アガロースゲル電気移動

0.7~2.0% アガロースゲル (Agarose S, ニッポンジーン) を使用した。ゲルは 1 × TAE に溶解して調製し、終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 10 mg/ml 臭化エチジウムを添

加した。DNA 試料には 1/10 容量の loading buffer (1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue) を添加し、電気泳動に供した。

酵素活性の測定

酵素溶液と等量の 28 mM L-Cysteine, 2 mM Fe $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で 37°C, 30 分間インキュベートし、ホロ化を行った後、30°C, 10 分でインキュベートした 90 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1.8 ml 及び 30 mM D-trisodium isocitrate 0.1 ml と酵素溶液 0.1 ml を混合し、240 nm の吸光度変化量を測定した。1 U は 30°C, 1 分間で 1 μmol の *cis*-アコニット酸を生じさせるために必要な酵素量とした。

酵素タンパク質の定量には Bio-Rad protein assay を用いた。適度に希釈した酵素溶液 1.6 ml に Bio-Rad protein assay 試薬を 0.4 ml 添加した後、15 分間放置し、595 nm の吸光度を測定した。

酵素の精製

精製は全て 4°C で行った。*E. coli* JM109/pKacn を LB 液体培地 5 ml で前培養を行い、培養菌体を集菌し、滅菌済み 0.9% 生理食塩水で洗浄後、100 μl 0.9% 生理食塩水で懸濁後、LB 液体培地 500 ml に植菌し、本培養を行った (最終的に 2,000 ml 培養を行った)。得られた菌体を 1 mM クエン酸, 2 mM DTT を含む 50 mM Tris-acetate (pH 6.5) (BufferA) で懸濁した後、超音波による破碎を行い、細胞残渣を 14,000 rpm, 30 分遠心分離を行い除去し、さらに上清を 37,000 rpm, 1 時間遠心分離し、無細胞抽出液を獲得した。次に BufferA で平衡化した DEAE-Toyopearl 650M ($\phi 2.0 \times 8$, 約 80 ml) に供し、同緩衝液で非吸着画分を溶出した後、20 mM の NaCl 濃度の同緩衝液でステップワイズで溶出を行った。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli らの方法に従って行った。分離用ゲル濃度は 12% で行った。ゲル板一枚あたり、20 mA の定電流で泳動した。タンパク質の染色は Coomassie Brilliant Blue G-250, 10% 酢酸を含んだ 45% メタノール溶液で行った。

ゲルろ過による分子量決定

使用担体として Sephacryl S-300 High Resolution (Amersham Biosciences) を使用した ($\phi 2.5 \times 100$, 約 500 ml)。マーカータンパク質は LMW GEL FILTRATION CALIBRATION KIT (Pharmacia Blotech) を使用した (Tyroglobulin 669,000 Da, Aldolase 158,000 Da, Ovalbumine 43,000 Da)。これらを 750 μl の 1 mM クエン酸, 2 mM DTT を含む 50 mM Tris-acetate (pH 6.5) に混合し、担体に吸着させた。これを用いて検量線を作製し、同条件で酵素サンプルを供し、分子量決定を試みた。

結果と考察

アコニターゼ遺伝子の同定及び相同性検索

pLWD 1 を用いてダイデオキシ法により塩基配列決定をした結果, *A. thiooxidans* 由来アコニターゼは646アミ

ノ酸, 1938bp の ORF から成っていることがわかった。また, さらに ICDH の ORF 付近の塩基配列解析を行った結果, 下流にスクシニル CoA シンテターゼをコードする遺伝子の ORF の存在が確認された。いずれの酵素も TCA 回路に重要な酵素である (Fig. 1)。 α -ケトグルタ

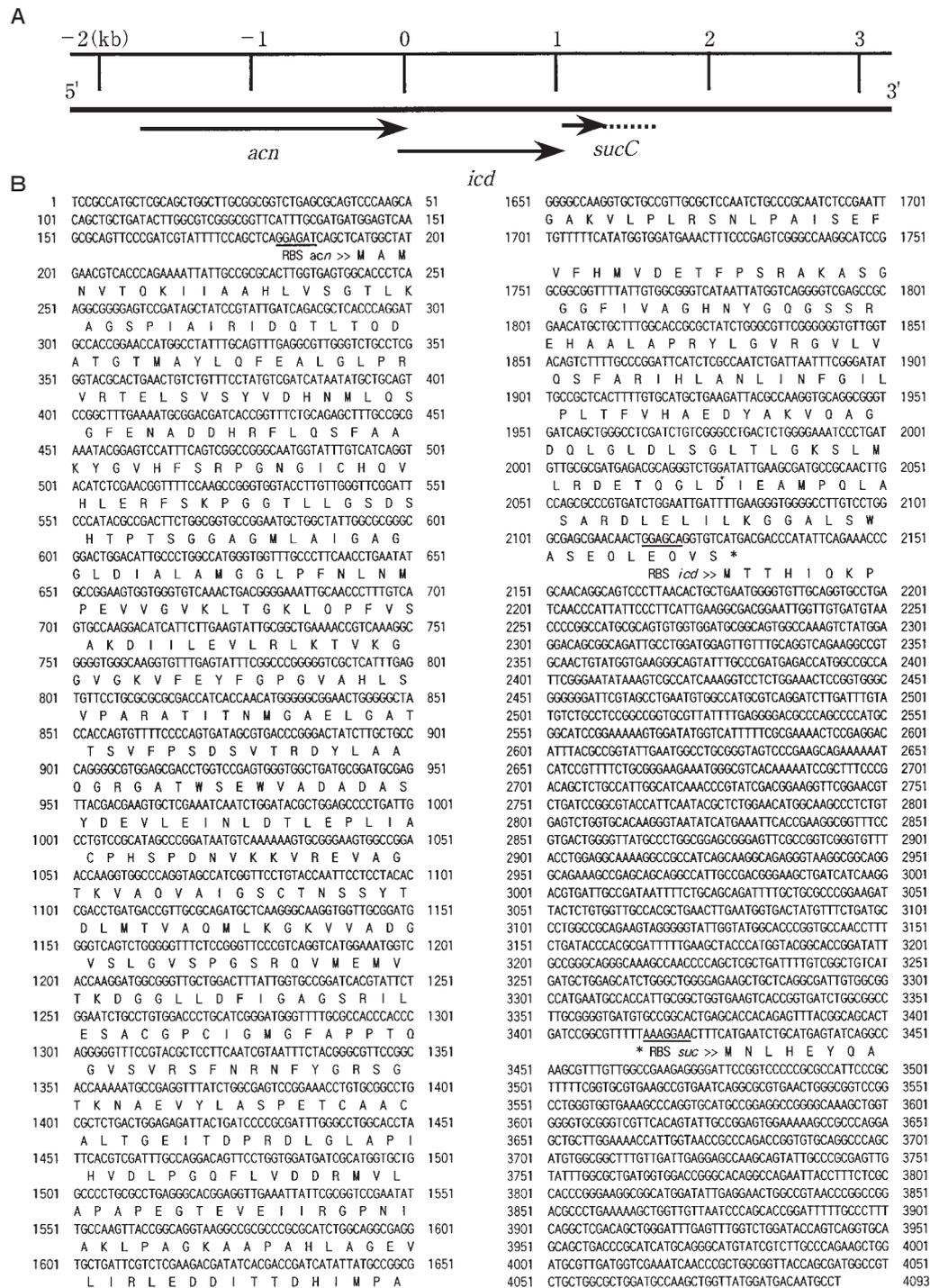


Fig. 1 A: Restriction map of the BamHI fragment of pLWD1 containing aconitase gene (*acn*). B: Nucleotide sequences of *acn*, *icd*, and the 5'-part of the putative succinyl-CoA synthase β -subunit gene (*sucC*). Putative ribosome binding sites (RBS) are underlined. Asterisk indicates stop codon.

ル酸脱水素酵素を欠損している報告に一致した。

相同性検索の結果、ブタ由来のアコニターゼと35%、大腸菌由来アコニターゼA型と28%のアミノ酸配列相同性があり⁵⁾、ブタ由来アコニターゼにおいて触媒反応、基質の結合に関与するとされている27アミノ酸のうち25アミノ酸の保存が確認されたされていた⁶⁾ (Fig. 2)。保存されていなかったアミノ酸は Ser 571, Pro 679 (ブタ心筋由来アコニターゼのアミノ酸番号を引用)であり、Ser 571は Met, Pro 580は Ala に対応していることが確認された。また古細菌である *Sulfolobus tokodai* strain 7,

Aeropyrum pernix K1 とはそれぞれ34%, 61%の相同性があり、古細菌以外の微生物、真核生物由来アコニターゼよりN末端が30アミノ酸ほど欠損していた。

酵素の精製

可溶性画分に有効な活性が確認された pKacn の系を用いて酵素精製を行った。アコニターゼは非常に酸化に対し不安定であることが、実験を行う上で確認されたことから、酵素希釈緩衝液及び精製に使用する緩衝液は全てN₂ガスをバブリングして行った。

E. coli JM 109/pKacn の菌体 8 g を用いて酵素精製

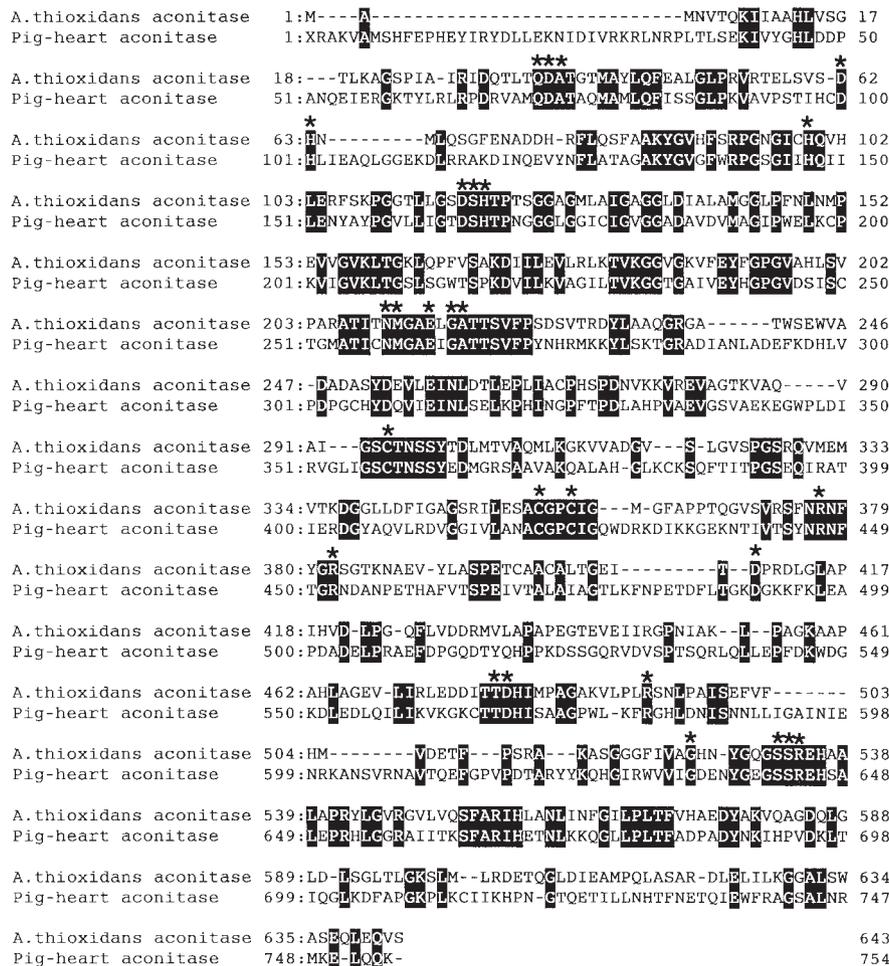


Fig. 2 Sequence alignment of *A. thiooxidans* and pig-heart aconitase. Asterisks indicate active site residues assigned in pig heart aconitase.

Table 1 Purification of aconitase from *A. thiooxidans*

	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Total protein (mg)	Yield (%)	Purification index (fold)
Crude extract	1106	0.9	1223	100	1
DEAE-Toyopearl 650 M	166	6.1	27.6	15	6.8

を行った。酵素希釈溶液には 1 mM クエン酸, 2 mM DTT 含有 50 mM Tris-acetate 緩衝液 (pH 6.5) を使用した。Table 1 に示した精製ステップを踏むことにより、収率は 15%, 6.8 倍にまで精製できた。精製酵素 10 μ g を用いて、SDS-PAGE を行ったところ、多少マイナーバンドの減少が確認された (Fig. 3)。引き続き酵素精製を行いたかったが酵素の失活が考えられたので、精製をここで

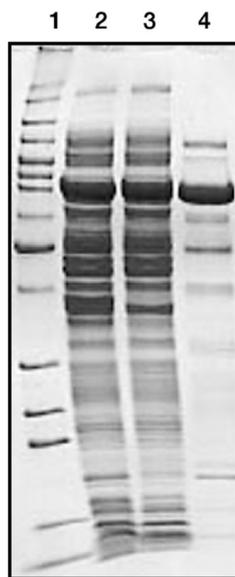


Fig. 3 SDS-PAGE (12%) of fractions from the aconitase preparation.

lane 1: BenchMark protein ladder; lane 2: crude extract; lane 3: crude extract after 37,000 rpm; lane 4: pool after anion-exchange chromatography (DEAE-Toyopearl 650 M). Protein was 10 μ g in each lane.

中止し、諸性質検討を行った。

部分精製酵素の性質検討

酵素溶液は 2.0 U/ml になるように希釈し、諸性質検討を行った。ただし pH 安定性を求めるときは各々の pH の緩衝液を用いて、2.0 U/ml に希釈した。90 mM 酢酸 NaOH 緩衝液 (pH 3.0~5.0), 90 mM リン酸カリウム緩衝液 (6.0~7.5), 90 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0), 90 mM グリシン NaOH 緩衝液 (pH 9.0~10.0) を用いて酵素活性に対する pH の影響を調べた。その結果、本酵素の最適 pH は 7.5 であった (Fig. 4 A)。酵素溶液を pH 3.0~10.0 の 50 mM 緩衝液で 2.0 U/ml になるように希釈し、室温で 60 分放置した後、ホロ化、活性測定を行った。その結果、pH 6.0~9.0 の範囲では 100% の残存活性を示した (Fig. 4 B)。

また活性測定溶液を 25°C~80°C で 10 分インキュベートし、酵素溶液を添加し、活性測定を行い、各温度における相対活性を求めた。その結果、60°C で最大の活性を示した (Fig. 5 A)。酵素溶液を 25~80°C で 60 分インキュベート後の残存活性を測定した結果、40°C 以下まで安定であったが、50°C 以上で顕著な活性の低下が確認された (Fig. 5 B)。

Fe²⁺ 以外の二価金属イオンが配位するかを確認 (活性を有するか確認) するため、ホロ化の際に用いている Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂ 以外の金属 (MgSO₄ · 7 H₂O, CuSO₄ · 5 H₂O, MnSO₄ · 5 H₂O, CoSO₄ · 7 H₂O, NiSO₄ · 6 H₂O) を使用し、ホロ化、活性測定を行った。その結果、鉄のみホロ化を行えることを確認できた (Fig. 6)。

D-イソクエン酸の代わりに、構造類似体である D-酒石酸, L-酒石酸, クエン酸, DL-3-イソプロピルリンゴ酸, DL-リンゴ酸, D-リンゴ酸, L-リンゴ酸を基質とし

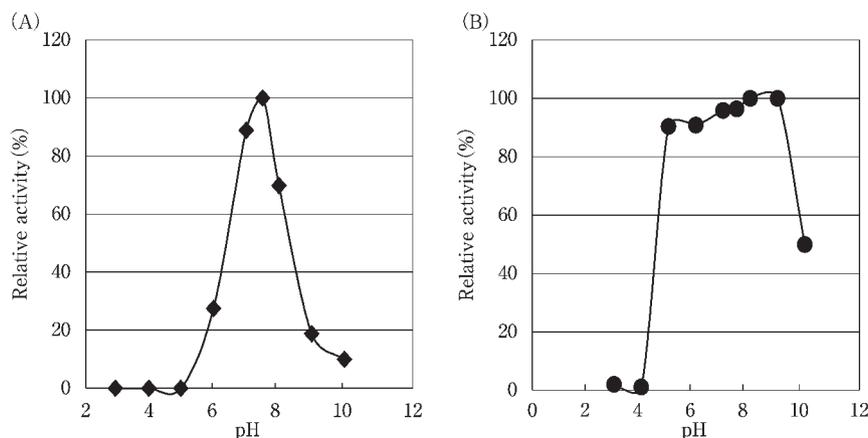


Fig. 4 Effect of pH on enzyme activity and stability.

(A) Enzyme activity was measured in the following buffer; 90 mM Acetate-NaOH (pH 3.0-5.0); 90 mM potassium phosphate (pH 6.0-7.5); 90 mM Tris-HCl (pH 8.0); 90 mM Glycine NaOH (pH 9.0-10.0). (B) Enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at the indicated pH and at room temperature for 60 min in the following buffer; 50 mM Acetate-NaOH (pH 3.0-5.0); 50 mM potassium phosphate (pH 6.0-7.5); 50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 50 mM Glycine NaOH (pH 9.0-10.0).

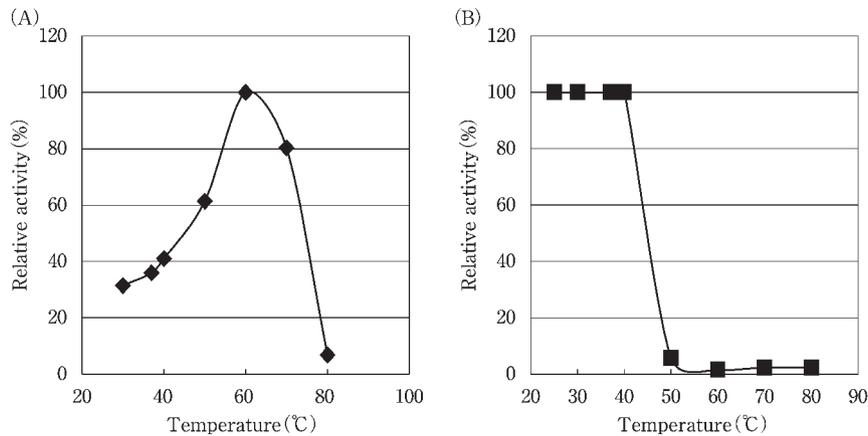


Fig. 5 Effect of temperature on enzyme activity and stability.

(A) Enzyme activity was measured in a 2ml reaction mixture containing 1.8ml 90mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1ml 30mM D-Isocitrate, and 0.1ml enzyme solution at various temperatures. (B) The enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various temperatures.

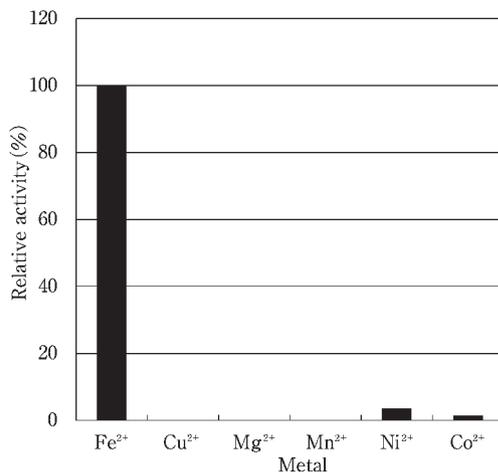


Fig. 6 Effect of various metal ions in activation of inactivated aconitase.

The inactivated enzyme was measured after incubation in 14mM L-Cysteine and the following 1mM various metal ions; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, MgSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, MnSO₄·5H₂O, CoSO₄·7H₂O, and NiSO₄·6H₂O.

て、活性測定を行った。精製酵素は1 mM クエン酸を含有しているので、2 mM DTT 含有50mM Tris-酢酸緩衝液 (pH 6.5) で透析したものを使用酵素とした。その結果、イソクエン酸、クエン酸のみを基質と出来ることが確認された。またイソクエン酸の方が比較的反応性が高いことが推測された (Table 2)。

Sephacryl S-300 High Resolution を用いたゲルろ過による分子量決定を試みた結果、分子量は66,000と算出された。SDS-PAGE の結果から、サブユニットの分子量は68,000と算出されていたことと照らし合わせるにより、本酵素はモノマー酵素であることが確認された。

Table 2 Substrate specificity of *A. thiooxidans* aconitase

Substrate	Relative activity (%)
DL-Isocitric acid	100
Citric acid	73
DL-3-Isopropyl malic acid	0
D-Malic acid	0
L-Malic acid	0
DL-Malic acid	0
D-Tartaric acid	0
L-Tartaric acid	0

Table 3 Comparison of properties of *A. thiooxidans* aconitase with pig heart aconitase

	Aconitase from <i>A. thiooxidans</i>	Aconitase from pig heart
pH stability	6.0-9.0	5.5-8.0
Optimum pH	7.5	8.5
Thermostability	< 40°C	< 50°C
Optimum temp.	60°C	> 70°C
K _m Value (mM) citrate	—	1.36

本研究において部分精製した酵素の性質と詳細に研究されているブタ由来アコニターゼと性質比較を行った^{7,8,9)}。その結果、温度に対し、不安定であり、pH 安定性も劣っていた (Table 3)。部分精製酵素を用いた性質検討であるためにこのような結果となってしまったとも考えられる。今後はゲルろ過、疎水イオン交換クロマトグラフィーを用いた精製を行い、均一に精製した後に、性質検討を行うことが期待される。

要 約

Acidithiobacillus thiooxidans 由来アコニターゼ遺伝子

を大腸菌中にクローニングし、発現させ、精製及び性質検討を行った。A. thiooxidans アコニターゼは *Escherichia coli* JM 109株で発現させ、活性が無細胞抽出液で確認された。646アミノ酸から成っており、イソクエン酸脱水素酵素遺伝子 (*icd*) の上流に位置していた。またブタ心筋由来アコニターゼと大腸菌アコニターゼA型と高いアミノ酸配列相同性があり、ブタ心筋アコニターゼで触媒反応、基質の結合に関与するとされている27アミノ酸のうち25アミノ酸の保存が確認された。A. thiooxidans アコニターゼは DEAE-Toyopearl 650M等により精製された。精製酵素は至適 pH 7.5, 至適温度60°Cであった。また40°Cで1時間インキュベートを行った後にも、活性の低下は見受けられなかった。pH 6.0-8.0で1時間インキュベートした後も、100%の活性を維持していた。更に本酵素は、分子量66,000のモノマー酵素であることが明らかになった。なお、本論文中に記載した A. thiooxidans のアコニターゼ遺伝子を含む塩基配列は DDBJ データベースに登録されており、アクセシオン番号 AB 196983で検索できる。

文 献

- 1) Kennedy, M.C., M. H. Emptage, J-L. Dreyer and H. Beinert : The Role of Iron in the Activation-Inactivation of Aconitase. *J. Biol. Chem.*, **258**, 11098-11105 (1983)
- 2) Plank, D. W., M. C. Kennedy, H. Beinert and J. B. Howard : Cysteine Labeling Studies of Beef Heart Aconitase Containing a 4 Fe, a Cubane 3 Fe, or a Linear 3 Fe Cluster. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20385-20393 (1989)
- 3) Rose, I. A. and E. L. O'Connell : Mechanism of Aconitase Action. *J. Biol. Chem.*, **242**, 1870-1879 (1967)
- 4) Inoue, H., T. Tamura, N. Ehara, A. Nishito, Y. Nakayama, M. Maekawa, K. Imada, H. Tanaka, and K. Inagaki : Biochemical and molecular characterization of the NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from the chemolithotroph *Acidithiobacillus thiooxidans*. *FEMS Microbiol Lett.*, **214**, 127-132 (2002)
- 5) Bradbury, A. J., M. J. Gruer, K. E. Rudd and J. R. Guest : The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology*, **142**, 389-400 (1996)
- 6) Lauble, H., M. C. Kennedy, H. Beinert and C. D. Stout : Crystal Structures of Aconitase with Isocitrate and Nitroisocitrate Bound. *Biochemistry*, **31**, 2735-2748 (1992)
- 7) Hebson, C.P. and W. W. Cleland : Purification and kinetic studies of beef liver cytoplasmic aconitase. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3833-3838 (1967)
- 8) Kennedy, M. C., L. Mende-Mueller, G. A. Blondin and H. Beinert : Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 11730-11734 (1992)
- 9) Hebson, C.P. and W. W. Cleland : Purification and kinetic studies of beef liver cytoplasmic aconitase. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3833-3838 (1967)