

Thiosphaera pantotropha からのペリプラズム
硝酸塩還元酵素の電気化学

池田 修¹⁾・B. C. Berks²⁾・D. J. Richardson²⁾・S. J. Ferguson²⁾
N. I. Hunt²⁾・H. A. O. Hill²⁾

Electrochemistry of Periplasmic Nitrate Reductase
of *Thiosphaera Pantotropha*

O. Ikeda¹⁾, B. C. Berks²⁾, D. J. Richardson²⁾, S. J. Ferguson²⁾
N. I. Hunt²⁾, and H. A. O. Hill²⁾

(Received April 28, 1995)

Abstract

Periplasmic nitrate reductase of photosynthetic bacterium "*thiosphaera pantotropha*" is composed of two subunits: one is 16 kDa cytochrome c_{552} containing two hemes (heme 1 and heme 2), and the other is a 96 kDa polypeptide containing (4Fe-4S) cluster and a molybdopterin as the catalytic site for the reduction of nitrate ion. In the present study, it was examined the electrochemical response of this enzyme in phosphate buffer solution. As the result, it was first observed that the direct electrochemical response of the enzyme became feasible on an electrode surface with negative charges. Also, it was confirmed by the electrochemical method that electrons from electrode enter into heme 1 with higher redox potential in cytochrome c_{552} and then move to pterin in the 96 kDa polypeptide. The current based on EC catalytic regeneration mechanism was directly proportional to the concentration of nitrate as the substrate. This means that the enzyme is applicable to the amperometric sensor of nitrate ion.

Key Words : Periplasmic Nitrate Reductase · Nitrate Reduction · Nitrate Sensor

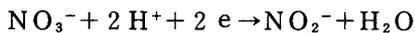
1 緒言

硝酸イオンの還元をエネルギー獲得のための電子輸送過程と結びつけている（いわゆる硝酸塩呼吸）バクテリアが数多く確認されている。そのようなバクテリアからの最もよく知られた硝酸塩還元酵素は *Paracoccus denitrificans*¹⁾ および *Escherichia coli*²⁾ に見いだ

1) 金沢大学教養部化学教室 Department of Chemistry, College of Liberal Arts, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa 920-11, Japan

2) New Chemistry Laboratory, University of Oxford, Oxford OX1 3 QT, UK

される酵素である。これらの酵素は膜透過型であるが、最近、ペリプラズム硝酸塩還元酵素が光合成細菌 *Thiosphaera pantotropha* (最近, *Paracoccus denitrificans*³⁾として再分類されている) から単離された。^{4,5)}この酵素は数多くの硝酸塩還元酵素 (NR) のなかでも特異的で、好気性条件でも、また嫌気性条件でも硝酸塩還元活性を示す。また、2つのサブユニットからなるタンパク質であることが明らかにされている。⁶⁾1つは2個のヘム中心を有する16KDaのシトクロム c_{552} であり、他の1つは(4Fe-4S)クラスターと次式の反応の触媒中心である補因子モリブドプテリンジヌクレオチドを有する96KDaのポリペプチドである。



硝酸イオンセンサーは、肥料による地下水および地表水の汚染問題と関連し、現在増加しつつある飲料水中の硝酸イオン濃度をモニターするセンサーとしてその開発が目ざされている。そこで本研究では、上記硝酸塩還元酵素内での電子伝達ルートの解明ならびに高選択性硝酸イオンセンサーへの応用を目的とし、その直接電気化学反応(メディエーターを使用せず、電極とタンパク質分子との間で直接的な電子移動を行わせる反応)について検討した。

2 実験方法

Thiosphaera pantotropha のペリプラズム硝酸塩還元酵素 (NR) はすでに報告された方法^{4,5)}により、単離精製した。精製された酵素はさらに使用直前に、ゲルクロマトグラフィー (Pharmacia, PD-10) により精製した。溶離液は遠心分離器により濃縮した後、使用する電解液(20mM リン酸バッファー+100mMKCl)で遠心処理し、電解液の交換を行った。水には逆浸透 (Millipore, RQ-4) で精製した後、さらに脱イオン処理 (Millipore, Milli-Q) したものを使用した。電解液のpH (= 5~7) は、全濃度を20mMとし、リン酸水素二カリウムとリン酸二水素カリウムの比率を変えることにより調整した。溶液中の酵素濃度はソーレー帯 408nm におけるモル吸光係数 ($\epsilon_{408} = 216 \text{ mM}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$)⁷⁾を使用して決定した。

電気化学測定はサイクリックボルタンメトリーにより行った。ポテンショスタットは市販品 (Oxford Electrode) を使用した。ボルタモグラムの記録は X-Y レコーダー (Bryans, Series 6000) により行った。作用電極には金ディスク電極 (4.2 mm ϕ)、照合電極には 3 MNaCl 中の銀/塩化銀電極 (0.203V vs. NHE)、対極には白金電極 (表面積 1 cm²) を使用した。試料溶液中の溶存酸素は高純度アルゴンガスを通気することにより除去した。金電極の表面は、研磨布上の α -アルミナ (粒子径0.3 μm) で研磨処理した。電極表面の残存アルミナは超音波浴中に電極を浸漬し除去した。

3 結果と考察

電気化学測定を行う前に、ペリプラズム硝酸塩還元酵素 (NR) の硝酸イオン還元活性を溶液中で確認する実験を行った。図1 (a) は精製された上記酵素のリン酸バッファー中での電子スペクトルを示したものである。500~600 nm にかけてのブロードな吸収(Q帯)はシトクロム c_{552} 中のヘム鉄が+3価の酸化状態にあることを示している。この溶液に少量の還元剤である亜ジチオン酸ナトリウムを加えると、図1 (b) に示すように、Q帯は2本の吸収に分かれ、ヘム鉄が+2価の還元状態に変化した。さらに、少量の基質である硝酸イオンを加えると、図1 (c) に示すように、

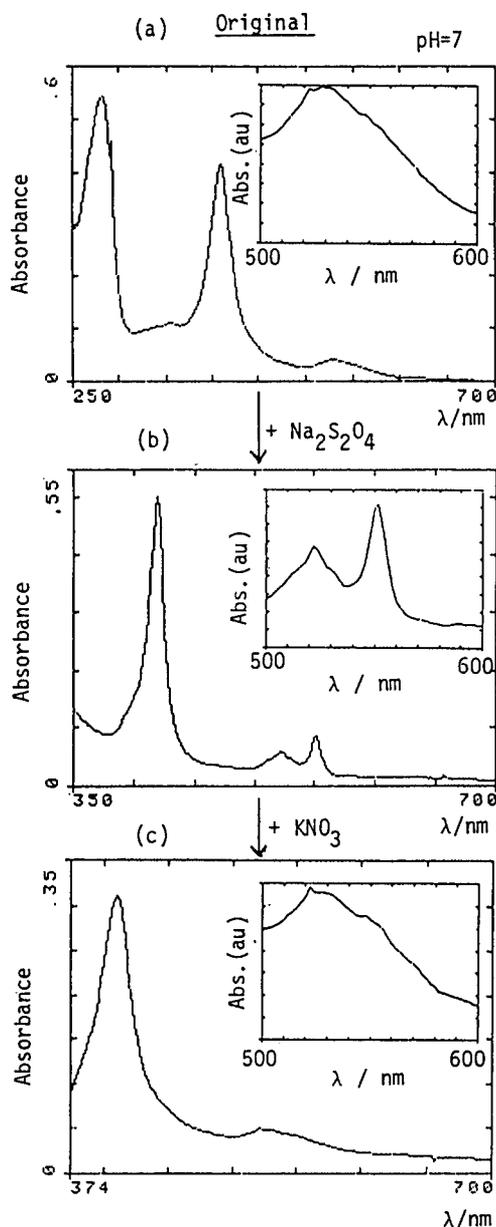


図1 還元剤および基質添加による硝酸塩還元酵素の電子スペクトルの変化 (a), オリジナル溶液 (pH=7); (b), 還元剤 (亜ジチオン酸ナトリウム) 添加溶液; (c), (b) に基質 (硝酸カリウム) を添加した溶液 (図中の小さな図は500~600nmのQ帯の吸収スペクトルを拡大したもの)

化状態にもどった。通常、硝酸イオン還元触媒サイトは96kDaサブユニットにあるモリブドプテリンと考えられることから、図1のスペクトル変化は本酵素が硝酸イオンの還元活性を有していることを示している。また、シトクロム c_{552} が電子の受容サイトであることも示唆している。

図2(a)はリン酸バッファー中での硝酸塩還元酵素のサイクリックボルタモグラム(CV)を示している。 $-0.1V$ から $-0.4V$ (vs. $Ag/AgCl$)にかけてブロードな還元電流ピークが観測された。このピークには複数のレドックス対が含まれていると考えられる。実際、電位差滴定法⁶⁾により、シトクロム c_{552} 中の2個のヘムの標準酸化還元電位がそれぞれ $-0.13V$ (ヘム1) および $-0.23V$ (ヘム2) vs. $Ag/AgCl$ と推定されていることから、観測されたブロードな還元電流ピークにはヘム1およびヘム2の二つの還元反応が含まれていることに起因すると思われる。

一方、この溶液に基質である硝酸カリウムを共存させると、図2(b)に示すように、非常に大きな還元電流が $-0.1V$ から $-0.4V$ の間で観測された。同じ酵素濃度で、硝酸イオン共存時と不在時の電流値を比較する

と、前者の電流値は後者の約400倍であった。このことは硝酸イオンの還元反応が酵素を触媒とするEC接触再生機構(EC catalytic regeneration mechanism)により進行していることを示唆している。また、基質共存下、還元電流が流れ始める電位いわゆるオンセット電位は $-0.05V$ で、

この値は酵素自身の還元オンセット電位にほぼ一致した。この結果はヘム1の

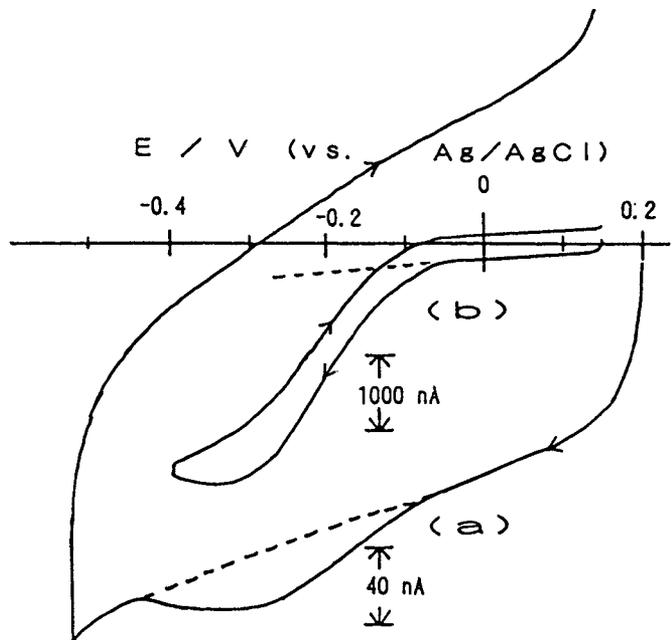


図2 リン酸バッファー中、金電極上における硝酸塩還元酵素(NR)のサイクリックボルタモグラム(CV)
(a), 基質不在時のCV(NR濃度, $33\mu M$)
(b), 基質共存時のCV(NR濃度, $7.6\mu M$; 基質(KNO_3)濃度, $1mM$)
電位走査速度, $5mVs^{-1}$

還元と同時にモリブドプテリンにおいて硝酸イオンの還元が起こることを意味している。

E C 接触再生機構を確認するため

に、 -0.3 V 付近でのピーク電流値を電位走査速度に対してプロットした。

図 3 に見られるように、ピーク電流

(I_p) は走査速度に依存せず、ほぼ一定となった。この結果はピーク電流は反応物の拡散に支配されているのではなく、

化学反応 (硝酸イオンの還元) の速度に支配されていることを意味している。⁸⁾ すなわち、図 2 (b) における

ピーク電流は、いわゆる触媒電流 (I_{cat}) であることが明らかとなった。

次に、この触媒電流の pH 依存性について検討した。その結果を図 4 に示した。溶液の pH が低い程、すなわち水

素イオン濃度が大きくなる程、触媒電流が大きくなる

ことが認められた。本来、本酵素による硝酸イオン還元反応には、水素イオンが必要であり、水素イオン濃度が高い程、反応速度は速くなると予想され、実験結果はその予想と一致している。

水溶性タンパク

質は高分子電解質

であり、水溶液中

でその分子表面は固有の荷電状態にある。電極とタンパク質との間での直接的な電子移動

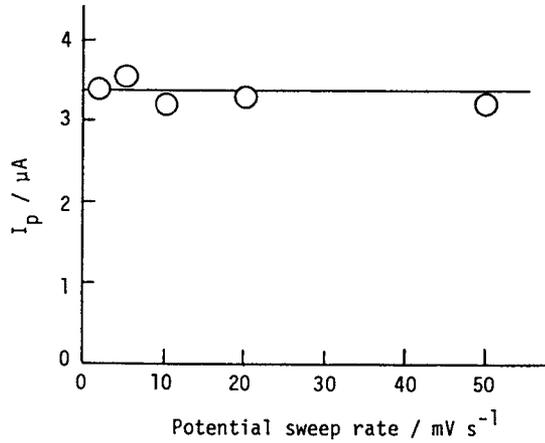


図 3 電位走査速度によるピーク電流 (I_p) の変化
NR 濃度, $1.3\mu\text{M}$; 基質濃度, 3.3mM

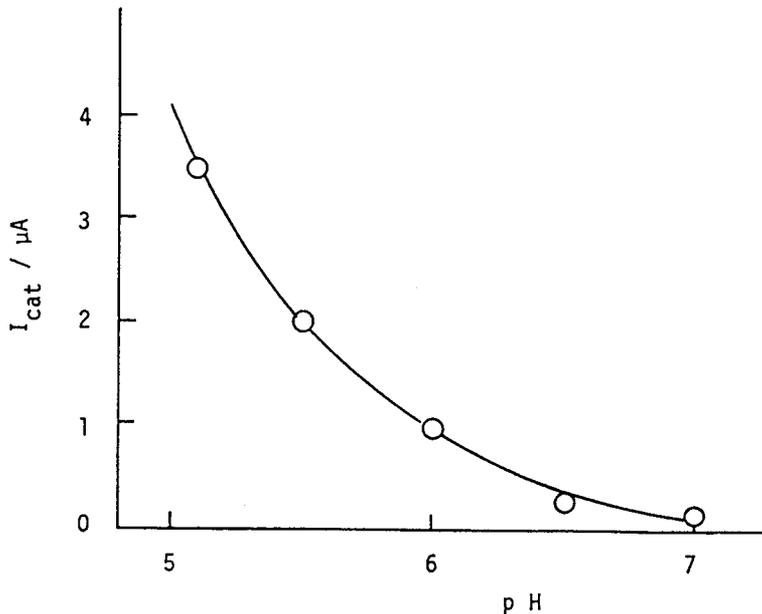


図 4 裸の金電極上での溶液 pH による触媒電流 (I_{cat}) の変化
NR 濃度, $1.3\mu\text{M}$; 基質濃度, 3mM ; 電位走査速度, 5mVs^{-1}

を工夫する場合、タンパク質における電子の受容部は広い分子表面のごく一部に限定されるので、電極上の電荷は直接電気化学にとって大変重要な要素である。例えば、ミトコンドリアのシトクロムcの場合その等電点(pI)は10.5⁹⁾で、pH=7の条件では正に荷電している。電子の受容部と考えられているヘムポケット周辺の表面積は全表面積のわずか5~6%であり、いかにしてヘムポケットの部分を実電極側に向けさせるかがシトクロムcの直接電気化学の

重要なポイント
になっている。

実際、ヘムポケット周辺には正に荷電したりシン残基が多く、電極表面を負に荷電させる工夫により、その直接電気化学が可能となった。^{10,11)}

そこで、電荷の異なる種々のジスルフィド化合物を金電極上に修飾し、その電荷が硝酸塩還元酵素の直接電気化学にどのよ

うな影響をもたらすかについて検討した。図5は基質である硝酸イオン共存下、種々のジスルフィド化合物修飾金電極上での硝酸塩還元酵素のサイクリックボルタモグラムを示している。ジスルフィド化合物としてpH=5~7の条件で、正に荷電しているシスタミン、ほぼ電氣的に中性の4,4'-ジピリジルジスルフィドおよび負に荷電しているジチオジグリコール酸を選んだ。これらのジスルフィド化合物の金電極上への修飾は、4,4'-ジピリジルジスルフィド¹²⁾ですでに報告されているのと同じように、2 mM ジスルフィド化合物水溶液に研磨した金電極を2分間浸漬することにより行った。裸の金電極の場合、そのゼロ電荷電位 (E_{pzc}) は $-0.02V$ (vs. $Ag/AgCl$)¹³⁾であるので、硝酸イオンの還元のお

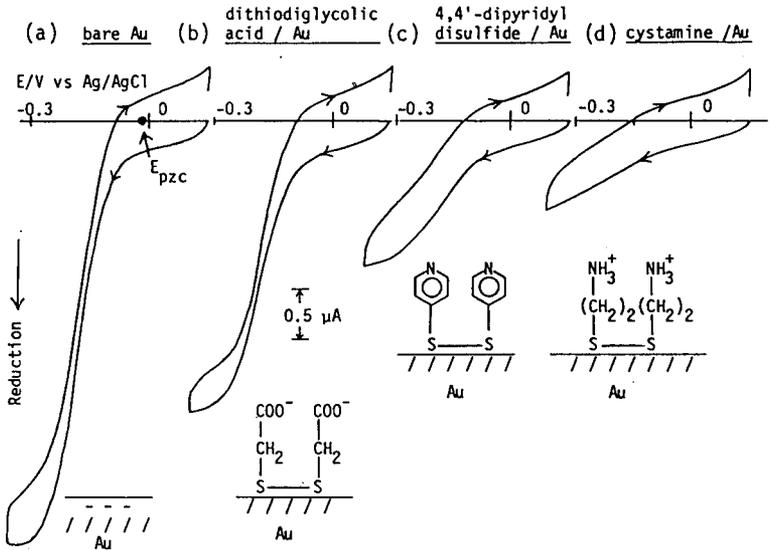


図5 基質存在下、種々の修飾金電極上における硝酸塩還元酵素 (NR) のサイクリックボルタモグラム

(a), 裸の金電極; (b), ジチオジグリコール酸修飾金電極;

(c), 4, 4'-ジピリジルジスルフィド修飾金電極; (d), シスタミン修飾金電極

NR 濃度, $1.2\mu M$; KNO_3 濃度, $3.3mM$; 電位走査速度, $5mVs^{-1}$; pH, 5.2

ンセット電位(-0.05V)より負の電位では電極表面は負に帯電している。図5の結果は負に荷電または帯電した電極表面が酵素の直接電気化学に有効であることを示している。硝酸塩還元酵素の96KDaサブユニットは、その等電点が2.7°であるので、pHが5~7の溶液中では大きく負に荷電している。それ故、触媒サイトを有する96KDaのサブユニットが正に荷電した電極表面と強

く相互作用をすると、触媒サイトへの硝酸イオンの供給が阻害されるか、または相対的に電子受容部であるシトクロム c_{552} が電極表面から離れることにより、電子移動が円滑に行われなくなったものと推定される。裸の金電極で最も大きな触媒電流が観測され

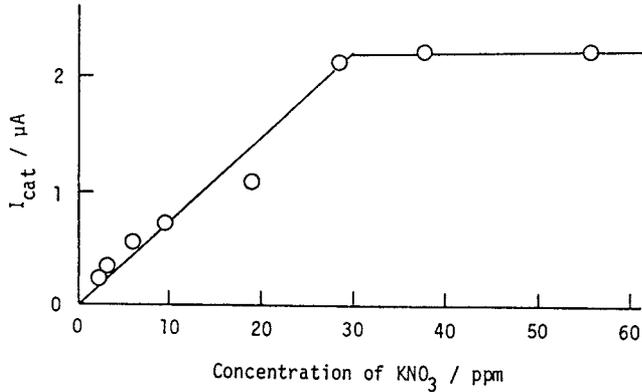


図6 裸の金電極上、触媒電流 (I_{cat}) の基質濃度依存性
NR 濃度, $7.6 \mu\text{M}$; 電位走査速度, 5 mVs^{-1}

たのは、修飾されたジチオグリコール酸が電極から酵素分子への電子移動を幾分阻害していることによると考えられる。

次に、本酵素が硝酸イオンセンサーに応用できるかどうかを検討するため、基質である硝酸イオンの濃度を変化させた時の触媒電流の変化を調べた。図6の説明の所で示した条件下では、触媒電流は30ppmの硝酸イオンの濃度まではほぼ直線的に変化し、アンペロメトリックセンサーとしての応用が可能ながことが明かとなった。

これまでの実験結果から、電極からの電子はまずシトクロム c_{552} のへムに入り、ついで96KDaのポリペプチドに移動し、最終的にモリブドプテリンサイトで硝酸イオンに渡されることが確認された。しかしながら、シトクロム c_{552} 中の2個のへムのうち、硝酸イオンの還元には有効なのは、図2から明らかのようにへム1のみである。硝酸イオンの還元反応は2電子過程であり、へム1のみの1電子還元で硝酸イオンの還元が起こるとは考えにくい。酵素は硝酸イオンに電子が到達するまでに、複数の電子を貯蔵するサイトを用意していると考えるのは自然である。そのような電子貯蔵サイトとして、96KDaサブユニット中に見いだされた(4Fe-4S)クラスターの可能性がある。しかしながら、種々の酵素で見いだされる(4Fe-4S)クラスターの標準酸化還元電位、 E^0 の多くは約-0.3Vvs. NHEで、へム1の値($E^0=0.085\text{Vvs. NHE}$)より低く、電子貯蔵サイトにはなり得ない。実際、本酵素の(4Fe-4S)^{2+/1+}の標準酸化還元電位は-0.16Vvs. NHE¹⁴⁾で、1電子貯蔵能力しかなく、またへム1からの電子を受け取る能力もなく、このクラスターは酵素分子

内での電子伝達経路に関与していない。 $\text{Mo}^{6+/5+}$ と $\text{Mo}^{5+/4+}$ の電位の異なる2つのレドックスによる2電子還元過程の可能性も低いと考えられる。一方、プテリンは同じ電位での2電子の酸化・還元が可能であり、(2電子+2水素イオン)をその還元体として貯蔵できる。プテリンに貯蔵された2電子はモリブデンイオンに配位した硝酸イオンに直接またはモリブデンイオンを経由して、供給されるものと思われる。

この研究は著者の一人(O. I)が文部省在外研究員として1993年3月から同年11月まで英国オックスフォード大学新化学研究所において行った仕事の一部をまとめたものである。在外研究を快く引き受けて頂いた Hill教授ならびに共同研究者の方々に深く感謝いたします。また、実験結果を議論して頂いた Armstrong 講師, 研究を進める上で種々のアドバイスを頂いた Kazlauskaitė 博士, Wong 博士, Gleria 博士, Safronov 博士, 大学院生 Jacob 君 ならびに Oliveira 君に感謝いたします。

文 献

- 1) A. Craske and S. J. Ferguson, *Eur. J. Biochem.*, 158 (1986) 429.
- 2) V. Blewail, *Microbiol. Rev.*, 52 (1988) 190.
- 3) L. A. Robertson and J. G. Knuenen, *Arch. Microbiol.*, 139 (1984) 351.
- 4) L. C. Bell, D. J. Richardson, and S. J. Ferguson, *FEBS Lett.*, 265(1990) 85.
- 5) W. Ludwig, G. Mittenhuber, and C. G. Friedrich, *Int. J. Synth. Bact.*, 43 (1993) 363.
- 6) B. C. Berks, D. J. Richardson, C. Robinson, A. Reilly, R. T. Aplin, and S. J. Ferguson, *Eur. J. Biochem.*, 220 (1993) 117.
- 7) L. C. Bell, M. D. Page, B. C. Berks, D. J. Richardson, and S. J. Ferguson, *J. Gen. Microbiol.*, 139 (1993) 3205.
- 8) R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 706.
- 9) G. H. Barlow and E. Margoliash, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 1473.
- 10) P. M. Allen, H. A. O. Hill, and N. J. Walton, *J. Electroanal. Chem.*, 178 (1984) 69.
- 11) O. Ikeda, Y. Shirota, and T. Sakurai, *J. Electroanal. Chem.*, 287(1990) 179.
- 12) I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, and K. Yasukouchi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1982) 1032.
- 13) J. Clavilier and Nguyen van Huong, *C. R. Acad. Sci., Ser. C*, 269(1968) 5133.
- 14) J. Breton, B. C. Berks, A. Reilly, A. J. Thomson, S. J. Ferguson, and D. J. Richardson, *FEBS Lett.*, 345 (1994) 76.