糸状菌 *Fusarium oxysporum* のチトクロムP450nor遺伝子に関する研究

1995

戸村大助

①

糸状菌*Fusarium oxysporum*のチトクロムP450nor遺伝子に関する研究

筑波大学大学院

農学研究科

応用生物化学専攻

戸村大助

目次　　頁

略語　1

緒言　2

第１章　*Fusarium oxysporum* のチトクロムP450norの発現解析　6

１－１　材料及び方法　6

１－１－１　*F. oxysporum* の培養　6

１－１－２　*F. oxysporum* からのRNAの調製　7

１－１－３　ノーザン法　8

１－２　結果　10

１－２－１　亜硝酸塩による誘導　10

１－２－２　硝酸塩による誘導　10

１－２－３　一酸化窒素による誘導　11

１－３　考察　12

第２章　*F. oxysporum* のチトクロムP450norゲノムDNAの構造解析　17

２－１　材料及び方法　17

２－１－１　*F. oxysporum* の培養　17

２－１－２　*F. oxysporum* からのDNAの調製　17

２－１－３　サザン法　18

２－１－４　*F. oxysporum* ゲノムDNAミニライブラリーの作製　19

２－１－５　チトクロムP450norのゲノムDNAのスクリーニング　19

２－１－６　サブクローニング　20

２－１－７　DNA塩基配列の決定　20

２－１－８　プライマー伸長法　20

2－2　結果　22
2－2－1　P450norゲノムDNAクローンの単離　22
2－2－2　P450nor ゲノムDNAの構造　23
2－3　考察　25
第3章　チトクロムP450norの大腸菌における発現　32
3－1　材料及び方法　32
3－1－1　菌株　32
3－1－2　発現プラスミドの構築　32
3－1－3　P450nor の発現　33
3－1－4　大腸菌菌体の破砕　34
3－1－5　タンパク質量の測定　34
3－1－6　SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動　35
3－1－7　ウエスタンブロット法　35
3－1－8　一酸化窒素還元（Nor）活性の測定　36
3－2　結果　38
3－2－1　pKK233-2を用いた大腸菌における発現　38
3－2－2　発現系の改良　38
3－3　考察　40
第4章　チトクロムP450norの酵母における発現　45
4－1　材料及び方法　45
4－1－1　菌株　45
4－1－2　培地組成　45
4－1－3　発現プラスミドの構築　45
4－1－4　酵母の形質転換　46

４－１－５　形質転換体の培養　47
４－１－６　酵母菌体の破砕　47
４－１－７　一酸化窒素還元活性の測定およびタンパク質量の測定　48
４－１－８　P450量の測定　48
４－１－９　ウエスタンブロット法　48
４－１－１０　組換えP450norタンパクの精製　48
４－１－１１　T243A変異体の作製　49
４－２　結果　51
４－２－１　pG-3を用いた酵母における発現　51
４－２－２　pYES2を用いた酵母における発現　51
４－２－３　組換えP450norタンパクの精製及び解析　51
４－２－４　T243A変異体の解析　52
４－３　考察　53
総合考察　64
概要　67
謝辞　71
参考文献　72

略語

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

GTC : guanidium (iso)thiocyanate

ORF : open reading frame

P450 : cytochrome P450

PCR : polymerase chain reaction

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride

RNase : ribonuclease

SDS : sodium dodecyl sulfate

SD : synthetic minimal

TE : Tris/EDTA

TAE : Tris/acetate/EDTA

TPCK : N-tosyl-L-phenylalanyl chloro-methyl ketone

YEPD : yeast extract/peptone/dextrose

YEPG : yeast extract/peptone/galactose

緒言

生物が細胞中に有機物または無機物を取り込み、酸化的に分解してエネルギーを得る過程を広義の呼吸というが、最終電子受容体が分子状酸素以外の物質である場合を嫌気呼吸という。この中で、硝酸塩（NO_3^-）をはじめとする一連の酸化窒素を最終電子受容体として利用するのが硝酸呼吸である。硝酸呼吸には、NO_3^-や亜硝酸塩（NO_2^-）を二原子窒素（N_2）あるいは亜酸化窒素（N_2O）に還元し、ガスとして大気中に放出するタイプと、NO_3^-を、NO_2^-を経てアンモニアに還元するタイプが知られている。前者は、脱窒と呼ばれており、窒素分子をNH_4^+に還元する窒素固定とともに地上の窒素循環に重要な役割を果たしている。脱窒を行う微生物は土壌、海洋など自然界に広く生息し、地球上で脱窒を受ける全窒素量は全窒素固定量と同程度と推定される。従って脱窒は地球環境の恒常性維持に重要な過程であり、近代の人間活動の著しい増大に伴う窒素化合物による、富栄養化、酸性雨などの環境汚染問題への対策手段としても注目されている。脱窒を含め、嫌気呼吸は進化的に酸素呼吸よりも先に出現したという説があり、支持も多いが、脱窒がこれまで原核生物にしか見られなかった事実はこの説の根拠の一つともなっていた[1)]。しかし近年、本研究室において、真核微生物である不完全菌（かびの一種）*Fusarium oxysporum* に強い脱窒活性の存在することが見出だされた[2)]。*F. oxysporum* の脱窒系は$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O$の3段階からなり、$N_2$は生成されない。本脱窒系は全体として菌の増殖に貢献しており、従って、嫌気呼吸としての生理的意義をもつことが強く示唆されている[3)]。

F. oxysporum のチトクロムP450（以下P450）は以前にリポキシゲナーゼ

活性を指標に単離されたが[4]、その生理的機能は長い間不明であった。しかし、このP450が硝酸塩または亜硝酸塩で特異的に誘導されることが発見され[5]、それをきっかけに上記脱窒活性も見い出された。また硝酸塩または亜硝酸塩による誘導が通気を上げることにより抑制されることが、タンパクのレベルで明らかにされた[5]。従って本P450は、このカビの脱窒過程（嫌気的過程）に関与し、その機能は通常の一原子酸素添加酵素（モノオキシゲナーゼ）とは異なる特異なものであることが予測された[2, 5]。現在では、このP450が本脱窒系の最終段階である一酸化窒素（NO）から亜酸化窒素（N_2O）への還元反応を触媒する酵素、すなわち一酸化窒素還元酵素（Nitric Oxide Reductase : Nor）であることが明らかとなっており、P450norという通称名が与えられている[6]。

チトクロムP450は、哺乳類から細菌にいたる数多くの生物種に見出だされる一群のヘムタンパク質の総称で、その還元型は一酸化炭素と結合して450nm付近にソーレー吸収帯を示す。P450は通常、一原子酸素添加酵素（モノオキシゲナーゼ）として機能しており、解毒やステロイドホルモンの生合成、その他の多くの生体反応に関与している。P450の関与する典型的な反応を下に示す。

$$RH + NAD(P)H + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + NAD(P)^+ + H_2O$$

NAD（P）HからP450への電子伝達は通常、P450還元酵素、またはフェレドキシン還元酵素とフェレドキシンを経由しておこなわれる。これまでに400種以上のP450の一次構造がcDNAあるいは遺伝子クローニングによって決定されており、それらの比較から、P450は共通構造の保存と著しい機能分化という相反する性質を持っていることが明らかとなっている。従ってこれらは一つの祖先型遺伝子が分岐進化して著しい機能分化とそれに伴う分子多様

性を獲得したものとされ、P450スーパーファミリーを形成している[7]。P450norのcDNAもすでにクローニングされており[7]ファミリー番号として55番が与えられた[7,8]。従ってP450norの分類名はP450 55A1であり、その遺伝子は*CYP 55a1*である。cDNAの解析から、そのアミノ酸一次配列は真核生物のP450より細菌、特に放線菌のP450により高い相同性を示し、真核生物のP450としてこれまで唯一、細菌のP450のグループに系統分類されている[9]。P450norは下記の反応を単独で触媒する。

$$2NO + NADH + H^+ \rightarrow N_2O + NAD^+ + H_2O$$

一酸化窒素は酸素分子のアナログでラジカルであり、モノオキシゲナーゼであるP450の強力な阻害剤として知られている。従って一酸化窒素を還元するというP450norの機能はP450として画期的なものである。通常のP450反応は、電子供与体としてNADHあるいはNADPHを必要とするが、P450は一分子のヘムのみをもつ一電子酸化還元体であるため、2電子を同時に転移するNAD(P)Hからの電子伝達には、フラビン等の、一電子還元（セミキノン）型が安定に存在しうる媒体の仲介が必須である。細菌 *Bacillus megaterium* のP450BM-3のように、フラビンタンパクとP450の融合酵素であるがために電子伝達に他の成分を必要としない場合も知られているが[9]、P450norのように一分子のプロトヘムのみを持つものでNADHから直接電子を受け取る例はこれまで皆無であり、その電子伝達様式の解明に興味が持たれる。

本研究では、このP450norについて遺伝子の面から解析を行った。遺伝子レベルでの発現解析、ゲノムDNAのクローニングおよび構造解析を行った。またP450norの構造と機能の相関を明らかにするためには、部位特異的変異体の作製など、タンパク工学的解析を行う必要がある。そのために、大腸菌及び酵母におけるP450norのcDNAの発現系の構築を行った。そして構築に成

功した酵母における大量発現系からは、組換え体P450norタンパクを精製し、その性質を調べた。更にこの発現系を用いて、部位指定変異体（T243A変異体）を発現させ、その性質を調べた。

第１章　*Fusarium oxysporum* のチトクロムP450norの発現解析

１－１　材料及び方法

１－１－１　*Fusarium oxysporum* の培養

ａ．菌株　*Fusarium oxysporum* MT-811

土壌から単離、同定され、最初に脱窒活性が見出された株[2)]を使用した。

ｂ．培地組成

以下の組成を水道水に溶解し、ＫＯＨでｐＨ７．５に調製した培地を用いた。

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	０．０２％
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	２ｐｐｍ
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	２ｐｐｍ
$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	０．０２％
KH_2PO_4	０．０１Ｍ
Ｐｏｌｙｐｅｐｔｏｎ（日本製薬）	０．２％
Ｇｌｙｃｅｒｏｌ	３％（Ｖ／Ｖ）

ｃ．培養方法

大型試験管に培地を10 ml入れ、スラントより一白金耳植菌し、25 ℃で３日間振盪培養することにより種培養を行った。

前培養は、500 ml三角フラスコ中、培地350 mlに種培養液を5 ml植菌し、ロータリーシェーカー（150 rpm）を用いて30 ℃で３日間行った。

硝酸塩、亜硝酸塩によるP450norの誘導を、高通気条件、低通気条件及び

嫌気条件で調べるための本培養は、以下に示す方法で行った。

高通気条件(aerobic)での培養は、500 ml三角フラスコ中、硝酸塩($NaNO_3$)又は亜硝酸塩として($NaNO_2$)を終濃度 20 mMとなるように加えた培地 96 mlに、上記前培養液（硝酸塩、亜硝酸塩無添加）16 mlを植菌して、ロータリーシェーカー（220 rpm）を用いて6～48時間、30 ℃で行った。

低通気条件(semiaerobic)での培養は、500 ml三角フラスコ中、$NaNO_3$又は$NaNO_2$を終濃度20 mMとなるように加えた培地300 mlに、前培養液を50 ml植菌し30 ℃、150 rpmで6～48時間行った。

嫌気条件(anaerobic)での培養は、500 ml枝付き三角フラスコ中、$NaNO_3$又は$NaNO_2$を終濃度20 mMとなるように加えた培地150 mlに、前培養液を25 ml植菌しブチルゴム栓で密閉し、気相をアルゴンガスで置換後、30 ℃、150 rpmで1～48時間行った。菌体はブフナー漏斗を用いて吸引濾過して回収した。回収した菌体は－80 ℃で保存した。

一酸化窒素による誘導を調べるための本培養は以下のように行った。
500 ml枝付き三角フラスコ中、培地150 mlに前培養液を25 ml植菌しブチルゴム栓で密閉し、気相をアルゴンガスで置換後、25 mlの一酸化窒素ガスをシリンジを用いて注入し、30 ℃、150 rpmで1～12 時間培養を行った。培地中の一酸化窒素は0.1 mMである。

1－1－2　*F. oxysporum* からのRNAの調製

トータルRNAの調製は、Hanらの方法[10]とCathalaらの方法[11]を組み合わせ一部改変した木沢らの方法[8]に従い、以下の様に行った。操作は極力0～4 ℃で行い、RNaseを失活させるために、使用器具、試薬等は可能な限りdiethylpyrocarbonate処理して、121 ℃、20 分加圧滅菌するか、180 ℃で一晩

乾熱滅菌したものを用いた。

乳鉢に、湿重量0.1 ～0.5 gの凍結菌体とその倍量の酸化アルミニウムをいれ、50 ～250 μlのRNA抽出バッファー（4 M guanidinium isothiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.1 M 2-mercaptoethanol, 0.5 % sodium laurylsarcosine）を加えて乳鉢で破砕した後、RNA抽出バッファーをさらに1～5 ml加えた。次に、染色体DNAの物理的剪断を目的として18 Gの注射針に3回通した後、0.3～1.5 mlの冷エタノールを加え、10,000 ×gで5分間遠心した。遠心後の沈殿にRNA抽出バッファーを4 ml加え、18 Gの注射針に2回通し、10,000×gで5分間遠心した。遠心後の上清に 4 M LiClを4 ml加えて4 ℃で18時間放置した。その後、12,000×gで1時間遠心し、得られた沈殿に 0.5 mlのRNA溶解バッファー（10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 1 % (W/V) SDS）を加えてボルテックスで攪拌し、－80℃に5分放置して凍結させ、これを37 ℃で急速に融解することにより、沈殿を完全に溶解した。得られた溶液を1.5 mlのマイクロチューブに移し、等量のフェノール／クロロホルム（1：1, V/V）を加えて混和し、10,000 ×gで5分間遠心し水層を回収した。この操作をもう一度行った後、0.1容量の3 M 酢酸ナトリウム溶液（pH 5.2）と2容量の冷エタノールを加え、－80 ℃に2時間放置した。これを12,000 ×gで10分間遠心し、得られた沈殿を70 % エタノールで洗浄後、乾燥し、20 μlの滅菌水に溶解した。RNA量は260 nmの吸光度より算出した（1 O.D.= 40 μg/ml）。

1－1－3　ノーザン法

10 μgのトータルRNAを、1 M glyoxal, 50 % dimethyl sulfoxideで50 ℃、1時間処理して変性させた後、1.2 %アガロースゲルで、TAEバッファー

（0.012 M Tris-acetate, 0.3 mM EDTA, pH 7.0）を用いて電気泳動した。泳動後、ethidium bromideで染色し、18S、25S rRNAの量が等しいことを確認した。染色したゲルと別に泳動したものをナイロン膜 GeneScreen Plus (Du Pont/New England Nuclear 社）に転写し、サンプル膜とした。プラスミドpfp450-20[8] 上のP450norのcDNAを、制限酵素*Eco* RIと*Bam* HIで切断して得られる5'側 337 bpの断片を、[α-^{32}P] dCTP (>3,000 Ci/mmol) (Amersham 社)を用いてランダムプライマー法[12, 13] により標識したものをプローブに用いた。ハイブリダイゼーション緩衝液（1 % SDS, 1 M NaCl, 10 % (W/V) dextran sulfate）中にサンプル膜と、200 μg/ml のサケ精子DNA、及び1.1×10^6 cpm/ml のプローブを加え、60 ℃で18時間保温した。その後、サンプル膜を 2×SCC 溶液（1×SCC : 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0）で室温、5分間、2回洗浄し、次に2×SCC , 1 % SDS 溶液で60 ℃、30分間、2回、そして0.1×SCC で室温で15分間、2回洗浄した。サンプル膜を風乾後、−80 ℃でオートラジオグラフィーを行った。

1－2　結果

1－2－1　亜硝酸塩による誘導

まず、脱窒系において、P450norの前段階の亜硝酸塩還元酵素の基質である亜硝酸塩による誘導を調べた。亜硝酸塩として、$NaNO_2$を20 mM含む培地で、高通気条件および低通気条件下で0, 6, 12, 24, 48 時間、また嫌気条件下で0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間培養した菌体よりトータルRNAを抽出した。10 μgのトータルRNAに対して、P450norのcDNAをプローブに用いてノーザン解析を行った（Fig. 1 -1）。高通気条件では12時間後にわずかにバンドが検出された。低通気条件下では明瞭なバンドが6時間後には検出され、24～48時間後に最大量に達していた。嫌気条件下での誘導は低通気条件下より早く、1時間後には検出され、その蓄積量は12時間後には最大量に達し、その後は減少し48時間後にはかなり少なくなっていた。最大量に達したときの発現量は低通気条件下より多かった。高通気条件、低通気条件、嫌気条件、いずれの場合も$NaNO_2$を含まない培地で培養した場合はバンドは検出されなかった。

1－2－2　硝酸塩による誘導

次に、脱窒の出発物質である硝酸塩による誘導を調べた。硝酸塩として$NaNO_3$を20 mM含む培地で、高通気条件および低通気条件下で0, 6, 12, 24, 48時間、また嫌気条件下で0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間培養した菌体よりトータルRNAを抽出した。10 μgのトータルRNAに対して、P450norのcDNAをプローブに用いてノーザン解析を行った（Fig.1- 2）。

高通気条件では亜硝酸塩の場合と同様、わずかな量のmRNAが12～24時間後にみられた。低通気条件下では亜硝酸塩の場合と同様にmRNAは6時間後には検出され、24～48時間後に最大量に達しており、発現量も亜硝酸塩の場

合とほぼ等しかった。一方、嫌気条件下では、亜硝酸塩の場合と同様に1時間後には検出されたが、その後は亜硝酸塩の場合よりやや低いレベルの発現が48時間後まで続いていた。高通気条件、低通気条件、嫌気条件、いずれの場合も$NaNO_3$を含まない培地で培養した場合はバンドはやはりみられなかった。

1－2－3　一酸化窒素による誘導

P450norの基質である一酸化窒素による誘導を調べた。培地中の濃度が0.1 mMとなるように一酸化窒素を加え、嫌気条件下で、0, 1, 3, 6, 12時間培養した菌体よりトータルRNAを抽出した。10 μgのトータルRNAに対して、P450norのcDNAをプローブに用いてノーザン解析を行った（Fig.1-3）。培養開始後、1時間で弱いながら明瞭なバンドが検出されたが、3時間後にはほとんど見られなくなり、6時間後には完全に消失した。

1－3　考察

今回のノーザン解析の結果から、硝酸塩、亜硝酸塩による誘導が転写レベルで行われていることが明らかとなった。また、高通気条件では誘導がわずかしか見られず、低通気条件、嫌気条件に条件をかえると誘導が見られるようになることから、硝酸塩、亜硝酸塩によるP450nor mRNAの誘導は、酸素分圧の高い状態では抑制され、酸素不足の状態で促進されるものと考えられた。低通気条件では、P450nor mRNAは硝酸塩、亜硝酸塩の場合とも6時間後には検出され、24～48時間後に最大量に達している。P450norタンパクはこの条件下で15～20時間で検出されており[3)]、タンパク合成に要する時間を考えるとmRNA出現とタンパク合成に要する時間差は妥当なものと考えられる。低通気条件下、及び嫌気条件下でP450norのmRNAの誘導時間は、硝酸塩と亜硝酸塩の場合で違いが見られなかった。また同条件下で、mRNAの誘導は脱窒活性が誘導されるより早く[2)]、嫌気条件下では、1時間後には検出されている。従って、硝酸塩、亜硝酸塩が代謝され、産生した一酸化窒素が誘導基質となるのではなく、硝酸塩、亜硝酸塩自身が誘導基質となっていると結論される。

P450norの直接の基質である一酸化窒素によっても1時間後にはバンドが検出された。しかし、その後バンドの強さは減少し、6時間後には完全に消失した。一酸化窒素は細胞毒性が強く、菌体がその影響をうけ、mRNAの合成が阻害されているいる可能性が高い。また一酸化窒素は不安定で、酸素と容易に反応して硝酸イオン、亜硝酸イオンになる。今回の実験においても微量の残存酸素と一酸化窒素が反応して生じた硝酸イオン、亜硝酸イオンにより誘導された可能性も考えられるが、誘導がかかるほど大量の硝酸イオン、亜硝酸イオンが生成しているとは考えにくい。自然条件下では、遊離の一酸

化窒素が大量に存在することは考えられないので、一酸化窒素によりP450norが誘導されることはないと思われるが、今回の実験結果からは、一酸化窒素もP450norの誘導基質となり得るものと考えることができる。

嫌気条件下で、亜硝酸塩の場合ではP450norのmRNAが12時間後には最大量に達し、その後は減少しているのに対して、硝酸塩の場合では48時間後までmRNAが継続して見られた。この場合も、亜硝酸塩が硝酸塩より高い細胞毒性を持っていることが原因であろう。

硝酸塩、亜硝酸塩ともに低通気条件下では、嫌気条件下と比べ誘導がかかるのが遅れる。この場合、菌の生育に伴い、細胞当りの酸素供給量が減少すると、脱窒系が酸素呼吸を補うかたちで誘導され、P450norのmRNAも誘導されるものと考えられた。なお硝酸塩、亜硝酸塩どちらの場合においても培地に窒素源としてPolypeptonを加えているので、硝酸同化系による硝酸塩、亜硝酸塩の消費はないと考えられる。

以上の結果からP450norの遺伝子が転写レベルで硝酸塩、亜硝酸塩の有無と酸素分圧という２つの要因で制御されていることが明らかとなった。

Fig. 1-1 Induction of cytochrome P450nor mRNA by nitrite.

Total RNAs were prepared from mycelia incubated for the indicated time (h) with 20 mM sodium nitrite, or without nitrite (N), under aerobic, semiaerobic, or anaerobic conditions. Denatured RNAs, each 10μg, were electrophoresed and hybridized.

Fig. 1-2 Induction of cytochrome P450nor mRNA by nitrate.

The procedure was the same as in Fig. 1-1 except that the growth medium contained 20 mM sodium nitrate instead of sodium nitrite. For comparison, induction by nitrite (NO_2^- , 12h, anaerobic) is shown on the same gel.

Fig. 1-3 Induction of cytochrome P450nor mRNA by nitric oxide.

The procedure was the same as in Fig. 1-1 except that the growth medium did not contain sodium nitrite. NO gas was injected by the amount so as to give the dissolved NO concentration of 0.1mM after equilibrium.

第２章　*Fusarium oxysporum* のチトクロムP450norゲノムDNAの構造解析

２－１　材料及び方法

２－１－１　*Fusarium oxysporum* の培養

ａ．菌株　*Fusarium oxysporum* MT-811

ｂ．培地組成

第１章で述べたものと同じ。

ｃ．培養方法

大型試験管に培地を10 ml入れ、スラントより一白金耳植菌し、25 ℃で３日間振盪培養することにより種培養を行った。

本培養は、500 ml三角フラスコ中、培地 350 mlに種培養液を５ml植菌し、ロータリーシェーカー（150 rpm）を用いて30 ℃で３日間行った。培養後、ブフナー漏斗で吸引濾過し、三角フラスコ１本あたり、約７gの菌体（湿重量）を得た。

２－１－２　*F. oxysporum* からのDNAの調製

Specht らの方法[14]を、一部改変し以下のようにして行った。

３gの凍結乾燥菌体を乳鉢中、乳棒を用いてパウダー状になるまで破砕した後、２％ SDSを含んだDNA抽出バッファー（50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 100 mM EDTA）100 mlと10 mlのトルエンを加えた。これを室温で40時間緩やかに攪拌した後、終濃度0.5 Mになるように$NaClO_4$を加えた。

次に、等量のフェノール／クロロホルム（1：1, V/V）を加え30分緩やかに攪拌した後、3,000 rpm、15分遠心し、水層を回収した。この操作をもう一度行った後、二倍量のエタノールを加えた。3,000 rpm、15分遠心後の沈殿に10 mlのDNA抽出バッファーを加えて溶解後、RNase Aを150 μg/mlとなるように加えて混和し37 ℃で２時間反応させてRNAを分解させた。次に、Proteinase Kを 100 μg/mlとなるように加えて混和し37℃で２時間反応させた後、フェノール／クロロホルム抽出を行い、水層を集めてTEバッファー（10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA）に対して一晩透析し、ゲノムDNA溶液とした。DNA量は260nmの吸光度より算出した（1 O.D.= 50 μg/ml）。

２－１－３　サザン法[15)]

F. oxysporum のゲノムDNA約20 μgを制限酵素*Eco* RI, *Bam* HI, *Bgl* IIでそれぞれ消化後、0.7 %アガロースゲルで電気泳動（TAEバッファー (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA pH 7.8) 中、100 V, 30分）を行ったのちナイロン膜 GeneScreen Plus に転写した。P450norのcDNAを、制限酵素*Eco* RIと*Bam* HIで切断して得られる5' 側337 bpの断片、制限酵素と*Bam* HIと*Rsa* Iで切断して得られる中央部613 bpの断片、制限酵素*Rsa* Iと*Eco* RIで切断して得られる3' 側425 bpの断片、の３つの断片をプローブに用いた。各断片をランダムプライマー法により[α-^{32}P] dCTP (>3,000 Ci/mmol)で標識し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーション緩衝液中にサンプル膜と、200 μg/ml のサケ精子DNA、及び 2.5×10^5 cpm/ml のプローブを加え、65 ℃で16時間保温した。その後、サンプル膜を 2×SCC 溶液で室温、５分間、２回洗浄し、次に2×SCC，1 % SDS 溶液で65℃、30分間、２回、そして0.1×SCC で室温で15分間、２回洗浄した。サンプル膜を風乾後、－80 ℃

でオートラジオグラフィーを行った。

クローン化したDNAがP450nor遺伝子を含むことの確認は、クローンとゲノムの制限酵素切断パターンをサザン法により比較することで行った。*F. oxysporum* のゲノムDNA約20 μgとクローンpGFP450-1 約 300 ngを制限酵素*Eco* RI、*Eco* RIと*Pst* I、*Bam* HIそれぞれで消化し、0.6 %アガロースゲルで電気泳動しナイロン膜に転写後、前述のP450norのcDNAの5' 側337 bpの断片を標識したものをもちいてハイブリダイゼーションを行った。

2－1－4　*F. oxysporum* ゲノムDNAミニライブラリーの作製

F. oxysporum のゲノムDNA約20 μgを制限酵素*Eco* RIで消化後、0.6 %アガロースゲルで電気泳動を行った。そしてEASYTRAP（宝酒造）を用いて約6～10 kbの断片をアガロースゲルより回収し、これをλZAPIIファージベクター（Stratagene 社）の*Eco* RIアームとライゲーションし、Gigapack Gold (Stratagene 社）を用いて*in vitro* パッケージングした。

2－1－5　チトクロムP450norのゲノムDNAのスクリーニング

パッケージングしたファージ液を、宿主である大腸菌*Escherichia coli* XL1-Blue 株に感染させプラークを形成させた後、ナイロン膜 GeneScreen Plus に転写し、プラークハイブリダイゼーション[16]を行った。P450norのcDNAの5' 側 *Eco* RI－*Bam* HI断片（337 bp）を[α-^{32}P] dCTP (>3,000 Ci/mmol) を用いてランダムプライマー法により標識したものをプローブに用いた。ハイブリダイゼーション緩衝液中にサンプル膜と、200 μg/ml のサケ精子DNA、及び1.1×10^6 cpm/ml のプローブを加え、65 ℃で16時間保温した。その後、サンプル膜を 2×SCC 溶液で室温、5分間、2回洗浄し、次に2×

SCC，1％SDS 溶液で65℃、30分間、2回、そして0.1×SCC で室温で15分間、2回洗浄した。サンプル膜を風乾後、−80℃でオートラジオグラフィーを行った。

2－1－6　サブクローニング

単離したクローンのファージDNAをSambrookらの方法[16]に従って調製し、*Eco* RIで切り出されるゲノムDNA断片をプラスミドpUC19の*Eco* RIサイトにサブクローニングした。プラスミドの調製は、Sambrookらの方法[16]に準じて行った。

2－1－7　DNA塩基配列の決定

P450norのゲノムDNA断片を含むアルカリ変性後のプラスミドを鋳型とし、Sequenase Ver.2.0 (United States Biochemical 社) を用いて、塩基配列をdideoxy法[17]により決定した。[α-^{32}P] dCTP (>3,000 Ci/mmol) はAmersham 社より購入したものを用いた。P450norのゲノムDNAの全塩基配列の決定は、Kilo-Sequence Deletion Kit（宝酒造）を用いてデレーションミュータントを作製することにより行った。

2－1－8　プライマー伸長法

嫌気条件下、亜硝酸塩存在下で6時間培養した菌体より、1章で述べた方法によりトータルRNAを抽出し、これよりAvivとLederの方法[18]に従い、オリゴ（dT）セルロースカラム（Collaborative Research Incorporated 社）を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりpoly (A)$^+$ RNAを調製した。

プライマー伸長法の操作は、Bodner とKarin の方法[19]に従い以下のよう

にして行った。P450norのORFの5'末端17bpに相補的な17merのオリゴヌクレオチド（5' -GGTGCGCCAGATGCCAT- 3'）を合成した後、T4 polynucleotide kinsae（宝酒造）を用いて5'末端を [γ-^{32}P] dATP (3,000 Ci/mmol) (Amersham 社)で標識したものをプライマーに用いた。5.0×10^{5} cpmのプライマー (20 fmol) と5 μgのpoly (A)$^{+}$ ＲＮＡを混合してハイブリッドを形成させ、逆転写酵素RAV-2（宝酒造）を用いて伸長反応を行った。反応産物を 7 M尿素を含んだ6 %ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。このとき、同じプライマーを用いてdideoxy 法のシークエンス反応を、P450norゲノムDNAの5'上流域からORFの一部を含んだ断片に対し行ったものを同時に電気泳動した。泳動後、ゲルドライヤーを用いてゲルを乾燥し、室温でオートラジオグラフィーを行った。そして、プライマー伸長反応産物のバンドの位置をdideoxy 法のバンドと比較することにより、転写開始地点を同定した。

2－2　結果

2－2－1　P450norゲノムDNAクローンの単離

F. oxysporum のゲノムDNAを制限酵素*Eco* RI, *Bam* HI, *Bgl* IIでそれぞれ消化後、cDNAの前部、中央部、後部の3つのプローブを用いて、サザン解析を行った（Fig. 2-1）。*Bam* HI, *Bgl* IIで消化したものでは3つのプローブで異なった位置にバンドが見られたり、複数のバンドが見られたのに対し、*Eco* RIで消化したものではすべてのプローブの場合で約9 kbのバンドが1本検出された。従って、この約9 kbの*Eco* RI断片上にP450nor遺伝子の全長が含まれていると考えられた。そこで*F. oxysporum* のゲノムDNAを*Eco* RIで消化し、約6～10 kbの断片を回収してλZAPIIを用いてミニゲノムライブラリーを作製した。そして約5.0×10^5個のプラークより、P450norのcDNAの5'側の断片をプローブに用いてスクリーニングを行った。その結果、39個の陽性プラークが得られた。このうち、特に強い陽性を示した、3つのクローンを単離し、pUC19の*Eco* RI 部位にサブクローニングし、それぞれpFGP450-1, 2, 3 と命名した。この3つのプラスミドを、*Eco* RI、*Pst* I、*Bam* HI を用いて消化したところ、同一の切断パターンを示した。従って、3つのクローンは同じ領域を含んでいると考えられたので、以降pFGP450-1 について解析を進めた。pFGP450-1の構造を Fig. 2-2A に示した。

次に*F. oxysporum* のゲノムDNAとpFGP450-1を *Eco* RI、*Eco* RIと*Pst* I、*Bam* HI それぞれで消化し、P450norのcDNAの5'側の断片をプローブに用いてサザン解析を行った（Fig. 2-2B）。ゲノムDNAとpGFP450-1両者で同一のパターンが得られた。従って、クローン化した pFGP450-1は、P450nor遺伝子を含んでいると推定された。

2－2－2　P450norゲノムDNAの構造

pFGP450-1より、Fig. 2-2Aに示した、a, b, cの3つの断片を得て、pUC19あるいはpBluescript II KS+（Stratagene社）にサブクローニングし、それぞれ、5'側及び3'側よりデレーションミュータントを作製し、dideoxy法でシークエンスを行って、5'上流795 bpと3'下流219 bpを含むP450norゲノムDNA全長2598 bpの配列を決定した（Fig. 2-3）。P450norのcDNA配列との比較から、P450norゲノムDNAはかびの遺伝子としては比較的多い、7つのイントロンを持っていることがわかった。

7つのイントロンはすべて、49～55 bpと短いものであった。7つのうち、6つのイントロンの最初の2塩基はGT、最後の2塩基はAGで、GT-AGルール[20]と一致したが、6番目のイントロンの最初の2塩基はGCであり、GT-AGルールから外れていた。pFGP450-2及びpFGP450-3についてもこの領域の塩基配列を決定したが、やはり、GCであったことからサブクローニングの過程などで変異を起こしたものではなく、確かに、6番目のイントロンの最初の2塩基はGCであると考えられた。

5'上流領域には、ORFの先頭より115～120 bp上流の所に、TATAボックスと思われる配列（TATAA）が見出された。プライマー伸長法を行ったところ、ORFの先頭より82 bp上流のCに相当する位置に1本のバンドが検出された（Fig. 2-4）。ほかにはバンドが見られなかったことから、この位置が唯一の転写開始地点であると考えられた。前述した配列（TATAA）は、この転写開始地点より33 bp上流に位置することから、TATAボックスとして働いている可能性が高いと考えられた。5'上流領域には、TATAボックスの他に、2ケ所のinverted repeat配列と2ケ所のpalindromeが見出された。これらの配列が、P450norの発現調節に関与しているのではないのかと考えられた。こ

のうち、転写開始地点より 124～138 bp 上流に位置するinverted repeat 配列が、大腸菌のFNR（Fumarate and Nitrate Reduction）と呼ばれる発現調節タンパクの結合領域と類似していることが分かった。FNRは、大腸菌その他のバクテリアにおいて、嫌気呼吸や窒素固定に関わる多くの酵素の嫌気条件下での発現に働く調節タンパクである[21, 22]。P450norのinverted repeat配列はTTGATT---AATCAAであり、FNRの結合領域のコンセンサス配列TTGAT----ATCAAと比較すると間の塩基数が異なるものの反復配列の部分は同一であった（Fig. 2-5A）。また転写開始地点より600-619 bp上流のinverted repeat 配列が、大腸菌の転写調節タンパクNarLの結合領域と類似していることが分かった。NarLは大腸菌の硝酸呼吸系の硝酸塩による誘導にかかわる発現調節タンパクであり[23, 24]、その結合領域は5'-XXTACYXKTX-3'(Y=pyrimidine; K=A or C)というコンセンサス配列を持った inverted repeat あるいは direct repeat であるとされている[24]。P450norのこの配列は10塩基中3塩基は異なっており完全な inverted repeat を形成していないが、NarL のコンセンサス配列とよく似ていた（ Fig.2- 5B）。これらの配列が、低酸素条件と硝酸塩、亜硝酸塩によるP450nor の発現調節に関与しているのではないのかと考えられた。

2－3　考察

P450norのゲノムDNAは、７つのイントロンを持っていることが明らかとなった。P450norは細菌のP450と高い相同性を示し、放線菌*Streptomyces griseolus*のP450SU2[25]とは約40％の相同性を示すことから、過去に放線菌からかびへの遺伝子の水平伝達が起こったのではないかと考えられた。７つものイントロンが見い出されたことから、遺伝子の水平伝達があったとしてもかなり古い時代であろうと結論づけられる。

ゲノムDNAの5'上流領域にはＴＡＴＡボックスのほか、２ケ所のinverted repeat配列と２ケ所のpalindromeが見い出され、これらの配列が、P450nor遺伝子の、酸素欠乏状態と硝酸塩、亜硝酸塩による発現調節に関与している可能性が考えられた。そのうちの２つは大腸菌の硝酸呼吸系の発現調節タンパクFNRとNarLの結合領域に類似していた。*F. oxysporum*は、大腸菌と異なり真核生物であるが、いままで原核生物に特異的なものと考えられてきた脱窒活性を示すことから、その脱窒酵素系の遺伝子が大腸菌の硝酸呼吸系と同様な機構で調節されている可能性も考えられる。真核生物と原核生物で同じ転写調節因子が使われている例はほとんど知られていない。バルビツール酸による誘導を受ける哺乳類の肝ミクロゾームのP450やアルデヒド脱水素酵素の遺伝子と、細菌*Bacillus megaterium*のP450BM-1、P450BM-3の遺伝子は、その上流にBarbie Boxとよばれる保存配列を持っている[26]。バルビツール酸はP450BM-3の基質ではないことから、この物質による細菌P450誘導の生理的意義は不明である。これに対し、脱窒は生理的目的がはっきりしている。*F. oxysporum*の脱窒系も細菌の系と同様の発現調節機構が働いているとすれば、生物の進化を考える上で大変興味深い。

FNR様の調節タンパクが*F. oxysporum*に存在するのであれば、大腸菌の

fnr遺伝子をプローブに用いて検出できるのではないかと考え、サザンブロッティングあるいはノーザンブロッティングを行ったが、バンドは検出されなかった。またFNRはFe^{2+}を持つ調節タンパクであり、その作用が、培地中に金属キレート剤を加えることにより阻害される[21,27]。そこで*F. oxysporum*で同様の実験を行いノーザン解析を行ったが、阻害効果は見られなかった。今後、ゲルシフト法や*F. oxysporum*の形質転換系の作製などにより、FNR、NarLなどの関与の有無を明らかにすることは極めて重要な課題となってくる。

Fig. 2-1 Southern blot analysis of *F. oxysporum* genomic DNA.

F. oxysporum genomic DNA was digested with *Eco* RI, *Bam* HI, or *Bgl* II. cDNA probes (5' : 337-bp *Eco* RI /*Bam* HI fragment, M : 613-bp *Bam* HI / *Rsa* I fragment, 3' : 425-bp *Rsa* I / *Eco* RI fragment) were used.

Fig. 2-2 Structure of the cytochrome P450nor gene.

A, Partial restriction map and relevant restriction sites of pFGP-450-1. An *Eco* RI fragment containing the P450nor gene is displayed. The P450nor gene is represented by the *solid bar*. Restriction sites are indicated as follows: B, *Bam* HI; E, *Eco* RI; P, *Pst* I. Fragments a, b, and c were subcloned into pUC19 or pBluescript II KS+ to determine the DNA sequence. **B,** Southern blot analysis. pFGP-450-1 (Clone) and *F. oxysporum* genomic DNA (Genome) were digested with *Eco* RI, *Eco* RI and *Pst* I, and *Bam* HI. Cleavage sites of each fragment are indicated by bars in Fig. 2-2A. The corresponding region of the cDNA probe (334-bp *Eco* RI/*Bam* HI fragment) used in this hybridization is also indicated in Fig. 2-2A.

```
-713     AATGC TGAGGAGGCG GAACAAGACA AATTCCAGCC ATAAAGATCG GTGTATGACG TGGGTTGGCT AAGAGTCGAA TCACGACGCT GCTTATAGCA

-618 CTACTCATTT ATTCCTAGTG GGTGGGATGC TTTTTGATGA CAGATCATGG AATCATATCA TTTTGTCGTA AGTATTTAAA GACTGCGTTT GCGCATCTCC

-518 GCGGGAATCA GCATCTCCAA GGAATGACAC GCTCAATCTT CAGGTCATCA AATTTGATTG TGCATTTTTC TAAAATGCAA TATGAAGAAA CAAAATAACT

-418 TTGCTTATGA GAAAATTGCA GAATGGTATC TGTACTTCAA CAACTGGAGT AAAGAGCAAT TTGATTAAGT TTTACTGCGG CGGACACAGT CCATAAAGTA

-318 GGAAGGCCAA CTTCTTTGCA TGGCCGTGAA CTCCCGAGCA GTACGACCTA GACGCATTGA CAAGTAATGA TGCCGATATT TGTAACACCC ATTACAGATG

-218 CCTGACAATC CGACTCGTCC GCCCGATTGC CCATGCAGGG GAAATGCCAT CGTCAAGCAT AAGCCGAGAC AGATCGGAAC TTGATTGGAA ATCAATTGCA

-118 TCTCGTGTTC TCATTGAATA CGGATGAATA TGGAATACTT TAAGTCCCAT ACTCCACATC TAATTTTCGC TTCCTTGAAA TATAACCCTC GGGCATCTCT

-18 CATCGTTATT CCCATCACCA TGGCTACTAC GAAGATTCAA TTCGCACTCC GCAACAAAAG GGTACTCTTC AGTCTACAGA GTTTCAATAG AACCTACACA

 +83   ATGGCATCTGGCGCACCGAGCTTCCCTTTCTCGCGCGCCTCTGGTCCTGAGCCACCCGCCGAGTTCGCCAAACTTCGAGCTACGAATCCCGTTTCCCAAG
        M  A  S  G  A  P  S  F  P  F  S  R  A  S  G  P  E  P  P  A  E  F  A  K  L  R  A  T  N  P  V  S  Q  V
+183   TCAAGCTTTTCGATGGCAGTCTCGCCTGGCTCGTCACTAAGCACAAAGATGTCTGCTTCGTAGCTACTTCTGAAAAGCTCTCCAAG gtatgacctgatat
        K  L  F  D  G  S  L  A  W  L  V  T  K  H  K  D  V  C  F  V  A  T  S  E  K  L  S  K  --------------
+283   gatctgatgggctcttctggttctaagctggctcaag GTCCGCACTCGCCAAGGCTTCCCTGAGCTTAGCGCCAGTGGAAAGCAAGCAGCCAAGGCAAAG
       ----Intron 1------------------------- V  R  T  R  Q  G  F  P  E  L  S  A  S  G  K  Q  A  A  K  A  K
+383   CCGACATTTGTCGACATGGATCCCCCAGAGCACATGCATCAGAG gtaagcaccttgtgtctttagagggctagatgagcaaggctgatgcagattgaag G
        P  T  F  V  D  M  D  P  P  E  H  M  H  Q  R  -------------------------Intron 2-----------------------
+483   AGCATGGTGGAGCCGACCTTTACCCCCGAAGCTGTCAAGAATTTGCAGCCTTACATCCAGAGGACTGTCGATGATCTACTGGAGCAGATGAAGCAGAAGG
        S  M  V  E  P  T  F  T  P  E  A  V  K  N  L  Q  P  Y  I  Q  R  T  V  D  D  L  L  E  Q  M  K  Q  K  G
+583   GGTGTGCCAATGGTCCAGTTGACCTTGTCAAAGAGTTTGCTCTCCCTGTCCCCTCCTAT gtaagtcacggcagacgattcttaaaggacatgtctcatat
        C  A  N  G  P  V  D  L  V  K  E  F  A  L  P  V  P  S  Y  ------------------------Intron 3---------
+683   cggtctag ATCATCTACACACTTCTCGGAGTTCCCTTCAATGATCTCGAATATCTTACGCAGCAGAACGCCATTCGCACAAATGGTAGCTCCACTGCCCG
        -------- I  I  Y  T  L  L  G  V  P  F  N  D  L  E  Y  L  T  Q  Q  N  A  I  R  T  N  G  S  S  T  A  R
+783   AGAGGCCTCTGCCGCTAACCA gtaggtccaaccaagaaccatttggtcatgttcaggtctgacaattgatag GGAACTCCTTGATTACCTTGCAATTCTT
        E  A  S  A  A  N  Q  --------------------Intron 4------------------------ E  L  L  D  Y  L  A  I  L
+883   GTCGAGCAGCGTCTCGTAGAGCCAAAGGATGATATCATCAGCAAGCTCTGCACTGAGCAAGTCAAGCCTGGAAATATCGACAAGTCCGATGCTGTCCAGA
        V  E  Q  R  L  V  E  P  K  D  D  I  I  S  K  L  C  T  E  Q  V  K  P  G  N  I  D  K  S  D  A  V  Q  I
+983   TTGCTTTCTTGCTCCTTGTCGCTGGCAACGCAACCATGGTAAACATGATTGCTCTG gtatgtgattctgttcaaatgtctgttgttcatttgctgacact
        A  F  L  L  L  V  A  G  N  A  T  M  V  N  M  I  A  L  ------------------------Intron 5-------------
+1083  ttgtag GGCGTCGCCACTCTGGCTCAGCACCCTGATCAGCTGGCGCAACTCAAGGCCAACCCATCCCTTGCGCCCCAGTTTGTCGAGGAACTCTGTCGCT
        ------ G  V  A  T  L  A  Q  H  P  D  Q  L  A  Q  L  K  A  N  P  S  L  A  P  Q  F  V  E  E  L  C  R  Y
+1183  ACCATACTGCTTCTGCACTAGCTATCAAGCGTACTGCCAAGGAGGATGTCATGATCGGTGACAAG gcaagtattatacccatgtgactggaggatccagc
        H  T  A  S  A  L  A  I  K  R  T  A  K  E  D  V  M  I  G  D  K  ------------------------Intron 6--
+1283  ccgactgaccccatgctag CTGGTCCGGGCGAATGAAGGCATTATCGCATCCAACCAGTCAGCCAACAGAGATGAAGAAGTCTTCGAGAATCCCGATGAG
        ------------------- L  V  R  A  N  E  G  I  I  A  S  N  Q  S  A  N  R  D  E  E  V  F  E  N  P  D  E
+1383  TTCAACATGAACCGCAAGTGGCCTCCTCAAGATCCTCTTGGCTTTGGCTTTGGTGATCACAGATGTATCGCTGAGCATCTTGCAAAGGCTGAACTCACAA
        F  N  M  N  R  K  W  P  P  Q  D  P  L  G  F  G  F  G  D  H  R  C  I  A  E  H  L  A  K  A  E  L  T  T
+1483  CTGTGTTCT gtaagtatacatgccttcaatctttggtgtactaccaactaacatgttgcag CAACACTGTATCAGAAGTTCCCAGATCTCAAGGTTGCGG
        V  F  S ---------------------Intron 7-----------------------  T  L  Y  Q  K  F  P  D  L  K  V  A  V
+1583  TTCCATTGGGAAAGATCAACTACACGCCTCTGAACCGAGATGTCGGAATCGTGGATCTTCCTGTCATTTTTTAA
        P  L  G  K  I  N  Y  T  P  L  N  R  D  V  G  I  V  D  L  P  V  I  F  STOP
+1657 GAATATCCAG AGAAGTGGAT ATAGCCGTTT TCGTATATAG CTCTATTAGC ACCCGAATAA ATTGTCTCAG CTCTACTTAC ATCGACCTAC GAACCGTGGT

+1757 TGAAACGATC CCTGTTTCTT CAAACTACAT CACTGTCTAA ACGACTTTAC TGTAGAAATG CTAAATGAAT CAATGAATCC AAATATTAAT GCAGTAGTGA

+1857 TTCTACCTTT GCGTATTTAT ATTGTCTTA +1885
```

Fig. 2-3 The nucleotide sequence of cytochrome P450nor gene and its flanking regions.

Numbers beside the sequence correspond to nucleotides starting from the first ATG codon. The transcriptional start point is indicated by an *arrowhead*. The putative TATA box and poly(A)$^+$ addition signal are *underlined*. The sequences with dyad symmetry are indicated by *arrows*. Broken underlines indicate intron-coding regions.

Fig. 2-4 Determination of the transcriptional start point in the cytochrome P450nor gene by primer extension analysis.

The primer extension reaction was analyzed against a DNA sequence ladder.

A

narG	ACTC	TTGATCGTTATCAA	TTCC
nirB	GAAT	TTGATTTACATCAA	TAAG
fumB	GGGG	TTGATTGGTGTGAG	CGTA
FNR consensus		TTGAT----ATCAA	
hlyX	AAAT	TTGCTTGAAATCAA	ACTT
arcDABC	GCTA	TTGACGTGGATCAG	CATT
fixN	GCAC	TTGATCTGGATCAA	GGTG
CYP 55	GAAC	TTGATTGGAAATCAA	TTGC

B

nirB	-79	TATACCCATT	-70
	-60	TATACTCCTT	-69
narG	-207	AATACTCCTT	-198
	-197	AATACCCATC	-188
fdnG	-114	TCTACCGCTA	-105
	-95	CCTACCTCAA	-104
NarL consensus		--TACY-KT-	
CYP 55	-619	ACTACTCATT	-610
	-600	ACTAGGAATA	-609

Fig. 2-5 Alignment of potential FNR- (A) and NarL- (B) binding sites of bacterial genes and *F. oxysporum* cytochrome P450nor gene.

Data concerning genes except *CYP 55* were obtained from references 21 and 22. The following genes are derived from organisms other than *E. coli* : *hlyX*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ; *arcDABC*, *Pseudomonas aeruginosa* ; *fixN*, *Rhizobium meliloti* ; *CYP 55*, *F. oxysporum*. Fig. B lists similar 10-base elements found in different *E. coli* promotors together with their co-ordinates, and the similar sequence in the *F. oxysporum* promotor region. Numberings are done from the respective transcription starts.

第３章　チトクロムP450norの大腸菌における発現

３－１　材料及び方法

３－１－１　菌株

P450norの発現には*Escherichia coli* HB101, JM105, XL1-Blue, Y1090 (r-) の４株を用いた。プラスミドの調製には*E. coli* HB101株を使用した。

３－１－２　発現プラスミドの構築

Trcプロモーターをもつ発現ベクターpKK233-2 (Pharmacia)をP450norの大腸菌における発現に用いた。pfp450-20 のP450nor cDNAを制限酵素*Eco* RIで切り出し、Klenow fragmentをもちいて平滑化し*Pst* Iリンカーを結合させた。*Pst* Iで消化後、pUC19の*Pst* I に挿入しpFP450-Pを作成した。次にpKK233-2に挿入するために、変異プライマーを用いた PCR法によりP450nor cDNAの開始コドン付近の塩配列基CAATGGをCCATGGに置換して制限酵素*Nco* Iの認識部位を作成した。PCR による部位特異的変異の導入[28, 29]は、以下のように行った。

変異プライマーは、以下のものをバイオロジカ社に合成、精製を依頼して用いた。

プライマーF　5'-GAACCTACACCATGGCATCTGG-3'

プライマーR　5'-CCAGATGCCATGGTGTAGGTTC-3'

pFP450-Pより開始コドン付近をふくむ *Bam* HI断片 (337 bp)を切り出しpUC19の*Bam* HI部位に挿入しPCRのテンプレートとした。変異プライマーFとM13-RVプライマー、変異プライマーRとM13-47プライマーを用いて1回目のPCR反応を行った。宝酒造より購入したTaq DNA polymeraseおよび添付

の10倍濃縮バッファー、100mM dNTPs溶液をPCR反応に用いた。0.5 mlマイクロチューブに、滅菌水 58.5 μl、10倍濃縮バッファー 10 μl、dNTPs溶液 8 μl、Taq DNA polymerase 0.5 μl (2.5 units)、M13-47プライマー又はM13-RVプライマーを20 μl (10 pmol)、変異プライマーを1 μl (20 pmol)、テンプレートを2 μl (100 ng)加え全容量を100 μlとしてPCRを行った。PCR反応は、Denaturation; 94 ℃、1 分間（1 回目は2 分間）、Annealing; 55 ℃、2 分間、Polymerization; 72 ℃、1 分間で、30サイクル行った。反応後、プライマーFの系より287 bpの断片を、プライマーRの系より70 bpの断片を回収し、2 回目のPCR反応を行った。0.5 mlマイクロチューブに、滅菌水 22.5 μl、10倍濃縮バッファー10 μl、dNTPs溶液 8 μl、Taq DNA polymerase 0.5 μl (2.5units)、M13-47プライマーとM13-RVプライマーを各20 μl (10 pmol)、回収断片を各10 μl 100 ng)加え全容量を100 μlとしてPCRを行った。反応条件は1回目と同じである。反応後、 *Bam* HI断片 (337 bp)を回収し、pUC19の *Bam* HI部位に挿入後、シークエンスを行い、*Nco* Iの認識部位が生じていること、また他の領域に変異がかかっていないことを確認した。その後この *Bam* HI断片をpFP450-Pの変異のかけていない断片と入れ換えて*Nco* Iの認識部位を開始コドン部分にもったP450nor cDNAを作製した。このcDNAの発現ベクターへの挿入はFig. 3-1 のように行った。P450nor のcDNAには5' 末端より798 bpのところに*Nco* Iの認識部位があるため、この部位で前半部、後半部に分けて組み込むことにした。まず後半部の*Nco* I－*Pst* I断片 (578 bp)をpKK233-2の*Nco* I －*Pst* I部位に挿入してpKKP450NPを作製し、次いでこれの*Nco* I部位に前半部の*Nco* I－*Nco* I断片（728 bp）を挿入して発現プラスミドpKKP450を作製した。また pKKP450よりプロモーター、P450nor cDNA、ターミネーターを含んだ *Sph* I－*Sca* I 断片を切り出し、pUC19の *Sph* I－

Sma I 部位に組み込んで発現プラスミドpUC-kkP450を作製した。

3－1－3　P450nor の発現

2つの発現プラスミドpKKP450とpUC-kkP450を、*E. coli* HB101, JM105, XL1-Blue, Y1090 (r-) の4株の大腸菌に導入し、以下のようにP450nor の発現を行った。

まず15mlの培養チューブ中で、50 μg/mlのampicillinを含んだ2 mlのLuria-Bertani (LB) 培地（1 % bacto-tryptone, 0.5 % bacto-yeast extract, 1 % NaCl)で37 ℃で一晩前培養を行った。これを、50 μg/mlのampicillinを含んだ200 mlのYT培地（0.8 % bacto-tryptone, 0.5 % bacto-yeast extract, 0.25 % NaCl）をいれた500 ml三角フラスコに移し37 ℃、150 rpmで振盪培養した。そして600 nmの吸光度が0.6に達したところで、誘導剤として終濃度2 mMのisopropyl- β - D - thiogalactopyranoside (IPTG)を加えて30 ℃で4時間培養した。そして菌体を8,000 rpm、15分遠心して回収した。

3－1－4　大腸菌菌体の破砕

菌体を9 mlの20 mMリン酸バッファー（20 mM KH_2PO_4, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 20 % (V/V) Glycerol. pH 7.2）に懸濁し、プロテアーゼ阻害剤溶液（0.3 M TPCK in ethanol, 0.3 M PMSF in ethanol ）を各45 ml加え、超音波破砕（180 W, 5分）を行った。その後、12,000 rpmで5分間遠心して沈殿を除き、上清を超遠心（350,000×g、30分）にかけ、上清の可溶性画分と沈殿の不溶性画分を得た。

3－1－5　タンパク質量の測定

タンパク質量の測定は牛血清アルブミン（BSA）を標準タンパクとし、Lowryらの方法[30]に従って測定した。

3－1－6　SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動

試料をLeammliらの方法[31]に従って、SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。ゲル濃度12 %、ゲルサイズ 139×130×1 mm。試料を2-メルカプトエタノール、SDS共存下で、30秒間煮沸して変成させた後、ゲルに添加し、定電流30 mAで泳動を行った。泳動後、クマジーブリリアントブルーを用いて染色した。

3－1－7　ウエスタンブロット法[32]

SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、転写装置（ホライズブロットAE-6670P/N 型、ATTO社）を用いてPVDF膜（クリアブロット・P膜、ATTO社）に電気泳動的に転写した。転写後のサンプル膜に対して、P450norに対する抗体による検出反応を以下のように行った。

まずサンプル膜を5%のスキムミルクを含んだTBS溶液（0.02 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH7.4）30 ml に浸し、室温で30分緩やかに振盪してブロッキングを行った。その後、サンプル膜をT-TBS溶液（TBS + 0.05% Tween 20 (w/v)）で2回、TBS溶液で1回洗浄した（各5分）。次に、抗P450nor抗体を1％のスキムミルクを含んだ TBS 溶液で 20,000 倍に希釈した1次抗体溶液 30 ml にサンプル膜を浸し、室温で2時間、緩やかに振盪した。サンプル膜を先ほどと同様にして洗浄した後、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体（ヤギ由来）を1 %のスキムミルクを含んだTBS溶液で2,000倍に希釈した2次抗体溶液 30 ml に浸し、室温で1時間、緩やかに振盪した。その

後、サンプル膜を洗浄し、4-クロロ-1-ナフトールを用いて発色反応を行った。

3－1－8　一酸化窒素還元（Nor）活性の測定

試料溶液に20 mM NADHを0.5 ml加え、50 mMリン酸バッファーで全容を5 mlとし、試験管（15 mm×13 cm）にとり、脱気とヘリウムガスによる気相の置換を交互に２回行い、最後にヘリウムガスを強く注入しながらダブルブチルゴム栓をして密閉した。30 ℃、５分間保温した後、NOガスを1 ml、シリンジで注入し、ボルテックスで10秒間攪拌、30 ℃で15秒間保温後、5秒間攪拌してから（計30秒後）シリンジで試験管内の気相0.5 mlを分取し、これを0分として、1分間ごとに10秒間攪拌しながら、適当な時間に気相を同様に分取した。分取した気相はガスクロマトグラフィーで分析し、標準N_2Oガスとの比較から、生成N_2O量を算出した。分析条件を以下に示す。

分析器	：Shimadzu GC12A
検出器	：TCD
検出温度	：100 ℃
カラム	：Porapack Q (3 mm×2 m)
カラム温度	：50 ℃
キャリアー・ガス（ヘリウム）	：25 ml/min
電流	：160 mA

大腸菌由来の電子伝達系が、NADHからP450norへの電子伝達をサポートしていないことを示すコントロールとして以下に述べる実験を行った。中原ら[5)]によって*F. oxysporum*より精製されたP450norタンパク10 pmolを、ベクターpKK233-2で形質転換した大腸菌の可溶性画分タンパク 10 mgと混合して試料溶液とし、一酸化窒素還元活性を測定した。そして、大腸菌タンパクと混

合しなかった試料の一酸化窒素還元活性と比較することにより、大腸菌の電子伝達系の関与の有無を調べた。

3－3　結果

3－3－1　pKK233-2を用いた大腸菌における発現

発現ベクターpKK233-2にP450norのcDNAを組み込み、大腸菌における発現を行った。発現させた大腸菌を破砕後、遠心、超遠心をかけ、可溶性画分と不溶性画分を得た。そしてウエスタンブロット法により、発現させたP450norの存在を確認した（Fig. 3-2）。発現させたP450norは可溶性画分に回収されており、*F. oxysporum* より精製したP450norとほぼ等しい分子量を示した。P450norの発現量を求めるため、可溶性画分のスペクトルを測定したが明確な450 nmのピークは認められなかった。これは発現量がかなり少ないためだと考えられた。そこで次に一酸化窒素還元活性を測定した。可溶性画分タンパク10 mg分を用いて反応測定を行った（Fig. 3-2）。その結果、明瞭な一酸化窒素還元活性が検出され、大腸菌において活性をもつP450norの発現に成功したことが示された。この一酸化窒素還元活性を指標にP450norの発現量を求めた (Table 3-1)。 最も発現量の低いHB101株で0.32 pmol/mg protein、最も高い XL1-Blue株で1.34 pmol/mg proteinであった。XL1-Blue株の場合で可溶性タンパクの約0.004 %という発現量である。

3－2－2　発現系の改良

より高い発現量を得るため、発現プラスミドのコピー数を増やすことを試みた。pKK233-2はpBR322由来のプラスミドである。これの発現ユニットを、pBR322の約10倍のコピー数をもつプラスミドpUC19に移し、発現を試みた (Table 3-1)。その結果、発現量はXL1-Blue株以外、1.6-5倍増加したが、それでも最高で可溶性タンパクの約 0.017 %であった。cDNAに含まれるpoly A配列が転写効率を下げている可能性が考えられたので、poly Aを除いた発

現プラスミドを作製したり、開始コドンとSD配列の距離を変えるなどの改良法を試みたが、いずれも効果が見られなかった。

3－4　考察

大腸菌において、活性を保持したP450norの発現に成功した。その発現量は可溶性タンパクの約 0.017 %とかなり低く、この系を用いて組換え体P450norを精製し解析を行うのは不可能であった。しかし、本来P450norを持たない大腸菌にそのcDNAを導入、発現させることによりP450nor活性を再構成できた本章の結果は、次章の酵母における発現の結果と併せ、本P450が他の電子伝達タンパクの介在を必要とせずに、単独でNADHより電子を受け取ることを示す最終的な証明になったと考える。大腸菌で発現したP450norが、大腸菌由来の電子伝達系の助けを借りていることもあり得る。しかし、*F. oxysporum* から精製したP450norに、P450nor cDNAを持たないpKK233-2で形質転換した大腸菌の抽出液を加えたところ、活性がやや抑えられた (Fig. 3-3) ことから、そのような可能性は否定される。

開始コドン周辺の塩基配列を大腸菌で大量発現に成功しているP450のものに置き換えるなど、更に改良を重ねることにより発現量が飛躍的に向上する可能性もあるが、それよりも次章で述べる酵母における発現系の構築を試みる方が優れていると判断した。

Fig. 3-1. Strategies for constructing expression plasmids pKKP450 and pUC- kkP450.

Pst I linker was ligated to both ends of P450nor cDNA , and a *Nco* I site was introduced into the head of open reading frame by PCR . Then pKKP450NP was made by inserting the *Nco* I-*Pst* I (the latter half) fragment of the cDNA into the *Nco* I-*Pst* I site of the expression vector pKK233-2. And subsequently, pKKP450 was constructed by inserting the *Nco* I-*Nco* I (the former half) fragment into pKKP450NP. A high copy number plasmid, pUC-kkP450, was constructed by inserting a fragment arose from the digestion of pKKP450 with *Sph* I and *Sca* I into the *Sph* I-*Sma* I site of pUC19.

Fig. 3-2. Western blot analysis of P450nor expressed in *E. coli*.

The soluble and insoluble fractions of transformed cells (XL1-Blue) were analyzed by SDS-PAGE (left) and Western blotting (right). The P450nor band could be detected only on the lanes in Western blotting of the soluble fraction from the cells that were transformed with the cDNA-containing plasmid.

Fig. 3-3. Nitric oxide reductase activity of P450nor expressed in *E. coli* cells.

The soluble fraction (10 mg protein) from cells (XL1-Blue) transformed with pKKP450 (○) or with only pKK233-2 without cDNA (●; control) was utilized for the anaerobic assay . Slight N_2O evolution observed in the control experiment might be due to the non-enzymatic reduction of NO with NADH that was added in the reaction mixture (5 mM). Native P-450nor (10 pmols) purified from *F. oxysporum* was also assayed under same condition in the presence (■) or absence (□) of the soluble fraction (10 mg protein) of the *E. coli* cells transformed with pKK233-2.

Table 3-1 Amounts of P450nor expressed in *E. coli.*

		P450nor specific content	
		pmol/mg	%
pKKP450	HB101	0.32	0.001
	JM105	0.70	0.003
	XL1-Blue	1.34	0.006
	Y1090 (r-)	0.46	0.002
pUC-kkP450	HB101	1.81	0.008
	JM105	3.75	0.017
	XL1-Blue	0.83	0.004
	Y1090 (r-)	0.59	0.002

第４章　チトクロムP450norの酵母における発現

４－１　材料及び方法

４－１－１　菌株

酵母*Saccharomyces cerevisiae* YPH250株（*Mat* a, *ura3-52, lys2-801*^{amber}, *ade2-101*^{ochre}, *trp1-Δ1, his3-Δ200, leu2-Δ1*）を発現ベクターpG-3[33]を用いた場合の宿主、*S. cerevisiae* INVSc2株（*Mat α, his-Δ200, Ura3-167*）を発現ベクターpYES2 (Invitrogen 社)を用いた場合の宿主として用いた。

４－１－２　培地組成

以下に示す培地を酵母の培養に用いた。

YEPD培地：1 % Yeast extract, 2 % Polypepton, 2 % Glucose

YEPG培地：1 % Yeast extract, 2 % Polypepton, 2 % Galactose

SD培地　：0.67 % Bacto-yeast nitrogen base w/o acids, 2 % Glucose

YPH250株を用いた形質転換の場合は、L-Histidine-HCl (20 μg/ml), Uracil (20 μg/ml), Adenine sulfate (20 μg/ml), L-Leucine (30 μg/ml), L-Lysine-HCl (30 μg/ml)をSD培地に加えた（カッコ内は終濃度）。INVSc2株を用いた形質転換の場合は、L-Histidine-HCl (20 μg/ml)をSD培地に加えた。YEPDプレート、SDプレートは、それぞれ上記培地に2 %アガロースを加えたものを用いた。

４－１－３　発現プラスミドの構築

構成発現プロモーターであるglyceraldehyde-3-phosphoglycerate dehydrogenase (GPD) 遺伝子のプロモーターをもつ発現ベクターpG-3及びガ

ラクトース誘導性のGAL1プロモーターを持った発現ベクターpYES2を用いて酵母における発現を試みた。P450nor cDNAのpG-3及び pYES2 への組み込みは以下のように行った。 pfp450-20上のP450nor cDNA全長を*Eco* RIで切り出し、Klenow fragment をもちいて平滑化後、*Kpn* I リンカーを結合させた。*Kpn* I で消化後、pG-3の*Kpn* I 部位に挿入し、発現プラスミド pGFP-450を作製した（Fig.4-1）。また同じcDNA全長の*Eco* RIを平滑化後、pUC118の*sma* I部位に挿入して pfp450-118を作製した。これよりcDNA全長を*Kpn* I と*Xba* Iで切り出し、pYES2の*Kpn* I －*Xba* I部位に挿入して、発現プラスミドpYESP450を作製した（Fig.4-2）。

4－1－4　酵母の形質転換

酵母の形質転換は、酢酸リチウム法[34]により、以下のように行った。YEPDプレートに保存された酵母 YPH250株あるいは INVSc2株を、50 ml遠心管中、10 mlのYEPD培地に植菌し、30 ℃、24時間、180 rpmで振盪培養した。次にL字管に10 mlのYEPD培地と20 mlの前記培養液をいれ、30 ℃、180 rpmで550nmの吸光度が 0.8になるまで振盪培養した。この培養液を38 ml遠心管に移し 2,000 rpm、5分遠心して集菌し、得られた菌体に0.5 mlのTEバッファー（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5）と0.5 mlの0.2 M 酢酸リチウム溶液を加えて再懸濁し30 ℃で30分処理してコンピテント細胞を得た。

コンピテント細胞懸濁液100 mlを1.5 mlマイクロチューブに移し20 μl (2 μg)のプラスミド溶液を加え、30 ℃で10分放置後、70 % (W/V) Polyethylene glycol 4,000 溶液を150 μl 加えて混和し、30 ℃で30分放置した。次に47 ℃で10分熱処理したのち12,000 rpm、10秒間遠心し、100 μlの滅菌水で懸濁し

SDプレートにまいた。30 ℃で3日培養して形質転換体のコロニーを得た。

4－1－5　形質転換体の培養

SDプレートに生育したコロニーを50 ml遠心管中、10 mlのSD培地に植菌し、30 ℃、24時間、180 rpmで前培養した。本培養は pG-3を用いた場合とpYES2を用いた場合で、それぞれ以下のように行った。

pG-3を用いた場合は、500 ml三角フラスコ中に50 mlのYEPD培地をいれ、前培養液を 1 ml植菌し、30 ℃、200 rpm、で24時間培養した。その後、培養液を50 ml遠心管に移し3,000 rpm、5分間遠心して集菌し、10 mlの滅菌水で懸濁後、同様に遠心して洗浄して発現菌体を得た。

pYES2を用いた場合は、まずpG-3の場合と同様に500 ml三角フラスコ中、50 mlのYEPD培地で24時間培養して、集菌、洗浄を行った。次いで、得られた菌体を50 mlのYEPG培地で懸濁し、500 ml三角フラスコに移して30 ℃、200 rpmで24時間培養し、ガラクトースによる誘導をかけた。培養終了後、同様に集菌、洗浄を行い、発現菌体を得た。

4－1－6　酵母菌体の破砕

発現酵母菌体2 g（湿重量）に対し50 mMリン酸バッファー（50 mM KH_2PO_4, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10 % (V/V) Glycerol. pH 7.2）を2 ml、プロテアーゼ阻害剤溶液（0.3 M TPCK in Ethanol, 0.3 M PMSF in Ethanol）各10 ml、ガラスビーズ（径 0.45 mm、塩酸で洗浄後乾熱滅菌したもの）8 gを加え、混和し、超音波破砕機で破砕（ 200 W, 5分）した。破砕後、底部に針で微小な穴を開けた1.5 mlマイクロテストチューブに分注し、受皿となるマイクロチューブに重ね、2分間、6,000 rpmで遠心し、ガラスビーズを除

いた。その後、15,000 rpmで5分間遠心して菌体残渣を沈殿として除き、上清を超遠心（350,000×g、30分）にかけ上清の可溶性画分と沈殿のミクロソーム画分を得た。

4－1－7　タンパク質量の測定および一酸化窒素還元活性の測定

第3章に述べた方法を用いた。

4－1－8　P450量の測定

大村と佐藤の方法[35]に基づき、ダブルビームの吸光光度計を用いて還元一一酸化炭素結合状態と還元状態の448 nmにおける吸光度差を測定した。この差スペクトルでの448 nmと490 nmにおける吸光度の差からP450norについて得られている分子吸光係数、$\Delta\varepsilon = 86.9\ mM^{-1} \cdot cm^{-1}$を用いてP450量を算出した[6]。

4－1－9　ウエスタンブロット法

第3章に述べた方法を用いた。

4－1－10　組換えP450norタンパクの精製

a．DEAE-cellulose DE52 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

10 mMリン酸バッファー で平衡化したDEAE-cellulose DE52カラム（100 ml）に同バッファー で平衡化した可溶性画分（2,800 mg）を添加し平衡化バッファーで洗浄後、20 mMリン酸バッファー で酵素を溶出させた。

b．Mono Q HR 5/5 (Pharmacia)陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

上の段階で回収したP450nor画分を濃縮後、5 mMリン酸バッファー に対し

て透析した後、同バッファー で平衡化したMono Q HR 5/5 カラム(1 ml) に添加し、20 mMリン酸バッファーで酵素を溶出させた。この画分を濃縮し、5 mMリン酸バッファー に対して透析した後、Mono Q HR 5/5 カラム に再度添加し5～20 mMのリン酸バッファーのグラジエントにより酵素を溶出させ、精製標品とした。

4－1－11　T243A変異体の作製

P450norの243番目のアミノ酸であるスレオニン残基をアラニンに置換したT243A変異体のcDNAを、変異プライマーを用いたPCR法により作製した。変異プライマーは、以下のものをバイオロジカ社に合成、精製を依頼して用いた。

変異プライマー　5'-GTTTACCATGGCTGCGTTGCC-3'

この変異プライマーは、cDNAのORFの718～738番目の塩基に相補的に設計されており、243番目のアミノ酸であるスレオニンをコードするコドンACCを、アラニンをコードするコドンGCCに置換してある（下線）。また袋文字の部分の配列は制限酵素*Nco* Iの認識部位となっている。pfp450-20 のP450nor cDNAを*Eco* RVと*Bgl* IIで消化して得られる497 bpの断片を、pBluescript II KS+ の*Eco* RV/*Bam* HI部位に組み込んでPCRのテンプレートとした。変異プライマーとM13-RVプライマーを用いてPCR反応を行った。反応液組成及び反応条件は3章と同様である。反応産物を*Kpn* Iと*Nco* Iで切断して 148 bpの断片を回収した。pfp450-20を*Kpn* Iと*Nco* Iで切断したものをベクターとし、断片を挿入後、M13-47プライマーを用いてシークエンスを行い、目的の変異が生じていること、また他の領域に変異がかかっていないことを確認した。その後、*Eco* RVと*Bgl* IIで消化して得られる497 bpの断片

を、pfp450-118のP450nor cDNAの相当部分と入れ換えてT243A変異体cDNA全長を作製し、pYES2に挿入して発現を行った。発現させたT243A変異体の精製、諸性質の解析は、野生型のものと同様にして行った。

4－2　結果

4－2－1　pG-3を用いた酵母における発現

構成発現プロモーターをもつpG-3を用いて酵母における発現を試みた。組換えP450norタンパクは、大腸菌の場合と同様、可溶性画分に見出だされた。可溶性画分の一酸化窒素還元酵素の比活性は、前章、大腸菌の場合と比べ、極めて高かった(Fig.4-3)。また可溶性画分のスペクトルを測定したところ、448nmにピークを持つP450norに特徴的な明瞭な差スペクトルが得られた(Fig.4-4)。一酸化窒素還元活性より求めた発現量は186 pmol/mg protein、差スペクトルから求めたP450量は190 pmol/mg proteinとほぼ等しい値を示した。このことから、発現した組換えP450norタンパクは、*F. oxysporum* より精製されたP450norと同じ分子活性を持っていることが予想される。またウエスタンブロット法を行ったところ、発現させたP450norの分子量は*F. oxysporum* より精製されたP450norとほぼ等しかった(Fig.4-5)。発現量は可溶性タンパクの約0.85%であった。

4－2－2　pYES2を用いた酵母における発現

ガラクトース誘導性のGAL1プロモーターを持ったpYES2を用いて酵母における発現を試みた。pG-3をもちいた場合と同様、強い一酸化窒素還元活性と明瞭な差スペクトルが可溶性画分に見出だされた(Fig.4-6,7)。発現量はpGFP450-1の場合よりやや高く310 pmol/mg protein、可溶性タンパクの約1.4%であった。

4－2－3　組換えP450norタンパクの精製及び解析

pYESP450の発現系を用いてP450norの大量発現と部分精製を試みた。6 L

の培養液から約150 gの菌体を得て、その菌体破砕抽出液から活性の部分精製を行い、41 nmolの組換えP450norタンパクを得た。精製標品の酸化型、還元型、およびCO結合型のスペクトルはそれぞれ、*F. oxysporum* より精製されたもともとのP450norのものとほとんど一致した (Fig.4-8)。NADH及びNOの濃度を種々に変化させて、活性測定を行い、その結果について2基質反応速度論の常法[35]に従って解析した。反応はnative酵素と同様シークエンシャル機構に従い、NADHに対する*K*mは 0.226 mM、NOに対する*K*mは0.064 mM、*k* catはNO消費として47,600 min^{-1}であった(Table. 4-1)。これらの数値も*F. oxysporum* より精製された native P450norとほぼ等しい値であった。以上の結果より、酵母において生産された組換えP450norタンパクがnative P450norと、スペクトル的にも速度論的にも同じ性質を示すことが示された。

4－2－4　T243A変異体の解析

上記pYESP450の発現系を用いて、部位指定変異体の大量発現が、野生型タンパクと同様に可能であるかどうか検討した。P450norのヘム遠位にはP450スーパーファミリーにおいて高度に保存されたスレオニン残基（Thr）が存在する。P450norにおいて243番目に位置するこのThrを水酸基を持たないAla（アラニン）に置換した変異体を作製し、部分精製を行った。得られた変異タンパクは野生型と同じスペクトルのパターンを示した。この変異タンパクのNADH、NOに対する*K*m値及び*k* cat値を算出したところ、NADHに対する*K*mは0.500 mM、NOに対する*K*mは0.074 mM、*k* catはNO消費で30,400 min^{-1}であった(Table. 4-1)。*k* catはやや低下したものの、依然高い活性を活性を保持していたことから、このThrは活性に必須ではないことが示唆された。

4－3　考察

発現ベクターpG-3あるいはpYES2を用いた酵母の発現系において、前章の大腸菌の発現系の100倍近い量のP450norの発現に成功した。pYES2を用いた発現系より組換えP450norタンパクを精製し、その諸性質を解析した。組換えP450norタンパクは分光学的にも、速度論的にもnativeの酵素と同じ性質を示した。このpYES2を用いた酵母の発現系を用いて、P450norにおいて243番目に位置するThrを基水酸基を持たないAlaに置換した変異体を発現させ、部分精製を行って性質を検討した。このThrを含むヘム遠位の領域は通常、酸素分子及び基質が結合する空間に存在しており、P450norの場合もこの領域が活性に重要な部分であると予測された。このThrは細菌*Psudomonas putida*のP450camにおいては、その側鎖の水酸基が酸素分子へのプロトンの伝達に関与しているとされている[37、38]。P450camのAla置換変異体ではプロトン伝達に不都合が生じ、酸素の還元と基質の酸化が共役せずに過酸化水素を生成する、いわゆる脱共役反応が起こるようになる[37]。本P450norにおいてもNADHからNOへの電子伝達の際、NADH以外から1個のプロトンが、供給される必要があるが、そのプロトン供与体として、このThrの水酸基が関与している可能性が考えられた[39]。しかしT243A変異体は、強い活性を保持しており、P450スーパーファミリーで高度に保存されているこのThr残基は、P450norにおいては活性に必須ではないことが明らかとなった。哺乳類のミクロゾーム型のP450dにおいてもこのThrは活性に必須ではないことが明らかとなっている[40]。しかしP450dの場合、このThrの前のGluのカルボキシル基がプロトンの伝達に寄与していることが示唆されている[40,41]。P450norの場合、Thrの前はカルボキシル基を持たないAlaである。P450norの場合、大きな有機物を基質とするのではないこと、その反応に酸素分子を利

用しないことなどから、プロトンの伝達にこれらの極性基を必要としないことも考えられる。

以上の結果から、本章で構築された酵母による発現系が、このようなP450norについてのタンパク工学的検討に利用できることが明らかとなった。NADHからの電子伝達などのP450norの反応機構を解明するために、今後、各種の変異体の作製による解析が進むことが期待される。

Fig. 4-1 Structure of cytochrome P450nor expression plasmid pGFP450-1.

P450nor cDNA was inserted into the yeast expression vector pG-3.

Fig. 4-2 Structure of cytochrome P450nor expression plasmid pYESP450.

P450nor cDNA was inserted into galactose-inducible expression vector pYES2.

Fig. 4-3 Nitric oxide reductase activity of P450nor expressed in the yeast transformed by pGFP450-1.

The soluble fraction (100 μg protein) from cells transformed with pGFP450-1 (○) or with only pG-3 without cDNA (●; control) was utilized for the anaerobic assay .

Fig. 4-4 Reduced carbon monoxide difference spectra of P450nor expressed in the yeast that was transformed by pGFP450-1.

Fig. 4-5 Western blot analysis of P450nor expressed in the yeast.

The soluble fraction (5 μg and 100 μg) of transformed cells were analyzed.The P450 lane contains native P450nor purified from *F. oxysporum*.

Fig. 4-6 Nitric oxide reductase activity of P450nor expressed in the yeast transformed by pYESP450.

The soluble fraction (50 μg protein) from cells transformed with pYESP450 (○) or with only pYES2 without cDNA (●; control) was utilized for the anaerobic assay .

Fig. 4-7 Reduced carbon monoxide difference spectra of P450nor expressed in yeast transformed by pYESP450.

Fig. 4-8 Absorption spectra of recombinant P-450nor.
———,ferric (native) ; — — - ,dithionite-reduced ; —·— ,dithionite-reduced plus CO

Table 4-1 Properties of P-450nor expressed in the yeast

	*K*m (NO) (mM)	*K*m (NADH) (mM)	*k*cat (min^{-1})
Wild type	0.064	0.226	47,600
T243A mutant	0.074	0.500	30,300

総合考察

本研究では、かび*Fusarium oxysporum*の脱窒系において、一酸化窒素還元酵素として機能しているチトクロムP450norについて、遺伝子の面から解析を行った。

P450norタンパクは、硝酸塩、亜硝酸塩により誘導され、その誘導が通気をあげることにより抑制される。その発現調節の機構を調べるためノーザン解析を行った。その結果、P450norはそのmRNAが硝酸塩、亜硝酸塩の存在と、低酸素分圧により誘導されること、すなわち転写レベルでの発現調節を受けていることが明らかとなった。P450norの基質は一酸化窒素であり、硝酸塩、亜硝酸塩ではない。しかし一酸化窒素は細胞毒性が非常に強く、硝酸塩あるいは亜硝酸塩から各還元酵素の働きにより一酸化窒素が生じてからP450norが誘導されるとは考えにくい。従って、P450norが硝酸塩、亜硝酸塩を誘導基質としているのは適切な機構であるといえる。

このP450nor遺伝子の硝酸塩、亜硝酸塩の存在と、低酸素分圧による誘導機構を解析するため、5'上流を含む、ゲノムDNAのクローニングを行った。硝酸塩、亜硝酸塩と酸素の関わる発現調節系は幾つか知られている。大腸菌の硝酸呼吸系は、嫌気条件下で硝酸塩、亜硝酸塩により誘導される。その発現調節は、FNRと呼ばれる酸素の存在を感知し、発現制御を行うタンパクと、硝酸イオンに対してセンサーとレギュレーターとして働くNarX-NarL系によって制御されている[23, 24]。脱窒を行う細菌*Psudomonas aeroginosa*の場合も、その脱窒系遺伝子が、ANRと呼ばれるFNR様の転写調節因子に制御されている[42, 43]。別の脱窒細菌 *Alcaligenes eutrophus* の脱窒系遺伝子の上流にもFNRの結合領域が見出だされている[44]。一方、酵母 *Sacchromyces*

cerevisiae には、HAP1- ROX1という酸素を感知し、転写調節を行うタンパクのペアーが知られている[45, 46]。HAP1は高酸素濃度で多くの好気性遺伝子の発現を促進する。ROX1は高酸素濃度でHAP1により誘導され、嫌気性遺伝子の好気条件での発現を抑制する。これらの調節機構がP450norにも存在するのか否か興味が持たれた。ゲノムDNAの5' 上流には、2ケ所のinverted repeat 配列と2ケ所のpalindromeが見出だされ、これらの配列が、P450nor遺伝子の、酸素欠乏状態と硝酸塩、亜硝酸塩による発現調節に関与している可能性が考えられた。そのうちの2つは大腸菌の硝酸呼吸系の発現調節タンパクFNRとNarL の結合領域に類似していた。一方酵母の嫌気的成育のリプレッサーROX1の結合領域の保存配列 YYYATTGTTCT[46]に類似した配列は見出されなかった。*F. oxysporum* は、細菌と異なり真核生物であるが、いままで細菌に特異的なものと考えられてきた脱窒活性を示し、しかもP450nor遺伝子上流にFNRとNarL の結合領域に類似した配列が存在したことは、その脱窒系の遺伝子が細菌の場合と同様な機構で調節されている可能性を強く示すものである。もし同じ機構で発現調節がおこなわれているのであれば、生命進化を考える上できわめて興味深い課題を提供する。これを明らかにするために、*F. oxysporum* の他の脱窒系の遺伝子の取得が望まれる。

P450norはNADHより直接電子を受け取るという極めて特異な反応機構を持ちながら、放線菌のP450とは30～40%もの高い相同性を示すなど、P450の分子進化を考える上で、興味深い知見が得られている。従ってP450norの構造と機能の相関の解明は大きな関心の的となっている。そこで、P450norのタンパク工学的解析を行なうための発現系の構築を目指して、cDNAの大腸菌、酵母における発現を試みた。大腸菌においては、発現量はかなり少ないものの活性を持ったP450norの発現に成功した。酵母においては、可溶性タ

ンパクの約1.4%の発現量を得ることができた。大腸菌、酵母の両者において可溶性画分に発現したことから、本P450norが真核生物において初めての可溶性のP450であることが確認された。酵母の発現系では組換えP450norタンパクを精製し、その性質が *F. oxysporum* 由来のものと変わらないことを明らかにした。これらの結果は、本P450norが他のタンパク成分の助けを借りず、単独でNADHより電子を受け取ることを示す最終的な証明になったと考える。本P450norの機能を発表した当初[6)]、他のタンパクの混在、あるいはヘム以外の補因子の存在についての疑問が当然ながら多く投げかけられた。P450norによる特異な電子伝達機構を解明する上で、これらの疑問点について明らかにすることは極めて重要である。本論文の結果により、少なくとも、上記、中原らの論文[6)]において、精製されたP450norに、他のタンパク成分が混在していた可能性は否定された。

この酵母の発現系を用いて、タンパク工学的解析を行った。この系を用いてT243A変異体を作製、解析した。T243A変異体は野生型よりやや低下したものの強い活性を保持していた。従って、P450ファミリーで高度に保存されているこのThr残基は、P450norにおいては活性に必須ではないことが明らかとなった。

本P450norの結晶構造解析が現在進められている。今後、この結晶構造解析と、各種の変異体の作製による解析が進み、本P450norの構造と機能の相関が解明されることが期待される。

概要

脱窒などの嫌気呼吸は従来、原核生物（細菌）に固有の能力であると考えられていたが、最近*Fusarium oxysporum*をはじめとする多くの真菌類（かび）に脱窒活性を持つもののいることが当研究室において初めて見出だされた。*F. oxysporum*の脱窒系は硝酸イオンを3段階で還元し亜酸化窒素（N_2O）を生成する。各段階には固有の還元酵素、硝酸塩還元酵素（Nar）、亜硝酸塩還元酵素（Nir）、一酸化窒素還元酵素（Nor）が各々関与する。NirとNorは精製がなされており、Nirは銅タンパク、Norはユニークなチトクロームp450（P450nor）であることが明らかになっている。このP450norはかびの脱窒系に特異的なもので、細菌の脱窒系には見出だされていない。このP450norは、単独で下記反応を触媒する。

$$2NO + NADH + H^+ \rightarrow N_2O + H_2O + NAD^+$$

一酸化窒素は酸素分子のアナログでラジカルであり、モノオキシゲナーゼであるP450の強力な阻害剤として知られている。従って一酸化窒素を還元するというP450norの機能はP450として画期的なものである。通常のP450反応は、電子供与体としてNADHあるいはNADPHを必要とするが、P450は一分子のヘムのみをもつ一電子酸化還元体であるため、2電子を同時に転移するNAD(P)Hからの電子伝達には、フラビン等の、一電子還元（セミキノン）型が安定に存在しうる媒体の仲介が必須である。細菌*Bacillus megaterium*のP450BM-3のように、フラビンタンパクとP450の融合酵素であるがために電子伝達に他の成分を必要としない場合も知られているが、P450norのように一分子のプロトヘムのみを持つものでNADHから直接電子を受け取る例はこれまで皆無であり、その電子伝達様式の解明に興味が持たれる。

P450norのcDNAは既に得られており、そのアミノ酸配列が真核生物のP450よりも原核生物のものとより高い相同性を示すことなどの興味深い性質が明らかにされている。本研究ではこの特異なP450norに関し、主に遺伝子の面からの解析を行なった。

P450norタンパクが硝酸塩、亜硝酸塩により低酸素条件下で誘導されることが明らかにされている。そこでノーザン解析を行い、転写レベルでの発現調節について調べた。硝酸塩、亜硝酸塩によるP450norのmRNA誘導を、高通気条件、低通気条件及び嫌気条件で調べた。硝酸塩、亜硝酸塩どちらの場合でも、高通気条件では誘導がほとんど見られなかったのに対し、低通気条件では6時間後、嫌気条件では1時間後にはP450norのmRNAが誘導されていることが明らかとなった。このことから、硝酸塩、亜硝酸塩が誘導基質となって、転写レベルで誘導が行われていること、そしてそのmRNAの誘導が、酸素分圧の高い状態では抑制され、酸素不足の状態で促進されることが明らかとなった。

この発現調節機構を解析するため、5'上流領域を含むP450norゲノムDNAのクローニングを行なった。P450norのcDNAをプローブに用いてゲノムDNAライブラリーよりスクリーニングを行い、得られたクローン中の5'上流795 bpと3'下流219 bpを含むP450nor ゲノムDNA全長2598 bpの配列を決定した。P450nor ゲノムDNAはかびの遺伝子としては比較的多い、7つのイントロンを持っていることがわかった。P450norは細菌のP450と高い相同性を示し、放線菌*Streptomyces griseolus* のP450SU2とは約40 %の相同性を示すことから、過去に放線菌からかびへの遺伝子の水平伝達が起こったのではないかと考えられている。7つものイントロンが見い出されたことから、遺伝子の水平伝達があったとしてもかなり古い時代であろうと結論づけられる。5'上流

領域にはTATAボックスとともにFNR結合部位と相同の逆方向繰り返し配列が見いだされた。FNR(fumarate and nitrate reduction)とは、大腸菌その他の細菌の嫌気的成育にかかわる多くの遺伝子の発現調節因子であり、酸素分圧を感知する。さらに上流、転写開始点より610bp前後には大腸菌において硝酸イオンに対するセンサーレギュレーターシステムの一員として働くNarLの結合部位と似た配列も存在した。この結果より、P450norを含むカビ脱窒系が細菌の硝酸呼吸系と同様に、FNRに類似した酸素分圧に応答する調節機構と、硝酸塩／亜硝酸塩を感受する機構により二重の制御を受けている可能性も考えられた。*F. oxysporum* の脱窒系も細菌の系と同様の発現調節機構が働いているとすれば、生物の進化を考える上で大変興味深い。今後、ゲルシフト法や*F. oxysporum*の形質転換系の作製などにより、FNR、NarLなどの関与の有無を明らかにすることは極めて重要な課題となってくる。

次に、NADHからの電子伝達機構など、P450norの構造と機能の相関をタンパク工学的手法を用いて解析するための発現系の構築を試みた。Trcプロモーターをもつ発現ベクターpKK233-2を用いてP450norの大腸菌における発現を試みた。その結果、可溶性タンパクの約0.017 %の活性を保持したP450norタンパクの発現に成功した。このことから、本P450norが、真核生物では、初めての可溶性P450であることが示された。

大腸菌において発現に成功はしたが、タンパク工学的解析を行うには発現量が低かったので、より多くの発現量を目指して酵母における発現を試みた。構成発現発現プロモーターであるglyceraldehyde-3-phosphoglycerate dehydrogenase (GPD) 遺伝子のプロモーターをもつ発現ベクターpG-3と、ガラクトース誘導性のGAL1プロモーターを持った発現ベクターpYES2を用いて酵母における発現を行った。pG-3を用いた場合で可溶性タンパクの0.85 %、

pYES2を用いた場合で1.4％の発現量が得られた。このpYES2を用いた発現系から、組換えP450norタンパクの精製を行い、その諸性質が*Fusarium*由来のものとかわらないことを明らかにした。この結果及び大腸菌における発現結果から、本P450norが、他の電子伝達タンパクの介在を必要とせずに、単独でNADHより電子を受け取ることが最終的に証明された。

pYES2を用いた酵母の発現系を用いて、T243A変異体を発現させ解析した。T243A変異体は、活性を保持しており、NOに対する*K*m値は野生型とほぼ同等、NADHに対する*K*m値は野生型の2.2倍、*k*cat値は野生型の64％であった。従って、P450スーパーファミリーで高度に保存されているこのThr残基は、P450norにおいては活性に必須ではないことが明らかとなった。以上より、本酵母発現系が、種々のタンパク工学的解析を行うための、有効な手段となることが明らかとなった。

本P450norの結晶構造解析が現在進められている。今後、この結晶構造解析と、各種の変異体の作製による解析が進み、本P450norの構造と機能の相関が解明されることが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導下さいました筑波大学応用生物化学系教授　祥雲弘文先生、筑波大学生物科学系教授　多比良和誠先生、筑波大学応用生物化学系助教授　星野貴行先生、筑波大学生物科学系教授　齋藤建彦先生に心より感謝致します。

本研究に多大な御助言を頂きました筑波大学応用生物化学系講師　深水昭吉先生に深く感謝致します。

数々の実験を共同で行って下さいました小比賀健司氏、工藤孝氏、戴学清氏、遠藤実奈子氏に深く感謝致します。

そして、本研究に多大な御協力と御助言を賜わりました筑波大学応用酵素学研究室の皆様に感謝致します。

参考文献

1. Egami, F. (1973) A comment to the concept on the role of nitrate fermentation and nitrate respiration in an evolutionary pathway of energy metabolism. *Z. Apg. Mikrobiol.* 13, 177-181
2. Shoun, H., & Tanimoto, T. (1991) Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* 266, 11078-11082
3. Tanimoto, T., Nakahara, K., & Shoun, H. (1992) Diauxic growth of *Fusarium oxysporum* during aerobic culture in the presence of nitrate/nitrite. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 2058-2059
4. Shoun, H., Sudo, Y., Seto, Y., & Beppu, T. (1983) Purification and properties of a cytochrome P-450 of a fungus, *Fusarium oxysporum. J. Biochem.* 94, 1219-1229
5. Shoun, H., Suyama, W., & Yasui, T. (1989) Soluble, nitrate/nitrite-inducible cytochrome P-450 of the fungus, *Fusarium oxysporum. FEBS Lett.* 244, 11-14
6. Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K., & Shoun, H. (1993) Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J. Biol. Chem.* 268, 8350-8355
7. Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R.,

Waterman, M. R., & Waxman, D. J.(1991) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10, 1-14

8. Kizawa, H., Tomura, D., Oda, M., Fukamizu, A., Hoshino, T., Gotoh, O., Yasui, T., & Shoun. H. (1991) Nucleotide sequence of the unique nitrate/nitrite-inducible cytochrome P-450 cDNA from *Fusarium oxysporum. J. Biol. Chem.* 266, 10632-10637

9. Narhi, L. O., & Fulco, A. J. (1986) Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-Dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium. J. Biol. Chem.* 261, 7160-7169

10. Han, J. H., Stratowa, C., & Rutter, W. J. (1987) Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNAisolation and cDNA cloning. *Biochemistry* 26, 1617-1625

11. Cathala, G., Savouret, J.-F., Mendez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A.,& Baxter, J. D. (1983) Laboratory methods; a method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA* 2, 329-335

12. Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13

13. Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1984) Addendum to 11. *Anal. Biochem.* 137, 266-267

14. Specht, C. A., DiRusso, C. C., Novotny, C. P., & Ullrich, R. C. (1982) A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* 119, 158-163

15. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517

16. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

17. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463- 5467

18. Aviv, H., & Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 1408-1412

19. Bodner, M., & Karin, M. (1987) A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 50, 267-275

20. Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucl. Acid Res.* 10, 459-472

21. Spiro, S., & Guest, J. R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 75, 399-428

22. Li, J., & Stewart, V. (1992) Localization of upstream sequence elements required for nitrate and anaerobic induction of *fdn* (formate

dehydrogenase-N) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174, 4935-4942

23. Stewart, V., Parales, J., Jr., & Merkel, S. M. (1989) Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 171, 2229-2234

24. Tyson, K. L., Bell, A. I., Cole, J. A., & Busby, S. J. W. (1993) Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli nirB* promoter: interactions between FNR and NarL. *Mol. Microbiol.* 7, 151-157

25. Omer, C.A., Lenstra, R., Little, P. J., Dean, C., Tepperman, J.M., Leto, K. J., Romesser, J. A., & O'Keefe, D. P. (1990) Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus*. *J. Bacteriol.* 172, 3335-3345

26. Liang, Q., He,J. -S., & Fulco, A. J. (1995) The role of barbie box sequences as *cis*-acting elements involved in the barbiturate-mediated induction of cytochromes $P450_{BM-1}$ and $P450_{BM-3}$ in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 270, 4438-4450.

27. Spiro, S., Roberts, R. E., & Guest, J. R. (1989) FNR-dependent repression of the *ndh* gene of *Escherichis coli* and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 3, 601-608

28. Higuchi, R., Krummel, B., & Saiki, R. K. (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments : study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acid Res.* 16, 7351-

7367

29. Horton, R. H., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes : gene splicing by overlap extention. *Gene* 77, 61-68

30. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Fan, A. L., & Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol regent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

31. Leammli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

32. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354

33. Schena, M., Picard, D., & Yamamoto, R. K. (1991) Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast. *Methods Enzymol.* 194, 389-398

34. Ito. H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-138

35. Omura, T., & Sato, R. (1964) The carbon monooxide-binding pigment of liver microsomes : solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378

36. Dalziel, K. (1975) Kinetics and mechanism of nicotinamide-nucleotide-linked dehydrogenases, in *The enzymes*, 3rd ed., vol.

11.(Boyer, P. D. ed.) pp. 1-60, Academic Press, New York.

37. Imai, M., Shimada, H., Watanabe, Y., Matsushima-Hibiya, Y., Makino, R., Koga, H., Horiuchi, T., & Ishimura, Y. (1989) Uncoupling of the cytochrome P-450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: a possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7823-7827

38. Raag, R., Martinis, S. A., Sligar, S. G., & Poulos, T. L. (1991) Crystal structure of the cytochrome P-450_{CAM} active site mutant Thr252Ala. *Biochemistry* 30, 11420-11429

39. Shiro, Y., Fujii, M., Iizuka, T., Adachi, S., Tsukamoto, K., Nakahara, K., & H. Shoun. (1995) Spectroscopic and kinetic studies on reaction of cytochrome P450nor with nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 270, 1617-1623

40. Tuck, S. F., Hiroya, K., Shimizu, T., Hatano, M., & Ortiz de Montellano, P. R. (1993) The cytochrome P450 1A2 active site: Topology and perturbations caused by glutamic acid-318 and threonine-319 mutations. *Biochemistry* 32, 2548-2553

41. Ishigooka, M., Shimizu, T., Hiroya, K., & Hatano, M. (1992) Role of Glu318 at the putative distal site in the catalytic function of cytochrome $P450_d$. *Biochemistry* 31,1528-1531

42. Arai, H., Igarashi, Y., & Kodama, T. (1991) Anaerobically induced expression of the nitrite reductase cytochrome *c*-551 operon from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 280, 351-353

43. Galimand, M., Gamper, M., Zimmermann, A., & Haas, D. (1991) Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol.* 173, 1598-1606

44. Zumft, W. G., Dreusch, A., Löchelt, S., Cuypers, H., Friedrich, B., & Schneider, B. (1992) Derived amino acid sequences of the *nosZ* gene (respiratory N_2O reductase) from *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas stutzeri* reveal potential copper-binding residues. *Eur. J. Biochem.* 208, 31-40

45. Zitomer, R. S. & Lowry, C. V. (1992) Regulation of gene expression by oxygen in *Sacchromyces cerevisiae. Microbiol. Rev.* 56, 1-11

46. Keng, T. (1992) HAP1 and ROX1 form a regulatory pathway in the repression of *HEM13* transcription in *Sacchromyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol.* 12, 2616-2623

inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19