

還元的TCAサイクルでは4ヶ所で炭素固定反応を行い、そのうち2つが pyruvate ferredoxin oxidoreductase (POR), 2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase (OGOR)により触媒される。これらの酵素は既に精製され ferredoxinを電子供与体として機能することが示されている。これらの酵素の分子量、subunit構造、基質特異性などと共に、水素から還元的TCAサイクルの鍵酵素であるpyruvate synthase及び2-oxoglutarate synthaseまでのエネルギー代謝機構（電子伝達系）などの物理化学的性質が明らかになっているが、これらの遺伝子構造と機能に関する解明は進んでいない。そこで本研究ではRTCAサイクルの鍵酵素の一つであるOGORの遺伝子構造と機能の解析を目的とした。

1. 2つの2-oxoacid oxidoreductase遺伝子群の取得

精製されたOGORタンパク質の2つのsubunit ($\alpha\beta$)のN-末端アミノ酸配列に基づきオリゴDNAを合成し、*H. thermophilus* TK-6の染色体DNAから、PCR増幅によりOGOR構造遺伝子の部分断片を得た。このPCR産物をprobeとしてOGOR遺伝子を含む6.8-kbのSacl断片をCharomidベクターを用いてクローニングした。塩基配列分析により、OGORの構造遺伝子上流に他の2-oxoacid oxidoreductase (For)の遺伝子が存在していることを確認した。そこで、この遺伝子群を含む2.1 kbのPstIと1.4 kbのHindIII断片をそれぞれpKF3とpGEM-T-Easyベクターを用いてクローニングした。

2. 2-oxoacid oxidoreductase遺伝子群の構造解析

Sacl 8.4-kb断片の塩基配列を決定したところ、予想した分子量の蛋白質 [GorA (68-kDa)とGorB (33-kDa)]をコードするOGORの構造遺伝子(*gorAB*)が存在していた。さらに22-と24-kDaの蛋白質をコードする2つの機能未知のORF (*orf3*と*orf4*)が*gorAB*の下流に存在していた。*gor*上流逆向きに存在する*for*遺伝子群は*forD-forA-forB-forG-fdx-orf6*の順で並んでおり(図3)、それぞれ27-(ForD), 43-(ForA), 32-(ForB), 25-kDa(ForG)の蛋白質をコードし、*fdx*と*orf6*は8-kDa, 11-kDaの蛋白質をコードしていた。*gor*と*for*構造遺伝子の翻訳アミノ酸配列と他の2-oxoacid oxidoreductase(Or)とのmultiple alignmentで、それらはお互いに相同性があることが示された。TK-6のFOR, GORは他のORと同じようにYPITP motif (ForAとGorA)、redox center (ForBとGorB), CoA結合部位 (ForGとGorA)、TPP結合部位が保存されていた。GorAには γ と α motifが存在したため、 γ - α fusion typeであることが示唆された。*for*遺伝子群はTK-6と*Aquifex aeolicus*だけに見られる特異な順で(D-A-B-G)並んでいた(図3)。*gor*遺伝子群の*orf3*, *orf4*と相同な遺伝子はデータベースの上では認められなかった。ORF3は複数のcystein残基を持っており、redox proteinであると示唆された。

3. 2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase (GOR)とferredoxin oxidoreductase (FOR)遺伝子群の機能

大腸菌でGORとFOR遺伝子を発現させるため、それらをpUC19の*lac* プロモーターの下流にクローン化して、いくつかの発現プラスミドを構築した。

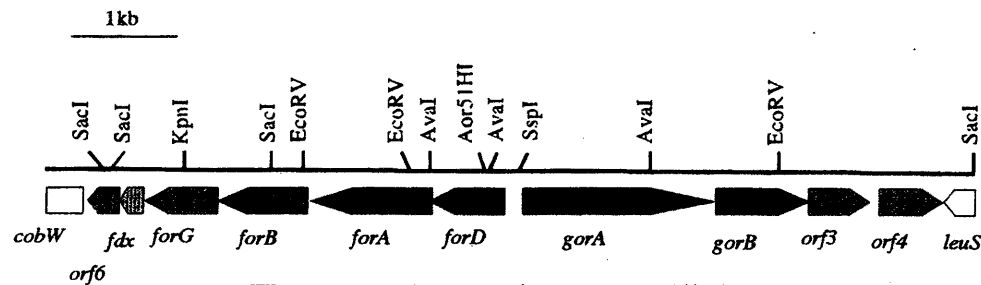


図3. GORとFOR遺伝子群の構造

GORの発現のために構築したpYNA101 (*gorA-gorB-orf3-orf4*), pYNA102 (*gorA-gorB-orf3*), pYNA103 (*gorA-gorB*), pYNA104 (*gorA-gorB-orf4*)を*E. coli* JM109をhostとして発現した結果、すべてのプラスミドで組み換え酵素の活性が確認できた。この結果から*orf3*と*orf4*は大腸菌のなかで活性型酵素の発現には必要ではないことが示唆された。

*for*遺伝子群の機能解析のため、プラスミドpYNA201 (*forD-forA-forB-forG*), pYNA 202 (*forD-forA-forB-forG-fdx*), pYNA203 (*forD-forA-forB-forG-fdx-orf6*)を構築した。そしてferredoxinと δ -subunitの機能を調べるため、*forD*遺伝子にdeletion mutationを入れたpYNA204 (*forD⁻-forA-forB-forG-fdx*)とferredoxin遺伝子にframe-shift mutationを入れたpYNA208 (*forD-forA-forB-forG-fdx⁻*)を構築した。それらのプラスミドで大腸菌を形質転換し、IPTGで誘導された蛋白質の活性を嫌気条件下で測定した。活性測定は、2-oxoglutarateを基質としてmethyl viologenの還元活性により行った。pYNA202と203はFOR活性を示したが、pYNA201, 204, 208の場合は活性がなかったので、*forD*と*fdx*遺伝子はFOR蛋白質の活性化に必要であることがわかった。pYNA203の活性はpYNA202より高い値を示したので、*orf6*がFORの完全活性化に関与していると考えられた。FORとGORの組み換え蛋白質としてpYNA101とpYNA202のcell free extractを用い、さまざまな2-oxoacidに対する特異性を調べたところ、両方とも2-oxoglutarateにのみ高い特異性を示したので、TK-6菌体のなかで*gor*と*for*遺伝子群はともに2-oxoglutarate oxidoreductaseを生産していると考えられた。

4. 2-oxoacid oxidoreductaseの系統分類学的解析

2-oxoacid oxidoreductase (Or)のhomologsは多様な古細菌、真正細菌、一部のamitochondrial eukaryotesで見られる。*H. thermophilus* のFOR, GORと他のOr family membersとの進化的観点での関係を解析した。系統学的解析より、Or familyは6個のsubfamilyに分けられ、gene duplication, lateral transfer, gene lossなどの現象がOr familyの進化中に起きたことが考えられた。そして還元型のcarboxylation 反応を触媒するTK-6株の2-oxoacid oxidoreductaseは酸化型のdecarboxylation反応を触媒する2-oxoacid oxidoreductaseと相同性を示した。TK-6株のGORは古細菌に、FORは真正細菌に近い関係を示し、還元的TCAサイクルは少なくともancestral Orsが真核生物、真正細菌、古細菌に分かれる前に存在したと思われた。

まとめ

本研究では水素細菌*H. thermophilus* TK-6株から還元的TCAサイクルの鍵酵素の中の一つである2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductaseの遺伝子と もう1つの2-oxoacid oxidoreductaseをコードする遺伝子群を単離し、その構造を解析した。*gor*遺伝子群はGorAとGorBをコードする2つの構造遺伝子*gorAB*と共に2つの未知のORFが下流に存在し、22 (Orf3)と24-kDa (Orf4)の蛋白質をコードしていた。*for*遺伝子群は*forDABG-fdx-orf6*の順で並んでおり、それぞれ27, 43, 32, 25, 8, 11-kDaの蛋白質をコードしていた。*for*と*gor*の塩基配列からの翻訳アミノ酸配列には、他の2-oxoacid oxidoreductaseからも見られるYPITP motif, redox center, CoAとTPP結合部位などのmotifが保存されていた。*gor*遺伝子群のORF3とORF4と*for*遺伝子群のORF6とは相同性がある蛋白質は見られないが、ORF3は複数のcystein残基が見られ酸化還元蛋白質ではないかと思われる。大腸菌中で発現された組み換えGORとFORは2-oxoglutarateにのみ基質特異性を示した。*orf3*と*orf4*は*gor*遺伝子群からの活性型酵素の発現に必須ではないが、*for*遺伝子群の*forD*と*fdx*遺伝子は、FOR蛋白質の活性化に必要であり、*orf6*もFOR蛋白質の活性化に関与すると思われる。また、TK-6株の2-oxoacid oxidoreductasesと他のhomolog蛋白質間の系統的解析を行い、進化的観点からの考察を行った。