

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 11 年度博士課程 入学

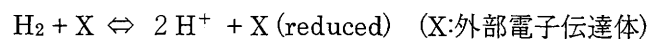
氏名 上田 康史

指導教官名 五十嵐 泰夫

論文題目

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の水素酸化機構に関する研究

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 株は生育至適温度が 70℃ の高度好熱性水素細菌である。本菌は水素を唯一のエネルギー源、二酸化炭素を唯一の炭素源とする絶対独立栄養性という興味深い性質を有している。一般的な通性独立栄養水素細菌は従属栄養時と比べて独立栄養時の生育速度が著しく遅いのに対し、本菌の倍化時間は最大で約 1 時間と他の従属栄養細菌と同等、もしくはそれ以上の速度を示している。本菌は連続培養を行えば、20 時間の培養で無機培地約 13l から湿菌体約 150g を得ることが可能である。このような条件における本菌の生育に必要なエネルギーはヒドロゲナーゼにより水素から取り出されているため、ヒドロゲナーゼ系を総合的に明らかにすることは極めて重要である。そこで本論文ではエネルギー獲得経路に注目し、初発段階である水素から電子を取り出す反応を触媒する酵素、ヒドロゲナーゼについて主に研究を行った。ヒドロゲナーゼ（水素酸化還元酵素）とは下式のような反応を可逆的に触媒する酵素であり、水素ガス取り込みを触媒するものは[Ni-Fe]型として知られている。



1. ヒドロゲナーゼ遺伝子の取得

H. thermophilus TK-6 では当研究室の瀧下らにより 1 種類のヒドロゲナーゼが精製されている。この N 末端アミノ酸シーケンスをもとに mix primer を合成し、クロモソーム DNA を template として PCR を行った結果、約 1.0kbp の PCR 断片が取得された。この断片は他の菌のヒドロゲナーゼ遺伝子とホモロジーを持っていたので、DIG により標識化したこの PCR 断片を probe として、制限酵素処理したゲノム DNA に対して Southern hybridization を行った。その後、TK-6 株ゲノムライブラリーについてコロニーハイブリダイゼーションを行い、*Pst* I 3.5kbp、*Eco*R I - *Kpn* I 4.2kbp のヒドロゲナーゼ遺伝子群を含む 2 つの遺伝子断片を得た。遺伝子配列を決定したところ、small subunit、large subunit の構造遺伝子の下流にアクセサリ遺伝子群のひとつである酵素の成熟過程で作用するプロテアーゼの遺伝子 (*hoxM*) と相同性の高い配列があることが判明した。この遺伝子 cluster を *hox* 遺伝子群と名付けた。構造遺伝子についてヒドロゲナーゼの保存モチーフを調べたところほとんど保存されておらず、精製タンパクが本菌に固有なキノンであるメチオナキノンと直接反応することからも特殊な [Ni-Fe] 型ヒドロゲナーゼであることがわかった。

本菌の無細胞抽出液画分、膜画分可溶化液を各種の分取精製用のカラムをもちいて分画すると複数の画分にヒドロゲナーゼ活性がみられるため、取得したヒドロゲナーゼ以外にもヒドロゲナーゼが存在することが示唆された。このため、本菌の近縁種ですでに全遺伝子配列が明らかになっている *Aquifex aeolicus* の遺伝子配列をもとにクローニングを行うことにした。*A. aeolicus* には 3 種のヒドロゲナーゼ様遺伝子 (*mbh1*, *mbh2*, *mbh3*) が確認されているのでそれぞれの large subunit の部分配列を *A. aeolicus* のクロモソーム DNA を template として PCR によって増幅し、塩基配列を確認した後、DIG 標識化した PCR 断片を probe として制限酵素処理した TK-6 ゲノム DNA についてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、3 種の probe 全てに positive なバンドが得られたため、それぞれについてコロニーハイブリダイゼーションによるクローニングを試みた。

mbh1 由来の probe については最初に *Kpn* I 3.8kbp の断片が取得された。この断片には large subunit の部分配列と直接電子伝達体と考えられる *cytochrome b*、アクセサリ遺伝子 *hypF* の部分配列が含まれていた。さらに TK-6 ゲノムライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションを行い、small subunit の全配列、large subunit の残りの配列を決定し、これらの構造遺伝子を *hyd1S*, *hyd1L* とそれぞれ命名した。相同性検索、モチーフの確認よりこの遺伝子は典型的な膜結合型 [Ni-Fe] 型ヒドロゲナーゼであることがわかった。

同様の方法により *mbh2* 由来の probe を用いて large subunit のみからなる *hyd2* を、*mbh3* 由来の probe を用いて small, large subunit からなる *hyd3* をクローニングし、塩基配列を決定

した。*hyd2*、*hyd3* ともに[Ni-Fe]型ヒドロゲナーゼの活性中心付近のモチーフが保存されており、[Ni-Fe]型ヒドロゲナーゼの遺伝子であることが予想された。またそれぞれのヒドロゲナーゼについて相同性検索を行った。

一般にひとつの細菌が複数のヒドロゲナーゼをもつことは特殊ではない。しかしながら、そうした菌のほとんどは菌体内の過剰還元力の除去装置として水素発生方向にヒドロゲナーゼを機能させている。本菌の場合、絶対独立栄養という栄養形式を考慮すると今回取得された4種のヒドロゲナーゼはそのほとんどが水素酸化の方向に働いていると考えられる。このような菌が4種のヒドロゲナーゼ遺伝子を持っているという知見が得られたのは初めてのことである。

2. 4種のヒドロゲナーゼ遺伝子群の発現解析と機能の推定

本菌のクロモソーム遺伝子から4種類のヒドロゲナーゼ遺伝子が取得されたことで本菌の水素酸化系が複雑であることが予想された。また4種の遺伝子がどのように発現されているか興味を持たれたので RT-PCR の手法を用いて発現解析を行った。

培養した菌体を遠心により集菌し、ペレットを ISOGEN で懸濁し、クロロホルム添加、イソプロパノール沈澱を行った後、DNase(RNase-free)処理を行い、ISOGEN 以後の処理を繰り返すことで total RNA を抽出した。抽出した RNA 1 μ g について random 9mer を primer として逆転写反応をおこない、引き続きそれぞれのヒドロゲナーゼ large subunit 遺伝子に specific な primer を使用して PCR 反応をおこなった。

まず、通常のガス組成 ($H_2:O_2:CO_2=12:3:5$) 条件において 10l 容 jar fermentor を使用して batch 培養を行い、対数増殖期前期、中期、後期について菌体を回収し、それぞれの菌体について RT-PCR を行った。その結果、4種のヒドロゲナーゼはいずれの phase においても全て転写されていることがわかった。RT-PCR では定量性を論じることはできないが、*hox*、*hyd1* は明らかに他の2種よりも多く転写されている(総 RNA 中の m-RNA の比率が高い)ことが推測された。

続いてガス組成中の水素分圧を下げた系 ($H_2:O_2:CO_2:N_2=4:3:5:8$) の対数増殖期について検討を行った。その結果、*hyd2*を除く3種の転写が確認された。

ヒドロゲナーゼはその活性中心が金属を含むことから一般的に酸素により不活性化されやすいことが知られている。そこで TK-6 株が増殖できる酸素濃度の上限に近い条件 ($H_2:O_2:CO_2=9:6:5$) についても検討を行った。この場合も4種類のヒドロゲナーゼ全てが転写されていることには変わりはない。しかし、これまで最も強い強度のバンドを示していた *hyd1* のバンドが *hox* と比較して弱くなっていた。これは内膜の periplasm 側に結合している Hyd1 が酸素の影響を受けやすいためと考えられた。

最後に、本菌が増殖可能であることが確認されている嫌気条件、硝酸呼吸条件 ($H_2:CO_2=3:1$) で生育させた菌体についても RT-PCR を行ったが全体のバンドの強度は弱まったものの、パターン的には通常のガス組成における培養と変わらなかった。

これらの結果により、取得された4種のヒドロゲナーゼ遺伝子は遺伝子が存在しているのみではなく、実際に転写され機能していることが明らかとなった。

以上の結果により、取得されたヒドロゲナーゼ遺伝子の機能を推定した。

- *hyd1*: 一般的な膜結合型ヒドロゲナーゼとして水素から電子を取り出し、獲得した電子を膜内の呼吸鎖へと提供する。4つのヒドロゲナーゼの中でもメインの働きをしていると考えられる。
- *hyd2*: はっきりした機能は解明できなかったが、水素濃度が高い条件において補助的に機能する。
- *hyd3*: 各条件において常に発現しており、*Ralstonia eutropha* において近年発見された菌体内の水素を感知しヒドロゲナーゼの発現を促す regulatory hydrogenase とホモロジーがあるため、水素の sensing に関与している可能性がある。
- *hox*: Cell debris を含む膜画分の可溶化液から精製されたタンパクであるため膜結合型ヒドロゲナーゼと予想された。しかし、細胞内で翻訳され、folding した pro-酵素が膜を通過するのに必要な TAT(twin arginine translocation)モチーフが遺伝子配列に含まれていなかった。このため、膜に結合しているとしても一般的な膜結合型とは異なる結合様式で内膜の cytoplasm 側に緩く結合し、主に cytoplasm 側でキノンを直接電子受容体として還元力を提供していると考えられる。

推定した本菌の水素酸化機構を下図に示した。

