

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 11 年度博士課程入学

氏名 Songkran Chuakrut

指導教官 五十嵐 泰夫

論文題目 Studies on the carboxylating enzyme of the modified 3-hydroxypropionate cycle in *Acidianus brierleyi*
(*Acidianus brierleyi* における修飾型 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルの炭酸固定酵素に関する研究)

序論

Acidianus brierleyi は、生育至適温度 70°C 及び生育至適 pH1.5~2 を有する通性嫌気性、好熱性、通性独立栄養性の硫黄代謝性アーキアである。本菌は、独立栄養的生育時には修飾型 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルを炭酸固定サイクルとして機能させていることが既に報告されている。3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルは当初は緑色非イオウ細菌である *Chloroflexus auranticus* で提案されたものであるが、最近ではアーキアでも機能性が示唆されている。本サイクルにおいて実際に炭酸固定を触媒している酵素は Acetyl-CoA carboxylase と Propionyl-CoA carboxylase である。*Chloroflexus auranticus* においては 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルの酵素の内、Malonyl-CoA reductase と Propionyl-CoA synthase が既に精製されているが、本サイクルの鍵酵素とも言える炭酸固定酵素は未だ精製されていない。

Acetyl-CoA carboxylase と Propionyl-CoA carboxylase はそれぞれ脂肪酸合成と二次代謝物合成に関与していることが知られている。この 2 種の酵素は植物、動物、酵母、藻類、並びにバクテリアを起源として精製されている。しかしながら、アーキアからの精製例は報告されていなかった。以上のような背景の下、本研究では *A. brierleyi* からの Acetyl-CoA carboxylase と Propionyl-CoA carboxylase の精製と生化学的性質を明らかにすることを目的とした。さらに、大腸菌の変異株を用いた相補性試験により遺伝子の機能的発現も試みた。以下に、本論文の概要を述べる。

1. *Acidianus brierleyi* の独立栄養的増殖

まず、*A. brierleyi* を、通気ガス (10% CO₂ 並びに 90% 空気、流量 : 3.5 L min⁻¹) 中の炭酸ガスを唯一炭素源、培地中のテトラチオン酸 (S₄O₆²⁻) を唯一エネルギー源として、完全無機培地を用いて独立栄養的に培養した。70°C かつ pH 2.0 なる至適培養条件下で本菌は、回分培養において $\mu_{\max} 0.057 \pm 0.010 \text{ h}^{-1}$ (倍化時間 : 18.0 ± 3.1 h) で、fed-batch 培養において $\mu_{\max} 0.034 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$ (倍化時間 : 29.7 ± 5.8 h) で生育した。回分培養における乾燥菌体の収量は 0.066 ± 0.014 g/L であり、fed-batch 培養における値 (0.067 ± 0.011 g/L) と概ね同等であった。一方、回分培養におけるモル増殖度は 2.42 ± 0.24 g/mol であり、fed-batch 培養における値 (3.60 ± 0.91 g/mol) の約 2/3 であった。全体として、46L の培養液から約 30.6g の湿菌体を調製できた。

2. *Acidianus brierleyi* からの Acyl-CoA carboxylase の精製と特徴付け

Streptavidin-peroxidase conjugate を用いたプロットティング実験から本菌中には 1 種類だけの Acyl-CoA carboxylase が存在していることが示唆された。本酵素は、Streptavidin を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーと Superose 6 を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製された。精製途上においては、Acetyl-CoA carboxylase 活性の認められる全てのフラクションにおいて、Propionyl-CoA carboxylase 活性が測定された。また、精製過程の全てにわたり Acetyl-CoA carboxylase と Propionyl-CoA carboxylase の比活性の比は一定であった。この結果は、*A. brierleyi* の Acyl-CoA carboxylase が修飾型 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルにおいて二機能性酵素であることを示している。Acetyl-CoA carboxylase を指標として、無細胞抽出液中の存在量を概算した所、全蛋白質の約 4% が Acyl-CoA carboxylase であることが示された。本菌においては、独立栄養的生育時に、Acyl-CoA carboxylase が誘導されることが知られており、上記知見はこうした過去の知見と合致するものである。精製酵素の比活性は Acetyl-CoA carboxylase ベースでは 14.5 ± 1.01 $\mu\text{mol fixed CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ であり、Propionyl-CoA carboxylase ベースでは 11.9 ± 0.92 $\mu\text{mol fixed CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ であった。

精製酵素の活性がアビジンにより阻害されたことから、精製 Acyl-CoA carboxylase がビオチン酵素であることが明らかとなった。本酵素は、見かけの分子量がそれぞれ 62、59、20 kDa である 3 サブユニットからなる、新規なサブユニット数を有することが示された。また、全体の分子量が 540 kDa であることが示され、サブユニット構造としては $\alpha_4\beta_4\gamma_4$ 構造をとっていることが示唆された。アミノ末端アミノ酸配列解析からは、59 kDa の蛋白質が Biotin Carboxylase (BC) であり、20 kDa の蛋白質が Biotin carboxyl carrier protein (BCCP) であることが示された。精製酵素の至適温度は 60~70°C、至適 pH は 6.4~6.9 であった。精製酵素は Acetyl-CoA あるいは Propionyl-CoA、ATP、Mg²⁺、並びに HCO₃⁻ を活性発現のために絶対的に必要としていた。Acetyl-CoA に対する見かけ上の K_m 値並びに V_{max} 値は、それぞれ 0.17 ± 0.03 mM、43.3 ± 2.8 U mg⁻¹ であり、Propionyl-CoA に対するそれぞれの値は 0.10 ± 0.008 mM、40.8 ± 1.0 U mg⁻¹ であった。この結果は、*A. brierleyi* の Acyl-CoA carboxylase が修飾型 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルにおいて二機能性酵素であることをさらに裏付けている。また、Acetyl-CoA carboxylase 活性も Propionyl-CoA carboxylase 活性も、malonyl-CoA, methymalonyl-CoA, succinyl-CoA あるいは Coenzyme A により阻害されたが、palmitoyl-CoA によっては阻害されなかった。

3. *A. brierleyi* からの Acyl-CoA carboxylase をコードする遺伝子のクローニングと配列解析

Southern hybridization のための DNA プローブは、BC と BCCP のそれぞれのアミノ末端のアミノ酸配列をもとに合成したプライマーを用い、PCR により調製した。上記プローブを用いて検出された2種類の *Xba*I フラグメント (3.5 kb *Xba*I 並びに 8.0 kb *Xba*I) を選択し、3.5 kb のフラグメントは pSXb を用い、8.0 kb のフラグメントは pLXb を用いてクローニングを行った。3.5 kb のフラグメントは *Eco*RI により、また、8.0 kb のフラグメントは *Pst*I によりサブクローン化を行った。サブクローン化されたフラグメントの遺伝子配列は、合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて遺伝子の両方向から決定した。BC サブユニットは *accC* (position 2036-3565)によりコードされており、509 アミノ酸残基から成っていた。また、BCCP サブユニットは *accB* (position 3565-4068) によりコードされており、167 アミノ酸残基から成っていた。*accB* の開始コドンの初めのヌクレオチドは *accC* のストップコドンの3番目のヌクレオチドと重なっていた。5番目の ORF (*pccB*, position 4149-5723 or 4176-5723)はカルボキシトランスフェラーゼ (CT)をコードしていたが、開始コドンとなる可能性のあるコドンが2箇所 (4149 或いは 4176)見出された。初めのコドン (4149)は、直上流にリボゾーム結合部位 (RBS)が見出されたが、二番目のコドンには見出されなかった。このことは、初めの ATG が開始コドンであることを示唆しており、*pccB* は 524 アミノ酸残基をコードしていることが示唆された。本菌の Acyl-CoA carboxylase 遺伝子のプロモーター配列、リボゾーム結合部位 (RBS)、並びに転写終結シグナルはアーキアの既知の配列との比較によって同定された。結果としては、*accC* と *accB* はオペロンとして、*pccB* は単独の mRNA として転写されていることが示唆された。

蛋白質の Multiple sequence alignment 解析によって、アーキア由来のアミノ酸配列はユーカリアよりも寧ろバクテリアにより近いことが示された。なお、他の生物において知られているモチーフのいくつかは、本菌においても保存されていた。例えば、本菌の BC の配列においては、ATP 結合に関わるグリシンに富んだ領域並びに4つの活性中心残基が認められた。さらに本菌の BCCP においては、EAMK³⁵S 配列としてのビオチン結合部位、並びに、周辺配列が高度に保存されていた。なお、EAMK³⁵S 配列におけるリジン残基はビオチン化される部位であるが、多くのビオチン酵素において同リジン残基はC末端から 35 番目のアミノ酸として存在しており、本菌においても同様であった。上述の周辺配列の保存性に関しては、グリシン並びにプロリン残基の、リジン残基からの相対的位置取りという点で、他の生物由来のものと同様であった。即ち、リジンの位置を 0 とすると、プロリン(-29)、グリシン(-16)、グリシン(-10)、グリシン(+11)が他種生物由来のものと同様に保存されていた。また、本菌の CT サブユニットには acyl-CoA 結合部位並びにカルボキシビオチン結合部位が認められた。

4. Acyl-CoA carboxylase 遺伝子の*E. coli*変異株における機能的発現

A. brierleyi の Acyl-CoA carboxylase 遺伝子を PCR 法によりゲノム DNA から単離した。*accB* と *pccB* の中間領域を除去し、*pccB* の上流には*E. coli*の RBS を導入した。得られたフラグメントの配列の正しさ確認した後、pUC19 もしくは pET21 に連結し、それぞれ pUACC7 あるいは pEACC5 を作成した。pUACC7 で形質転換した *E. coli* JM109 株を用いて ACC 遺伝子群を発現させた場合、極少量の BCCP 蛋白質のみが可溶性画分もしくは

インクルージョンボディ画分に生産されるだけであった。一方、pEACC5 で形質転換した *E. coli* BL21 (DE3) 株を用いた場合には、著量の BCCP が可溶性画分に検出された。加えて、BC と CT もインクルージョンボディ画分に多量に生産されていた。しかしながら、発現された BCCP を Streptavidin 法により解析した所、*E. coli* の BCCP に比べると *A. brierleyi* BCCP へは、極微量のビオチン分子しか取り込まれていないことが明らかとなった。

A. brierleyi の BCCP が *E. coli* の BCCP を相補できるか否かを決定するために、*E. coli* L8 [*accB22* (Ts)] を用いた実験を行った。上記 *E. coli* の温度感受性変異株は 30°C では生育できるが、それ以上の温度では BCCP 蛋白質を作れないため生育できなくなる。pUACC7 で形質転換された *E. coli* L8 株は 42°C では生育できず、*A. brierleyi* の BCCP は *E. coli* の BCCP を相補できなかった。次に、recombinant 酵素を活性型として得るために、*E. coli* BL21 (DE3) 株を用いて、*accC-accB* と *pccB* を別々に発現させることを試みた。この場合、BC と CT はインクルージョンボディとして生産され、6 M guanidine-HCl により可溶化された。しかしながら、希釈並びに透析による renaturation の過程で蛋白質の aggregation が生じたため、可溶化蛋白質を再構成することは出来なかった。

5. 結論

A. brierleyi から Acyl-CoA carboxylase の精製と特徴付けをまず行った。これは、アーキアとしては初めての例である。精製酵素は以下の点において他の acetyl-CoA carboxylase と共通の性質を示した。即ち、(1) ビオチン並びに ATP に依存するカルボキシラーゼである。(2) 反応に、二価金属(Mg^{2+})、重炭酸、ならびに acetyl-CoA (或いは propionyl-CoA) を必要とする。(3) 3つの機能部位を有し、保存モチーフを有する。しかしながら、*A. brierleyi* の Acyl-CoA carboxylase のいくつかの性質は他の Acetyl-CoA carboxylases とは異なっていた。そうした性質とは、サブユニット構造、Acetyl-CoA と Propionyl-CoA に対する K_m の比、至適 pH 及び至適温度、さらには palmitoyl-CoA による酵素の活性化である。こうした結果から、精製 Acyl-CoA carboxylase がその機能面と特質面で特異なものであることを示す一方、アミノ酸配列の保存から示されるように分子レベルでは他の酵素と共通の性質を示すことを、明らかにした。

なお、BC と BCCP の3次元構造は既に明らかにされているが、CT 並びにホロ酵素の結晶構造は未だに報告されていない。そのため、*A. brierleyi* の Acyl-CoA carboxylase の結晶構造解析が将来の研究として大いに期待される所である。