

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成12年度博士課程 入学

氏 名 山 本 正 浩

指導教官 五 十 嵐 泰 夫

## 論文題目

好熱好気性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株由来の  
二つの 2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase に関する研究

## 緒言

*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株は好熱好気性、絶対化学独立栄養性の水素酸化細菌である。本菌株は二酸化炭素固定経路として還元的 TCA サイクルと呼ばれる独特な回路を有している。還元的 TCA サイクルでは TCA サイクルを逆回転させることで二酸化炭素を同化することができる。2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase (OGOR)は本回路の鍵酵素のひとつであり、succinyl-CoA から 2-oxoglutarate への炭酸固定反応を触媒する。強力な還元力がこのカルボキシル化反応に要求され、還元型フェレドキシン(Fd)がこの反応の電子供与体として機能すると考えられている。

TK-6 株は2種類の OGOR を持つと予想された。すなわち For と Kor である。Kor は既に TK-6 株から精製されていた。この酵素は $\alpha\beta$ -型である。 $\alpha$ -,  $\beta$ -サブユニットは *korAB* 遺伝子にコードされる。*KorAB*、*orf3*、*orf4* によりひとつのオペロンが形成されている。しかしながら、*orf3* と *orf4* の遺伝子産物の機能は不明である。興味深いことに、もうひとつの 2-oxoacid oxidoreductase (OR)をコードする遺伝子クラスターが *kor* 遺伝子クラスターの上流隣に逆向きに存在していた。この *forDABGEF* と名付けられた遺伝子群はひとつのオペロンを形成していた。この *for* 遺伝子クラスターにコードされる蛋白質を大腸菌で発現させ無細胞抽出液 (CFE) を調製したところ、この CFE は 2-oxoglutarate に対して高い OR 活性を示したが他のどの 2-oxoacid にも高い OR 活性は見られなかった。したがって For は Kor と並ぶもうひとつの OGOR であることが示唆された。

私は、これら二つの OGOR に関して、その酵素学的特徴と生理的意義についてさらに知見を深めるべく研究を行った。

## 1. OGOR の大腸菌での発現と精製、および酵素学的特徴付け

Kor は既に前任者らによって、TK-6 株の菌体から精製され、その酵素学的特徴について報告されていた。私は、より簡便な調製法として大腸菌からの組換え Kor の発現と精製を試みた。本酵素が耐熱性であることから、CFE に熱処理を加えることで精製の行程を簡便化することに成功した。得られた酵素は、その最大活性速度において過去の報告よりも約 2 倍高い値が得られ、精製行程の簡便化による精製効率の上昇が認められた。それ以外の酵素学的な特徴は、過去の報告と差が認められなかったため、ネイティブ酵素と同等の酵素とみなして、以下の実験に使用した。

For については、その遺伝子は得られていたものの、精製蛋白質は得られていなかったため、大腸菌からの組換え For の発現と精製を行った。精製された蛋白質を SDS-PAGE に供したところ、ゲル上には 5 本のバンドを確認することができた。4 本の大きなバンドは上から順に *forA*, *forB*, *forD*, *forG* 遺伝子産物の計算上の分子質量とそれぞれ一致した。最も低分子の位置のポリペプチドの N-末端アミノ酸配列を決定した。その結果、*forE* 遺伝子にコードされるアミノ酸と一致した。この結果と、*forD* や *forE* 遺伝子を欠失させた発現プラスミドを用いた場合に酵素活性が得られなかったという結果を合わせると、For が 5 種類のサブユニット、すなわち ForA, ForB, ForG, ForD, ForE から成る酵素であると考えられた。これはそれまで知られていたどの OR のサブユニット構造のタイプにもあてはまらず、新規のサブユニット構造を持つ OR であることが示唆された。

For の酵素学的特徴付けとして、分子量、基質特異性、至適温度、至適 pH、耐熱性、耐酸素性、基質親和性などの測定を行い、かつ Kor の特徴と比較した。For と Kor の特徴の差について、最大活性と熱安定性および酸素感受性の違いに興味を持たれた。methylviologen 還元活性において For の最大速度は Kor の約 1/10 程度であった。熱安定性は For の方が Kor よりも好気・嫌気の両条件において総じて高い値を示した。興味深いことに、TK-6 株の至適生育条件である 70°C、好気条件では For は比較的安定なのに対し、Kor は大部分が失活した。一般的に OR は酸素感受性が高いことが知られているが、Kor の酸素耐性は比較的高い。For の酸素耐性がそれを上回ったことから、TK-6 株の OGOR が一般的な OR と比べて好气的環境に順応していることが考えられた。

## 2. OGOR による炭酸固定反応

上述の OGOR の酵素学的な解析は主に脱炭酸反応の触媒能を指標に行った。本酵素の生理的意義を考慮した場合、炭酸固定反応の触媒能を解析することが望ましい。しかしなが

ら、これまで、試験管内での活性測定は、電子供与体の枯渇などの原因により困難であるとされてきた。私は測定系を改良し、本酵素による炭酸固定反応の動力学的解析を可能にすることを試みた。

電子供与体である還元型 Fd の供給が系内で維持されるために、Fd を還元する酵素として pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (POR) を系に加えることにした。また、glutamate dehydrogenase (GDH) も反応系に加えることにした。これにより炭酸固定反応の生成物である 2-oxoglutarate の生成を、GDH による NADH の酸化を伴う glutamate の生成でもって分光光学的に追跡することができる。Fd と POR は TK-6 株由来の遺伝子を大腸菌に組換えて発現・精製したものをを用いた。Fd は 2 種類(Fd1、Fd2)用意した。GDH は *Sulfolobus tokodaii* 由来の好熱性 GDH の遺伝子を大腸菌に組換えて発現・精製したものをを用いた。まず、OGOR による Fd の還元反応の測定から OGOR の Fd に対する  $K_m$  値を求め、炭酸固定反応に十分な Fd の濃度を決定した。次に POR による Fd の還元速度と 340 nm の吸収を求め、本実験系における POR の最大濃度と速度を設定した。OGOR による炭酸固定反応速度がこれを超えないように濃度を調節しながら測定を行った。また、GDH についても反応速度を求め十分量添加した。構築された測定系を用いて酵素活性を観察したところ、OGOR による炭酸固定反応が観察された。For、Kor 共に、試験管内で炭酸固定反応を触媒することが精製蛋白質を使って示された。活性速度は、酸化反応の場合と同様に、Kor の方が For よりも高かった。For、Kor 共に、炭酸固定反応速度は脱炭酸反応速度を下回った。これは測定系の最適化が不十分だからかも知れない。最適条件の更なる検討が必要であると考えられた。

### 3. OGOR の発現解析と遺伝子破壊

ウェスタンブロットにより For と Kor の発現解析を行った。解析は酸素呼吸条件および硝酸呼吸条件で培養した TK-6 株について行った。その結果、Kor は酸素呼吸・硝酸呼吸の両条件において定常的に発現していることが示された。For は、酸素呼吸条件においては定常的に発現しているものの、硝酸呼吸条件においてはほとんど発現を観察することができなかった。これらのことから、For は好気条件の時にのみ発現され、TK-6 株の好気条件時の旺盛な生育を支持していると考えられた。

このことを更に確かめるために、TK-6 株において遺伝子破壊系を構築し、*for* 変異株と *kor* 変異株をそれぞれ取得することを試みた。遺伝子破壊はプラスミドを用いた相同組換え法で行った。形質転換には塩化カルシウム法を用い、遺伝子マーカには熱安定カナマイシン耐性遺伝子を用いた。条件検討の結果、高効率の遺伝子破壊系を構築し、目的の遺伝子破壊株、すなわち *for* 変異株と *kor* 変異株の取得に成功した。これら変異株の生育を観察したところ、*kor*

変異株は好気条件において野生株と変わらぬ旺盛な生育を示したが、嫌気条件では全く生育しなかった。対照的に、*for* 変異株は嫌気条件では野生株と同様の生育を示したが、好気条件では野生株の生育を大きく下まわった。これらの結果は前述の知見、すなわち For の方が Kor より酸素に対する安定性が高い、および野生株において For は好気条件でのみ発現するといった結果と合致するものであり、For は好気条件での旺盛な生育を支持するかたちで機能していると考えられた。

#### 4. OGOR オペロンにコードされる機能未知蛋白質群の解析

For の構造遺伝子の下流には *forF*、Kor の構造遺伝子の下流には *orf3* と *orf4* と名付けられた遺伝子が存在し、それぞれ上流の *for* 遺伝子群、*kor* 遺伝子群とオペロンを形成している。しかしながら、その蛋白質の機能は未知であった。私はこれらの蛋白質を大腸菌で発現し、精製を行い、EPR や金属定量、OGOR 酵素活性測定における影響などを調べた。しかしながら、有効な結果は得られなかった。今後、より精密かつ多様な実験が要求されると思われる。別のアプローチとしてこれらの遺伝子破壊が考えられた。

#### まとめ

1. *H. thermophilus* TK-6 株は、サブユニット構造の異なる 2 種類の OGOR、すなわち For と Kor を持つことがわかった。
2. For はその活性において ForE を必要とし、5 サブユニット構造を持つ新規の 2-オキソ酸酸化還元酵素であることを示した。
3. 大腸菌から精製した組換え For の酵素学的諸性質を解析し、Kor と比較した。For は Kor と比べて活性は低いが高熱好気条件において安定であった。
4. 精製した OGOR を用いて、試験管内で炭酸固定反応を触媒することを証明した。また動力学的解析も行った。
5. Kor は構成的に発現しているが、For は好気条件でのみ発現された。好気培養時の TK-6 株の旺盛な生育は For の発現により支援されていると考えられた。
6. *H. thermophilus* TK-6 の遺伝子破壊系を相同組換え法により構築した。