

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成14年度博士課程進学  
氏名 吉沢 洋一  
指導教員名 五十嵐 泰夫

## 論文題目

Effect of carbon dioxide concentration on *Hydrogenovibrio marinus*  
(*Hydrogenovibrio marinus* に対する二酸化炭素濃度の影響)

### 1. はじめに

植物をはじめ、藻類や多くの独立栄養細菌はカルビン回路を用いて炭酸固定を行っている。この回路の鍵酵素の一つである Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) は、二酸化炭素を有機物に変換する炭酸固定反応を触媒する。ほとんど全ての生物が最終的にこの反応に依存しているため、RubisCO は地球上で最も重要な酵素と言っても過言ではない。

細菌においては、I型（8個のラージサブユニットと8個のスモールサブユニットからなる）とII型（ラージサブユニットのみからなる）の典型的な二種類の RubisCO に加え、近年のゲノム解析によりアーキアに存在するIII型や *Bacillus* 属に見出された RubisCO 活性を持たないが一次構造がI型と類似しているIV型の存在が明らかにされている。RubisCO の合成や酵素活性には数多くの要因が関与しており、例えば、 $\Omega$  値（炭酸固定反応と副反応であるオキシゲナーゼ反応の反応特異性の比）、遺伝子発現制御、カルボキシソーム形成などが挙げられる。ある生物の RubisCO にはその酵素に特有の  $\Omega$  値があり、この値が高いほどオキシゲナーゼ反応に対して炭酸固定反応の反応効率がよいため、高酸素存在下においても二酸化炭素を選択的に取り込むことができ、低二酸化炭素濃度に適応していると言える。RubisCO 遺伝子の発現は多くの場合、すぐ上流逆向きに位置する LysR 様転写制御因子によって制御されている。また、カルボキシソームはシアノバクテリアと数種の化学独立栄養細菌に存在する細胞内小胞であり、RubisCO を内部に隔離することで RubisCO

の炭酸固定効率を高めていると考えられている。

*Hydrogenovibrio marinus* MH-110 株は、海水から単離された絶対独立栄養性水素細菌であり、カルビン回路を用いて炭酸固定を行っている。MH-110 株は、2 種類の I 型(CbbLS-1 と CbbLS-2)と 1 種類の II 型(CbbM)の、合計 3 種類の RubisCO を持っている。これまでに各 RubisCO の  $\Omega$  値は決定されており、またそれぞれの遺伝子も既に単離されている。しかし、生体内におけるこれら 3 種の RubisCO の役割分担は不明であり、いまだ炭酸固定機構の全体像は明らかとなっていない。そこで本研究では、*H. marinus* の炭酸固定に関する知見を深めることを目的とし、RubisCO 遺伝子クラスターの構造の解明、異なる CO<sub>2</sub> に応答して発現する RubisCO の解析に加え、遺伝子クラスターの構造から明らかとなったカルボキシソーム遺伝子群の分子生物学的解析、さらには CO<sub>2</sub> 濃度依存的に発現する遺伝子の探索を行った。

## 2. 3 種類の RubisCO 遺伝子クラスターの構造

独立栄養細菌では、RubisCO 遺伝子は他のカルビンサイクルに関わる遺伝子とクラスターを形成していることが多い。そこで *H. marinus* の 3 種類の RubisCO 遺伝子クラスターの構造を調べた。既に単離されている RubisCO 遺伝子の部分断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、この結果をもとにゲノムライブラリーを作製し、各 RubisCO 遺伝子の周辺を含むクローンのスクリーニングを行った。得られたクローンの塩基配列を決定し、相同性検索を施した。その結果、*cbbLS-1* の上流には *cbbR1*、下流には *cbbQ1*、*cbbO1* が、*cbbLS-2* の下流にはカルボキシソームの殻タンパク質をコードする遺伝子群(*csoS2*, *csoS3*, *ORFA*, *ORFB*, *csoS1C*, *csoS1A*, *csoS1B*)とそれに引き続く 3 つの ORF が、*cbbM* 領域には既に知られている上流の *cbbRm*、下流の *cbbQm* の他、*cbbOm*、カーボニックアンヒドラーゼ *can* が発見された。*cbbQ1*、*cbbO1*、*cbbQm*、*cbbOm* は RubisCO の翻訳後修飾、安定化に寄与すると考えられているタンパク質をコードする遺伝子である。

## 3. CO<sub>2</sub> 濃度応答による RubisCO とカルボキシソームの発現

複数の RubisCO を持つ細菌では、異なる RubisCO の発現は CO<sub>2</sub> 濃度に依存することが知られているため、異なる CO<sub>2</sub> 濃度(15%、2%、0.15%、0.03%)における本菌の 3 種類の RubisCO の発現を調べた。各 CO<sub>2</sub> 濃度下で小型のジャーファーメンターを用いて培養し、細胞から細胞粗抽出液を調製し、immunoblotting を行った。一次抗体には、各 RubisCO を特異的に認識するポリクローナル抗体を用いた。CbbLS-1 と CbbLS-2 は相同性が高いため、相互認識しないようにスモールサブユニットの N 末端アミノ酸付近で異なる配列をもとに設計したオリゴペプチドから合成した抗 Cbb-S1 ペプチド抗体、抗 Cbb-S2 ペプチド抗体を使用した。CbbM については、精製タンパク質から作製された抗 CbbM 抗体を使用した。その結果、15%では CbbM のみが、2%では CbbM に加えて CbbLS-1 が、0.15%では

CbbLS-2 と CbbM が、そして 0.03%では 3 種類全ての RubisCO が発現していた。また、転写レベルでの発現を RT-PCR によって確認したところ、immunoblotting の結果と一致したため、これらの発現は転写レベルで制御されていることが示された。同時に *cbbLS-2* 下流のカルボキシソーム遺伝子の発現も調べたところ *cbbLS-2* の発現パターンと一致したことから、カルボキシソームが形成されていることが予測された。そこで透過型電子顕微鏡を用いて細胞観察を行ったところ、低 CO<sub>2</sub> 濃度(0.15%、0.03%)で培養した菌体ではカルボキシソームの特徴である六角形の細胞内小胞が多数確認された。

#### 4. カルボキシソームオペロンとカルボキシソーム遺伝子破壊株の解析

低 CO<sub>2</sub> 濃度下で特異的に発現する *cbbLS-2* とカルボキシソーム遺伝子群の転写解析を RT-PCR により行った。PCR 産物が各遺伝子間を重複するようにプライマーを設計し、ランダムプライマーを用いて合成された cDNA を鋳型として PCR を行った。その結果、*csoS1CAB* 領域が増幅されなかったことからこの遺伝子の upstream に別の転写開始点があることが示唆された。プライマーエクステンション法によって転写開始点を決定したところ、*csoS1C* の upstream に二つの転写開始点を見出した。以上の結果より、カルボキシソーム遺伝子クラスターは、単一のオペロンではなく二つのオペロンから構成されることが示された。

また、低 CO<sub>2</sub> 濃度においてカルボキシソームが必須であることをカルボキシソーム遺伝子破壊株を構築することによって調べた。*cbbLS-2* のすぐ下流の *csoS2* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子を挿入することでカルボキシソーム遺伝子破壊株 dCS2 を構築した。dCS2 株は、高 CO<sub>2</sub> 濃度(15%、2%)では野生株と変わらぬ生育を示したが、低 CO<sub>2</sub> 濃度(0.15%、0.03%)では生育できなかった。各 RubisCO の発現パターンを調べたところ、低 CO<sub>2</sub> 濃度において、CbbLS-2 の発現は野生株と同等であったが CbbLS-1 の発現が上昇していた。さらに電子顕微鏡を用いて低 CO<sub>2</sub> 濃度で培養した dCS2 株の観察を行ったところ、カルボキシソームは確認されなかった。従って、低 CO<sub>2</sub> 濃度での生育には RubisCO のみならずカルボキシソームが必須であることが示された。さらにカルボキシソーム遺伝子下流に存在する *bfr* 遺伝子についても破壊株 dBF を構築し、その機能を調べた。その結果、各 CO<sub>2</sub> 濃度における生育と RubisCO の発現パターンは dCS2 株と同様であったが、電子顕微鏡観察ではカルボキシソームの形成異常と考えられる繊維状の構造が見られた。したがって、*bfr* またはその下流の二つの機能未知の ORF (極性効果によって影響を受ける) のいずれかがカルボキシソームの形成に関与していることが示唆された。

#### 5. 異なる CO<sub>2</sub> 濃度での遺伝子発現の違いの解析

CO<sub>2</sub> 濃度の違いによって細胞にどのような変化が生じるのかを遺伝子の発現パターンの変化により解析した。手法は、RNA Arbitrarily Primed (RAP) PCR 法を用いた。まず、高 CO<sub>2</sub> 濃度(15%)と低 CO<sub>2</sub> 濃度(0.15%)で培養した菌体から全 RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、それぞれの RNA から cDNA を合成した。この cDNA

を鋳型として、20種類の異なる arbitrary primer を用いて PCR を行い、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離した。上の二つの条件で培養したサンプルの PCR 産物を隣り合わせに泳動し、バンドパターンの比較を行うことで、CO<sub>2</sub> 濃度特異的に発現している RAP-PCR 断片が検出される。次に、CO<sub>2</sub> 濃度特異的に増幅した RAP-PCR 断片を切り出して、再度同じ条件で PCR を行い、PCR 産物を TA クローニングし、塩基配列を決定した。その塩基配列をもとに相同性検索を行った結果、低 CO<sub>2</sub> 濃度特異的に発現する遺伝子の中で炭酸固定と関係するものの中にカルボキシソーム遺伝子があった。また、多くの独立栄養細菌において、RubisCO 遺伝子の転写を制御している CbbR をコードする遺伝子と相同性のある遺伝子が見つかった。これは、MH-110 株が保有する既知の2つの *cbbR* とは異なる新規な遺伝子であった。RAP-PCR 法によって単離された遺伝子が実際に CO<sub>2</sub> 濃度依存的に発現しているかどうかを dot blot hybridization によって確認した。採取した RNA をメンブレンにブロットし、RAP-PCR 産物を RI 標識したものをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。その結果、新たに発見した *cbbR* が低 CO<sub>2</sub> 濃度で特異的に発現していることが確認された。そこで、この遺伝子を含む約 6.9kb の EcoRI 断片のクローニングを行った。全塩基配列を決定したところ、5'側がカルボキシソーム遺伝子の下流と一致した。すなわち、この断片はカルボキシソーム遺伝子下流の断片であり、新たな *cbbR* は *cbbLS-2* の約 10kb 下流に位置する。そこで本遺伝子を *cbbR2* と命名した。*cbbR2* は 316 アミノ酸をコードする 951bp の ORF であり、翻訳アミノ酸配列は CbbR1、CbbRm とそれぞれ約 39%、約 42%の相同性を示した。さらに、異なる CO<sub>2</sub> 濃度での発現を調べたところ、0.15%と 0.03%で発現が見られ、*cbbLS-2* およびカルボキシソーム遺伝子と発現パターンが一致することが分かった。また、この遺伝子の領域について転写解析を行ったところ、上流に存在する二つの遺伝子とオペロンをなしていることが明らかとなった。

## 6. まとめ

本研究では、3種類の RubisCO 遺伝子クラスターの構造を明らかにし、異なる CO<sub>2</sub> 濃度下での各 RubisCO の発現を調べた。CbbM は高 CO<sub>2</sub> 濃度で主要な発現を示し、一方、CbbLS-2 は低 CO<sub>2</sub> 濃度でのみ発現が見られた。CbbLS-1 はそれらの RubisCO による炭酸固定が十分でない場合に発現し補助的な役割をすると考えられる。また、低 CO<sub>2</sub> 濃度下において効率的に炭酸固定を行うためには CbbLS-2 のみならず、カルボキシソームが必須であることが示された。そして、カルボキシソーム遺伝子クラスターの下流に存在する3つの遺伝子もカルボキシソームの形成に関与していることが示唆された。その具体的な機能を解明することは今後の課題である。また、*cbbLS-2* の約 10kb 下流に同定された転写制御因子 CbbR2 は、*cbbLS-2* とカルボキシソーム遺伝子の転写を制御している可能性が考えられる。