

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 15 年度博士課程 進学
氏 名 豊田 晃一
指導教員名 五十嵐 泰夫

論文題目 海洋性水素細菌由来の 3 種の RubisCO オペロンに関する研究

1. はじめに

植物をはじめ、藻類や多くの独立栄養性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 CO_2 を有機炭素に変換する炭酸固定反応を触媒する。RubisCO は地球上で最も多いタンパク質ともいわれ、触媒する炭酸固定反応は地球の炭素循環に深く関わっている。細菌における RubisCO には四次構造の異なる 4 つの型 (I~IV 型) が知られている。large subunit、small subunit それぞれ 8 つずつからなる I 型、large subunit のみからなる II 型がカルビン回路を有する細菌に見いだされてきた。また、古細菌において見いだされた III 型や RubisCO 活性を持たないが構造に近い IV 型も近年のゲノム情報から多く見つかってきている。RubisCO はそれぞれ固有の炭酸固定反応の効率を示す値、 Ω 値 (carboxylase 活性と副反応の oxygenase 活性の反応特異性の比) を有する。この値が高いほど oxygenase 活性より carboxylase 活性が効率良く進み、高 O_2 、低 CO_2 濃度においても効率良く炭酸固定ができる。一般に I 型の RubisCO は II 型よりも高い Ω 値を有しており、現在の大气レベルの低い CO_2 濃度(0.03%)に適応しているといえる。

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。この菌は2種類のI型 (CbbLS-1、CbbLS-2)、1種類のII型 (CbbM) の合計3種類のRubisCOを有している。これまでに、各RubisCO遺伝子クラスターのクローニング、組換えRubisCOを用いた Ω 値の決定がなされてきた。さらに、培養時に通気するCO₂濃度によって3種類のRubisCOの発現が変化し、低い濃度になるにしたがい Ω 値の高いRubisCOが発現することが示されてきた。また、大気レベルのCO₂濃度においては、CO₂の濃縮を行うとされるcarboxysomeと呼ばれる細胞内小胞が形成されることも示された。このように、MH-110株は周囲のCO₂濃度に応じてRubisCOやCO₂濃縮機構の発現を制御することで、広範囲のCO₂濃度に適応してきたと考えられる。このようなCO₂濃度応答性を示す遺伝子発現制御機構は、RubisCOを有する細菌には共通してみられるもので大変興味深い。本研究ではMH-110株における遺伝子操作系を構築し、各RubisCOの生体内での機能を調べるとともに、その発現調節機構を解明することにより、MH-110株のCO₂応答機構に関する知見を深めることを目的として研究を行った。

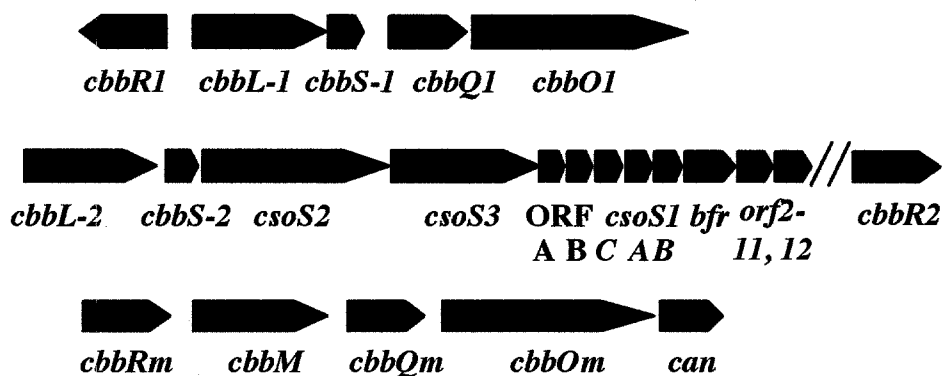


図1. 3種のRubisCOオペロン

2. *H. marinus* MH-110 株における遺伝子破壊法の構築

これまで、MH-110株における遺伝子導入法は確立されていなかったため、グラム陰性細菌において広く用いられている、transconjugation法を適用し遺伝子導入を試みた。導入するプラスミドを有する大腸菌とMH-110株をフィルターメンブレン上で混和、培養することで、大腸菌からMH-110株へプラスミドを接合伝達させた。導入したプラスミドとゲノムの間での相同組換えを用いて目的遺伝子の破壊を行った。また、MH-110株に保持されるプラスミドとして、pSF1010のoriを有するプラスミドが利用可能であることを見いだした。

3. 3種の RubisCO 遺伝子の破壊株

上述した方法により RubisCO をコードする *cbbLS-1*、*cbbLS-2*、*cbbM* 各遺伝子の破壊株を構築した。これまでに、CO₂ 濃度変化に伴い各 RubisCO の発現が変化することが分かっていたため、CO₂ 濃度変化 (15, 2, 0.15, 0.03%) の影響について調べた。I 型 RubisCO の 1 つをコードする *cbbLS-1* 破壊株はどの CO₂ 濃度においても野生株と変わらない生育を示し、また他の RubisCO の発現は野生株と変わらないものであった。II 型 RubisCO をコードする *cbbM* の破壊株は 2% 以上の高い CO₂ 濃度において、野生株と比較して生育速度の低下が認められた。また、*cbbM* 破壊株では全ての CO₂ 濃度において野生株と比較して *CbbLS-1* の発現量が増大していた。これらの結果から、高 CO₂ 濃度 (≥2%) における生育には *CbbM* が必要であることが示された。もう一方の I 型 RubisCO、*CbbLS-2* は大気レベルの CO₂ 濃度特異的に発現する。*cbbLS-2* 遺伝子破壊株は高 CO₂ 濃度においては野生株と変わらない生育を示したが、大気レベルの低 CO₂ 濃度 (≤0.15%) において生育不能であった。*cbbLS-2* は下流の *carboxysome* を形成するタンパク質をコードする *cso* 遺伝子群とオペロンを形成している。*cso* 遺伝子破壊株は同様に低 CO₂ 濃度において生育できないことが分かっている。これらの結果から、低 CO₂ 濃度においては *cbbLS-2* オペロンが生育に必須であることが示された。

4. 各 RubisCO オペロンの発現制御機構

原核生物の多くの RubisCO 遺伝子の上流には、LysR 様転写制御因子 *CbbR* が逆向きにコードされており、RubisCO の発現を正に制御している。MH-110 株においても *cbbLS-1* と *cbbM* の上流に *CbbR* が見付き、それぞれ *CbbR1*、*CbbRm* と命名した。また、*cbbLS-2* の下流にも別の *CbbR* (*CbbR2*) が見付けられていた。各 *CbbR* の組換えタンパク質を affinity chromatography を用いて粗精製し gel shift assay を行った結果、*CbbR1* は *cbbLS-1*、*CbbRm* は *cbbM*、*CbbR2* は *cbbLS-2* のプロモーター領域に結合することが分かった。各 *cbbR* 遺伝子の破壊株を構築することで、それぞれの RubisCO の発現がこれら 3 種類の *CbbR* によって独立して正に制御されていることが示された。*cbbRm* 破壊株では *CbbLS-1* が、*cbbR1* と *cbbRm* の二重破壊株では *CbbLS-2* が CO₂ 濃度非依存的に発現した。これらの結果から *CbbR* は CO₂ 濃度変化を直接感知しているのではなく、それに伴う代謝産物量や酸化還元状態の変化を感知して RubisCO の発現を制御していることが示唆された。

5. carbonic anhydrase の発現と機能

carbonic anhydrase (CA)は活性中心に亜鉛を含む金属酵素で、CO₂の可逆的水和反応を触媒する。CAは原核生物、真核生物を問わず、広く生物界に保存されており、生体内で様々な機能を有している。CO₂を唯一炭素源とする独立栄養性生物にとって、RubisCOの基質となるCO₂の変換を促すこの酵素は重要であり、その変異株の多くはCO₂要求性を示す。また最近、鉄硫黄酸化細菌において carboxysome を形成するタンパク質の一つ CsoS3 が CA 活性を有していることが明らかとなり、CA が CO₂ 濃縮に深く関与していることが示された。MH-110 株には *cbbM* の下流に CA と高い相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 *can* が見つけられていたが、その発現及び機能についてはまだ明らかとされていなかった。また、MH-110 株の carboxysome オペロンは上記の CsoS3 を含むため、MH-110 株は少なくとも 2 種類の CA を有していることとなる。そこで、組換えタンパク質として Can を精製したところ、CA 活性を有していたことから、Can が CA であることが確認された。primer extension により *can* の発現を調べたところ、*can* は単独で転写されており 2%以上の CO₂ 濃度においては発現が認められたが、大気レベルの低 CO₂ 濃度では発現が認められなかった。この低 CO₂ 濃度においては carboxysome が特異的に発現するため、Can と CsoS3 の発現パターンは CO₂ 濃度から見ると正反対であることが示された。*can* の破壊株を構築した結果、Can は 1-2%の CO₂濃度では生育に必須であるが、より高い CO₂濃度もしくは大気レベルの低 CO₂濃度においては必須ではないことが示された。一方、*csoS3* 破壊株を構築した結果、CsoS3 は大気レベルの低 CO₂濃度下での生育に必須であることが示された。

6. まとめ

絶対独立栄養性細菌 *H. marinus* MH-110 株由来の 3 種類の RubisCO の発現は CO₂ 濃度に応じて変化することが分かっていたが、本研究において各 RubisCO の変異株を構築した結果、高 CO₂ 濃度においては CbbM が、低 CO₂ 濃度においては CbbLS-2 ならびに carboxysome が、それぞれ生育に必要であることが示された。さらに各 RubisCO オペロンは別々の CbbR 型制御因子によって正に制御されていることが示された。RubisCO の発現制御は CO₂ を直接感知しているのではなく、CO₂ 濃度変化に伴う代謝の変化によってなされていることも示唆された。本菌株においては RubisCO だけでなく CA と carboxysome を CO₂ 濃度に応じて発現制御することで、CO₂ 濃度に適した CO₂ の濃縮ならびに炭酸固定を行っていることが示唆された。