

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 16 年度博士課程 進学
氏 名 池田 丈
指導教員名 五十嵐 泰夫

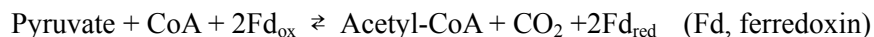
論文題目

Studies on pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
(好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株由来の pyruvate:ferredoxin oxidoreductase に関する研究)

独立栄養生物による炭酸固定は、CO₂を有機化する反応として、我々人類を含む従属栄養生物の生存に必須な生物作用である。地球上で最も普遍的な炭酸固定経路は、全ての植物、ラン藻類、また、多くの独立栄養細菌が利用する Calvin-Benson-Bassham (CBB) サイクルである。しかし、一部の独立栄養細菌は CBB サイクル以外の炭酸固定経路を用いて生育に必要な CO₂を固定することが知られている。そのような非 CBB 型炭酸固定経路のひとつである還元的 TCA サイクルは、1960 年代に緑色硫黄細菌 *Chrolobium limicola* (f. *thiosulfatophilum*)において確認された。還元的 TCA サイクルは、好気性生物の酸化エネルギー獲得経路として知られる TCA サイクルを逆回転させた形をしており、1 サイクルあたり 4 分子の CO₂を固定する。近年の研究では、海底熱水噴出孔付近などにおいては還元的 TCA サイクルが主要な炭酸固定経路として機能していることが報告され、地球上の炭素循環における還元的 TCA サイクルの重要性が認識されつつある。

多くの好気性生物ではピルビン酸の脱炭酸反応は pyruvate dehydrogenase complex (PDC)により触媒される。一方、古細菌や嫌気性細菌、嫌気性原生物などではこの反応は pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (POR)によって触媒される。PDC が NAD⁺を電子受容体として用いるのに対し、POR はより酸化還元電位の低い電子伝達タンパク質である ferredoxin を電子受容体として利用する。そのため、PDC による反応では逆反応は進行し得ないが、POR は逆反応である炭酸固定反応も触媒することが可能である(下式)。

この逆反応は、還元的 TCA サイクルにおける CO₂ 固定反応のひとつであり、重要な代謝中間体であるピルビン酸を生じる。



本研究の対象である *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株(以下 TK-6 株)は好熱性の水素細菌で還元的 TCA サイクルを用いて炭酸固定を行い独立栄養的に生育する。16S rRNA 配列に基づく系統解析では、真正細菌中最も古い起源を有することが知られており、これまでに様々な特徴的な代謝経路が発見されている。本研究では、TK-6 株の POR 反応周辺の知見を深め、さらに POR による炭酸固定反応を測定する系を構築し、その反応機構の解明を目的とした。

1) POR のサブユニット構造

POR を含む 2-oxoacid oxidoreductase family では $\alpha\beta\gamma\delta/\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2$ 型、ab/a₂b₂ 型、A₂ 型のサブユニット構造が知られている。ab/a₂b₂ 型や A₂ 型酵素の各ドメインが $\alpha\beta\gamma\delta$ 型のサブユニットに相当することから、原型である $\alpha\beta\gamma\delta$ 型から遺伝子の再配列や融合によって他のサブユニット構造に進化したと考えられていた。TK-6 株の POR は既に精製され、SDS-PAGE の結果から $\alpha\beta\gamma\delta$ 型の 4 サブユニット構造であると考えられていた。しかし、その後、遺伝子がクローニングされたところ、各サブユニットをコードする 4 つの遺伝子 (*porDABG*) のうち *porD* は既知の POR のサブユニットと相同性を示さなかった(図)。*porDABG* の上流に、ferredoxin 様 δ サブユニットに相同な *porE* 遺伝子が発見されたことから、PorE も POR のサブユニットであることが示唆されていた。そこで、*porEDABG* 遺伝子が大腸菌内で発現し、得られた組換え体の精製を行った。POR は酸素感受性を示すため、嫌氣的に精製を行い、活性を保持したまま POR を精製することに成功した。精製された POR を SDS-PAGE に供したところ、5 本のバンドが観察された。各バンドの N 末端アミノ酸配列は *porEDABG* の推定アミノ酸配列と一致し、本菌の POR は 5 種類のサブユニットからなる新規の構造をとることが示された。PorD は既知のサブユニットと相同性を示さなかったが、ホロ酵素の発現に必要であった。PorD に関して相同性検索を行ったところ、TK-6 株とその近縁種にしか相同なタンパク質が存在しない特徴的なタンパク質であることが判明した。5 個中 4 個のサブユニットが $\alpha\beta\gamma\delta$ 型酵素の各サブユニットと相同であることから、原型となる $\alpha\beta\gamma\delta$ 型酵素が進化の過程で新規サブユニットを獲得し、5 サブユニット構造へ独自に進化したと予想された。

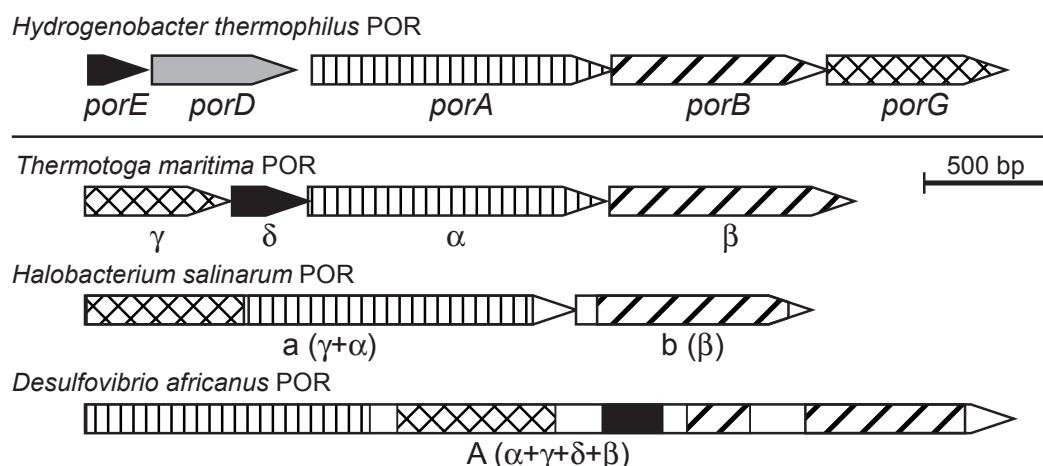


図 2-Oxoacid oxidoreductase の遺伝子構造。相同なサブユニット/ドメインを同じパターンで示した。

2) Ferredoxin

POR 反応において電子伝達体として機能する鉄硫黄タンパク質 ferredoxin の遺伝子クローニングを行った。本菌より部分精製された ferredoxin の N 末端アミノ酸配列を基にクローニングを行ったところ、目的とした ferredoxin 遺伝子(*fdx1*)のすぐ下流に、もうひとつ別の ferredoxin 遺伝子(*fdx2*)が発見された。*fdx1*, *fdx2* は、還元的 TCA サイクルの酵素である succinyl-CoA synthetase 遺伝子の下流に存在していた。それぞれの組換え体(Fd1, Fd2)を大腸菌内で発現し精製を行った。得られたタンパク質は細菌型 ferredoxin に特徴的な吸光スペクトルを示し、EPR スペクトルや鉄の定量的結果からそれぞれひとつの $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ クラスターを含むことが確認された。*fdx1* と *fdx2* は 4 bp ほどオーバーラップしており、RT-PCR の結果、オペロンとして共転写されていることが確認された。しかし、タンパク質レベルでは Fd2 は観察されず、Fd1 のみが主要な $[4\text{Fe-4S}]$ ferredoxin として機能していることが示唆された。また、このことは ferredoxin の遺伝子破壊実験による結果からも支持された。

3) Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase

Ferredoxin は POR の他に、還元的 TCA サイクルの別の鍵酵素 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase (OGOR)やアンモニア同化経路の鍵酵素への電子供与体としても機能し、本菌の代謝において中心的な役割を果たしていると考えられた。Ferredoxin の酸化還元に関与する酵素を探索したところ、ドラフトゲノム配列上に植物/細菌型 ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase (FNR)に相同な遺伝子(*fpr*)を発見した。この遺伝子を実験室で発現し、得られた組換え体を精製した。得られたタンパク質はフラビンを含むモノマーで、ferredoxin と NADP⁺/NADPH の可逆的酸化還元反応を触媒した。本酵素は NADPH 依存 ferredoxin 還元活性に比べ、還元型 ferredoxin 依存 NADP⁺還元活性の方が高く、生体内

では NADPH 生成方向に機能していることが示唆された。

4) POR 炭酸固定反応の解析

4-1) 共役反応系による炭酸固定反応の観察

アセチル CoA を基質とした炭酸固定反応によるピルビン酸の生成は、エネルギー的に不利な反応であるため、非常に進行しにくい。この反応を *in vitro* で観察するためには、強力な ferredoxin 還元システムが必要とされる。そこで、上記の FNR による ferredoxin 還元を試みたが、十分な ferredoxin 還元活性が得られず、炭酸固定反応の観察には適さなかった。そこで、本菌から単離された OGOR による反応を共役させ ferredoxin 還元を行った。また、反応を検出するため、炭酸固定反応により生じたピルビン酸を lactate dehydrogenase により乳酸に変換し、それに伴う NADH の減少を分光学的に測定した。この共役反応系を用いて POR による炭酸固定反応を観察することに成功した。

4-2) 反応における分子内電子伝達機構の解析

POR は、catalytic unit あたり 1 分子の TPP と 3 個の鉄硫黄クラスターをコファクターとして含む。鉄硫黄クラスターは、活性中心である TPP と外部電子伝達体間の電子の授受に関与する。また、TPP は反応中間体においてラジカル化することが知られている。反応中間体におけるこれらのコファクターの酸化還元状態を明らかにすることは、POR の反応機構を解析する上で非常に重要である。そこで、種々の反応中間体を調製し、それぞれの EPR スペクトルを測定した。脱炭酸反応において、ピルビン酸と TPP の結合に伴い、hydroxyethyl (HE)-TPP ラジカルの生成が観察された。炭酸固定反応では、ferredoxin を介して還元力が供給されると TPP とアセチル CoA の結合が認められ、HE-TPP ラジカルのシグナルが観察された。

本研究のまとめ

TK-6 株の POR は既知の酵素とは異なるサブユニット構造をとることを明らかにした。また、本菌から単離された ferredoxin を介して、酵素反応により還元力を供給することで、POR の炭酸固定反応を測定することに成功した。反応中間体の分子内電子伝達の解析からも、ferredoxin を介した還元力の供給が炭酸固定反応の進行に必要であることが示されたことから、TK-6 株の代謝において ferredoxin の酸化還元が重要な役割を果たしていることが示唆された。

参考文献

- [1] Ikeda *et al.* (2005) Biosci. Biotechnol. Biochem. 69:1172-1177
- [2] Ikeda *et al.* (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. 340:76-82