

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

応用生命工学専攻
平成 12 年博士課程入学
山本 正浩

指導教官 五十嵐泰夫 教授

目次

序論	1
----	---

極限環境と独立栄養性

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 株

H. thermophilus TK-6 株のエネルギー・炭素代謝

還元的 TCA サイクル

OR ファミリーに属する OGOR

研究の歴史

本研究の目的

第一章 OGOR の精製と酵素学的特徴付け

序	12
---	----

材料と方法	13
-------	----

菌株とプラスミド DNA

OGOR の発現

無細胞抽出液(cell free extract: CFE)の調製

蛋白質定量

Kor の精製

For の精製

For サブユニットのモル比の計算

OGOR 活性測定

タンパク質のメンブレンプロッティング

タンパク質の N 末端アミノ酸シーケンス

forE 発現プラスミドの構築と発現

封入体となったタンパク質の可溶化と再構成

Kor と For の分子量測定

OGOR の熱安定性の測定

結果	17
組換え Kor の精製とネイティブ Kor との比較	
組換え For の精製	
ForE の単独発現	
For の分子量測定	
For の基質特異性	
For の至適 pH と至適温度	
For の動力学的解析	
For の熱・酸素安定性	
For と Kor の酵素学的特徴の比較	
考察	32
第二章 OGOR による炭酸固定反応	
序	35
材料と方法	36
OGOR の調製	
<i>H. thermophilus</i> TK-6 株の培養	
TK-6 株の CFE の調製	
$^{14}\text{CO}_3^-$ を用いた炭酸固定反応活性測定	
<i>H. thermophilus</i> TK-6 株由来 succinyl-CoA synthetase の調製	
POR および GDH とのカップリングによる OGOR 活性測定の方法	
Fd の調製	
POR の調製	
OGOR、POR による Fd の還元活性測定	
GDH の調製	
GDH による glutamate 生成反応	
カップリングによる OGOR 活性測定	

結果	43
----	----

[¹⁴C]を用いた炭酸固定反応活性測定

OGOR の POR と glutamate dehydrogenase とのカップリング反応

組換え Fd の調製

POR の調製

OGOR の Fd に対する K_m 値の測定

POR による Fd の還元速度

GDH の精製と酵素学的特徴付け

OGOR による炭酸固定反応活性測定

OGOR の Succinyl-CoA に対する K_m 値の測定

考察	54
----	----

第三章 OGOR の発現解析と遺伝子破壊

序	57
---	----

材料と方法	58
-------	----

TK-6 株の培養

抗血清の調製

ウェスタンブロット解析

相同組換え用のプラスミドの構築

塩化カルシウム法による形質転換の手順

コロニーからの液体培養

染色体 DNA の調製

サザンハイブリダイゼーション

結果	62
----	----

For 抗血清、Kor 抗血清の結合特異性

TK-6 株における OGOR の発現解析

OGOR 欠損株の取得

遺伝子組換えの確認

遺伝子破壊株における蛋白質発現解析	
OGOR 変異株の生育曲線	
混合栄養性の可能性	
<i>H. thermophilus</i> における遺伝子破壊法の構築	
考察	75

第四章 機能未知蛋白質群の解析

序	80
材料と方法	81
大腸菌を用いた DNA の組換え技術	
大腸菌の形質転換	
DNA シークエンス	
大腸菌での組換えタンパク質の大量発現	
CFE の調製と組換え蛋白質の精製	
組換え ORF3 の精製	
組換え ORF4 の精製	
組換え ForF の精製	
電子常磁性共鳴(EPR)分析	
亜鉛の定量分析	
抗血清の調製	
遺伝子破壊株の構築	
結果	86
組換え ORF3 の発現と精製	
組換え ORF4 の発現と精製	
組換え ForF の発現と精製	
金属の存在確認	
OGOR 酵素反応への影響	
遺伝子破壊株の構築	

各種蛋白質の発現解析

変異株の生育曲線

ForF 相同遺伝子のクローニング

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 96

総合討論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 99

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 102

関連論文・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 107

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 108

論文内容要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 109

序論

極限環境と独立栄養性

地球上には多様な環境が存在し、その中には高温・高圧・高塩濃度・無酸素・強酸性・高放射線など、多くの生物にとって過酷といえる極限的環境も少なくない。そのような環境下にあっても生育可能な微生物が存在し、むしろ、微生物が存在しない自然環境をこの地球上に見い出すことの方が困難とも言える。このような極限環境微生物を研究することは生物進化的にも地球規模の物質循環的にも産業応用的にも意義深い。

こうした極限環境中であっても、二酸化炭素などの C1 化合物を同化する能力を持つ独立栄養性生物は生態系の中の生産者であり、その物質・エネルギー循環における重要性は疑い無い。一般に独立栄養生物の二酸化炭素固定経路で最も有名なものといえば、光合成の一部としても知られるカルビン-ベンソンサイクルであり、多くの細菌、藻類、植物などに広く分布している。一方、嫌気、高温、強酸条件などいわゆる極限環境においては、ある種の微生物は異なる二酸化炭素同化経路を利用する。これまでに 3 種の二酸化炭素固定経路が細菌・古細菌・真核生物に分布して存在していることが報告されている(Fig. 0-1)。すなわち Acetyl-CoA 経路[1]、3-Hydroxypropionate 回路[2, 3]、そして還元的 TCA 回路[4, 5]である(Fig. 0-2)。これらの経路のメカニズムや効率を調べることは地球規模の炭素循環を理解する上でも、二酸化炭素を利用した物質生産の研究の上でも重要である。

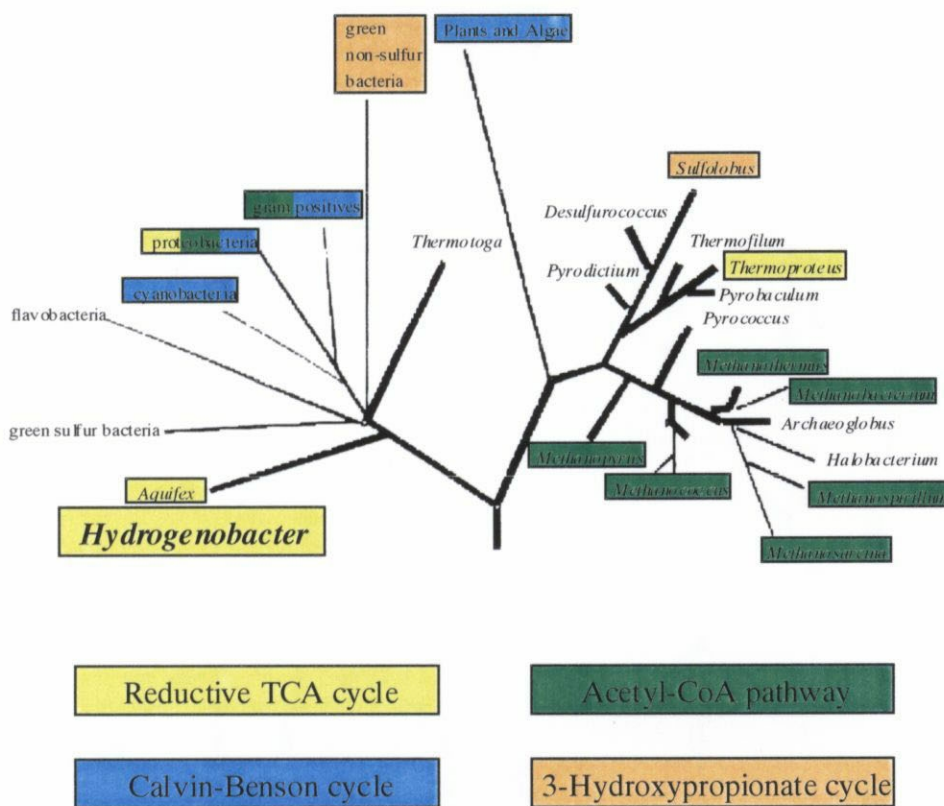


Fig. 0-1. Phylogenetic position of *H. thermophilus* TK-6 based on the 16S rRNA sequence, and Diversity of autotrophic CO₂ fixation pathway.

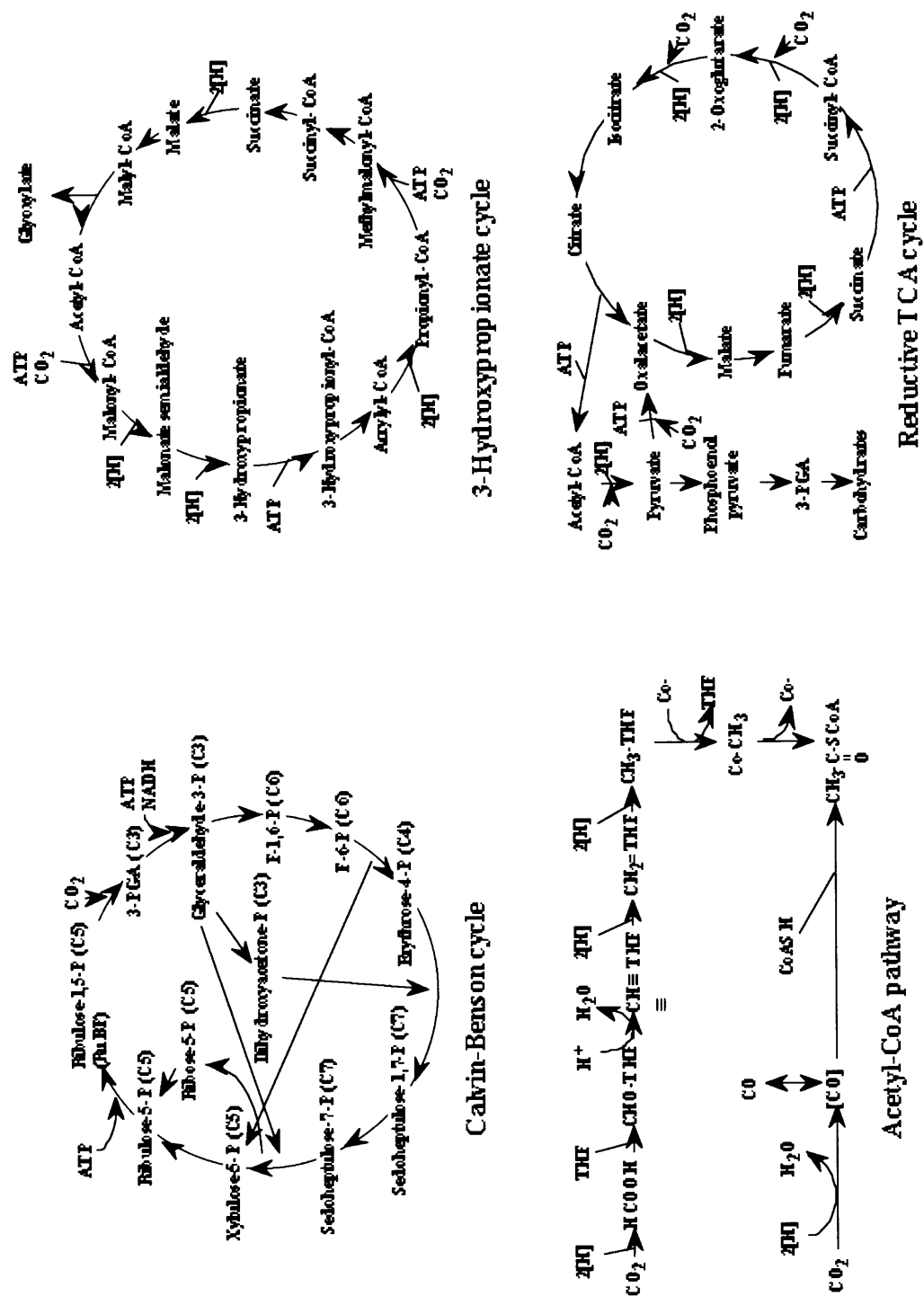


Fig. 0-2. Biological carbon dioxide fixation systems.

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 株

本論文で使用する好熱好気性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株 (IAM 12695, DSM 6534)は、当研究室によって伊豆の峰温泉近傍土壌から単離されたグラム陰性の細菌である[6, 7]。16S ribosomal RNA による系統解析の結果は、本菌は細菌の中で最も初期に分岐した科に属していることを示している(Fig. 0-1)[8]。本菌株の性状を Table 0-1 に表す。生育至適温度は 70-75°C で真正細菌中では高い生育温度を有する[9]。本菌のリン脂質の主成分は 1,2-diacyl-3-O-(phospho-2'-O-(1'-amino)-2',3',4',5'-pentanetetrol)-sn-glycerol (PX)と名付けられたアミノリン脂質で、類似の構造がメタン生成古細菌の一部にしか見い出されていない特殊なものである(Fig. 0-3)[10]。本菌は完全無機培地よりスクリーニングされ、いかなる有機培地にも生育しなかった。このことから、その栄養形態は、世界で初めて、水素を唯一のエネルギー源、二酸化炭素を唯一の炭素源とする絶対独立栄養性であることが示された[7]。本菌は嫌氣的に生育することが可能で、硝酸を最終電子受容体として呼吸する脱窒能を有し[11]、また二価鉄イオンを最終電子受容体とする鉄呼吸能も有する [12]。また、好気条件においても生育可能であり、生育速度も好気下で最も速く、その最大比増殖速度(μ_{\max}) は 0.45 hr⁻¹である[7]。これは独立栄養細菌の生育速度としては非常に速いと言え、筆者の知るところではカルビンサイクルを有する *Pseudomonas hydrogenothermophila* ($\mu_{\max} = 0.7$ hr⁻¹) [13] と *Hydrogenovibrio marinus* ($\mu_{\max} = 0.7$ hr⁻¹) [14]、及び Acetyl-CoA 経路を持つ *Methanobacterium thermoautotrophicum* ($\mu_{\max} = 0.69$ hr⁻¹) [15]に次ぐ。このことから本菌が効率的に、水素酸化、電子伝達、炭酸固定を行っていると考えられる。

Table 0-1 Properties of *H.thermophilus* TK-6.

Cell shape	Long straight rod
Cell dimensions (μm)	Width: 0.3-0.5 Length: 2.0-3.0
Gram staining	Negative
Motility	Negative
GC content (mol%)	43.7
Cellular fatty acid	C _{18:0} , C _{20:1}
Phospholipid	Aminophospholipid, PI, PG
Quinone	Methionaquinone
Cytochrome	<i>b</i> ₅₆₀ , <i>c</i> ₅₅₂ , <i>o</i>
Hydrogenase	Hyd-1, 2, 3, Hox
Growth temperature (°C)	Optimum: 70 - 75 Maximum: 80
Carbon source	CO ₂
CO ₂ fixation	Reductive TCA cycle
Energy source	H ₂
Terminal electron acceptor	O ₂ , NO ₃ ⁻ , Fe ³⁺

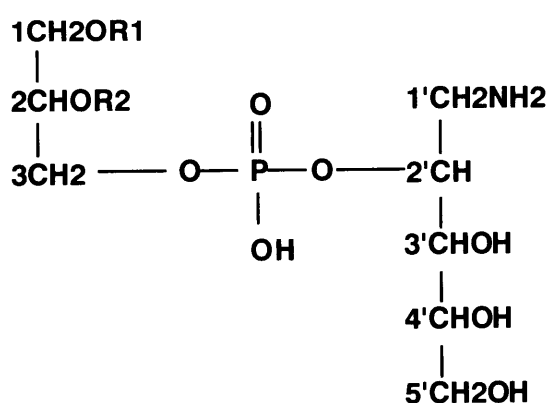


Fig. 0-3. Chemical structures of PX. R1 and R2 are acyl chains, in which C_{18:0} and C_{20:1} are major fatty acids.

本菌株のエネルギー・炭素代謝の提唱モデルを Fig. 0-4 に示した。

本菌から既に 4 種類のヒドロゲナーゼ遺伝子がクローニングされ、そのアミノ酸配列からいずれも水素酸化型ヒドロゲナーゼに属することが予想されている[16, 17]。これまで一菌体から 3 種以上のヒドロゲナーゼが見い出された例はあるが、その場合必ず水素発生型、あるいは両機能性のヒドロゲナーゼが含まれる[18, 19]。TK-6 株のように水素酸化に特化している例はない。

本菌では既に 1 種の膜結合型ヒドロゲナーゼが精製され、このヒドロゲナーゼからメチオナキノン、メチオナキノンからシトクロム類に電子が伝達されることが示されている [16, 20]。一方、これ以外の 3 種のヒドロゲナーゼの具体的な機能は不明のままである。

本菌の炭酸固定経路は還元的 TCA 回路である[5, 21, 22]。この回路中の炭酸固定反応に必要な電子はフェレドキシンによって供給されることが示されている[23]。この還元力はヒドロゲナーゼを通して供給されると考えられているが証明されるに至っていない。

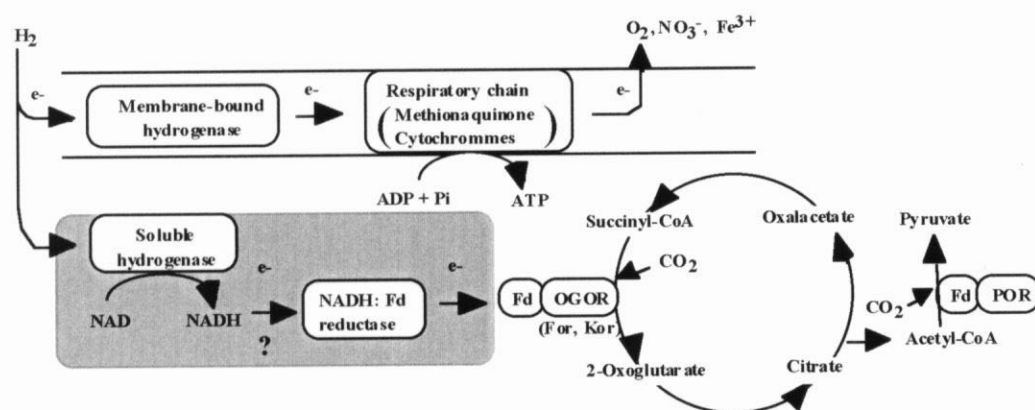


Fig. 0-4. Predictive CO₂ and energy metabolism in *H. thermophilus* TK-6.

還元的 TCA サイクル

還元的 TCA サイクルでは、一般に知られる TCA サイクルを逆回転させることで、1 サイクルあたり 4 分子の二酸化炭素が固定され 1 分子のオキサロ酢酸が生成される (Fig. 0-5)。これら 4 つの炭酸固定反応のうち、一般的な TCA サイクルのピルビン酸デヒドロゲナーゼと 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼでは起こり得ない 2 つの炭酸固定反応を触媒しているのが、それぞれ pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (POR) と 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase (OGOR) である。本回路におけるもうひとつの特異的な酵素が、クエン酸を ATP 依存的にアセチル-CoA とオキサロ酢酸に分解する ATP:citrate lyase であり、本酵素によるこの反応は不可逆に近いとされている [24]。すなわち以上の三種の酵素 (POR、OGOR、ATP:citrate lyase) が還元的 TCA サイクルに特有の酵素で、還元的な回転力を与えるものであり、ゆえに本回路の鍵酵素ととらえられている。

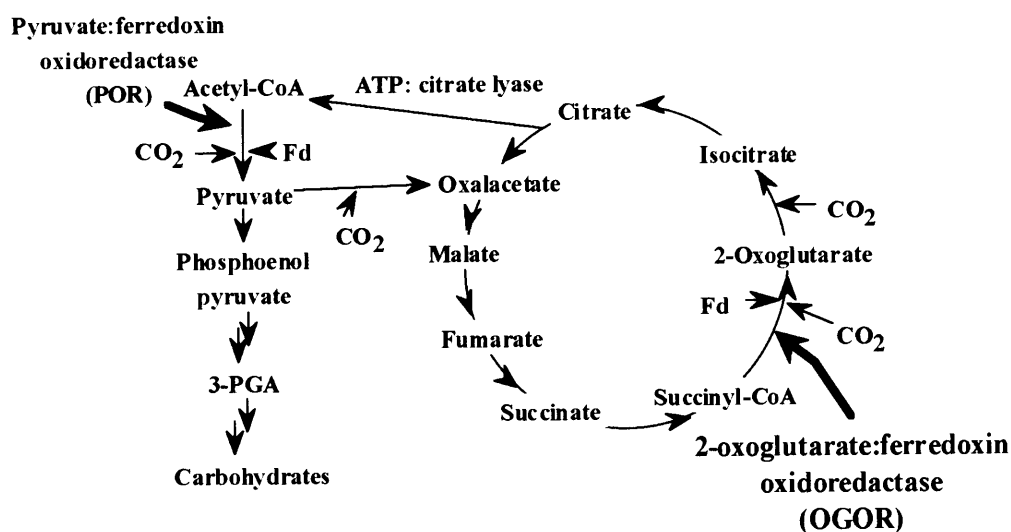


Fig. 0-5. Reductive TCA cycle.

OR ファミリーに属する OGOR

本菌の OGOR と POR は 2-oxoacid oxidoreductase (OR)ファミリーの一員である。OR ファミリーに属する酵素は 2-oxoacid の acyl- または aryl-coenzyme A (CoA)への酸化を触媒する[25]。TCA サイクルでは OGOR は 2-oxoglutarate から succinyl-CoA への酸化を触媒するが、還元的 TCA サイクルでは本酵素は 2-oxoglutarate synthase として機能し、還元反応による二酸化炭素の同化を触媒する。強力な還元力がこのカルボキシル化反応に要求される。TK-6 株は水素をエネルギー源としながら、好気条件下であってさえも上記の反応を可能にしている[16, 20]。

OR ファミリー酵素は鉄-硫黄クラスターと thiamine pyrophosphate (TPP)を保持している。フェレドキシンのような低電位の電子運搬体が反応の電子受容体として使用される。超好熱性菌由来のほとんどの OR は 4 種類のサブユニット($\alpha\beta\gamma\delta$)に別れている (Fig. 0-6)[26]。それぞれのサブユニットは特異的な保存配列を有している。これらのサブユニットが会合し分子質量 120 kDa 以上のひとつの触媒体を構成している。これとは対照的に、いくつかの中温性の OR は 1 種類の大きなサブユニットから成る。このサブユニットは A-, B-, G-, D-ドメインと呼ばれる領域により A-G-D-B という順番で構成されている。活性型のホロ酵素はホモ二量体で分子質量は約 240 kDa である。A-, B-, G-, D-ドメインと α -, β -, γ -, δ -サブユニットはそれぞれ相同性がある [27]。*Sulfolobus* や *Halobacterium* のような生物においては 2 種類のサブユニットから成る $\alpha\beta$ -型 OR が見出されている[28, 29]。この酵素の α -サブユニットは G + A-ドメイン構造を持ち、 β -サブユニットは B-ドメイン構造を持つ。古細菌の indolepyruvate: ferredoxin oxidoreductase もまた($\alpha\beta$)-型 OR であるが、その α -サブユニットは A + B + D -ドメイン構造を持ち、 β -サブユニットは G-ドメイン構造を持つ。このように、OR ファミリーのサブユニット構造の多様性はドメインの融合のパターンに由来すると考えられる。OR はおそらく祖先の A-, B-, G-, D-ドメインの再配列、融合、欠落などを経ることで進化・多様化してきたのであろう[27]。

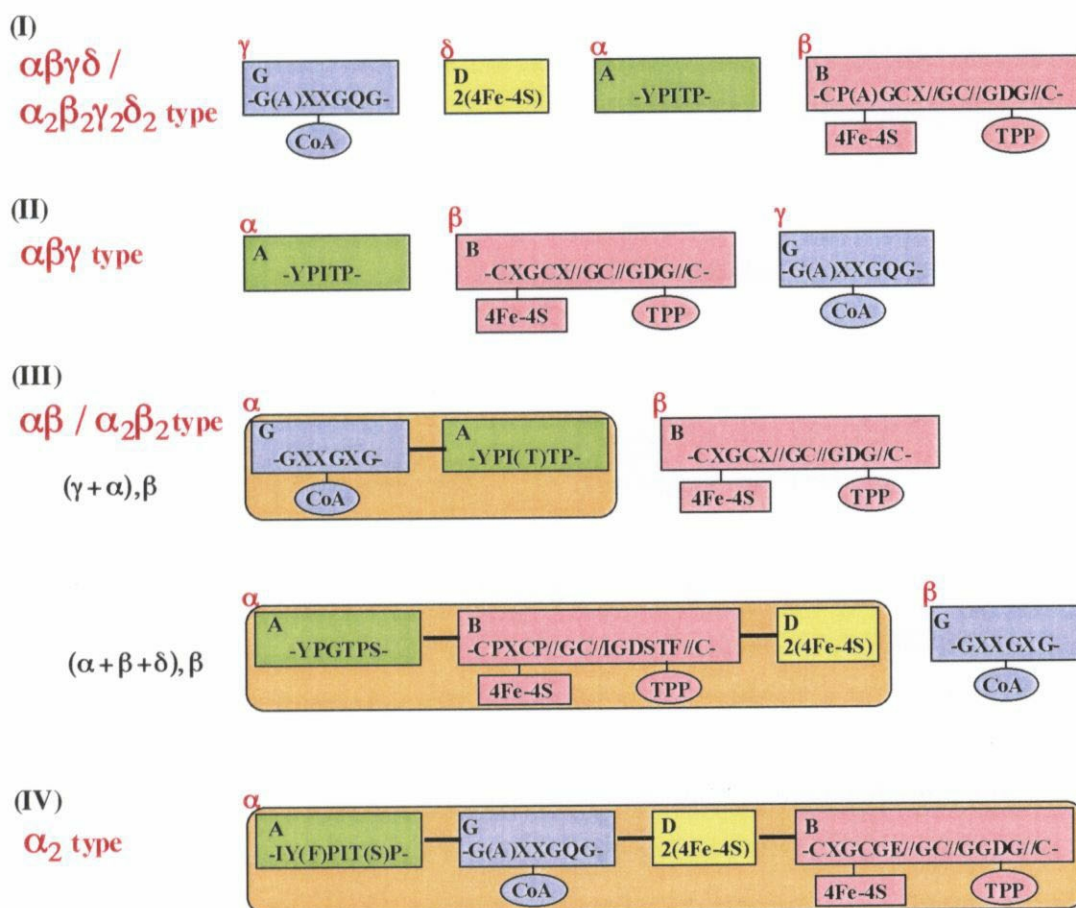


Fig. 0-6 Structures of typical 2-oxoacid oxidoreductases (OR) showing location of conserved domains. The typical sequence or motifs of the conserved domain found in each type of ORs are indicated. Four types of 2-oxoacid oxidoreductases classified according to the number of subunits composing are illustrated. (I), Four subunit type; (II), three subunit type; (III), two subunit type, two kinds of fusion pattern are indicated; (IV), one subunit type. CoA, putative CoA binding site (G(A)XXGQG) located in G-domain; 4Fe-4S (CXGCX//GC//C), 4Fe-4S cluster located in B-domain; TPP, TPP cofactor (GDG) located in B-domain; 2(4Fe-4S) cluster located in D-domain.

過去の仕事において、TK-6 株より OGOR が精製され、Kor と名付けられた[30, 31]。この酵素について酵素学的特徴付けがなされた。本酵素の最大の特徴である炭酸固定反応の触媒能についても *in vitro* での¹⁴Cを用いた実験により確かめられた[23]。しかしながら、この実験系は TK-6 株の無細胞抽出液を要求する点で完全なものと言い難く、夾雑蛋白質を排除した測定系の確立が望まれた。またこの実験系は放射性同位体を用いてるため、実験者の危険を伴う上、操作に制限があるため酵素の動力学的な解析が困難であるという欠点を抱えていた。

精製された Kor サブユニット蛋白質のアミノ酸配列の情報をもとに、Kor をコードする遺伝子が取得された[31] (Fig. 0-7)。構造遺伝子である *korAB* と機能未知遺伝子 *orf3*, *orf4* によりひとつのオペロンが形成されていた。興味深いことに、*kor* 遺伝子クラスターの上流隣に逆向きに存在していた遺伝子クラスターが、別の OR をコードすることがその塩基配列から予想された[32]。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。*forABG* 遺伝子にコードされる蛋白質は、それぞれ $\alpha\beta\delta$ 型 OR の α -、 β -、 γ -サブユニットと相同性を示し、これらのサブユニットに見られる保存モチーフも存在した。*forD* 遺伝子にコードされる蛋白質は他の $\alpha\beta\gamma\delta$ 型の OR の δ -サブユニットとは相同性を示さず、かつ2[4Fe-4S]クラスター結合モチーフも持たないが、TK-6 株由来の POR の δ -サブユニットと相同性を示した（当時、TK-6 株由来の POR が精製され $\alpha\beta\gamma\delta$ 型の OR であることが報告されていた[33]。）。一方、*forE* 遺伝子にコードされる蛋白質は2[4Fe-4S]クラスター結合モチーフを持っていたが、そのサイズ（74 アミノ酸）は他の δ -サブユニットと比べて随分小さいものであった。*forF* 遺伝子にコードされる蛋白質は報告されているどの蛋白質のアミノ酸配列とも相同性を示さなかった。この *for* 遺伝子クラスターを大腸菌で発現させたところ、この無細胞抽出液は 2-oxoglutarate に対して高い OR 活性を示したが他のどの 2-oxoaid にも高い OR 活性は見られなかった。したがって本酵素 For は Kor と並ぶもうひとつの OGOR と考えられた。大腸菌内での *for* 遺伝子群の発現実験の結果、OGOR 活性には *forDABGE* の5つの遺伝子が必要であることが示唆され、他のどの型の OR にも属さない新規の OR である可能性が議論されていた。

本研究の目的

本研究では、TK-6 株由来の二つの OGOR、すなわち For と Kor について、大腸菌で組換え体を発現させ、精製し、その酵素学的特徴を比較することで、その生理的意義を考察することにした。特に、本酵素の最大の特徴とも言える炭酸固定反応について、精製酵素を用いて動力学的解析を行うことを最重要課題とした。また二つの OGOR の発現パターンを解析することでも、本酵素の生理的意義を考察することにした。さらに本菌株に遺伝子組換え系を導入し、For 変異株や Kor 変異株についての生育パターンからも生理的意義を考察することを試みた。最後に For オペロンや Kor オペロン中にコードされる機能未知蛋白質についてその機能の解明を試みた。

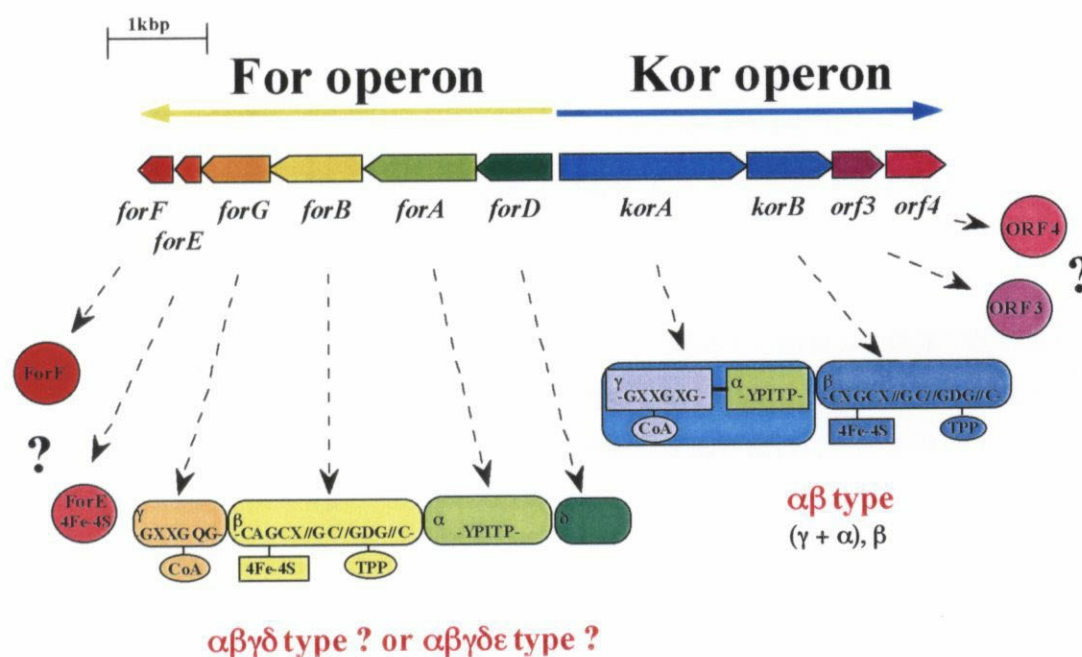


Fig. 0-7 Structure of the *for* and *kor* gene clusters. The arrow boxes indicate size and direction of the transcription of the genes. The ends of dot line arrows indicate products encoded by the genes. Question marks indicate that functions of the products are unknown.

第一章 OGOR の精製と酵素学的特徴付け

序

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 株は二酸化炭素固定経路として還元的 TCA サイクルを使用する。2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase (OGOR)は本回路の鍵酵素のひとつであり、 $\text{succinyl-CoA} + \text{CO}_2 \rightarrow 2\text{-oxoglutarate} + \text{CoA}$ の炭酸固定反応を触媒する。本研究室により既に TK-6 株より OGOR のひとつである Kor の精製・酵素学的特徴付け・遺伝子クローニングが終了している[30, 31]。Kor は 2-oxoacid oxidoreductase (OR)ファミリーの一員であり、特に *Sulfolobus* や *Halobacterium* に見い出された 2 種類のサブユニットから成る $\alpha\beta$ -型 OR と高い相同性を示す。一方、*kor* 遺伝子クラスターの上流隣に逆向きに存在していた *for* 遺伝子クラスターが、別の OR をコードすることがその塩基配列から予想され、そのサブユニット構造は $\alpha\beta\gamma\delta$ の 4 種類から成る超好熱性菌由来の OR に類似すると考えられた。この *for* 遺伝子クラスターにコードされる OR を大腸菌で発現したところ、この無細胞抽出液は 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。したがって本酵素 For は Kor と並ぶもうひとつの OGOR と考えられた[32]。

本章では、TK-6 株由来の For と Kor を大腸菌から精製し、酵素学的特徴について比較した。尚、OGOR の特徴付けについて、炭酸固定反応に関しては内容量が多いため第二章に独立させたので、本章では主に脱炭酸反応を指標にした特徴付けについて論ずる。

材料と方法

菌株とプラスミド DNA

大腸菌 JM109 株(Takara)を OGOR 発現用のプラスミドベクターの宿主として使用した。OGOR 発現プラスミドベクター、pYNA101 及び pYNA203 は当研究室により過去に構築されたものである (Fig. 1-1) [31, 32]。各々Kor 及び For を発現するために使用された。大腸菌は tryptic soy broth (TSB; Difco)培地を用いて 37°Cで培養された。

OGOR の発現

対象となるプラスミドベクター (pYNA101 もしくは pYNA203) を形質転換した大腸菌を 100 µg/ml アンピシリンを添加した TSB 培地に接種し、37°Cで一晩前培養を行った。本培養では、TSB 培地をメディウムびん*に容量の 83% (6 分の 5)に相当するだけ入れ、さらに 100 µg/ml アンピシリン、0.5 mM FeSO₄、1 mM IPTG となるように調整した培地を用いた。この培地に前培養液を全体の 1 %量加え、蓋で密封しよく振った後、37°Cで 16-20 時間静置培養を行った。

*本実験で使用した最大のびんは 3 L 容量で、これに 2.5 L の TSB 培地を入れた。

無細胞抽出液(cell free extract: CFE)の調製

培養後の菌体を遠心分離により回収し (6,000 rpm, 10 min)、ペレットを MY-I バッファー (10 mM Tris・HCl, pH 8.0; 0.01% Triton X-100, 1mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol and 1 mM sodium dithionite)で懸濁した。懸濁は 1 g の湿重量菌体に対して 4-5 ml のバッファーで行った。超音波破碎機 (Sonifier 250D; BRANSON) で懸濁液中の細胞を破碎し (pulse: 1s, duty: 50% power: 1-4, time: 1-2 min)、遠心分離(15,000 rpm, 15 min)の後の上清を回収した。バイアルに移し密封してから内部の気相をアルゴンガスで 10 分間置換し嫌氣的にした。70°C・10 分間の熱処理をし、変性した蛋白質を超遠心(37,000 rpm, 1h)で取り除いた。得られた溶液を無細胞抽出液 (CFE) とし以下の実験に使用した。保存する時は、再び密封しアルゴンガスで気相を置換してから-80°Cで凍結した。

蛋白質定量

蛋白質の濃度測定は Bradford 法(Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad)を用いて行った。スタンダードには BSA (Sigma)を用いた。

Kor の精製

まず CFE を硫酸アンモニウム沈澱によって目的酵素を多く含む画分(35-50%)を回収した。得られた沈澱は MY-I バッファーで再懸濁し PD-10 カラム (Pharmacia)で脱塩した。得られた溶液を MY-1 バッファーで平衡化した HiLoad Q Sepharose High Performance column (1.6 by 10 cm; Pharmacia)に供し、流速 5 ml/min、0-1 M の NaCl の濃度勾配（総量 800 ml）で溶出した。OGOR 活性の高い画分を限外ろ過(Vivaspin 20; Vivascience, England)で濃縮した。この溶液をゲルろ過カラム(HiPrep Sephacryl S-300 column, 1.6 by 60 cm; Pharmacia)に供した。0.2 M NaCl を含む MY-I バッファーで流速 0.5 ml/min で溶出して得られた活性画分を精製酵素とした。

For の精製

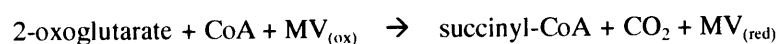
CFE に対して沈澱を行い 0-35%の硫酸アンモニウムで沈澱したタンパク質を回収した。得られたタンパク質は MY-I で再懸濁し PD-10 カラム (Pharmacia)で脱塩した。この試料を HiLoad Q Sepharose High Performance column (1.6 by 10 cm; Pharmacia)に供し、流速 5 ml/min、0-1 M の NaCl の濃度勾配（総量 1000 ml）で溶出した。OGOR 活性の高い画分を精製酵素とした。

For サブユニットのモル比の計算

精製された For のサブユニットを SDS-PAGE で分離した。ゲルを Coomassie brilliant blue (CBB)で染色し、洗浄、乾燥した。これをスキヤナでスキャンし、マッキントッシュ用ソフトウェア NIH image 1.62 を用いて染色された蛋白質のバンドの強度を測定した。

OGOR 活性測定

OGOR による脱炭酸反応の活性値は 2-オキソグルタル酸に依存的なメチルヴィオローゲン(MV)還元を分光光学的に追跡することで測定した。



測定は原則として 70°Cで行った。キュベット (3 ml 容量、1 cm 幅) は中を嫌気条件にできるようにゴム内栓とアルミ外栓で密封できる特注のものを使用した。標準的な反応混合液の組成は{OGOR enzyme, 10 mM sodium 2-oxoglutarate, 0.25 mM coenzyme A, 1mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol and 5 mM methyl viologen in 50 mM HEPES (pH 8.0); 1.5 ml}であった。キュベット内に注射針でアルゴンガスを 5 分間吹き込むことで嫌気条件にし、70°Cで 5 分間保温した後、基質である 2-オキソグルタル酸をシリンジで添加して

反応を開始させた。MV は還元されると青色を呈するので、 A_{578} ($\epsilon_{578} = 9.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) の変化を恒温機を付属させた U-3200 spectrophotometer (Hitachi) で計測した。酵素活性は U/mg protein で表し、1U は 1 分間あたり 1 μmol の MV の還元と定義した。

タンパク質のメンブレンブロッティング

目的のタンパク質溶液を SDS-PAGE に供し、このゲルから Sequi-Blot™ PVDF membrane (0.2 μm ; Bio-Rad Lab., Richmond, Calif.) 上に電気泳動でブロットした。電気泳動はセミドライ型電気泳動装置(Horiz-Blot; ATTO)と 1 mm 厚のろ紙 (ATTO) を用い、泳動バッファーには Towbin buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)を用いた。下から Towbin buffer に浸したろ紙 4 枚、メンブレン、ゲル、ろ紙 4 枚を重ね、下面陽極側から、ろ紙の面積(cm^2) あたり 2 mA の電流を室温で 1 時間流した。蛋白質のゲルからメンブレンへの移動の確認は、ブレステインマーカ―(Bio-Rad)の移動を目で確認することで行った。

タンパク質の N 末端アミノ酸シーケンス

上述のブロッティング後のメンブレンを 0.025% Coomassie blue R-250 を含む 40% methanol で染色後、50% methanol で脱色し、さらにイオン交換水で十分に洗浄した。目的のタンパク質のバンド部分をハサミで切りとり、プロテインシーケンサー(Procise™ cLC protein sequencer system; Applied Biosystems)を用いて N 末端アミノ酸シーケンスを決定した。

forE 発現プラスミドの構築と発現

2 種類のプライマー、P-*forE*-N (CATATGTACTATGTGGCTGATGTAAACGAA; 斜体は *Nde*I サイトを表す)と、P-*forE*-C(GGATCCTCAGTCTCCTGCAGTCACCATAAC; 斜体は *Bam*HI サイトを表す) を用いて、*forE* 遺伝子を TK-6 株のゲノム DNA から PCR で増幅した。得られた DNA 断片は一度 T ベクター (T-vector easy; Promega) に挿入しエラーが無いことをシーケンスによって確認した。あらかじめプライマー内に導入した制限酵素部位で切断した後、目的 DNA 断片をアガロースゲルから抽出し (QIAquick gel extraction kit; QIAGEN)、pET11a(+)ベクター (Novagen) に挿入し、*forE* 発現プラスミド pET-*forE* を得た。尚、DNA 実験方法の詳細は第 4 章に記述した。培養と発現は好氣的に行った。詳しい方法は第 4 章の「大腸菌での組換えタンパク質の大量発現」の項に記述した。

封入体となったタンパク質の可溶化と再構成

大量の封入体を形成した菌体の細胞破碎液を遠心分離して得られる沈澱を 8M 尿素を含む MY-1 バッファー中で嫌氣的に一晩攪拌することでできる限り可溶化した。残った不溶性画分は遠心分離で取り除いた。この溶液について MY-1 バッファーで透析を 2 回行い尿素を希釈していくことで、タンパク質の再構成を試みた。尿素の希釈に伴って不溶化した画分を遠心分離によって取り除いた上清について、SDS-PAGE で観察した。

Kor と For の分子量測定

ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いた。目的の蛋白質試料を 0.2 M NaCl を含む MY-I バッファーで平衡化した HiPrep Sephacril S-300 column (1.6 x 60 cm; Pharmacia Biotech)に供与し、同バッファーにより流速 0.5 ml/min で溶出した。同条件で決定したゲルろ過スタンダード(Bio-Rad)の溶出時間を指標にして For の分子量を測定した。

OGOR の熱安定性の測定

OGOR の熱安定性を測定するために以下の方法で熱処理を行った。適量の酵素溶液を 5 ml のバイアルに入れ密封したものを複数準備した。これらのバイアルを様々な温度で 30 分間インキュベートし、冷却した後開封し、遠心分離(15,000 rpm, 10 min)の後の上清を酵素活性測定に使用した。また、同様の実験を、バイアルの中の気相をアルゴンガスでガス置換し嫌気状態にしたサンプルについても行った。

結果

組換え Kor の精製とネイティブ Kor との比較

Kor 発現用プラスミドベクター pYNA101 で形質転換した大腸菌から組換え Kor を精製した(Fig. 1-1)。精製は熱処理(70°C, 10 min)後の CFE を硫酸アンモニウム沈澱、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(Q Sepharose)、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを経て行った。(Fig. 1-2 and 3, Table 1-1)。硫酸アンモニウム沈澱では 35-50%の画分を回収した。Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーでは 0.39 から 0.41 M の NaCl 濃度で活性画分を得た。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーでは溶出量 65.2 ml 周辺に活性画分を得た。Fig. 1-4 は精製された Kor の SDS-PAGE を示している。Kor の二つのサブユニット α , β の蛋白質を示すバンドを観察することができた。 α サブユニットより低分子側にはしご状にバンドが見い出された。これらのバンドのうち 2 種類について N 末端アミノ酸配列を調べた結果、Kor の α サブユニットのものと一致した(data not shown)。従って、これらはしご状の蛋白質群は分解を受けた Kor の α サブユニットであり、精製あるいは SDS-PAGE の過程で分解がおこっているものと推察された。このはしご状の蛋白質の出現は再現的事実であることから、分解を受けやすい箇所が決められていると考えられる。

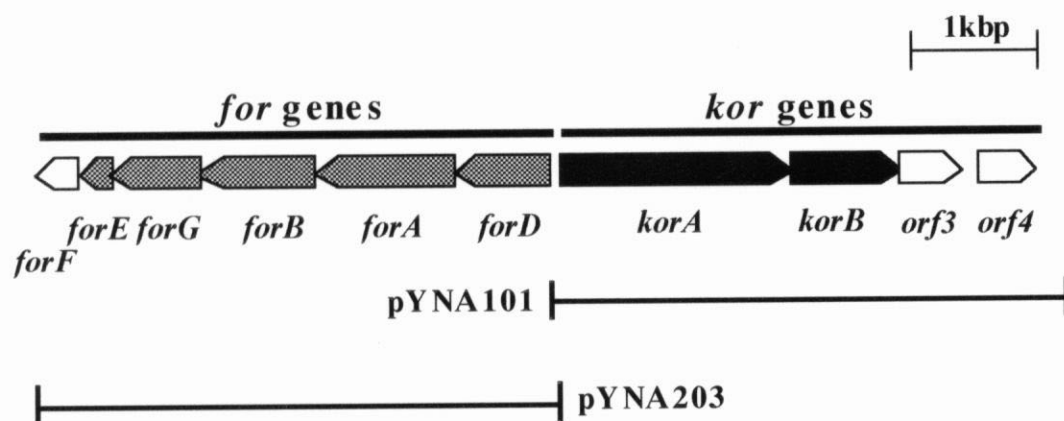


Fig. 1-1. Structure of the *for* and *kor* gene clusters. The arrow boxes indicate size and direction of the transcription of the genes. The genes encoding the subunits of For are shown in gray. The genes encoding the subunits of Kor are shown in black. Functions of the genes shown in white are unknown. The lower bars designated as pYNA101 and pYNA203 indicate the fragments used for expression of recombinant enzymes.

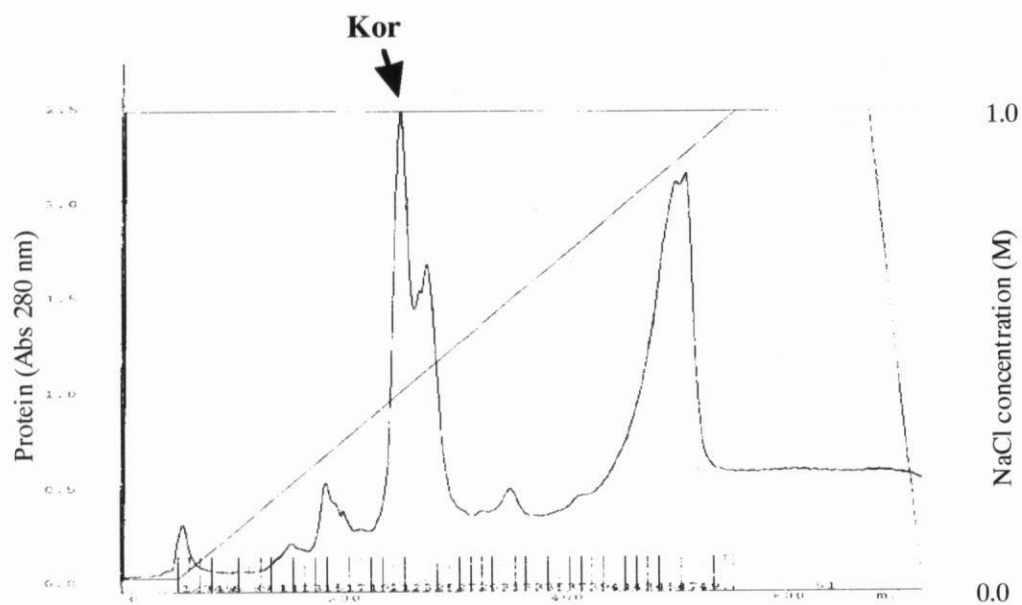


Fig. 1-2. Elution pattern of the protein during Q-sepharose HP column chromatography step.

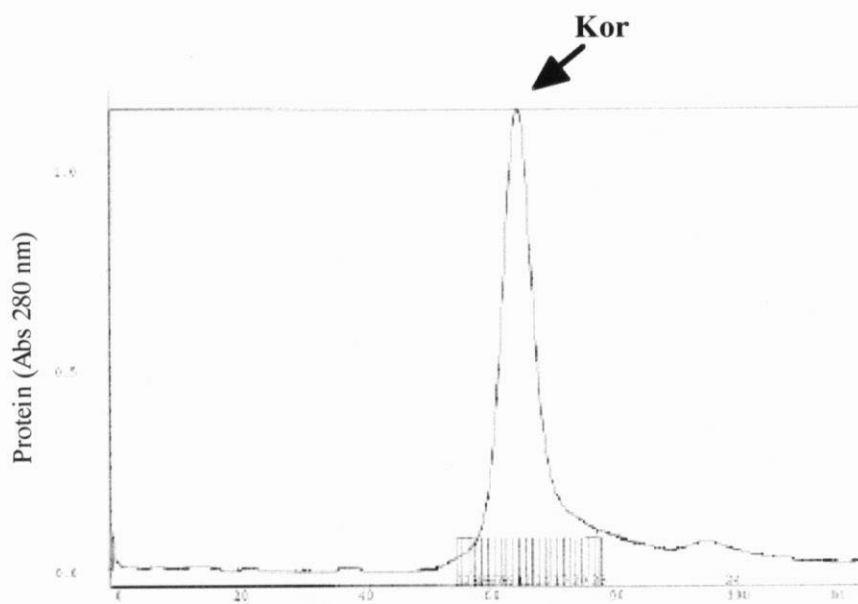


Fig. 1-3. Elution pattern of the protein during gel filtration column chromatography step.

Table 1-1. Purification of the recombinant Kor from *E.coli*.

Step	Protein (mg)	Activity (U)	Sp. Act. (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell-free extract	49.2	989.0	20.1	100	1
Ammonium sulfate	33.2	630.8	22.9	64	1.1
Q-sepharose HP	4.1	136.8	33.4	14	1.7
Hiprep Sephacryl S-300	1.0	35.0	35.0	3.5	1.7

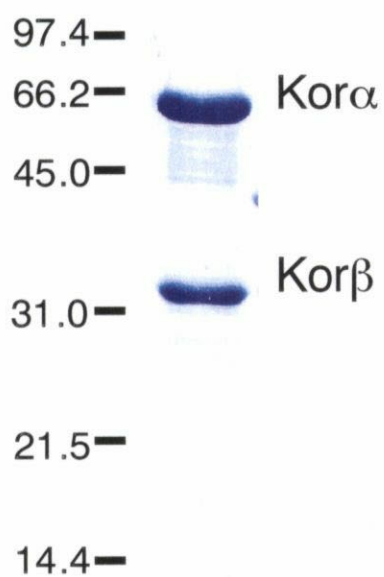


Fig. 1-4. SDS-PAGE (18%). Purified recombinant Kor (13 μ g). The gel was stained by Coomassie brilliant blue (CBB).

TK-6 株から精製した Kor のネイティブ酵素が既にキャラクタライズされている。分子質量、至適温度、至適 pH、温度安定性などにおいてネイティブ酵素と組換え酵素の間に差は見出せなかったが、最大活性はネイティブ酵素 18 U/mg であるのに対し、組換え酵素は 35 U/mg と約 2 倍の差があった (Table 1-2)。これは組換え酵素の精製では熱処理によってその過程を簡略化することができたために、活性型の酵素の精製効率が上昇したためであると考えられる。

Table 1-2. Properties of recombinant and native Kor enzymes.

	Recombinant Kor	Native Kor
Molecular mass ^{*1}	104 k	105 k
Optimum pH	7.8	7.6-7.8
Optimum temperature	75-85°C	75-85°C
Thermostability		
Anaerobic condition		
T _{50%} (30 min) ^{*2}	82°C	84°C
Aerobic condition		
T _{50%} (30 min)	62°C	58°C
T _{<20%} (30 min) ^{*2}	73°C	71°C
Maximum velocity (U/mg) ^{*3}	35	18
K _m (2-oxoglutarate) (mM)	No data	1.4
K _m (CoA) (μM)	No data	80

*1 Molecular mass was calculated by gel filtration column.

*2 T_{50%} or T_{<20%} indicates the temperature which shows 50% or 20% of residual activity after treatment for 30 min.

*3 Specific activity was determined by reduction of methyl viologen.

組換え For の精製

For 発現用プラスミドベクターpYNA203 で形質転換した大腸菌から組換え For を精製した。精製は熱処理(70°C, 10 min)後の CFE を硫酸アンモニウム沈澱、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(Q-Sepharose)を経て行った。(Fig. 1-5, Table 1-3)。Fig. 1-6 は精製された For の SDS-PAGE を示している。SDS-PAGE のゲル上には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量とそれぞれ一致した。最も低分子の位置のバンドは他の4本のバンドよりも弱いものであった。このバンドが *forE* 遺伝子産物と *forF* 遺伝子産物のどちらに由来するものであるかを確かめるために、このバンド中のポリペプチドの N-末端アミノ酸配列を決定した。その結果、1番目から9番目までのアミノ酸が *forE* 遺伝子にコードされるアミノ酸と完全に一致した(Fig. 1-7)。このことから、この最小のバンドが *forE* 遺伝子産物に由来するものであると確認された。この結果は 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ことを強く示唆した。また、pYNA202 (*forDABGE* 遺伝子発現プラスミド。*forF* を含んでいない。)を保持した組換え大腸菌からの For の精製においても上記と同じ結果が得られ(data not shown)、5本のバンドが ForA, ForB, ForG, ForD, ForE であることが示された。したがって、本酵素が、これまで報告されている4種類以下のドメインから成るどの OR ファミリーの酵素とも異なる新規のサブユニット構造を持つ OR であると考えられた。CBB で染色したゲル上の蛋白質のバンド強度の積分値から計算されたサブユニットのモル比は ForA: ForB: ForG: ForD: ForE = 1.00: 1.04: 1.02: 0.98: 0.20 であった。

Table 1-3. Purification of the recombinant For from *E.coli*

Step	Protein (mg)	Activity (U)	Sp. Act. (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell-free extract	55.8	89.7	1.61	100	1
Ammonium sulfate	6.8	17.8	2.62	20	1.6
Q-sepharose HP	0.2	0.67	3.34	0.7	2.1

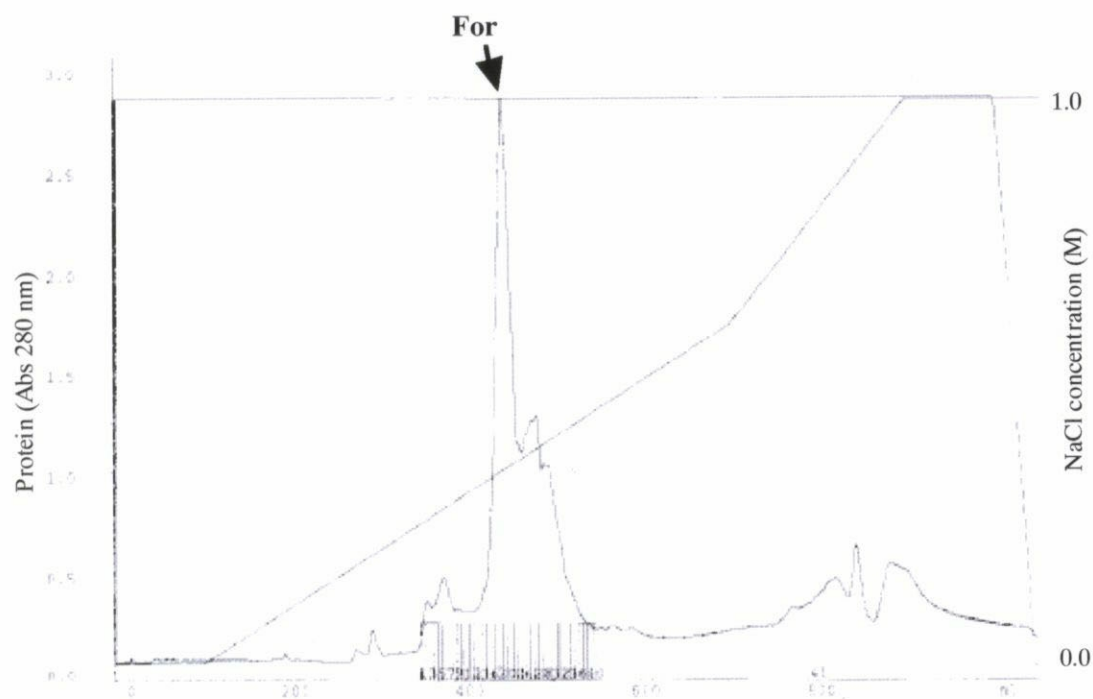


Fig. 1-5. Elution pattern of the protein during Q-sepharose HP column chromatography step.

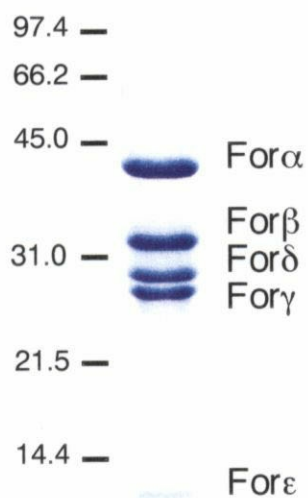
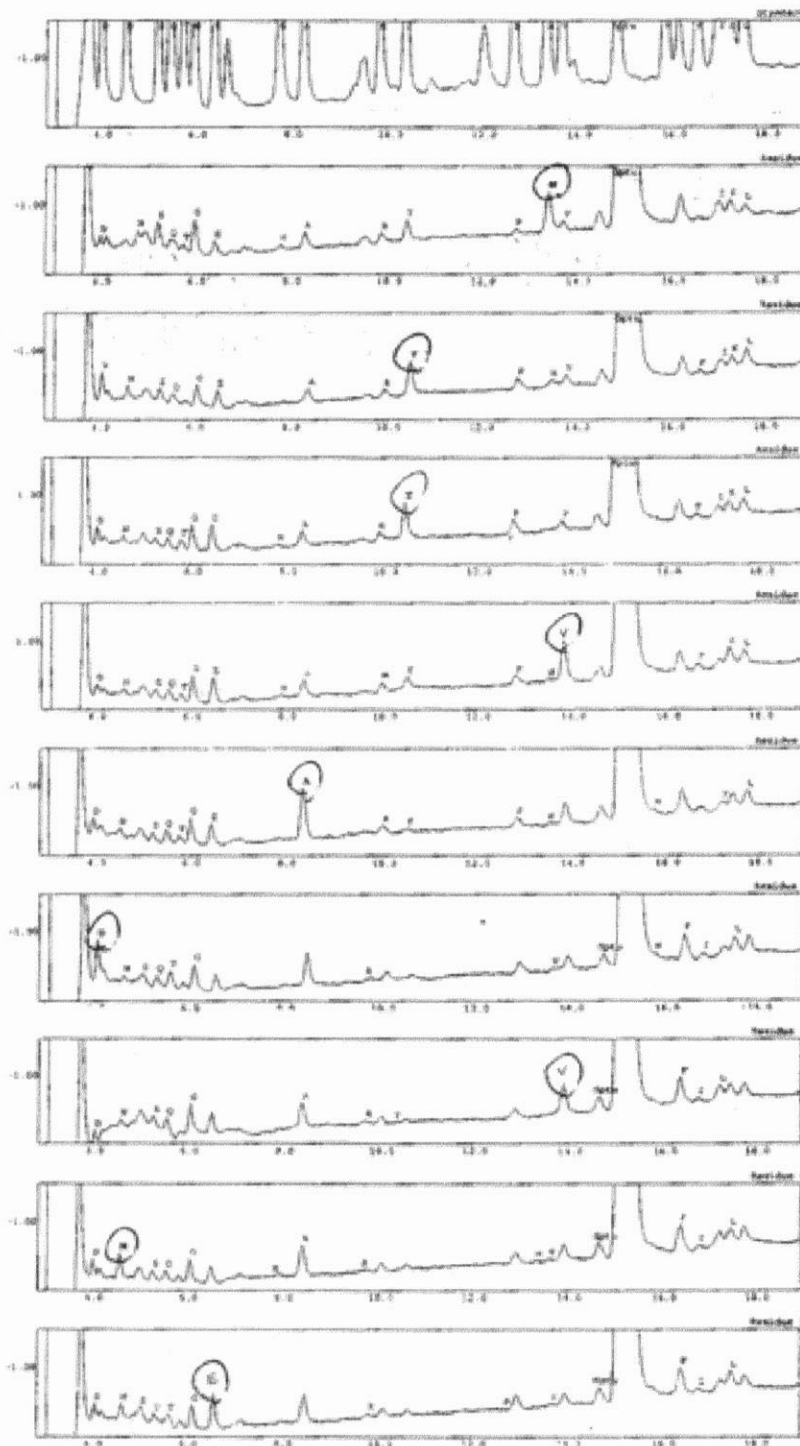


Fig. 1-6. SDS-PAGE (18%). Purified recombinant For (16 μ g). The gel was stained by Coomassie brilliant blue (CBB).

A



B **MYVADVNE...**

Fig. 1-7. A: Chromatogram of N-terminal amino acid sequence of the fifth subunit of For. B: N-terminal amino acid sequence of the *forE* gene product.

ForE の単独発現

精製された For に含まれる ForE 蛋白質の存在比は明らかに他の 4 種の蛋白質より少なかった。For が OGOR 活性を得るには少なくとも *forE* 遺伝子の発現が必要ながことが示唆されていたことと、*forE* 遺伝子にコードされる蛋白質が 2 つの 4Fe-4S クラスター結合モチーフを持つ小型の蛋白質であることも含め、ForE は遊離の蛋白質として存在し For 専用の電子伝達体として機能する可能性もまた考えられた。

そこで私は *forE* 遺伝子を大腸菌内で発現させるプラスミド pET-ForE を作成し、大腸菌に組み込んだ。発現は好氣的に行った。しかし、発現蛋白質は強力な封入体を形成し、可溶性画分には得られなかった。この封入体となった ForE を 8 M の尿素によって可溶化させた後、希釈によってリフォールディングすることを試みた。しかし、得られた可溶化蛋白質は熱処理 (70°C, 3 min) で速やかに沈澱した(Fig. 1-8)。これらの結果は、ForE が単独では構造を維持できないことを示唆しており、ForE が For のサブユニットであることを強く支持するものであった。

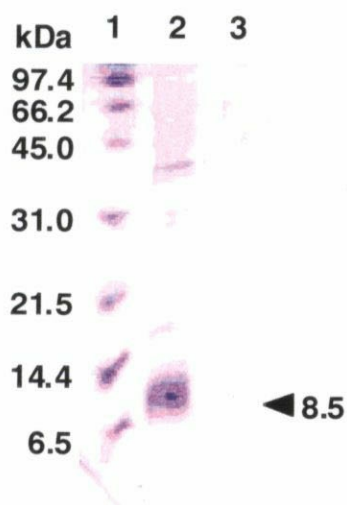
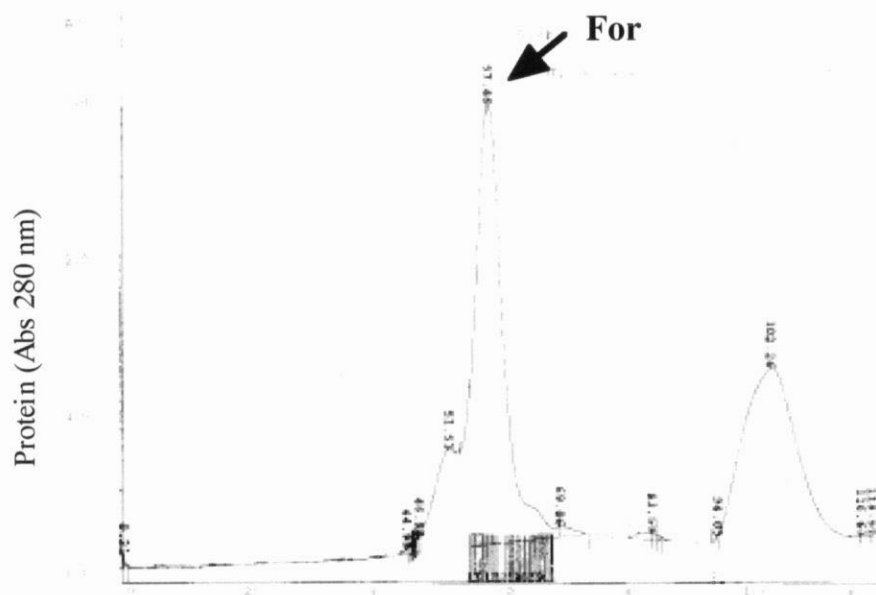


Fig. 1-8. SDS-PAGE (18%). Refolding of the recombinant ForE. Lane 1: marker protein, 2: solution containing the refolded proteins, 3: the same solution after the heat treatment.

精製した For の分子質量をゲルろ過カラムによって測定した(Fig. 1-9)。カラムは HiPrep Sephacryl S-300 column を用いた。For は溶出量 57.7ml 周辺で溶出され、その結果 For の分子質量は約 230 kDa と推定された(Fig. 1-10)。



The figure is a gel permeation chromatogram (GPC) plot. The vertical axis (y-axis) is labeled 'ecular weight' and is on a logarithmic scale with major ticks at 10^3 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 . The horizontal axis (x-axis) is labeled 'Elution volume (ml)' and is on a linear scale from 40 to 90 with major ticks every 10 units. A series of data points, represented by small circles, shows a linear decrease in molecular weight as elution volume increases. A straight line is drawn through the data points. An arrow points to a specific data point on the line at an elution volume of approximately 61 ml.

25

For の基質特異性

精製酵素を用いて基質特異性を調べた (Table 1-4)。8 種類の 2-oxoacid (2-oxoglutarate, 2-oxobutyrate, 2-oxoisocaproate, 2-oxoisovalerate, oxalacetate, oxomalonate, pyruvate, phosphoenolpyruvate) を酵素活性測定に使用した。この結果、For は Kor と同様に 2-oxoglutarate に対してのみ特に高い活性を示した。このことから For は生体内で OGOR として機能していることが強く示唆された。

Table 1-4. Substrate specificity of recombinant For.

Substrate	Concentration (mM)	Activity (%)
2-Oxoglutarate	10	100
2-Oxobutyrate	10	0.1
2-Oxoisocaproate	10	0.8
2-Oxoisovalerate	10	0.4
Oxalacetate	10	0.0
Oxomalonate	10	0.4
Pyruvate	10	1.9
Phosphoenolpyruvate	10	0.3

For の至適 pH と至適温度

For の至適 pH を測定した(Fig. 1-11)。バッファーによって差はあるものの pH 8.7 の時に最大の活性を示した。この値は Kor の至適 pH (pH 7.7)よりも少しアルカリ側に傾倒していた。

For の至適温度を測定した(Fig. 1-12)。For は室温では事実上活性を示さず、60℃以上で活性が上昇し、80℃周辺で至適を示した。このパターンは Kor のものとほぼ完全に一致した。

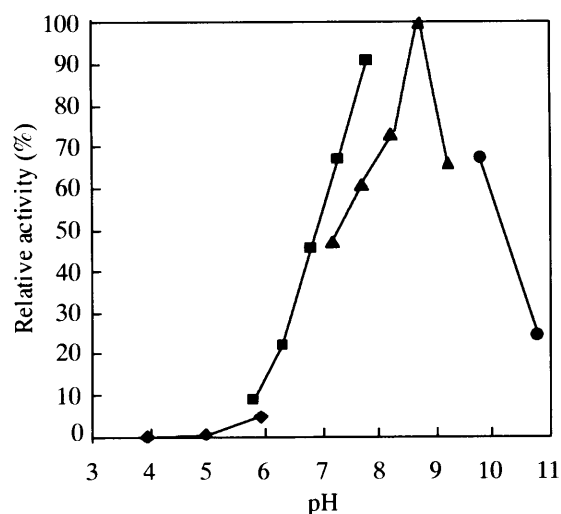


Fig. 1-11. Effect of pH on the decarboxylation activity of recombinant For. The buffers used were as follows: 100 mM citrate-phosphate (pH 4.0 to 6.0; diamond), 100 mM HEPES-NaOH (pH 5.8 to 7.8; square), 100mM glycine-NaOH (pH 7.2 to 9.2; triangle), and Na₂HPO₄-NaOH (pH 9.8 to 10.8; circle). The reaction was measured at 70°C. The pH of the buffer was adjusted at 20°C and the revised value at 70°C was calculated using the following pK_a/°C correction ratios (citrate-phosphate: -0.001, HEPES-NaOH: -0.014, glycine-NaOH: -0.026, and Na₂HPO₄-NaOH: -0.025).

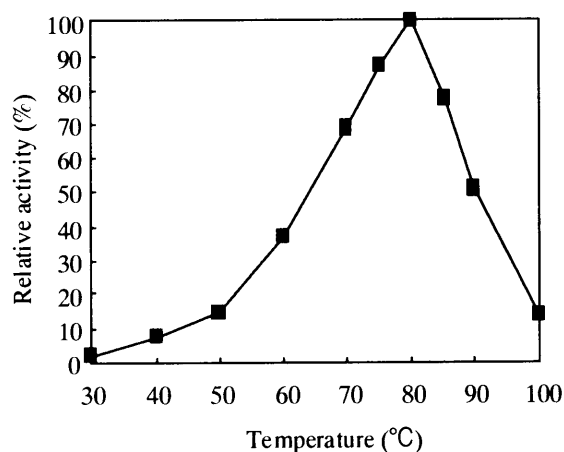


Fig. 1-12. Effect of temperature on the decarboxylation activity of recombinant For. After incubation of the reaction mixture in the absence of the enzyme at the indicated temperature for 5 min, the reaction was started by addition of the enzyme solution.

For の動力学的解析

この酵素による methylviologen 還元活性は 2-oxoglutarate と CoA の濃度に依存した。70℃、pH 7.8 におけるこれらの基質に対する K_m 値は 2.9 mM (2-oxoglutarate)と 26 μ M (CoA)であった(Fig. 1-13, 14)。Kor のこれらの基質に対する K_m 値は 1.4 mM (2-oxoglutarate)と 80 μ M (CoA)であり、For との大きな差は見出せなかった。しかし For の最大速度は 3.6 units/mg であり Kor (35 units/mg)の約 1/10 程度であったことから、回転数において For は Kor よりも低いと推察された。

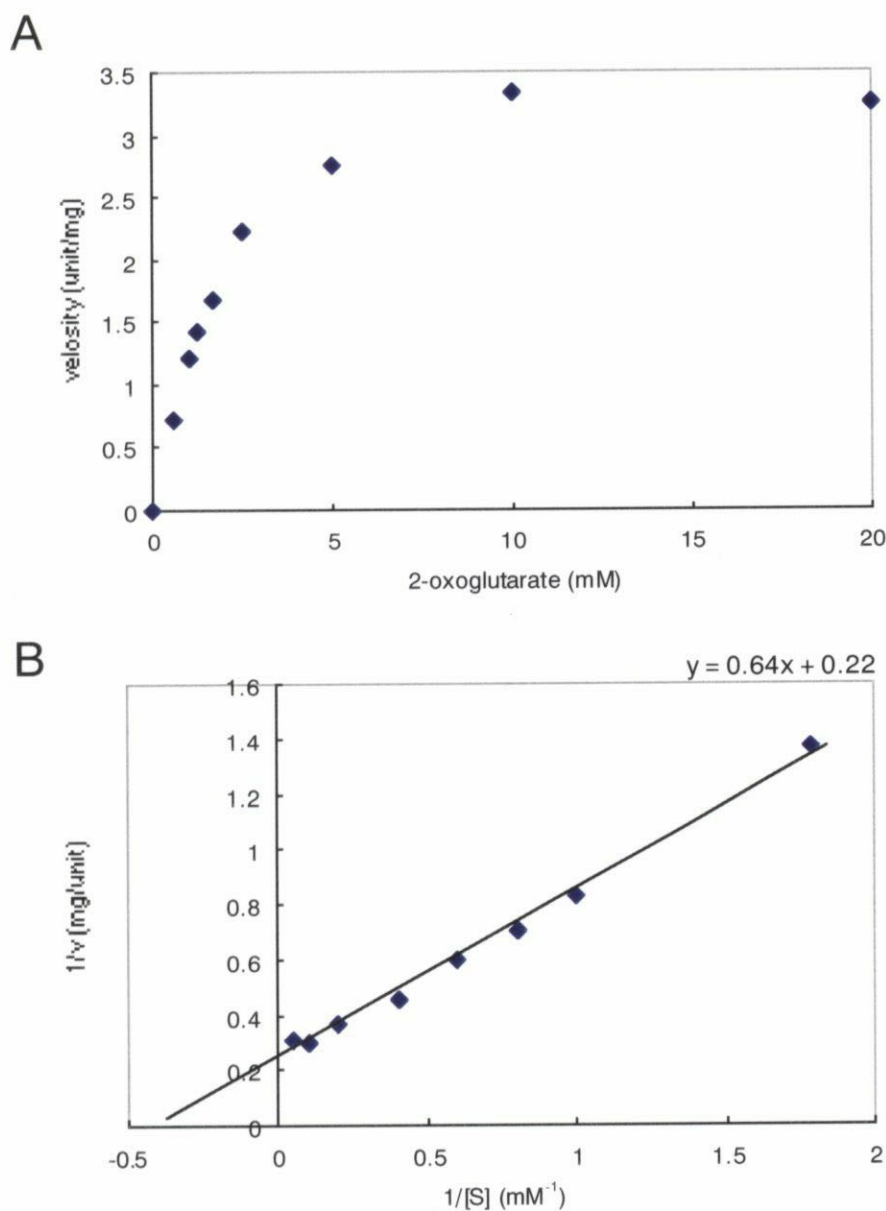
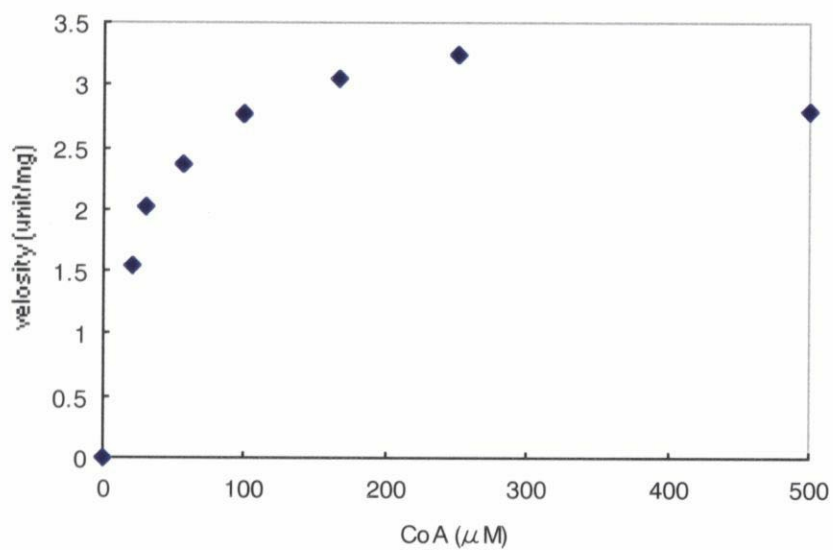


Fig. 1-13. Kinetics of purified recombinant For for 2-oxoglutarate. A: S-v plot. Concentration of CoA was 250 μ M. B: Lineweaver-Burk plot.

A



B

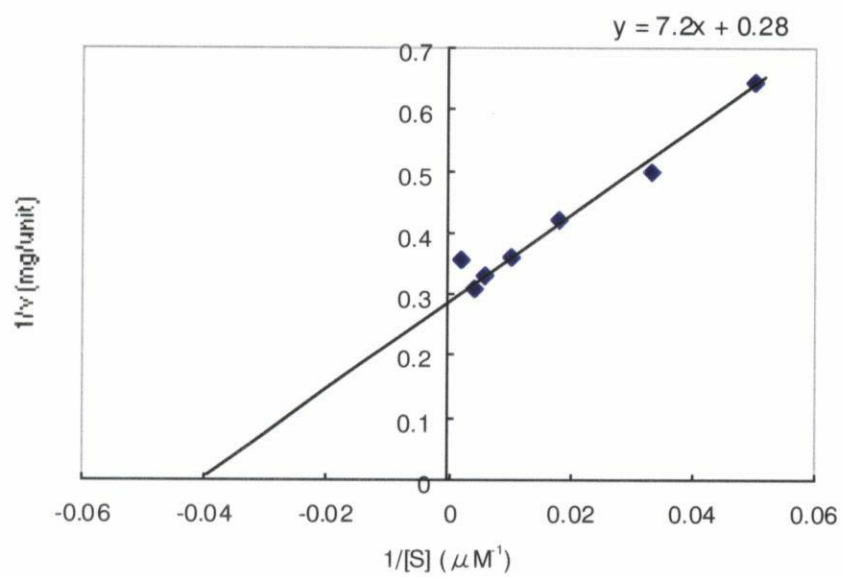


Fig. 1-14. Kinetics of purified recombinant For for CoA.
 A: S-v plot. Concentration of 2-oxoglutarate was 20 mM.
 B: Lineweaver-Burk plot.

For の熱・酸素安定性

組換え For と組換え Kor の熱安定性を決定するために、4℃から 100℃の各温度における 30 分間のインキュベート後の残存活性を測定した(Fig. 1-15)。インキュベートは好氣的・嫌氣的の 2 条件にて行った。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℃、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。

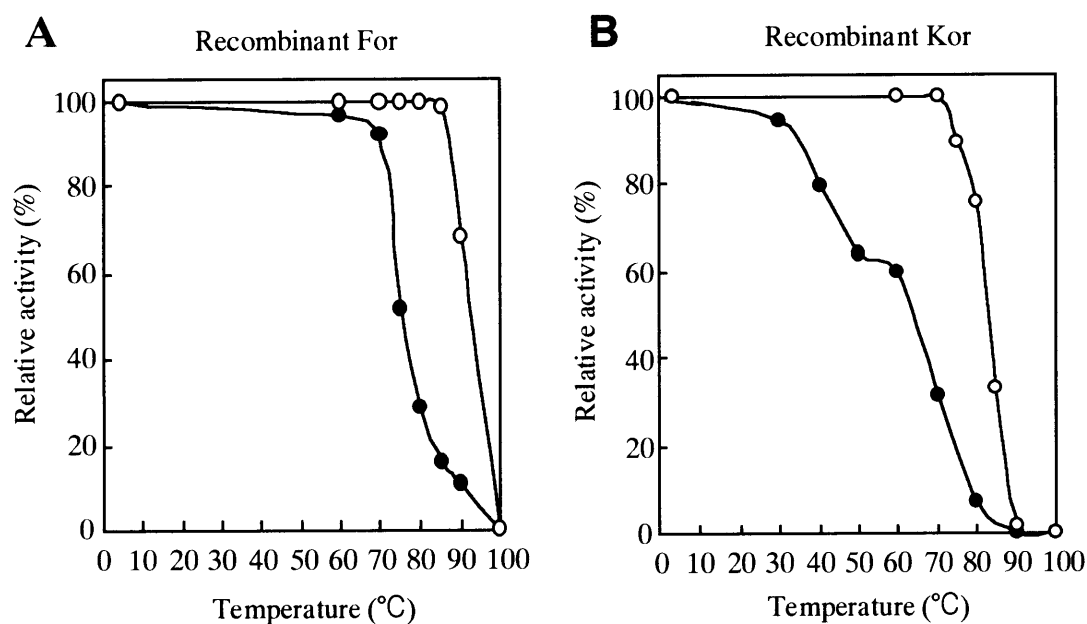


Fig. 1-15. Thermal stability of OGORs under aerobic and anaerobic conditions. Recombinant For; A and recombinant Kor; B. The purified enzyme solution was treated at the indicated temperature for 30 min either aerobically (closed circles) or anaerobically (open circles). After the treatment, the residual activity was measured at 70℃.

For と Kor の酵素学的特徴の比較

以上、本章の実験で得られた For の特徴について、Kor と比較したものが Table 1-5 である。

Table 1-5. Properties of recombinant For and Kor.

	For	Kor
Molecular mass ^{*1}	230 k	104 k
Subunit (kDa)	43, 32, 25, 27, 8	68, 33
Holoenzyme	($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$) ₂ or ($\alpha\beta\gamma\delta$) ₂ ϵ ?	$\alpha\beta$
Optimum pH	8.7	7.8
Optimum temperature	75-85°C	75-85°C
Thermostability		
Anaerobic condition		
T _{50%} (30 min) ^{*2}	93°C	85°C
Aerobic condition		
T _{50%} (30 min)	75°C	60°C
T _{<20%} (30 min) ^{*2}	85°C	70°C
Maximum velocity (U/mg) ^{*3}	3.6	35
K _m (2-oxoglutarate) (mM)	2.9	1.4 ^{*4}
K _m (CoA) (μM)	26	80 ^{*4}

*1 Molecular mass was calculated by gel filtration column.

*2 T_{50%} or T_{<20%} indicates the temperature which shows 50% or 20% of residual activity after treatment for 30 min.

*3 Specific activity was determined by reduction of methyl viologen.

*4 These values were referred from property of native Kor.

考察

本章では、私は *H. thermophilus* TK-6 株由来の For を組換え大腸菌から精製し、酵素学的特徴付けを行った。本酵素は先に遺伝子が取得されていたので、今回初めて精製蛋白質として得られた。この For と比較するために組換え大腸菌より生産された TK-6 株由来 Kor もまた精製された。この組換え Kor の精製は既に報告されている TK-6 株細胞からの Kor の精製よりも簡単に行うことができた。これは本酵素が耐熱性であるため、熱処理によって大腸菌由来の蛋白質の大部分を除去できたからであると考えられる。熱処理後の CFE を精製の出発材料にしているので精製表における Kor の比活性の上昇はわずかな値になった。この組換え Kor の酵素学的特徴は報告されている天然の Kor とおおよそ同じ性質を示した。ただし、最大活性速度については組換え体の方が天然の約 2 倍高い値を示した。これは精製過程の簡略化によって、酵素の失活量を抑えることができたためと考えられた。精製 Kor を SDS-PAGE に供すると、 α サブユニットの分解を観察することができた。この分解は精製過程におこるものなのか、SDS-PAGE の過程におこるものかはわからない。

For の組換え大腸菌からの精製も熱処理により、その後の操作は少なくて済んだ。一般に OR は酸素感受性であり空気中では速やかに失活する。TK-6 株由来の OGOR は For と Kor 共に、空気下でも比較的活性が維持されるが、それでも長時間の露出は大幅な活性低下を招くので、精製時間の短縮は高活性の酵素を得るのに有効であろう。精製された For の SDS-PAGE の映像は明らかに ForA, ForB, ForG, ForD, ForE の 5 本のバンドの存在を示し、For は 5 種類のサブユニットから成る OGOR であると考えられた。

その一方で、これまで 4 種以上のサブユニットから成る OR の報告がなかったことや、ForE が 2 つの 4Fe-4S クラスター結合モチーフを持つ小型の蛋白質であることから、遊離の電子伝達体である ForE が For と共に共精製された可能性も考えられた。しかしながら、*forE* 遺伝子の大腸菌内での単独発現の結果は、強力な封入体の形成を招き、またこの封入体を安定な可溶性蛋白質として再生することもできなかった。これらのことは ForE が単独では可溶性画分で構造を維持できないことを示唆し、ForE が For のサブユニットであることを強く支持した。

以上、過去の知見を含めた下記の結果から、For は 5 種類のサブユニットから成る新規の型の OGOR であると考えられた。

- (i) 精製された For の SDS-PAGE の映像は明らかに 5 本のバンドの存在を示した。
- (ii) For が OGOR 活性を得るには少なくとも *forABGDE* の 5 種類の遺伝子の発現が必要。
- (iii) ForE は一般的な OR の D-ドメインに保存されている 2 (4Fe-4S) 結合モチーフを持つ。

(iv) ForE は単独では可溶性蛋白質としての構造を維持できない。

ゲルろ過カラムによって測定された組換え For の分子質量は 230 kDa であった。この値は 5 個のサブユニット($\alpha\beta\delta\gamma\epsilon$)の分子質量の合計(136 kDa)よりも大きい、その 2 倍よりは小さい。ゲルろ過カラムでは、耐熱性の蛋白質はその密な構造によりしばしば実際の分子質量より小さく評価される。SDS-PAGE のゲル解析による各サブユニットのモル比は ForE サブユニットだけ他のサブユニットの 1/5 の値を示したが、これは精製過程中の ForE サブユニットのホロエンザイムからの解離によるものだろう。従って、For ホロエンザイムのサブユニット構造は($\alpha\beta\delta\gamma\epsilon$)₂ か ($\alpha\beta\delta\gamma$)₂ ϵ であろう。

For の最大活性速度は Kor の 1/10 程度であった。その上、精製中に突然失活するという扱いにくさもある（この失活は時間に比例するものではなく、あるひとつの操作後に突発的に非再現的に起る。したがってこの失活は酸化によるものではなく、物理的な衝撃による ForE サブユニットの解離などによって引き起こされるものではないかと私は考えている。ただし、ForE は 活性に重要と考えられる 2[4Fe-4S]クラスターを含んでいるので、この 2[4Fe-4S]クラスターの分解とサブユニットの解離は密接に関係しているのかも知れない。）。これらのことが、過去に当研究室において TK-6 株の細胞から OGOR を精製した際に Kor だけが見い出され、For は見逃されてしまった理由であろう。

ほとんどすべての OR ファミリー酵素は酸素感受性で、空気中で速やかに失活する傾向がある[34]。これは、おそらく 3 つの[4Fe-4S]クラスター（酵素中に整列し電子の通路を形成している）が分解してしまうからであろう[35, 36]。しかしながら、Kor のような $\alpha\beta$ タイプの OR は、2 つの[4Fe-4S]クラスターを内包する D-ドメインを持たず、電子の授受は B-ドメインに位置するただ 1 つの[4Fe-4S]クラスターを通して行われると考えられている。これがこのタイプの OR にある程度の酸素耐性を与える理由になっているという仮説がある[28]。実際、TK-6 株由来の Kor や *Sulfolobus* や *Halobacterium* 由来の OR は好気条件下で精製され、他の嫌気性菌由来の OR よりも高い酸素耐性を示している[28, 30, 37]。私は For は多くの OR と同様に酸素感受性が高いと予想していた。なぜなら、For は 3 つの[4Fe-4S]クラスター結合モチーフを有し、また、好氣的な精製過程にしばしば失活したからである。しかしながら、For の熱処理後の残存活性率は嫌気・好気の両条件において Kor のそれを上回った。特に好気条件下の熱処理で For が高い活性残存率を示したことは大きな驚きであった。この For の酸素耐性のメカニズムは現在のところ不明である。For のサブユニット構造において、最も特徴的なことは ForD サブユニットの存在である。ForD は他の OR に見られる保存モチーフを一切含まず、その機能は不明であるが、ForD サブユニットがその酵素活性に不可欠であることは、

過去に行われた組換え大腸菌による遺伝子発現実験により証明されている。したがって、ForD サブユニットが酵素機能に重要な働きをしていることは明らかであり、ひとつの可能性として、ホロ酵素の構造維持に役立っているのかも知れない。

本章では For と Kor を大腸菌から発現・精製し、酵素学的特徴を明らかにした。For はかねてから、その構造の新規性が議論されていたが、今回精製するに至り、明確に新規のサブユニット構造をとることを示した。本菌において POR をコードする遺伝子クラスターが *for* 遺伝子クラスターと高い相同性を示したことから、POR もまた5種のサブユニットを持つことが予想された。近頃、大腸菌から POR の組換え体の精製が達成され、5サブユニット構造をとることが示された(Fig. 2-3B) [38]。 *H. thermophilus* TK-6 株と近縁種で全ゲノム配列が明らかにされている *Aquifex aeolicus* のゲノム上に TK-6株の *for* 遺伝子クラスターと *por* 遺伝子クラスターとそれぞれ相同な配列を持つ[39]。これらは一般的な $\alpha\beta\gamma\delta$ -type の OR としてデータバンクに登録されているが、おそらく TK-6 株と同様に5サブユニット構造を持つと考えられる。これ以外に For と相同と考えられる OR の報告は今のところ無い。つい最近、*Methanococcus maripaludis* 由来の5種類のポリペプチドから成る POR について報告されたが、TK-6 株の For や POR とは相同性を示さなかったので異なる系統であると考えられた[40]。

第二章 OGOR による炭酸固定反応

序

OGOR の生理的意義を考慮した場合、二酸化炭素を固定する反応を測定する必要がある。しかしながら、これまで遺伝子情報だけが与えられていた For に関しては、炭酸固定反応触媒能に関する知見は全く無い。一方、Kor については精製酵素存在下で $^{14}\text{CO}_3^-$ の取込みが起こることと、その生成物が 2-オキソグルタル酸であることがすでに確認されている[23]。しかしながらこの反応系は TK-6 株の CFE を添加しなければ起こらないという点で不完全なものであった。不特定多数の物質を含む CFE を添加した時点で系の内部で起こっていることを議論するのは困難である。この不明瞭性を排除するために、CFE に頼らず精製物のみを使った系の確立が必要とされた。また $[^{14}\text{C}]$ の取込みを計測する実験では経時的な測定が困難であることから動力的な解析が行われていなかった。

本章では精製した OGOR 及びその他の蛋白質を用いて二酸化炭素固定反応を証明し、かつ動力的に解析することを目的とした。

材料と方法

OGOR の調製

For、Kor 共に、第一章で述べた通り、組換え大腸菌から発現・精製したものを実験に用いた。

H. thermophilus TK-6 株の培養

H. thermophilus TK-6 は無機培地で培養した。無機培地の組成は Table 2-1 に示した。

Table 2-1-1. 無機培地の組成

(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.25 g
CaCl ₂	0.03 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.014 g
trace elements solution	0.5 ml

(per litter of deionized water, pH 7.0)

Table 2-1-2. trace elements solution の組成

MoO ₃	4 mg
ZnSO ₄ •7H ₂ O	28 mg
CuSO ₄ •5H ₂ O	2 mg
H ₃ BO ₃	4 mg
MnSO ₄ •5H ₂ O	4 mg
CoCl ₂ •6H ₂ O	4 mg

(per litter of deionized water, pH 7.0)

TK-6 株の培養は目的に応じて 3 段階のスケールに別けて行った。

(i) 50-100 mL 培地 / 500 mL 坂口フラスコ： 種菌（湿菌体 1 g を約 1 ml の無機培地で懸濁し凍結保存したもの）50-100 μ l を添加し、ゴム栓をビニールテープで固定した後、ゴム栓を貫通させたガラス管を通して混合ガス(H_2 : O_2 : CO_2 = 75: 10: 15)を 1 L / min で約 5 分間吹き込むことでガス置換を行った。70°C、150 rpm で振盪培養を行い、12-24 hr 間隔でガス置換を行い、2-3 日後に回収した。

(ii) 1-2 L 培地 / 5 L 耐圧びん： 種菌 1ml ないしは前述の培養液 100 ml を接種し、ゴム栓をビニールテープで固定した後、混合ガスを 1-2 L / min で約 15-30 分間吹き込むことでガス置換を行った。70°C、150 rpm で振盪培養を行い、12-24 hr 間隔でガス置換を行い、2-3 日後に回収した。

(iii) 8 L 培地 / 10 L ジャーファーマンター： 前述の培養液 1-2 L をジャーファーマンター内の 6-7 L 培地に合計 8 L になるように添加し、混合ガスを 1 L / min で吹き込みながら 70°C、600 rpm でジャー培養を行い、12-18 時間後に回収した。

TK-6 株の CFE の調製

培養液を遠心分離機にかけ、菌体を回収した後、10 mM HEPES (pH 8.0)に懸濁し、フレンチプレスにかけて溶菌した。この菌体破碎液を超遠心(37,000 rpm, 1 hr)にかけ上清を回収し CFE とした。保存はアルゴンガス置換したバイアル内で-80°C で凍結することで行った。

$^{14}\text{CO}_3^-$ を用いた炭酸固定反応活性測定

酵素反応溶液を Table 2-2 に、実験の流れを Fig. 2-1 に示した。

Table 2-2. OGOR による ^{14}C 取り込み実験の反応液組成

50 mM	phosphate buffer (pH 6.8)
5 mM	MgCl_2
1mM	EDTA
0.2 mM	sodium dithionite
0.25 mM	succinyl-CoA
5 mM	$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$
0.1 mM	thiamine pyrophosphate
0.2 mM	ATP
	Ferredoxin
	OGOR

この反応溶液 500 μl を 5 ml のバイアルに入れゴム栓とアルミ栓で密封してからアルゴンガスを吹き込み中を嫌氣的にした。 ^{14}C でラベルされた重炭酸ナトリウム溶液をマイクロシリンジで加え、70°C で 1 時間反応させた。その後、500 μl の 30%トリクロロ酢酸溶液を加えることで反応を止めた。半分量 (500 μl) を液体シンチレーションカウンター計測用のバイアルに移し、蓋を外した状態でドラフトの中で 70°C 2 時間処理することで、未反応の炭酸を飛ばした。その後、4 ml の液体シンチレーション用の有機溶媒を加え、蓋を締めて 2-3 度振った。バイアル中の ^{14}C を液体シンチレーションカウンター(Packard Tricarb 3255)でカウントすることで反応液中に固定された炭酸量を測定した。

H. thermophilus TK-6 株由来 succinyl-CoA synthetase の調製

当研究室の青島美穂博士によって TK-6 株の細胞から精製された succinyl-CoA synthetase を分与して頂いた。

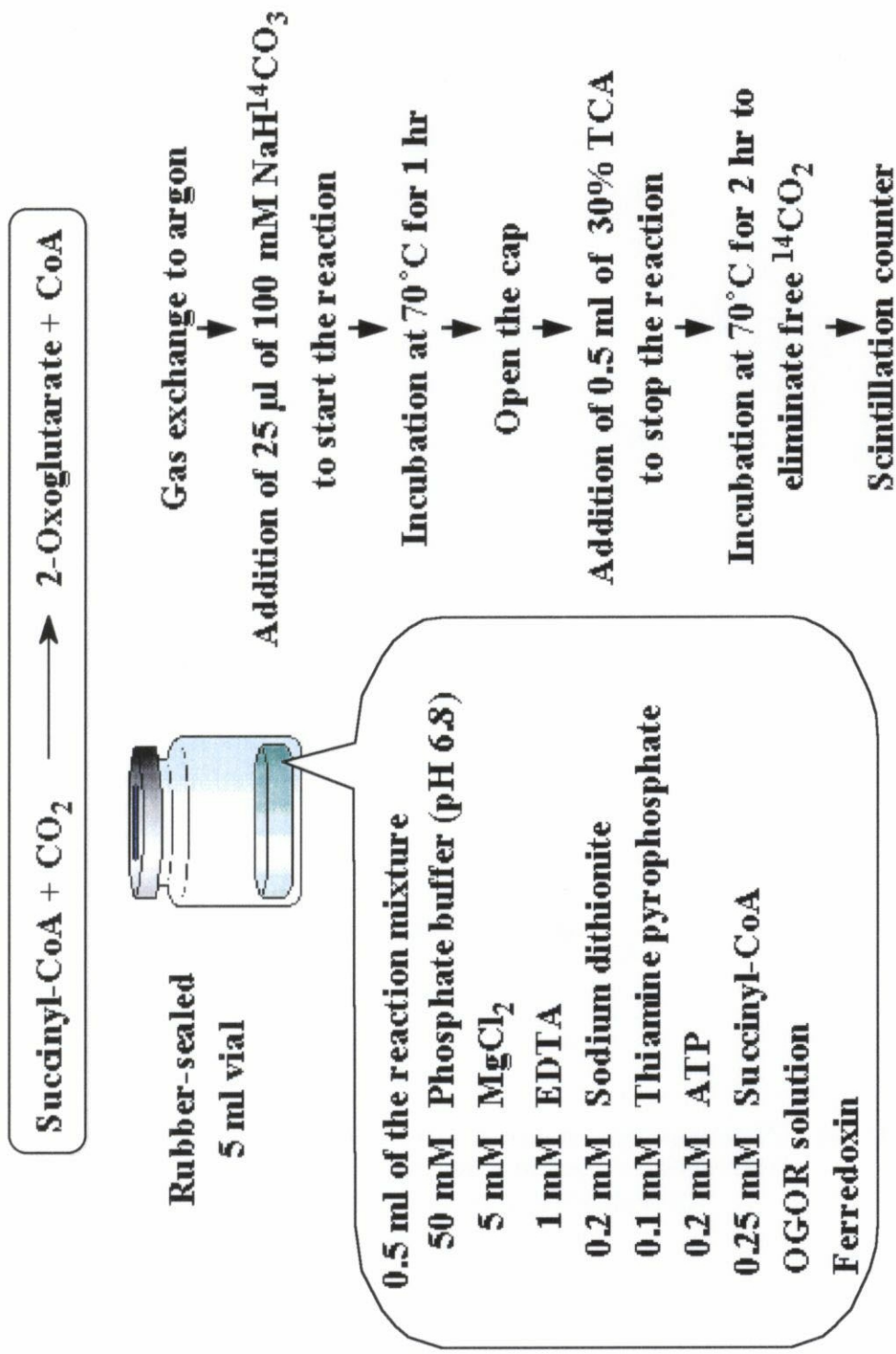


Fig. 2-1. CO₂ fixation assay by measurement of incorporation of ¹⁴C.

POR および GDH とのカップリングによる OGOR 活性測定の方法

上記の ^{14}C を用いた炭酸固定反応測定系以外に、Fig. 2-2 に示したような pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (POR) と glutamate dehydrogenase (GDH) とカップルさせた OGOR 炭酸固定反応活性測定系を組み立てた。OGOR 以外に必要な蛋白質として、Fd、POR、GDH を以下のようにして調製した。

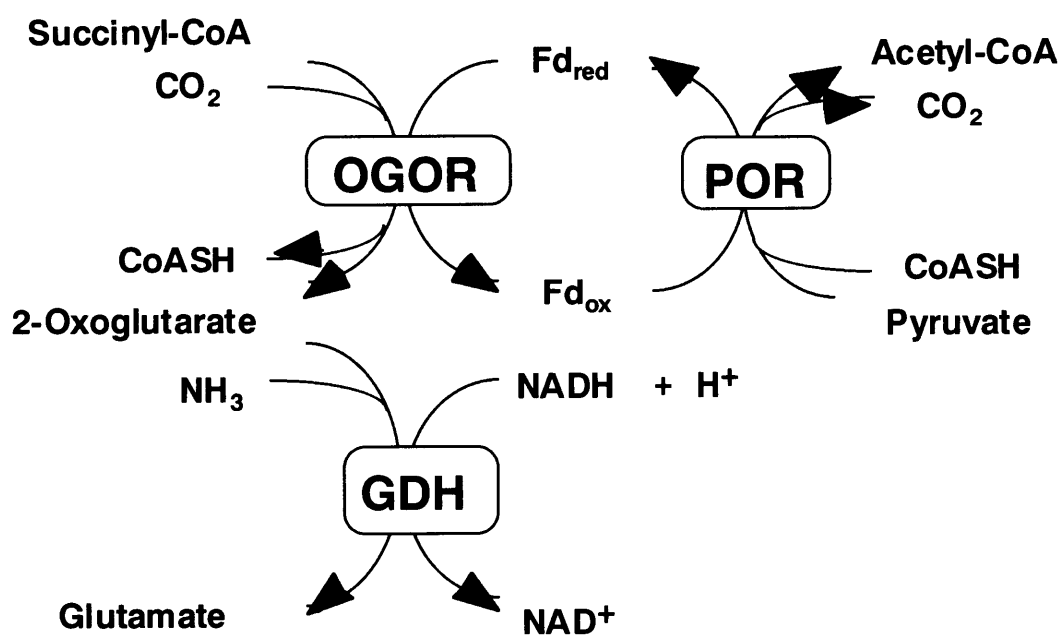


Fig. 2-2. OGOR enzyme assay coupling with POR and GDH.
OGOR, 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase;
POR, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase;
GDH, glutamate dehydrogenase.

Fd の調製

TK-6 株由来の天然の ferredoxin (Fd1)を TK-6 株の細胞から過去に当研究室によって報告された方法に従って精製した[41]。

TK-6 株由来の 2 種類の Fd (Fd1, Fd2)をコードする遺伝子が当研究室の池田氏によってクローニングされ、これらの Fd を大腸菌で発現させるためのプラスミドが構築された[38]。そこでこれらの Fd を組換え大腸菌で発現させ、CFE を調製し、精製した。精製は熱処理(Fd1: 80°C, 10 min; Fd2: 60°C, 10 min)、陰イオン交換カラムクロマトグラフィ(Q-Sepharose Fast Flow)、ゲルろ過カラムクロマトグラフィ(Superdex 75 HR 10/ 30)の過程を経て行った。Fd の追跡は 390 nm / 280 nm の吸収スペクトル比の高さを指標に行った。Fd の蛋白質定量は Bradford 法では誤差が大きかったので BCA 法(BCA Protein Assay Kit; PIERCE)を用いて行った。

POR の調製

TK-6 株由来 POR の大腸菌組換え体を用いた。空気下で精製を試みたところ、POR は速やかに失活した。そこで精製 POR の調製は当研究室の池田氏によって茨木大学の研究室の完全嫌気的な蛋白質精製設備を使って為された[38]。これを以下の実験に用いた。

OGOR、POR による Fd の還元活性測定

OGOR による Fd の還元反応の活性値は基質である 2-オキソグルタル酸に依存的な Fd の還元を分光光学的に追跡することで測定した。測定は 70°Cで行った。石英セル (1 ml 容量、1 cm 幅) は中を嫌気条件にできるようにゴム内栓とプラスチック外栓で密封できるものを使用した。標準的な反応混合液の組成は {OGOR enzyme, 10 mM sodium 2-oxoglutarate, 0.25 mM coenzyme A, 1mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol and 5 mM methyl viologen in 100 mM HEPES (pH 7.0); 1.5 ml}であった。セル内に注射針でアルゴンガスを 5 分間吹き込むことで嫌気条件にし、70°Cで 5 分間保温した後、基質である 2-オキソグルタル酸をシリンジで添加して反応を開始させた。Fd の還元は可視光の吸収によって追跡した。

GDH の調製

Sulfolobus tokodaii のゲノム DNA から GDH をコードすると予想される遺伝子を PCR で得るために、2 種類のプライマーを合成した (S.tok.GDH-N, 5'-GGAATTCCATATGAATTCAGCCGTC-3' and S.tok.GDH-C, 5'-CCGCTCGAGTAACATACCTCTAGCT-3')。増幅された PCR 産物をプライマー上の *NdeI* サイトと *XhoI* サイトで切断し、pET21C (Novagen) に挿入した。結果、構築されたプラスミド pET-GDH によって、C 末にヒスチジントグが付加された組換え蛋白質の発現が期待された。この蛋白質を大腸菌で発現させ、この CFE に 80°C, 15 min の熱処理を加えた後、Ni-アフィニティーカラム (HiTrap Chelating HP column, Pharmacia) を用いて精製した。

GDH による glutamate 生成反応

GDH 活性はアンモニアの還元に伴う NADH の酸化を 340 nm の光の吸収の変化を分光光学的に計測することで決定した。反応液の組成は 100 mM HEPES pH 7.0, 10 mM 2-oxoglutarate, 200 mM ammonia and 0.2 mM NADH を標準とした。反応は ammonia の添加で開始した。

カップリングによる OGOR 活性測定

標準的なアッセイ混合液の組成は以下の通りである。

10 mM MOPS (pH 6.8), 1 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 20 mM NaHCO₃, 5 mM NH₄Cl, 0.25 mM CoA, 0.26 mM NADH, 40 mM pyruvate, 0.5 mM succinyl-CoA and proteins (OGOR, POR, ferredoxin, and GDH)。

これを石英セル (1 ml 容量、1 cm 幅) に入れ、ゴム内栓とプラスチック外栓で密封し、セル内に注射針でアルゴンガスを 5 分間吹き込むことで嫌気条件にした。70°C で 30 分間保温した後、基質である succinyl-CoA をマイクロシリンジで添加して反応を開始させた。340 nm の光の吸収の変化を分光光学的に計測した (U-3200: Hitachi and DU7400: Beckman)。

結果

[¹⁴C]を用いた炭酸固定反応活性測定

過去の実験では、分解しやすい succinyl-CoA の代わりに succinate と CoA を基質とし、succinyl-CoA synthetase の代用として TK-6 株の CFE を測定系内に添加している。そこで今回は CFE を使わずに、TK-6 株から精製された succinyl-CoA synthetase を用いて実験を行った。その結果、For においても Kor においても [¹⁴C]の取り込みは観察されなかった(Table 2-3)。次に、succinyl-CoA を基質とした条件で測定を行った。TK-6 株の CFE の添加の影響も観察した(Table 2-4)。その結果、精製した OGOR では [¹⁴C]の取り込みがおこらなかった。しかし TK-6 株の CFE を添加した場合、 [¹⁴C]の取り込みが観察された。これらのことから言えることは、反応は succinyl-CoA からの開始で良く succinyl-CoA synthetase は不要であることと、炭酸固定反応を推進させるには CFE 中の別の因子が必要であるということである。

Table 2-3. succinyl-CoA synthetase を伴う OGOR 炭酸固定反応

Enzymes	C-DPM
No enzyme	36.9
CFE (TK-6)	552.0
For + succinyl-CoA synthetase	24.0
Kor + succinyl-CoA synthetase	21.8

Table 2-4. succinyl-CoA を基質とした OGOR 炭酸固定反応

Enzymes	C-DPM
No enzyme	36.4
CFE (TK-6)	305.5
For	58.5
Kor	39.2
For + CFE (TK-6)	13675.2
Kor + CFE (TK-6)	12670.7

OGOR の POR と glutamate dehydrogenase とのカップリング反応

上記の実験方法とは別に OGOR による炭酸固定反応を観測する方法として POR と glutamate dehydrogenase (GDH) とのカップリング反応を計画した。Fig.2-2 にその概略図を示した。電子伝達体である Fd は、OGOR による炭酸固定反応と POR による脱炭酸反応の間で酸化還元がくり返される。炭酸固定反応の生成物である 2-oxoglutarate は GDH によって即座にアミノ化され glutamate に変換される。この方法は上記の $[^{14}\text{C}]$ を用いた炭酸固定反応測定系にない二つの利点を持つ。ひとつは、NADH の酸化を分光光学的に追跡することで経時的に反応を観測できる点である。もうひとつは還元型 Fd の供給を POR に担わせることで、dithionite のような強力な還元剤に頼らなくても良い点である。これは $[^{14}\text{C}]$ 取り込み実験には応用できない。 $[^{14}\text{C}]$ ラベルされた炭酸の存在下で OR 酵素とその基質である 2-オキソ酸が存在すると、2-オキソ酸のカルボキシル基が ^{14}C ラベルされた炭酸と交換されてしまうので（これを「 CO_2 交換反応」と呼ぶ）、炭酸固定とは無関係に $[^{14}\text{C}]$ の取り込みがおきてしまうからである。

以下に POR・GDH カップリング反応に必要な蛋白質の調製の結果について述べた。

組換え Fd の調製

当初、天然の ferredoxin (Fd1) を TK-6 株の細胞から精製していたが、TK-6 株由来の 2 種類の Fd (Fd1, Fd2) を大腸菌で発現させるためのプラスミドが当研究室の池田氏によって構築されたので、これら 2 種の Fd の組換え体は大腸菌から精製した(Fig. 2-3)。

POR の調製

TK-6 株由来 POR の大腸菌組換え体を用いた。空気下で精製を試みたところ、POR は速やかに失活した。そこで POR の嫌気的な精製が当研究室の池田氏によって茨木大学の研究室の設備を使って成された(Fig. 2-3B)[38]。これを以下の実験に用いた。

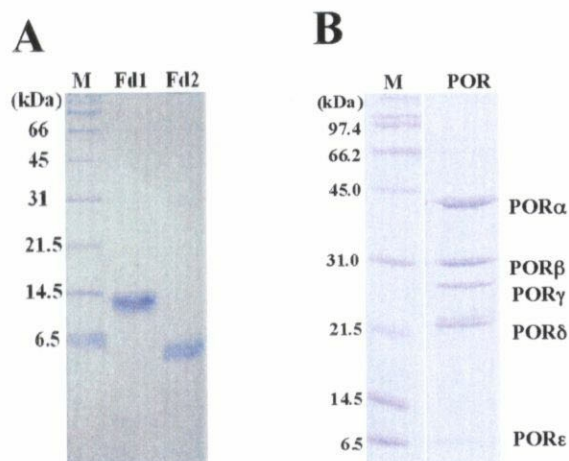


Fig. 2-3. SDS-PAGE (18%). Purified recombinant Fd1 and Fd2 (A), and POR (B).

OGOR の Fd に対する K_m 値の測定

OGOR による炭酸固定反応は還元型 Fd から電子を受け取ることで起こるので Fd はこの反応の基質とみなせる。従って、この反応速度を最大にするためには Fd の濃度を十分にすることがある。その目安として OGOR の Fd に対する K_m 値を算出することを試みた。 K_m 値は逆反応である脱炭酸反応における酸化型 Fd に対して算出することにした。活性は Fd の還元に伴う A_{425} の変化を吸光度計で追跡した(Fig. 2-4)。これにより、 A_{425} における Fd のモル吸光係数を Table 2-5 のように決定し、酵素活性は U/mg protein で表し、1U は 1 分間あたり 1 μmol の Fd の還元と定義した。OGOR による Fd 還元反応の動力学的解析が行われた(Fig. 2-5, Table 2-6)。

Table 2-5. TK-6 株由来 Fd の A_{425} におけるモル吸光係数

	Fd1	Fd2
ϵ_{425} (Oxidized Fd)	12.1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	15.6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
ϵ_{425} (Reduced Fd)	6.6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	7.2 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
$\Delta\epsilon_{425}$ (Ox. - Red. Fd)	5.5 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	8.4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

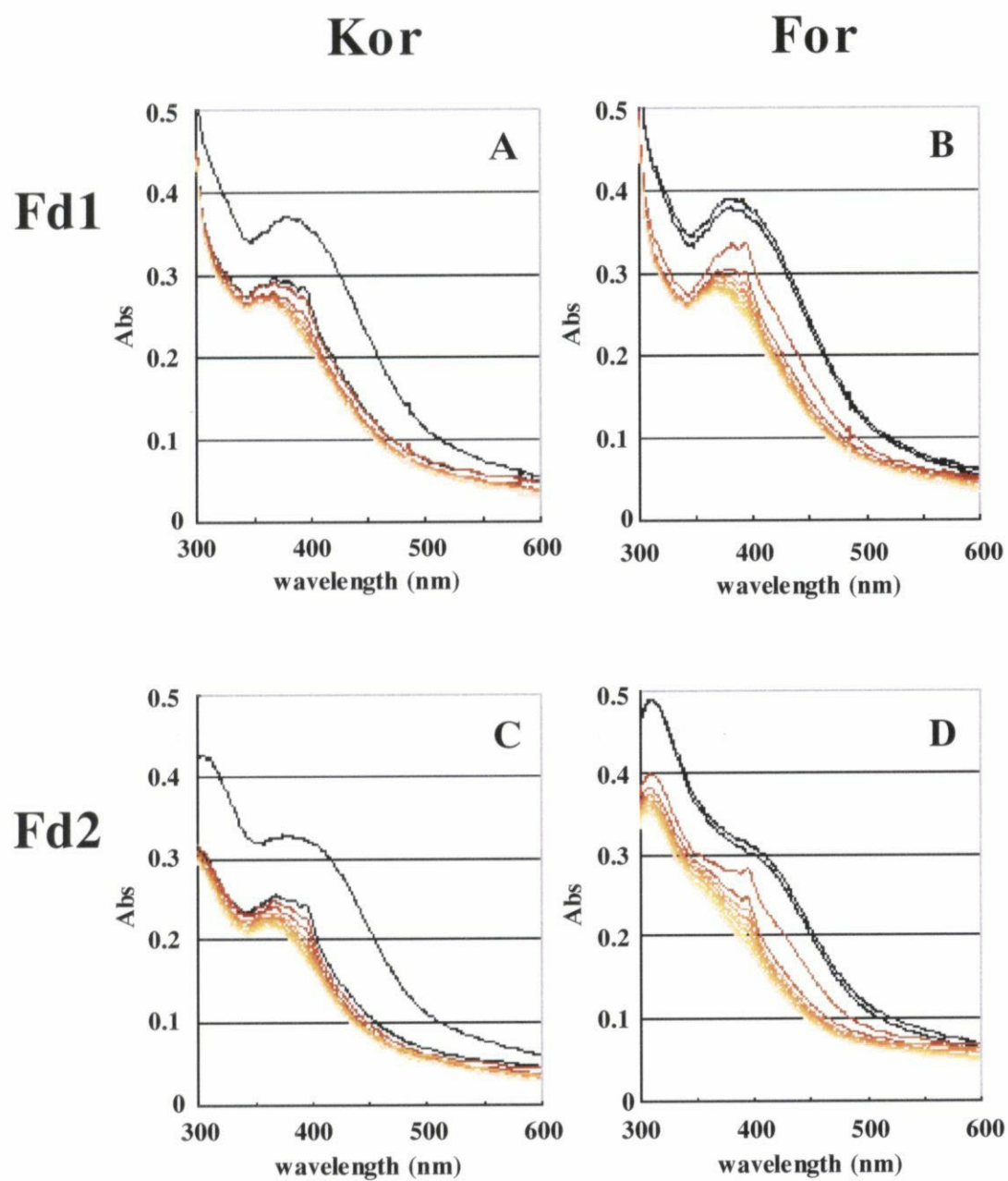


Fig. 2-4. Reduction of ferredoxin. 2-Oxoglutarate and CoA dependent spectral change of Fd1(A and B) and Fd2 (C and D) catalyzed by Kor (A and C) and For (B and D).

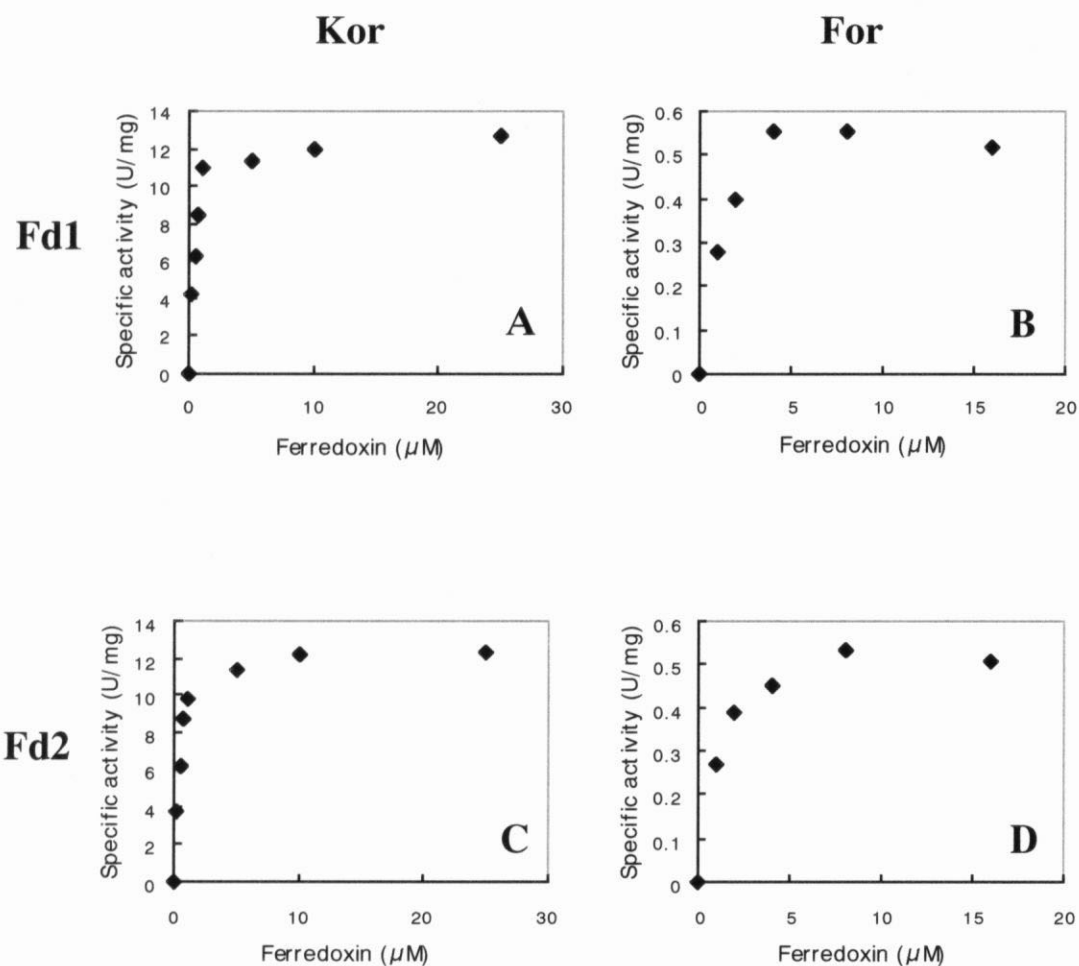


Fig. 2-5. S-v plot of KOR (A and C) and For (B and D) for Fd1 (A and B) and Fd2 (C and D).

Table 2-6. OGOR による Fd 還元活性の動力的パラメーター

	Kor		For	
	V_{\max} (U/mg)	K_m (μ M)	V_{\max} (U/mg)	K_m (μ M)
Fd1	13.8	0.55	0.93	2.5
Fd2	14.2	0.67	0.90	2.4

いずれの条件でも Fd の濃度が 10 μ M のときに、ほぼ飽和していると言える。Fd の酸化型の Fd1 と Fd2 の 340 nm のモル吸光係数は 15.3 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ と 18.3 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であった。10 μ M Fd による 340 nm の吸収はそれぞれ、0.15 Abs と 0.18 Abs になり、NADH の計測を妨害しないための許容範囲であると考えられた。

POR による Fd の還元速度

OGOR による炭酸固定反応において、反応系内で Fd が常に還元型になっていることが肝要である。そのためには還元型 Fd を供給する反応（POR による pyruvate の脱炭酸反応）の速度が還元型 Fd を消費する反応の速度を上回る必要がある。そこで Fd 濃度 10 μM の時の POR による Fd の還元速度を求めた (Table 2-6)。

Table 2-7. POR による Fd の還元速度

Fd1	0.52 U/mg
Fd2	0.43 U/mg

Concentrations of Fd were 10 μM .

POR の 340 nm の吸収は約 0.15 Abs / 1.0 mg protein と、あまり高くなく、このことは高濃度の POR の添加が可能なことを意味した。しかしながら POR は酸素感受性が高く、また試料はグリセロール溶液に溶かして保管されることもあって、高度な濃縮は返って POR の失活を招いてしまい、この濃縮限界のほうに添加量の律速となった。POR の添加量は 0.02 U (約 50 μg) 以上を目安とした。NADH の 340 nm のモル吸光係数は $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であるから、

$$0.02 \text{ U} = 0.125 \text{ dAbs/min}$$

と計算できる。OGOR の活性はこの範囲内で行った。

GDH の精製と酵素学的特徴付け

Sulfolobus tokodaii のゲノム DNA から GDH をコードすると予想される遺伝子を PCR で得、大腸菌内で C 末にヒスチジンタグが付加した組換え蛋白質として発現し精製した (Fig. 2-6)。この蛋白質は 70°C で GDH 活性を示した。GDH の至適 pH は pH 7.0 前後であり、OGOR 活性測定条件と一致した (Fig. 2-7A)。至適温度は約 60°C であった (Fig. 2-7B)。OGOR 活性測定条件である 70°C では至適温度の約半分の活性しか得られなかった。とは言え、70°C での最大活性速度は $V_{\max}=26.3 \text{ U/mg}$ であり、2-oxoglutarate に対する K_m は 0.16 mM であり既知の GDH の報告と比べても遜色のない値であり、カップリング反応に十分使用できると考えられた (Fig. 2-8) [42]。

OGOR とのカップリング反応では GDH は過剰量の 0.1 U (3.8 μg) 添加した。

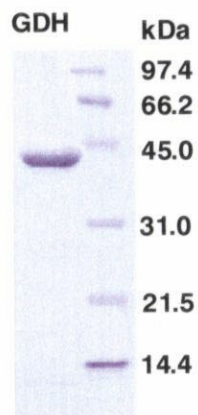


Fig. 2-6. SDS-PAGE (15%). Purified recombinant GDH .

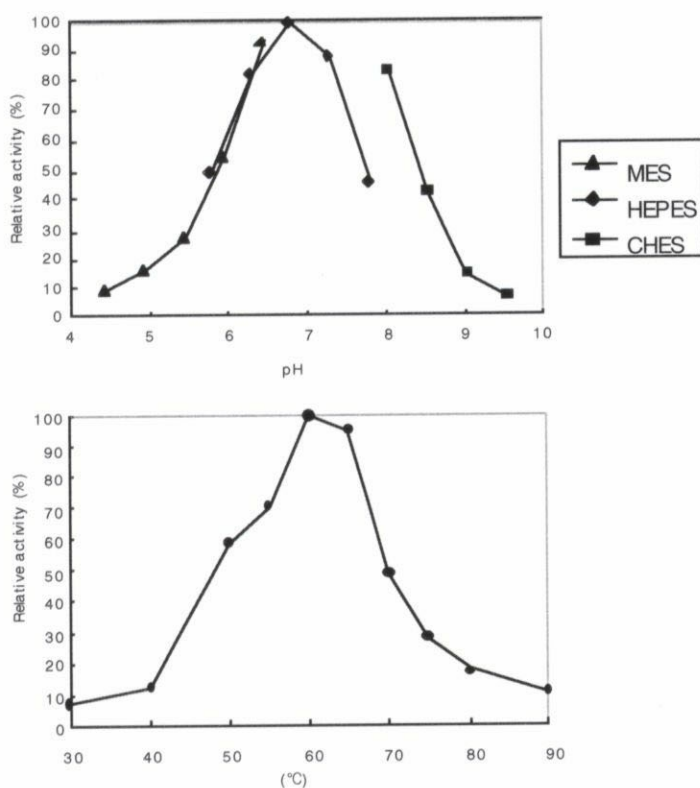


Fig. 2-7. (A) Effect of pH on the amination activity of 2-oxoglutarate catalyzed by recombinant GDH. The buffers used were as follows: 100 mM MES (pH 4.5 to 6.5; triangle), 100 mM HEPES (pH 5.8 to 7.8; diamond), and 100mM CHES (pH 8.1 to 9.1; square). The reaction was measured at 70°C. (B) Effect of temperature on the amination activity of 2-oxoglutarate catalyzed by recombinant GDH.

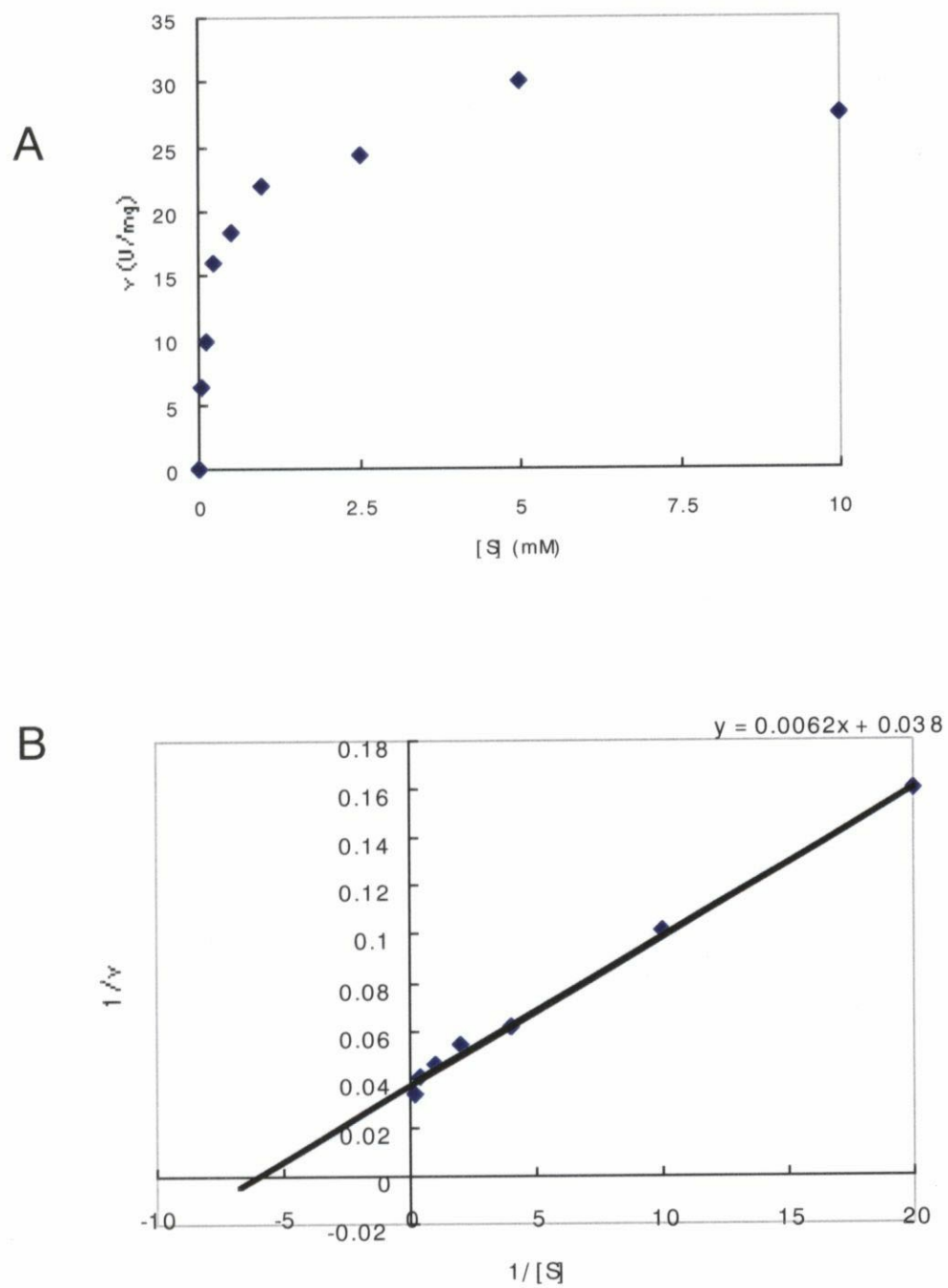


Fig. 2-8. Kinetics of recombinant GDH for 2-oxoglutarate.
A: S-v plot. B: Lineweaver-Burk plot.

OGOR による炭酸固定反応活性測定

以上の予備実験を経てカップリング反応を用いた OGOR 活性測定の系を組み上げた。

標準的なアッセイ混合液の組成は Table 2-8.の通りである。

Table 2-8. OGOR 活性測定反応液組成

10 mM	HEPES (pH 7.5)
1 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT
0.4 mM	TPP
100 mM	NH ₄ Cl
10 mM	NaHCO ₃
10 mM	Pyruvate
0.5 mM	CoA
0.2 mM	NADH
< 0.02 U	OGOR
> 0.02 U	POR
10 μM	Fd1
0.1 U	GDH
1 mM	Succinyl-CoA
500 μl	

340 nm の紫外吸収の変化を分光光学的に計測したところ、Fig. 2-10 のように吸収の減少が見られ、OGOR による炭酸固定反応活性を観察することができた。この活性は系内の全ての蛋白質に依存的であり、かつ OGOR の基質である succinyl-CoA と、POR の基質である pyruvate にも依存的であった。しかし、HCO₃⁻と CoA には依存しなかった。この二者は系内の反応で供給されるためであると考えられた。

OGOR の Succinyl-CoA に対する K_m 値の測定

OGOR の Succinyl-CoA に対する K_m 値を算出した。実験材料の都合上、Fd には Fd1 のみを用いた。その結果を Fig. 2-11 と Table 2-9 に示した。この反応系では CO₂ は常に POR 反応によって供給され CO₂ を加えなくても反応が進むので、CO₂ に対する K_m 値は測定できなかった。

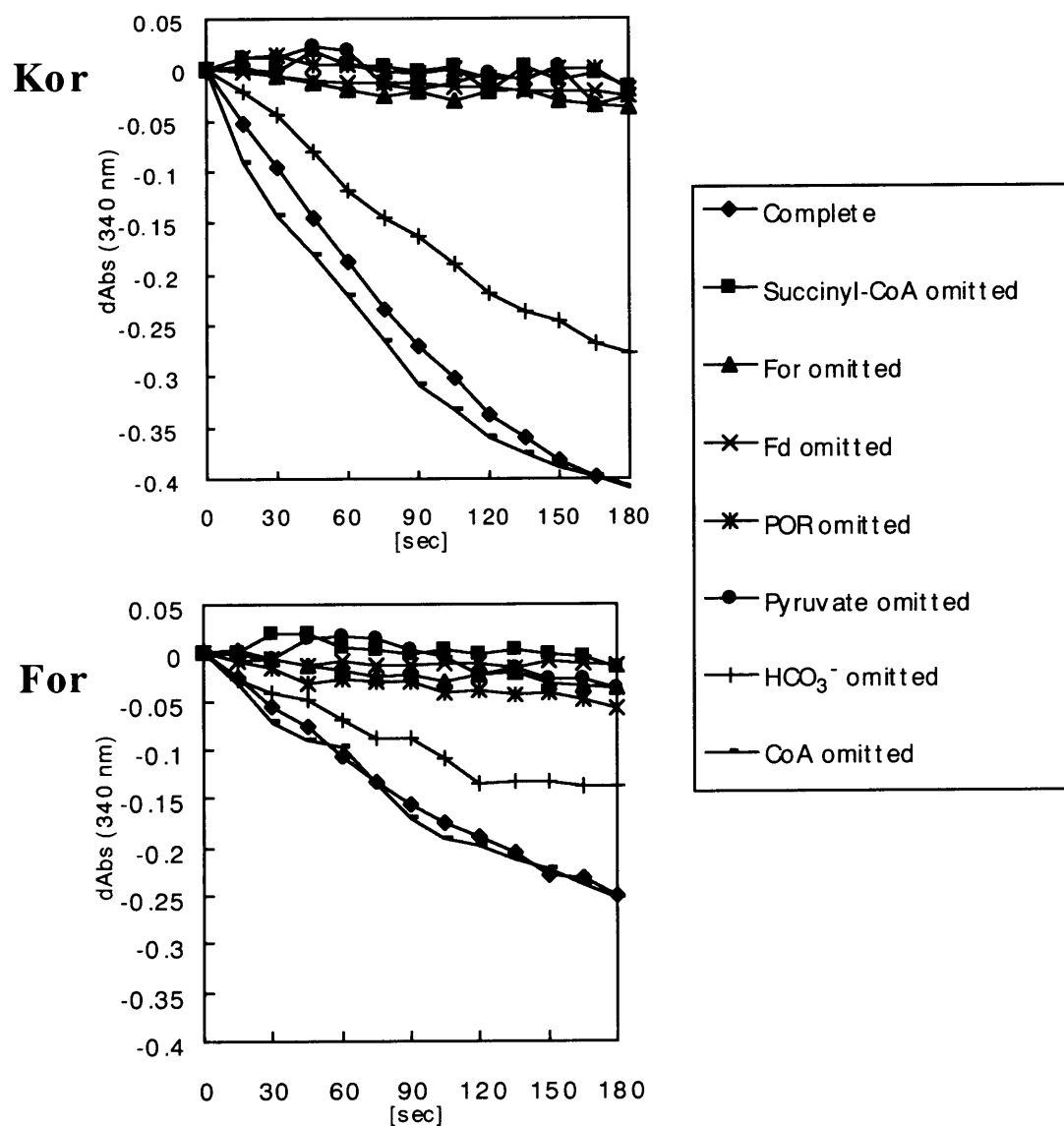


Fig. 2-10. Carboxylation by Kor and For. Upper: Kor, lower; For.

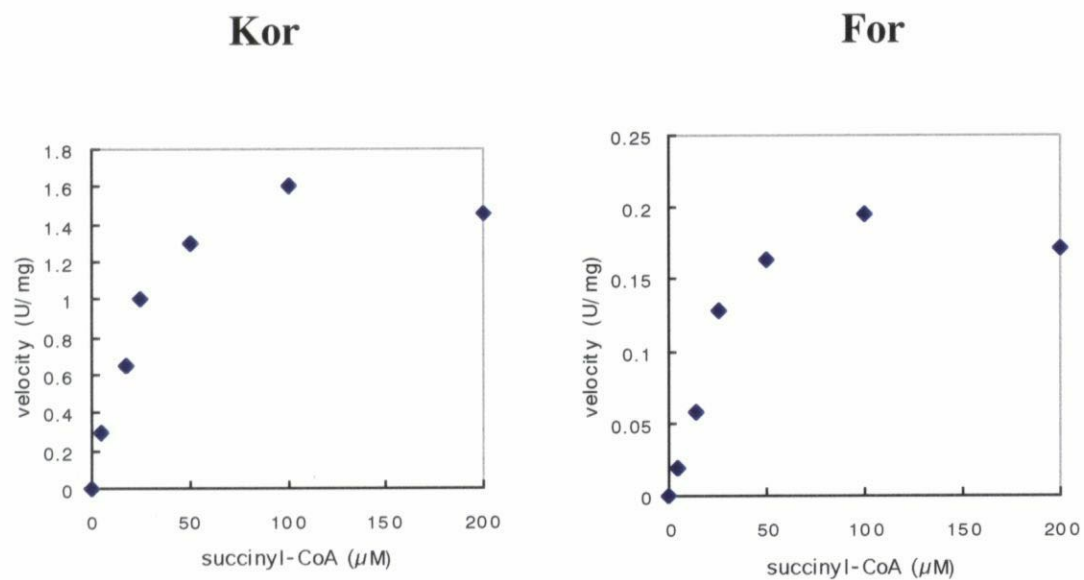


Fig. 2-11. S-v plot of OGOR for succinyl-CoA.

Table 2-9. OGOR による炭酸固定反応の動力学的パラメーター

	Kor	For
V_{\max} (U/mg)	1.98	0.57
K_m (μ M)	28.2	134

考察

これまで当研究室では炭酸固定反応を証明するひとつの方法として、 $[^{14}\text{C}]$ でラベルされた炭酸の有機化合物への取り込みの実験を行い、多大な成果を挙げてきた[42, 43]。しかしながら、この手法をそのまま引き継いで、*H. thermophilus* TK-6 株由来の蛋白質と大腸菌の組換え蛋白質を用いて行った実験は、大変な問題を生じさせた。大腸菌の CFE と TK-6 株由来の CFE との混合液は $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ にラベルされた $[^{14}\text{C}]$ をその他の基質に依存することなく系内に取り込んでしまうのである(data not shown)。これによって様々な意味不明のデータが蓄積されてしまった。この現象が引き起こされる原因は不明であるが、ひとつ明らかなことは、大腸菌組換え蛋白質と TK-6 株由来の天然蛋白質を同時に用いる時は少なくとも片方は精製されていなければいけないということであった。

過去に行われた TK-6 株由来の OGOR による炭酸固定活性測定は不完全なものであった。反応には TK-6 株の CFE が要求された。この CFE の役割は succinyl-CoA synthetase 活性であり、分解しやすい succinyl-CoA を succinate と CoA から供給してくれるものと予想されていた。しかしながら今回の実験で、精製された succinyl-CoA synthetase の添加が意味を成さないことが示され、CFE の役割は別にあると推察された。

上記の実験で精製蛋白質のみでは炭酸固定反応が起きない原因のひとつとして電子伝達がうまく起こらないことが考えられた。すなわち、系内が dithionite のような強還元剤により還元的になりすぎて、Fd が還元型から酸化型へ移行できないか、あるいは、逆に還元力が足りず還元型 Fd が枯渇してしまっている可能性が考えられた。CFE の添加はそうした停滞してしまった電子の流れをバイパスする効果があるのではないだろうか。

酵素の実験は *in vitro* といえども、より生体内に近い環境で解析することが望ましい。還元型 Fd の供給も生体内に近いモデルを構築したいところであるが、存在が予想されている NADH: Fd reductase はいまだ取得されていない。そこで、その代用として pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (POR) の利用を考えた。TK-6 株の POR が同株由来の Fd を *in vitro* で還元することは既に証明されていた[44]。Fig. 2-2 に表したように二つの OR がそれぞれ脱炭酸と炭酸固定の反応を触媒し、Fd の酸化還元を回転させることにした。しかし、このコンビネーションでは $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ を利用した $[^{14}\text{C}]$ の取り込みの実験の方法は使用できない。OR はその基質である 2-オキソ酸のカルボキシル基と遊離の炭酸を交換するので、炭酸固定とは無関係に $[^{14}\text{C}]$ の取り込みがおきてしまうからである。

代わりに GDH による NADH の酸化を伴う 2-oxoglutarate のアミノ化反応とカップリングさせることで、分光光学的に追跡することを試みた。

このカップリング反応に必要な蛋白質群は、OGOR (For と Kor)、POR、Fd (Fd1 と Fd2)、GDH である。これらはことごとく組換え大腸菌から精製された。Kor、POR、Fd1 は TK-6 株細胞から精製されており、必ずしも組換え蛋白質は必要ではないが、熱処理による除蛋白質の効果等もあり活性の高い酵素を簡便かつ多量に調製できるのでおおいに利用した。Fd は TK-6 株由来の Fd1 と Fd2 の 2 種類調製した。Fd1 の遺伝子をクローニングした際、その遺伝子のすぐ下流に並んで順向きに Fd2 の遺伝子が存在していたので、あわせてこれも調製したかたちとなった。使われたほとんどの蛋白質は TK-6 株の遺伝子由来であるが、GDH だけは *S. tokodaii* のゲノム上の GDH をコードすると思しき遺伝子から得た。発現蛋白は GDH 活性を示し、OGOR とのカップリング反応の環境条件はこの GDH にとって至適ではなかったものの十分に高い活性を示した。

このカップリング反応で律速反応になるのは POR による Fd 還元であることは容易に予想できた。POR は生体内では OGOR と同様、炭酸固定反応を触媒するので Fd 還元は逆反応である。また、この POR はもともとあまり活性が高いとは言えない上に失活しやすい。まず、OGOR の炭酸固定反応に十分量の Fd 濃度を割り出し、その Fd を還元する POR の速度を知る必要があった。Kor の Fd1 と Fd2 に対する K_m 値は $0.55\ \mu\text{M}$ と $0.67\ \mu\text{M}$ と低い値を示した。For の Fd1 と Fd2 に対する K_m 値は $2.5\ \mu\text{M}$ と $2.4\ \mu\text{M}$ だった。Kor は Fd の濃度を上げて活性阻害は見られなかった。これは *Chlorobium tepidum* の PFOR (POR と同義) と Fd の関係と似ている[45]。一方、For は Fd 濃度 $10\ \mu\text{M}$ 前後で活性阻害が観察された。このパターンは *Clostridium pasteurianum* と似ている[46]。Fd1 と Fd2 の間に差はあまり見出せなかった。この動力学測定の結果と Fd の $340\ \text{nm}$ の吸光係数(Fd1, $15.3\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Fd2, $18.3\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)からカップリング反応での Fd 濃度は $10\ \mu\text{M}$ が妥当と考えた。

$10\ \mu\text{M}$ Fd に対する POR の還元速度が約 $0.5\ \text{U}/\text{mg}$ と測定された。低い値とは言えないが、カップリング反応に十分耐え得る速度を与えようとするならば、濃縮して多めに加えたいところである。しかし POR は濃縮操作でも失活する恐れがあったので、濃縮は行わず精製試料($0.4\text{--}0.5\ \text{mg}/\text{ml}$)をそのまま用いた。但し、これは危ない橋を渡らなかなただけで、やってみれば簡単に成功するかも知れない。POR の添加の下限を $0.02\ \text{U}$ とし、OGOR 活性はこの速度の範囲内で行った。

カップリング反応の結果、 $340\ \text{nm}$ の紫外吸収の減少が観察された。この減少は HCO_3^- と CoA 以外の反応系内の全ての蛋白質と基質に対して依存的であった。 HCO_3^-

と CoA は反応液内で生産されるので、外部からの添加は不要なのであろう。理論的に必要と考えられる「役者」全てに依存したので、確かに OGOR によって炭酸固定反応がおこっているものと考えられた。

この測定系では炭酸に対する K_m 値は出せないで、succinyl-CoA に対する K_m 値だけを算出した。また、これまで実験結果から Fd1 と Fd2 に大きな差は無いとみなし、この実験では Fd1 のみを用いた。succinyl-CoA に対する K_m 値は Kor において 28.2 μM 、For において 134 μM であった。succinyl-CoA の濃度を上げると活性阻害が見られた。これは逆反応における CoA に対する挙動と一致している。比活性を逆反応の値と比較すると酸化反応の方が高かった。まだアッセイ系の磨き上げが足りないと言える。今回構築された酵素活性測定系は同じ OR ファミリーに属する POR をパートナーに用いている。この立場を反対にすれば POR の炭酸固定活性を測定することも可能であり (NADH の酸化は lactate dehydrogenase が担当する)。それぞれの研究において役に立つ。しかしながら、CO₂ を系内に放出してしまうので酵素の CO₂ に対する依存性を調べることができないという欠点を持つ。さらに POR は失活しやすい扱いにくい酵素で、しかも系全体の反応の律速となっている。カップリングの相手としては不適合と判断せざるを得ない。出来ることならば、TK-6 株の生体内で実際に Fd を還元している酵素を取得して *in vitro* で再現することが望ましい。それは、TK-6 株のエネルギー代謝の解明に直結する。今後の進展に興味を持たれる。

第三章 OGOR の発現解析と遺伝子破壊

序

H. thermophilus TK-6 株は 2 種類の OGOR、For と Kor を持つことが報告されている。第一章と第二章では、この二つの OGOR について精製酵素を用い、*in vitro* の特徴付けを行った。

本章では、*H. thermophilus* TK-6 株におけるこれら 2 種類の OGOR の発現解析を行うことで、これらの酵素の生理的役割をより明確にすることを試みた。また、本菌株における遺伝子破壊法を構築して、2 種類の OGOR についてそれぞれの破壊株を取得しその表現型を観察することで、その生理的意義について更に深い考察を加えることも試みた。