

材料と方法

TK-6 株の培養

TK-6 株は、最終電子受容体に酸素あるいは硝酸を用いて培養し回収したものを
用いた。酸素呼吸条件での培養は以下の通りである。500 ml 坂口フラスコに入れた 50 ml
無機培地に TK-6 細胞懸濁液を接種し、 H_2 : O_2 : CO_2 (750: 100: 150 ml/min)のガスでフラス
コ内の気相を 5-10 分間置換し、70°Cで振盪培養したものを前培養液とした。この前培
養液を 5 L フラスコ内の 1.5 L の無機培地に加え、 H_2 : O_2 : CO_2 (750: 100: 150 ml/min)の
ガスを 20-30 分間吹き込んだ後、70°Cで 48-72 時間振盪培養した。培養液の回収とガス
置換は 6 時間毎あるいは 12 時間毎に行った。硝酸呼吸条件での培養は上記とほぼ同条
件で行われたが、以下の点において異なる。無機培地中には 100 mM NaNO_3 が加えられ
た。ガス置換の条件は H_2 : CO_2 (750: 250 ml/min)にした。生育が遅いため、培養液の回収
及びガス置換の間隔を 12 時間とし、全体で 48-72 時間振盪培養した。

抗血清の調製

精製された For と Kor について、それぞれ約 1.0 mg protein / 1 ml リン酸バッ
ファー(pH 8.0)となるように調製した。この溶液をそれぞれの抗血清の抗原とした。抗血
清の作製は Takara に依頼し、それぞれウサギー羽を用いて、ポリルローナル抗体を作
成した。ForF、ORF3、ORF4 抗血清についても同様であり、詳細は第四章に記述した。

ウェスタンブロット解析

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 1mm 厚のろ紙 (Absorbent Paper;
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。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。抗体
追跡としての二次抗体には Goat anti-Rabbit IgG (Bio-Rad)を用い、抗体の可視化にはイム
ノステイニング HRP-1000 (Konica)が使用された。

相同組換え用のプラスミドの構築

プラスミドベクター pGEM-Teasy (Promega) と pUC19 が形質転換用プラスミドベクターの作製のために使用された。形質転換の宿主には大腸菌 JM109 株を使用した。大腸菌は LB 培地を用いて 37°C で培養された。遺伝子マーカーとして使用した耐熱性カナマイシン耐性遺伝子は、譲与されたプラスミドベクター pUC18-promoter +HTK[55] から PCR で増幅したものを使用した。相同組換え用のプラスミドの構築で使用された PCR 用のプライマーは Table 3-1 にまとめた。

Table 3-1. Primers used for construction of the homologous recombination plasmids.		
Primer	Sequence	Restriction enzyme site (italic)
Primer-HTK-F	AAC <i>TGC</i> AGCGTTGACGGCGGATATG	<i>Pst</i> I
Primer-HTK-R	AAC <i>TGC</i> AGCGTAACCAACATGATTA	<i>Pst</i> I
Primer-FGD-F	GGGATCCCAAAGCTTCCACCTGAAA	<i>Bam</i> HI
Primer-FGD-R	GGGGGATCCTCTCCTTATGGTC	<i>Bam</i> HI
Primer-KGD-F	GGGATCCAGGTATGACGGAGCTTCC	<i>Bam</i> HI
Primer-KGD-R	GGGGGATCCGCTTCCCCCAGAAA	<i>Bam</i> HI
Primer-KGD'-F	GCTCTAGATGGACAAAAGGTTTAAG	<i>Xba</i> I
Primer-KGD'-R	GCTCTAGACATAAGTCTGTGCAACA	<i>Xba</i> I

(i) pFGD (*forA* 破壊プラスミド) の構築

破壊の標的とした遺伝子 *forA* 内に見られる制限酵素 *Pst*I のサイトを中心に周辺約 2kb の領域を、Primer-FGD-F と Primer-FGD-R を用いた PCR によって TK-6 株の染色体 DNA から増幅した。得られた DNA 断片の両末端を制限酵素 *Bam*HI で消化後、同酵素で切断・脱リン酸処理した pUC19 に挿入した。クローンの選択はブルー・ホワイトセレクションによって行った。得られたプラスミドを制限酵素 *Pst*I で処理し挿入された相同領域の中間を切断した。これに、pUC18-promoter +HTK から PCR で増幅した耐熱性カナマイシン耐性遺伝子・*htk* を組み込んだ。PCR のプライマーには Primer-HTK-F と Primer-HTK-R を用い、得られた断片を制限酵素 *Pst*I で処理した。クローンの選択はカナマイシン耐性能によって行った。結果得られたプラスミドを pFGD と名付けた。

(ii) pKGD (*korB* 破壊プラスミド) の構築

pFGD の構築と同様の方法で *korB* 遺伝子破壊用プラスミドベクター pKGD を構築した。相同 DNA は Primer-KGD-F と Primer-KGD-R を用いた PCR によって TK-6 株の染色体 DNA から増幅した。得られた DNA は *orf3* 遺伝子上流部分を含んでいるので、この部分にミスが入っていないことを DNA シークエンスによって確認した。相同 DNA

の中央部に位置する *Pst*I サイトに耐熱性カナマイシン耐性遺伝子 *hik* を挿入した。結果得られたプラスミドを pKGD と名付けた。

(iii) pKGD-2 (*korB* 破壊プラスミド) の構築

pKGD に含まれる TK-6 株ゲノムと相同な DNA の長さは *hik* 遺伝子を挟んで上流 1 kbp、下流 1 kbp である。相同 DNA の長さがこの半分に相当する DNA (*hik* 遺伝子を挟んで上流 0.5 kbp、下流 0.5 kbp) を得るために pKGD をテンプレートにして Primer-KGD'-F と Primer-KGD'-R を用いて PCR を行い、得られた産物を pGEM-T easy に挿入した。結果、pKGD-2 を得た。

塩化カルシウム法による形質転換の手順

TK-6 株を 500 ml の坂口フラスコに入れた 50-100 ml の無機培地で 30-42 時間、 $OD_{540} = 0.5 - 0.8$ になるまで培養した。ガス置換($H_2:O_2:CO_2 = 75:10:15$)を約 12 時間毎に行い、培養の終了は最後のガス置換から 6 時間以内になるようにした。この培養液から遠心分離 (6,500 rpm, 10 min) によって細胞を回収し、元の培養液の 1/50 量の 100 mM 塩化カルシウム溶液で細胞を懸濁し、チューブに分注した。この時の細胞濃度は約 $1 \times 10^{9-10}$ cell / ml であった。30 分間の氷冷の後、形質転換用のプラスミド DNA 溶液を添加した。ネガティブコントロールには等量の TE を添加した。1 時間の氷冷の後、70°C、10 分間のヒートショックをかけた。この際、数分おきにチューブを軽く手で振った。ヒートショック後、数分間氷冷し、500 μ g/ml 濃度のカナマイシンを含む無機培地プレート (Table 3-2)[47]にこの細胞懸濁液を塗布した。このプレートをガス置換($H_2:O_2:CO_2 = 75:10:15$)したデシケーター内で約 1 週間培養した。ガス置換は 1-2 日おきに行った。

Table 3-2. 無機培地プレートの組成

TK-6 株用液体無機培地	
CuSO ₄ •5H ₂ O	10 mg/l
GELRITE (Wako)	1%

コロニーからの液体培養

試験管に 500 μ g/ml 濃度のカナマイシンを含む無機培地を 3-4 ml 入れ、これにコロニーをできるだけ摂取量が多くなるように接種した。ブチル栓で密封した後、シリ

ンジ針を用いて混合ガス($\text{H}_2:\text{O}_2:\text{CO}_2 = 75:10:15$)を数分間吹き込んだ。この時、ガスの風圧ができるだけ液面を直撃するように心掛けた。70°Cで震盪培養を行った。培養は菌の生育によって培養液が白濁するまで行い(3-5日)、ガス置換は毎日行った。

染色体 DNA の調製

染色体 DNA の調製は塩化ベンジル法で行った(Table 3-3)[48]。

Table 3-3. 塩化ベンジル法による染色体 DNA の抽出

1.5 ml の培養液から遠心分離によって菌体を回収

↓

500 μl の DNA extraction buffer (100 mM Tris•HCl pH9.0, 40 mM EDTA)で懸濁

↓

50 μl の 20% SDS、300 μl の Benzyl chloride を添加

↓

チューブを 50°C, 30 min 攪拌後、氷上で冷ます

↓

300 μl の 3M NaOAc pH 5.0 を添加、氷上で 15 min 静置

↓

遠心(4°C, 1,500 rpm, 10 min)の後、上清を回収

↓

Phenol/Chloroform 処理、Isopropanol 沈澱

↓

TE buffer (30 - 100 μl)を加え、4°C、over night 静置

↓

RNase を加え、37°C, 30 min 処理

サザンハイブリダイゼーション

得られたゲノム DNA を制限酵素 *Hind*III で消化した。2-プロパノール沈澱で濃縮後、アガロースゲル電気泳動を行い、メンブレンにブロッティングした。プローブには TK-6 株の染色体 DNA から PCR で増幅した DNA 断片を鋳型にしてランダムプライマーと Klenow fragment を用いた伸長反応により DIG ラベルした DNA 断片を作成した。上記のメンブレンとプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

結果

For 抗血清、Kor 抗血清の結合特異性

第 1 章で精製された For と Kor を抗原にして抗血清を調製した。

For と Kor は共に OR ファミリーに属し、保存されたいくつかのモチーフを持つ。また、TK-6 株は少なくとももう一つの OR、すなわち pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (POR)を持つ。この POR の遺伝子は既に取得されており、そのアミノ酸配列は For と高い相同性を持つことが示されている[49]。そこで、今回調製した For と Kor の抗血清のこれら他の OR に対する結合性を観察した。TK-6 株由来の For、Kor、POR を発現させた大腸菌の CFE を SDS-PAGE に供し、For と Kor の抗血清を用いてウエスタンブロッティング解析を行った(Fig. 3-1)。

Kor 抗血清は For と POR のどのサブユニットとも反応しないことがわかった。Kor を発現させた菌体の CFE では、Kor の二つのサブユニットの位置以外にも複数のバンドが観察された。他のレーンではこれらのバンドが観察されなかったことから、これらのバンドは Kor のサブユニットの分解物を表していると考えられた。

For 抗血清は Kor のサブユニットとは反応しなかったが、POR のサブユニット群とは結合した。特に POR γ と POR δ との結合性が高いように思われた。但し、For と POR のサブユニットの大きさの違いから、両者の発現を見きわめることは可能であると考えられた。Forサブユニットの位置にはかすかにバンドを確認することができた。その隣の POR ϵ の位置にもかすかにバンドが見えた。

- 1: pUC19 (negative control)
 2: pYNA101 (Kor expressin vector)
 3: pYNA203 (For expressin vector)
 4: pET-POR (POR expressin vector)

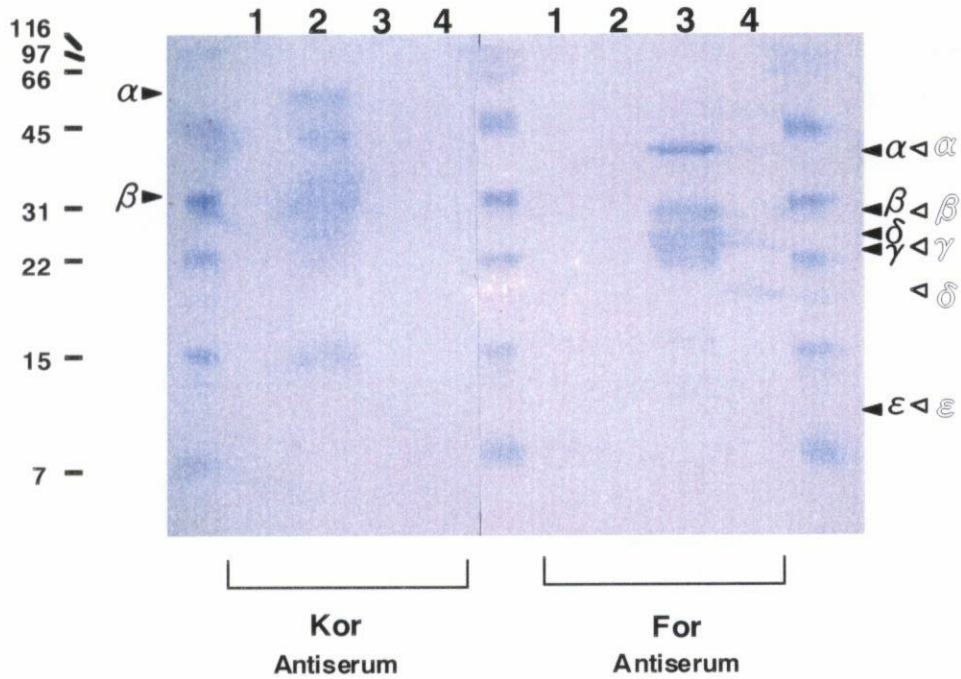


Fig. 3-1. Binding specificity of For and Kor antibody. Closed arrows indicate positions of Kor and For subunits. Open arrows indicate positions of POR subunits. Lanes 1-4: CFE of *E. coli* harboring an expression vector, pUC 19 (negative control), pYNA 101 (*kor* gene cluster), pYNA 203 (*for* gene cluster), and pET-POR (*por* gene cluster), respectively.

TK-6 株における OGOR の発現解析

酸素呼吸条件あるいは硝酸呼吸条件で培養した TK-6 株の培養曲線を示した (Fig. 3-2)。12 時間毎に細胞を回収した。ウエスタンブロット解析により、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 については、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。For 抗体が POR の γ サブユニットと結合することが確かめられている。従って、Fig. 3-2C の右側のパネル (硝酸呼吸条件) に見られるバンドは POR γ サブユニットに由来し、For とは関係ないと考えられる。鉄呼吸条件で培養した細胞を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、硝酸呼吸条件時と同様に、Kor の発現は認められたが、For の発現は認められなかった (data not shown)。

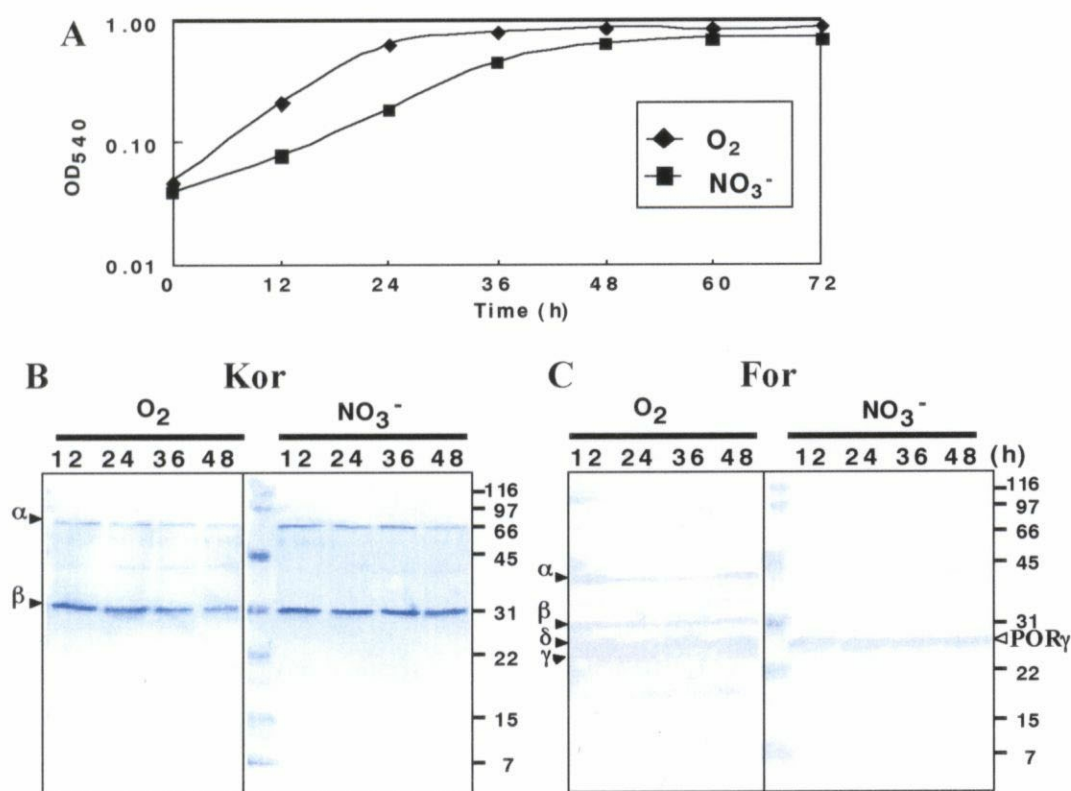


Fig. 3-2. Expression pattern of Kor and For in strain TK-6. A: Growth curve of strain TK-6. dioxygen (diamond) and nitrate (square) represent the final electron donor. B and C: Expression of Kor and For in TK-6 strain analyzed by western blotting. Closed arrows indicate the position of subunits of Kor or For. Open arrow indicates the position of POR γ subunit.

OGOR 欠損株の取得

2種類の OGOR、For と Kor について、相同組換えによる遺伝子破壊を行うためのプラスミド pFGD と pKGD が構築された(Fig. 3-3)。これら二つのプラスミドを用いて TK-6 株に形質転換を行った。尚、形質転換の詳細については後述する。Fig. 3-4A は、形質転換後の培養後のプレートの写真である。野生株の細胞懸濁液をカナマイシンを添加していない無機培地にまくと一面に菌が生えた。しかしカナマイシン存在下ではほとんどコロニーは形成されなかった。中央の白い部分は析出したリン酸カルシウムで菌ではない。一方、プラスミドを用いた形質転換後の培養プレートでは pFGD・pKGD の両方でカナマイシン耐性を獲得したコロニーを多数得られた。これらのコロニーはカナマイシン添加液体培地でも生育した。それぞれ FGD-6 株、KGD-1 株と命名された(Fig. 3-4B)。

遺伝子組換えの確認

これら得られた菌株、FGD-6 株と KGD-1 株について、実際に形質転換されていることを確認するための実験が行われた(Fig. 3-5)。液体培養された菌体を回収し、染色体 DNA が抽出された。これを鋳型に Primer-HTK を用いて PCR 反応を行ったところ、野生株(TK-6)には存在しない *htk* 遺伝子の存在が確認された。また Primer-FGD・Primer-KGD を用いた PCR によってそれぞれ破壊の対象とした遺伝子周辺が野生株より *htk* 遺伝子分(1.1 kbp)だけ大きい位置にバンドが現れ、野生株と同じ位置にはバンドは観察されなかった。これら FGD-6 および KGD-1 株の組換えはサザンハイブリダイゼーションでも観察された。形質転換体では、それぞれプロンプ領域の周辺が *htk* 遺伝子の分だけ大きい位置にバンドが現れ、元に位置にはバンドは観察されなかった。PCR、サザンハイブリダイゼーションの両方の実験で、組換え体において野生株と同じ位置にバンドが出なかったことから、これらの変異が2点交差組換えでおこっていることが示された。これによって、FGD-6 株と KGD-1 株においてそれぞれ確かに *forA* 遺伝子と *korB* 遺伝子が破壊されていることが示された。

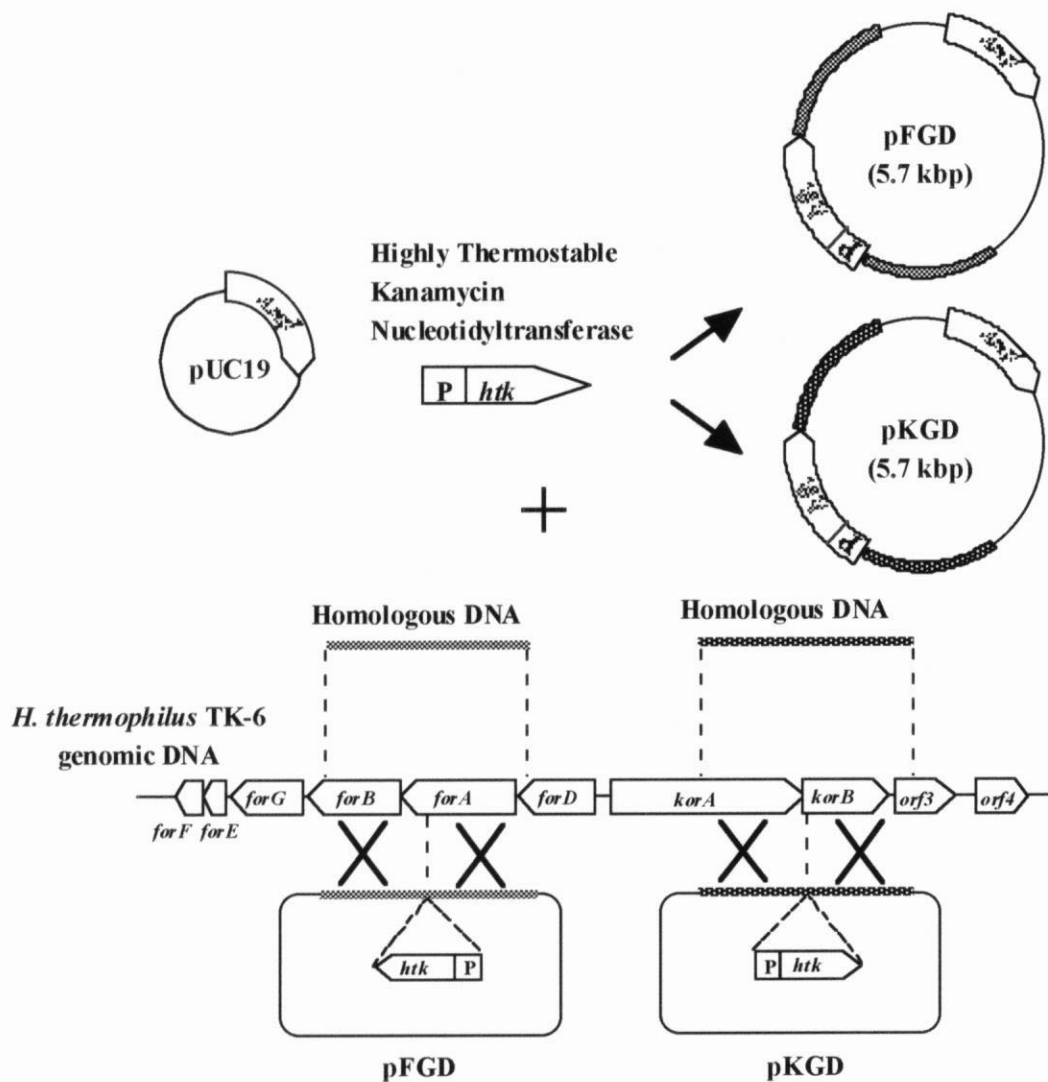
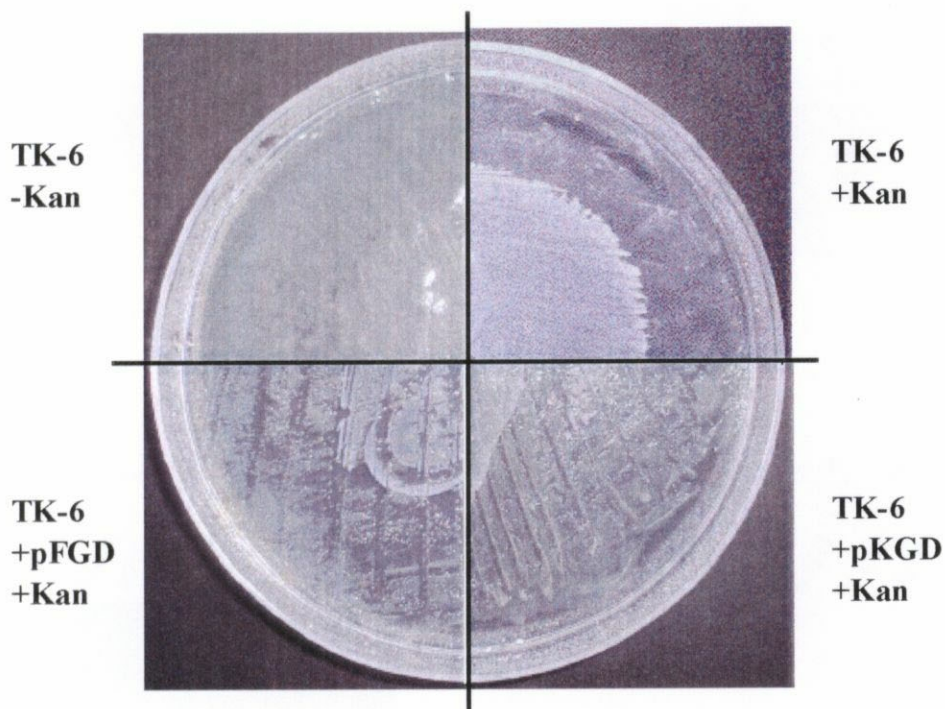


Fig. 3-3. Construction of plasmid DNA, pFGD and pKGD. Thick and shaded lines indicate homologous regions with the genomic DNA from strain TK-6. The pFGD and pKGD are expected to disrupt the *forA* and *korB* genes, respectively, by double crossover homologous recombinations.

A. Solid medium



B. Liquid medium + Kan

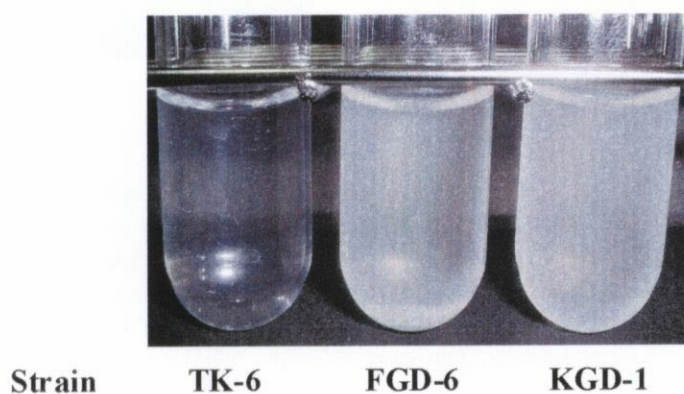


Fig. 3-4. Kanamycin resistance of *H. thermophilus*. (A), Solid inorganic medium plates. The upper left: positive control, strain TK-6 on solid medium without kanamycin. The upper right: negative control, strain TK-6 on solid medium containing 500 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin. The lower left and right: *H. thermophilus* plated on solid medium containing kanamycin after transformation with pFGD and pKGD, respectively. (B), Liquid inorganic medium containing 500 $\mu\text{g/ml}$ of kanamycin. Cultures of strain TK-6, FGD-6, and KGD-1.

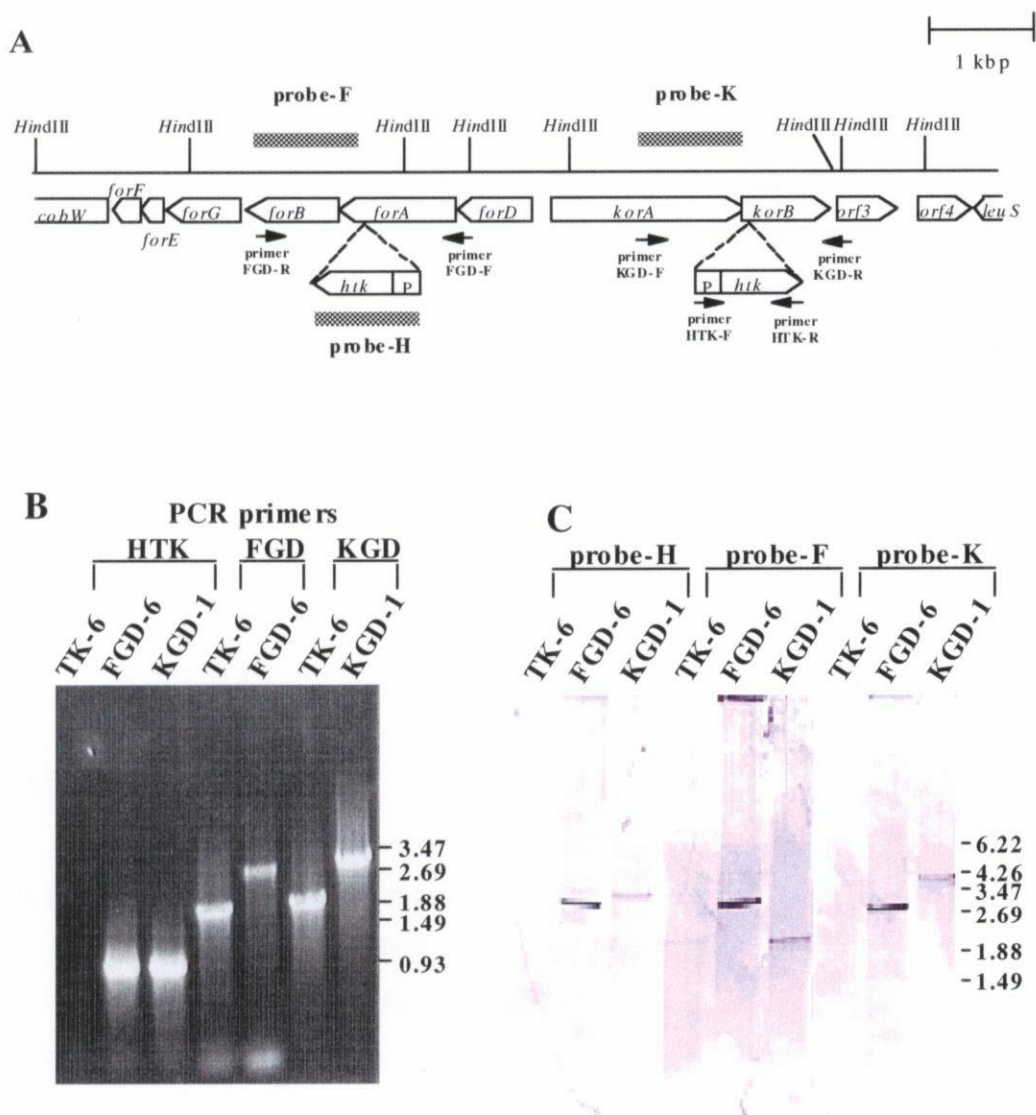


Fig. 3-5. Confirmation of gene disruptions of *H. thermophilus*. (A) Restriction map of the *for* and *kor* genes locus in *H. thermophilus*. Dotted line indicates site where *htk* gene was inserted in strain FGD-6 and KGD-1, respectively. Arrows and shaded lines indicate primers used for PCR and probes used for Southern blot analysis, respectively. (B) Amplified DNA fragments from genomic DNA of strain TK-6, FGD-6, and KGD-1 by PCR using HTK-F / HTK-R, FGD-F / FGD-R, and KGD-F / KGD-R as primers. (C) Southern blot analysis using the probe-H, probe-F, and probe-K. Genomic DNA of TK-6, FGD-6, and KGD-1 were digested with *Hind*III.

遺伝子破壊株における蛋白質発現解析

これらの遺伝子破壊株の細胞破碎液を調製し、ウェスタンブロットにより For と Kor の発現解析が行われた(Fig. 3-6A)。これらの菌株の培養は好気条件で行われているため、TK-6 株では For と Kor の両方が発現した。一方、FGD-6 株では For が発現されておらず、KGD-1 株では Kor が発現されていないことが観察された。

次に、これらの遺伝子破壊によりオペロン中の下流に位置する遺伝子の発現が変化するかを調査した。菌体は好氣的に培養されたものを用いた。FGD-6 株では For オペロン中の下流にコードされた ForF が発現されなかった。野生株では発現していた。したがって、FGD-6 株では *forF* 遺伝子は極性効果を受けていると考えられた。KGD-1 株では Kor オペロン中の下流にコードされた ORF3 と ORF4 の発現が調査された。ORF3 は TK-6 株と KGD-1 株の両方でバンドを確認することができなかった。一方、ORF4 は TK-6 株、KGD-1 株の両方で明確なバンドが出た。この *korB* 遺伝子破壊では下流の遺伝子の転写に影響を与えないものと考えられた。

OGOR 変異株の生育曲線

Fig. 3-7 は変異株 FGD-6 株および KGD-1 株の酸素呼吸・硝酸呼吸時の生育曲線を表している。KGD-1 株すなわち *korB* が破壊され For しか持たない株は酸素呼吸条件において野生株と変わらない旺盛な生育を示したが、硝酸呼吸条件では全く生育しなかった。対照的に、FGD-6 株すなわち *forA* が破壊され Kor しか持たない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 Kor が嫌気生育において必須であることと、For が好気生育時の旺盛な生育に重大な影響を与えていることを示した。

OGOR 変異株の混合栄養性生育の可能性

KGD-1 株は嫌氣的な硝酸呼吸条件下では生育できななかった。このことは、培地に 50 mM 酢酸ナトリウム、あるいは 50 mM 2-オキソグルタル酸ナトリウムを加えた場合にも変わらなかった(Fig. 3-8)。

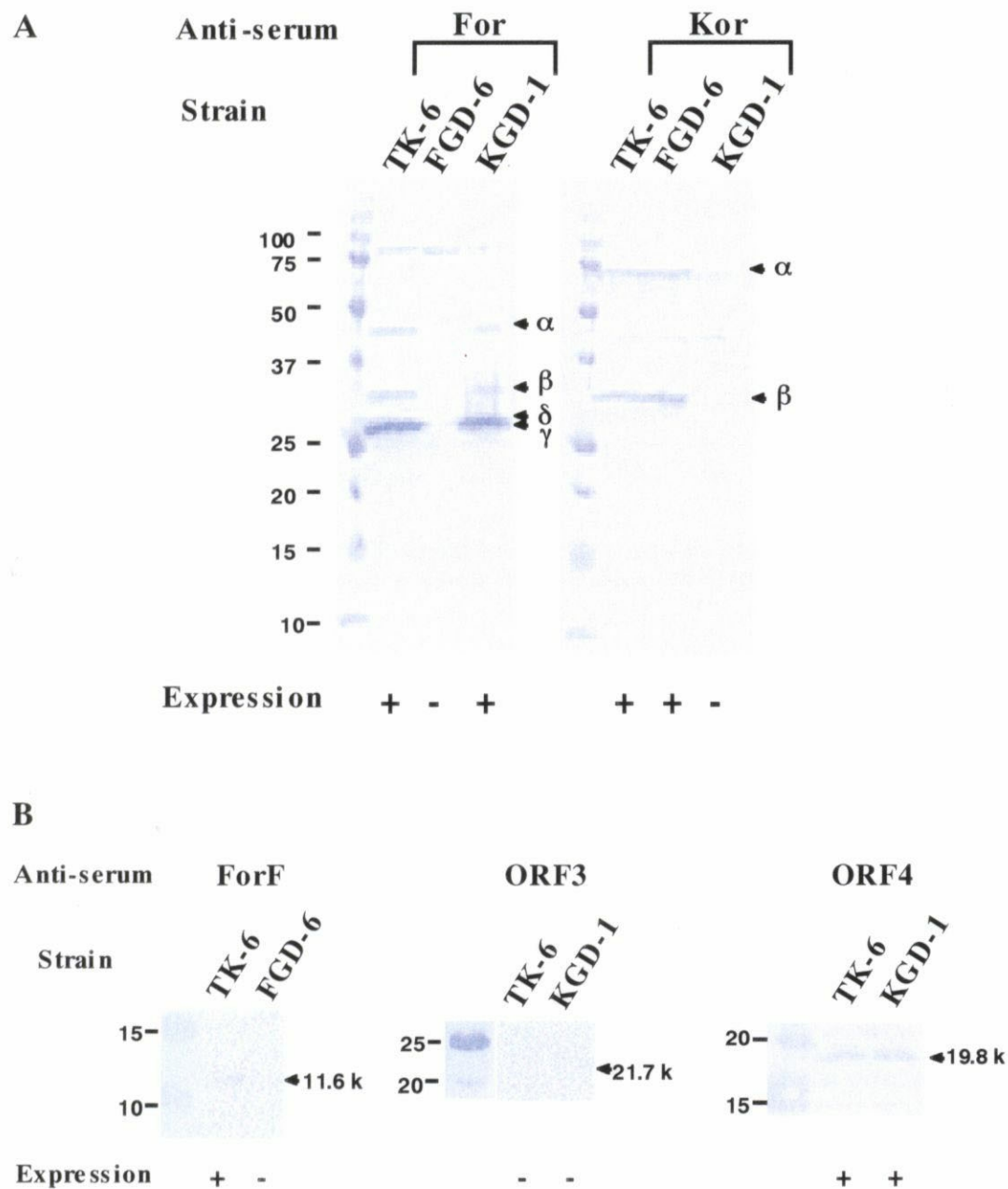


Fig. 3-6. Western blot analysis of TK-6, FGD-6, and KGD-1 (A) Expression of For and Kor enzymes. Closed arrows indicate positions of Kor and For subunits. (B) Expression of ForF, ORF3, and ORF4. Closed arrows indicate positions of the proteins.

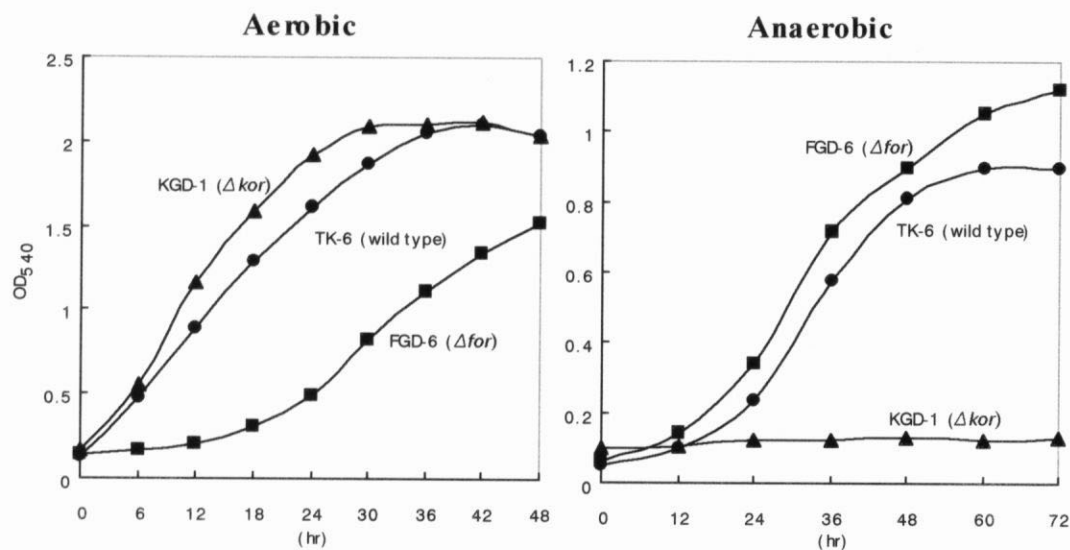


Fig. 3-7. Growth curves of TK-6, FGD-6, and KGD-1 under the aerobic and anaerobic conditions. Left: aerobic, right: anaerobic condition; circle: TK-6, square: FGD-6, triangle: KGD-1.

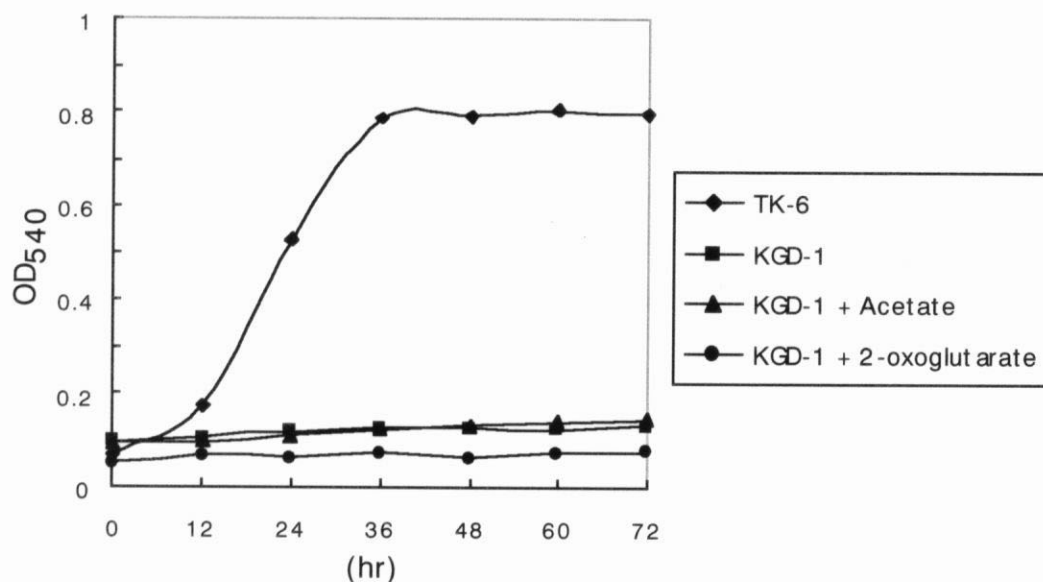


Fig. 3-8. Effect of addition of acetate or 2-oxoglutarate on growth of strain KGD-1 under the anaerobic denitrification conditions. Diamond: TK-6, square: KGD-1, triangle: KGD-1 + 50 mM sodium acetate, circle: KGD-1 + 50 mM sodium 2-oxoglutarate.

H. thermophilus における遺伝子破壊法の構築

遺伝子組換えの方法には相同組換え法を用い、形質転換の方法には塩化カルシウム法を用いた。遺伝子マーカーには好熱性のカナマイシン耐性遺伝子を用いた。予備実験として、TK-6 株の生育を 500 $\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを添加した培地において抑えられることが確かめられた(Fig. 3-4)。形質転換の方法を検討した結果、「材料と方法」で述べた方法で多数の形質転換体を得ることができた(Fig. 3-9)。ただし、形質転換の成功の再現性は高いとは言えず、約 3 ~ 4 回の実験に 1 度成功する程度であった。成功しない場合は、コロニーがほとんど得られず、得られたコロニーも相同組換えはおこっておらず、自発的なカナマイシン耐性能の獲得と考えられた。この実験の成否を決定する因子は未だ特定されていない。以降の記述は、形質転換が成功した時に限ったものについてである。

形質転換の効率を pKGD を用いて検討した。 2.8×10^8 個の細胞あたり約 1.0×10^3 個の形質転換体を得られ、細胞あたりの形質転換効率は 3.6×10^{-6} と表すことができた。過去に測定された本菌のコロニー形成効率は 3.0×10^{-4} であるので、この形質転換効率は十分に高いと評価できる[47]。加えたプラスミド DNA 量は 10, 100, 1000 μg / 200 μl 細胞懸濁液 / チューブの場合で差が見られなかった。加える DNA として、pKGD の代わりに、L-KGD、pKGD-2 を用いて形質転換を行ったところ、十分に多量の形質転換体を得られた。それぞれの形質転換体について 10 株ずつ染色体 DNA を抽出し、染色体の組換えを確認したところ、30 株全てが二点交差組換えをしていた(Table 3-4)。塩化カルシウムの影響を調べるために、細胞の懸濁を 100 mM CaCl_2 の代わりに滅菌水を用いて行い、形質転換したところ、100 mM CaCl_2 を用いた時と変わらず形質転換体を得ることができた(data no shown)。

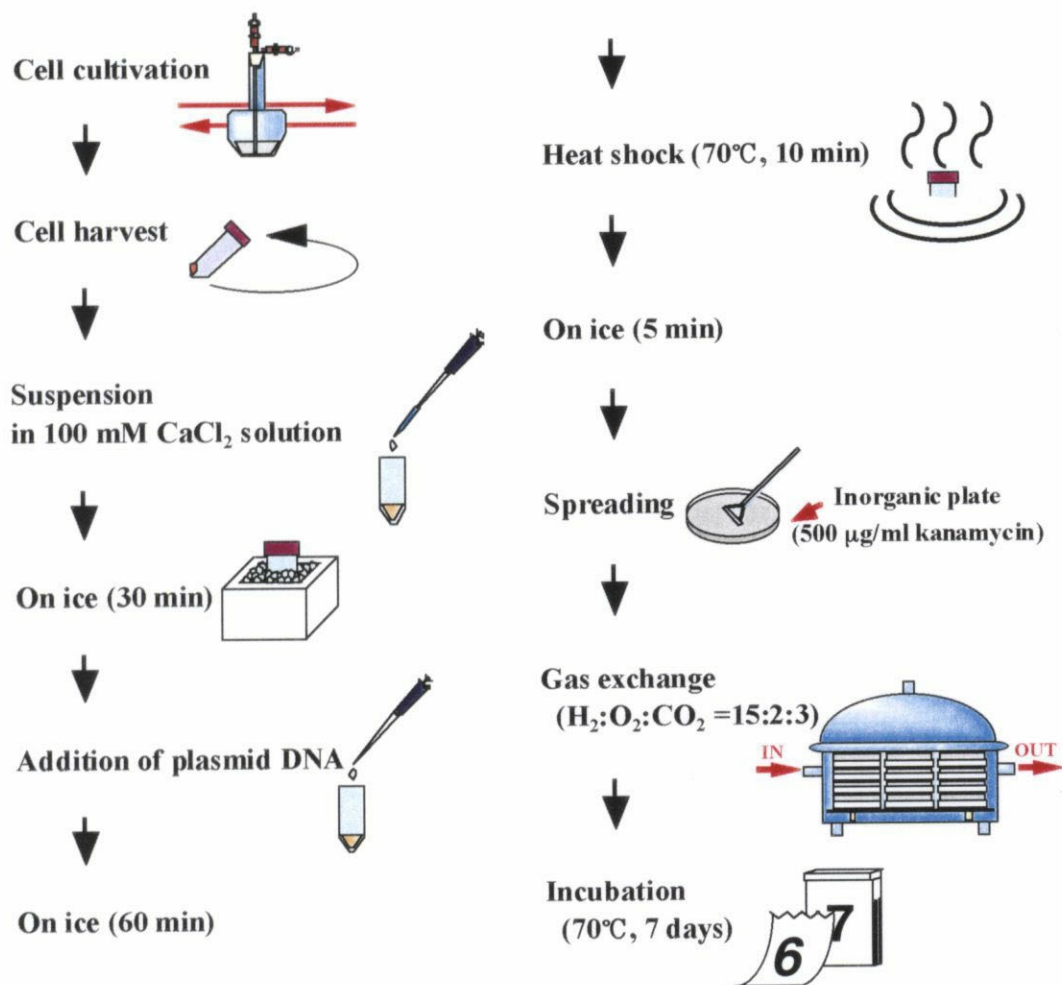
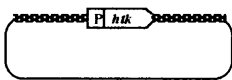
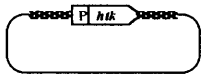
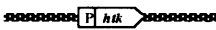


Fig. 3-9. Manipulation of transformation by the CaCl₂ method.

Table 3-4. Transformation of *H. thermophilus* with various DNAs

DNA added to the cells	Form of DNA	Lengths of homologous regions (bp)	DNA structure	No. of double crossover mutants / no. of examined Kan ^r strains
pKGD	Circular	1006, 1017		10 /10
pKGD-2	Circular	508, 501		10 /10
L-KGD	Liner	1006, 1017		10 /10

考察

TK-6 株におけるウエスタンブロット解析の結果は、Kor は好気・嫌気の両条件において構成的に発現していて、一方、For は好気条件時のみ発現していることを示した。この結果は TK-6 株が嫌気生育において Kor によって支えられていることを表し、また For が好気生育時の旺盛な生育に重大な影響を与えていることを示唆した。好気生育時に Kor は発現しているものの α サブユニットのバンドが比較的弱い。第 1 章で Kor の酸素感受性が For より高いこと、および Kor α サブユニットが分解されやすいことを示した。これらの結果と今回の結果から、Kor は好気条件にあまり適応していないように思われた。

本章において *forA* 遺伝子を破壊した FGD-6 株と *korB* 遺伝子を破壊した KGD-1 株が取得された。FGD-6 株においては *forF* 遺伝子の、KGD-1 株においては *orf3* 遺伝子の極性効果が観察された。従って、KGD-1 株や FGD-6 株の表現型の変化は ORF3 欠損や ForF 欠損による可能性も考えられた。

FGD-6 株と KGD-1 株の生育曲線を描いたところ、好気・嫌気の条件の違いで各々の欠損株は対照的な特徴を示した。Kor 欠損株は好気条件において野生株と変わらない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 欠損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 Kor が嫌気生育において必須であることと、For（もしくは ForF、もしくはその両方）が好気生育時の旺盛な生育を支持していることを示した。

H.thermophilus の近縁種であり全ゲノム配列が決定している *Aquifex aeolicus* は、硝酸呼吸などによる嫌気的な生育が不可能である[39]。*A. aeolicus* は *forDABGE* と相同な遺伝子を有しているが、*korAB* に相同な遺伝子は有していない。このことは Kor が嫌気的な炭酸固定に順応していることを強く示唆している。*A. aeolicus* は好氣的に生育するが、その酸素濃度上限はわずかに 7.5 ppm である。一方、TK-6 株はこれよりずっと高い酸素濃度でも生育でき、生育速度も格段に高い。TK-6 株において好気条件で二つの OGOR が発現することは、この株の旺盛な生育を説明できる。第一章で示された For の酸素耐性もまた、この株の高酸素濃度の順応を説明できる。

FOR の発現が酸素で誘導されることは、TK-6 株が酸素に応答した遺伝子発現制御機構を有していることを示唆している。本菌株の好気呼吸や脱窒や鉄呼吸の呼吸鎖の最終酸化酵素はこの制御機構の支配下にあるのかも知れない。大腸菌の酸素応答遺伝

子発現制御システムで良く知られたものに、ArcAB システムや FNR システムがある[50]。しかし、TK-6 株において、これらと相同なシステムは見い出されていないし、For 遺伝子クラスターと Kor 遺伝子クラスターの間のプロモーター領域にこれら既知のシステム特異的な制御モチーフは見い出されていない。TK-6 株から脱窒関連遺伝子群のいくつかは既に取得されているが、これら遺伝子群のプロモーター領域にも既知の発現制御モチーフは見出せないで、TK-6 株は未だ知られていない遺伝子発現制御機構を有しているのかも知れない。

野生株におけるウェスタンブロット発現解析により、好気条件で For と Kor の両方が発現していることが確認されたので(Fig. 3-2)、ひとつの OGOR の遺伝子が破壊されても好気条件ではもう一方の OGOR によって還元的 TCA 回路が機能することが予想された。実際、For 欠損株と Kor 欠損株の両方が取得されたのでこの予想は正しかったと言える。

興味深いことは、Kor 欠損株が嫌気条件でほとんど生育できなかったことである。このことは、For の発現が嫌気条件では強く抑制されていることと、OGOR が発現しないと本菌が生育できないことを示している。大腸菌は嫌気条件になると酸素濃度応答システムとして ArcAB と FNR の2系統を使用した上で、その炭素・エネルギー代謝経路を大きく変える(Fig. 3-10A)。例えば TCA 回路の酸化的な回転は止まり、2-oxoglutarate への酸化的な流れと succinate への還元的な流れに分岐する。この際、2-oxoglutarate dehydrogenase と pyruvate dehydrogenase の発現が抑制され、代わりに acetyl-CoA の生成のために pyruvate formate lyase が発現される。また、呼吸鎖では硝酸などの代替呼吸基質に対しての還元酵素が発現され、さらに代替呼吸基質が無い場合には醗酵用の酵素が誘導される。TK-6 株において、大腸菌の嫌氣的代謝のように TCA 回路が酸化方向と還元方向に分岐することはあり得ないということであろうか(Fig. 3-10B)? TK-6 株は絶対独立栄養性で、C 源に二酸化炭素のみを用いると考えられている[21]。したがって二酸化炭素固定反応は必須である。OGOR を持たず TCA 回路の還元的回転が期待できない以上、二酸化炭素固定反応は POR による acetyl-CoA から pyruvate への還元反応と pyruvate carboxylase による pyruvate から oxalacetate への還元反応に依存せざるを得ない。しかし、この連続した2つの反応の出発物質である acetyl-CoA の供給は、還元的 TCA 回路なしにはあり得ないので、この菌は生育できない。

では、環境中に酢酸を添加した場合はどうなるだろう？ TK-6 株は絶対独立栄養性であり生育には二酸化炭素の供給が必須である。これに 50 mM 程度の酢酸を添加すると、生育を少し促進させる効果があることが知られている（100 mM 酢酸では生育はむしろ阻害される）[51]。このことから、本菌は酢酸存在下では OGOR に依存せずに生育できるかも知れないと考え、Kor 欠損株を 50 mM 酢酸存在下で硝酸呼吸条件で培養してみたが、ほとんど生育せず、酢酸添加の効果は得られなかった。このことから、外部から酢酸が供給されたとしても、OGOR に依存せずには生育できないことが示された。一般に還元的 TCA 回路の鍵酵素のひとつである ATP: citrate lyase による反応の平衡が citrate から oxalacetate と acetyl-CoA の生成に大きく偏っていることが知られている[24]。TK-6 株においてもそれがあてはまると仮定すれば、2-oxoglutarate が供給されないので生育できないことになる。

では 2-oxoglutarate を培地に添加したらどうか？ やはり生育は不可能であった。野生株において 2-oxoglutarate の添加が生育に影響を与えないことが報告されている[51]。おそらく細胞内に取り込むことができないものと考えられる。これらのことから、*H. thermophilus* はその生育に OGOR が必須であることが裏付けられた。

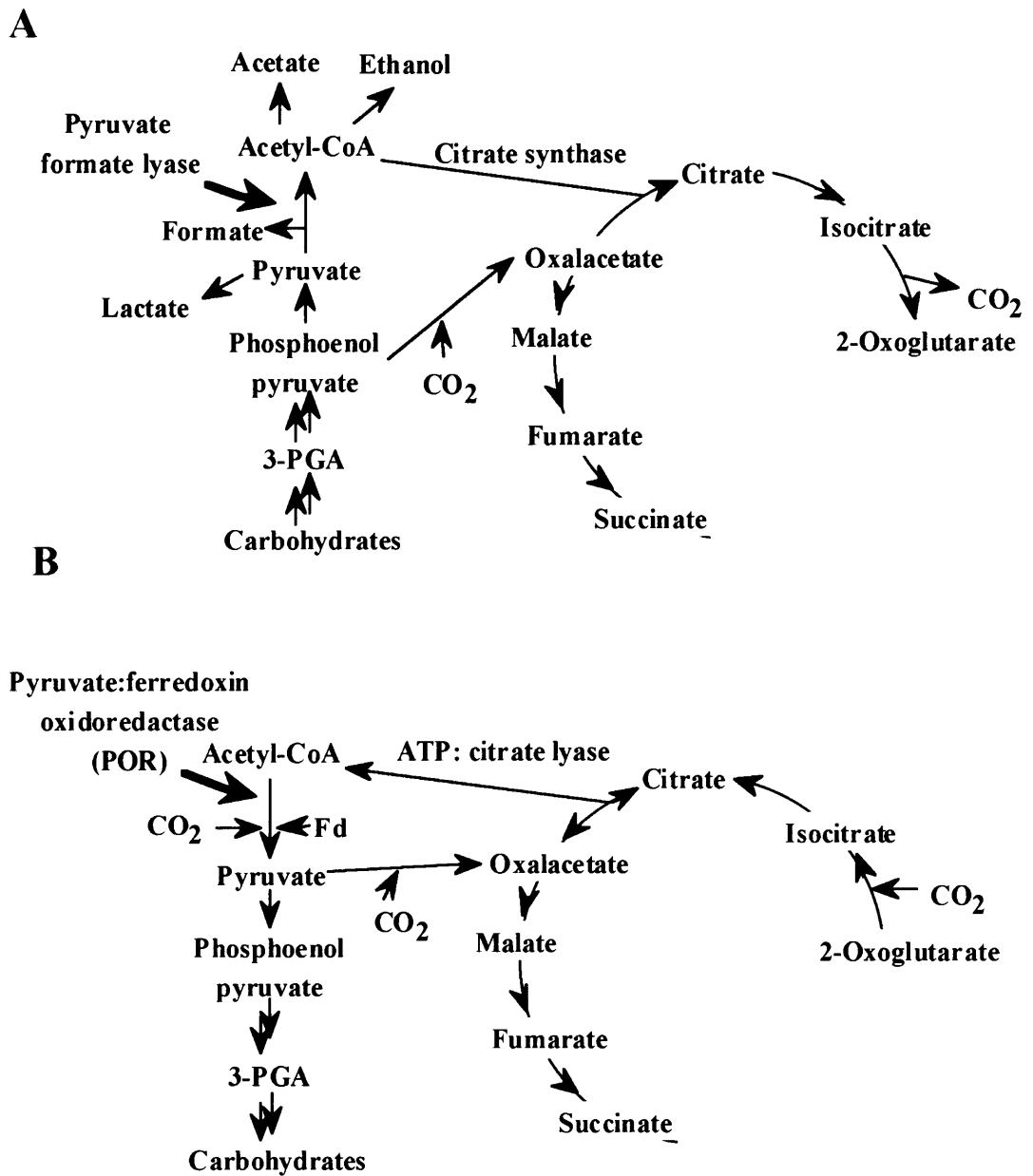


Fig. 3-10. (A) Carbon metabolism in *E. coli* growing under anaerobic condition. (B) Putative mixotrophic carbon metabolism in *H. thermophilus* growing without OGOR.

本章において、*H. thermophilus* における遺伝子破壊法が構築された。遺伝子組換えの方法には相同組換え法を用いた。これは好熱性古細菌でいくつかの成功の報告があったからであり[52]、また TK-6 株あるいはこの近縁種において使用可能なプラスミドのような遺伝子ベクターの報告がなかったからである。形質転換の方法には塩化カルシウム法を用いた。これも好熱性古細菌によって報告例があったからであり[53]、また操作が簡便で系の大きさの変更が容易であったからである。遺伝子マーカーには耐熱性のカナマイシン耐性遺伝子を用いた。本菌は絶対独立栄養性であり、多くの有機化合物を単一の炭素源・エネルギー源として利用できず、栄養要求性変異株が取得できるかどうか危惧されたことから、遺伝子マーカーには薬剤耐性を選んだ。TK-6 株の生育条件である 70-75°C、pH 7.0 において多くの抗生物質は不安定であるがアミノグリコシド系抗生物質は比較的安定である[54]。70°C で使用可能なカナマイシン耐性遺伝子の報告があり[55]、TK-6 株が 500 µg/ml のカナマイシンを添加した培地において生育を抑えられることが確かめられたので、耐熱性カナマイシン耐性遺伝子をマーカーとして使用した。

TK-6 株において、比較的高い効率で相同組換えがおこることが観察された。しかも、そのうちの大部分が2点交差による相同組換えであった。添加量は最初 1000 µg / 200 µl / tube にしていたが、その後、10 µg まで減らしても大量の形質転換体を得られることが判明し(10³ transformants / µg DNA)、DNA の調製が容易になった。形質転換には高濃度の塩化カルシウムを必要としないことも判明した。同様な報告は古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* や *Methanococcus voltae* でも報告されている。またこれは、本菌のエレクトロポレーション法による形質転換の可能性を示唆している。数度のエレクトロポレーション法による形質転換の試みは失敗したが(date not shown)、今後条件検討してみる価値はある。今回の形質転換に使用したプラスミドに含まれる *H. thermophilus* との相同領域は 2.0 kbp (1.0 kbp x 2)であったが、半分の 1.0 kbp (0.5 kbp x 2)まで短くしても、ほぼ同様の数の形質転換体を得られた。また、直鎖状の DNA を用いても同様の結果を得た。そして2点交差組換えの確率も 100%であった。組換え効率が高い好熱菌として *Thermas thermophilus* が有名であるが、時に実験者の期待しない組換えを引き起こすので、取扱いには注意が必要である。形質転換の再現性は現在のところ高いとは言えない。今後、条件の最適化を行う必要がある。ダブルミューテーションの取得には他の遺伝子マーカーが必要であるが、70°C・中性の条件で使える抗生物質耐性遺伝子としてハイグロマイシン B 耐性遺伝子の報告があるので、TK-6 株に応用できるか検討してみる価値がある[56]。

第四章 機能不明蛋白質群の解析

序

H. thermophilus TK-6 株は 2 種類の OGOR、すなわち For と Kor を持つ。これら 2 つの OGOR の構造遺伝子である *forDABGE* と *korAB* はそれぞれ染色体上でクラスターをなし、お互いにプロモーター領域を共有する形で逆向きに並んで存在している。*forDABGE* のすぐ下流には *forF* と名付けられた機能不明な蛋白質をコードする遺伝子が見い出された。また、*korAB* の下流には *orf3* と *orf4* と名付けられた機能不明な蛋白質をコードする遺伝子が見い出された。RT-PCR の結果から、*forDABGEF* と *korAB-orf3-orf4* はそれぞれ一つの mRNA として転写されることが示され、それぞれ For オペロン、Kor オペロンと名付けられた。これらの機能不明蛋白質をコードする 3 個の遺伝子、*orf3*, *orf4*, and *forF* について配列上の特徴を Table 4-1 に表した。しかしながら、これらの蛋白質と相同な配列を持つ蛋白質・遺伝子の情報は殆どなく、機能はもとより、OGOR との関連性の有無についても予想することが困難であった。本章では、これらの機能未知蛋白質について、知見を得ることを目的とした。

Table 4-1. Summary of function-unknown proteins encoded in downstreams of OGOR operons based on the deduced amino acid sequences.

Gene	No. of nucleotide	No. of amino acid	MW	Characters
<i>orf3</i>	579	192	21.7 k	Cysteine rich Redox protein?
<i>orf4</i>	609 or 501 ^{*1}	202 or 166	23.8 k or 19.8 k	Similar to sl10741 gene in cyanobacteria <i>Synechocystis</i> sp.
<i>forF</i>	294	97	11.6 k	Homolog of function-unknown protein, FFL from strain TK-6 ^{*2}

*1 This ORF has two ATG codon in one frame.

*2 See the section of "gene cloning encoding FofF like protein".

材料と方法

大腸菌を用いた DNA の組換え技術

プラスミド DNA の抽出はアルカリ-SDS 法に従って行った。また DNA シーケンスのためのプラスミド DNA の場合、更に PEG 沈澱処理を加えるか、QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN)あるいは GenElute plasmid miniprep kit (Sigma)を用いて調製した。

大腸菌の形質転換

Cell-Porator (Bethesda research laboratories)を用いてエレクトロポレーション法によって行った。コンピテントセルは以下のように調製した。大腸菌株を Luria-Bertani (LB) 培地で OD₆₀₀ が 0.5-0.7 になるまで培養し、遠心して菌体を回収した。培地と等量の水で 2 回、半分量の 10%グリセロールで 1 回洗浄して得られた菌体を細胞濃度がおよそ 1 x 10¹¹/ml 以上になるように適量（培地の 4%が目安）の 10%グリセロールで懸濁し分注して-80℃で保存した。

DNA シーケンス

ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer Corporation)で dideoxy chain termination 法を用いて行った。PCR 反応は Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Corporation)を用いて Table 4-2 のように反応液を調製し Table 4-3 の条件で行った。

Table 4-2. PCR reaction mixture for DNA sequence.

Mixture	
Template DNA	200-500 ng
Primer	3.2 pmol
Premix	8 µl
Distilled water	q.s.
Total	20 µl

Table 4-3. PCR condition.

96°C	2 min	x 25
96°C	30 sec	
50°C	15 sec	
60°C	4 min	
4°C	hold	

OGOR オペロン遺伝子群の発現プラスミドの構築

OGOR オペロン中にコードされる機能不明の遺伝子群 (*orf3*, *orf4*, and *forF*) を大腸菌内でおのおの単独で発現させるためのプラスミドベクターを構築した。

それぞれの遺伝子を TK-6 株のゲノム DNA から PCR で増幅するためのプライマーをデザインした (Table 4-4)。プライマーの製造はサワデー社もしくはシグマジェノシス社に依頼した。PCR の反応液は Table 4-5 のように調製し DNA polymerase には Ex Taq DNA polymerase (Takara) を用いた。反応条件は Table 4-6 に示した。増幅により得られた DNA 断片は一度 T ベクター (pGEM-T 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)、pET ベクター (Novagen) に挿入した。pET ベクターは原則として pET11a(+) を、C 末端にヒスチジンタグを付加させるために pET21c(+) を、用いた。

Table 4-4. PCR primers.

P- <i>orf3</i> -N	CATATGAACTACGAGAACGTTGACCTCTCC
P- <i>orf3</i> -C	GGATCCTCAATCAAAGCCATAGCTCTCAAA
P- <i>orf4</i> -N	CATATGATCAAAATTAGTGGAATACCTAGC
P- <i>orf4</i> -C	GGATCCCTAAGAGCTTCCTTTTAGCTCCTT
P- <i>orf4</i> -C'	CTCGAGAGAGCTTCCTTTTAGCTCCTTTTT
P- <i>orf4.1</i> -N	CATATGAGGACGCTTAGTAAGGAAGAGCTA
P- <i>forF</i> -N	GGAATTCCATATGATGGAAGAAAAGTTCAG
P- <i>forF</i> -C	CGGGATCCCTACTCTCCGCCGTACTCTACC

Table 4-5. PCR reaction mixture.

Mixture		
	TK-6 genomic DNA	0.5 µg
	each primer	0.5 µM
	dNTP	200 µM
	Taq DNA polymerase	2.5 U
	buffer	q.s.
Total		50 µl

Table 4-6. PCR condition.

96°C	2 min		
96°C	1 min] x 30	
55°C	40 sec		
72°C	1 min		
72°C	2 min		
4°C	hold		

大腸菌での組換えタンパク質の大量発現

目的の遺伝子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 LB 培地に接種し、37°Cで一晩前培養を行った。この培養液をアーレンメイヤーフラスコ中の LB 培地 (100 µg/ml アンピシリン、0.5 mM FeSO₄) に培地の 1 %量加え、アルミホイルでキャップし 37°C、150 rpm で震盪した。600 nm における吸光度がおおよそ 0.5-0.8 に達してから、1 mM isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)を添加することで発現を誘導した。培養はこの後さらに 3-4 時間行った。

CFE の調製と組換え蛋白質の精製

CFE の調製は組換え OGOR の場合と同じ条件で行った。バッファーは MY-1 バッファーを用い、精製過程でも原則として同じバッファーを用いた。蛋白質の精製は 280 nm の紫外線吸収と SDS-PAGE の映像を指標に行った。

組換え ORF3 の精製

組換え ORF3 は CFE を熱処理(70°C, 10 min)とゲルろ過カラムクロマトグラフィーカラム(Superdex-200 column, 1.0 by 60 cm; Amersham)で精製された。

組換え ORF4 の精製

組換え ORF4 は N 末端にヒスチジンタグをつけた組換え体として発現された。精製は CFE を熱処理(70°C, 10 min)とアフィニティーカラムクロマトグラフィー(HiTrap Chelating; Amersham)で行った。

組換え ForF の精製

組換え ForF は CFE を熱処理(70°C, 10 min)と陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(Q-sepharose HP column, Amersham)で精製された。

電子常磁性共鳴(EPR)分析

EPR は日本医科大学の岩崎俊雄先生の協力のもと行った。

亜鉛の定量分析

原子吸光分析を日立サイエンスシステムズに依頼した。

抗血清の調製

精製された蛋白質について、それぞれ約 1.0 mg protein / 1 ml リン酸バッファー (pH 8.0) となるように調製した。この溶液をそれぞれの抗血清の抗原とした。抗血清の作製は Takara に依頼し、それぞれウサギ一羽を用いて、ポリクローナル抗体を作成した。

遺伝子破壊株の構築

3つの遺伝子 *forF*、*orf3*、*orf4* をそれぞれ標的とした遺伝子破壊用のプラスミド pFFGD、pCGD、pDGD を構築した。使用した PCR プライマーを Table 4-7 に記載した。

(i)pFFGD (*forF* 破壊プラスミド) の構築 pYNA3 (*forF* 遺伝子全長を含む 1.4 kbp の DNA 断片を pGEM-T Easy に挿入したもの) を *Eco*NI で消化し、*forF* 遺伝子中に存在する *Eco*NI 部位で切断した。これを klenow fragment で処理し両端を平滑末端にした。pUC18-promoter +HTK から耐熱性カナマイシン耐性遺伝子・*hik* を PCR で増幅した。PCR のプライマーには Primer-H2-F と Primer-H3-R を使い、DNA ポリメラーゼには KOD plus (Toyobo) を用いた (KOD plus を用いると PCR 産物は平滑末端で得られる。)。これら2種の DNA 断片をライゲーションし、大腸菌に形質転換した。クローンの選択はカナマイシン耐性能によって行った。結果得られたプラスミドを pFFGD と名付けた。

(ii)pCGD (*orr3* 破壊プラスミド) の構築 pYNA101 を *Pst*I で消化し、*orr3* 遺伝子全長を含む 1.7 kbp の DNA 断片を抽出し、同酵素で切断・脱リン酸処理した pUC19 に挿入した。クローンの選択はブルー・ホワイトセレクションによって行った。得られたプラスミドを制限酵素 *Eco*81I で処理し *orr3* 遺伝子内の 1 箇所を切断した。これに、pUC18-promoter +HTK から PCR で増幅した耐熱性カナマイシン耐性遺伝子・*hik* を組み込んだ。PCR のプライマーには Primer-H3-F と Primer-H3-R を使い、得られた断片を制限酵素 *Eco*81I で処理した。クローンの選択はカナマイシン耐性能によって行った。結果得られたプラスミドを pCGD と名付けた。

(iii)pDGD (*orr4* 破壊プラスミド) の構築 pYNA101 を *Eco*RV と *Sac*I で消化し、*orr4* 遺伝子全長を含む 1.9 kbp の DNA 断片を抽出し、*Sma*I と *Sac*I で切断・脱リン酸処理した pUC19 に挿入した。クローンの選択はブルー・ホワイトセレクションによって行った。得られたプラスミドを制限酵素 *A*fIII で処理し *orr4* 遺伝子内の 1 箇所を切断した。これに、pUC18-promoter +HTK から PCR で増幅した耐熱性カナマイシン耐性遺伝子・*hik*

を組み込んだ。PCR のプライマーには Primer-H4-F と Primer-H4-R を用い、得られた断片を制限酵素 *Afl*III で処理した。クローンの選択はカナマイシン耐性能によって行った。結果得られたプラスミドを pCGD と名付けた。

Table 4-7. PCR primers to amplify the <i>htk</i> gene,		
Primer	Sequence	Restriction enzyme site
Primer-H2-F	A A CTGCAGCGTTGACGGCGGATATG	<i>Pst</i> I
Primer-H2-R	A A CTGCAGCGTAACCAACATGATTA	<i>Pst</i> I
Primer-H3-F	G G GGCTTAAGCGTTGACGGCGGATATG	<i>Eco</i> 81I
Primer-H3-R	G G GGCTTAAGCGTAACCAACATGATTA	<i>Eco</i> 81I
Primer-H4-F	CCCCCTCAGGCGTTGACGGCGGATATG	<i>Afl</i> III
Primer-H4-R	CCCCCTCAGGCGTAACCAACATGATTA	<i>Afl</i> III

結果

組換え ORF3 の発現と精製

ORF3 を発現させるためのプラスミド pET-ORF3 を以下のように構築した。*orf3* 遺伝子をプライマー P-*orf3*-N と P-*orf3*-C を用いた PCR によって TK-6 株のゲノム DNA から増幅し、pET11a(+)に挿入された。このプラスミドによって発現される蛋白質はネイティブの ORF3 と等しいアミノ酸配列を持つことが期待された。このプラスミドを用いて大腸菌で組換え ORF3 を発現させたところ、SDS-PAGE のゲル上で分子質量約 25 kDa の位置に発現蛋白質が確認された。アミノ酸配列から予想される ORF3 の分子質量は 21.7 kDa であるので、それより少し大きい値であるが、これは SDS-PAGE 上の誤差と考えられた。熱処理 (70°C, 10 min) とゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより単一なバンドとして精製することができた(Fig. 4-1)。

組換え ORF4 の発現と精製

orf3 遺伝子の下流には *orf4* 遺伝子の存在が予想されていた。その同一のフレーム内には二つの ATG トリプレットが見い出され、それぞれ 202 個と 166 個のアミノ酸から成る蛋白質が生産されると予想されたが、TK-6 株の細胞内でどちらの蛋白質が発現されるかは不明であった。そこでこれら 2 種類の蛋白質を発現させるためのプラスミド pET-ORF4 (202 個のアミノ酸) と pET-ORF4.1 (166 個のアミノ酸) を以下のように構築した。TK-6 株のゲノム DNA からプライマー P-*orf4*-N と P-*orf4*-C を用いた PCR、またプライマー P-*orf4*.1-N と P-*orf4*-C を用いた PCR によって増幅された DNA 断片をそれぞれ pET11a(+)に挿入した。これらのプラスミドを用いて大腸菌で組換え ORF4 を発現させたところ、pET-ORF4 を用いて発現された 202 個のアミノ酸から成る蛋白質は、その大半が大腸菌の細胞膜内で封入体を形成し、わずかに細胞破碎液の可溶性画分に存在した蛋白質も熱処理 (70°C, 10 min) により完全に変性した。一方、pET-ORF4.1 を用いて発現された 166 個のアミノ酸から成る蛋白質は、可溶性画分に十分量存在し、かつ熱処理 (70°C, 10 min) にも安定であった。これによって、*orf4* によってコードされる ORF は 166 個のアミノ酸から成っていることが強く示唆された。この組換え蛋白質を Q-sepharose カラムクロマトグラフィーで精製しようと試みたが、あまり精製効果が得られなかった。そこで、新たに発現プラスミド pET-ORF4.1(His)を構築した。*orf4* 遺伝子をプライマー P-*orf4*.1-N と P-*orf4*-C'を用いた PCR によって TK-6 株のゲノム DNA から増幅し、pET21c(+)に挿入された。このプラスミドによって発現される蛋白質は C 末

端にヒスチジインタグが付加され分子質量が 20.9 kDa になることが期待された。発現された蛋白質は可溶性蛋白質として発現され、熱処理と Ni-レジンアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより単一なバンドとして精製することができた(Fig. 4-1)。

組換え ForF の発現と精製

ForF を発現させるためのプラスミド pET-ForF を以下のように構築した。*forF* 遺伝子をプライマーP-forF-N と P-forF-C を用いた PCR によって TK-6 株のゲノム DNA から増幅し、pET11a(+)に挿入された。このプラスミドを用いて大腸菌で組換え ForF を発現させたところ、可溶性画分に発現された。アミノ酸配列から予想される ForF の分子質量は 11.6 kDa であり、発現蛋白質は SDS-PAGE のゲル上の位置でこれと一致した。ForF は熱処理 (70°C, 10 min) と Q-sepharose カラムクロマトグラフィーにより単一なバンドとして精製することができた(Fig. 4-1)。

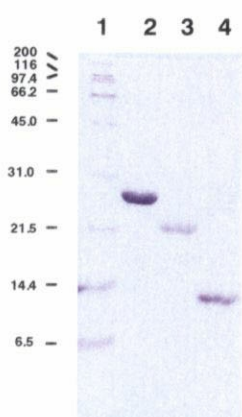
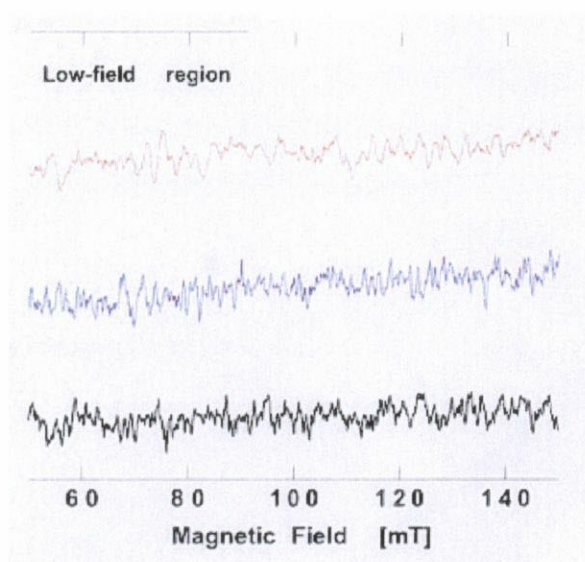


Fig. 4-1. SDS-PAGE of 18% acrylamide. Purified proteins. Lane 1: Molecular standard, lane 2: ORF3, lane 3: ORF4, and lane 5: ForF .

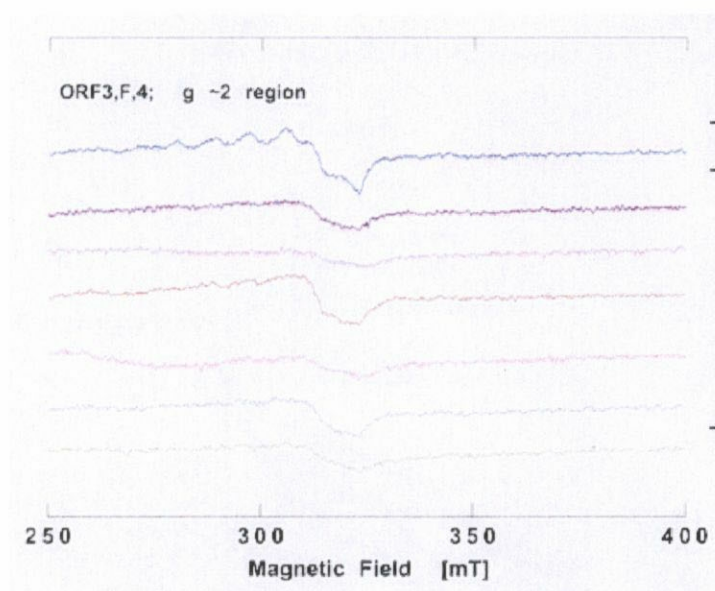
金属の存在確認

ORF3、ORF4、ForF の機能を探るために、これらの蛋白質に関して paramagnetic center の存在を EPR で調査した(Fig. 4-2)。液体ヘリウム温度で測定を行った結果、これらの蛋白質には Fe, Cu, Mn, Ni, Mo, Co, organic radical などは検出されなかった。

ORF3はシステインリッチな蛋白質である。EPRの結果とアミノ酸配列から Fe-S クラスターを持つ可能性は少ないと考えられたが、亜鉛原子が結合している可能性は考えられたので、原子吸光分析による亜鉛の定量を行った。結果はごく少量の亜鉛しか検出されず、ORF3は亜鉛を含まないと考えられた(Table 4-8)。



Protein, Temp., MW power		
ORF3,	30 K,	1 mW
ORF3,	18 K,	0.2 mW
ORF4,	32 K,	1 mW



Protein, Temp., MW power		
ORF3,	18 K,	0.2 mW
ORF3,	40 K,	1 mW
ORF3,	80 K,	2 mW
ForF,	32 K,	0.2 mW
ForF,	80 K,	2 mW
ORF4,	31 K,	1 mW
ORF4,	80 K,	2 mW

Fig. 4-2. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum of the purified ORF3, ORF4, and ForF. The conditions for the measurement were as follows; microwave frequency 8.98 GHz. Modulations of magnetic field were not done.

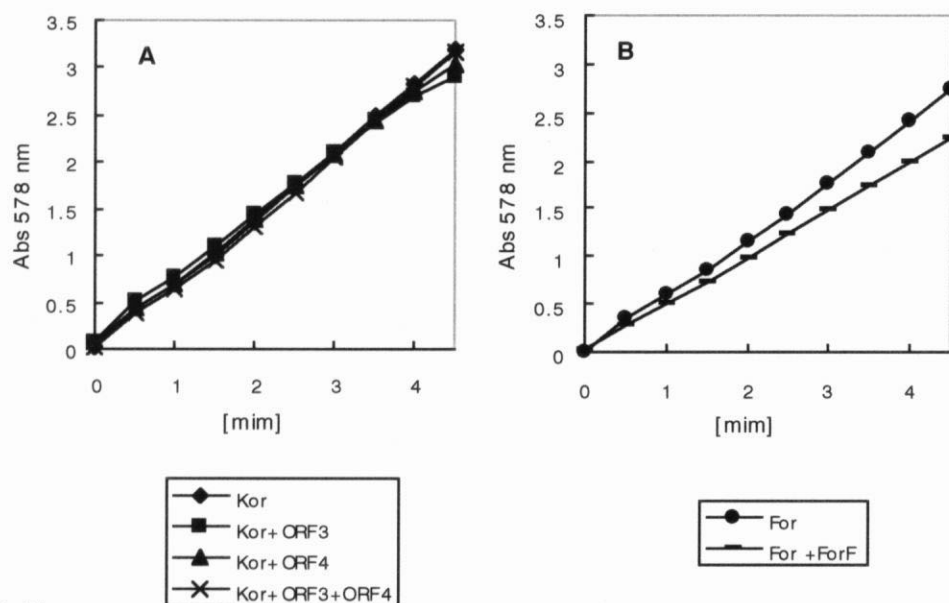
Table 4-8. Atomic absorption spectrophotometry of ORF3.

	ORF3	Zinc
MW	21.7 k	65.4
Concentration	1.0 mg/ml	9.2 ng/ml
Molarity	46.1 μ M	0.14 nM

OGOR 酵素反応への影響

ORF3、ORF4、ForF を OGOR 酵素活性系に加え、影響を観察した。脱炭酸反応と炭酸固定反応のいずれにおいても正の効果は無かった。(Fig. 4-3)。むしろ活性が落ちるのは蛋白質の過剰添加による弊害と考えられた。

Decarboxylation



Carboxylation

Fig. 4-3. Effect of addition of ORF3, ORF4, and ForF into the decarboxylation (A and B) and carboxylation (C and D) reaction catalyzed by Kor (A and C) and For (B and D).

遺伝子破壊株の構築

orf3、*orf4*、*forF* 遺伝子をそれぞれ破壊するためのプラスミド pCGD、pDGD、pFFGD を作成し、形質転換を行った(Fig. 4-4)。*orf3* 遺伝子破壊株 CGD-3 と *forF* 遺伝子破壊株 FFGD-1 が取得できた。それぞれの遺伝子破壊株のゲノム DNA において、野生株には存在しない *htk* 遺伝子が存在し、かつ目的の遺伝子が *htk* 遺伝子分だけ大きくなっていることが観察された(Fig. 4-5)。

orf4 遺伝子破壊株は数度の試みにも関わらず取得できなかった。

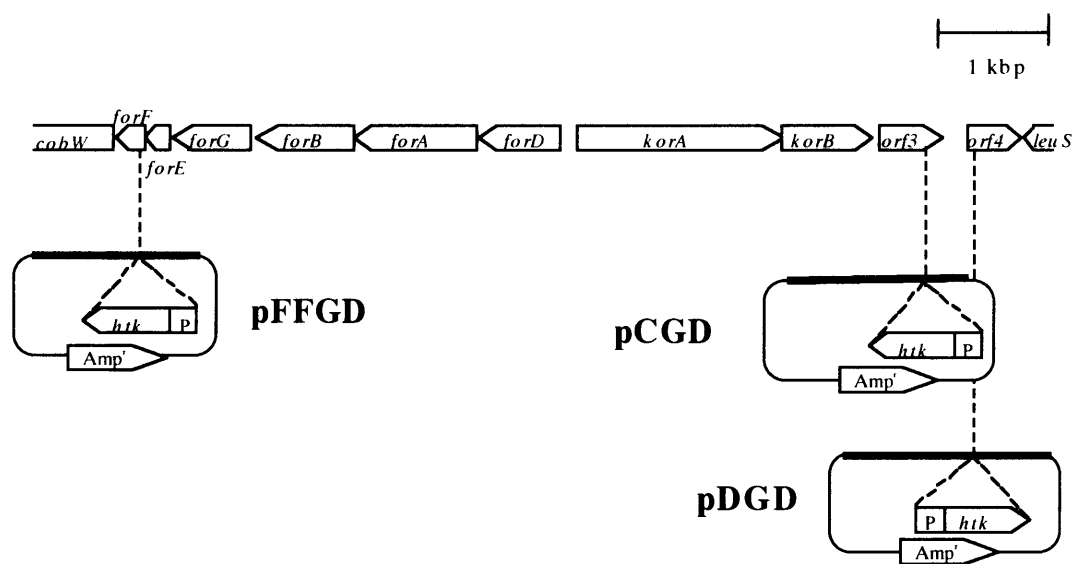
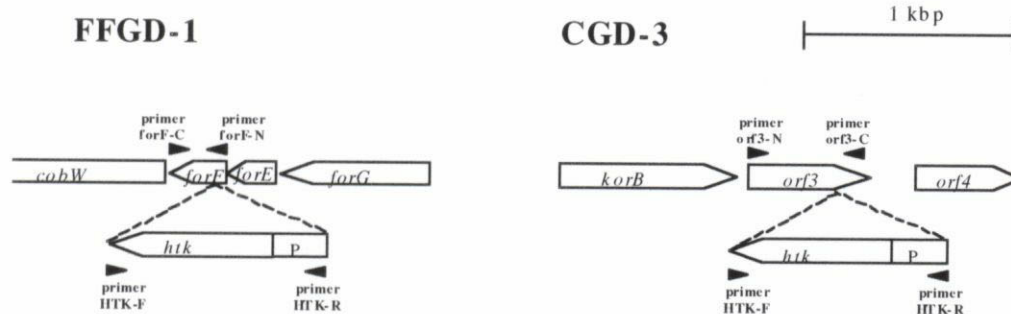


Fig. 4-4. Constructed plasmid DNAs, pFFGD, pCGD, and pDGD to disrupt the *forF*, *orf3*, and *orf4* gene, respectively. Thick line indicates homologous region. Thin line is derived from pUC19 or pT-vector easy. Dotted line indicates site where the *htk* gene was inserted in.

A



B

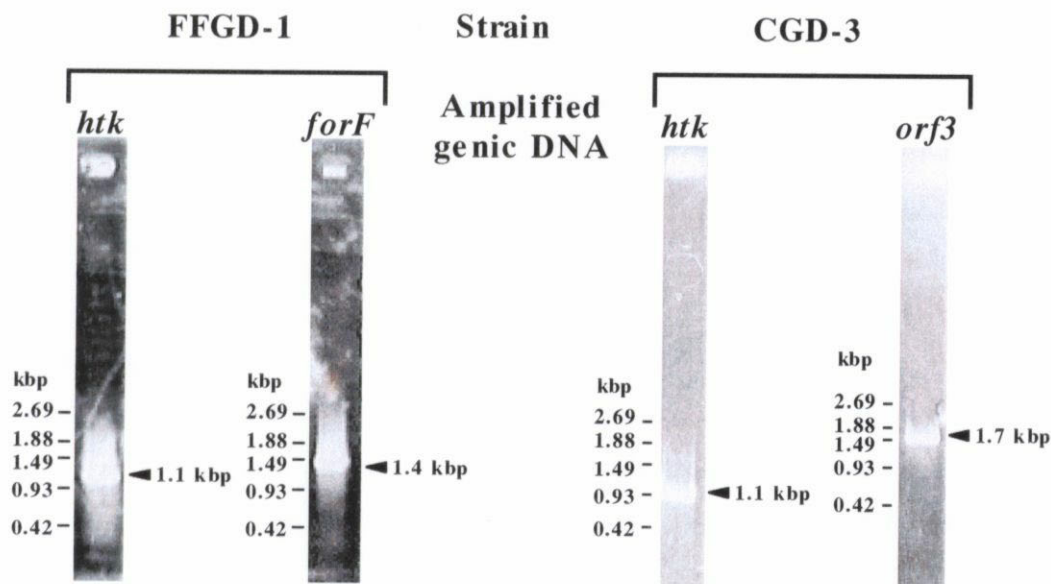


Fig. 4-5. Confirmation of gene disruptions of *H. thermophilus*. (A) Gene structures around the *forF* and *orf3* genes in strains FF GD-1 and CGD-3. Dotted line indicates site where *htk* gene was inserted in. Arrows indicate primers used for PCR. (B) Amplified genic DNA fragments (*htk*, *forF*, *orf3*) from genomic DNA of strain FF GD-1 and CGD-3 by PCR using HTK-F / HTK-R, forF-N / ForF-C, and orf3-N / orf3-C as primers.

各種蛋白質の発現解析

本研究で構築された遺伝子破壊株について、ForF、ORF3、ORF4 の発現をウェスタンブロットで解析した(Fig. 4-6 上段)。菌体はすべて好氣的に培養したものを用いた。ForF は *forF* 遺伝子破壊株である FFGD-1 株と FGD-6 株で発現していなかった。後者については第三章でも述べたが、上流の *forA* 遺伝子破壊による極性効果であると考えられる。TK-6 株、KGD-1 株、CGD-3 株においては ForF は発現していた。ORF3 は FFGD-1 株においてのみ発現が認められ、それ以外の株では野生株である TK-6 株であっても発現を認めることができなかった。ORF4 は全ての株で発現が観察された。

FFGD-1 株と CGD-3 株における OGOR の発現を観察した(Fig. 4-6 下段)。いずれの株においても、For と Kor の両方の発現が観察された。

変異株の生育曲線

FFGD-1 株と CGD-3 株について生育曲線を作製した(Fig. 4-7)。培養は酸素呼吸条件と、嫌氣的硝酸呼吸条件で行った。その結果、*forF* 遺伝子破壊は好気・嫌気の両条件において生育に影響を与えなかった。一方、*orf3* 遺伝子破壊は嫌氣的生育に影響を与えなかったが、好気条件下では生育速度の低下を招いた。

ForF 相同遺伝子のクローニング

話は少し変わるが、私がこの研究を開始した時、既に *H. thermophilus* TK-6 株の細胞からフェレドキシンが精製されており、N 末端アミノ酸配列も明らかにされていたが、遺伝子のクローニングはされていなかった[44]。OGOR の酵素反応測定に大量のフェレドキシンが必要なこともあって、この N 末端アミノ酸配列の情報をもとに TK-6 株のゲノム DNA からフェレドキシンをコードする遺伝子の取得を試みた。結論から述べると、目的の N 末端アミノ酸配列と一致するアミノ酸配列をコードする遺伝子が取得されたものの、全体の配列はフェレドキシンに特徴的な配列を一切示さなかった。この遺伝子はフェレドキシンと共精製された機能不明の蛋白質をコードしていて、過去に読まれた N 末端アミノ酸配列もこの機能不明の蛋白質のものであることが明らかとなった。このように事故的に取得された遺伝子であったが、興味深いことに、この遺伝子にコードされる蛋白質は ForF と高い相同性を示した(Fig. 4-8)。ForF 相同蛋白質(FFL, ForF-like protein)がフェレドキシンと共精製されたことに何か意味があるのかも知れないが、ForF の機能自体が未だ不明であるので、今のところ何も言えない。尚、本物のフェレドキシン遺伝子の取得は、その後、当研究室の池田氏と共に達成されたが、池田氏の修士論文に詳しいので、ここでは記述を割愛する[38]。

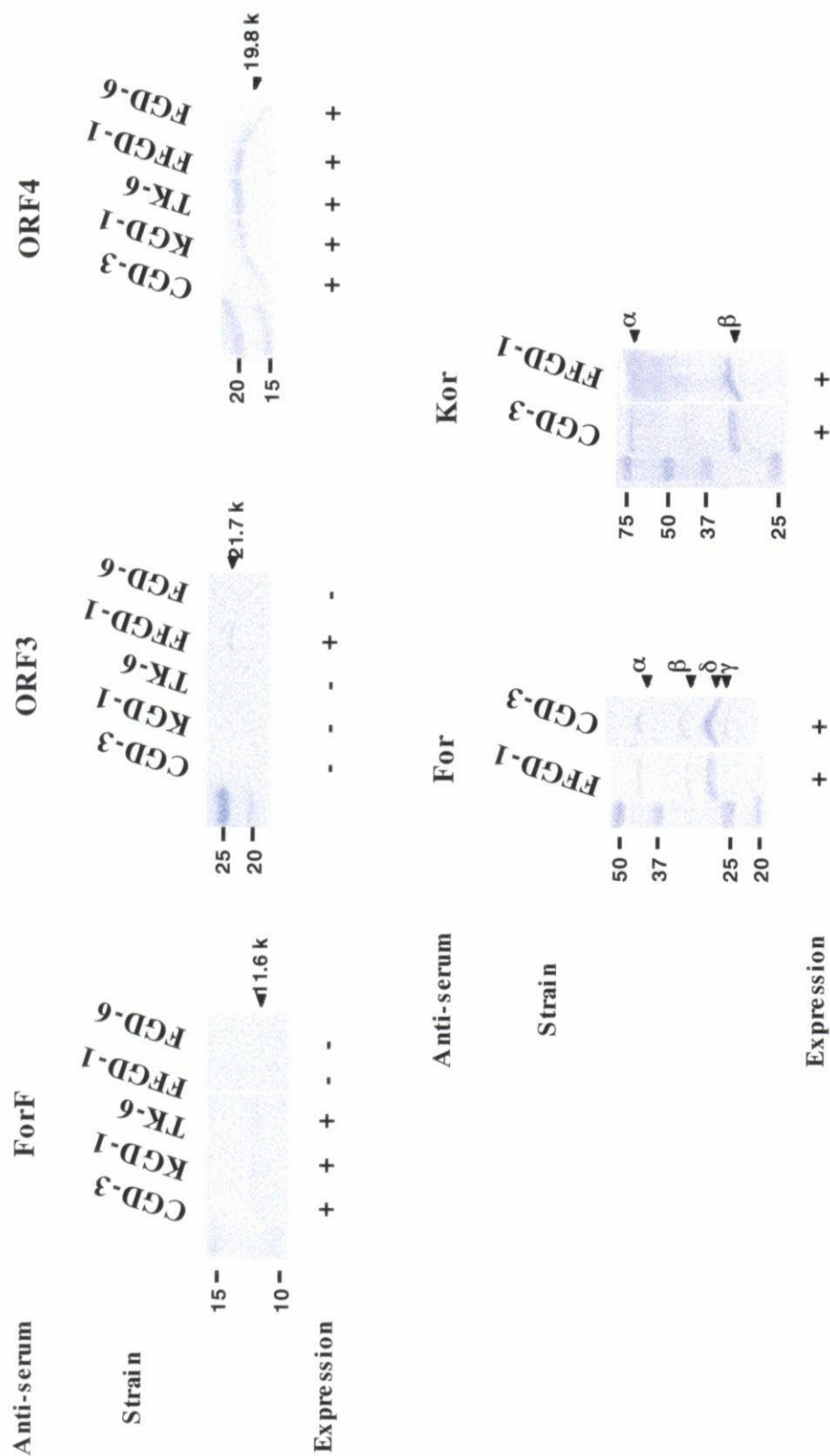


Fig. 4-6. Western blot analysis of proteins encoded in OGOR gene clusters in various mutant strains by Western blot analysis.

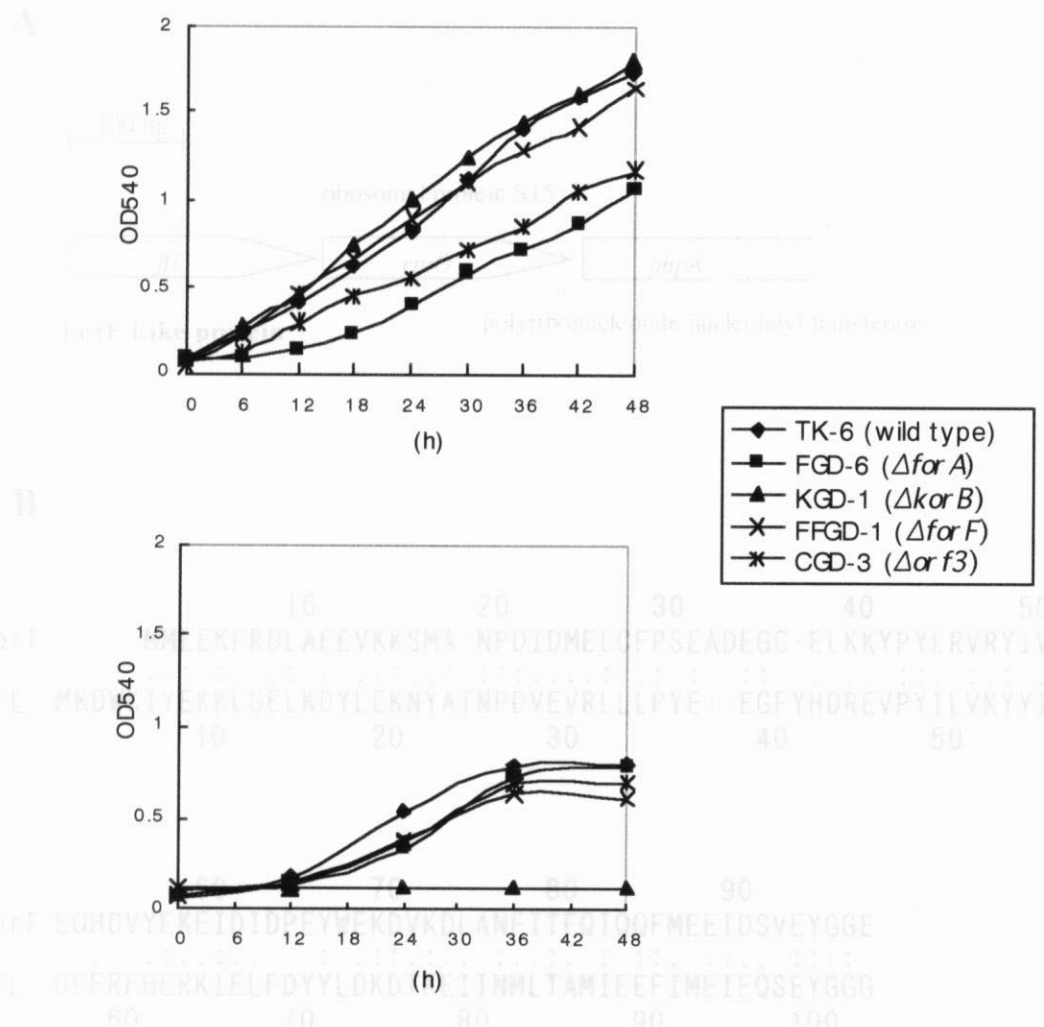
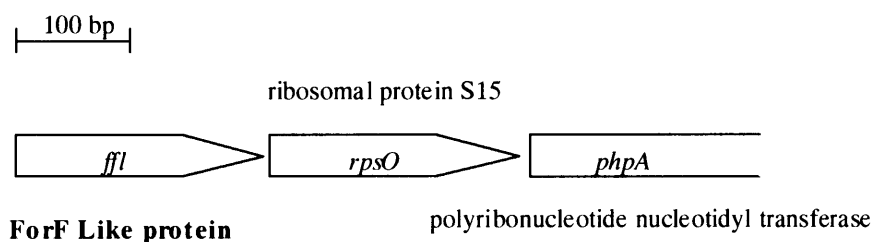


Fig. 4-7. Growth curves of strain FFGD-1, CGD-3, TK-6, FGD-6, and KGD-1 under the aerobic and anaerobic conditions. Upper: aerobic, lower: anaerobic condition; circle: TK-6, square: FGD-6, triangle: KGD-1, cross: FFGD-1, asterisk: CGD-3.

A



B

	10	20	30	40	50
ForF	MMEKFRDLAEEVKKSMA	-NPDIDMELCFPSEAD	EGC-ELKKYPYLRVRYIV		
FFL	MKDWKIYEKKLGELKDYLEKNYATNPDVEVRLLLPYE	-EGFYHREVPYILVKYYI			
	10	20	30	40	50

	60	70	80	90
ForF	EGHDVYEKEIDIDPEYWEKDVKDLANFITFQIQFMEEIDSVEYGGGE			
FFL	DEERFHERKIELFDYYLDKDTKEIINMLTAMIEEFIMEIEQSEYGGG			
	60	70	80	90

Fig. 4-8. (A) Location of the *ffl* gene encoding ForF like protein.
(B) Homology between ForF and FFL.

考察

今回、*orf3*、*orf4*、*forF* 遺伝子について、大腸菌組換え体として発現させた。*orf4* については 1 フレーム中に ATG トリプレットが二ヶ所存在したので、それぞれを開始コドンとする 2 種類の蛋白質を発現させた。その結果は、後方の ATG から翻訳を開始させた蛋白質のみが可溶性蛋白として発現され、熱にも安定であったので、これが本来の開始コドンであると予想された。これは妥当な結果である。というのは、その方がデータベース上で *orf4* と唯一相同性を示す遺伝子である *Synechocystis* sp.由来の *sl10741* gene とマッチするからである。しかしながら、前方の ATG と後方の ATG には 108 bp のひらきがあり、*orf3* と *orf4* の間は 198 bp も空くことになる。*korAB-orf3-orf4* が一本の mRNA として転写されるには不自然である。この *orf3* と *orf4* の間に *kor* 遺伝子クラストーとは逆向きの 192 bp から成る ORF を見い出すことができた。相同検索の結果、線虫類の *Caenorhabditis elegans* の推定上の W02D9.9 遺伝子と低い相同性を示しただけであった。なぜこのような遺伝子がここに位置しているのか、返って謎は深まった。

大腸菌から組換え ORF3、ORF4、ForF を精製することができた。機能不明の蛋白質を 280nm の紫外吸収のみで追跡しながら各々 1 回のカラムクロマトグラフィーのみで精製ができたのは、T7 プロモーターを使った大量発現、耐熱性であることを利用した熱処理による除蛋白、ヒスチジンタグを利用したアフィニティカラムの使用など、遺伝子組換えによる効果が絶大であったために思われる。精製が達成されたことは、その蛋白質の機能を探るための大きな最初の一步であるが、組換え蛋白質の機能が未知の場合、天然の状態を反映しているかを判断する術が無いのも事実である。

今回、精製された蛋白質について EPR を行ったが、常磁性の金属の存在は確認されなかった。ORF3 はシステインリッチなので亜鉛の結合の可能性も考えたが、原子吸光分析の結果、亜鉛を含まないことが判明した。

さらに、これら精製蛋白質を OGOR 活性測定に加えてみたが、有意の差は見られなかった。

機能が不明で OGOR との関連性も不明な状態であるため、試行錯誤の末にネガティブデータが蓄積されるのはむしろ自然なことかも知れないが、まずその蛋白質が天然の機能を維持した状態で精製されていることを知らなければ、そのネガティブデータを真実と断定できないのは実験者として辛いところである。

第三章で、*H. thermophilus* の遺伝子破壊法が構築されたので、*orf3*、*orf4*、*forF*

遺伝子の破壊を試みた。*orf3* 遺伝子破壊株 CGD-3 株と *forF* 遺伝子破壊株 FFGD-1 株は取得できたが、*orf4* 遺伝子破壊株は数度の試みにも関わらず取得できなかった。*orf4* 遺伝子が生育に必須であるという可能性もあるが、残念ながら、現時点での形質転換の成功率はあまり高くないため、そのように推測するのは尚早であると思う。今後、*orf4* 遺伝子破壊株の取得の努力は続けられるべきであろう。

得られた遺伝子破壊株において、OGOR 遺伝子クラスター群の発現を解析した。最も興味深かったのが、ORF3 の発現パターンである。ORF3 は野生株である TK-6 株で発現していない。唯一発現が認められたのが、*forF* 破壊株である FFGD-1 株においてである。ForF が *orf3* の発現抑制に関与しているのであろうか？ 現時点でそれを議論するには情報が少なすぎるが、今回の結果は For オペロンと Kor オペロンの下流遺伝子同士が相互関係を示した初めての例である。*forF* 遺伝子の極性効果がおこっていると推察された FGD-6 株においては ORF3 が発現していない。この株での *forF* の発現阻害は完全ではないのかも知れない。ORF3 が発現していないいずれの株においても ORF4 は発現していた。*orf4* 遺伝子は独自のプロモーターを有するのかも知れない。

今回の実験で使用した CFE は全て好気呼吸条件下で生育した細胞を用いている。比較として、嫌気呼吸条件下で生育させた菌体ではどのような発現パターンを示すかに興味を持たれる。本論文においてその結果を記載できなかったのは残念であるが、今後の課題として取りあげたい。

forF 遺伝子破壊と *orf3* 遺伝子破壊が酸素呼吸条件と嫌氣的硝酸呼吸条件下で生育に与える影響を調べた。その結果、*forF* 遺伝子破壊は好気・嫌気の両条件において生育に影響を与えなかった。一方、*orf3* 遺伝子破壊は好気条件下での生育速度の低下を招いた。ウェスタンブロット解析の結果は ORF3 は TK-6 株や KGD-1 株でも発現していなかった。にもかかわらず、CGD-3 株と生育速度に差が見られることから、TK-6 株や KGD-1 株ではごく微量の、しかし皆無では無い ORF3 が機能していることが推察された。

本章において OGOR オペロンにコードされる機能不明蛋白質の精製が成された。*in vitro* における各種の分析で新たに得られた知見は少ない。もとより「何か見つければ儲けもの」的な雲をつかむような分析であったので、何も見つからなくても仕方がないと考えるべきであろう。今後、その機能がもう少し絞られた時に改めて各種分析に手を伸ばすのが良いと思う。

精製蛋白質から抗体を作製し、蛋白質の発現解析が可能になったことの成果は大きかった。続く遺伝子破壊実験との相乗効果により、わずかではあるが機能解明のための手がかりが掴めた。今後、嫌気条件下での各種蛋白質の発現解析を行うなどして情

報を増やしていけばゴールも見えてこよう。二重変異株取得の方法の導入などに興味を持たれた。

総合討論 -展望も兼ねて-

本研究では、好熱好気性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の持つ二つの 2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase (OGOR)とその関連遺伝子についてその機能と特徴を探ることを目的としている。これにより、本菌の持つ絶対独立栄養性をはじめとした様々な独特の炭素・エネルギー代謝について、新しい知見を得られることを狙った。具体的な手段としては二つの 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。

まず、本研究の最初のステップとして二つの OGOR を精製することが後の研究に繋げるためにも必須の課題であった。特に、For に関しては、蛋白質よりも遺伝子が先に取得されたという経緯から、精製そのものにも意味があった。一般的に 2-oxoacid oxidoreductase (OR)ファミリーに属する酵素は酸素感受性なことが多く、精製には困難がつきまとうが、TK-6 株の OGOR は比較的容易に精製できたように思う。この OGOR 本来の酸素耐性の高さに加え、好熱菌由来の蛋白質にのみ許された熱処理を行うことで、精製過程の序盤で大部分の蛋白質を除去できたことがきわめて有効であった。

精製された For は新規のサブユニット構造を示した。本研究では掘り下げることができなかったが、構造の方面に研究を進めることも興味深い。For の構造について本論文で列挙した相補的な示唆の数々よりも、X 線結晶構造解析を解くほうがよほど確実でありインパクトも大きいであろう。今後の課題に取り上げられて良いと思う。

酵素学的な特徴付けの比較から For と Kor の生理的意義の解明を試みた。反応は、生体内でおこっている反応と逆反応である脱炭酸反応を指標に行われた。逆反応における特徴付けでもって生理的意義に迫れるかという指摘はあったものの確立された簡便な活性測定システムを通して得られるデータの蓄積は信頼に足るものである。実際、本実験で For と Kor の熱と酸素に対する安定性の相違が指摘され、その後の研究の方向性を決める大きなヒントを与えた。

対照的なのが炭酸固定活性測定である。本菌の炭素代謝の鍵酵素といううたい文句を持ち、その生理的意義を論ずるための格好的であるはずだが、これまでこの反応を *vitro* で再現することは困難であった。本研究にあつて、炭酸固定活性を測定するに至ったが、それでもようやく観測できたという感じであり、生体内での働きぶりを議論できるまでに、その姿を実験室で再現しているとは言い難い。システムのさらなる磨き上げが必要である。Fd の酸化還元を他の酵素とのカップリングで回転させるのは良い方法だが、そのパートナーとして POR にこだわる理由はあまり無い。細胞内での電子の流れを忠実にそれでいてシンプルに再現できそうな酵素の検索が遠回りのようで近道なのかも知れない。一思いにヒドロゲナーゼによる水素酸化から OR による炭酸固定反応までのエネルギーの流れを再現するくらいの計画を立てても良いと思う。

代謝の研究のアプローチには精製蛋白質を *vitro* で解析する方法と、*vivo* での物質の流れや発現制御を追跡する方法に大別できよう。本研究において、精製 OGOR から抗体を作製し蛋白質発現解析が可能にしたことと、さらに *H. thermophilus* の遺伝子破壊株を構築できたことは相乗効果をあげたと思う。OGOR が環境の違いにより発現制御を受けることを明確にし、その表現型への影響なども調べることができた。惜しむらくは、この発現制御を支配している因子にたどりつけていないことである。本菌の呼吸形態の多様性から考えても何らかの環境応答発現制御因子を持つことは間違い無い。しかしながらプロモーター領域に既知の結合モチーフは見出せないのだ。この発現制御機構を解明すれば新発見につながるかも知れない。

さらにひとつ惜しむことは、今回構築された遺伝子破壊法の完成度を高められなかったことである。ひとつのノックアウト変異株を取得するのに何度も試行しなければいけないのは、この手法を受け継ぐ研究者にとって歓迎されないだろう。しかし研究室の財産となる技術なのでさらに精度を上げられることを望みたい。

OGOR 遺伝子クラスターにコードされる機能不明の蛋白質群の機能を探るための実験を行った。おおよそ新たに得られた躍進的な知見は無く、機能不明なものの機能を探ることの大変さを知った。それでも遺伝子破壊によって他の遺伝子発現が誘導されたり、生育速度が遅くなるといった知見が得られたのは暗闇の中に一筋の光を見た思いであった。根拠の薄い夢物語になるが、これらの遺伝子が先に述べた環境応答と何らかの関わりを持っていたとすれば、話が大きく膨らむ。研究テーマの主題に据えるには現時点では危険だが、片手間に細々と実験が続けられたら良いと思う。

最後に、本研究の主題とは少し離れる。この *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株という菌は非常にユニークな菌である。研究を続けていて感じた印象として『欲張りな菌』というのがある。何でも複数持ちたがるからだ。私の研究主題であるが、OGOR を二つ持っている。類似の報告は無い。ヒドロゲナーゼを少なくとも 4 種持つ。しかも全て水素酸化タイプである。フェレドキシンの遺伝子も二つ並べて持っている。呼吸鎖は酸素呼吸、硝酸呼吸、鉄呼吸に対応している。近縁種である *Aquifex aeolicus* と比べても随分異なっている。そしてそれは圧倒的な生育速度と環境適応力の差となって現れている。これらのエネルギー代謝に関わる部品の多様性はお互いにシンクロしていると考えて間違い無いだろう。当研究室においてこれらに関する研究が別々のテーマとして進められているが、最終的にはつながってひとつに集約されていくと予想される。そして互いをつなげる鍵となるのが環境応答発現制御因子ではなかろうか。当研究室では *Pseudomonas aeruginosa* の嫌気応答代謝メカニズムについても精力的に研究が進められているが、*H. thermophilus* についてもこのレベルにまで議論を押し上げられると愉快であると思う。

参考文献

- [1] Pezacka E. and Wood E. G. Acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. Identification of the methyl-binding site of the CO dehydrogenase. *Biological Chemistry*. 263 (1988) 16000-16006.
- [2] Strauss G. and Fuchs G. Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. *European Journal of Biochemistry*. 215 (1993) 633-643.
- [3] Ishii M., Miyake T., Satoh T., Sugiyama H., Oshima Y., Kodama T. and Igarashi Y. Autotrophic carbon dioxide fixation in *Acidianus brierleyi*. *Archives of Microbiology*. 166 (1996) 368-371.
- [4] Schafer S., Paalme T., Vilu R. and Fuchs G. ¹³C-NMR study of acetate assimilation in *Thermoproteus neutrophilus*. *European Journal of Biochemistry*. 186 (1989) 695-700.
- [5] Shiba H., T. Kawasumi, Y. Igarashi, T. Kodama and Y. Minoda, The CO₂ assimilation via the reductive tricarboxylic acid cycle in an obligatory autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *Arch. Microbiol.* 141 (1985) 198-203.
- [6] Kawasumi T., Igarashi Y., Kodama T. and Minoda Y. Isolation of strictly thermophilic and obligately autotrophic hydrogen bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 1985-1986.
- [7] Kawasumi T., Igarashi Y., Kodama T. and Minoda Y. *Hydrogenobacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen oxidizing bacterium. *Int. J. System. Bacteriol.* 34 (1984) 5-10.
- [8] Pitulle C., Yang Y., Marchiani M., Moore E. R., Siefert J. L., Aragno M., Jurtshuk P. Jr., and Fox G. E. Phylogenetic position of the genus *Hydrogenobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 (1994) 620-626.
- [9] Adams M. W. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 degrees C. *Annual Review of Microbiology*. 47 (1993) 627-658.
- [10] Yoshino J., Sugiyama Y., Sakuda S., Kodama T., Nagasawa H., Ishii M. and Igarashi Y. Chemical structure of a novel aminophospholipid from *Hydrogenobacter thermophilus* strain TK-6. *Journal of Bacteriology*. 183 (2001) 6302-6304.
- [11] Suzuki M., Cui Z.-J., Ishii M. and Igarashi Y., Nitrate respiratory metabolism in an obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Arc. Microbiol.* 175 (2001) 75-78.

- [12] 吉田直樹 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の嫌気鉄呼吸による生育とその呼吸鎖に関する研究 東大院・農生科・応生工 修士論文 (2001)
- [13] Goto E., Kodama T. and Minoda Y. Isolation and culture conditions of thermophilic hydrogen bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 41 (1977) 685-690.
- [14] Nishihara H., Igarashi Y., and Kodama T. *Hydrogenovibrio marinus* gen. nov. sp. nov., a marine obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1991) 130-133.
- [15] Schonheit P., Moll J. and Thauer RK. Nickel, cobalt, and molybdenum requirement for growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Archives of Microbiology.* 123 (1979) 105-107
- [16] Ishii M., Takishita S., Iwasaki T., Peerapornpisal Y., Yoshino J., Kodama T. and Igarashi Y. Purification and characterization of membrane-bound hydrogenase from *Hydrogenobacter thermophilus* strain TK-6, an obligatory autotrophic, thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (2000) 492-502.
- [17] 上田康史 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の水素酸化機構に関する研究 東大院・農生科・応生工 博士論文 (2003)
- [18] Casalot L., De Luca G., Dermoun Z., Rousset M., and de Philip P. Evidence for a fourth hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans*. *Journal of Bacteriology.* 184 (2002) 853-856.
- [19] Silva PJ., van den Ban EC., Wassink H., Haaker H., de Castro B., Robb FT. and Hagen WR. Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry.* 267 (2000) 6541-6551.
- [20] Ishii M., Kawasumi T., Igarashi Y., Kodama T. and Minoda Y. 2-Methylthio-1,4-naphthoquinone, a unique sulfur-containing quinone from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *Journal of Bacteriology.* 169 (1987) 2380-2384.
- [21] Shiba H., T. Kawasumi, Y. Igarashi, T. Kodama and Y. Minoda, The deficient carbohydrate metabolic pathways and the incomplete tricarboxylic acid cycle in an obligatory autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 2341-2345.
- [22] Ishii M., Igarashi Y. and Kodama T. Purification and characterization of ATP:citrate lyase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Journal of Bacteriology.* 171(1989) 1788-1792.
- [23] Yoon K.-S., Ishii M., Kodama T. and Igarashi Y. Carboxylation reactions of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Biosci.*

Biotechnol. Biochem. 61 (1997) 510-513.

[24] Antranikian G., Herzberg C. and Gottschalk G. Characterization of ATP citrate lyase from *Chlorobium limicola*. Journal of Bacteriology. 152 (1982) 1284-1287.

[25] Adams M. W. W. Biochemical diversity among sulfur-dependent hyperthermophilic microorganisms. FEMS Microbial. Rev. 15 (1994) 261-277.

[26] Yun N.-R. *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の 2-oxoglutarate oxidoreductase 遺伝子群に関する研究 東大院・農生科・応生工 博士論文 (2001)

[27] Hawkins C. F., Borgess A. and Perham R. N. A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. FEBS Lett. 255 (1989) 77-82.

[28] Zhang Q., Iwasaki T., Wakagi T. and Oshima T. 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductase from the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. J. Biochem. 120 (1996) 587-599.

[29] Plaga W., Lottspeich F. and Oesterhelt D. Improved purification, crystalization and primary structure of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Halobacterium halobium*. Eur. J. Biochem. 205 (1992) 391-397.

[30] Yoon K.-S., Ishii M., Igarashi Y. and Kodama T. Purification and characterization of 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase from a thermophilic obligatory chemolithoautotrophic bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. J. Bacteriol. 178 (1996) 3365-3368.

[31] Yun N.-R., Arai H., Ishii M. and Igarashi Y. The genes for anabolic 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Biochem. Biophys. Res. Commun. 282 (2001) 589-594.

[32] Yun N.-R., Yamamoto M., Arai H., Ishii M. and Igarashi Y. A novel five-subunit-type 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductases from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Biochem. Biophys. Res. Commun. 292 (2002) 280-286.

[33] Yoon K.-S., Ishii M., Kodama T. and Igarashi Y. Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Arch. Microbial. 167 (1997) 275-279.

[34] Adams M. W. W. and Kletzin A. Oxidoreductase-type enzymes and redox proteins involved in fermentative metabolisms of hyperthermophilic archaea. Adv. Protein Chem. 48 (1996) 101-180.

[35] Beinert H. and Thomson A. J. Three-iron clusters in iron-sulfur proteins. Arch. Biochem. Biophys. 222 (1983) 333-361.

[36] Chabriere E., Charon M.-H., Volbeda A., Pieulle L., Hatchikian E. C. and Fontecilla-Camps

J.-C. Crystal structures of the key anaerobic enzyme pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, free and in complex with pyruvate. *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 182-190.

[37] Kerscher L. and Oesterhelt D. Purification and properties of two 2-Oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.* 116 (1981) 587-594.

[38] 池田丈 東大院・農生科・応生工 修士論文(2004)

[39] Deckert G., Warren P. V, Gaasterland T., Young W. G., Lenox A. L., Graham D. E., Overbeek R., Snead M. A., Keller M., Aujay M., Huber R., Feldman R. A., Short J. M., Olson G. J. and Swanson R. V. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392 (1998) 353-358.

[40] Lin W. C., Yang Y.-L. and Whitman W. B. The anabolic pyruvate oxidoreductase from *Methanococcus maripaludis*. *Arch. Microbiol.* 179 (2003) 444-456.

[41] Ishii M., Ueda Y., Yoon K.-S., Igarashi Y. and Kodama T. Purification and characterization of ferredoxin from *Hydrogenobacter thermophilus* strain TK-6. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (1996) 1513-1515.

[42] Hayashi N. R., Arai H., Kodama T. and Igarashi Y. The cbbQ genes, located downstream of the form I and form II RubisCO genes, affect the activity of both RubisCOs. *Biochem Biophys Res Commun.* 265 (1999) 177-83.

[43] Chuakrut S., Arai H., Ishii M. and Igarashi Y. Characterization of a bifunctional archaeal acyl coenzyme A carboxylase. *J Bacteriol.* 185 (2003) 938-947.

[44] Yoon K.-S. *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の還元的 TCA サイクルに関する研究 東大院・農生科・応生工 博士論文 (1996)

[45] Yoon K.-S., Bobst C., Hemann C. F., Hille R. and Tabita F. R. Spectroscopic and functional properties of novel 2[4Fe-4S] cluster-containing ferredoxins from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J Biol Chem.* 276 (2001) 44027-36.

[46] Carpenter C. E., Reddy D. S. and Cornforth D. P. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. *Appl Environ Microbiol.* 53 (1987) 549-52.

[47] Ishii M., Igarashi Y. and Kodama T. Colony formation of *Hydrogenobacter thermophilus* on a plate solidified with GELRITE. *Agric. Biol. Chem.* 11 (1987) 3139-3141.

[48] Zhu H., Qu F. and Zhu L. H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 5279-80.

[49] 森田進 東大院・農生科・応生工 修士論文 (1999)

- [50] J. R. Guest, Oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*, J. Gen. Microbiol. 138 (1992) 2253-2263.
- [51] 芝弘孝 絶対独立栄養性・高度好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の炭素代謝に関する研究 東大院・農生科・応生工 博士論文 (1985)
- [52] Sato T., Fukui T., Atomi H. and Imanaka T. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. J Bacteriol. 185 (2003) 210-20.
- [53] Kenneth M. N. and Madeline V. Recent advances in genetic analyses of hyperthermophilic Archea and Bacteria. 168 (1997) 73-80.
- [54] Londei P., Altamura S., Huber R., Stetter K. O. and Cammarano P. Ribosomes of the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* are uniquely insensitive to the miscoding-inducing action of aminoglycoside antibiotics. J Bacteriol. 170 (1988) 4353-60.
- [55] Hoseki J., Yano T., Koyama Y., Kuramitsu S. and Kagamiyama H. Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus*. J Biochem (Tokyo). 126 (1999) 951-6.
- [56] Cannio R., Contursi P., Rossi M. and Bartolucci S. Thermoadaptation of a mesophilic hygromycin B phosphotransferase by directed evolution in hyperthermophilic Archaea: selection of a stable genetic marker for DNA transfer into *Sulfolobus solfataricus*. Extremophiles. 5 (2001) 153-9.

関連論文

(1) 2001 年 1 月 Biochemical and Biophysical Research Communications

Vol. 292, pp. 280-286

"A Novel Five-Subunit-Type 2-Oxoglutarate:Ferredoxin Oxidoreductases from
Hydrogenobacter thermophilus TK-6"

(N.-R. Yun, M. Yamamoto, H. Arai, M. Ishii, Y. Igarashi)

(2) 2003 年 12 月 Biochemical and Biophysical Research Communications

Vol. 312, pp. 1297-1302

"Characterization of two different 2-Oxoglutarate:Ferredoxin Oxidoreductases from
Hydrogenobacter thermophilus TK-6"

(M. Yamamoto, H. Arai, M. Ishii, Y. Igarashi)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻応用微生物学研究室教授五十嵐泰夫先生に篤く感謝申し上げます。

当研究室助教授の石井正治先生には、御指導および研究の遂行に御協力いただき、とくに学内外の先生や実験機器業者との連絡をとる際には非常に迅速な御対応をいただき深く感謝いたします。また論文投稿時に御指導いただいたことに深く感謝いたします。

当研究室助手の新井博之先生には、筆者の至らない点をサポートしていただき、実験・執筆において細やかな御指導をいただいたことを深く感謝いたします。

また、日本医科大学生化学第一教室助手の岩崎俊雄先生には EPR 測定について御指導いただきましたことを深謝いたします。また、産業技術総合研究所・酵素開発研究グループの小山芳典先生には好熱性カナマイシン耐性遺伝子保有プラスミドを分与していただきましたことを深感いたします。

茨城大学の Yoon Ki-Sok 博士には OGOR の活性測定法について丁寧な御指導を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

当研究室の先輩、同輩、後輩の皆様方には、研究を遂行するにあたり常に温かい御指導をいただきましたことを深く御礼申し上げます。特に、実験において惜しみないサポートをいただいた Yun Na-Rae 博士と池田丈氏には深く感謝申し上げます。また、常に互いに討論し切磋琢磨しあえた同輩の中村浩平氏に感謝いたします。

最後に、大学院進学之机をを与えて下さり常に多方面で援助してくださった両親と、折に触れ励ましてくれた学内外の友人達に感謝します。

平成 16 年 1 月

山本 正浩

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。 α -, β -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℃、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 と比べて好氣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

ウエ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、遺伝子マーカー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-オリ

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。