（様式第９　別紙２：公開版）

養成技術者の研究・研修成果等

１．養成技術者氏名：　　青　島　美　穂

２．養成カリキュラム名：　水素細菌由来エネルギー変換デバイスによる効率的炭酸固定

３．養成カリキュラムの達成状況

カリキュラムの進捗は順調である。本カリキュラムにより、*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の炭酸固定メカニズムが解き明かされてきている。本カリキュラムにより、１）ＩＣＤＨによる炭酸固定反応は新規な炭酸固定因子ＣＦＩが関与するＡＴＰ依存的な反応であること、２）ＰＶＣがアナプレロティック炭酸固定酵素として機能していること、３）新規な２種類の酵素ＣＣＳ、ＣＣＬによる２段階反応によりクエン酸開裂反応が進行することが明らかになった。

４．成果（Ａ４版１～２枚程度）

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 株は、至適生育温度 70℃の好熱性水素細菌であり、二酸化炭素を唯一の炭素源として生育する独立栄養生物である。１６ＳｒＲＮＡ遺伝子配列の解析の結果、本菌は *Aquifex* 属と最も近縁な関係にあることが明らかになっており、真正細菌の中で極めて早い時期に分岐した種であることが推定されている。本菌を水素をエネルギー源、酸素を最終電子受容体として培養すると、極めて速く増殖し（μ max＝0.45, 1.5-2.0g dry weight cells/l/hr)、極めて高い最終菌密度が得られる (5g dry weight cells/l)。したがって、本菌は極めて高いエネルギー変換効率を得るための特別なメカニズムがあると考えられる。本菌は、還元的ＴＣＡ回路により炭酸固定を行っていることが示唆されている。還元的ＴＣＡ回路は、緑色硫黄細菌 *Chlorobium* で初めてその存在が報告された炭酸固定経路である。

昨年までの研究により、本菌の還元的ＴＣＡ回路は *Chlorobium* のものとはかなり異なるメカニズムで進行することが明らかになってきている。まず、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（ＩＣＤＨ）による炭酸固定反応は、新規な炭酸固定因子ＣＦＩが関与するＡＴＰ依存的な反応であり、ＣＦＩはピルビン酸カルボキシラーゼ（ＰＶＣ）ホモログであることが明らかになった。また、本菌は還元的ＴＣＡ回路の鍵酵素とされるＡＴＰシトレートリアーゼ（ＡＣＬ）をもたず、新規な２種類の酵素であるシトリルＣｏＡシンテターゼ（ＣＣＳ）とシトリルＣｏＡリアーゼ（ＣＣＬ）による２段階反応によりクエン酸開裂反応が進行することが明らかになった。本年度は、本菌の還元的ＴＣＡ回路の分子メカニズムの解析をさらに進め、以下に記載するような研究成果が得られた。

１）他種由来ＩＣＤＨの炭酸固定反応への炭酸固定デバイス添加効果

昨年度までの本研究により、*H. thermophilus* 由来ＩＣＤＨの炭酸固定反応には、炭酸固定デバイスＣＦＩが必須であることが明らかになった。そこで、この炭酸固定デバイスは、他種由来のＩＣＤＨにも有効であるか否かを調べた。その結果、大腸菌由来ＩＣＤＨの場合、ＣＦＩを加えなくても炭酸固定能が検出されたが、ＣＦＩの添加効果は見られなかった。また、超好熱性古細菌 *Caldococcus noboribetus* 由来ＩＣＤＨの場合、ＣＦＩを加えない場合の炭酸固定能は非常に微弱であったが、ＣＦＩの添加による促進効果は示された。

２）*Schizosaccharomyces pombe* を宿主としたＣＣＳ遺伝子およびＳＣＳ遺伝子の大量発現

現在までに、*H. thermophilus* 由来ＣＣＳ遺伝子、ＳＣＳ遺伝子の大腸菌内での大量発現には成功していない。そこで、分裂酵母を宿主とした発現系を試みた。しかし、分裂酵母を宿主とした発現系を用いても、ＣＣＳおよびＳＣＳ遺伝子の発現は困難であることが示された。

３）炭酸固定デバイス（ＣＦＩ）、ＰＶＣ、ＣＣＳ、ＳＣＳ、ＣＣＬのサブユット構造

これまでに *H. thermophilus* からさまざまな蛋白質を精製してきた。これらの蛋白質を構成する各々のサブユニットの分子量は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（あるいは遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列）により見積ることができる。しかし、それぞれの蛋白質がどのようなサブユニット構造をとっているのかはまだわかっていない。そこで、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いてそれぞれの蛋白質の「native の分子量」を測定し、その値からサブユニット構造を推定した。その結果、ＣＦＩは α８β８構造、ＰＶＣは α１２β１２構造、

ＣＣＳは α３β３構造、ＳＣＳは α２β２構造、ＣＣＬは α３構造をもつと推測された。

４）ＣＣＳとＳＣＳの諸性質と速度論的評価

H. thermophilus から精製したＣＣＳとＳＣＳについて、その酵素学的諸性質を調べた。ＣＣＳとＳＣＳは、ともに中性付近（ｐＨ６．５～８．５）で最大活性を示した。Ｍｇイオンはどちらの酵素活性にも必須であり、１０ｍM以上の濃度下で最大活性を示した。ＣＣＳのＡＴＰに対するＫｍ値は０．７７７ｍM、ＣｏＡに対するＫｍ値は０．３３５ｍM、クエン酸に対するＫｍ値は２．５３ｍM、Ｖｍａｘ値は３９．９Ｕ／ｍｇであった。ＳＣＳのＡＴＰに対するＫｍ値は２．０４ｍM、ＣｏＡに対するＫｍ値は０．０４８２ｍM、コハク酸に対するＫｍ値は０．６８４ｍM、Ｖｍａｘ値は７０．８Ｕ／ｍｇであった。ＣＣＳはクエン酸だけでなく、イソクエン酸やアコニット酸をも基質とすることができた。D,L―イソクエン酸を基質とした場合、Ｋｍ値は２．１２ｍM、Ｖｍａｘは４．４６Ｕ／ｍｇであった。cis―アコニット酸を基質とした場合、Ｋｍ値は２．２１ｍM、Ｖｍａｘは１．８２Ｕ／ｍｇであった。trans―アコニット酸を基質とした場合、０．７５２Ｕ／ｍｇ程度の最大活性が得られたが、ミカエリスメンテン型ではなくアロステリック型のＳ―Ｖ曲線が得られた。ＡＴＰの代わりにＧＴＰを用いた場合、ＣＣＳでは３．６％の活性しか示さなかったが、ＳＣＳでは６０％の活性が得られた。ＣＣＳとＳＣＳはどちらも非常に耐熱性が高く、８０℃で１０分間熱処理を行っても、活性の減少は見られなかった。

５）ＣＣＬの諸性質と速度論的評価

大腸菌から精製した組み換えＣＣＬについて、その酵素学的諸性質を調べた。ＣＣＬは中性～弱アルカリ性（ｐＨ７．０～９．５）で最大活性を示した。シトリルＣｏＡに対するＫｍ値はおおよそ０．０８２ｍM、Ｖｍａｘ値はおおよそ３９０Ｕ／ｍｇであった。ＣＣＬは弱いシトレートシンターゼ（ＣＳ）活性を示し、オキサロ酢酸に対するＫｍ値は０．１２５ｍM、アセチルＣｏＡに対するＫｍ値は０．０４９６ｍM、Ｖｍａｘ値は１．４２Ｕ／ｍｇであった。ＣＣＬは非常に耐熱性が高く、８０℃で１０分間熱処理を行っても、活性の減少は見られなかった。

６）還元的ＴＣＡ回路の方向性

上記のように、*H. thermophilus* のクエン酸開裂反応は２段階の酵素反応で進行し、第一段階の反応を触媒する酵素ＣＣＳの比活性は３０Ｕ／ｍｇ程度、第二段階の反応を触媒する酵素ＣＣＬの比活性は３００Ｕ／ｍｇ以上であった。既報のＡＣＬの比活性が０．５～５Ｕ／ｍｇ程度であることを考えると、本菌のクエン酸開裂機構は優れた性能をもち、還元的ＴＣＡ回路の方向性を決定づけていることが示された。

７）ＡＣＬとの進化関係

ＣＣＳとＣＣＬの推定アミノ酸配列をデータベースサーチにかけたところ、ＣＣＳの大サブユニットはＡＣＬの小サブユニットと相同性を示し、ＣＣＳの小サブユニットはＡＣＬの大サブユニットのＮ末領域と相同性を示し、ＣＣＬはＡＣＬの大サブユニットのＣ末領域と相同性を示すことが明らかになった。したがって、生物の進化の過程でＣＣＳとＣＣＬが融合することによりＡＣＬとなり、２段階で進行していたクエン酸開裂反応が１段階で進行するようになっていったと考えられる。つまり、ＣＣＳとＣＣＬはＡＣＬの祖先酵素であると考えられる。

８）ＣＳとの進化関係

ＣＣＬの推定アミノ酸配列をデータベースサーチにかけたところ、ＣＣＬはＣＳのＣ末領域と相同性を示すことが明らかになった。また、ＣＣＬが弱いＣＳ活性をもち、ＣＳが弱いＣＣＬ活性をもつ。したがって、ＣＣＬとＣＳは祖先を共通にする類似の酵素であると考えられる。

本カリキュラムは、*H. thermophilus* の効率的な炭酸固定メカニズムを解明し、それを産業に応用しようとするものである。本研究に成果により、ＩＣＤＨの炭酸固定反応を促進する新規な炭酸固定因子ＣＦＩが見出された。今後、ＩＣＤＨとＣＦＩによる炭酸固定リアクターを構築してその炭酸固定能を評価し、産業応用への可能性を探っていく予定である。また、本研究の成果により、新規な２種類の酵素ＣＣＳ、ＣＣＬが見出された。このうち、シトリルＣｏＡ合成酵素であるＣＣＳは、シトリルＣｏＡ製造酵素として産業利用できる可能性をもつ。

５．成果の対外的発表等

（１）論文発表（論文掲載済、または査読済を対象。）

Miho Aoshima, Masaharu Ishii, Akihiko Yamagishi, Tairo Oshima, and Yasuo Igarashi (2003) Metabolic characteristics of an isocitrate dehydrogenase defective derivative of *Escherichia coli* BL21(DE3). Biotechnol. Bioeng. 84, 732-737.

Miho Aoshima, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi (2004) A novel biotin protein required for reductive carboxylation of 2-oxoglutarate by isocitrate dehydrogenase in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Mol. Microbiol. 51, 791-798.

Miho Aoshima, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi (2004) A novel enzyme, citryl-CoA synthetase, catalyzing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Mol. Microbiol. in press.

Miho Aoshima, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi (2004) A novel enzyme, citryl-CoA lyase, catalyzing the second step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Mol. Microbiol. in press.

（２）口頭発表（発表済を対象。）

青島美穂、石井正治、五十嵐泰夫「*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 細胞中の主要なビオチン蛋白の構造と機能」平成１５年４月　日本農芸化学会２００３年度大会

青島美穂、石井正治、五十嵐泰夫「*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の新規なクエン酸開裂経路」平成１６年３月　日本農芸化学会２００４年度大会

（３）特許等の出願件数

１件