

# 目次

## 1. 主論文

好熱性嫌気性細菌 *Moorella* sp. HUC22-1 の代謝経路の解析、及び遺伝子導入系の開発

(Analysis of metabolic pathways of thermophilic anaerobic bacterium, *Moorella* sp. HUC22-1 and development of its genetic transformation system)

猪熊 健太郎

## 2. 公表論文

- (1) Characterization of enzymes involved in the ethanol production of *Moorella* sp. HUC22-1.

Kentaro Inokuma, Yutaka Nakashimada, Takuya Akahoshi, and Naomichi Nishio

Archives of Microbiology, 188: 37-45 (2007).

- (2) Degradation of glyoxylate and glycolate with ATP synthesis by a thermophilic anaerobic bacterium, *Moorella* sp. strain HUC22-1.

Shinsuke Sakai, Kentaro Inokuma, Yutaka Nakashimada, and Naomichi Nishio

Applied and Environmental Microbiology, 74: 1447-52 (2008).

## 3. 参考論文

- (1) Acetate and ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by *Moorella* sp. using a repeated batch culture.

Shinsuke Sakai, Yutaka Nakashimada, Kentaro Inokuma, Masayuki Kita, Hideki Okada, and Naomichi Nishio

Journal of Bioscience and Bioengineering, 99: 252-258 (2005).

# 主論文

# 主論文目次

主論文目次 .....	1
序論.....	5
1. リグノセルロース系バイオマスのガス化利用について .....	5
2. エタノールについて.....	5
3. 酢酸生産菌におけるエタノール生産.....	6
4. 好熱性嫌気性細菌を用いたガス基質からのエタノール生産.....	7
5. これまでの研究の経緯.....	7
6. 本研究の目的 .....	8
第1部 HUC22-1株のエタノール生成に関与する酵素の機能解析 .....	9
第1章 HUC22-1株ゲノム由来 acetaldehyde dehydrogenase 遺伝子、alcohol dehydrogenase 遺伝子のクローニングと配列決定.....	9
第1節 緒言.....	9
第2節 方法.....	12
1-2-1 基本培地、基質溶液の調製.....	12
1-2-2 バイアルビンをを用いた回分培養.....	14
1-2-3 HUC22-1株からのゲノムDNAの抽出.....	14
1-2-4 <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073株のゲノムデータベースからの <i>adh</i> 、 <i>aldh</i> ホモログの検索.....	15
1-2-5 HUC22-1株ゲノム由来の <i>adh</i> 、 <i>aldh</i> ホモログのクローニング及び配列決定.....	15
第3節 結果及び考察.....	17
1-3-1 <i>adh</i> 、 <i>aldh</i> ホモログの検索.....	17
1-3-2 HUC22-1株ゲノム由来の <i>adh</i> 、 <i>aldh</i> ホモログのクローニング及び配列決定.....	17
1-3-3 各遺伝子がコードするタンパクと既知のタンパク質とのアミノ酸配列の比較.....	17
第4節 要約.....	26
第2章 HUC22-1株由来 Adh、Aldh の酵素特性の解析.....	27
第1節 緒言.....	27
第2節 方法.....	28
2-2-1 <i>E. coli</i> 用大量発現ベクターへのサブクローニング.....	28
2-2-2 Adh、Aldh の大量発現と超音波破碎による抽出.....	30
2-2-3 His タグを付与した組換えタンパク質の精製.....	30
2-2-4 タンパク濃度の測定.....	31
2-2-5 SDS-PAGE による精製 Adh、Aldh の確認.....	31
2-2-6 精製 Adh、Aldh の酵素活性測定.....	32

2-2-7	酵素活性に及ぼす pH、温度の影響.....	34
2-2-8	精製 Adh の基質特異性の解析.....	34
2-2-9	精製 Adh、Aldh によるアセチル-CoA からのエタノール生産.....	34
第3節	結果及び考察.....	35
2-3-1	<i>E. coli</i> 用大量発現ベクターへのサブクローニング.....	35
2-3-2	Adh、Aldh の大量発現、抽出、精製、及び SDS-PAGE による確認.....	35
2-3-3	精製 Adh、Aldh の酵素活性測定.....	38
2-3-4	精製 Adh、Aldh の kinetic property.....	38
2-3-5	精製 Adh、Aldh の酵素活性の至適 pH の検討.....	41
2-3-6	精製 Adh、Aldh に対する温度の影響の検討.....	41
2-3-7	精製 Adh の基質特異性の解析.....	41
2-3-8	精製 Adh、Aldh によるアセチル-CoA からのエタノール生産.....	44
第4節	要約.....	45
第3章	HUC22-1 株における <i>adh</i> 、 <i>aldh</i> の発現レベルの解析.....	46
第1節	緒言.....	46
第2節	方法.....	46
3-2-1	HUC22-1 株のトータル RNA の抽出.....	46
3-2-2	逆転写反応による cDNA 合成.....	47
3-2-3	RTQ-PCR による遺伝子発現レベルの解析.....	47
第3節	結果及び考察.....	49
3-3-1	RTQ-PCR による遺伝子の発現レベルの解析.....	49
第4節	要約.....	50
第2部	各基質における代謝特性の解析.....	51
第4章	各基質における回分培養と、エネルギー代謝の比較.....	51
第1節	緒言.....	51
第2節	方法.....	51
4-2-1	各基質における回分培養.....	51
4-2-2	各基質、及び生産物の測定.....	51
4-2-3	乾菌体重量の測定.....	52
第3節	結果及び考察.....	52
4-3-1	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 培養とグリオキシル酸培養のエネルギー代謝の比較.....	52
4-3-2	HUC22-1 株におけるグリオキシル酸代謝経路.....	53
4-3-3	L-リンゴ酸を基質とした HUC22-1 株の培養.....	53
4-3-4	グリコール酸とシュウ酸を基質とした HUC22-1 株の培養.....	53
第4節	要約.....	56
第5章	HUC22-1 株のグリオキシル酸代謝経路の酵素的解析.....	57

第1節	緒言.....	57
第2節	方法.....	57
5-2-1	HUC22-1株の粗酵素液の抽出.....	57
5-2-2	Malyl-CoA lyaseの酵素活性測定.....	57
5-2-3	Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase系の酵素活性測定.....	58
5-2-4	Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase系(逆反応)の酵素活性測定.....	58
5-2-5	Malic enzymeの酵素活性測定.....	59
5-2-6	Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase/malic enzyme系の酵素活性測定.....	60
5-2-7	Pyruvate synthaseの酵素活性測定.....	60
5-2-8	Glyoxylate reductaseの酵素活性測定.....	61
5-2-9	Glycolate dehydrogenaseの酵素活性測定.....	61
第3節	結果及び考察.....	62
5-3-1	マリル-CoA経路に関わる酵素の活性の比較.....	62
5-3-2	マリル-CoA経路に関わる酵素をコードする遺伝子について.....	63
5-3-3	グリコール酸の代謝について.....	63
5-3-4	シュウ酸の代謝について.....	63
第4節	要約.....	65
第3部 HUC22-1株に対する遺伝子導入法の開発.....		66
第6章 プラスミドベクターを用いた遺伝子導入法の開発.....		66
第1節	緒言.....	66
第2節	方法.....	66
6-2-1	HUC22-1株からのプラスミド抽出.....	66
6-2-2	シャトルベクターpNAK2の構築.....	66
6-2-3	エレクトロポレーション法によるHUC22-1株への遺伝子導入.....	69
第3節	結果及び考察.....	69
6-3-1	HUC22-1株自身のプラスミドの有無の確認.....	69
6-3-2	シャトルベクターpNAK2を用いた遺伝子導入法の開発.....	69
6-3-3	シャトルベクターpIKM1を用いた遺伝子導入法の開発.....	70
第4節	要約.....	72
第7章 相同性組換えを用いた遺伝子導入法の開発.....		73
第1節	緒言.....	73
第2節	方法.....	75
7-2-1	<i>M. thermoacetica</i> ATCC 39073株のゲノムデータベースからのpyrE、pyrFの検索.....	75
7-2-2	HUC22-1株ゲノム由来のpyrE、pyrFのクローニング.....	75
7-2-3	pyrE破壊用プラスミドpGDPyrEの構築.....	75
7-2-4	pyrE破壊用プラスミドpGDPyrE2の構築.....	75
7-2-5	相同性組換えによるHUC22-1株ゲノム上のpyrEの破壊.....	80

7-2-6	PCRによる <i>pyrE</i> の破壊の確認.....	80
第3節	結果及び考察.....	82
7-3-1	HUC22-1株の5-FOAに対する耐性の確認.....	82
7-3-2	<i>M. thermoacetica</i> ATCC 39073株のゲノムデータベースからの <i>pyrE</i> 、 <i>pyrF</i> の検索.....	82
7-3-3	HUC22-1株由来 <i>pyrE</i> 、 <i>pyrF</i> のクローニング.....	82
7-3-4	pGDPyrEを用いた相同性組換えによる <i>pyrE</i> の破壊.....	82
7-3-5	pGDPyrE2を用いた相同性組換えによる <i>pyrE</i> の破壊.....	83
7-3-6	ウラシル要求性株の <i>pyrE</i> の破壊の確認.....	83
7-3-7	ウラシル生合成能の相補性試験について.....	86
7-3-8	遺伝子導入法の確立とエタノール高生産株の育種について.....	86
第4節	要約.....	87
総括.....		88
参考文献.....		90
謝辞.....		97

## 序論

### 1. リグノセルロース系バイオマスのガス化利用について

現在の化学工業は、その原料とエネルギー源の大部分を石油、天然ガス、石炭などの化石資源に依存しており、そこから大気中へ排出される二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) が地球温暖化の原因となっていることが指摘されている。このため、化石資源の消費を節減し、大気中の CO<sub>2</sub> 濃度の増大を抑制することが世界的に求められており、日本も京都議定書 ([http://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/treaty/treaty\\_020413.html](http://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/treaty/treaty_020413.html)) において、2008 年から 2012 年の間に温室効果ガスの排出量を 1990 年に比べて 6% 削減することが目標として義務付けられている。

現在世界では、化石資源に代わるクリーンで再生可能な天然資源としてバイオマスの利用が注目されている<sup>1)</sup>。その一例として、農作物廃棄物やおがくず、廃紙、木屑などのリグノセルロース系バイオマスの利用が試みられている。現在、リグノセルロース系バイオマスを有用物質に変換するプロセスは、大きく 2 つに分けられている。1 つは、糖化可能なバイオマス (セルロースやヘミセルロース) を酸加水分解や酵素的加水分解を用いて糖に変換し、得られた糖を微生物によって発酵して水素 (H<sub>2</sub>) や乳酸、エタノールなどの有用物質に変換するプロセスである。しかしながら、このプロセスには、加水分解に高いコストがかかることや、糖化が困難なバイオマス (リグニン) があるなどの問題がある。一方で、国内の生物廃棄物の約 8 割を占める糖化が難しいバイオマスは、もう 1 つのプロセスである、水素、メタン発酵等の微生物変換によるガス化、あるいは直接燃焼や熱化学的変換によるガス化が検討されている。このプロセスは、リグニンを含む総てのバイオマス成分に利用できると考えられる<sup>2-4)</sup>。回収された混合ガス[一酸化炭素 (CO)、CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>、以下、合成ガスと表記する]は、ボイラー燃料や燃料電池などへの利用が検討されているが、さらに、今後ガソリン添加物として爆発的な需要の拡大が見込まれているエタノール (後述) の原料として利用できれば、新規有用物質生産法として提案できる。そこで我々は、H<sub>2</sub> 及び CO<sub>2</sub> を原料とし、培養温度制御や雑菌汚染防止、及びエタノール回収を同時に行えるなどメリットの多い好熱性嫌気性細菌を用いたエタノール生産法の開発に着目した。

### 2. エタノールについて

エタノールは、溶剤、有機合成原料、消毒剤などとして多くの分野で利用されている。また、最近では石油価格高騰および地球温暖化に対する関心の高まりを背景に、エタノールの自動車燃料への混合が世界的に注目されている<sup>1)</sup>。バイオマスを原料とするエタノールをガソリンに添加することによって、ガソリンの消費量を削減でき、さらに、CO<sub>2</sub> 排出量の削減にも繋がると考えられる。

米国では、2005 年エネルギー政策法によって 2012 年までに生物資源由来の燃料の使用量を 75 億ガロン (約 2.9 億 kl) まで増やすことが定められたが、そのかなりの部分がトウモロコシなどのバイオマス由来のエタノールでまかなわれるとみられている。また、州レベルでみると、コネチカット州やミネソタ州ではエタノールを 10% 混合させた E10 燃料の販売が義務付けられている。

ブラジルでは、サトウキビ栽培が盛んでバイオマスエタノールが国内で供給できることから、1970 年代初の石油ショックの際にプロアルコール政策 (1975 年～) が策定され、エタノールをガソリン代替にすることが進められてきた。既にブラジルでは年間に販売される新車の半数以上がエタノール燃料に対応した車となっている。現在、ブラジルでのガソリンに対するエタノール混合義務は 20% となっている。

日本では、政府全体が「バイオマス・ニッポン総合戦略」に取り組んでおり、輸送用燃料におけるバイオマス由来燃料の普及を目指し、エタノールを3%混合させたE3燃料などの導入が推進されている。2010年度に原油換算で50万kl相当のバイオ燃料を輸送用燃料として導入する目標が立てられている。さらに、E3よりも高濃度のエタノール混入に対応するため、国土交通省では、E10対応の車両の安全・環境性能に関する技術指針の整備も進めている。これらのことから、今後日本でも、バイオマス由来エタノールの需要は、大幅な増加が見込まれている。

エタノールは、エチレンを原料とした化学合成法の他に、トウモロコシ、芋類、小麦、サトウキビ、果物や野菜の残さなどを原料とした発酵法でも生産されている。しかしながら、莫大な量のトウモロコシやサトウキビを生産できる米国やブラジルとは異なり、日本ではこれらを基質としたエタノール発酵には限界がある。また、これらを原料としたバイオマスエタノールの増産が農産物の価格高騰を招き、エタノールと食料との競合が生じているとの指摘がある。さらに、他の作物からバイオマスエタノールの原料作物に転作する生産者が増加すれば、転作によって供給が減少する作物（特に大豆）の価格が今後高騰する可能性も指摘されている。そのため、これら食用作物と競合しない原料からの新たなエタノール生産法が求められている。

### 3. 酢酸生産菌におけるエタノール生産

Acetogen と呼ばれる嫌気性酢酸生産菌（以降、酢酸生産菌）の一群は、 $H_2$ をエネルギー源（電子供与体）として $CO_2$ を固定し、主に酢酸を生産して生育することがきる。酢酸生産菌は通常、最終産物として酢酸のみを生産し、「ホモ酢酸菌」とも呼ばれる。しかしながら、ある種の中温性酢酸生産菌 *Clostridium ljungdahlii* strain PETC<sup>5)</sup>や *C. autoethanogenum*<sup>7)</sup>等においては、合成ガスからエタノールを生産することが報告されている。

一方で、好熱性酢酸生産菌におけるエタノール代謝についてはほとんど報告されていない。その中で、*Moorella thermoacetica*（以前の名称、*Clostridium thermoaceticum*）の一種は、硝酸( $NO_3^-$ )を電子受容体として用いた時に、エタノールを資化できることが報告されている<sup>8)</sup>。また、*M. thermoacetica*の休止菌体系や粗酵素液を用いた研究では、炭素の放射性同位体 $^{14}C$ を含むアセチル-CoA経路の中間体[5- $^{14}C$ ]methyltetrahydrofolateから $^{14}C$ を含むエタノールを生産することが報告されている<sup>9)</sup>。これらのことから、ある種の好熱性酢酸生産菌もまた、中温性酢酸生産菌と同様にエタノール生産経路を持っている可能性が示唆された。好熱性嫌気性菌をエタノールの発酵生産に用いることには、酵母や中温性酢酸生産菌を用いる場合に比べて以下のような利点がある<sup>10)~12)</sup>。

- 培養温度が高温（50～80℃）であるため減圧蒸留によるエタノールの回収が容易になる
- 好熱性菌の場合の加熱するコストの方が酵母などの場合の冷却するコストに比べて安い
- 培養温度が高温であるため、自然条件に左右されにくく安定したオペレーションが可能になる
- 培養が高温、無酸素の状態で行われるため、コンタミネーションの危険が非常に少ない

しかしながら、好熱性酢酸生産菌が増殖条件下においてエタノールを生産することを直接示す報告はなく、それに関わる酵素系などについての情報も全く分かっていなかった。

#### 4. 好熱性嫌気性細菌を用いたガス基質からのエタノール生産

前節までのことから、我々は、バイオマス由来の合成ガスを原料とした好熱性細菌によるエタノール生産に着目した(図1)。

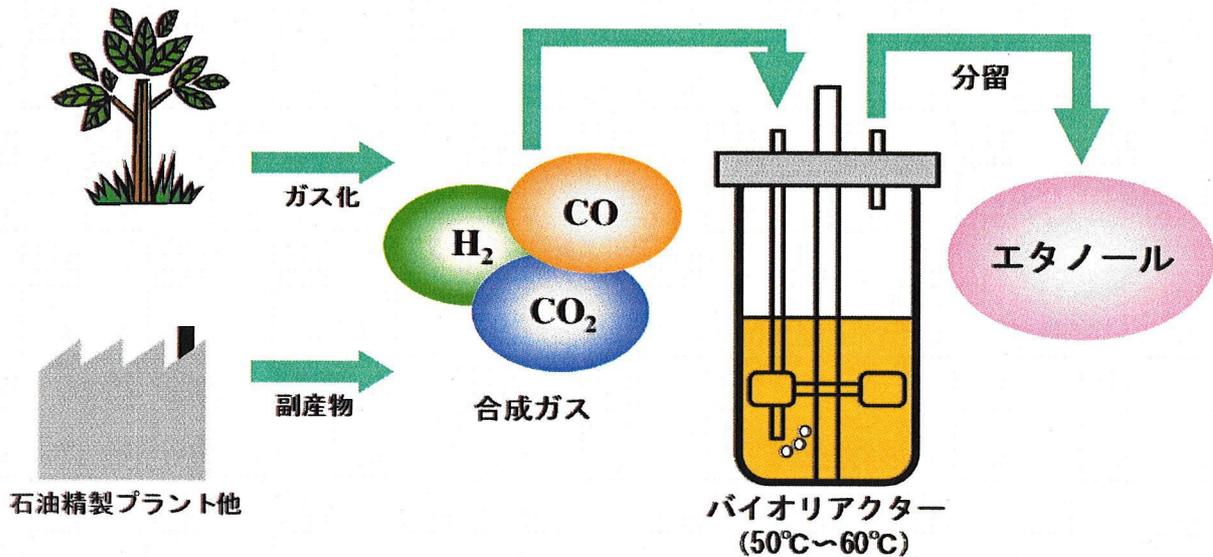


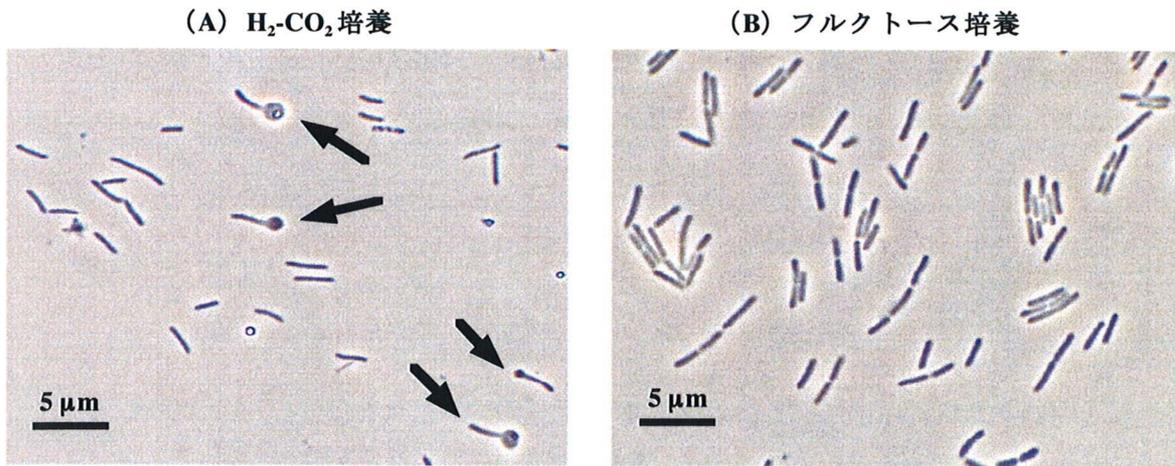
図1 好熱性細菌を用いたエタノール生産プロセス

この生産系には、バイオマス以外に様々なガス供給源が考えられる。特に $H_2$ については、石油(ナフサ接触改質)、石油化学(ナフサ分解、エチレンプラント)、製鉄(コークス炉)、ソーダ製造(電解)などで副生される $H_2$ <sup>13)</sup>を利用することが考えられる。

#### 5. これまでの研究の経緯

これまでに、我々は、様々な土壌サンプルから $H_2$ - $CO_2$ ガスをエタノールに変換できる好熱性嫌気性菌のスクリーニングを行い、その結果、吉本により新たに9株を単離することに成功した<sup>14)</sup>。そして、これらの菌株が、 $H_2$ - $CO_2$ ガスからエタノールを生産できることを初めて報告した。さらに、その中でもエタノール生産性が高く、 $H_2$ 、エタノール、酢酸に対する耐性のバランスが良好なHUC22-1株(図2)を選択し、 $H_2$ - $CO_2$ ガスからのエタノール及び酢酸生産への応用を目的とした基礎研究が酒井により行われた<sup>15)</sup>。

HUC22-1株の16S rRNA遺伝子の解析を行ったところ、この菌はグラム陽性菌 *Moorella* sp.であることが分かった。しかしながら既存菌(*M.thermoacetica* 及び *M.thermohydrosulfurica*)とは生産物や基質資化性が異なること、及びそのエタノール生産能から、*M.thermoacetica* の中でも特異な種であることが推察された。また、本菌は45~65°C、pH 4.5~7.5で生育可能であり、55~60°C、pH 5.7~6.7で最も高い増殖を示すことが分かった<sup>16)</sup>。 $H_2$ - $CO_2$ を基質とした典型的な回分培養では、156時間培養で56.7 mMの酢酸と1.5 mMのエタノールを生産した。さらに、pH 5.8一定制御の条件で反復回分培養を行ったところ、合計エタノール生産量は15.4 mmol (l-reactor)<sup>-1</sup>まで上昇した<sup>17)</sup>。一方、フルクトースを基質とした培養では、エタノール生産はほとんど確認されず、 $H_2$ - $CO_2$ 培養との違いが見られた。また、化学変異剤 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) による変異処理を用い、エタノール高生産株の作製を試みたが、継代後もエタノール高生産を維持する株は得られなかった。



※矢印は孢子形成菌体

図 2 *Moorella* sp. HUC22-1 株の位相差顕微鏡写真

## 6. 本研究の目的

これまでの研究から、単離された HUC22-1 株の基本的な特徴と、エタノール生産性についての情報は得られた。しかしながら、エタノール生産経路を含め、本菌がどのような代謝経路を持つのかについてはほとんど情報が得られていなかった。また、本菌のエタノール生産性は低く、実用化するには何らかの方法でエタノール生産性を向上させる必要があった。そこで、本研究では、本菌の H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> からのエタノール生産への応用を目的とし、代謝経路のさらなる解析を行った。また、エタノール高生産株の分子生物学的育種に必要な遺伝子導入法の開発にも取り組んだ。

第 1 部では、本菌のエタノール生産に関わると予想される酵素をコードしていると思われる遺伝子の本菌ゲノムよりクローニングし、既知の酵素のアミノ酸配列と比較した。また、各酵素を *E. coli* でそれぞれ大量発現させ、精製し、得られた精製酵素の特性解析を行った。さらに、Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) による各遺伝子の発現レベルの解析を行った。

第 2 部では、本菌の様々な基質における代謝特性の解析を行った。また、各基質で培養した本菌の菌体から粗酵素液を抽出し、ATP 生成を伴うグリオキシル酸代謝経路であるマリル-CoA 経路に関わる酵素の活性測定を行い、その活性を比較した。

第 3 部では、既存のシャトルベクター、または相同性組換えを用いて、本菌のエタノール高生産株の分子生物学的育種に必要な遺伝子導入法の開発を行った。

# 第 1 部 HUC22-1 株のエタノール生成に関与する酵素の機能解析

## 第 1 章 HUC22-1 株ゲノム由来 acetaldehyde dehydrogenase 遺伝子、alcohol dehydrogenase 遺伝子のクローニングと配列決定

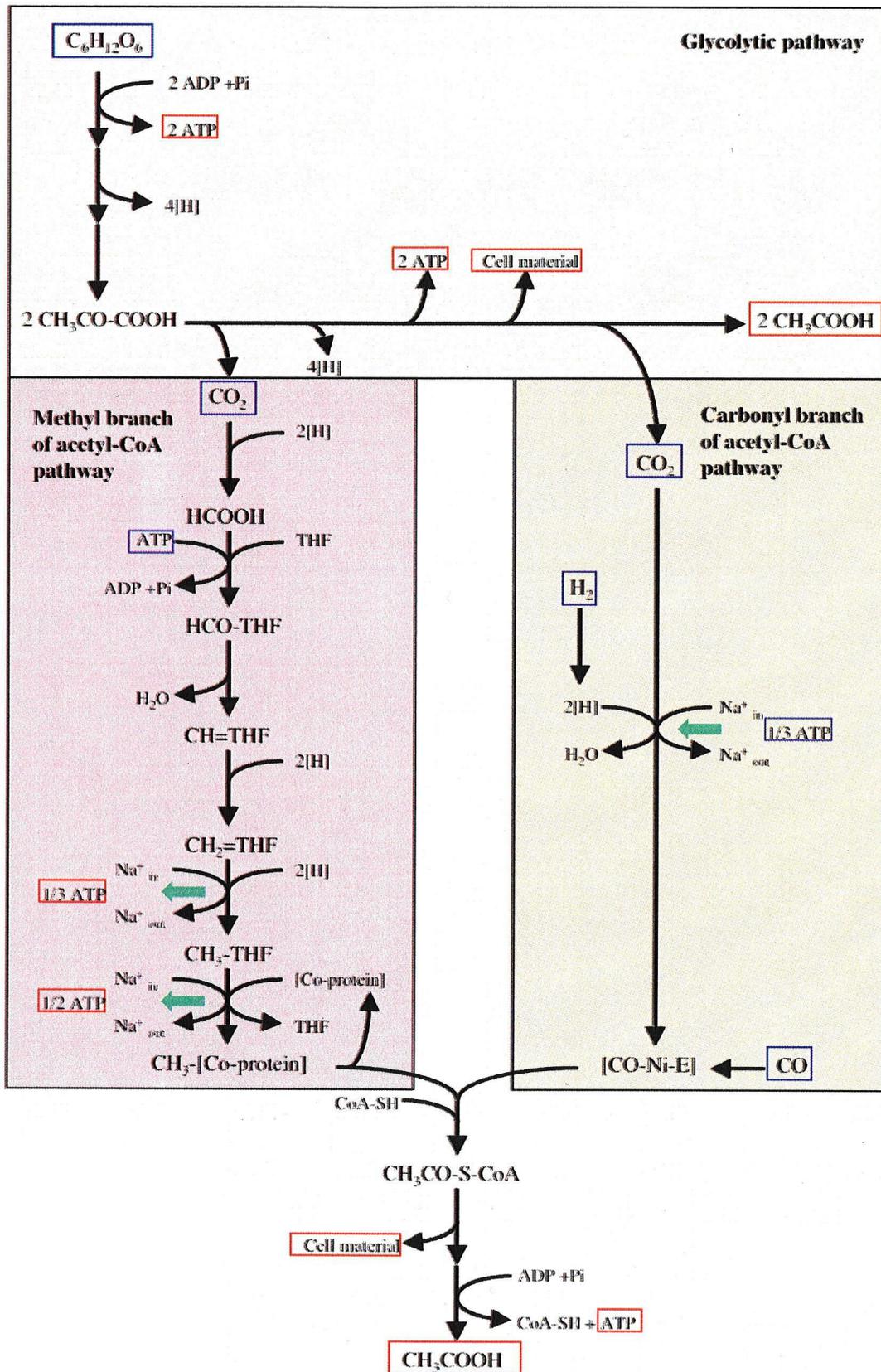
### 第 1 節 緒言

当研究室で単離された好熱性嫌気性細菌 *Moorella* sp. HUC22-1 は、 $H_2$ - $CO_2$  ガスを基質として酢酸と微量のエタノールを生産する。しかしながら、好熱性嫌気性細菌が増殖条件下で合成ガスを基質としてエタノールを生産したという報告は他に無く、どのような代謝経路で  $H_2$ - $CO_2$  ガスからエタノールを生産するのかについては全く不明である。

酢酸生産菌の  $H_2$ - $CO_2$  の代謝経路は Harland G. Wood と Lars G. Ljungdahl によって詳細に研究され、アセチル-CoA 経路 (Wood-Ljungdahl pathway 図 3) と呼ばれている<sup>18)~20)</sup>。4 mol の  $H_2$  と 2 mol の  $CO_2$  はこのアセチル-CoA 経路に入り、1 mol の酢酸を生産するとともに 1 mol の ATP を生産するが、methyl branch で 1 mol の ATP が消費されるため、ATP 生産は 0 mol になる。しかしながら、図 3 の緑の矢印で示した 3 つの反応がナトリウムポンプによる膜を介した ATP 生産と連動していると考えられており、それぞれ 1/3 mol の ATP 生産、1/2 mol の ATP 生産、1/3 mol の ATP 消費となるため、最終的にアセチル-CoA 経路では 1 mol の酢酸を生産する際に 1/2 mol の ATP が生産されることが考えられている<sup>7)</sup>。

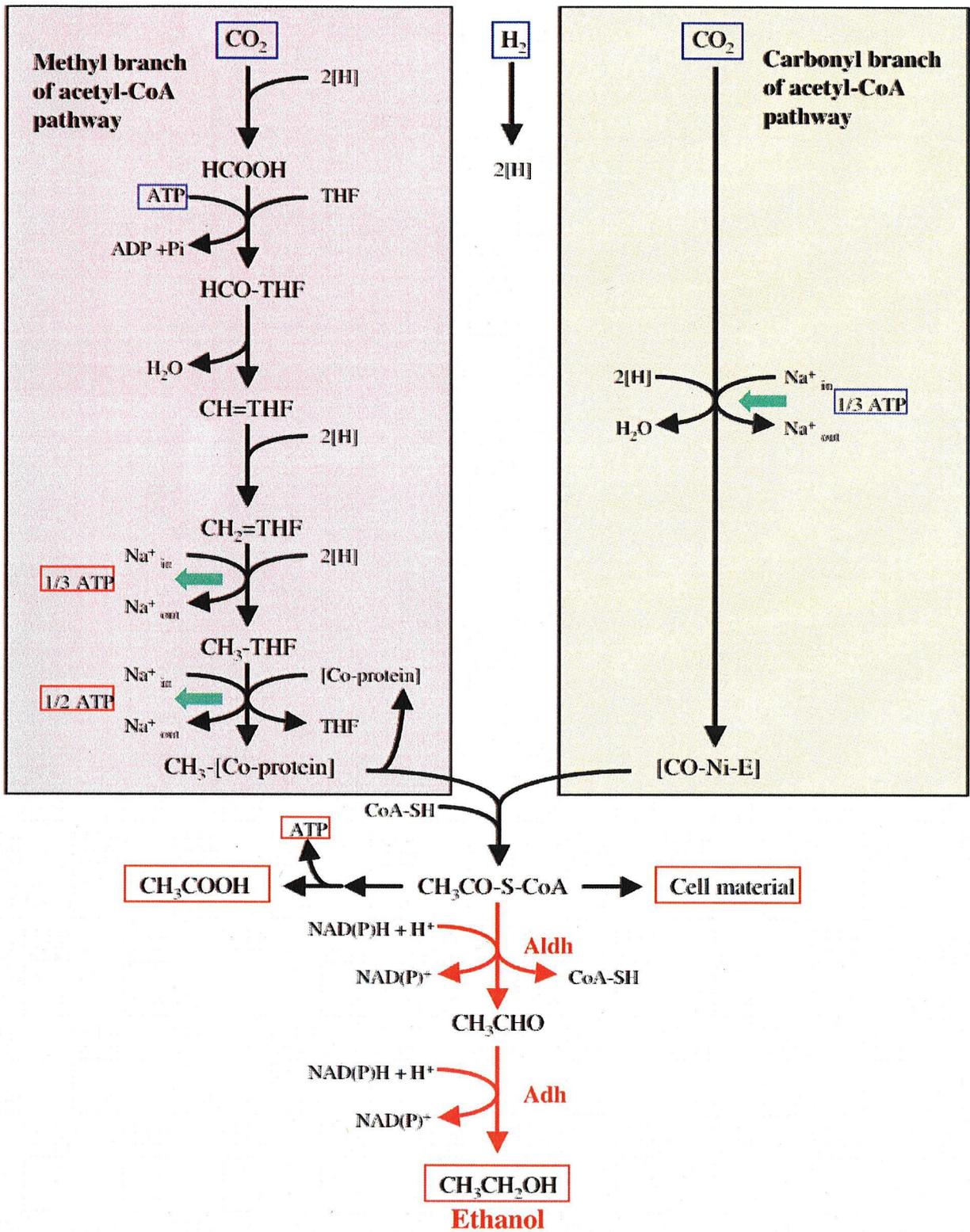
酒井らによる HUC22-1 株の粗酵素抽出液を用いた研究では、NAD(P)H を還元力としてアセチル-CoA をアセトアルデヒドに変換する酵素 acetaldehyde dehydrogenase (Aldh) と、NAD(P)H を還元力としてアセトアルデヒドをエタノールに変換する酵素 alcohol dehydrogenase (Adh) の活性が、エタノールを生産しないフルクトース培養時の菌体より、エタノールを生産する  $H_2$ - $CO_2$  培養時の菌体のほうが高いことが示されている<sup>16)</sup>。これらのことから、我々は、図 4 に示すような、HUC22-1 株におけるアセチル-CoA 経路を介した  $H_2$ - $CO_2$  からのエタノール生産経路を提案した。

そこで本章では、まず HUC22-1 株ゲノムから上記の Aldh 及び Adh をコードする候補遺伝子を検索、クローニングし、その配列を決定し、既知の Aldh、Adh との比較を行った。



※THF: tetrahydrofolate, [Co-protein]: corrinoid protein

図3 嫌気性酢酸生産菌における代謝経路図



※THF: tetrahydrofolate, [Co-protein]: corrinoid protein,  
 Aldh: acetaldehyde dehydrogenase, Adh: alcohol dehydrogenase

図4 HUC22-1株における  $H_2$ - $CO_2$ からの予想エタノール生産経路

## 第2節 方法

### 1-2-1 基本培地、基質溶液の調製

本研究では、*C. ljungdahlii* の培養に用いられる ATCC 1754 PETC medium (<http://www.atcc.org>) を改変したものを基本培地として用いた。改変として、cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O の最終濃度を 0.3 g l<sup>-1</sup> に減らし、Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O を除いた。培地作製は、reducing agent (cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O, 30 g l<sup>-1</sup>) と基質 (フルクトース等) を別に調製した。嫌氣的に培地を調製する方法として、Hungate の方法<sup>21)</sup> を改変した Miller らの方法<sup>22)</sup> を用いた。各成分の組成と調製手順を以下に示す。

#### Moorella sp. HUC22-1 用基本培地 (l<sup>-1</sup>) (ATCC medium 1754 PETC medium 改変)

NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
KCl	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20.0 mg
Yeast extract	1.0 g (オリエンタル酵母工業)
Trace Elements	10.0 ml
Wolfe's Vitamin Solution	10.0 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2.0 g

HCl で pH 6.9 に調整

MilliQ water で 900 ml にフィルアップ

Resazurin 1 mg

20 min ボイルして脱気。培地が青から赤に変色したら脱気完了

CO<sub>2</sub> を注入しながら氷中で 20 分間冷却

予め CO<sub>2</sub> を注入しておいた 125 ml バイアル瓶に 18 ml ずつ分注

※ロールチューブにする場合はここでバイアル瓶一本につき 0.4 g の高温培養用寒天 (ナカライテスク) を添加

さらに 3 min CO<sub>2</sub> を注入した後、ブチルゴム栓とアルミシールで密閉

オートクレーブ (121°C 15 分間)

菌体接種直前に以下の溶液を添加

※以下はバイアル瓶一本 (培地 18 ml) につき加える量

Fructose solution 1 ml

Reducing agent 0.2 ml

※培地が高い場合には Ti (III) citrate solution を 1、2 滴添加

※H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> で培養する場合には、Fructose solution を添加せず、代わりに菌体植菌後 H<sub>2</sub> -CO<sub>2</sub> [80:20 (v/v)] の混合ガスをゲージ圧 0.15 MPa になるようにヘッドスペースに充填

### Trace elements (l<sup>-1</sup>)

Nitrilotriacetic acid	2.0 g
Nitrilotriacetic acid を溶解させた後、KOH で pH 6.0 に調整	
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.0 g
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0.8 g
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0.2 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.2 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	20.0 mg
NiCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	20.0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	20.0 mg
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	20.0 mg
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	20.0 mg
MilliQ water で 1 l にフィルアップ	
遮光し 4°C に保存	

### Wolfe's vitamin solution (l<sup>-1</sup>)

Biotin	2.0 mg
Folic acid	2.0 mg
Pyridoxine hydrochloride	10.0 mg
Thiamine·HCl	5.0 mg
Riboflavin	5.0 mg
Nicotinic acid	5.0 mg
Calcium D-(+)-pantothenate	5.0 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.1 mg
p-Aminobenzoic acid	5.0 mg
Thioctic acid	5.0 mg
MilliQ water で 1 l にフィルアップ	
遮光し 4°C に保存	

### Fructose solution

MilliQ water 100 ml  
20 分間ボイルして脱気  
N<sub>2</sub> を注入しつつ氷中で室温まで冷却  
Fructose 10 g  
N<sub>2</sub> を注入しつつさらに氷中で 20 分間冷却  
0.45 μm フィルターで濾過滅菌しつつ、N<sub>2</sub> を注入した滅菌済みバイアル瓶に注入

### Reducing agent

MilliQ water 100 ml

20 分間ボイルして脱気

N<sub>2</sub> を注入しつつ水中で室温まで冷却

L-Cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O 3.0 g

N<sub>2</sub> を注入しつつさらに水中で 20 分間冷却

0.45 μm フィルターで濾過滅菌しつつ、N<sub>2</sub> を注入した滅菌済みバイアル瓶に注入

遮光し保存

### Ti (III) citrate solution

Sodium citrate·2H<sub>2</sub>O 11.764 g

MilliQ water で 200 ml にフィルアップ

20 分間ボイルして脱気

N<sub>2</sub> を注入しながら水中で 20 分間冷却

N<sub>2</sub> ガス下で、8.5 % Titanium (III) chloride 水溶液 25 ml (シグマアルドリッチ) を混合

N<sub>2</sub> ガス下で、湯煎で沈殿を溶解させた飽和炭酸ナトリウム水溶液で pH 6.0 に調整

予め N<sub>2</sub> を注入しておいた 65 ml バイアル瓶に 30 ml ずつ分注

さらに 3 分間 N<sub>2</sub> を注入した後、ブチルゴム栓とアルミキャップで密閉

オートクレーブ (121°C 15 分間)

遮光し保存

### 1-2-2 バイアルビンを用いた回分培養

この章では用いないが、後述の章で用いる H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> を基質とした回分培養の方法についてもここで述べる。

フルクトースを基質とした回分培養は、1-2-1 で述べた調製法に従って調製した培地に、前培養液を 5% (v/v) 濃度で植菌し、55°C のインキュベーターで静置培養を行った。バイアル瓶への基質の添加や植菌には 22 G×1.1/4 の注射針 (ニプロ) を取り付けたプラスチック注射器 (テルモ) を用いてクリーンベンチ内で嫌氣的に行った。注射針を刺すブチルゴム栓の部分は、アルコールを吹き付け、ガスバーナーであぶって滅菌した。

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> を基質とした回分培養では、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> ガスを充填する前に、フルクトースを基質として対数増殖期まで増殖させた前培養液を 5% (v/v) 濃度で植菌した。その後、0.45 μm の mixed cellulose ester hydrophilic filter (Dismic<sup>®</sup>-25AS, Advantec<sup>®</sup>, 東洋濾紙) を通して滅菌した H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> [80:20 (v/v)] の混合ガスでバイアル瓶のヘッドスペースを 2 分間置換し、ゲージ圧 0.15 MPa になるようにさらに 2 分間混合ガスを充填した。その後、55°C のシェーカーで 160 rpm で振とう培養を行った。なお、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養から H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養への植え継ぎも、前培養液を 5% (v/v) 濃度で植菌した。

### 1-2-3 HUC22-1 株からのゲノム DNA の抽出

グラム陽性菌である本菌からのゲノム DNA の抽出には、Marmur 法<sup>23)</sup>を改変した以下の方法を用いた。フルクトースを基質として定常期まで培養した培養液 20 ml を 3,000 rpm、15 分間遠心して集菌し、

上清を除去した。得られた菌体に 1.5 ml の TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA-2Na) と 5 mg のリゾチーム (粉末) を加えて懸濁し、37°C で 30 分間ゆっくりと振とうした。その後、2.5 ml の溶菌液 [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20 mM EDTA-2Na, 2% SDS, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Proteinase K] を加えて混合させ、55°C で 60 分間静置し、菌体を溶解させた。菌体溶解液に 1.25 ml のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) 混液を加えて室温で 10 分間振とうして完全に混合させたのち、11,000 rpm、5 分間遠心して 3 層に分離し、上層を新しいチューブに移した。この操作を計 2 回繰り返してタンパクを除去した。得られた溶液量の 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2) と 2.5 倍量のエタノールを加えて静かに混合させ、室温で 10 分間静置したのち、11,000 rpm、15 分間遠心して上清を除去し、DNA を沈殿させた。その後、75%エタノールを 5 ml 加えて 11,000 rpm、5 分間遠心して上清を除去し、DNA をリンスした。最後に、11,000 rpm、30 秒間遠心して余分なエタノールを完全に除去し、200  $\mu\text{l}$  の dH<sub>2</sub>O に溶解させ、-20°C に保存した。得られたゲノム DNA は、dH<sub>2</sub>O で 10 倍に希釈し、分光光度計 (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) の DNA 定量モードで濃度と純度を確認した。

#### 1-2-4 *Moorella thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースからの *adh*、*aldh* ホモログの検索

HUC22-1 株のゲノム DNA の配列は未だ解析されていない。一方で、本菌の近縁種である *Moorella thermoacetica* ATCC 39073 株は、そのゲノムデータベースが Genbank に登録されている (Accession number: CP000232)。そこで、National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の BLAST 検索を用い、このデータベースから *adh*、*aldh* のホモログの検索を行った。

#### 1-2-5 HUC22-1 株ゲノム由来の *adh*、*aldh* ホモログのクローニング及び配列決定

1-2-3 で得られた HUC22-1 株のゲノム DNA を鋳型に、Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version, Takara Bio) と PCR 装置 (PC808, ASTEC) を用いて PCR を行い、1-2-4 で見つかった各ホモログを増幅した。PCR 反応液組成と反応条件を表 1-1 に、各ホモログに対して用いたプライマーの配列を表 1-2 に示す。反応終了後、各 PCR 産物を 0.7%アガロースゲル電気泳動 (Agarose S, Takara Bio) で確認した後、pGEM®-T Easy Vector System (Promega) を用いた TA クローニングによってそれぞれ pGEM®-T Easy vector に組み込み、*E. coli* DH5 $\alpha$  をヒートショック法で形質転換した。100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ampicillin、0.1 mM isopropyl thiogalactoside (IPTG)、及び 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  5-bromo-4chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-gal) を含む Luria-Bertani (LB) プレートで一晩培養し、Blue/White selection によって目的遺伝子がクローニングされたプラスミドを持つコロニーを選択した。選択した各コロニーをそれぞれ 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ampicillin を含む 2 ml の LB 培地に植菌し、さらに一晩振とう培養した後、Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad) を用いてプラスミドを回収した。回収された各プラスミドは、適当な制限酵素で切断した後、0.7%アガロースゲル電気泳動で目的の断片がクローニングされていることを確認した。各プラスミドにクローニングされた断片の配列決定は、広島大学 自然科学研究支援開発センター 遺伝子実験部門の DNA 塩基配列決定サービスに依頼した。まず、M13 forward プライマーと M13 reverse プライマーを用いて両端から配列を決定し、さらに内側の配列については、表 1-3 に示すプライマーを用いて決定した。なお、PCR 段階での変異がないことを確認するため、PCR からシーケンスまでの一連の操作はすべてのホモログについて複数並行して行い、問題がないことをそれぞれ確認した。

配列を決定した断片に含まれていた遺伝子がコードするタンパクと他の細菌が持つ既知のタンパクとのアミノ酸配列の比較を、BLAST 検索を用いて行った。

表 1-1 PCR 反応液組成と反応条件

Premix Taq <sup>TM</sup> (TaKaRa Ex Taq <sup>TM</sup> Version)	25 $\mu$ l
HUC22-1 株ゲノム DNA (0.1 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l
Primer F (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
Primer R (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	1 min kb <sup>-1</sup>	
4°C	$\infty$	

表 1-2 クローニングに用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')	Accession number	Localization
<i>adhA</i> -F	ATCAAAACGTTAGCCTCGCC	CP000232	1,978,929
<i>adhA</i> -R	TAATTATCCTGGATCCGCCC	CP000232	1,981,635
<i>adhB</i> -F	TATGCGTGCCCATGATCGTT	CP000232	1,051,627
<i>adhB</i> -R	TTACTAACTTGGCTCCTTGC	CP000232	1,054,727
<i>adhC</i> -F	TGATGTTCTCAGTAGCCGAC	CP000232	2,377,335
<i>adhC</i> -R	TATTTCCCTCGATGGACCAGG	CP000232	2,374,294
<i>aldh</i> -F	ATGCTCCTGCTGGAGGGTGA	CP000232	1,832,850
<i>aldh</i> -R	CTTCCGGTAACATAGCCCCC	CP000232	1,830,910

※Localization は Genbank に登録されている *M. thermoacetica* ATCC 39073 株ゲノムデータベースにおける各プライマー配列の位置

表 1-3 各遺伝子のシーケンスに用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
<i>adhA</i> -F2	CCAGATGCTCCTTCACTTTT
<i>adhA</i> -R2	AGGTCAGTTAACCTGGCGAT
<i>adhB</i> -F2	AGGGCTACCCAGAATGGTTT
<i>adhB</i> -R2	ATGTCGACAACCGCGTTATG
<i>adhC</i> -F2	ATTAACGACCCGATCTTCGC
<i>adhC</i> -R2	TAAGGCCGTAACCTGGAATGG
<i>aldh</i> -F2	AAACCCCACTTACAGCATGC

### 第3節 結果及び考察

#### 1-3-1 *adh*、*aldh* ホモログの検索

HUC22-1 株の近縁種である *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースから *adh*、*aldh* のホモログを検索した結果、*adh* については3つ、*aldh* については1つのホモログが存在することが分かった。そこで本研究では、これらの遺伝子をそれぞれ *adhA* (geneID: 3830835)、*adhB* (geneID: 3832643)、*adhC* (geneID: 3831379)、及び *aldh* (geneID: 3832442) と表記、呼称することとした。

#### 1-3-2 HUC22-1 株ゲノム由来の *adh*、*aldh* ホモログのクローニング及び配列決定

1-3-1 で得られたホモログを HUC22-1 株のゲノムからクローニングするために、HUC22-1 株からゲノム DNA を抽出し、そのゲノム DNA を鋳型に用い、表 1-2 に示した各プライマーで4つのホモログを PCR によってそれぞれ増幅し、アガロースゲル電気泳動で確認した。その結果、すべての PCR 反応について、予想されたサイズの単一バンドが確認されたため、これらをそれぞれ pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector にクローニングした。得られたプラスミドはそれぞれ pGEM-*adhA*、pGEM-*adhB*、pGEM-*adhC*、及び pGEM-*aldh* と呼ぶこととした。これらのプラスミドにクローニングされた断片の塩基配列を決定したところ、いずれも *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースに示されている配列と 99%以上の相同性を示すことが確認された。図 5 に決定された各遺伝子の塩基配列と、それにコードされているタンパク質 (*AdhA*、*AdhB*、*AdhC* 及び *Aldh*) のアミノ酸配列を示す。

#### 1-3-3 各遺伝子がコードするタンパクと既知のタンパク質とのアミノ酸配列の比較

*AdhA*、*AdhB*、*AdhC* 及び *Aldh* のアミノ酸配列を、BLAST 検索を用いて他の細菌が持つ既知のタンパク質と比較した。その結果の中から特に相同性の高かったものについてまとめたものを表 1-4 に示す。を示した。

*AdhA* は、アミノ酸レベルでは *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースに示されているもの (class IV *Adh*) と 100%の相同性を示すことが分かった。また、好熱性細菌、及び古細菌の Fe-containing *Adh* と高い相同性 (59–68%) を示した。これらの中には、実際に *Adh* としての酵素特性の解析が行われ、その結果が報告されているものも含まれており、この *AdhA* が *Adh* としての機能を持っている可能性は高いと考えられた。

*AdhB* は、アミノ酸レベルでは *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースに示されているもの (Fe-*Adh*) と 98%の相同性を示すことが分かった。また、*AdhA* と同様に好熱性細菌の Fe-containing *Adh* と相同性を示したが、*AdhA* に比べるとその相同性は低かった。(37–44%)。

*AdhC* は、アミノ酸レベルでは *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースに示されているもの (Zn-*Adh*) と 99%の相同性を示すことが分かった。しかしながら、*AdhA* や *AdhB* と異なり、*M. thermoacetica* 以外の好熱性細菌が持つ *Adh* との相同性は見られず、中温性細菌が持つ Zn-containing *Adh* と低い相同性 (36–39%) を示すのみであった。

*Aldh* は、アミノ酸レベルでは *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースに示されているもの (semialdehyde dehydrogenase) と 100%の相同性を示すことが分かった。また、好熱性細菌が持つ *Aldh*、あるいは semialdehyde dehydrogenase と高い相同性 (57–65%) を示した。

(A) *adhA*

Molecular Weight : 43327.55

```
5' ATG TGG GAA ACA AAA ATA AAC ATC AAC GAA GTC CGG GAA ATC CGG GCT AAA ACA ACC GTC TAC TTT GGA
-----
Met Trp Glu Thr Lys Ile Asn Ile Asn Glu Val Arg Glu Ile Arg Ala Lys Thr Thr Val Tyr Phe Gly

GTT GGA GCT ATT AAA AAG ATT GAC GAC ATA GCC AGG GAA TTT AAG GAA AAG GGA TAC GAT AGG ATC ATC
-----
Val Gly Ala Ile Lys Lys Ile Asp Asp Ile Ala Arg Glu Phe Lys Glu Lys Gly Tyr Asp Arg Ile Ile

GTA ATA ACC GGC AAG GGG GCT TAT AAA GCC ACC GGC GCG TGG GAA TAT ATA GTT CCG GCC TTA AAT AAA AAC
-----
Val Ile Thr Gly Lys Gly Ala Tyr Lys Ala Thr Gly Ala Trp Glu Tyr Ile Val Pro Ala Leu Asn Lys Asn

CAG ATA ACC TAT ATC CAT TAC GAC CAG GTG ACG CCC AAC CCG ACG GTA GAC CAG GTT GAC GAG GCA ACC
-----
Gln Ile Thr Tyr Ile His Tyr Asp Gln Val Thr Pro Asn Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Glu Ala Thr

GAG GCA ACC AAA CAA GCC CGG GAA TTC GGT GCC CGA GCC GTC CTG GCC ATC GGC GGG GGT AGC CCC ATT
-----
Glu Ala Thr Lys Gln Ala Arg Glu Phe Gly Ala Arg Ala Val Leu Ala Ile Gly Gly Gly Ser Pro Ile

GAT GCC GCT AAA AGC GTA GCC GTC TTG CTC TCC TAC CCC GAC AAA AAT GCC CGA CAG CTC TAC CAG TTA
-----
Asp Ala Ala Lys Ser Val Ala Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asp Lys Asn Ala Arg Gln Leu Tyr Gln Leu

GAA TTT ACA CCT GTT AAG GCC GCA CCT ATC ATC GCT ATT AAT CTT ACC CAT GGT ACG GGG ACG GAA GCC
-----
Glu Phe Thr Pro Val Lys Ala Ala Pro Ile Ile Ala Ile Asn Leu Thr His Gly Thr Gly Thr Glu Ala

GAT CGC TTT GCC GTT GTC AGC ATC CCT GAA AAG GCA TAT AAA CCC GCT ATT GCC TAT GAT TGC ATT TAC
-----
Asp Arg Phe Ala Val Val Ser Ile Pro Glu Lys Ala Tyr Lys Pro Ala Ile Ala Tyr Asp Cys Ile Tyr

CCC TTA TAT TCA ATT GAC GAC CCG GCC CTC ATG GTA AAA CTG CCG TCC GAC CAG ACA GCT TAT GTC TCT
-----
Pro Leu Tyr Ser Ile Asp Asp Pro Ala Leu Met Val Lys Leu Pro Ser Asp Gln Thr Ala Tyr Val Ser
```

図5 HUC22-1株由来 *adh*、*aldh* の塩基配列及び遺伝子産物のアミノ酸配列

GTT GAT GCC CTC AAC CAT GTC GTC GAA GCA GCC ACC AGC AAA GTA GCC AGC CCC TAT ACT ATT ATC CTG  
-----  
Val Asp Ala Leu Asn His Val Val Glu Ala Ala Thr Ser Lys Val Ala Ser Pro Tyr Thr Ile Ile Leu

GCC AAG GAA ACG GTA CGG CTC ATC GCC CGA TAC CTG CCC CAG GCC CTG TCC CAT CCG GCG GAT TTG ACG  
-----  
Ala Lys Glu Thr Val Arg Leu Ile Ala Arg Tyr Leu Pro Gln Ala Leu Ser His Pro Ala Asp Leu Thr

GCC AGG TAT TAT CTC CTC TAT GCT TCC CTG ATT GCC GGA ATA GCC TTT GAC AAC GGT TTG CTC CAC TTC  
-----  
Ala Arg Tyr Tyr Leu Leu Tyr Ala Ser Leu Ile Ala Gly Ile Ala Phe Asp Asn Gly Leu Leu His Phe

ACC CAC GCC CTG GAA CAC CCC CTG AGC GCC GTC AAA CCG GAG CTC GCC CAC GGT CTG GGG CTG GGT ATG  
-----  
Thr His Ala Leu Glu His Pro Leu Ser Ala Val Lys Pro Glu Leu Ala His Gly Leu Gly Leu Gly Met

CTG CTG CCG GCC GTA GTC AAG CAG ATT TAC CCG GCA ACC CCG GAG GTA CTG GCG GAG ATA CTG GAG CCC  
-----  
Leu Leu Pro Ala Val Val Lys Gln Ile Tyr Pro Ala Thr Pro Glu Val Leu Ala Glu Ile Leu Glu Pro

ATT GTT CCC GAT CTC AAA GGC GTT CCC GGT GAA GCA GAA AAG GCG GCC AGC GGG GTG GCA AAA TGG CTT  
-----  
Ile Val Pro Asp Leu Lys Gly Val Pro Gly Glu Ala Glu Lys Ala Ala Ser Gly Val Ala Lys Trp Leu

GCC GGA GCC GGT ATT ACC ATG AAG CTA AAA GAT GCG GGC TTT CAA GCG GAA GAT ATC GCC AGG TTA ACT  
-----  
Ala Gly Ala Gly Ile Thr Met Lys Leu Lys Asp Ala Gly Phe Gln Ala Glu Asp Ile Ala Arg Leu Thr

GAC CTG GCC TTT ACC ACC CCG AGT CTC GAG CTT CTC CTG AGT ATG GCC CCG GTA ACG GCC GAC AGG GAA  
-----  
Asp Leu Ala Phe Thr Thr Pro Ser Leu Glu Leu Leu Leu Ser Met Ala Pro Val Thr Ala Asp Arg Glu

AGG GTT AAG GCA ATT TAC CAG GAC GCC TTT TAA 3'  
-----  
Arg Val Lys Ala Ile Tyr Gln Asp Ala Phe \*\*\*

**(B) *adhB***

Molecular Weight : 39124.07

5' ATG TCC TTC AGT TTT TAT TTA CCA ACA AAG GTC TTT TTT GGC GAA GGG GCT GTT AAC AAT CAT GGC GTC  
-----  
Met Ser Phe Ser Phe Tyr Leu Pro Thr Lys Val Phe Phe Gly Glu Gly Ala Val Asn Asn His Gly Val  
  
TTT CTT AAA GGC AGG GGC CGC CGG GCC CTG GTA GTC ACC GGG CGC CAC AGC GCT ACA GCC AGC GGT GCT  
-----  
Phe Leu Lys Gly Arg Gly Arg Arg Ala Leu Val Val Thr Gly Arg His Ser Ala Thr Ala Ser Gly Ala  
  
ATG GCC GAT ATT GAA GCC TTG GCC CAG AAA CTA GAT ATA ACC CTG GCG ACC TTC AAT CAG GTC CCT TCT  
-----  
Met Ala Asp Ile Glu Ala Leu Ala Gln Lys Leu Asp Ile Thr Leu Ala Thr Phe Asn Gln Val Pro Ser  
  
AAC CCC ACC CTG GAA GTA GTG GGC CGG GGT GTT GAA ATG GCC CGC AGC GAA GGG GCG GAT TTT ATC ATC  
-----  
Asn Pro Thr Leu Glu Val Val Gly Arg Gly Val Glu Met Ala Arg Ser Glu Gly Ala Asp Phe Ile Ile  
  
GGA ATT GGC GGT GGT TCT CCC CTG GAT ACG GCC AAA GCC ATC GCC CTC CTG GCA ACC AAC AAA GTA CCG  
-----  
Gly Ile Gly Gly Gly Ser Pro Leu Asp Thr Ala Lys Ala Ile Ala Leu Leu Ala Thr Asn Lys Val Pro  
  
GCA ACC GCC CTT TAT GAG GCT GAG CTA CCG GAG CCG CCT CTG CCT GTG GTT GCT ATA CCG ACT ACT GCC  
-----  
Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Ala Glu Leu Pro Glu Pro Pro Leu Pro Val Val Ala Ile Pro Thr Thr Ala  
  
GGC ACC GGG AGC GAA GTC ACC CAG CAT GCC GTT TTT ACC CTG CCG GAA AAG AAA ATC AAG AAG GGC TTT  
-----  
Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Gln His Ala Val Phe Thr Leu Pro Glu Lys Lys Ile Lys Lys Gly Phe  
  
AGT GAC GAC CGC TGT TTT CCC CTG GCA GCA TTG GTG GAT CCC CGT TAT ACC GCC TCT CTC CCC CTG GAG  
-----  
Ser Asp Asp Arg Cys Phe Pro Leu Ala Ala Leu Val Asp Pro Arg Tyr Thr Ala Ser Leu Pro Leu Glu  
  
GTT ACC ATT GAT ACC GCC CTG GAC GCC CTG AGC CAT GCC ATC GAG GGT TAC CTG TCC AGG CGG GCG ACG  
-----  
Val Thr Ile Asp Thr Ala Leu Asp Ala Leu Ser His Ala Ile Glu Gly Tyr Leu Ser Arg Arg Ala Thr

CCT TTA AGC GAT ACT CTG GCC CTT GAG GCC ATG GGC CTC TTC GCC AGG CAT AAG GAA GCC CTG GTG AGG  
-----  
Pro Leu Ser Asp Thr Leu Ala Leu Glu Ala Met Gly Leu Phe Ala Arg His Lys Glu Ala Leu Val Arg

GGA GAG TTG ACT CCT GCT GCC AGG TAC GAT CTC ATG TAT GCT TCC ACC CTT GGT GGC ATG GTC ATT GCC  
-----  
Gly Glu Leu Thr Pro Ala Ala Arg Tyr Asp Leu Met Tyr Ala Ser Thr Leu Gly Gly Met Val Ile Ala

CAG ACG CGT ACG ACC ATT CTG CAT ACC CTG GGT TAT CCT CTA ACC TTC AGC CAC AAT ATC CCC CAT GGC  
-----  
Gln Thr Arg Thr Thr Ile Leu His Thr Leu Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Ser His Asn Ile Pro His Gly

CGG GCC AAT GGC CTC CTG CTG GCA GCC TAC CTG GAG TTC GTA CAA CCG GCG GAA CCG GTG AAG GTC GCT  
-----  
Arg Ala Asn Gly Leu Leu Leu Ala Ala Tyr Leu Glu Phe Val Gln Pro Ala Glu Pro Val Lys Val Ala

CGC ATC CTG ACT GTT TTA GGG ATG ACC TCC CTG GCA GAG GTG CAA CAG ATG ATC CGG CTA CTC CTG CCG  
-----  
Arg Ile Leu Thr Val Leu Gly Met Thr Ser Leu Ala Glu Val Gln Gln Met Ile Arg Leu Leu Leu Pro

GTG CCG GGA ATA TAT CCG GAG AAG GAA TTG GAA CGC ATG GCG GAT CTG GTA ACC GGG GCC AGC AGT ATG  
-----  
Val Pro Gly Ile Tyr Pro Glu Lys Glu Leu Glu Arg Met Ala Asp Leu Val Thr Gly Ala Ser Ser Met

GCC TGG ACG GCC CGC CAG GGG ACC CGG GCC GAT CTG GTC CGG ATA CTG CGC CAG AGT TTG GGT TAG 3'  
-----  
Ala Trp Thr Ala Arg Gln Gly Thr Arg Ala Asp Leu Val Arg Ile Leu Arg Gln Ser Leu Gly \*\*\*

(C) *adhC*

Molecular Weight : 38062.20

```
5' ATG ATC CCT GAA AAA ATG AAA GCC CTG GTT CTC TTC GGC CCT AAC GAC GTG CGC CTG GTA GAA AAG CCG
   -----
   Met Ile Pro Glu Lys Met Lys Ala Leu Val Leu Phe Gly Pro Asn Asp Val Arg Leu Val Glu Lys Pro

   GTG CCC AAA CCC GGC CCC GGC GAG GTG CTG GTC AGG GTG GCG GCC TGC GGC ATC TGC GGC ACC GAT GTA
   -----
   Val Pro Lys Pro Gly Pro Gly Glu Val Leu Val Arg Val Ala Ala Cys Gly Ile Cys Gly Thr Asp Val

   AAG ATT ATC ACC AAG GGC ATG CCA AAG ATG CCT CCC TAC GGT GAA TTT ACC TTC GGC CAT GAA TGG GCC
   -----
   Lys Ile Ile Thr Lys Gly Met Pro Lys Met Pro Pro Tyr Gly Glu Phe Thr Phe Gly His Glu Trp Ala

   GGG ACC ATT GTC GCC CTG GGA GAA ACA GTG GAC GAA TTC CAG GTC GGC GAC CGG GTA GCC CTC GAG GCT
   -----
   Gly Thr Ile Val Ala Leu Gly Glu Thr Val Asp Glu Phe Gln Val Gly Asp Arg Val Ala Leu Glu Ala

   CAC AAG GGT TGC GGC CGC TGT GAA AAC TGC ATC GAC GGC AAG TAC ACT GCC TGC CTA AAC TAC GGC CGC
   -----
   His Lys Gly Cys Gly Arg Cys Glu Asn Cys Ile Asp Gly Lys Tyr Thr Ala Cys Leu Asn Tyr Gly Arg

   CTG GAC AAG GGC CAC CGG GCC GCG GGC ATG ACG GTA GAC GGT GGC TTT GCC GAG TAT GCC GTC CAG CAT
   -----
   Leu Asp Lys Gly His Arg Ala Ala Gly Met Thr Val Asp Gly Gly Phe Ala Glu Tyr Ala Val Gln His

   GTA AAT TCA GTC TAC AAG ATT CCC GAC AAT ATT ACT TTC AAC GAA GCC ACC TAT GTG ACT ACG GCC GGC
   -----
   Val Asn Ser Val Tyr Lys Ile Pro Asp Asn Ile Thr Phe Asn Glu Ala Thr Tyr Val Thr Thr Ala Gly

   TGT GCC CTC TAC GCC ATC GAC AAG AGC GGC GGT TAT ATT GCC GGG GAT ACG GTC CTG GTC ATC GGC CCC
   -----
   Cys Ala Leu Tyr Ala Ile Asp Lys Ser Gly Gly Tyr Ile Ala Gly Asp Thr Val Leu Val Ile Gly Pro

   GGC CCT ATT GGT CTC TCT GTG GTC CAG GGA GCC CGG TCC CTG GGG GCC GAA AAG ATC ATC CTC ATG GGA
   -----
   Gly Pro Ile Gly Leu Ser Val Val Gln Gly Ala Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys Ile Ile Leu Met Gly
```

```

ACC CGA GAA GAC CGC CTG GTC AAG GGT CGT GAG CTC GGC GCC ACC CAT ACC ATT AAT ATT CGT GAG GTG
-----
Thr Arg Glu Asp Arg Leu Val Lys Gly Arg Glu Leu Gly Ala Thr His Thr Ile Asn Ile Arg Glu Val

GCC GAT CCC GTT GCC GAA GTA ATG GCC ATC ACC GGT GGT AAG GGC TGC GAG CGG GTT TTT GAG TGC GCT
-----
Ala Asp Pro Val Ala Glu Val Met Ala Ile Thr Gly Gly Lys Gly Cys Glu Arg Val Phe Glu Cys Ala

GGC AAC TCT CAG TCC TTC GAG TAC GGC ATC AAA GCG GCT AAA AAG GGC GGT GTC ATG GTC CTG GTT TCC
-----
Gly Asn Ser Gln Ser Phe Glu Tyr Gly Ile Lys Ala Ala Lys Lys Gly Gly Val Met Val Leu Val Ser

TTC TAT AAG GAA CCG GTA ACG GCT AAC CTG GAT TAT GTC GTC TTA AAC CAG ATC AGC CTG CTC ACC GTA
-----
Phe Tyr Lys Glu Pro Val Thr Ala Asn Leu Asp Tyr Val Val Leu Asn Gln Ile Ser Leu Leu Thr Val

CGC GGT GAG GGC AAC CAG AAC TGT AAG CGC GCC CTG TCC CTG ATG GCC CAG GGT AAG ATT GAC GCC AAA
-----
Arg Gly Glu Gly Asn Gln Asn Cys Lys Arg Ala Leu Ser Leu Met Ala Gln Gly Lys Ile Asp Ala Lys

CCC ATT ATG ACC CAC GCC TTC CCG TTA GAA GAG TTC CAG AAG GGC CTG GAT TAC TTC GTC AAC CGC AAA
-----
Pro Ile Met Thr His Ala Phe Pro Leu Glu Glu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Tyr Phe Val Asn Arg Lys

GAC GGG GCC ATG AAG GTG GTT ATT AAC CCC TAA 3'
-----
Asp Gly Ala Met Lys Val Val Ile Asn Pro ***

```

(D) *aldh*

Molecular Weight : 30761.26

```
5' GTG GAC AAG GTA AAA GTG GCT GTT ATC GGC CCG GGC AAT ATC GGG TCC GAC CTG ATG TAC AAG ATC CTG
-----
Met Asp Lys Val Lys Val Ala Val Ile Gly Pro Gly Asn Ile Gly Ser Asp Leu Met Tyr Lys Ile Leu

CGC AGC CGG CAT CTA GAG ATG GCC CTG ATG ACC GGT ATT ATC GAA TCC GAG GGC ATC AAG CGG GCC AGG
-----
Arg Ser Arg His Leu Glu Met Ala Leu Met Thr Gly Ile Ile Glu Ser Glu Gly Ile Lys Arg Ala Arg

AAG CTG GGT ATC AAG ACA TCC ATC GAA GGT GTC AAG GCC GTC CTG GCG GAA GAC GAT ATC AAG ATT GTC
-----
Lys Leu Gly Ile Lys Thr Ser Ile Glu Gly Val Lys Ala Val Leu Ala Glu Asp Asp Ile Lys Ile Val

TTT GAC GCC ACC GGG GCC AAA CCC CAC TTA CAG CAT GCG CCG CTT TTA AAA GAA GCG GGC AAG ATC GCC
-----
Phe Asp Ala Thr Gly Ala Lys Pro His Leu Gln His Ala Pro Leu Leu Lys Glu Ala Gly Lys Ile Ala

ATC GAC TTG ACA CCG GCG GCA GTA GGT CCC TAC GTG GTA CCA TGT GTC AAC CTG GAC CAG GTT AAG GCC
-----
Ile Asp Leu Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Tyr Val Val Pro Cys Val Asn Leu Asp Gln Val Lys Ala

GAA CCA AAC CTT AAC ATG GTC ACC TGC GGT GGC CAG GCT ACA GTA CCC ATC GTC TAT GCC ATC AAC CGG
-----
Glu Pro Asn Leu Asn Met Val Thr Cys Gly Gly Gln Ala Thr Val Pro Ile Val Tyr Ala Ile Asn Arg

GTG GCC GGG GCC AGA TAC GCT GAG ATT GTA GCC TGC ATC GCT TCC AAG AGC GCC GGG CCG GGG ACC CGT
-----
Val Ala Gly Ala Arg Tyr Ala Glu Ile Val Ala Cys Ile Ala Ser Lys Ser Ala Gly Pro Gly Thr Arg

CAG AAC ATT GAT GAG TTC ACC CAG ACT ACG GCC AAG GCC CTG GAG GTT GTC GGC GGG GCG AAA AAG GGC
-----
Gln Asn Ile Asp Glu Phe Thr Gln Thr Thr Ala Lys Ala Leu Glu Val Val Gly Gly Ala Lys Lys Gly

AAA GCC ATC ATT ATT CTG AAT CCT GCC GAG CCA CCC ATT ATG ATG CAT AAC ACC ATT TAT GTA GAG GTC
-----
Lys Ala Ile Ile Ile Leu Asn Pro Ala Glu Pro Pro Ile Met Met His Asn Thr Ile Tyr Val Glu Val
```

GAA AAG CCC GAC ATC GAA GCC ATT CGC GCT TCG GTT GAA GCC ATG GTC AAG GAA ATC CAG AGC TAT GTT  
-----  
Glu Lys Pro Asp Ile Glu Ala Ile Arg Ala Ser Val Glu Ala Met Val Lys Glu Ile Gln Ser Tyr Val

CCC GGG TAC CGG CTC GTC GTG CCG CCC ATT CTT GAC GGC AAC AAA GTA ACG GCA GCT GTT GAA GTG GAG  
-----  
Pro Gly Tyr Arg Leu Val Val Pro Pro Ile Leu Asp Gly Asn Lys Val Thr Ala Ala Val Glu Val Glu

GGT GCT GGT GAC TTC CTG CCC AAA TAC TCC GGT AAT CTG GAT ATT ATC ACT TCA GCA GCC GTG GCG GTA  
-----  
Gly Ala Gly Asp Phe Leu Pro Lys Tyr Ser Gly Asn Leu Asp Ile Ile Thr Ser Ala Ala Val Ala Val

GCT GAA AAG CTG GCC CAG GAA CTG CAG GTA AAG GAA GGG GTA GCA TGA 3'  
-----  
Ala Glu Lys Leu Ala Gln Glu Leu Gln Val Lys Glu Gly Val Ala \*\*\*

表 1-4 HUC22-1 株由来 Adh、Aldh と関連酵素との比較

Enzyme	Identity (%)	Cofactor	Metal	Accession number	Reference
<b>Moorella sp. HUC22-1 AdhA</b>	100	NADP	x	This study	
<i>Moorella thermoacetica</i> AdhIV	100	x <sup>a</sup>	x	ABC20211	
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4 AdhIV	68	x	x	AAM23958	
<i>Thermococcus hydrothermalis</i> Adh	66	NADP	Fe	CAA74334	Antoine et al. <sup>24)</sup>
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 39E primary Adh	66	NADP/NAD	Fe	EAO64868	Burdette and Zeikus <sup>25)</sup>
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW200 primary Adh	65	NADP	Fe	AAG01186	Holt et al. <sup>26)</sup>
<i>Thermococcus zilligii</i> Fe-Adh	64	NADP	Fe	AAB63011	Li and Stevenson <sup>27)</sup>
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> AdhIV	64	x	x	EAP41917	
<i>Thermotoga</i> sp. RQ2 Adh	59	x	x	CAD67961	
<b>Moorella sp. HUC22-1 AdhB</b>	100	NADP	x	This study	
<i>Moorella thermoacetica</i> Fe-Adh	98	x	x	EAN20710	
<i>Clostridium thermocellum</i> Fe-Adh	44	x	x	EAM47093	
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8 Fe-Adh	40	x	x	AAD36001	
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> Fe-Adh	39	x	x	EAP41712	
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2 Fe-Adh	37	x	x	EAM98646	
<b>Moorella sp. HUC22-1 AdhC</b>	100	x	x	This study	
<i>Moorella thermoacetica</i> Zn-Adh	99	x	x	ABC20555	
<i>Nocardioides</i> sp. JS614 Zn-Adh	39	x	x	EAO07561	
<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831 Adh	36	x	x	BAC15309	
<b>Moorella sp. HUC22-1 Aldh</b>	100	NADP/NAD	x	This study	
<i>Moorella thermoacetica</i> semialdehyde dehydrogenase	100	x	x	ABC20077	
<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> Z-2901 Aldh	65	x	x	ABB13885	
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2 Aldh	62	x	x	EAM98145	
<i>Thermus thermophilus</i> HB8 Aldh	59	x	x	BAD72043	
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl semialdehyde dehydrogenase	57	x	x	EAO58741	

<sup>a</sup>not reported.

#### 第 4 節 要約

*Moorella* sp. HUC22-1 株ゲノムからエタノール生産の予想経路に関与すると思われる酵素をコードする候補遺伝子 (*adhA*, *adhB*, *adhC*, 及び *aldh*) をクローニングし、その配列を決定し、既知の Adh、Aldh との比較を行った。AdhA は、好熱性細菌、及び古細菌の Fe-containing Adh と高い相同性 (59~68%) を示し、Adh としての機能を持っている可能性が高いと考えられた。AdhB も好熱性細菌の Fe-containing Adh と高い相同性を示したが、AdhA に比べるとその相同性は低かった。(37~44%)。AdhC は、*M. thermoacetica* 以外の好熱性細菌の Adh との相同性は見られず、中温性細菌が持つ Zn-containing Adh と低い相同性 (36~39%) を示すのみであった。Aldh は、好熱性細菌の Aldh、あるいは semialdehyde dehydrogenase と高い相同性 (57~65%) を示した。

## 第2章 HUC22-1株由来 Adh、Aldh の酵素特性の解析

### 第1節 緒言

第1章では、HUC22-1株ゲノムから Adh 及び Aldh をコードする候補遺伝子をクローニングし、その配列を決定した。そしてそれらの遺伝子がコードしているタンパク質が既知の Adh 及び Aldh と相同性を示す事を確認した。しかしながら、これらのタンパク質が実際に Adh 及び Aldh としての機能を有しているのかについては不明であった。そこで本章では、第1章で得られた4つの遺伝子を *E. coli* でそれぞれ大量発現させて精製した後、得られた精製酵素の特性解析を行った。概略を図6に示す。まず、3つの精製 Adh が NAD(P)H を還元力としてアセトアルデヒドをエタノールに変換できるのか、そして精製 Aldh が NAD(P)H を還元力としてアセチル-CoA をアセトアルデヒドに変換できるのかをそれぞれ確認した。次に、これらの精製酵素の酵素活性に対する pH、温度の影響を検討した。また、AdhA と B については、その基質特異性についても検討した。さらに、精製 Adh と精製 Aldh を組み合わせることで、実際にアセチル-CoA からエタノールが生産されるのかについても検討した。

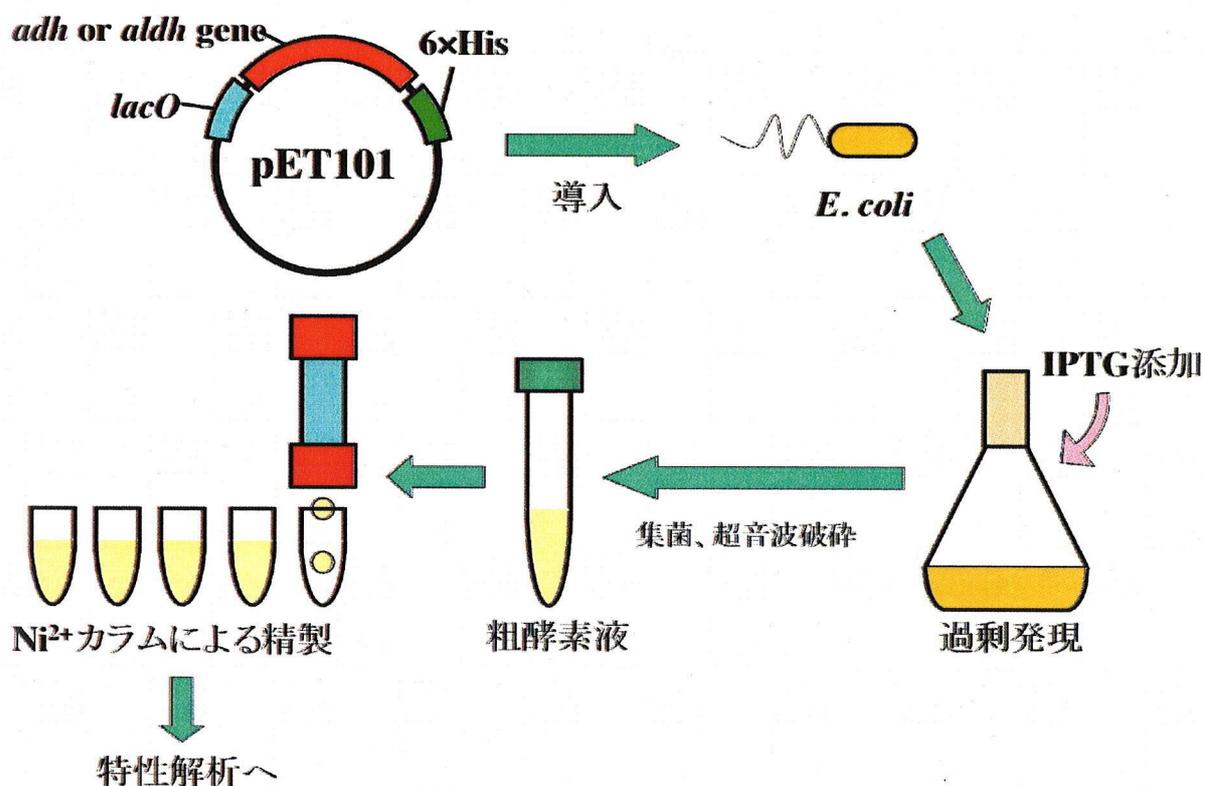
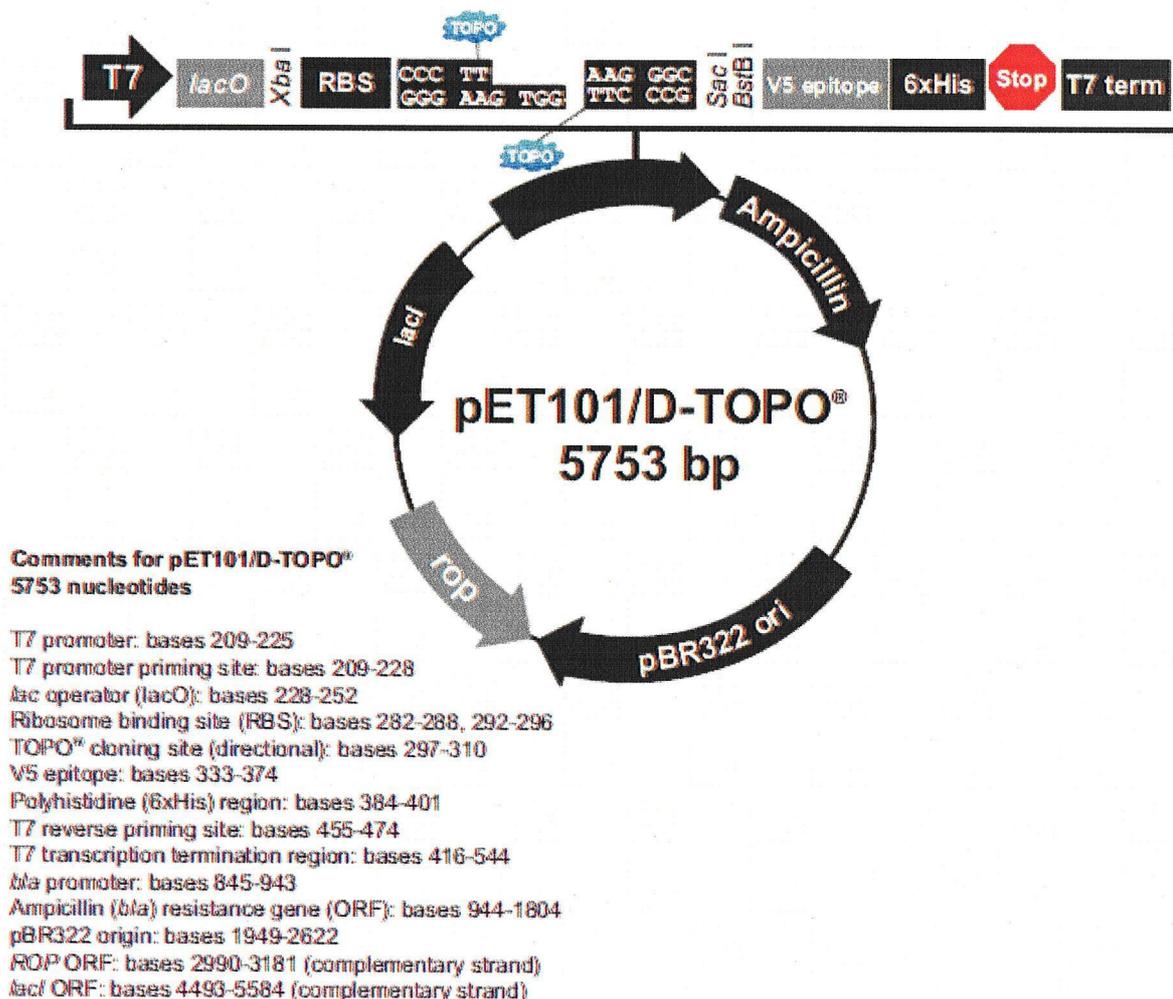


図6 Adh、Aldh の大量発現、精製の概略

## 第2節 方法

### 2-2-1 *E. coli* 用大量発現ベクターへのサブクローニング

各遺伝子の *E. coli* 用大量発現ベクターへのサブクローニングは、Champion™ pET Directinal TOPO® Expression Kit (Invitrogen) と添付の pET101/D-TOPO® vector と *E. coli* TOP10 を用い、付属のマニュアルに従って行った。このベクターは、図 7 に示す構造を持ち、サブクローニングした遺伝子にコードされているタンパク質の C 末端に 6×His タグを付与し、IPTG による誘導で大量発現させることができる。このサブクローニングには 5' 末端に CACC 配列を持つ、平滑末端の PCR 産物が必要なため、PCR には KOD -Plus- (TOYOBO) を用いた。サブクローニングのための PCR 反応液組成と反応条件を表 2-1 に、使用したプライマーを表 2-2 に示す。得られた各プラスミドは、適当な制限酵素で切断した後、0.7% アガロースゲル電気泳動で目的のサイズの断片がクローニングされていることを確認した。



※Champion™ pET Directinal TOPO® Expression Kit のマニュアルより引用

図 7 pET101/D-TOPO® vector の構造

表 2-1 サブクローニング用 PCR の反応液組成と反応条件

10×KOD -Plus- buffer	5 $\mu$ l
2 mM dNTP mixture	5 $\mu$ l
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ l
Primer F (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
Primer R (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
各プラスミド (0.1 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l
KOD -Plus- DNA polymerase	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	32 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
54°C	30 sec	
68°C	1 min kb <sup>-1</sup>	
4°C	$\infty$	

表 2-2 pET101/D-TOPO® vector へのサブクローニングに用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
<i>adhA</i> -TOPO-F	CACCATGTGGGAAACAAAAAT
<i>adhA</i> -TOPO-R	AAAGGCGTCCTGGTAAATTG
<i>adhB</i> -TOPO-F	CACCATGTCCTTCAGTTTTTATTAC
<i>adhB</i> -TOPO-R	ACCCAAACTCTGGCGCA
<i>adhC</i> -TOPO-F	CACCATGACTTATATGATCCCTG
<i>adhC</i> -TOPO-R	GGGGTTAATAACCACCTTCATG
<i>aldh</i> -TOPO-F	CACCGTGGACAAGGTA AAAAGTG
<i>aldh</i> -TOPO-R	TGCTACCCCTTCCTTTACCTGC

※Primer F は各遺伝子のスタートコドンの前に CACC 配列を付与する形で設計し、

Primer R は各遺伝子の 3'末端から終止コドンを除く形で設計した

## 2-2-2 Adh、Aldh の大量発現と超音波破碎による抽出

2-2-1 で得られた各プラスミドを Champion™ pET Directinal TOPO® Expression Kit (Invitrogen) に付属の大量発現用 *E. coli* BL21star™ (DE3) にヒートショック法を用いて導入し、その形質転換株を 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin を含む 2 ml の LB 培地で、37°C で一晩前培養した。この前培養液を、100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin を含む 50 ml の LB 培地加えて、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、この培地に 1 mM になるように IPTG を添加し、さらに 4 時間振とう培養してタンパク質を大量発現させた。培養終了後、培養液を 6,000 rpm、4°C、10 分間遠心して菌体を沈殿させ、上清を除去した。菌体を 2.5 ml の sonication buffer (組成は後述) に懸濁し、氷水で冷却しつつ超音波破碎装置 (ULTRASONIC PROCESSOR W-385, ASTRASON) で超音波破碎した (output control level: 5、2 sec interval、40% duty cycle、4 分間)。破碎液を 11,000 rpm、4°C、15 分間遠心して上清を回収し、0.45 µm の cellulose acetate hydrophilic filter (Dismic®-13CP, Advantec®, 東洋濾紙) で濾過し、これを粗酵素液とした。

### Sonication buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

使用直前に以下の 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を終濃度 1 mM になるように加える

### 100 mM PMSF

PMSF 17.42 mg を isopropanol 1 ml に溶解させて -20°C に保存

## 2-2-3 His タグを付与した組換えタンパク質の精製

2-2-2 で抽出した粗酵素液に含まれている 6×His タグを付与されたタンパク質は、HisTrap FF crude Kit (GE healthcare) と添付の HisTrap FF crude column (容量 1 ml) を使い、付属のマニュアルに従って精製した。Binding buffer と elution buffer は、以下の組成のものを用いた。

### Binding buffer (pH 7.4)

20 mM sodium phosphate

500 mM NaCl

10 mM imidazole

### Elution buffer (pH 7.4)

20 mM sodium phosphate

500 mM NaCl

500 mM imidazole

カラムからの溶出液は 1 ml 毎に分取し、これらを溶出画分 1、2、3…とした。各画分は、タンパク質濃度の測定と SDS-PAGE に必要な量を除いてすべて等量の glycerol と混合し、-20°C に保存した。なお、これらの精製酵素液は、-20°C で 1 ヶ月間保存した後も、活性の低下はほとんど見られなかった。

#### 2-2-4 タンパク濃度の測定

粗酵素液及び溶出画分のタンパク質濃度の測定は、サンプルを MilliQ 水で 5-10 倍に希釈したうえで、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いた Bradford 法による比色定量で行った。定量のための標準タンパク質溶液には bovine serum albumin (BSA) 水溶液 (0、0.2、0.4、0.6 mg ml<sup>-1</sup>) を用いた。

#### 2-2-5 SDS-PAGE による精製 Adh、Aldh の確認

2-2-3 で得られた各画分の精製度を、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて確認した。各サンプル 10 µl (ただし、濃度が 10 mg ml<sup>-1</sup> を超えるものについては、10 mg ml<sup>-1</sup> 以下になるように希釈したものを 10 µl) と 2×サンプルバッファー 10 µl を混合し、5 分間ボイルしてタンパク質を変性させた後、すぐに氷中に移し急冷した。15%レディーゲル J (Bio-Rad) を泳動槽 (Bio-Rad) にセットし、泳動槽を 1×泳動バッファーで満たし、変性させたサンプル 20 µl と Precision Plus Protein™ Standards (プレステインマーカー, Bio-Rad) 10 µl をゲルにアプライし、電圧 50 V、4°C の条件で泳動した。サンプルが 1 本のラインに濃縮されたのを確認した後、電圧を 100 V に変更し、bromophenol blue (BPB) マーカーがゲルの下端に達するまで泳動した。泳動終了後、泳動槽からゲルを取り出し、予め 60°C 程度に温めておいた 200 ml の CBB 染色液に浸けて 60°C で 60 分間振とうした。ゲルが完全に染色されたら、ゲルを脱色液で軽くゆすぎ、予め 60°C 程度に温めておいた 100 ml 程度の脱色液に移して 60°C で 10 分間振とうし、脱色液を新しいものに交換した。これを完全に脱色されるまで (10 回程度) 繰り返した。ゲルを MilliQ 水に移して室温で一晩振とうした後、スキャナーでパソコンに取り込み、解析した。2×サンプルバッファー、泳動バッファー、CBB 染色液、及び脱色液の組成は以下に示す。

#### 2×サンプルバッファー

0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)	25 ml
2-mercaptoethanol	5 ml
SDS	2 g
Sucrose	5 g
Bromophenol blue	0.1% (w/v) の溶液を数滴
MilliQ water で 50 ml にフィルアップ	

#### 10×泳動バッファー

Tris	30.3 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
MilliQ water で 1000 ml にフィルアップ	
※使用時は MilliQ water で 10 倍に希釈し、1×泳動バッファーとして使用	

### CBB 染色液

Coomassie brilliant blue R-250	0.5 g
Ethanol	10 ml
Acetic acid	15 ml

MilliQ water で 200 ml にフィルアップ

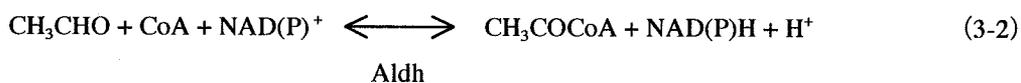
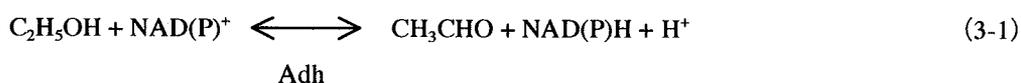
### 脱色液

Ethanol	250 ml
Acetic acid	75 ml

MilliQ water で 1000 ml にフィルアップ

#### 2-2-6 精製 Adh、Aldh の酵素活性測定

SDS-PAGE による確認で目的のサイズのタンパク質の精製が確認された画分を用いて、Adh 及び Aldh の活性測定を行った。測定方法は、Clark らの方法<sup>28)</sup>を少し改変したものを用いた。なお、HUC22-1 株は嫌気性細菌であるが、本章の酵素反応はすべて好気条件下でおこなった。次式 3-1、3-2 のように、これらの酵素の反応は可逆的であることから、補酵素 NAD(P)H の減少量（エタノール生成方向）と増加量（エタノール酸化方向）を  $A_{340}$  を測定する事によって酵素活性を求めた。具体的には、表 2-1 に示す組成の反応液のうち精製酵素以外を攪拌子の入ったキュベットに加えて混合し、60℃に保温した吸光度計（UV-1600, 島津製作所）にキュベットをセットし、攪拌子で攪拌しながら 5 分間温めた後、適量（反応が急激になりすぎない程度）の精製酵素液を加えて反応をスタートさせ、その直後約 10 秒間の  $A_{340}$  の変化（傾き）をグラフから読み取り、それを元に反応速度（初速度）を算出し、酵素活性を決定した。なお、NAD 及び NADP のモル吸光係数は  $\epsilon_{340}=6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  として計算した<sup>29)</sup>。また、1 U=1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の NAD(P)H を生成する（もしくは消費する）活性量と定義した。



**表 2-1 Adh、Aldh 酵素活性測定の実験液組成**

Adh (エタノール → アセトアルデヒド)	
100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)	1 ml
300 mM ethanol	1 ml
1 mM NAD(P) <sup>+</sup>	0.8 ml
精製酵素	10~200 $\mu$ l

Adh (アセトアルデヒド → エタノール)	
100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)	1 ml
300 mM acetaldehyde	1 ml
1 mM NAD(P)H	0.8 ml
精製酵素	10~200 $\mu$ l

Aldh (アセトアルデヒド + CoA → アセチル-CoA)	
100 mM sodium phosphate buffer (pH 10.0)	1 ml
300 mM acetaldehyde	0.5 ml
3 mM CoA	0.5 ml
1 mM NAD(P) <sup>+</sup>	0.8 ml
精製酵素	10~200 $\mu$ l

Aldh (アセチル-CoA → アセトアルデヒド + CoA)	
100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)	1 ml
3 mM acetyl-CoA	1 ml
1 mM NAD(P)H	0.8 ml
精製酵素	10~200 $\mu$ l

※どの反応も基本的に 60°Cで行った。

### 2-2-7 酵素活性に及ぼす pH、温度の影響

精製酵素の特性をより詳細に解析するために、pH 及び温度の影響について検討した。表 2-1 に示した条件を基本とし、pH については 6.0~10.5、温度については、AdhA と Aldh は 30°C~80°C、AdhB は 50°C~95°C の範囲について、酵素活性に与える影響を検討した。pH については、バッファーの種類によって対応可能な緩衝範囲に限界があるため、以下の複数種のバッファーを用いて測定を行った。バッファーの違いが活性に大きな影響を与えていないことを確認するために、それぞれのバッファーの測定範囲が必ず重複するようにして測定した。なお、精製 Aldh のみ、Tris-HCl buffer を用いた場合に活性に対して強い影響がみられたため、代わりに glycylglycine-NaOH buffer を用いた。

100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0~8.0)

100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0~9.0) (AdhA、AdhB、AdhC)

100 mM glycylglycine-NaOH buffer (pH 8.0~9.0) (Aldh)

100 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0~10.5)

### 2-2-8 精製 Adh の基質特異性の解析

精製 Adh について、基質特異性の解析を行った。アルコール生成方向、アルコール酸化方向の両方向について、炭素数等が異なる各種の化合物 (表 2-5 及び 2-6) を基質として反応を行い、その活性を見た。表 2-1 に示した条件を基本とし、基質のみを測定したい化合物の 300 mM 溶液に置き換えて行った。補酵素には NADP(H) を用いた。

### 2-2-9 精製 Adh、Aldh によるアセチル-CoA からのエタノール生産

精製 AdhA と精製 Aldh を組み合わせることで、実際にアセチル-CoA からエタノールが生産されるのかについて検討した。反応液の組成を表 2-2 に示す。反応液の組成のうち精製 Aldh 以外を攪拌子の入ったキュベットに加えて混合し、60°C に保温した吸光光度計にキュベットをセットし、攪拌子で攪拌しながら 5 分間温めた後、精製 Aldh を加えて反応をスタートさせた。反応開始から 10 分毎に 50  $\mu$ l ずつ反応液をサンプリングした。最終的に 90 分間反応を行い、サンプリングした反応液に含まれるエタノールの濃度を、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いて解析した。GC システムは、GC-1700 及び C-R8A chromatopac (島津製作所) を用い、移動相は  $N_2$  を用いて流速を 54 ml  $min^{-1}$  に設定した。カラムは、ポリイミド樹脂でコートしたフューズドシリカチューブの内壁に、極性の強いポリエチレングリコールを固定相 (液相) として結合させたタイプの ULBON HR-20M capillary column (信和化工) を使用した。カラムオープン温度は、60°C から 150°C まで 10°C  $min^{-1}$  の速度で昇温するプログラムを設定した。検出には水素炎中で有機物の一部をイオン化させ、そのイオンが電極間を通る際に生じる電流を検出する flame ionization detector (FID) を用いた。Injector と detector の温度は 250°C に設定した。Auto injector は用いず、GC-1700 への注入は手動で行った (注入量は 1  $\mu$ l)。また、標準液 (ethanol 10 mM) 及びすべてのサンプルに対し、内部標準として butanol を終濃度 1 mM になるように加えて (サンプル 40  $\mu$ l に対して 5 mM の butanol 溶液を 10  $\mu$ l 添加して)、測定を行った。

表 2-2 精製 Adh、Aldh によるエタノール生産反応の反応液組成

100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)	1 ml
9 mM acetyl-CoA	1 ml
30 mM NADH*	0.5 ml
30 mM NADPH*	0.5 ml
精製 Adh	50 µg protein
精製 Aldh	50 µg protein

※補酵素をどちらか片方しか添加しない場合には、添加しなかった補酵素の代わりに dH<sub>2</sub>O を 0.5 ml 添加

### 第 3 節 結果及び考察

#### 2-3-1 *E. coli* 用大量発現ベクターへのサブクローニング

前章においてクローニングし、配列を決定した HUC22-1 株由来の各遺伝子 (*adhA*、*adhB*、*adhC* 及び *aldh*) の、*E. coli* 用大量発現ベクター pET101/D-TOPO® vector へのサブクローニングを行った。これにより、大量発現用プラスミド pET101*adhA*、pET101*adhB*、pET101*adhC* 及び pET101*aldh* を構築することに成功した。各遺伝子は本来の終止コドンを失い、C 末端に 6×His タグを付与された形での大量発現が可能となった。

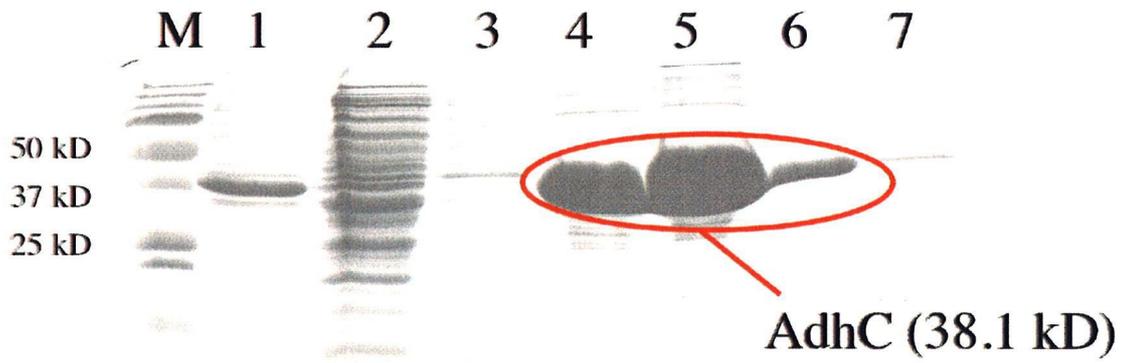
#### 2-3-2 Adh、Aldh の大量発現、抽出、精製、及び SDS-PAGE による確認

pET101*adhA*、pET101*adhB*、pET101*adhC* 及び pET101*aldh* を用いて、*E. coli* での AdhA、AdhB、AdhC 及び Aldh の大量発現、抽出と、HisTrap FF crude column による精製を行った。各タンパクの溶出画分は、SDS-PAGE によってその精製度を確認された。結果を図 8 に示す。各タンパクとも、溶出画分の赤丸で囲んだ部分にアミノ酸配列から予想される分子量の明確なバンドが見られ、精製が成功していることが確認された。以降の実験には、AdhA、AdhB、AdhC については溶出画分 2 を、Aldh については溶出画分 1 を精製酵素として用いた。



図 8 pET101/D-TOPO® vector の構造

### (C) AdhC



### (D) Aldh



M: Precision Plus Protein™ Standards
1: 粗酵素液
2: 非吸着画分
3: 素通り画分
4: 溶出画分 1
5: 溶出画分 2
6: 溶出画分 3
7: 溶出画分 4

### 2-3-3 精製 Adh、Aldh の酵素活性測定

2-3-2 で調製した精製酵素を用いて、精製 Adh、Aldh の酵素活性測定を行った。測定は、エタノール生成方向とエタノール酸化方向の両方向について行った。また、補酵素についても NAD(H) と NADP(H) のそれぞれについて測定を行った。各実験について、独立した測定を 3 回ずつ行い、平均値とその標準偏差を求めた。結果をまとめたものを表 2-3 に示す。

AdhA は、NADP(H) を補酵素とした場合にエタノール生成/酸化の両方向に高い活性を示した。一方で、補酵素を NAD(H) に変更した場合にも両方向の反応を触媒したが、その比活性は NADP(H) を補酵素とした場合に比べて著しく低下した。このことから、AdhA はほぼ NADP(H) 依存的な酵素であることが分かった。同じように NADP(H) 依存的な Adh としては、*Thermococcus hydrothermalis*<sup>24)</sup>、*Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200<sup>26)</sup>、及び *Thermococcus zilligii*<sup>27)</sup> 由来の Adh が報告されている。その一方で、*Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E 由来の primary Adh は、NAD(H) と NADP(H) の両方を補酵素として利用できることが報告されている<sup>25)</sup>。

AdhB は、NADP(H) を補酵素とした場合のエタノール生成方向でのみ活性が検出され、それ以外の反応では活性は検出されなかった。また、その比活性も、AdhA に比べると非常に低かった。

AdhC は、エタノール生成/酸化のどちらに対しても活性は検出されなかった。このことから、AdhC は HUC22-1 株において Adh として機能していない可能性が高いと考えられた。ただし、*E. coli* での発現から抽出、精製を経たことで AdhC が失活している可能性もあるため断定することはできない。

以上のように、今回解析した酵素からはほぼ NADP(H) 依存的な活性しか検出されなかった。しかしながら、以前の研究<sup>16)</sup>において酒井が行った、粗酵素抽出液を用いた活性測定では、NAD(H) を補酵素に用いた場合でも、NADP(H) を補酵素に用いた場合と同程度の Adh 活性が検出されている。このことから、HUC22-1 株には、今回解析したもの以外にも、NAD(H) を利用できる未知の Adh が存在する可能性がある。

Aldh は、アセトアルデヒド生成/酸化の両方向の反応を、同程度に触媒することが分かった。また、NAD(H) を補酵素に用いた場合のほうが、NADP(H) を補酵素に用いた場合よりも比較的高い活性を示したが、その差は AdhA の場合ほど著しくはなかった。このことから、Aldh は NAD(H) と NADP(H) の両方を補酵素として利用できる酵素であることが分かった。同じように NAD(H) と NADP(H) の両方を補酵素として利用できる Aldh としては、*Clostridium acetobutylicum* NRRL B643<sup>30)</sup> 及び *Clostridium beijerinckii* NRRL B592<sup>31)</sup> 由来の Aldh が報告されている。その一方で、*T. ethanolicus* 39E<sup>25)</sup> 及び *Clostridium kluyveri* K-1<sup>32)</sup> 由来の Aldh は、NAD(H) 依存的であると報告されている。

### 2-3-4 精製 Adh、Aldh の kinetic property

2-3-3 で高い活性が検出された各反応について、複数の基質濃度で活性測定を行い、その結果を元に Lineweaver-Burk プロットを行い、 $K_m$  と  $V_{max}$  を求めた。さらに、反応の進み易さの目安である catalytic efficiency ( $V_{max}/K_m$ ) も求めた。反応は、AdhA と AdhB については pH8.0 で行い、補酵素には NADP(H) を用いた。Aldh については pH8.0 で行い、補酵素には NAD(H) を用いた。結果をまとめたものを表 2-4 に示す。AdhA のエタノール生成方向の反応の catalytic efficiency は、エタノール酸化方向のそれに比べておよそ 15 倍も高い値を示した。この事は、AdhA が、エタノール生成方向に反応を進めやすい酵素であることを示唆している。一方で AdhB のエタノール生成方向の反応の catalytic efficiency は、AdhA のそのわずか 64 分の 1 程度であった。Aldh については、アセトアルデヒド生成方向の反応の catalytic efficiency が、アセトアルデヒド酸化方向のそれのおよそ 1.7 倍の値を示した。この事から、Aldh も、

AdhA ほどではないものの、エタノール生成方向に反応を進め易い酵素であると考えられた。これらの傾向は、以前の研究<sup>16)</sup>で酒井が行った、粗酵素抽出液を用いた活性測定の結果とも良く一致する。

表 2-3 精製 Adh、Aldh の酵素活性測定

Reaction	Specific activity (U/mg protein)
<b>AdhA</b>	
Acetaldehyde + NADH + H <sup>+</sup> → Ethanol + NAD <sup>+</sup>	0.049 ± 0.010
Acetaldehyde + NADPH + H <sup>+</sup> → Ethanol + NADP <sup>+</sup>	50.4 ± 3.6
Ethanol + NAD <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADH + H <sup>+</sup>	0.032 ± 0.002
Ethanol + NADP <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADPH + H <sup>+</sup>	11.9 ± 0.6
<b>AdhB</b>	
Acetaldehyde + NADH + H <sup>+</sup> → Ethanol + NAD <sup>+</sup>	ND <sup>a</sup>
Acetaldehyde + NADPH + H <sup>+</sup> → Ethanol + NADP <sup>+</sup>	2.9 ± 0.4
Ethanol + NAD <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADH + H <sup>+</sup>	ND
Ethanol + NADP <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADPH + H <sup>+</sup>	ND
<b>AdhC</b>	
Acetaldehyde + NADH + H <sup>+</sup> → Ethanol + NAD <sup>+</sup>	ND
Acetaldehyde + NADPH + H <sup>+</sup> → Ethanol + NADP <sup>+</sup>	ND
Ethanol + NAD <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADH + H <sup>+</sup>	ND
Ethanol + NADP <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADPH + H <sup>+</sup>	ND
<b>Aldh</b>	
Acetyl-CoA + NADH + H <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NAD <sup>+</sup> + CoA	18.8 ± 2.7
Acetyl-CoA + NADPH + H <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADP <sup>+</sup> + CoA	2.8 ± 0.1
Acetaldehyde + NAD <sup>+</sup> + CoA → Acetyl-CoA + NADH + H <sup>+</sup>	29.9 ± 2.6
Acetaldehyde + NADP <sup>+</sup> + CoA → Acetyl-CoA + NADPH + H <sup>+</sup>	3.7 ± 0.2

<sup>a</sup>ND, not detected (< 0.001).

表 2-4 精製 Adh、Aldh の kinetic property

Substrate	<i>K<sub>m</sub></i> (mM)	<i>V<sub>max</sub></i> (U/mg protein)	<i>V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub></i> (U/mg protein mM)
<b>AdhA</b>			
Acetaldehyde	10.0	58.5	5.85
Ethanol	40.0	15.5	0.388
<b>AdhB</b>			
Acetaldehyde	55.8	5.1	0.091
<b>Aldh</b>			
Acetyl-CoA	1.6	24.8	15.5
Acetaldehyde	4.3	41.3	9.6

### 2-3-5 精製 Adh、Aldh の酵素活性の至適 pH の検討

精製 Adh、Aldh の酵素活性に対する pH の影響を検討し、各反応の至適 pH を調査した。測定の際、AdhA、AdhB については NADP(H) を、Aldh については NAD(H) を補酵素に用いた。測定の結果、AdhA、AdhB のエタノール生成方向、及び Aldh のアセトアルデヒド生成方向の反応の至適 pH はいずれも 8.0 である事が分かった。また、AdhA、エタノール酸化方向、及び Aldh のアセトアルデヒド酸化方向の反応の至適 pH はともに 10.0 である事が分かった。

### 2-3-6 精製 Adh、Aldh に対する温度の影響の検討

精製 Adh、Aldh の酵素活性に対する温度の影響を検討した。測定は、どの酵素も還元反応についてのみ行い、AdhA、AdhB については NADPH を、Aldh については NADH を補酵素に用いた。最も比活性が高かった温度の値を 100% とした場合の各温度における比活性をプロットし、作製したグラフを図 9 に示す。なお、AdhC は、測定したどの温度においても活性は検出されなかった。測定の結果から、AdhA と Aldh の至適温度は、HUC22-1 株の至適生育温度 (55°C~60°C) と同じ 60°C であることが分かった。一方で、AdhB の至適温度は 85°C と非常に高く、本菌の生育温度とはずれていることが分かった。ただし、いずれの酵素も 65°C 以下では比較的安定した (60 分以上) 活性が見られたものの、80°C 以上の温度では反応開始から 5 分以内に活性がほぼ見られなくなった。このことから、いずれの酵素も 80°C 以上の高温域における熱安定性はあまり高くないことが分かった。

### 2-3-7 精製 Adh の基質特異性の解析

AdhA 及び AdhB について、基質特異性の解析を行った。AdhA については酸化/還元 の両方向について、AdhB については活性が見られた還元方向のみについて行った。AdhA、AdhB ともに NADP(H) を補酵素に用いた。アセトアルデヒド及びエタノールを基質とした場合の活性を 100% とし、各基質に対する比活性をまとめたものを表 2-5 及び 2-6 に示す。

還元反応では、AdhA、AdhB ともに、ホルムアルデヒドを除く幅広いアルデヒドを基質として利用できることが分かった。また、一緒に測定した 2-ブタノン は、どちらの酵素も利用できなかった。AdhA、AdhB ともに、最も高い活性を示した基質は *n*-ブチルアルデヒドだった。しかしながら、AdhB ではアセトアルデヒドも *n*-ブチルアルデヒドも同程度の活性を示したのに対し、AdhA ではアセトアルデヒドよりも炭素数の多い *n*-ブチルアルデヒドやイソブチルアルデヒドに対する活性のほうが 4~6 倍も高いという結果になった。

酸化反応では、AdhA がメタノールを除く幅広い第一級アルコールを基質として利用できることが分かった。一方で、第二級、第三級アルコールは全く利用できなかった。また、一緒に測定したアミン類については、エタノールアミンに対してわずかに活性が見られたのみで、ほとんど利用できなかった。最も高い活性を示した基質は、1-ブタノール、2 番目に高かったのはイソブチルアルコールであり、この結果は還元反応の結果と良く一致した。

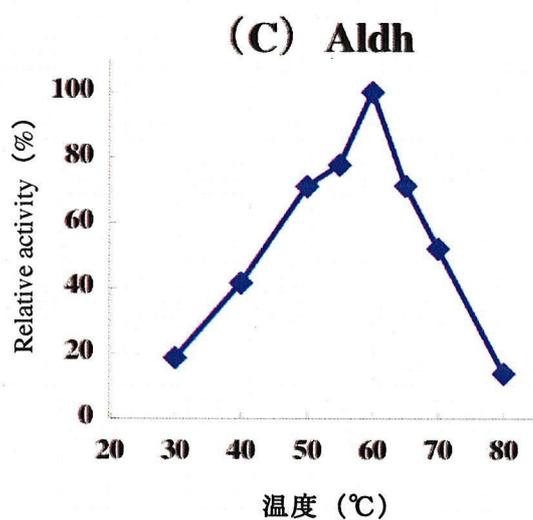
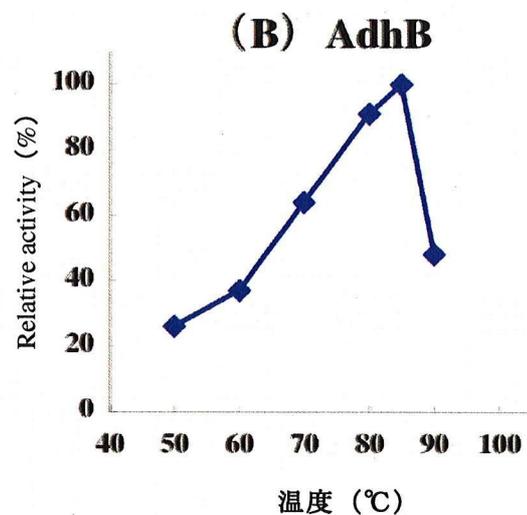
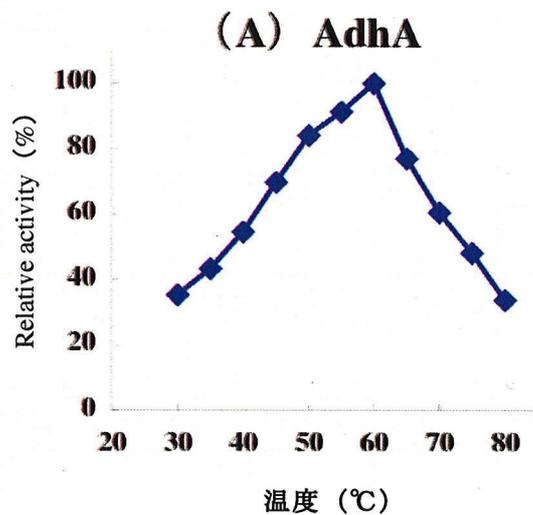


図 9 精製 Adh、Aldh に対する温度の影響の検討

表 2-5 精製 AdhA、AdhB の基質特異性 (還元反応)

Substrate	Relative activity (%)	
	AdhA	AdhB
Formaldehyde	0	0
Acetaldehyde	100	100
Propionaldehyde	50	62
<i>n</i> -Butylaldehyde	625	108
Isobutylaldehyde	469	48
2-Butanone	0	0

表 2-6 精製 AdhA の基質特異性 (酸化反応)

Substrate	Relative activity (%)
Methanol	0
Ethanol	100
1-Propanol	162
1-Butanol	238
2-Propanol	0
2-Butanol	0
<i>t</i> -Butanol	0
Isobutylalcohol	221
Isoamylalcohol	7
1,3-Propandiol	0
2,3-Butandiol	0
Ethanolamine	1
Diethanolamine	0
Triethanolamine	0

### 2-3-8 精製 Adh、Aldh によるアセチル-CoA からのエタノール生産

これまでの実験で比較的高いエタノール生成方向の活性を示した精製 AdhA と精製 Aldh を組み合わせて、アセチル-CoA から直接エタノールを生成する実験を行った。実験は、NADH のみを補酵素とした場合、NADPH のみを補酵素とした場合、及び NADH と NADPH の両方を補酵素とした場合の 3 つについて行い、それぞれの経時変化を追った。各実験について、独立した測定を 3 回ずつ行い、平均値とその標準偏差を求め、エラーバーで表示した。結果を図 10 に示す。NADH のみを補酵素とした場合には、エタノールの生成は全く見られなかった。これは 2-3-3 で示されたように、AdhA が NADH をほとんど利用できないためであると思われる。一方、NADPH のみを補酵素とした場合には、60 分の反応でおよそ 0.7 mM のエタノール生産が見られた。さらに、NADH と NADPH の両方を補酵素とした場合には、反応開始からわずか 10 分で 0.7 mM に達し、最終的に 90 分間でおよそ 1.6 mM のエタノール生成が見られた。以上のことから、これらの酵素による反応系では、利用できる補酵素が NADPH のみでもエタノール生成が可能であること、また NADH と NADPH の両方を利用できる状態であれば、その生産性が大きく向上することが分かった。

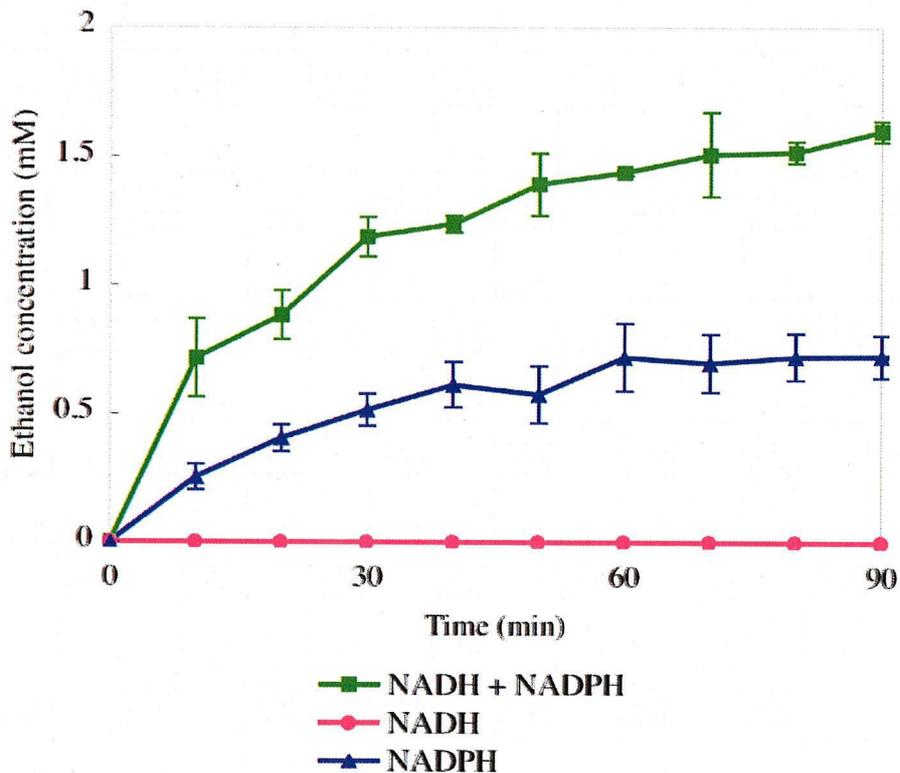


図 10 精製 AdhA、Aldh によるアセチル-CoA からのエタノール生産

#### 第4節 要約

本章では、HUC22-1株由来の AdhA、AdhB、AdhC、及び Aldh を *E. coli* で大量発現して精製し、その特性解析を行った。

AdhA は、ほぼ NADP(H) 依存的な酵素であり、酸化/還元 の両方向に高い活性を示した。また、catalytic efficiency ( $V_{\max}/K_m$ ) から、エタノール生成方向に反応を進め易い酵素であることが分かった。エタノール生成方向の反応の至適 pH は 8.0、エタノール酸化方向の反応の至適 pH 10.0 であり、至適温度は 60 °C だった。最も高い活性を示した基質は *n*-ブチルアルデヒド及び 1-ブタノールであり、アセトアルデヒド及びエタノールよりも明らかに高い活性を示した。

AdhB は、NADP(H) 依存的な酵素であり、還元方向にのみ活性が検出された。また、その比活性は、AdhA に比べると非常に低かった。反応の至適 pH は 8.0 であり、至適温度は 85 °C だった。最も高い活性を示した基質は *n*-ブチルアルデヒドだったが、アセトアルデヒドに対してもほぼ同程度の活性が見られた。

AdhC は、測定したどの pH、温度においても、Adh としての活性が検出されなかったため、HUC22-1 株において Adh として機能していない可能性が高いと考えられた。

Aldh は、NAD(H) と NADP(H) の両方を補酵素として利用でき、アセトアルデヒド生成方向と酸化方向の両方向に活性を示した。また、catalytic efficiency ( $V_{\max}/K_m$ ) から、AdhA と同様エタノール生産方向に反応を進め易い酵素であることが分かった。アセトアルデヒド生成方向の反応の至適 pH は 8.0、アセトアルデヒド酸化方向の反応の至適 pH 10.0 であり、至適温度は 60 °C だった。

さらに、精製 AdhA と精製 Aldh を組み合わせることで、アセチル-CoA からエタノールを生成することも確認した。

## 第3章 HUC22-1株における *adh*、*aldh* の発現レベルの解析

### 第1節 緒言

第2章では、HUC22-1株由来の Adh、Aldh を精製し、その特性を解析した。その結果、AdhA、AdhB、及び Aldh がエタノール生産系の酵素としての活性を持っていることが確認された。しかしながら、これらの酵素が HUC22-1 株の菌体において実際にエタノール生産に関与しているかどうかについては、不明なままである。

Real-time PCR (RT-PCR) は、PCR による増幅を二本鎖 DNA に特異的に挿入して蛍光を発する色素 (SYBR green) を用いて経時的 (リアルタイム) に測定することで、その増幅率に基づいて鋳型となる DNA の定量を行なう分析方法である<sup>33)34)</sup>。これを逆転写 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) と組み合わせることで、ごく少量の mRNA の定量が可能となり、特定の時期、特定の条件の細胞における特定の遺伝子の発現レベルを解析することができるようになる。この組み合わせによる技法が Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) である。序論で述べたように、本菌は、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> を基質とした培養ではエタノールを生産するが、フルクトースを基質とした培養ではエタノールをほとんど生産しない。そこで本章では、エタノール生産性の異なるこの 2 つの基質で培養した菌体の中で、エタノール生産性に連動した *adh* や *aldh* の発現レベル (mRNA 量) の変化が見られれば、本菌が Adh、Aldh を介した経路でエタノールを生産していることの間接的な裏付けになると考え、前述の RTQ-PCR による各遺伝子の発現レベルの解析を行った。

### 第2節 方法

#### 3-2-1 HUC22-1 株のトータル RNA の抽出

酒井がおこなった解析<sup>16)</sup>より、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> を基質とした回分培養において HUC22-1 株が最も多くエタノールを生産するのは、対数増殖期が終了し、細胞の増殖が止まるころ (定常期初期) であることが分かっている。そこでまず、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> あるいはフルクトースを基質として定常期初期まで培養した菌体からトータル RNA を抽出した。なお、RNA は DNA と比較すると非常に不安定な物質であるため、抽出には RNase free な器具、試薬を用い、RNase の混入が起こらないよう細心の注意を払った。

定常期初期の培養液から、培養液の OD<sub>660</sub> × 液量 (ml) = 4.0 になるように菌体を回収し、ISOGEN (Wako) とガラスビーズ (Lysing Matrix B, Q-BIOgene) を用いて、参考文献 35 の抽出法に従い、トータル RNA を抽出した。得られたトータル RNA は、RNase free DNase I (Takara Bio) を用いて、添付のマニュアルに従い混入ゲノム DNA を除去した後、25 µl の diethyl pyrocarbonate-treated sterile distilled water (DEPC water) に溶解し、-80°C に保存した。また、分光光度計 (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) の RNA 定量モードで濃度と純度 (A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> ratio > 1.8) を確認した。さらに、Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version, Takara Bio) と表 3-3 に示す *adhA*-1、*adhA*-2 プライマーを用いて PCR を行い、0.7% アガロースゲル電気泳動でゲノム DNA のコンタミネーションがないことを確認した。PCR 反応液組成と反応条件を表 3-1 に示す。

表 3-1 DNA コンタミネーション確認のための PCR の反応液組成と反応条件

Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version)	25 $\mu$ l
HUC22-1 株トータル RNA (0.05 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l
Primer <i>adhA</i> -1 (10 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
Primer <i>adhA</i> -2 (10 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
4°C	$\infty$	

### 3-2-2 逆転写反応による cDNA 合成

3-2-1 で得られたトータル RNA 200 ng から、逆転写反応により cDNA を合成した。cDNA 合成は、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて、添付のマニュアルに従い行った。cDNA 合成のためのプライマーには、上記の Kit に付属のランダムヘキサマープライマーを用いた。得られた cDNA は-20°Cに保存した。

### 3-2-3 RTQ-PCR による遺伝子発現レベルの解析

3-2-2 で合成された cDNA を鋳型に、RTQ-PCR による各遺伝子の発現レベルの解析を行った。参考文献 36,37 の手法に従い、以前の研究<sup>16</sup>で酒井が pGEM®-T Easy vector にクローニングし (pGEM-16S)、配列を決定した本菌の 16S rRNA を各サンプルの内部標準として用いた。また、各遺伝子がクローニングされたプラスミド (pGEM-*adhA*, pGEM-*adhB*, pGEM-*adhC*, pGEM-*aldh*, 及び pGEM-16S) を制限酵素で切断し直鎖状にしたものを、 $10^2$ ~ $10^8$  copies  $\mu$ l<sup>-1</sup> になるように 10 倍ずつ希釈し、各遺伝子の外部標準系列とし、検量線を求めた。PCR と、PCR 産物のリアルタイム測定には、LightCycler® (Roche) 及び LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I キット (Roche) を用いた。PCR 反応液組成と反応条件を表 3-2 に、各遺伝子に対して用いたプライマーの配列を表 3-3 に示す。反応終了後の反応液はすべて 2%アガロースゲル電気泳動にかけ、目的のサイズ以外の断片の非特異的増幅が起きていないことを確認した。

表 3-2 RTQ-PCR の反応液組成と反応条件

dH <sub>2</sub> O	11.6 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.4 μl
Primer F (10 pmol μl <sup>-1</sup> )	1 μl
Primer R (10 pmol μl <sup>-1</sup> )	1 μl
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	2 μl
cDNA or standard DNA	2 μl
Total	20 μl

変性	95°C	10 min
	94°C	15 sec (temperature transition 20°C s <sup>-1</sup> )
増幅 (45 cycles)	60°C	5 sec (temperature transition 20°C s <sup>-1</sup> )
	72°C	10 sec (temperature transition 20°C s <sup>-1</sup> )
融解曲線解析	65°C→95°C (temperature transition 0.1°C s <sup>-1</sup> )	
冷却	4°C	30 sec (temperature transition 20°C s <sup>-1</sup> )

表 3-3 RTQ-PCR に用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')	Accession number	Localization
<i>adhA-1</i>	CGGCCGTAGTCAAGCAGATT	This study	899
<i>adhA-2</i>	TGGCCGCCTTTTCTGCTTCA	This study	1,009
<i>adhB-1</i>	ATCCTCTAACCTTCAGCCAC	This study	794
<i>adhB-2</i>	AAAACAGTCAGGATGCGAGC	This study	914
<i>adhC-1</i>	TTGCCGAAGTAATGGCCATC	This study	710
<i>adhC-2</i>	AAGGAAACCAGGACCATGAC	This study	839
<i>aldh-1</i>	AAACCCCACTTACAGCATGC	This study	226
<i>aldh-2</i>	GTTGACACATGGTACCACGT	This study	327
<i>16S-1</i>	TGTAGCGGTGAAATGCGTAG	AB127110	697
<i>16S-2</i>	TAATCCTGTTTGTCCCCAC	AB127110	803

※Localization は、16S 以外については各遺伝子の ORF の 5' 末端側を 1 とした場合における各プライマー配列の位置。16S については Genbank に登録されている配列内における各プライマー配列の位置。

### 第3節 結果及び考察

#### 3-3-1 RTQ-PCRによる遺伝子の発現レベルの解析

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>を基質として培養した菌体（エタノールを生産）と、フルクトースを基質として培養した菌体（エタノール非生産）から、それぞれRNAを抽出し、RTQ-PCRによって各培養条件における*adhA*、*adhB*、*adhC*及び*aldh*の発現レベルの解析を行った。発現レベルは、内部標準である16S rRNAとの比として求めた。各遺伝子、各条件について、菌体を培養する段階から独立した解析を3回ずつ行い、平均値とその標準偏差を求めた。結果を図11に示す。

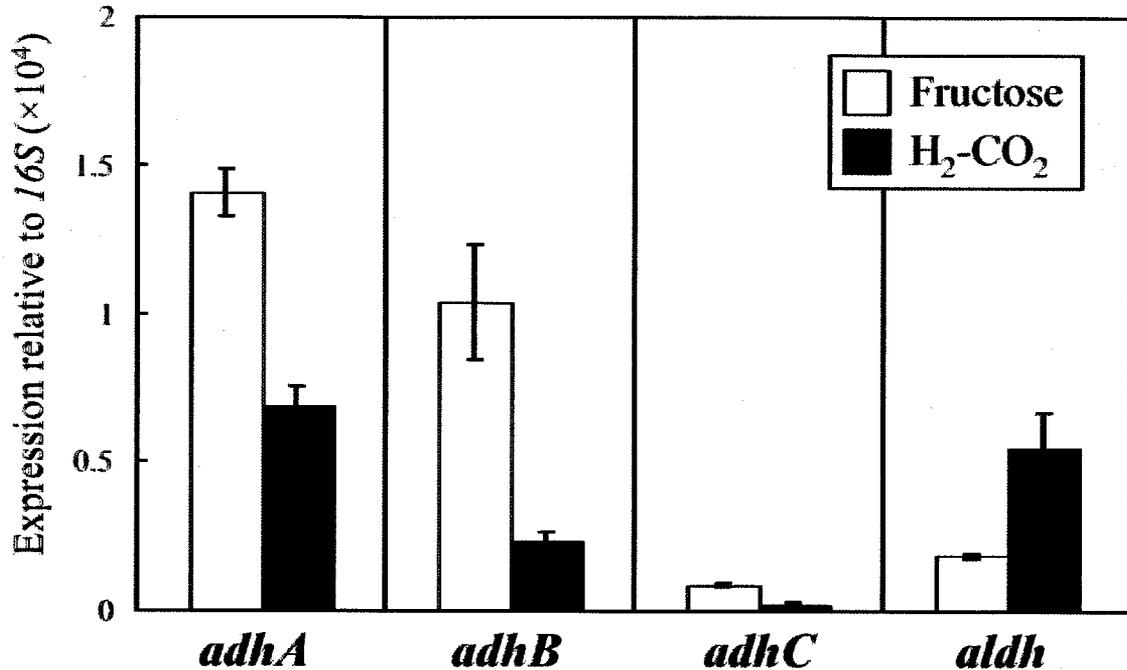
*adhA*の発現レベルは、エタノール非生産条件であるフルクトース培養のほうが、エタノール生産条件であるはずのH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養よりもおよそ2倍高かった。しかしながら、*adhB*、*adhC*に比べれば、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養時でも比較的高い発現レベルを保っていた。表2-4に示したkinetic efficiency ( $V_{max}/K_m$ )の高さも併せて考えると、*adhA*が本菌のエタノール生産に関与している可能性は高いと考えられた。

*adhB*の発現レベルも、フルクトース培養のほうが、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養よりもおよそ4倍高かった。加えて、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養時の発現レベルが*adhA*のおよそ3分の1しかないことから、*adhB*が本菌のエタノール生産に関与している可能性は*adhA*に比べると低いと考えられた。

*adhC*の発現レベルは、フルクトース培養でもH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養でも他の2つの*adh*に比べて非常に低かった。このことから、*adhC*は本菌のエタノール生産とは無関係である可能性が高いと考えられた。

以前の研究<sup>16)</sup>において酒井が行った、粗酵素抽出液を用いた活性測定の結果では、NADPHを補酵素に用いた場合、Adhのエタノール生産方向の活性はH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養時にフルクトース培養時の約3倍に増大したとされている。今回測定されたAdhAとAdhB（いずれもNADPH依存的）の発現レベルは、この酒井の結果と逆の傾向を示した。酒井の実験は粗酵素抽出液を用いたものであり、一概に今回の結果と比較することはできないが、本菌がAdhとしての活性を持つ未発見の酵素を持っている可能性はあると思われる。

*aldh*の発現レベルは、前述の3つの*adh*とは対照的に、エタノール生産条件であるH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養のほうが、エタノール非生産条件であるフルクトース培養よりもおよそ3倍高かった。以前の研究<sup>16)</sup>において酒井が行った、粗酵素抽出液を用いた活性測定でも、Aldhについて同様の傾向が見られている。そのため、*aldh*が本菌のエタノール生産に関与している可能性は非常に高いと考えられた。*aldh*は、我々が予想する本菌のエタノール生産経路（図4）の入り口に当たる遺伝子である。その遺伝子の発現レベルがエタノール生産時に増大するということは、本菌においてエタノールの生産が転写レベルで制御されていることを示唆している。この結果は、本菌がアセチル-CoAからAldh、Adhを介してエタノールを生産しているという我々の予想を強く支持するものである。



※各遺伝子の発現レベルを、内部標準である *16S* との比で示した。ただし、*16S* はその発現量が膨大であったため、値が使用機器の分析可能範囲に収まるように、RTQ-PCR の鋳型に用いる cDNA を  $1/10^4$  に希釈して測定を行った。

図 11 RTQ-PCR による各遺伝子の発現レベルの解析

#### 第4節 要約

本章では、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養の菌体（エタノールを生産）と、フルクトース培養の菌体（エタノール非生産）からそれぞれ RNA を抽出し、RTQ-PCR によって各培養条件における *adhA*、*adhB*、*adhC* 及び *aldH* の発現レベルの解析を行った。

*adhA* の発現レベルは、エタノール非生産条件であるフルクトース培養のほうが、エタノール生産条件であるはずの H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養よりもおよそ 2 倍高かったが、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養時でも比較的高い発現レベルを保っており、*adhA* が本菌のエタノール生産に関与している可能性は高いと考えられた。

*adhB* の発現レベルも、フルクトース培養のほうが、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養よりもおよそ 4 倍高かった。加えて、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養時の発現レベルが *adhA* のおよそ 3 分の 1 しかないことから、*adhB* が本菌のエタノール生産に関与している可能性は *adhA* に比べると低いと考えられた。

*adhC* の発現レベルは、フルクトース培養でも H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養でも他の 2 つの *adh* に比べて非常に低かった。そのため、*adhC* は本菌のエタノール生産とは無関係である可能性が高いと考えられた。

*aldH* の発現レベルは、エタノール生産条件である H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養のほうが、エタノール非生産条件であるフルクトース培養よりもおよそ 3 倍高かった。そのため、*aldH* が本菌のエタノール生産に関与している可能性は非常に高いと考えられた。これにより、アセチル-CoA からの AldH、Adh を介したエタノール生産経路が強く支持された。

## 第2部 各基質における代謝特性の解析

### 第4章 各基質における回分培養と、エネルギー代謝の比較

#### 第1節 緒言

第1部での研究により、HUC22-1株がアセチル-CoAからAldh、Adhを介してエタノールを生産している可能性が高いことが示された。しかしながら、この場合エタノール生産経路と酢酸生産経路はアセチル-CoAから枝分かれしていることになり、今後分子生物学的手法によってエタノール生産経路を増強させた場合に、酢酸生産経路に基づくATP生産への影響が懸念される。そのため、本菌の代謝についてより詳細に調べる必要があると考えられた（Wood-Ljungdahl pathway以外のATP生成経路はあるのか、ガス基質以外でエタノール生産が可能な基質はあるのか、など）。そこで本章では、各種の有機酸を基質として本菌の培養を行い、本菌のエネルギー代謝特性の解析を行った。

#### 第2節 方法

##### 4-2-1 各基質における回分培養

回分培養の基本培地組成は1-2-1のものを用い、回分培養の方法は1-2-2に従った。なお、yeast extract無しの完全合成培地で培養を行う場合には、1-2-1の培地組成からyeast extractを削除したものを用いた。フルクトースの代わりに加える各基質の終濃度は、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸については20 mM、L-リンゴ酸については40 mMで行った。いずれの培養も、フルクトースを基質として対数増殖期まで増殖させた前培養液を5% (v/v)濃度で植菌し、その後それぞれの基質で2-3回継代してから本培養を行った。グリコール酸については、フルクトースを基質とした前培養液では増殖しなかったため、グリオキシル酸を基質とした培養液を前培養液に用いて、上記と同様に2-3回継代してから本培養を行った。シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、L-リンゴ酸の基質溶液は、以下の手順で調整した。

##### Substrate solution

Potassium oxalate · H <sub>2</sub> O	} いずれかを400 mMになるように MilliQ water 100 ml に溶解
Glyoxylic acid · H <sub>2</sub> O	
Glycolic acid	
Sodium L-malate	

pHを6.0付近に調整

N<sub>2</sub>を注入しつつ氷中で30分間冷却

0.45 μm フィルターで濾過滅菌しつつ、N<sub>2</sub>を注入した滅菌済みバイアル瓶に注入

##### 4-2-2 各基質、及び生産物の測定

シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、リンゴ酸の消費量、及び酢酸、エタノールの生産量は high performance liquid chromatography (HPLC) によって測定した。HPLCのシステムは、PU-2080 Plus

(HPLC pump)、RI-2031 Plus (RI detector)、CO-2065 Plus (column oven)、AS-2057 Plus (auto sampler) を用いた (いずれも JASCO)。移動相は 0.1% (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を使い、 $0.7 \text{ ml min}^{-1}$  の流速で流した。HPLC カラムには、RSpak KC-811 (Shodex) を用いた。また、ガードカラムとして RSpak KC-G (Shodex) を HPLC カラムの前に設置した。カラムオープンの温度は、 $60^\circ\text{C}$  に設定した。培養液を 13,200 rpm で 5 分間遠心して菌体を沈殿させた後、上清を  $0.45 \mu\text{m}$  の Cellulose acetate hydrophilic filter (Dismic<sup>®</sup>-13CP) で濾過したものをサンプルとした。次に、このサンプル及び標準液 (各成分 10 mM) に、内部標準として 20 mM のクロトン酸を含む 0.2% (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を 1:1 で混合し、測定を行った。Auto sampler の injecton volume は、 $20 \mu\text{l}$  とした。

#### 4-2-3 乾菌体重量の測定

以前の研究において酒井が行った実験から、HUC22-1 株の乾菌体重量と  $\text{OD}_{660}$  は以下の式 4-1 の関係にあることが分かっている<sup>15)</sup>。本研究で示す乾菌体重量はすべて、培養液の  $\text{OD}_{660}$  を式 4-1 に当てはめて求めた。

$$\text{Dry cell weight (g l}^{-1}\text{)} = \text{OD}_{660} \times 0.46 \quad (4-1)$$

### 第 3 節 結果及び考察

#### 4-3-1 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 培養とグリオキシル酸培養のエネルギー代謝の比較

$\text{H}_2\text{-CO}_2$ 、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、L-リンゴ酸を用いて HUC22-1 株の回分培養を行った結果と、それに基づいて算出した  $Y_{X/S}$  を表 4-1 と 4-2 に示す。yeast extract の有無に関わらず、本菌は、今回検討したすべての有機酸を基質として利用することができた。しかしながらどの有機酸を基質にした場合にもエタノールの生産は見られなかった。

yeast extract 有りの  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養では、基質消費当たりの増殖収率 ( $Y_{X/S}$ ) は  $0.68 \text{ g mol}^{-1}$  であった。それに対し、yeast extract 有りのグリオキシル酸培養では、 $Y_{X/S}$  は  $11.7 \text{ g mol}^{-1}$  と明らかに高い値を示した。仮に本菌が、以下の反応 (式 4-2) によってグリオキシル酸を最終的に  $\text{H}_2$  と  $\text{CO}_2$  に分解し、主に Wood-Ljungdahl pathway (図 3) を用いて代謝しているなら、1 mol のグリオキシル酸は 2 mol の  $\text{H}_2$  に相当するはずなので、グリオキシル酸培養時における  $Y_{X/S}$  は  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養時のおよそ 2 倍になるはずである。しかしながら、実際にはそれを大きく上回る値となった。また、酵母エキスを含まない完全合成培地で回分培養を行った場合にも同じ傾向を示した (表 4-2)。このことから、本菌が Wood-Ljungdahl pathway 以外に、グリオキシル酸培養時に働く未知の ATP 生成経路を持っていることが示唆された。この仮説は、ATP 加水分解における自由エネルギー変化 ( $\Delta G^0 = -31.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ )<sup>38)</sup> と、以下の反応 (式 4-2) によるグリオキシル酸の  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  への分解における自由エネルギー変化に基づく計算によっても支持される。



これらの値から計算すると、理論的には、1 mol のグリオキシル酸の  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  への分解を通じて、1.1 mol の ATP が追加で得られることになる。以前、*M. thermoacetica* によるヘキソース発酵の研究において、

Andreesen らは基質消費当たりの細胞収率の計算に  $Y_{ATP} = 10.5$  を用い、未知の ATP 源を推測していた<sup>76)</sup>。グリオキシル酸はヘキソースよりも単純な基質なので、グリオキシル酸培養での  $Y_{ATP}$  は、ヘキソースを基質とした場合のそれよりも低い可能性がある。一方で、*Acetobacterium woodii* の yeast extract 有りの  $H_2-CO_2$  培養における  $Y_{ATP}$  は、4.3 と計算されている<sup>39)</sup>。これらのことをふまえて、仮に、本菌における yeast extract 有りのグリオキシル酸培養における  $Y_{ATP}$  が 4.3–10.5 の間だとすると、その場合の  $Y_{ATP/S}$  は、2.7–1.11 の間と計算される。この、 $Y_{ATP} = 10.5$  とした場合の  $Y_{ATP/S} = 1.11$  は、前述のグリオキシル酸からの ATP の理論収率と良く一致する値である。

#### 4-3-2 HUC22-1 株におけるグリオキシル酸代謝経路

グリオキシル酸を分解する経路はこれまでにいくつか報告されている。他の嫌気性細菌と  $Y_{X/S}$  を比較した結果から、我々は、本菌のグリオキシル酸代謝経路の候補として、グリオキシル酸資化性細菌 *Syntrophobotulus* 関連菌などで提案されているマリル-CoA 経路<sup>40)</sup>を選んだ (図 12)。1 mol のグリオキシル酸がマリル-CoA 経路で 2 mol の  $CO_2$  に酸化される時、同時に 2 mol の電子受容体が還元される。 $CO_2$  の酢酸への還元には化学量論的に 2 mol の還元当量が使用されるので、1 mol のグリオキシル酸の酸化を通じて 0.5 mol の酢酸が生産されるはずである。本菌の yeast extract 有りのグリオキシル酸回分培養では、消費されたグリオキシル酸 1 mol 当たり 0.46 mol の酢酸が生産されており (表 4-1)、これは前述の理論値と良く一致する値である。さらに、マリル-CoA 経路は、malyI-CoA lyase/malyI-CoA synthetase の反応と共役した基質レベルのリン酸化によって、1 mol のグリオキシル酸を分解する間に 1 mol の ATP を合成できる。

#### 4-3-3 L-リンゴ酸を基質とした HUC22-1 株の培養

もし本菌においてグリオキシル酸がマリル-CoA 経路によって酸化されているなら、本菌はマリル-CoA 経路の中間代謝物である L-リンゴ酸を利用できるはずである。しかしながら、*Moorella* 属の細菌が L-リンゴ酸を資化したという報告はこれまで無い<sup>41)</sup>。そこで、我々は、L-リンゴ酸を基質とした本菌の回分培養を行った。その結果、本菌は、60 時間で 20.2 mM の L-リンゴ酸を消費し、27.6 mM の酢酸を生産した (表 4-1)。消費された L-リンゴ酸当たりの酢酸収率は  $1.36 \text{ mol mol}^{-1}$  であった。この値は *A. malicum* の L-リンゴ酸培養で得られた値に近い<sup>42)</sup>。

#### 4-3-4 グリコール酸とシュウ酸を基質とした HUC22-1 株の培養

本菌は、グリコール酸とシュウ酸も資化できた (表 4-1 及び 4-2)。yeast extract のグリコール酸、シュウ酸を基質とした回分培養時の  $Y_{X/S}$  は、それぞれ 7.02 及び  $5.64 \text{ g mol}^{-1}$  であった。これらの値もまた、 $H_2-CO_2$  培養時のそれ (0.68) に比べて明らかに高い値であった。この結果もまた、グリオキシル酸培養と同様に、Wood-Ljungdahl pathway 以外の ATP 生成経路の存在を示唆するものであった。

表 4-1 各基質による HUC22-1 株の回分培養の結果 (酵母エキス有り)

Substrate	Culture time (h)	Dry cell (g l <sup>-1</sup> )	Substrate degraded (mM)	Product formed (mM)		Acetate yield per substrate (Y <sub>P/S</sub> ) (mol mol <sup>-1</sup> )	Cell yield per substrate (Y <sub>X/S</sub> ) (g mol <sup>-1</sup> )	Electron recovery (R <sub>e</sub> <sup>a</sup> ) (%)
				Acetate	Ethanol			
Glyoxylate	72	0.15±0.01	12.8±1.0	5.8±0.7	N.D.	0.46±0.02	11.7±0.06	91±3
Glycolate	72	0.12±0.01	17.5±0.7	11.1±1.2	N.D.	0.64±0.05	7.02±0.31	85±6
Oxalate	72	0.11±0.02	19.3±1.7	4.2±0.5	N.D.	0.22±0.01	5.64±0.54	86±2
L-Malate	60	0.16±0.01	20.2±0.3	27.6±0.3	N.D.	1.36±0.02	7.80±0.36	91±2
H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	108	0.17±0.01	260±20 (H <sub>2</sub> )	56.7±2.1	1.5±0.3	0.22±0.01 (H <sub>2</sub> )	0.68±0.04 (H <sub>2</sub> )	92±5

N.D., no compound was detected.

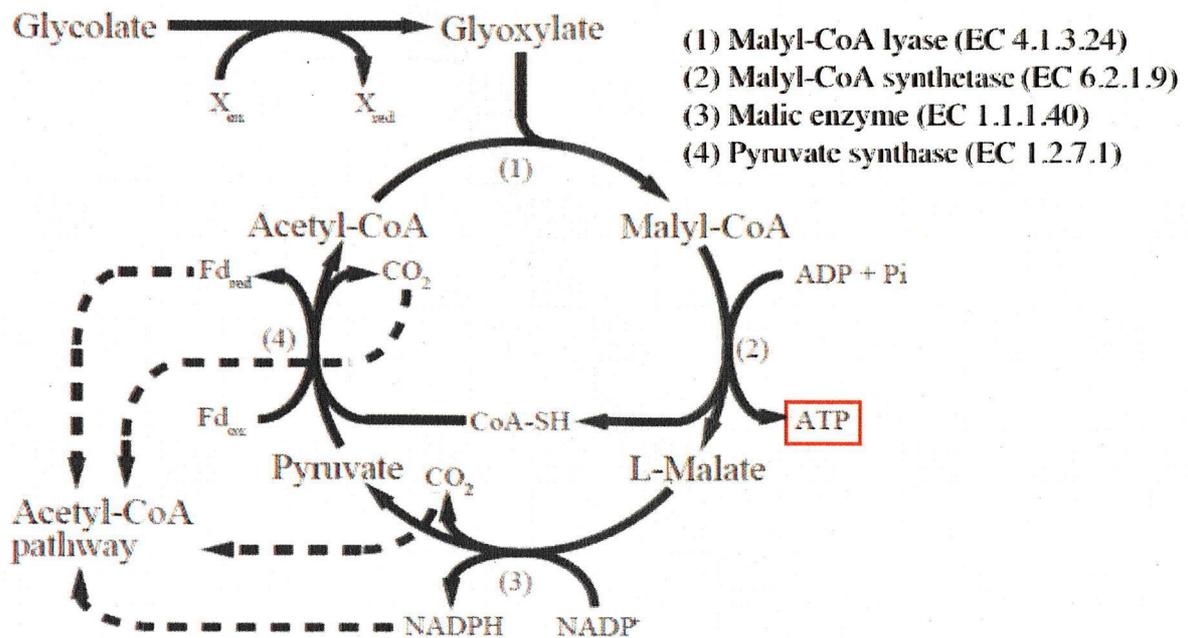
<sup>a</sup>Electron recovery was calculated from electron equivalents of substrate and products.

表 4-2 各基質による HUC22-1 株の回分培養の結果 (酵母エキス無し)

Substrate	Culture time (h)	Dry cell (g l <sup>-1</sup> )	Substrate degraded (mM)	Product formed (mM)		Acetate yield per substrate (Y <sub>P/S</sub> ) (mol mol <sup>-1</sup> )	Cell yield per substrate (Y <sub>X/S</sub> ) (g mol <sup>-1</sup> )	Electron recovery (R <sub>e</sub> <sup>a</sup> ) (%)
				Acetate	Ethanol			
Glyoxylate	96	0.075±0.006	25.9±2.7	4.8±0.4	N.D.	0.19±0.01	2.89±0.27	37±2
Glycolate	72	0.074±0.011	18.1±1.1	10.6±0.6	N.D.	0.59±0.03	4.12±0.88	78±4
Oxalate	72	0.058±0.002	12.9±0.6	2.0±0.2	N.D.	0.16±0.01	4.47±0.09	62±2
L-Malate	60	0.073±0.005	14.2±0.5	17.7±1.4	N.D.	1.25±0.07	5.14±0.22	83±5
H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	48	0.067±0.007	98±8 (H <sub>2</sub> )	24.4±3.1	N.D.	0.25±0.01 (H <sub>2</sub> )	0.68±0.02 (H <sub>2</sub> )	99±5

N.D., no compound was detected.

<sup>a</sup>Electron recovery was calculated from electron equivalents of substrate and products.



※Fd<sub>ox</sub>: oxidized ferredoxin, Fd<sub>red</sub>: reduced ferredoxin, X: unidentified electron acceptor

図 12 HUC22-1 株におけるグリオキシル酸、グリコール酸の予想代謝経路

#### 第4節 要約

本章では、各種の有機酸を基質として HUC22-1 株の回分培養を行い、本菌のエネルギー代謝特性の解析を行った。その結果、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 以外の基質（シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、L-リンゴ酸）を用いた培養では、残念ながらエタノール生産は見られなかった。一方で、グリオキシル酸培養時における Y<sub>X/S</sub> が H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養時のそれを大きく上回る値となったことから、本菌が Wood-Ljungdahl pathway 以外に、グリオキシル酸培養時に働く未知の ATP 生成経路を持っていることが示唆された。また、他の嫌気性細菌と Y<sub>X/S</sub> を比較した結果から、本菌のグリオキシル酸代謝経路の候補としてマリル-CoA 経路（図 12）が挙げられた。

## 第5章 HUC22-1株のグリオキシル酸代謝経路の酵素的解析

### 第1節 緒言

第4章での解析から、HUC22-1株が未知のATP生産経路を持っていること、及びその経路がマリンル-CoA経路(図12)である可能性が高いことが示唆された。この経路は、malyl-CoA lyase (EC 4.1.3.24)、malyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.9)、malic enzyme (EC 1.1.1.40)、pyruvate synthase (EC 1.2.7.1)の4つの酵素によって構成されている。もし本菌がこの経路によって実際にグリオキシル酸を代謝しているなら、グリオキシル酸で培養した菌体ではこれらの酵素の活性が検出されるはずである。そこで本章では、様々な基質で培養した本菌の菌体から粗酵素液を抽出し、マリンル-CoA経路に関わる酵素の活性測定を行い、その活性を比較した。

### 第2節 方法

#### 5-2-1 HUC22-1株の粗酵素液の抽出

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、及びリンゴ酸を基質とした yeast extract 有りの培地で、HUC22-1株を55°Cで対数増殖中期までそれぞれ培養した。なお、この培養は720 ml容量のバイアル瓶を用いて培養液量を150 mlにスケールアップして行った。得られた培養液150 mlを3,000 rpm、15分間遠心して上清を除去し、菌体を回収した。菌体を5 mlの洗浄バッファー [100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)]に再懸濁し、3,000 rpm、15分間遠心して上清を除去した。この洗浄を計2回繰り返した後、菌体を1 mlの抽出バッファー [100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 5 mg ml<sup>-1</sup> lysozyme, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.18 mg ml<sup>-1</sup> PMSF]に再懸濁し、37°C、30分間振とうし、タンパクを溶出させた。13,200 rpm、15分間遠心して沈殿を除去し、上清を粗酵素液として回収した。粗酵素液のタンパク濃度は、2-2-4で示した方法による比色定量で確認した。

#### 5-2-2 Malyl-CoA lyaseの酵素活性測定

本章で行う反応はすべて、45°Cに保温した吸光光度計 (UV-1600, 島津製作所) にセットしたキュベットで行った。malyl-CoA lyaseの酵素反応は、Herterらの方法<sup>43)</sup>を元に、以下の組成の反応液で行った(反応温度45°C)。反応を開始して30秒後に反応液から25 µlをサンプリングし、氷中で冷却して反応を停止させた。これに、3.5 mMのphenylhydrazinium chlorideを含む200 mM MOPS-KOH buffer (pH 7.5)を0.975 ml添加して室温で15分間放置し、生成されたglyoxylate phenylhydrazoneの量をA<sub>324 nm</sub>から測定した。glyoxylate phenylhydrazoneのモル吸光係数はε<sub>324</sub>=15,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>として計算した<sup>44)</sup>。初発の吸光度との差から、消費されたglyoxylateの量を算出し、酵素活性を決定した。なお、1 U=1分間に1 µmolのglyoxylateを消費する活性量と定義した。

Malyl-CoA lyase (glyoxylate + acetyl-CoA → L-malyl-CoA)		
200 mM MOPS-KOH buffer (pH 7.5)	0.8 ml	(160 mM)
400 mM MgCl <sub>2</sub>	10 μl	(4 mM)
400 mM glyoxylate (pH 6)	5 μl	(2 mM)
40 mM acetyl-CoA	100 μl	(4 mM)
粗酵素液	100 μl	

※粗酵素液を添加して反応スタート

※括弧内は終濃度

### 5-2-3 Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase 系の酵素活性測定

Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase の2つの酵素による反応系は、以下の組成の反応液で行った(反応温度 45°C)。反応を開始して5分後に反応液から25 μlをサンプリングし、氷中で冷却して反応を停止させた。サンプリングした反応液のATP濃度を、ATP bioluminescence assay kit CLS II (Roche)を用いて、付属のマニュアルに従い測定した。蛍光強度の測定には、Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer)を使用した。アセチル-CoAを添加せずに行った場合(コントロール)とのATP濃度の差から、生成されたATPの量を算出し、酵素活性を決定した。なお、1 U=1分間に1 μmolのATPを生成する活性量と定義した。

Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase (glyoxylate + acetyl-CoA + ADP + Pi → L-malate + CoA + ATP)		
100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)	0.7 ml	(70 mM)
400 mM MgCl <sub>2</sub>	25 μl	(10 mM)
400 mM glyoxylate (pH 6)	5 μl	(2 mM)
40 mM acetyl-CoA	100 μl	(4 mM)
50 mM ADP	100 μl	(5 mM)
粗酵素液	100 μl	

※粗酵素液を添加して反応スタート

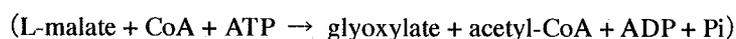
※コントロールの場合は acetyl-CoA の代わりに MilliQ water を添加

※括弧内は終濃度

### 5-2-4 Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase 系(逆反応)の酵素活性測定

Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase の2つの酵素による反応系の逆反応は、Tuboi と Kikuchi の方法<sup>45)</sup>を元に、以下の組成の反応液で行った(反応温度 45°C)。反応開始後の glyoxylate phenylhydrazone の生成の伴う  $A_{324\text{ nm}}$  の変化(傾き)をグラフから読み取り、それを元に反応速度(初速度)を算出し、酵素活性を決定した。なお、glyoxylate phenylhydrazone のモル吸光係数は  $\epsilon_{324}=15,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として計算した<sup>44)</sup>。また、1 U=1分間に1 μmolの glyoxylate を生成する活性量と定義した。

Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase (逆反応)



900 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)	0.5 ml	(150 mM)
120 mM MgCl <sub>2</sub>	0.25 ml	(10 mM)
6 mM CoA	0.25 ml	(0.5 mM)
30 mM ATP	0.5 ml	(5 mM)
18 mM phenylhydrazine-HCl	0.5 ml	(3 mM)
1 M DTT	3 μl	(1 mM)
粗酵素液	50~100 μl	
dH <sub>2</sub> O	400~450 μl	
150 mM L-malate	0.5 ml	(25 mM)

※L-malate を添加して反応スタート

※括弧内は終濃度

5-2-5 Malic enzyme の酵素活性測定

Malic enzyme の酵素反応は、Stams らの方法<sup>46)</sup>を元に、以下の組成の反応液で行った(反応温度 45°C)。反応開始後の  $A_{340\text{nm}}$  の変化(傾き)をグラフから読み取り、それを元に反応速度(初速度)を算出し、酵素活性を決定した。なお、NAD 及び NADP のモル吸光係数は  $\epsilon_{340}=6,220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として計算した<sup>29)</sup>。また、1 U=1 分間に 1 μmol の NAD(P)H を生成する活性量と定義した。

Malic enzyme (L-malate + NAD(P) <sup>+</sup> → pyruvate + CO <sub>2</sub> + NAD(P)H)		
900 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)	0.5 ml	(150 mM)
120 mM MgCl <sub>2</sub>	0.25 ml	(10 mM)
1 mM NAD(P) <sup>+</sup>	0.5 ml	(0.17 mM)
1 M DTT	3 μl	(1 mM)
粗酵素液	50~100 μl	
dH <sub>2</sub> O	1.35~1.4 ml	
150 mM L-malate	0.3 ml	(15 mM)

※L-malate を添加して反応スタート

※括弧内は終濃度

### 5-2-6 Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase/malic enzyme 系の酵素活性測定

Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase/malic enzyme の3つの酵素による反応系は、以下の組成の反応液で行った（反応温度 45°C）。反応開始後の  $A_{340\text{ nm}}$  の変化（傾き）をグラフから読み取り、それを元に反応速度（初速度）を算出し、酵素活性を決定した。なお、NAD 及び NADP のモル吸光係数は  $\epsilon_{340}=6,220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として計算した<sup>29)</sup>。また、1 U=1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の NAD(P)H を生成する活性量と定義した。

Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase/malic enzyme (glyoxylate + acetyl-CoA + NAD(P) <sup>+</sup> + ADP + Pi → pyruvate + CO <sub>2</sub> + NAD(P)H + CoA + ATP)		
600 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)	0.5 ml	(100 mM)
120 mM MgCl <sub>2</sub>	0.25 ml	(10 mM)
1 mM NAD(P) <sup>+</sup>	0.5 ml	(0.17 mM)
30 mM ADP	0.5 ml	(5 mM)
90 mM glyoxylate (pH 6)	0.5 ml	(15 mM)
1 M DTT	3 $\mu\text{l}$	(1 mM)
粗酵素液	50~100 $\mu\text{l}$	
dH <sub>2</sub> O	150~200 $\mu\text{l}$	
3 mM acetyl-CoA	0.5 ml	(0.5 mM)

※Acetyl-CoA を添加して反応スタート

※括弧内は終濃度

### 5-2-7 Pyruvate synthase の酵素活性測定

Pyruvate synthase の酵素反応は、Odom と Peck の方法<sup>40)</sup>を元に、以下の組成の反応液で行った（反応温度 45°C）。反応開始後の benzyl viologen (BV) の還元に伴う  $A_{578\text{ nm}}$  の変化（傾き）をグラフから読み取り、それを元に反応速度（初速度）を算出し、酵素活性を決定した。なお、benzyl viologen のモル吸光係数は  $\epsilon_{578}=8,650\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として計算した。また、1 U=1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  のアセチル-CoA を生成する活性量と定義した。

Pyruvate synthase (pyruvate + CoA + BV <sub>ox</sub> → acetyl-CoA + CO <sub>2</sub> + BV <sub>red</sub> )		
600 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)	0.5 ml	(100 mM)
6 mM BV	0.1 ml	(0.2 mM)
6 mM CoA	0.5 ml	(1 mM)
1 M DTT	3 $\mu\text{l}$	(1 mM)
粗酵素液	5~10 $\mu\text{l}$	
dH <sub>2</sub> O	1.7 ml	
120 mM pyruvate	0.2 ml	(8 mM)

※Pyruvate を添加して反応スタート

※括弧内は終濃度

### 5-2-8 Glyoxylate reductase の酵素活性測定

Glyoxylate reductase (EC 1.1.1.26) の酵素反応は、Zeltich の方法<sup>48)</sup>を元に、以下の組成の反応液で行った (反応温度 45°C)。反応開始後の  $A_{340\text{ nm}}$  の変化 (傾き) をグラフから読み取り、それを元に反応速度 (初速度) を算出し、酵素活性を決定した。なお、NAD 及び NADP のモル吸光係数は  $\epsilon_{340}=6,220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として計算した<sup>29)</sup>。また、1 U=1 分間に  $1\text{ }\mu\text{mol}$  の NAD(P)H を消費する活性量と定義した。

Glyoxylate reductase (glyoxylate + NAD(P)H → glycolate + NAD(P) <sup>+</sup> )		
600 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)	0.5 ml	(100 mM)
120 mM MgCl <sub>2</sub>	0.25 ml	(10 mM)
1 M DTT	3 $\mu$ l	(1 mM)
粗酵素液	100 $\mu$ l	
dH <sub>2</sub> O	1.15 ml	
1 mM NAD(P)H	0.5 ml	(0.17 mM)
90 mM glyoxylate (pH 6)	0.5 ml	(15 mM)

※Glyoxylate を添加して反応スタート

※括弧内は終濃度

### 5-2-9 Glycolate dehydrogenase の酵素活性測定

Glycolate dehydrogenase (EC 1.1.99.14) の酵素反応は、Friedrich と Schink の方法<sup>49)</sup>を元に、様々な電子受容体[NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>、methylene blue (MB)、methyl viologen (MV)、及び benzyl viologen (BV) ] を用いて以下の組成の反応液で行った (反応温度 45°C)。反応開始後の  $A_{340\text{ nm}}$  (NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>)、 $A_{570\text{ nm}}$  (MB)、 $A_{604\text{ nm}}$  (MV) もしくは  $A_{578\text{ nm}}$  (BV) の変化 (傾き) をグラフから読み取り、それを元に反応速度 (初速度) を算出し、酵素活性を決定した。なお、NAD 及び NADP のモル吸光係数は  $\epsilon_{340}=6,220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として<sup>29)</sup>、MB のモル吸光係数は  $\epsilon_{570}=1,310\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として、MV のモル吸光係数は  $\epsilon_{604}=1,310\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として、BV のモル吸光係数は  $\epsilon_{578}=8,650\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  として計算した。また、1 U=1 分間に  $1\text{ }\mu\text{mol}$  の電子受容体を消費する活性量と定義した。

Glycolate dehydrogenase (glycolate + NAD(P) <sup>+</sup> → glyoxylate + NAD(P)H)		
300 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)	0.5 ml	(50 mM)
120 mM MgCl <sub>2</sub>	0.25 ml	(10 mM)
1 M DTT	3 $\mu$ l	(1 mM)
1 mM NAD(P) <sup>+</sup>	0.5 ml	(0.17 mM)
粗酵素液	100 $\mu$ l	
dH <sub>2</sub> O	1.55 ml	
400 mM glycolate (pH 6)	0.1 ml	(13.3 mM)

※Glycolate を添加して反応スタート

※括弧内は終濃度

Glycolate dehydrogenase		
(glycolate + MB <sub>ox</sub> or MV <sub>ox</sub> or BV <sub>ox</sub> → glyoxylate + MB <sub>red</sub> or MV <sub>red</sub> or BV <sub>red</sub> )		
300 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)	0.5 ml	(50 mM)
120 mM MgCl <sub>2</sub>	0.25 ml	(10 mM)
1.2 mM MB or 60 mM MV or 60 mM BV	0.25 ml	(0.1 mM or 5 mM or 5 mM)
粗酵素液	100 μl	
dH <sub>2</sub> O	1.75 ml	
50 mM sodium dithionite	5~10 μl	
400 mM glycolate (pH 6)	0.1 ml	(13.3 mM)

※Glycolate を添加して反応スタート

※括弧内は終濃度

### 第3節 結果及び考察

#### 5-3-1 マリル-CoA 経路に関わる酵素の活性の比較

HUC22-1 株がマリル-CoA 経路を持っていることを確認するために、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、及びリンゴ酸を基質として yeast extract 有りの培地で培養した本菌の菌体から粗酵素液を抽出し、マリル-CoA 経路に関わる酵素 (及び酵素系) の活性測定を行った。各反応について、独立した測定を3回ずつ行い、平均値とその標準偏差を求めた。結果をまとめたものを表5-1に示す。ただし、glycolate dehydrogenase についてはどの基質で培養した菌体からも活性が検出されなかったため、省略した。

Malyl-CoA lyase の活性は、グリオキシル酸、グリコール酸培養の菌体で高く、L-リンゴ酸培養でもある程度見られたが、それ以外の基質で培養した菌体では低かった。また、アセチル-CoA を除いたコントロールの反応では活性は検出されなかった。

Malyl-CoA synthetase の活性は、基質であるマリル-CoA が入手できなかったため、malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase 系として測定した。正方向の活性は ATP の生成量から算出した。この酵素系の活性も、基本的には malyl-CoA lyase 単独の活性と同様に、グリオキシル酸、グリコール酸培養の菌体で高い値を示した。これにより、本菌がこの経路で実際に ATP を生成できることが確認された。しかしながら、その一方で、正方向の反応については H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養の菌体からもグリオキシル酸培養の菌体と同程度の活性が見られた。この原因については不明であるが、酢酸生産経路における ATP 生成などのバックグラウンドの差が影響している可能性も考えられる。

Malic enzyme の活性も、malyl-CoA lyase 単独の活性と同様の傾向を示した。また、この活性は NADP<sup>+</sup> 依存的であり、NAD<sup>+</sup> を補酵素とした場合には活性は検出されなかった。

上記の3つの酵素による malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase/malic enzyme 系の活性は、グリオキシル酸、グリコール酸培養の菌体で高く、それ以外の基質で培養した菌体では低かった。特に、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養の菌体からは、この酵素系の活性は検出されなかった。また、この酵素系も malic enzyme 単独の場合と同じく NADP<sup>+</sup> 依存的であり、NAD<sup>+</sup> を補酵素とした場合には活性は検出されなかった。さらに、反応液から ADP を除いた場合にも活性が検出されなかったことから、この酵素系が ADP 依存的な活性であることも確認された。

Pyruvate synthase については、malyl-CoA lyase 等とは異なり、基質の違いによる活性の顕著な差は見られなかったが、どの基質で培養した菌体からも同程度の活性が検出された。

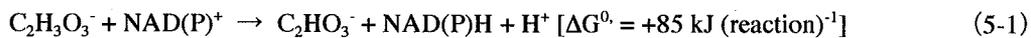
グリオキシル酸をグリコール酸に還元する酵素である glyoxylate reductase の活性についても調べたところ、グリオキシル酸、グリコール酸培養の菌体にのみ活性が見られ、それ以外の基質で培養した菌体では検出されなかった。

### 5-3-2 マリル-CoA 経路に関わる酵素をコードする遺伝子について

1-2-4 で述べたように、HUC22-1 株の近縁種である *M. thermoacetica* ATCC 39073 株は、そのゲノムデータベースが Genbank に登録されており (accession number: CP000232)、そこには malic enzyme をコードすると推定されている遺伝子が存在している (geneID: 3832341)。さらに BLAST 検索の結果、*Methylobacterium extorquens* 由来の malyl-CoA synthetase  $\alpha$  chain、malyl-CoA synthetase  $\beta$  chain、及び malyl-CoA lyase と高い相同性を持つタンパクをコードする遺伝子も確認された (それぞれ geneID: 3832337、3832339、3832340)。興味深いことに、これら 4 つの遺伝子は、ゲノム上に同じ転写方向で並んで存在していた。このことから、これら 4 つの遺伝子は、1 つの遺伝子クラスターの中に存在している可能性がある。

### 5-3-3 グリコール酸の代謝について

グリオキシル酸培養の菌体と同様に、グリコール酸培養の菌体からも、マリル-CoA 経路の各酵素の高い活性が検出された (表 5-1)。この結果は、HUC22-1 株がグリコール酸をグリオキシル酸に酸化し、それをマリル-CoA 経路で代謝していることを示唆している。しかしながら、グリコール酸培養の菌体から、グリコール酸のグリオキシル酸への酸化を触媒する glycolate dehydrogenase の活性は検出されなかった (data not shown)。その一方で、逆反応である glyoxylate reductase の活性は検出された。グリコール酸のグリオキシル酸への酸化を、以下の式 5-1<sup>50)</sup>に示す。



標準状態において高度に吸エルゴニックなこの反応は、菌体内の NAD(P)H 濃度が低い場合には進むが、それ以外の場合では、他の発エルゴン反応と共役しなければならない。実際、グリコール酸培養時の  $Y_{X/S}$  は、グリオキシル酸培養時のそれのほぼ半分になっていた (表 4-1)。この差は、グリコール酸培養の菌体がグリオキシル酸培養の菌体に比べて基質の異化により多くの ATP 消費を必要とするために生じていると考えられる。

### 5-3-4 シュウ酸の代謝について

シュウ酸培養の菌体から抽出した粗酵素液からは、pyruvate synthase の反応を除くすべての反応で、グリコール酸培養やグリオキシル酸培養に比べて非常に低い活性しか検出されず、また ATP 生成も全く見られなかった (表 5-1)。これらの結果は、HUC22-1 株において、シュウ酸の代謝にマリル-CoA 経路が関与していないことを示唆している。シュウ酸がどのような経路で代謝されているのかについては、現時点では不明である。

表 5-1 各基質で培養した HUC22-1 株菌体の粗酵素液を用いた酵素活性測定

Enzyme	Specific activity [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ (standard deviation)] after grown on the substrates of:				
	Glyoxylate	Glycolate	Oxalate	L-Malate	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>
Malyl-CoA lyase (EC 4.1.3.24)					
Glyoxylate + Acetyl-CoA $\rightarrow$ L-Malyl-CoA	10.0 (1.4)	20.9 (1.1)	0.54 (0.04)	5.6 (0.18)	1.6 (0.09)
Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase (Forward direction)					
Glyoxylate + Acetyl-CoA + ADP + Pi $\rightarrow$ L-Malate + CoA + ATP	0.50 (0.07)	0.98 (0.11)	N.D.	0.16 (0.01)	0.49 (0.05)
Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase (Reverse direction)					
L-Malate + CoA + ATP $\rightarrow$ Glyoxylate + Acetyl-CoA + ADP + Pi	0.23 (0.018)	0.38 (0.02)	0.04 (0.003)	0.10 (0.006)	0.08 (0.004)
Malic enzyme (EC 1.1.1.38 or 1.1.1.40)					
L-Malate + NAD <sup>+</sup> $\rightarrow$ Pyruvate + CO <sub>2</sub> + NADH (EC 1.1.1.38)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
L-Malate + NADP <sup>+</sup> $\rightarrow$ Pyruvate + CO <sub>2</sub> + NADPH (EC 1.1.1.40)	0.16 (0.031)	0.12 (0.01)	0.03 (0.001)	0.05 (0.003)	0.03 (0.004)
Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase/malate dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> , Forward direction)					
Glyoxylate + Acetyl-CoA + NAD <sup>+</sup> + ADP + Pi $\rightarrow$ Pyruvate + CO <sub>2</sub> + NADH + CoA + ATP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Malyl-CoA lyase/malyl-CoA synthetase/malate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> , Forward direction)					
Glyoxylate + Acetyl-CoA + NADP <sup>+</sup> + ADP + Pi $\rightarrow$ Pyruvate + CO <sub>2</sub> + NADPH + CoA + ATP	0.15 (0.005)	0.26 (0.013)	0.02 (0.002)	0.05 (0.003)	N.D.
Pyruvate synthase (EC 1.2.7.1)					
Pyruvate + CoA + BV <sub>ox</sub> $\rightarrow$ Acetyl-CoA + CO <sub>2</sub> + BV <sub>red</sub>	0.44 (0.012)	0.54 (0.012)	0.42 (0.015)	0.48 (0.077)	0.48 (0.047)
Glyoxylate reductase (EC 1.1.1.26 or 1.1.1.79)					
Glyoxylate + NADH $\rightarrow$ Glycolate + NAD <sup>+</sup> (EC 1.1.1.26 or 79)	0.25 (0.011)	0.04 (0.006)	N.D.	N.D.	N.D.
Glyoxylate + NADPH $\rightarrow$ Glycolate + NADP <sup>+</sup> (EC 1.1.1.79)	0.31 (0.027)	0.10 (0.009)	N.D.	N.D.	N.D.

BV<sub>ox</sub>, oxidized benzyl viologen. BV<sub>red</sub>, reduced benzyl viologen. N.D., not detected.

#### 第4節 要約

HUC22-1 株を様々な基質で培養し、粗酵素液を抽出し、マリンル-CoA 経路に関わる酵素の活性測定を行い、その活性を比較した。その結果、グリオキシル酸培養、グリコール酸培養の菌体の粗酵素液から、 $H_2$ - $CO_2$  培養の菌体と比べて高い活性が検出された。また、これらの酵素による ATP 生産も確認された。これらのことから、本菌がマリンル-CoA 経路でグリオキシル酸及びグリコール酸を異化し、ATP を生産している可能性が高いことが分かった。その一方で、シュウ酸培養の菌体の粗酵素液からは、*pyruvate synthase* の反応を除いてほとんど活性は検出されなかった。このことから、シュウ酸はマリンル-CoA 経路とは別の経路で代謝されていると考えられた。

## 第3部 HUC22-1株に対する遺伝子導入法の開発

### 第6章 プラスミドベクターを用いた遺伝子導入法の開発

#### 第1節 緒言

第1部での研究により、HUC22-1株がアセチル-CoA から Aldh、Adh を介してエタノールを生産している可能性が高いことが示された。このことから、これらの酵素から成る経路を何らかの方法で強化できれば、本菌のエタノール生産性を向上させることができると考えられた。これまでの研究において、酒井は化学変異剤 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) による変異処理を用いたエタノール高生産株の作製を試みたが、継代後もエタノール高生産を維持する株は得られなかった<sup>15)</sup>。そこで我々は、標的とする遺伝子をピンポイントに導入、あるいは破壊できる、分子生物学的育種によるエタノール高生産株の作製を試みることにした。しかしながら、*E. coli* の様な一般的な菌の場合とは異なり、好熱性嫌気性細菌を宿主とした遺伝子導入法は報告例が少なく、特に *Moorella* 属の細菌を宿主とした遺伝子導入法はこれまで全く報告されていない。そのため、本菌の分子生物学的育種を行うには、本菌を宿主とする遺伝子導入法の確立が不可欠である。そこで本章では、プラスミドベクターとエレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入法の開発を試みた。

#### 第2節 方法

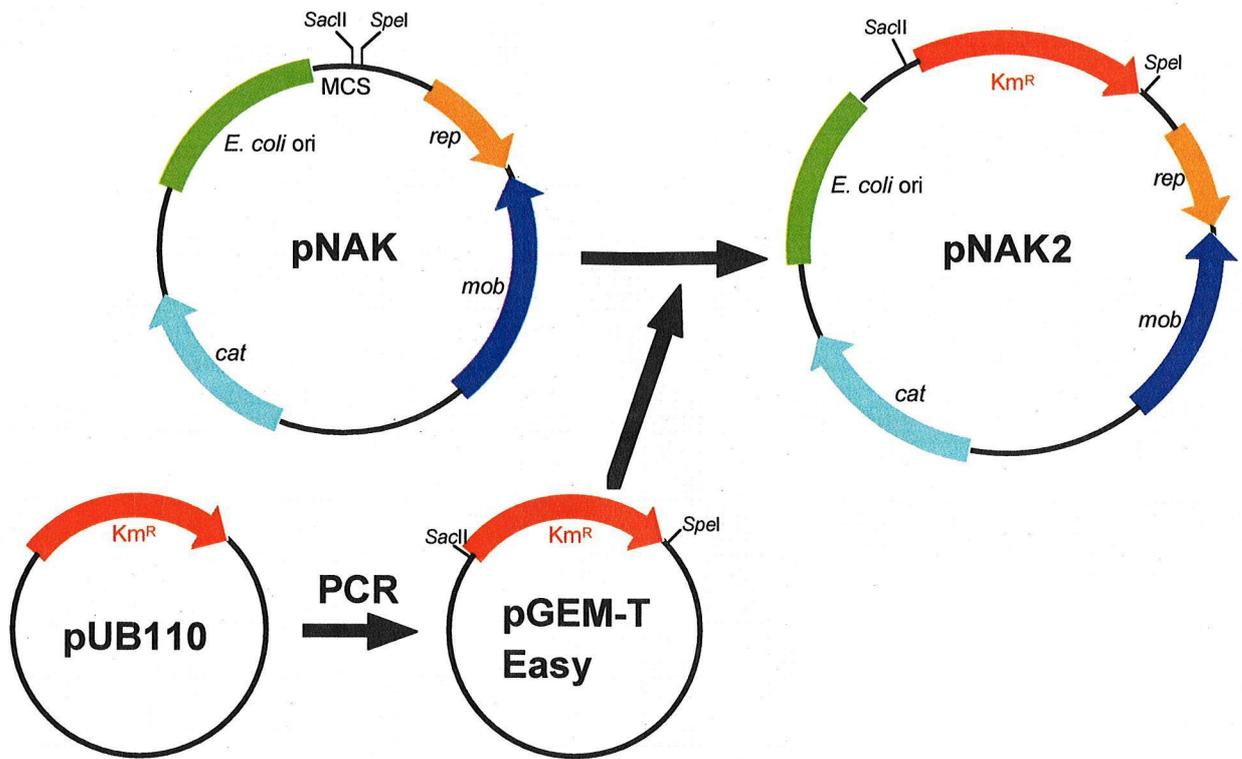
##### 6-2-1 HUC22-1株からのプラスミド抽出

フルクトースを基質に対数増殖中期まで培養した HUC22-1 株の培養液 5 ml からプラスミドの抽出を行った。抽出法には O'Sullivan と Klaenhammer<sup>51)</sup>の方法を用いた。得られた抽出物を 40  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O に溶解し、0.7%アガロースゲル電気泳動でプラスミドの存在を確認した。

##### 6-2-2 シャトルベクター pNAK2 の構築

九州大学の古川謙介先生より分与して頂いたプラスミド pNAK (中温性 *Clostridium* 属と *E. coli* の両方で複製可能なシャトルベクター) をベースに、筑波大学の星野貴行教授より分与して頂いたプラスミド pUB110 由来の耐熱性 kanamycin 耐性遺伝子<sup>52)</sup>を挿入したシャトルベクター pNAK2 の構築を行った。構築の概略を図 13 に示す。

pUB110 を鋳型に Premix Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa Ex Taq<sup>TM</sup> Version) を用いて PCR を行い、耐熱性 kanamycin 耐性遺伝子を含む断片を取り出し、pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector にクローニングした。PCR 反応液組成と反応条件を表 6-1 に、用いたプライマーの配列を表 6-2 に示す。クローニング法は 1-2-5 に示した方法と同様にした。得られたプラスミド (pGEM-HTRKR) と、ベースとなる pNAK は、それぞれ制限酵素 *Sac*II と *Spe*I で一晚切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動で確認した後、必要なバンドの部分をカッターで切り出し、MagExtractor<sup>®</sup>-PCR & Gel Clean Up- (TOYOBO) を用いて精製した。その後、2つの断片を DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara Bio) を用いてライゲーションさせ、耐熱性 kanamycin 耐性遺伝子を挿入されたシャトルベクター pNAK2 (図 13) を構築した。



※*rep*: replication gene, *mob*: mobilization gene, *cat*: chloramphenicol acetyltransferase gene,  
*Km<sup>R</sup>*: kanamycin resistance gene

図 13 シヤトルベクターpNAK2の構築

**表 6-1 PCR 反応液組成と反応条件**

Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version)	25 $\mu$ l
HUC22-1 株ゲノム DNA (0.1 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l
Primer F (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
Primer R (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	2 min	
4°C	$\infty$	

**表 6-2 耐熱性 kanamycin 耐性遺伝子のサブクローニング用プライマー**

Name	Sequence (5' to 3')
HTKMR-F	TAGTTCAACAAACGGGCCAG
HTKMR-R	GAGGTCATCGTTCAAAATGG

### 6-2-3 エレクトロポレーション法による HUC22-1 株への遺伝子導入

HUC22-1 株に対する遺伝子導入には、エレクトロポレーション法を用いた。参考文献 53-55 を参考に、以下の手順で行った。使用する培地、バッファーはすべて嫌氣的に調製したものをを用い、また操作はすべて 0.45  $\mu\text{m}$  の Mixed cellulose ester hydrophilic filter (Dismic<sup>®</sup>-25AS) を通した CO<sub>2</sub> ガスを吹き付けながら嫌氣的に行った。フルクトースを基質に対数増殖後期 (OD<sub>660</sub> = 1.5-2.0) まで培養した本菌の培養液 20 ml を 6,000 rpm、4°C で 5 分間遠心して上清を除去し、菌体を回収した。菌体を 5 ml の 272 mM スクロース溶液に再懸濁し、6,000 rpm、4°C で 5 分間遠心して洗浄し、上清を除去した。この洗浄を計 2 回繰り返した後、菌体を 1 ml の 272 mM スクロース溶液に再懸濁した。菌体に導入する DNA 5-10  $\mu\text{g}$  を含む溶液を添加して混合した。ネガティブコントロールの場合は DNA 溶液の代わりに dH<sub>2</sub>O を同じ量添加した。、氷中で 10 分間静置した後、予め氷中で冷却しておいた 1 mm もしくは 2 mm ギャップのエレクトロポレーション用キュベット (ELECTROPORATION CUVETTES PLUS<sup>™</sup>, BTX) に移し (1 mm キュベットなら 40  $\mu\text{l}$ 、2 mm キュベットなら 100  $\mu\text{l}$ )、エレクトロポレーション装置 (ECM 630, BTX) にセットしてパルスを 1 回かけた (条件は後述)。パルスをかけ終わった溶液を、22 G  $\times$  1.1/4 の注射針 (ニプロ) を取り付けたプラスチック注射器 (テルモ) を用いて回収し、8 ml 容量のバイアル瓶に入った 2 ml のフルクトース液体培地に加えた。、氷中で 10 分間静置した後、55°C で 4 時間前培養を行った。適当な抗生物質と 2% (w/v) の高温培養用寒天 (ナカライテスク) を含むフルクトース培地に前培養液全量を加えてロールチューブ<sup>2)</sup> を作製した。ただし、ポジティブコントロールに対しては抗生物質を加えなかった。作製したロールチューブを 55°C に静置し 4-7 日間培養した後、得られたコロニーを滅菌したパスツールピペットを用いて嫌氣的に採取し、適当な抗生物質を含むフルクトース液体培地へ植え継いだ。2 回の植え継ぎの後、6-2-1 で示した方法でプラスミドを抽出し、遺伝子導入の確認を行った。

## 第 3 節 結果及び考察

### 6-3-1 HUC22-1 株自身のプラスミドの有無の確認

プラスミドベクターを用いた遺伝子導入法の開発には、HUC22-1 株と *E. coli* の両方で選択、複製が可能なシャトルベクターが不可欠である。もし、本菌自身が独自のプラスミドをすでに保持しているなら、それをベースにシャトルベクターの開発が可能になると思われる。そこでまず、本菌からのプラスミド抽出を行い、アガロースゲル電気泳動でプラスミドの有無を確認した。しかし残念ながら、プラスミドと思われるバンドは確認できなかった (data not shown)。このことから、本菌が独自のプラスミドを保持している可能性は低いと考えられた。そのため、これ以降は既存のシャトルベクターを用いた遺伝子導入法の開発を目指すことにした。

### 6-3-2 シャトルベクター pNAK2 を用いた遺伝子導入法の開発

既存のシャトルベクターの中から HUC22-1 株と *E. coli* の両方で複製可能と思われるものを探した。まず、九州大学の古川謙介先生より分与して頂いたシャトルベクター pNAK が候補に挙がった。しかしながら、この pNAK は中温性 *Clostridium* 属と *E. coli* の両方で選択、複製が可能のように構築されたベクターであり、HUC22-1 株のような好熱性細菌で選択を行うための選択マーカーが存在していなかった。そこで、このベクターに筑波大学の星野貴行教授より分与して頂いたプラスミド pUB110 由来の耐熱性 kanamycin 耐性遺伝子<sup>5)</sup> を挿入し、好熱性細菌でも選択が可能な新たなシャトルベクター

pNAK2 を構築した (図 13)。

完成したシャトルベクターpNAK2を用いて、エレクトロポレーション法による遺伝子導入を試みた。まず、HUC22-1株のkanamycin耐性を調べた。その結果、寒天培地上における本菌のkanamycin耐性はかなり高く、kanamycin濃度が $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ 以下の培地では、遺伝子導入を行ってなくてもコロニーが見られることが分かった。そこで、kanamycin濃度を $200\ \mu\text{g ml}^{-1}$ にしたところ、コロニーは見られなくなったので、以降の実験はこのkanamycin濃度で行うことにした。次に、同様の遺伝子導入を行っている論文<sup>53)–55)</sup>を参考に、パルスの各パラメーターを以下の範囲で調節し、最も導入効率の良い条件を検討した。

voltage: 2 mm ギャップのキュベットで  $1.25\sim 2.4\ \text{kV}$  ( $6.25\sim 12.0\ \text{kV cm}^{-1}$ )

1 mm ギャップのキュベットで  $1.25\sim 2.4\ \text{kV}$  ( $12.5\sim 24.0\ \text{kV cm}^{-1}$ )

resistor: 200、400、600  $\Omega$

capacitor: 50  $\mu\text{F}$  に固定

その結果、voltageが $12.0\ \text{kV cm}^{-1}$ 以上の条件では、パルスをかける際に放電が起こり失敗することが多くなり、仮に成功したとしても、ポジティブコントロール (kanamycin無し) のロールチューブにおける菌体の生存率が著しく低下することが分かった。従って、パルスをかける際のvoltageは、 $12.0\ \text{kV cm}^{-1}$ よりも低い範囲が望ましいと考えられた。一方で、resistorの値に関しては、どの条件でも菌体の生存率にそれほど大きな差は見られなかった。しかしながら、結局どの条件でパルスをかけても、形質転換したコロニーは全く得られなかった。

### 6-3-3 シャトルベクターpIKM1を用いた遺伝子導入法の開発

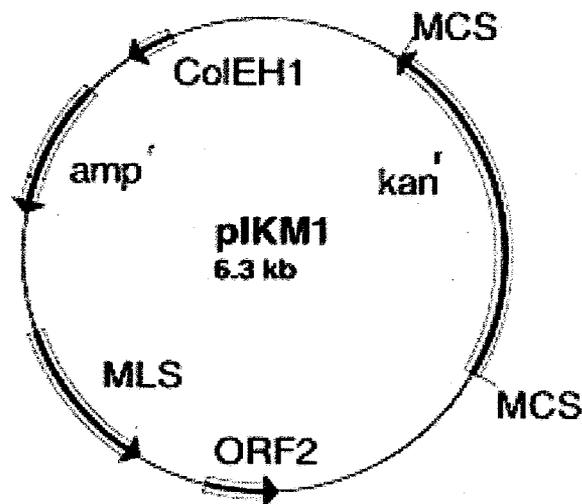
前項のpNAK2を用いた遺伝子導入においてHUC22-1株のkanamycin耐性の高さが問題になったことから、今度はkanamycin以外の抗生物質で選択が可能であることを条件に再度シャトルベクターの探索を行った。その結果、*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*<sup>56)</sup>や*Clostridium thermocellum*<sup>54)</sup>などの好熱性細菌で複製が確認されており、かつ $58^\circ\text{C}$ でerythromycin及びlincomycinによる選択が可能なシャトルベクターpIKM1 (図 14) が有力な候補として発見された。そこで、このシャトルベクターの開発を行ったWiegel教授らのグループからこのプラスミドを分与して頂き、これを用いてエレクトロポレーション法による遺伝子導入を試みた。

まず、本菌のerythromycin及びlincomycin耐性を調べた。その結果、寒天培地上において、本菌はerythromycin濃度が $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$ 以上、もしくはlincomycin濃度が $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ 以上ならコロニーが見られなくなることが分かった。そこで、本菌の選択は、 $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ のlincomycinを含む培地で行うことにした。次に、パルスの各パラメーターをpNAK2と同様の範囲 (ただし、生存率が著しく低下した条件は除く) で調節し、最も導入効率の良い条件を検討した。しかしながら、このpIKM1を用いた場合も、どの条件でパルスをかけても、形質転換したコロニーは全く得られなかった。

pNAK2 や pIKM1 を用いた遺伝子導入で形質転換体を得られなかった原因としては、以下のものが考えられる。

- 1) そもそも菌体内にプラスミドが導入されていない
- 2) 菌体内にプラスミドは導入されているが、プラスミドを複製できていない（本菌ではプラスミド上の複製起点が機能できていない）
- 3) 菌体内にプラスミドは導入されているが、プラスミド上の抗生物質耐性遺伝子が機能していない

全く形質転換体を得られなかったため、3つのうちどれが原因なのかを確認することはできないが、本菌を宿主とする遺伝子導入法の開発には、これらの問題を解決した新たな手法が必要であると考えられた。



※MCS: multiple cloning site, MLS: macrolide lincosamide streptogramicin

図 14 シャトルベクターpIKM1 (参考文献 56 より引用)

#### 第4節 要約

シャトルベクタープラスミド(pNAK2 及び pIKM1) とエレクトロポレーション法を用いて、HUC22-1株の分子生物学的育種によるエタノール高生産株の作製に必要な遺伝子導入法の開発を試みた。しかしながら、どちらのシャトルベクターを用いた場合でも、遺伝子導入が確認された株は獲得できなかった。そのため、シャトルベクターを用いた方法とは異なる新たな手法が必要であると考えられた。

## 第7章 相同性組換えを用いた遺伝子導入法の開発

### 第1節 緒言

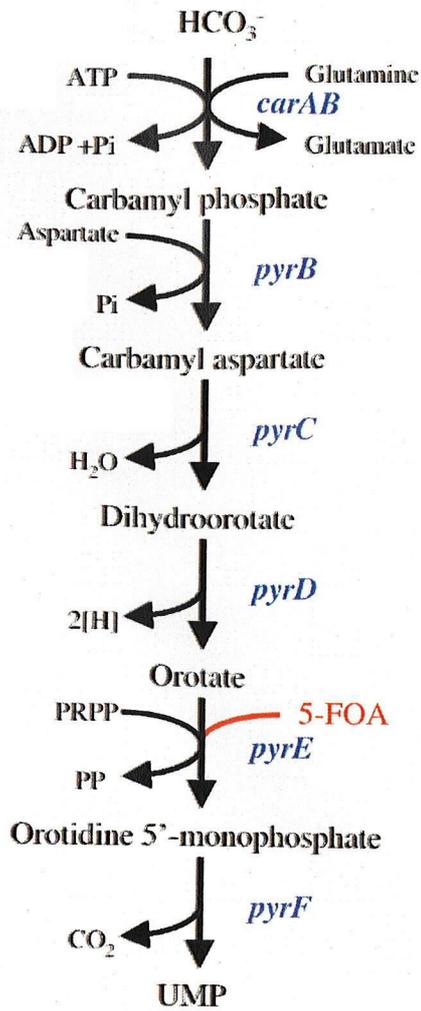
第6章において、我々はプラスミドベクターを用いた HUC22-1 株に対する遺伝子導入法の開発を試みた。しかしながら、最終的にこの方法では形質転換が確認された株は得られなかった。そのため、プラスミドベクターを用いた方法とは別の方法による本菌への遺伝子導入法の開発が求められた。そこで我々は、前章での問題点を回避できる新たな遺伝子導入法として、ウラシル要求性を利用した、相同性組換えによるゲノム DNA への遺伝子導入法を考えた。

相同性組換えは、1対の2本鎖 DNA の相同的な塩基配列を持つ部分に起こる組換えであり、人工的にゲノム上の特定遺伝子を変化させる手段の1つとして用いられている。ゲノム上の特定の塩基配列と相同性を持つ DNA を細胞に導入すると、この相同部分で組換えを起こし、外来の DNA がゲノムに取り込まれる。これを利用してして特定の遺伝子を破壊したり別の遺伝子と置き換えたりすることが可能となる。ゲノム DNA への相同性組換えによる遺伝子導入には、プラスミドベクターを用いた方法に比べて、導入した遺伝子を多コピーで持たせることが困難という問題点はあるものの、逆に選択圧をかけ続ける必要性が無く、形質が安定しているという利点もある。また、前章で問題になったプラスミドの複製も必要なくなる。ゲノム DNA への相同性組換えによる遺伝子導入は HUC22-1 株と同じ好熱性嫌気性細菌である *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 でも成功例が報告されており<sup>59)</sup>、本菌でも可能であると考えられる。

ピリミジン塩基の生合成経路は細菌<sup>57)~64)</sup>から菌類<sup>65)</sup>、植物<sup>66)</sup>、及び動物<sup>67)68)</sup>に至るまで共通の酵素系によって構成されており、極一部の病原菌<sup>69)~71)</sup>を除くすべての生物にとって必須の経路である。この経路は *E. coli* 及び *Salmonella typhimurium* で最も広く研究されており、すべてのピリミジン塩基の前駆体である UMP に至る6つの酵素反応から成ることが分かっている。6つの酵素（及びそれをコードする遺伝子）と、*E. coli* 及び *S. typhimurium* における経路を図15に示す。これらの酵素を欠損した株は UMP を生合成出来なくなるために、ウラシル要求性株となる。

これらのうち、*pyrE* もしくは *pyrF* を破壊された株 ( $\Delta pyrE$ 、 $\Delta pyrF$ ) については、5-fluoroorotic acid (5-FOA) によるポジティブセレクションが可能であることが分かっている<sup>72)73)</sup>。5-FOA は、野生株では orotate の代わりにピリミジン経路に取り込まれ（図15の赤字の部分）、最終的に RNA に取り込まれて正常な RNA の合成を阻害し、菌体を死滅させるが、 $\Delta pyrE$  株及び  $\Delta pyrF$  株では代謝されることがないために菌体は生存できる。このことを利用すると、5-FOA と十分な量のウラシルを含む培地を用いることで、前述の相同性組換えによって *pyrE* もしくは *pyrF* の破壊株を選択、単離することが可能となる。この方法で  $\Delta pyrF$  株を獲得し、それをホストに、*pyrF* を選択マーカーに用いた遺伝子導入系の開発が、超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 ですでに報告されている<sup>74)75)</sup>。また、この *pyrE* もしくは *pyrF* を選択マーカーに用いれば、前章で用いた選択マーカー（抗生物質耐性遺伝子）と異なり本菌が元々持っていた遺伝子なので、確実に発現させることができると考えられる。

以上のことをふまえ、本章では、本菌のウラシル要求性を利用した、相同性組換えによるゲノム DNA への遺伝子導入法の開発を試みた。



Carbamoylphosphate synthetase (EC 6.3.5.5, CPSase, *carAB*)

Aspartate transcarbamoylase (EC 2.1.3.2, ATCase, *pyrB*)

Dihydroorotase (EC 3.5.2.3, DHOase, *pyrC*)

Dihydroorotate dehydrogenase (EC 1.3.3.1, DHOdehase, *pyrD*)

Orotate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.10, OPRTase, *pyrE*)

Orotidine 5-monophosphate decarboxylase (EC 4.1.1.23, OMPdecase, *pyrF*)

図 15 *E. coli* 及び *S. typhimurium* におけるピリミジン生合成経路

## 第2節 方法

### 7-2-1 *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースからの *pyrE*、*pyrF* の検索

1-2-4 と同様に、Genbank に登録されている、HUC22-1 株の近縁種である *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベース (accession number: CP000232) から、BLAST 検索を用いて *pyrE*、*pyrF* と思われる遺伝子の検索を行った。

### 7-2-2 HUC22-1 株ゲノム由来の *pyrE*、*pyrF* のクローニング

1-2-3 で得られた HUC22-1 株のゲノム DNA を鋳型に、Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version) を用いて PCR を行い、1-2-2 で見つかった *pyrE*、*pyrF* と思われる遺伝子を、ORF の前後約 1,000 bp ずつを含めて増幅した。PCR 反応液組成と反応条件を表 7-1 に、各遺伝子に対して用いたプライマーの配列を表 7-2 に示す。反応終了後、各 PCR 産物を 0.7%アガロースゲル電気泳動で確認した後、pGEM®-T Easy Vector System を用いた TA クローニングによって pGEM®-T Easy vector に組み込み、*E. coli* DH5α にヒートショック法で導入し、形質転換させた。100 μg ml<sup>-1</sup> ampicillin、0.1 mM IPTG、及び 40 μg ml<sup>-1</sup> X-gal を含む LB プレートで一晩培養し、Blue/White selection によって目的遺伝子がクローニングされたプラスミドを持つコロニーを選択した。選択した各コロニーをそれぞれ 100 μg ml<sup>-1</sup> ampicillin を含む 2 ml の LB 培地に植菌し、さらに一晩振とう培養した後、Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit を用いてプラスミドを回収した。回収された各プラスミドは、適当な制限酵素で切断された後、0.7%アガロースゲル電気泳動で目的の断片がクローニングされていることが確認された。確認された各プラスミドにクローニングされた断片の配列決定は、広島大学 自然科学研究支援開発センター 遺伝子実験部門の DNA 塩基配列決定サービスに依頼した。まず、M13 forward プライマーと M13 reverse プライマーを用いて両端から配列を決定し、さらに内側の配列については、表 7-3 に示すプライマーを用いて決定した。

### 7-2-3 *pyrE* 破壊用プラスミド pGDPyrE の構築

参考文献 75 の方法に従い、相同性組換え (ダブルクロスオーバー) による *pyrE* の破壊 (図 16) を行うためのプラスミドを構築した。構築の概略を図 17 に示す。7-2-2 で得られたプラスミド pGEM-pyrE を鋳型に Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version) を用いてアダプターPCRを行い、プラスミド上の *pyrE* の ORF を除いた部分を増幅するとともに、その両末端に *Bam*HI サイトを付与した。PCR 反応液組成と反応条件を表 7-4 に、用いたプライマーの配列を表 7-5 に示す。得られた PCR 産物を 0.7%アガロースゲル電気泳動で確認した後、制限酵素 *Bam*HI で一晩切断し、MagExtractor® -PCR & Gel Clean Up-を用いて精製した。その後、DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いてライゲーションさせ、*pyrE* 破壊用プラスミド pGDPyrE (図 17) を構築した。

### 7-2-4 *pyrE* 破壊用プラスミド pGDPyrE2 の構築

ダブルクロスオーバーを起こすための相同性領域をより短くしても形質転換が行えるのかを確認するために、7-2-3 で構築した pGDPyrE から、PCR により前後の相同性領域が 500 bp ずつになるように断片を取り出し、pGEM®-T Easy vector に再クローニングしたプラスミド pGDPyrE2 (図 17) を構築した (クローニングの方法は 7-2-2 と同様)。PCR 反応液組成と反応条件を表 7-6 に、用いたプライマーの配列を表 7-7 に示す。

表 7-1 PCR 反応液組成と反応条件

Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version)	25 µl
HUC22-1 株ゲノム DNA (0.1 µg µl <sup>-1</sup> )	1 µl
Primer F (20 pmol µl <sup>-1</sup> )	2 µl
Primer R (20 pmol µl <sup>-1</sup> )	2 µl
dH <sub>2</sub> O	20 µl
Total	50 µl

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	1 min kb <sup>-1</sup>	
4°C	∞	

表 7-2 *pyrE*、*pyrF* のクローニングに用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')	Accession number	Localization
<i>pyrE</i> -F	CCCGGAGTGAATCCTAAAGA	CP000232	2,226,284
<i>pyrE</i> -R	GCATATAACCCACCAGCACA	CP000232	2,223,632
<i>pyrF</i> -F1	ACCCTACCTCTCCAAGATTA	CP000232	913,953
<i>pyrF</i> -R1	TTGTCCAAGCTTATGCACCT	CP000232	916,656
<i>pyrF</i> -F2	GTCTACGTCCTGGAGGTAAA	CP000232	913,912
<i>pyrF</i> -R2	CAGGCGGTACTGGTAAAGAA	CP000232	916,677
<i>pyrF</i> -F3	AAGATCGTCGCTTACACCGA	CP000232	913,825
<i>pyrF</i> -R3	CTGGTGAAACACGTCCGGAA	CP000232	917,280

※Localizatin は Genbank に登録されている *M. thermoacetica* ATCC 39073 株ゲノムデータベースにおける各プライマー配列の位置

表 7-3 *pyrE* の配列決定に用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
<i>pyrE</i> -F2	CAATATCGTCGGGGGCCTGA
<i>pyrE</i> -R2	CTCCTCCCGACTAGTTGAGA

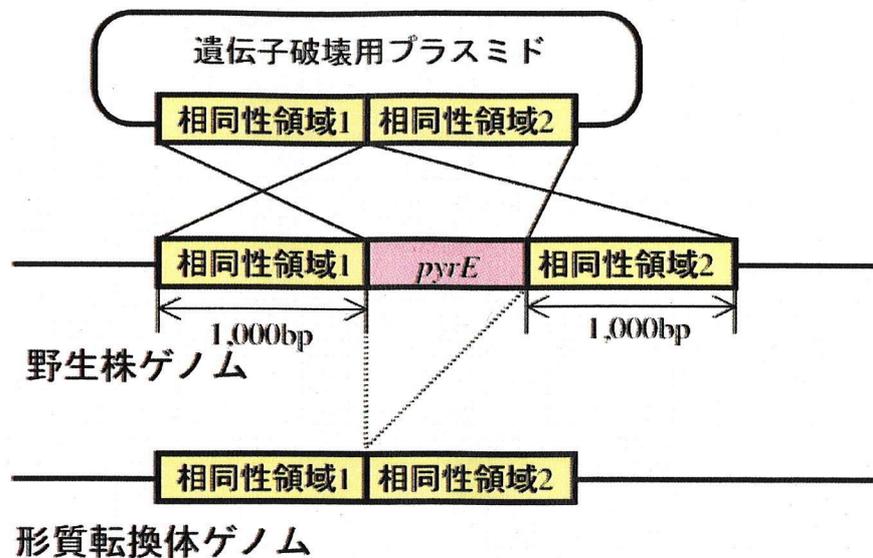


図 16 相同性組換え（ダブルクロスオーバー）による *pyrE* の破壊

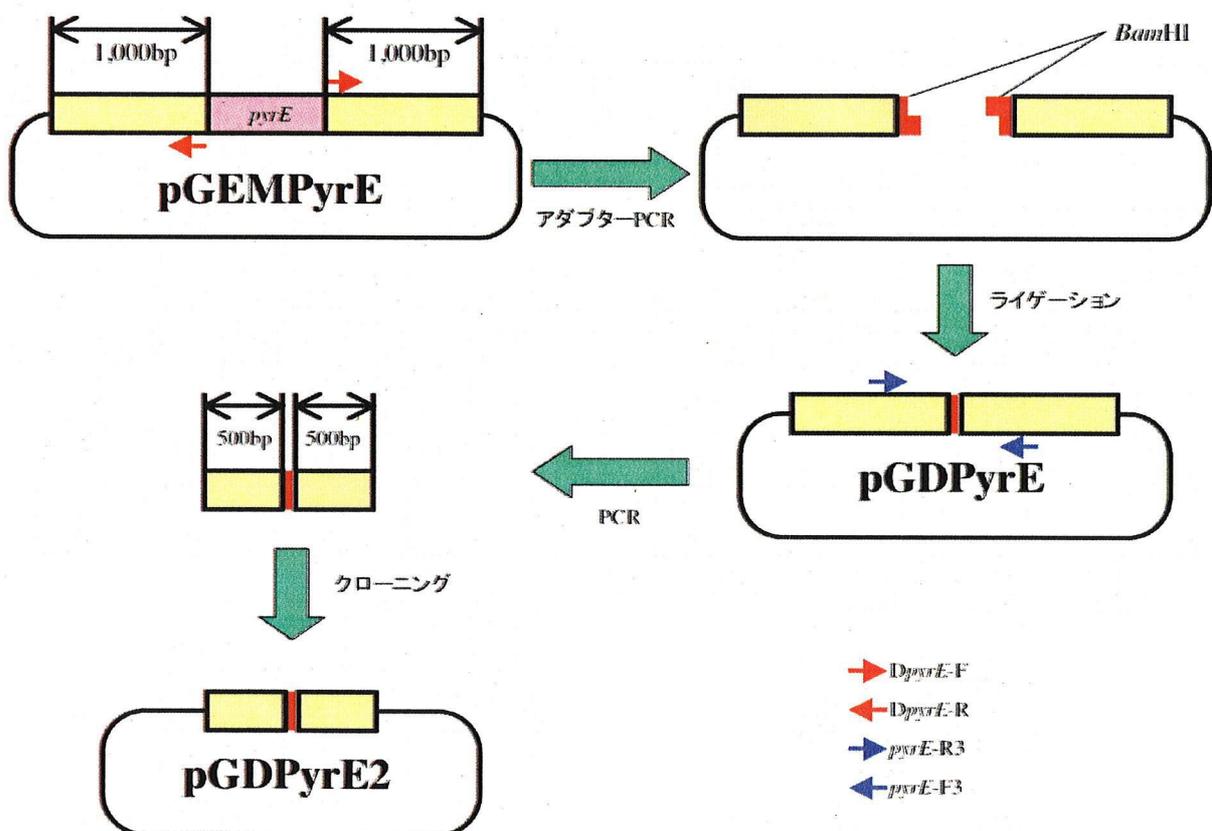


図 17 *pyrE* 破壊用プラスミド pGDpyrE 及び pGDpyrE2 の構築

**表 7-4 PCR 反応液組成と反応条件**

Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version)	25 $\mu$ l
pGEMPyrE (0.1 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l
DpyrE-F (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
DpyrE-R (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	6 min	
4°C	$\infty$	

**表 7-5 pGDPyrE の構築に用いたプライマー**

Name	Sequence (5' to 3')
DpyrE-F	CGGGATCCCGCCTACCAGTTCGTTGACAT
DpyrE-R	CGGGATCCCGAAGCCGCCCGTCTTTAGTT

**表 7-6 PCR 反応液組成と反応条件**

Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version)	25 $\mu$ l
pGDPyrE (0.1 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l
<i>pyrE</i> -F3 (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
<i>pyrE</i> -R3 (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	2 min	
4°C	$\infty$	

**表 7-7 pGDPyrE2 の構築に用いたプライマー**

Name	Sequence (5' to 3')
<i>pyrE</i> -F3	GGGAGGTATTGTCTTCGGCA
<i>pyrE</i> -R3	GATAAGCGGTTGTCAGCAGA

#### 7-2-5 相同性組換えによる HUC22-1 株ゲノム上の *pyrE* の破壊

HUC22-1 株に対する遺伝子導入には、エレクトロポレーション法を用いた。Sato らの方法<sup>75)</sup>を参考に、以下の手順で行った。使用する培地、バッファーはすべて嫌氣的、無菌的に調製したものを、また操作はすべて CO<sub>2</sub> ガスを吹き付けながら嫌氣的に行った。フルクトースを基質に対数増殖後期 (OD<sub>660</sub>=1.5-2.0) まで培養した本菌の培養液 20 ml を 6,000 rpm、4℃で 5 分間遠心して上清を除去し、菌体を回収した。菌体を 5 ml の 272 mM スクロース溶液に再懸濁し、6,000 rpm、4℃で 5 分間遠心して洗浄し、上清を除去した。この洗浄を計 2 回繰り返した後、菌体を 1 ml の 272 mM スクロース溶液に再懸濁した。菌体に導入する DNA (pGDPyrE もしくは pGDpyrE2) 5-10 μg を含む溶液を添加して混合した。ネガティブコントロールの場合は DNA 溶液の代わりに dH<sub>2</sub>O を同じ量添加した。水中で 10 分間静置した後、予め水中で冷却しておいた 2 mm ギャップのエレクトロポレーション用キュベット (ELECTROPORATION CUVETTES PLUS™, BTX) に 100 μl を移し、エレクトロポレーション装置 (ECM 630, BTX) にセットしてパルスを 1 回かけた。パルスをかけ終わった溶液を、22 G×1.1/4 の注射針 (ニプロ) を取り付けたプラスチック注射器 (テルモ) を用いて回収し、8 ml 容量のバイアル瓶に入った 2 ml のフルクトース培地 (10 μg ml<sup>-1</sup> のウラシルを含む) に加えた。水中で 10 分間静置した後、55℃で 10 時間前培養を行った。選択物質である 0.2% (w/v) の 5-FOA と 10 μg ml<sup>-1</sup> のウラシルと 2% (w/v) の高温培養用寒天 (ナカライテスク) を含むフルクトース培地に前培養液全量を加えてロールチューブ<sup>7)</sup> を作製した。ただし、ポジティブコントロールに対しては 5-FOA を加えなかった。作製したロールチューブを 55℃に静置し 4-7 日間培養した後、得られたコロニーを滅菌したパスツールピペットを用いて嫌氣的に採取し、0.2% (w/v) の 5-FOA と 10 μg ml<sup>-1</sup> のウラシルを含むフルクトース液体培地へ植え継いだ。2 回の植え継ぎの後、一部をウラシルも酵母エキスも含まない完全合成培地へ植え継いで、増殖しないこと (=ウラシル要求性であること) を確認したうえで、1-2-3 で示した方法でゲノム DNA を抽出した。また、培養液の一部 (1.5 ml) は、嫌氣的、無菌的に調製した 60%グリセロールと 1:1 で混合して 8 ml 容量のバイアル瓶に封入され、30%グリセロールストックとして -80℃に保存された。

#### 7-2-6 PCR による *pyrE* の破壊の確認

前項の相同性組換えにより HUC22-1 株ゲノム上の *pyrE* が破壊された場合、その株 ( $\Delta pyrE$  株) のゲノム上からは *pyrE* の ORF (約 600 bp) にあたる配列が削除されているはずである (図 16)。従って、 $\Delta pyrE$  株のゲノム DNA を鋳型に、*pyrE* を挟むように PCR を行えば、野生株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った場合に比べて約 600 bp 短い断片が増幅されるはずである。そこで、野生株とウラシル要求性株のゲノム DNA を鋳型に Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version) を用いて PCR を行い、*pyrE* の破壊の確認を行った。PCR 反応液組成と反応条件を表 7-8 に、各遺伝子に対して用いたプライマーの配列を表 7-9 に示す。反応終了後、各 PCR 産物のサイズを 0.7%アガロースゲル電気泳動で確認した。

表 7-8 PCR 反応液組成と反応条件

Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version)	25 $\mu$ l
ウラシル要求性株ゲノム DNA (0.1 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l
<i>pyrE</i> -F3 (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
<i>pyrE</i> -R3 (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
58°C	30 sec	
72°C	3 min	
4°C	$\infty$	

表 7-9 *pyrE* の破壊の確認に用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
<i>pyrE</i> -F4	TAGTATGGAGCAGGCTGAGA
<i>pyrE</i> -R4	AACTGTGACAGGGCGGCATA

### 第3節 結果及び考察

#### 7-3-1 HUC22-1 株の 5-FOA に対する耐性の確認

HUC22-1 株の 5-FOA に対する耐性を確認するために、5-FOA を 0、0.1、0.2、0.5 及び 1.0% (w/v) になるように溶解させたフルクトース液体培地及び寒天培地を用意し、それぞれに本菌の野生株を接種して 55°C で培養した。その結果、液体培地、寒天培地ともに、0.2% (w/v) 以上の 5-FOA を含む培地では、本菌は完全に生育できなくなることが確認された。このことから、本章でのウラシル要求性株の選択には、0.2% (w/v) の 5-FOA を含む培地を用いることにした。

#### 7-3-2 *M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースからの *pyrE*、*pyrF* の検索

*M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースを検索した結果、*pyrE* 及び *pyrF* と推定される遺伝子を見つけることができた。また、このデータベース上において、*pyrE* は *pyrD* と推定される遺伝子と、*pyrF* は *carAB*、*pyrB*、*pyrC* と推定される遺伝子と、それぞれ並んで存在していることも分かった。これらの遺伝子はすべて図 15 のピリミジン合成経路を構成する遺伝子である。このことから、これらの遺伝子群は、それぞれに遺伝子クラスターを形成している可能性がある。

#### 7-3-3 HUC22-1 株由来 *pyrE*、*pyrF* のクローニング

*pyrE* と *pyrF* を HUC22-1 株のゲノムからクローニングするために、表 7-2 に示した各プライマーで 2 つの遺伝子を PCR によってそれぞれ増幅し、アガロースゲル電気泳動で確認した。その結果、*pyrE* については予想されたサイズの単一バンドが確認されたが、*pyrF* については、配列の位置が異なるプライマーである F1-R1 ペア、F2-R2 ペア、F3-R3 ペアのいずれを用いても、予想されたサイズのバンドが得られなかった。また、PCR 反応条件のアニーリング温度を下げるなどの検討も試みたが、結果は同じであった。そのため、*pyrF* のクローニングは保留し、*pyrE* のみを pGEM®-T Easy vector にクローニングした。得られたプラスミドは pGEM-*pyrE* と呼ぶこととした。このプラスミドにクローニングされた断片の塩基配列を決定したところ、*M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースに示されている配列と 99% 以上の相同性を持つことが確認された。

*pyrF* が増幅されなかった原因は不明であるが、*M. thermoacetica* ATCC 39073 株のゲノムデータベースと HUC22-1 株のゲノム配列との間で、*pyrF* 及び周辺の配列に違いがあるの可能性が考えられる。

#### 7-3-4 pGDPyrE を用いた相同性組換えによる *pyrE* の破壊

HUC22-1 株のゲノムから *pyrE* のみしかクローニングできなかったため、この研究では、破壊する標的遺伝子を *pyrE* に絞ってウラシル要求性株の獲得を試みた。まず、7-2-3 で作製した *pyrE* 破壊用プラスミド pGDPyrE (図 17) を用いて、7-2-5 で示した導入法に従い、エレクトロポレーションのパルスの各パラメーターを以下の範囲で調節し、最も導入効率の良い条件を検討した。

voltage: 2 mm ギャップのキューベットで 1.8、2.0、2.2 kV (9.0–11.0 kV cm<sup>-1</sup>)

resistor: 200、400、600 Ω

capacitor: 50 μF に固定

その結果、2 mm ギャップのキュベットで 2.0 kV (10.0 kV cm<sup>-1</sup>)、400 Ω、50 μF の条件でパルスをかけたサンプルにのみ、0.2% (w/v) の 5-FOA (選択物質) と 10 μg ml<sup>-1</sup> のウラシルを含むロールチューブ上にコロニーが確認された。それ以外の条件ではコロニーは確認されなかった。そのため、以降の実験では、2 mm ギャップのキュベットで 2.0 kV (10.0 kV cm<sup>-1</sup>)、400 Ω、50 μF の条件でパルスをかけることにした。

得られたコロニーの中からいくつかを選択し、0.2% (w/v) の 5-FOA と 10 μg ml<sup>-1</sup> のウラシルを含むフルクトース液体培地へ植え継いだ。2 回の植え継ぎの後、ウラシルも酵母エキスも含まない完全合成培地 (4-2-1 を参照) へ植え継いだところ、野生株は問題なく増殖できたのに対し、これらの株は全く増殖できなかった。また、この完全合成培地に 10 μg ml<sup>-1</sup> のウラシルのみを添加すると、これらの株は増殖できるようになった。これらのことから、これらの株がウラシル要求性株に形質転換していることが確認された。

次に、この pGDPyrE を用いた形質転換の効率を求めるために、同様の形質転換を計 4 回行い、用いた DNA 1 μg 当たり得られたコロニーの数を測定した。結果を表 7-10 に示す。

**表 7-10 pGDPyrE による形質転換効率**

	Transformants μg DNA <sup>-1</sup>
1回目	66.0
2回目	25.2
3回目	34.7
4回目	14.4
平均 ± 標準偏差	35.1 ± 22.2

最大で DNA 1 μg 当たり約 66 個のコロニーが得られたものの、効率はあまり安定せず、効率の平均は DNA 1 μg 当たり約 35 個となった。この値は、同じダブルクロスオーバーの相同性組換えによる遺伝子破壊を行った Sato ら<sup>75)</sup>の値 (10<sup>2</sup> transformants μg DNA<sup>-1</sup> 4×10<sup>8</sup> cells<sup>-1</sup>) よりは低いものの、毎回安定して形質転換体を得るには十分な効率であると思われる。

#### 7-3-5 pGDPyrE2 を用いた相同性組換えによる *pyrE* の破壊

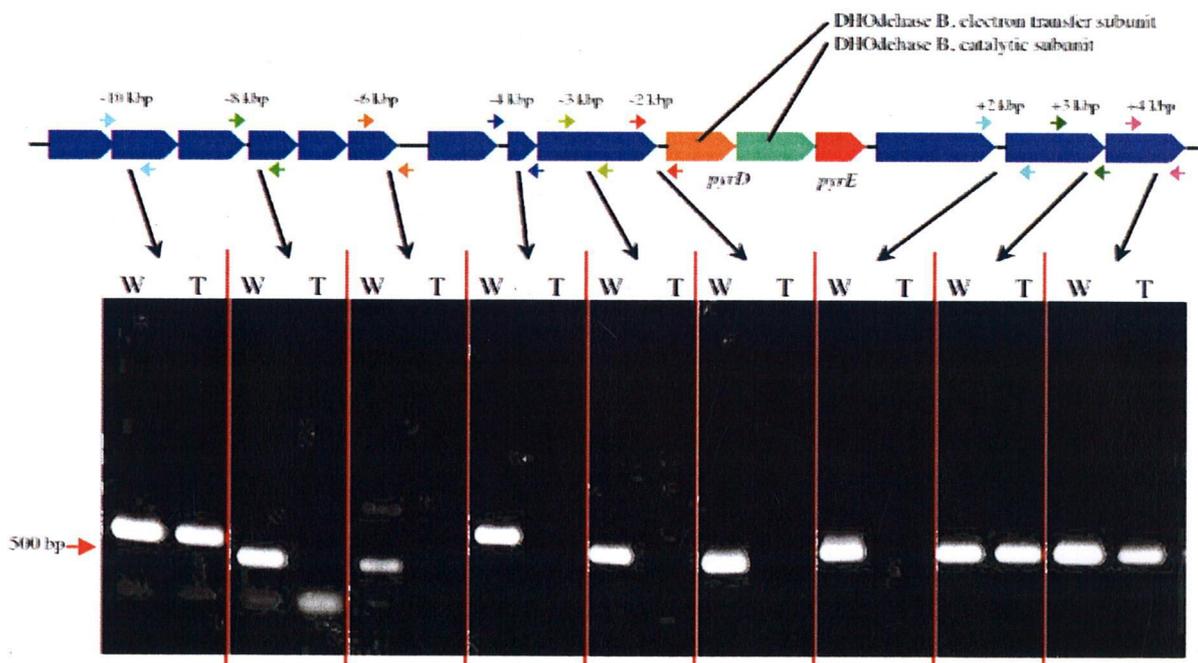
ダブルクロスオーバーを起こすための相同性領域をより短くしても形質転換が行えるのかを確認するために、前後の相同性領域の長さを pGDPyrE の 1,000 bp から 500 bp に短縮したプラスミド pGDPyrE2 (図 17) を用いて、相同性組換えによる *pyrE* の破壊を試みた。その結果、効率は DNA 1 μg 当たり約 8 個と pGDPyrE に比べて低下したものの、コロニーを得ることができた。また、得られたコロニーの 1 つを選択し、pGDPyrE の場合と同様に液体培養を行ったところ、ウラシル要求性株であることが確認された。このことから、効率は落ちるものの、相同性領域が 500 bp でも形質転換は可能であることが確認された。このような効率の低下は、Sato ら<sup>75)</sup>の実験でも確認されている。

#### 7-3-6 ウラシル要求性株の *pyrE* の破壊の確認

pGDPyrE 及び pGDPyrE2 を用いて形質転換を行い、ウラシル要求性が確認された株 (計 28 株) から、ゲノム DNA を回収し、7-2-6 に示した PCR によって *pyrE* の破壊の確認を行った。しかしながら、確

認を行った 28 株すべてで、野生株で見られるバンド（約 2,600 bp）は無くなっているものの、*pyrE* が失われていれば見られるはずのバンド（約 2,000 bp）も見られないという結果になった（data not shown）。このことから、これらの株では、何らかの理由で *pyrE* 周辺のより広い範囲の配列がゲノム上から失われている可能性があると考えられた。

これらの株のゲノム DNA がどの程度の範囲で失われているのかを確認するために、*pyrE* が存在した位置から上流に 10 kbp、8 kbp、6 kbp、4 kbp、3 kbp、2 kbp、及び下流に 2 kbp、3 kbp、4 kbp 付近の 500bp 程度の配列をそれぞれ増幅するようにプライマーを設計した（図 18）。そして、pGDPyrE を用いて得られたウラシル要求性株と pGDPyrE2 を用いて得られたウラシル要求性株から 1 つずつを選び、それぞれのゲノム DNA を鋳型に、これらのプライマーを用いて PCR による確認を行った。PCR 反応液組成と反応条件を表 7-11 に、各遺伝子に対して用いたプライマーの配列を表 7-12 に示す。結果を図 18 に示す。図には pGDPyrE2 を用いて得られた株の結果のみを示したが、pGDPyrE を用いて得られた株も、PCR の結果は全く同じであった。この結果は、今回得られたウラシル要求性株のゲノム DNA から、*pyrE* の上流は少なくとも約 8 kbp、下流は少なくとも 2 kbp の長さにわたって配列が失われている可能性が高いことを意味している。何故このような現象が起こったのかは不明であるが、HUC22-1 株では元々ゲノム DNA のリアレンジメントが起きやすいのかもしれない。図 18 に示したように、この範囲には多くの ORF が含まれており、これらもゲノム DNA から失われている可能性が高い。特に *pyrE* の直前には、*pyrE* と同じくピリミジン合成経路を構成する酵素の 1 つである Dihydroorotate dehydrogenase (DHODhase) をコードする *pyrD* と推測される遺伝子が存在している。今後、サザンプロット解析等で確認しなければ断定はできないが、これらの株では *pyrE* と *pyrD* の両方が失われている可能性が高い。なお、菌体増殖や生産物を見る限り、これらの株と野生株との間には、ウラシル要求性であること以外特に違いは見られなかった。



W: 野生型 HUC22-1 株ゲノム, T: pGDPyrE2 による形質転換体ゲノム

図 18 PCR による *pyrE* 周辺配列の確認

表 7-11 PCR 反応液組成と反応条件

Premix Taq™ (TaKaRa Ex Taq™ Version)	25 $\mu$ l
ゲノム DNA (0.1 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l
Primer F (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
Primer R (20 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

94°C	1 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
58°C	30 sec	
72°C	1 min	
4°C	$\infty$	

表 7-12 *pyrE* の破壊の確認に用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
<i>pyrE</i> -10ku-F	CGACGACCTGGAAACCTTGA
<i>pyrE</i> -10ku-R	CTCTACCTTCGTACCGGCTT
<i>pyrE</i> -8ku-F	GTGCCCTTGAAGGGTCACGA
<i>pyrE</i> -8ku-R	CCGCGTAATGACGACATTGA
<i>pyrE</i> -6ku-F	TCTCGGCGAAGTGGTGGCTT
<i>pyrE</i> -6ku-R	CCGGCCTCGCCCTTTAAGAT
<i>pyrE</i> -4ku-F	CTGATACAGAACCCGGAGGA
<i>pyrE</i> -4ku-R	GGCTTCGGTGAGTTTGGTAA
<i>pyrE</i> -3ku-F	CGTGGAGGAATCCAAAGGTA
<i>pyrE</i> -3ku-R	TATCCGGGCTTCAATGGCCT
<i>pyrE</i> -2ku-F	GTCCTGACCACTGAGAGTCT
<i>pyrE</i> -2ku-R	GGTCCCAGGAGATCTACCTT
<i>pyrE</i> -2kd-F	AGGCGGTTAATGGTGTGCA
<i>pyrE</i> -2kd-R	TTAAGGGCAAGCTGCAGGCT
<i>pyrE</i> -3kd-F	GGCGTCCGCGACAAAATAA
<i>pyrE</i> -3kd-R	CCCATGGACATGGGTTCATT
<i>pyrE</i> -4kd-F	AATGTTGCTGCTCTCTCCCA
<i>pyrE</i> -4kd-R	GGTCCCTTACCGTAGGTAAA

### 7-3-7 ウラシル生合成能の相補性試験について

予想していた通り *pyrE* のみが破壊された株が得られれば、7-2-2 で得られた pGEMPyrE (図 17 左上) を用いて再度相同性組換えを行い、*pyrE* を再導入することでウラシル生合成能を取り戻させる相補性試験を行う予定であった。しかしながら、7-3-6 での確認の結果から、*pyrE* だけではなく *pyrD* も失われている可能性が高くなり、また *pyrE* の周辺の配列も失われていると考えられたため、pGEMPyrE をこれらのウラシル要求性株に導入したとしても、相同性組換えを起こしてウラシル生合成能を取り戻させることは困難であると考えられた。

これらのウラシル要求性株に相同性組換えを用いてウラシル生合成能を取り戻させるためには、*pyrE* と *pyrD* の両方を同時に、ゲノム DNA 上の *pyrE* の周辺とは別の部位に再導入しなければならないと考えられる。再導入する部位の候補としては、第 1 章で配列を決定した *adhC* の周辺が考えられる。この遺伝子は、第 2 章、第 3 章での解析から、ほとんど機能していないと考えられるため、仮に破壊しても菌体に影響はほぼ無いと思われる。現在、この *adhC* 周辺の配列を標的に、相同性組換えによって *pyrE* と *pyrD* の両方をゲノム DNA に再導入するためのプラスミドを構築中である。

### 7-3-8 遺伝子導入法の確立とエタノール高生産株の育種について

今回の研究で得られたウラシル要求性株 (おそらくは  $\Delta pyrE$ ,  $\Delta pyrD$  株) をホストに、*pyrE* と *pyrD* を選択マーカーに用いた遺伝子導入法を確立し、エタノール高生産株を育種しようと考えた場合、その手法は以下の 2 通りが考えられる。

1 つは、7-3-6 で述べたように相同性組換えによって *pyrE* と *pyrD* をゲノム DNA に再導入する方法である。その際に、これらの選択マーカーとともにエタノール生産に関与する遺伝子を導入すれば、エタノール生産性が向上した株が得られると考えられる。導入する遺伝子の候補としては、HUC22-1 株自身の *adhA* や *aldh* の他に、エタノール高生産株である *T. ethanolicus* 39E が持つ secondary Adh gene (*sadh*) が考えられる。この酵素は、アセチル-CoA を直接エタノールにまで変換でき、39E 株のエタノール生産に主要な役割を果たしていると報告されているため<sup>25)</sup>、導入できればエタノール生産性の向上が期待できる。我々はすでに 39E 株のゲノム DNA からこの遺伝子をクローニングしている。しかしながら、外来の遺伝子を導入する場合、その遺伝子が HUC22-1 株で発現できるか分からないという問題が生じる。この問題を解決するためには、HUC22-1 株由来の高発現可能なプロモーターが必要である。その候補としては、carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase gene (*codh/lacs*) のプロモーターが考えられる。この酵素は、図 3 に示した Wood-Ljungdahl pathway において CO<sub>2</sub> を活性型 CO に還元する反応と、アセチル-CoA を合成する反応を触媒する酵素であるため、高発現が期待できる。我々はすでに *codh/lacs* と推定される遺伝子を HUC22-1 株ゲノムからクローニングし、その配列を決定している。

もう 1 つの方法は、第 6 章で用いたシャトルベクターによる遺伝子導入法である。第 7 章での結果から、6-3-3 で挙げた 3 つの問題点のうち、1) は解決済みであり、3) は *pyrE* と *pyrD* を選択マーカーに用いることで解決が可能である。そのため、残る 2) のプラスミドの複製の問題が原因でないならば、シャトルベクターによる遺伝子導入法は可能になると考えられる。この場合、導入した遺伝子を多コピーで菌体に持たせることが可能になるため、前述の方法よりも高発現が期待できる。また、再度の相同性組換えも不要である。

#### 第4節 要約

本章では、新たな遺伝子導入法として、ウラシル要求性を利用した方法を提案し、相同性組換えによって、ピリミジン生合成に関わる遺伝子である *pyrE* を破壊されたウラシル要求性株の獲得を試みた。その結果、ウラシル要求性株は得られたものの、そのゲノム DNA 上からは *pyrE* だけではなくその周辺の配列も失われている可能性が高いことが分かった。その中には、*pyrE* 同様ピリミジン生合成に関わる遺伝子である *pyrD* と推測される遺伝子も含まれていた。現在、この  $\Delta pyrE$ ,  $\Delta pyrD$  株と思われる株をホストに、*pyrE* と *pyrD* を選択マーカーに用いた遺伝子導入法の確立を検討中である。

## 総括

当研究室で単離された好熱性嫌気性細菌 *Moorella* sp. HUC22-1 は、 $H_2$ - $CO_2$  ガスを基質として酢酸と微量のエタノールを生産する。しかしながら、どのような代謝経路で  $H_2$ - $CO_2$  ガスからエタノールを生産するのかについては全く不明であった。そこで第 1 章では、 $H_2$ - $CO_2$  からアセチル-CoA 経路を介し、Aldh、Adh によってエタノールを生産する経路 (図 4) を提案し、本菌のゲノム DNA から上記の Aldh 及び Adh をコードする遺伝子の候補を検索した。その結果、3 つの *adh* (*adhA*, *adhB*, *adhC*)、及び *aldh* を発見し、それらをクローニングした。そしてそれらの遺伝子がコードしているタンパクが既知の Adh 及び Aldh とアミノ酸レベルで相同性を持つ事を確認した。しかしながら、これらのタンパクが実際に Adh 及び Aldh としての活性を有しているのかについては不明であった。

そこで第 2 章では、第 1 章で得られた 4 つの遺伝子を *E. coli* でそれぞれ大量発現させ、精製した後、得られた精製酵素の特性解析を行った。その結果、AdhC を除く Adh、Aldh がエタノールを生産する方向の活性を有していることが確認された。さらに、AdhA と Aldh を組み合わせることで、アセチル-CoA から直接エタノールを生産できることも確認した。今回のような精製度の高い酵素を用いた好熱性 Adh、Aldh の特性解析はほとんど例が無く、この研究で得られた情報は、今後の好熱性 Adh、Aldh の研究に大いに役立つものと思われる。なお、以前に酒井が行った粗酵素抽出液を用いた活性測定<sup>16)</sup>での結果との相違から、本菌に今回解析したもの以外の未知の Adh が存在する可能性は残されている。

第 3 章では、 $H_2$ - $CO_2$  培養の菌体 (エタノールを生産) と、フルクトース培養の菌体 (エタノール非生産) からそれぞれ RNA を抽出し、RTQ-PCR によって各培養条件における *adhA*, *adhB*, *adhC* 及び *aldh* の発現レベルの解析を行った。その結果、エタノール非生産条件であるフルクトース培養よりも、エタノール生産条件である  $H_2$ - $CO_2$  培養のほうが、*aldh* の発現レベルがおよそ 3 倍高くなっていることが分かった。*aldh* はアセチル-CoA からのエタノール生産経路の入り口に当たる遺伝子であり、この結果は本菌においてエタノールの生産が転写レベルで制御されていることを示唆するものであった。これにより、アセチル-CoA からの Aldh、Adh を介したエタノール生産経路が裏付けられた。

第 4 章では、本菌のエネルギー代謝をより詳細に把握するために、各種の有機酸を基質として本菌の培養を行い、代謝特性の解析を行った。その結果、グリオキシル酸培養時における  $Y_{X/S}$  が  $H_2$ - $CO_2$  培養時のそれを大きく上回る値を示した。これにより、本菌が Wood-Ljungdahl pathway 以外に、グリオキシル酸培養時に働く未知の ATP 生成経路を持っていることが示唆された。そして、他の嫌気性細菌と  $Y_{X/S}$  を比較した結果から、本菌のグリオキシル酸代謝経路の候補としてマリル-CoA 経路 (図 12) が挙げられた。そこで第 5 章では、様々な基質で培養した本菌の菌体から粗酵素液を抽出し、このマリル-CoA 経路に関わる酵素の活性測定を行い、その活性を比較した。その結果、グリオキシル酸培養、グリコール酸培養の菌体の粗酵素液から、 $H_2$ - $CO_2$  培養の菌体と比べて高い活性が検出された。また、これらの酵素による ATP 生産も確認された。これらのことから、本菌がマリル-CoA 経路でグリオキシル酸及びグリコール酸を異化し、ATP を生産していることが裏付けられた。

第 6 章では、シャトルベクタープラスミド (pNAK2 及び pIKM1) とエレクトロポレーション法を用いて、本菌の分子生物学的育種によるエタノール高生産株の作製に必要な遺伝子導入法の開発を試みた。しかしながら、どちらのシャトルベクターを用いた場合でも、遺伝子導入が確認された株は獲得できなかった。そしてその原因は、シャトルベクター上の複製起点、もしくは抗生物質耐性遺伝子が本菌でうまく機能できていないためではないかと考えられた。そのため、これらの問題を解決できる新たな遺伝子導入法が必要になった。

そこで第 7 章では、新たな遺伝子導入法として、ウラシル要求性を利用した方法を提案し、相同性組換えによって、ピリミジン生合成に関わる遺伝子である *pyrE* を破壊されたウラシル要求性株の獲得を試みた。その結果、ウラシル要求性株は得られたものの、そのゲノム DNA 上からは *pyrE* だけではなくその周辺の配列も失われている可能性が高いことが分かった。その中には、*pyrE* 同様ピリミジン生合成に関わる遺伝子である *pyrD* と推測される遺伝子も含まれていた。現在、この  $\Delta pyrE$ ,  $\Delta pyrD$  株と思われる株をホストに、*pyrE* と *pyrD* を選択マーカーに用いた遺伝子導入法の確立を検討中である。なお、当研究室の増馬によって、相同性組換えによって *pyrE* のみを破壊する試みは現在も続けられている。

今後、分子生物学的育種により本菌のエタノール高生産株が作製され、エタノール生産に利用できるようになれば、リグノセルロース系バイオマスなどから得られる合成ガスを効率的にエタノールに変換するプロセスを開発でき、未利用資源の有効利用による循環型社会の構築の一助になると期待される。

また、本菌に対する遺伝子導入法が確立されれば、エタノール高生産株の育種のみならず、様々な有用遺伝子の導入や、遺伝子破壊による遺伝子機能解析など、これまで困難だった多くの研究への応用が期待される。

## 参考文献

- 1) Sun, Y., and Cheng, J.: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 2002; 83: 1-11
- 2) McKendry, P.: Energy production from biomass (Part 1): Overview of biomass. *Bioresour. Technol.* 2002; 83: 37-46
- 3) McKendry, P.: Energy production from biomass (Part 2): Conversion technologies. *Bioresour. Technol.* 2002; 83: 47-54
- 4) McKendry, P.: Energy production from biomass (Part 3): Gasification technologies. *Bioresour. Technol.* 2002; 83: 55-63
- 5) Vega, J. L., Prieto, S., Elmore, B. B., Clausen, E. C., and Gaddy, J. L.: The biological production of ethanol from synthesis gas. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1989; 20/21: 781-97
- 6) Tanner, R. S., Miller, L. M., and Yang, D.: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1993; 43: 232-6
- 7) Abrini, J., Naveau, H., and Nyns, E. J.: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Arch. Microbiol.* 1994; 161: 345-51
- 8) Fröstl, J. M., Seifritz, C., and Drake, H. L.: Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 4597-603
- 9) White, H., Lebertz, H., Thanos, I., and Simon, H.: *Clostridium thermoaceticum* forms methanol from carbon monoxide in the presence of viologen dyes. *FEMS Microbiol. Lett.* 1987; 43, 173-6
- 10) Lamed, R., and Zeikus, J. G.: Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields of and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. *J. Bacteriol.* 1980; 144: 569-78
- 11) Zeikus, J. G. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1980; 34: 423-64
- 12) Payton, M. A.: Production of ethanol by thermophilic bacteria. *Trends Biotechnol.* 1984; 2: 153-8
- 13) 亀山秀雄: 水素製造技術, 化学工学, 2004; 68: 166-71

- 14) 吉本秀之: 修士論文, 2004
- 15) 酒井伸介: 博士論文, 2005
- 16) Sakai, S., Nakashimada, Y., Yoshimoto, H., Watanabe, S., Okada, H., and Nishio, N.: Ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by a newly isolated thermophilic bacterium, *Moorella* sp. HUC22-1. *Biotechnol. Lett.* 2004; 26: 1607-12
- 17) Sakai, S., Nakashimada, Y., Inokuma, K., Kita, M., Okada, H., and Nishio, N.: Acetate and ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by *Moorella* sp. using a repeated batch culture. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 99: 252-8
- 18) Ljungdahl, L. G.: The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1986; 40: 415-50
- 19) Diekert, G. and Wohlfarth, G.: Metabolism of homocetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1994; 66: 209-21
- 20) 今井竹夫: アセチルコエンザイム A 経路—嫌気性細菌の CO<sub>2</sub> 固定経路, *生化学*, 1994; 66: 1335-9
- 21) Hungate, R. E.: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* 1969; 3B: 117-32
- 22) Miller, T. L. and Wolin, M. J.: A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 1974; 27: 985-7
- 23) Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 1961; 3: 208-18
- 24) Antoine, E., Rolland, J. L., Raffin, J.P., and Dietrich, J.: Cloning and over-expression in *Escherichia coli* of the gene encoding NADPH group III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus hydrothermalis*. Characterization and comparison of the native and the recombinant enzymes. *Eur. J. Biochem.* 1999; 264: 880-9
- 25) Burdette, D., and Zeikus, J.G.: Purification of acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E and characterization of the secondary-alcohol dehydrogenase (2 degrees Adh) as a bifunctional alcohol dehydrogenase--acetyl-CoA reductive thioesterase. *Biochem. J.* 1994; 302 ( Pt 1): 163-70

- 26) Holt, P. J., Williams, R. E., Jordan, K. N., Lowe, C. R., and Bruce, N. C.: Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the primary alcohol dehydrogenase gene from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200. FEMS Microbiol. Lett. 2000; 190: 57-62
- 27) Li, D., and Stevenson, K. J.: Purification and sequence analysis of a novel NADP(H)-dependent type III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus* strain AN1. J. Bacteriol. 1997; 179: 4433-7
- 28) Clark, D. P. and Cronan.: Acetaldehyde coenzyme A dehydrogenase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1980; 144: 179-84
- 29) Yoon, S. Y., Noh, H. S., Kim, E. H., and Kong, K. H.: The highly stable alcohol dehydrogenase of *Thermomicrobium roseum*: purification and molecular characterization. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2002; 132: 415-22
- 30) Palosaari, N. R., and Rogers, P.: Purification and properties of the inducible coenzyme A-linked butyraldehyde dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. 1988; 170: 2971-6
- 31) Yan, R. T., and Chen, J. S.: Coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56: 2591-9
- 32) Burton, R. M., and Standtman, E. R.: The oxidation of acetaldehyde to acetyl coenzyme A. J. Biol. Chem. 1953; 202: 873-90
- 33) Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y) 1992; 10: 413-7
- 34) Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y) 1993; 11: 1026-30
- 35) ISOGEN を用いたグラム陽性菌からの RNA 抽出, WAKO BIO WINDOW, 2001; 34: 12
- 36) Eleaume, H., and Jabbouri, S.: Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. J. Microbiol. Methods 2004; 59: 363-70
- 37) Stevenson, D. M., and Weimer, P. J.: Expression of 17 genes in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during fermentation of cellulose or cellobiose in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71: 4672-8

- 38) Thauer, R. K., Jungermann, K., and Decker, K.: Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 1977; 41: 100-80
- 39) Tshech, A., and Pfennig, N.: Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 1984; 137: 163-7
- 40) Friedrich, M., and Schink, B.: Hydrogen formation from glycolate driven by reversed electron transport in membrane vesicles of a syntrophic glycolate-oxidizing bacterium. *Eur. J. Biochem.* 1993; 217: 233-40
- 41) Drake, H. L., and Daniel, S. L.: Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Res. Microbiol.* 2004; 155: 422-36
- 42) Strohhäcker, J., and Schink, B.: Energetic aspects of malate and lactate fermentation by *Acetobacterium malicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991; 90: 83-8
- 43) Herter, S., Busch, A., and Fuchs, G.: L-Malyl-coenzyme A lyase/beta-methylmalyl-coenzyme A lyase from *Chloroflexus aurantiacus*, a bifunctional enzyme involved in autotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *J. Bacteriol.* 2002; 184: 5999-6006
- 44) Meister, M., Saum, S., Alber, B. E., and Fuchs, G.: L-malyl-coenzyme A/beta-methylmalyl-coenzyme A lyase is involved in acetate assimilation of the isocitrate lyase-negative bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 2005; 187: 1415-25
- 45) Tuboi, S. and Kikuchi, G.: Enzymic cleavage of malyl-coenzyme A into acetyl-coenzyme A and glyoxylic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1965; 96: 148-53
- 46) Stams, A. J. K., Kremer, D. R., Nicolay, K., Weenk, G. H., and Hensen, T. A.: Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch. Microbiol.* 1984; 139:167-73
- 47) Odom, J. M., and Peck.: Localization of dehydrogenases, reductases, and electron transfer components in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 1981; 147: 161-9
- 48) Zelitch, I.: Oxidation and reduction of glycolic and glyoxylic acids in plants. II. Glyoxylic acid reductase. *J. Biol. Chem.* 1953; 201: 719-26
- 49) Friedrich, M., and Schink, B.: Hydrogen formation from glycolate driven by reversed electron transport in membrane vesicles of a syntrophic glycolate-oxidizing bacterium. *Eur. J. Biochem.* 1993; 217: 233-40
- 50) Zelitch, I.: The isolation and action of crystalline glyoxylic acid reductase from tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* 1955; 216: 553-75

- 51) O'sullivan, D. J., and Klaenhammer, T. R.: Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 2730-33
- 52) Hosino, T., Eda, S., Fukase, Y., and Oda, M.: Determination of the transcriptional initiation sites of the kanamycin resistance genes of pUB110 and pTHN1. *J. Ferment. Bioeng.* 1995; 79: 62-3
- 53) Mai, V., Lorenz, W. W., and Wiegel, J.: Transformation of *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485 with plasmid pIKM1 conferring kanamycin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997; 148: 163-7
- 54) Tyurin, M. V., Desai, S. G., and Lynd, L. R.: Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 883-90
- 55) Feustel, L., Nakotte, S., Dürre, P.: Characterization and development of two reporter gene systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 798-803
- 56) Mai, V., and Wiegel, J.: Advances in development of a genetic system for *Thermoanaerobacterium* spp.: expression of genes encoding hydrolytic enzymes, development of a second shuttle vector, and integration of genes into the chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 4817-21
- 57) Isaac, J. H., and Holloway, B. W.: Control of pyrimidine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1968; 96: 1732-41
- 58) Chu, C. P., and West, T. P.: Pyrimidine biosynthetic pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* 1990; 136: 875-80
- 59) West, T. P.: Control of the pyrimidine biosynthetic pathway in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Arch. Microbiol.* 1994; 162: 75-9
- 60) Neuhard, J., and Kelln, R.: Biosynthesis and conversion of pyrimidines. In: *Escherichia coli* and *Salmonella* (F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C Linn, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger, Editors), pp. Cell and Mol Biol., 2nd ed. Am. Soc. Microbiol. 1996; 580-99
- 61) West, T. P.: Pyrimidine biosynthesis in *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1997; 72: 175-81
- 62) West, T. P.: Control of pyrimidine synthesis in *Pseudomonas fragi*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002; 35: 380-4

- 63) West, T. P.: Control of pyrimidine biosynthesis in "*Pseudomonas alkanolytica*" ATCC 21034. *J. Basic Microbiol.* 2004; 44: 253-7
- 64) West, T. P.: Effect of carbon source on pyrimidine formation in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. *Microbiol. Res.* 2005; 160: 337-42
- 65) Denis-Duphil, M.: Pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *uraA* cluster gene, its multifunctional enzyme product, and other structural or regulatory genes involved in de novo UMP synthesis. *Biochem. Cell Biol.* 1989; 67: 612-31
- 66) Doremus, H. D.: Organization of the pathway of de novo pyrimidine nucleotide biosynthesis in pea (*Pisum sativum* L. cv Progress No. 9) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986; 250: 112-9
- 67) Jones, M. E.: The genes for and regulation of the enzyme activities of two multifunctional proteins required for the de novo pathway for UMP biosynthesis in mammals. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 1980; 32: 165-82
- 68) Jones, M. E.: Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 1980; 49: 253-79
- 69) McClarty, G., and Qin, B.: Pyrimidine metabolism by intracellular *Chlamydia psittaci*. *J. Bacteriol.* 1993; 175: 4652-61
- 70) Mitchell, A., and Finch, L. R.: Pathways of nucleotide biosynthesis in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *J. Bacteriol.* 1977; 130: 1047-54
- 71) Heyworth, P. G., Gutteridge, W. E., Ginger, C. D.: Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* 1984; 176: 55-60
- 72) Boeke, J. D., LaCrute, F., and Fink, G. R.: A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 1984; 197: 345-6
- 73) Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R.: 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 1987; 154: 164-75
- 74) Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T.: Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* 2003; 185: 210-20

- 75) Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T.: Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 3889-99
- 76) Andreesen, J. R., Schaupp, A., Neurauder, C., Brown, A., and Ljungdahl, L. G.: Fermentation of glucose, fructose, and xylose by *Clostridium thermoaceticum*: effect of metals on growth yield, enzymes, and the synthesis of acetate from CO<sub>2</sub>. *J. Bacteriol.* 1973; 114: 743-51
- 77) Bainotti, A. E., and Nishio, N.: Growth kinetics of *Acetobacterium* sp. on methanol-formate in continuous culture. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 88: 191-201

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導頂きました広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻 西尾 尚道教授、柿蘭 俊英准教授、葉山 八千代助教、東京農工大学大学院共生科学技術研究院工学府応用化学専攻 中島田 豊准教授に厚く御礼申し上げます。また、論文審査に際し貴重な助言とご指導を頂きました分子生命化学研究室 小椋 和久教授、細胞機能工学研究室 加藤 純一教授に深く感謝致します。

最後に、同じ研究グループとして御助力頂きました酒井伸介博士、吉本 秀之さん、喜多 正幸君、赤星 卓也君、鸛野 正浩君、増馬孝昭君、秀衡 かおりさんを始め、代謝変換制御学研究室の皆様改めて御礼申し上げます。

2008年3月

猪熊 健太郎

# 公表論文

- (1) Characterization of enzymes involved in the ethanol production of *Moorella* sp. HUC22-1.  
Kentaro Inokuma, Yutaka Nakashimada, Takuya Akahoshi, and Naomichi Nishio  
Archives of Microbiology, 188: 37-45 (2007).
- (2) Degradation of glyoxylate and glycolate with ATP synthesis by a thermophilic anaerobic bacterium, *Moorella* sp. strain HUC22-1.  
Shinsuke Sakai, Kentaro Inokuma, Yutaka Nakashimada, and Naomichi Nishio  
Applied and Environmental Microbiology, 74: 1447-52 (2008).