

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株における
炭酸固定経路の生化学的解析

矢野 嵩典

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室

(高木 博史 教授)

平成 27 年 1 月 20 日 提出

目次

序論	5
1. 微生物の炭酸固定系を研究する意義	
2. 微生物の炭酸固定経路	
3. 超低栄養性細菌 <i>Rhodococcus erythropolis</i> N9T-4 株	
4. 本研究の目的	
第一章 N9T-4 株の CO 資化性と CO 脱水素酵素の関連性	12
1-1. 緒言	
1-2. 実験材料及び方法	12
1-2-1. 試薬	
1-2-2. 菌株	
1-2-3. 培地	
1-2-4. 培養方法	
1-2-5. ガス状 C1 化合物の吹き込みによる培養	
1-2-6. 遺伝子の発現誘導	
1-2-7. リアルタイム PCR	
1-2-7-1. 使用したプライマー	
1-2-7-2. cDNA 調製及びリアルタイム PCR の条件	
1-2-8. アクセション番号	
1-3. 結果	16
1-3-1. 本菌の生育におけるガス状 C1 化合物の添加効果	
1-3-2. N9T-4 株の CO 資化性と CODH の関連性	
1-4. 考察	22
第二章 N9T-4 株の低栄養生育に必要な遺伝子の同定	24
2-1. 緒言	
2-2. 実験材料及び方法	26
2-2-1. 試薬	
2-2-2. 菌株	
2-2-3. 培地	

2-2-4.	培養方法	
2-2-5.	N9T-4 株の DNA 抽出	
2-2-6.	ランダム変異ライブラリーの構築	
2-2-7.	低栄養欠失変異株の生育試験	
2-2-8.	標的遺伝子欠損株の生育試験	
2-2-9.	アクセッション番号	
2-3.	結果	29
2-4.	考察	33

第三章 N9T-4 株における炭酸固定経路の生化学的解析

3-1.	緒言	
3-2.	実験材料及び方法	36
3-2-1.	試薬	
3-2-2.	菌株	
3-2-3.	培地	
3-2-4.	培養方法	
3-2-5.	無細胞抽出液の調製	
3-2-6.	酵素活性の測定	
3-2-7.	N9T-4 株の粗酵素反応及び休止菌体反応	
3-2-8.	リコンビナント KGD (rKGD) の発現と精製	
3-2-8-1.	使用したプライマー	
3-2-8-2.	<i>sucA</i> 遺伝子のクローニング	
3-2-8-3.	KGD タンパク質の異種発現と精製	
3-2-9.	ガスクロマトグラフィー (GC) による GO の検出	
3-2-9-1.	トリメチルシリル (TMS) 誘導体化	
3-2-9-2.	GC 分析	
3-2-10.	薄層クロマトグラフィー (TLC) による酵素反応の解析	
3-2-11.	高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による酵素反応の解析	
3-2-12.	酵素法によるグルタミン酸の定量	
3-2-13.	DNA マイクロアレイ解析	
3-2-14.	アクセッション番号	
3-3.	結果	47
3-3-1.	N9T-4 株における TCA 回路関連酵素の活性測定	
3-3-2.	KG から GO を生成する反応の解析 (ICD 逆反応 + ICL 反応)	
3-3-3.	N9T-4 株における TCA バイパス経路の活性測定	
3-3-4.	N9T-4 株由来の rKGD の機能	

3-3-5.	SSA から KG を生成する反応の解析 (KGD 逆反応)	
3-3-6.	DNA マイクロアレイ解析	
3-3-7.	炭酸固定を経てピルビン酸を生成する反応の解析	
3-4.	考察	61
3-4-1.	N9T-4 株における変形 TCA 回路	
3-4-2.	新たな炭酸固定経路の推定	
総括		67
謝辞		69
参考文献		70

序論

1. 微生物の炭酸固定系を研究する意義

近年、地球温暖化が国際的な社会問題となっているが、その主因は「人為的な温室効果ガス（特に CO_2 ）の排出」にあると考えられている。IPCC（気候変動に関する政府間パネル）第 5 次評価報告書[1]によると、2011 年時点の大気中 CO_2 濃度は世界平均で 391 ppm であり、工業化以前の水準より約 40% 高い値であったという。温室効果ガスの削減と脱石油社会の実現を進めていく上で、バイオテクノロジーを用いて現大気中の CO_2 由来のバイオマス資源を増産させることは不可欠である。従って、生物による高効率な炭酸固定系の構築はバイオサイエンスにおける重要課題の一つである。生物による CO_2 固定については、植物の光合成がよく知られているが、微生物の中にも様々な反応により CO_2 を固定し、生育するもの（独立栄養性細菌）が見出されている。独立栄養性細菌の高効率な炭酸固定系を実証し、既存の微生物反応とハイブリッド化させることで、 CO_2 を原料としたカーボンニュートラルな有用物質生産が可能になると期待できる。

2. 微生物の炭酸固定経路

これまでに、微生物（独立栄養性細菌）の炭酸固定経路として 6 種類が報告されている（図 1, 2）[2-4]。糖代謝を基盤とするものとしてカルビン-ベンソン回路[5]、C1 代謝を基盤とするものとして還元的アセチル-CoA 経路（Wood-Ljungdahl 経路ともいう）[6, 7]、有機酸代謝を基盤とするものとして還元的 TCA 回路 [8, 9]、3-ヒドロキシプロピオン酸回路（3-HP 回路）[10]、3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸回路（3-HP/4-HB 回路）[11]、ジカルボン酸/4-ヒドロキシプロピオン酪酸回路（DC/4-HB 回路）[12]が挙げられる。

カルビン-ベンソン回路は植物、藻類、シアノバクテリアなど光合成を行う生物が保有しており、炭酸固定酵素であるリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（RuBisCO）、RuBisCO に基質であるリブローズ-1,5-ビスリン酸（RuBP）を供給するホスホリブロキナーゼ（PRK）が鍵酵素となっている [5]。RuBisCO は 4 種類の酵素群（Form I-IV）に分類されるが、このうち Form III はアーキアのみが存在し、RuBisCO 活性を示す点で特徴的である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* は Form III RuBisCO を有する一方で PRK を有しておらず、カルビン-ベンソン回路を持

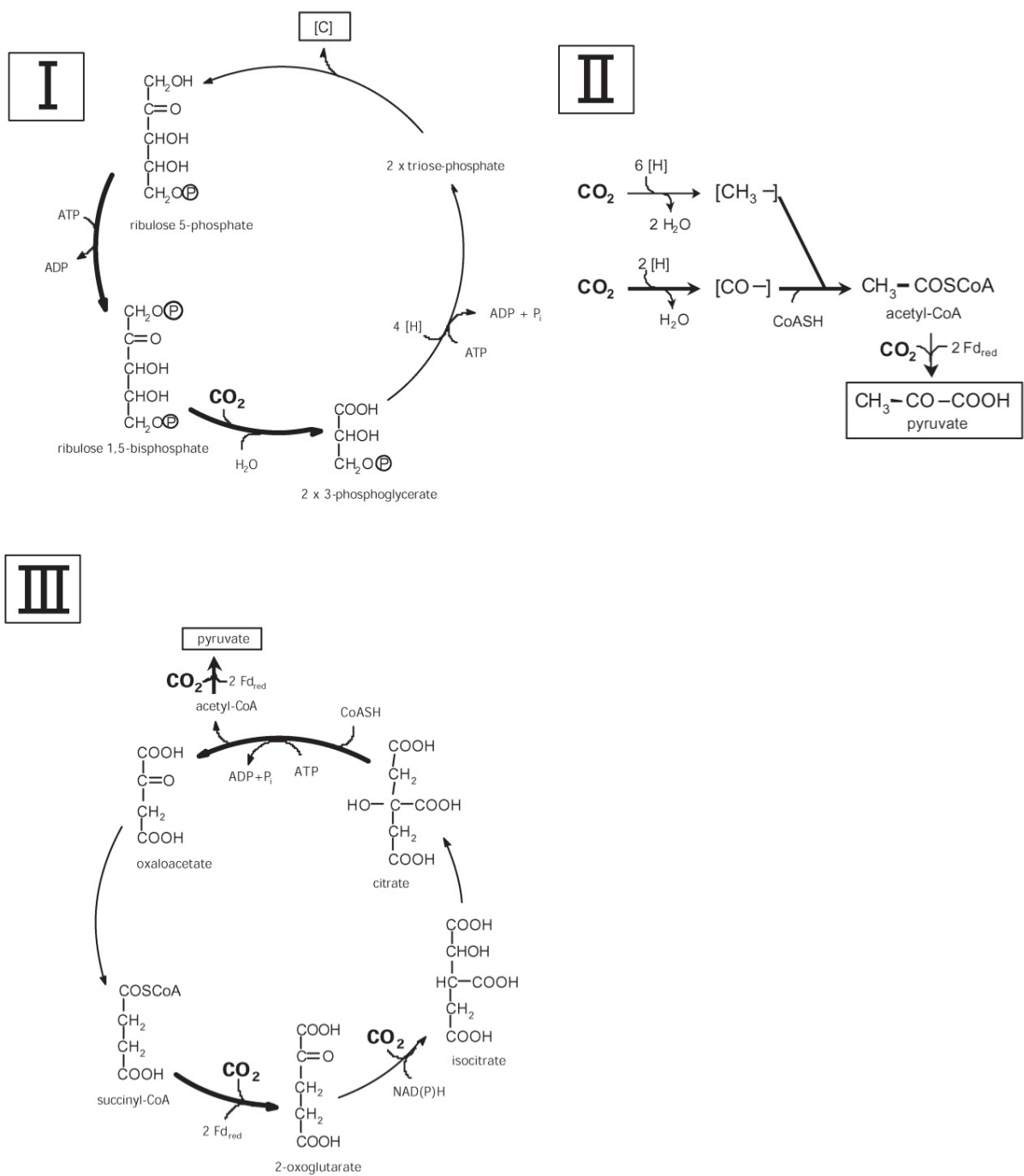


図 1. 微生物の炭酸固定経路[3]

I. カルビン・ベンソン回路.

II. 還元的アセチル-CoA 経路 (Wood-Ljungdahl 経路).

III. 還元的 TCA 回路.

I から III の各経路上の太矢印は鍵酵素反応を示す.

たない。*T. kodakaraensis* の RuBisCO は、核酸代謝産物であるアデノシンモノリン酸 (AMP) から生成された RuBP を基質とする炭酸固定を触媒することから、核酸代謝と解糖系/糖新生系を繋ぐ役割があると予想されている[13, 14]。Form III RuBisCO が機能する AMP 代謝経路は原始的な炭酸固定経路の一部となっている可能性があり、カルビン-ベンソン回路との進化的な関係に興味を持たれる。

還元的アセチル-CoA 経路は 6 種類の炭酸固定経路の中で唯一の一方通行的な非回路経路であり、その鍵酵素は二機能性の一酸化炭素デヒドロゲナーゼ (CODH) /アセチル-CoA 合成酵素 (ACS) である[6, 7]。CODH 活性により CO₂ から変換された一酸化炭素 (CO) と CO₂ 由来の活性型メチルカチオンが、ACS 活性により CoA の末端チオールをアセチル化して 1 分子のアセチル-CoA を生成するという経路である。

還元的 TCA 回路は TCA 回路の逆反応で構成され、TCA 回路には存在しない還元反応を触媒する ATP クエン酸リアーゼ、 α -ケトグルタル酸:フェレドキシンオキシドレダクターゼ (KGOR)、ならびに糖新生に向かうピルビン酸:フェレドキシンオキシドレダクターゼ (POR) が鍵酵素となっている[8, 9]。ATP クエン酸リアーゼは回路方向の決定に必要と考えられる。KGOR、POR は回路上で必須な炭酸固定酵素として働く。

3-HP 回路は長らく単一の回路と考えられていたが[15]、最近になって 1 分子のグリオキシル酸 (GO) が放出される第一回路、1 分子の GO が取り込まれる第二回路の 2 つの回路が共役して成立する回路であることが判明した[10]。3-HP 回路の鍵酵素はマロニル-CoA から 3-ヒドロキシプロピオン酸を経てプロピオニル-CoA に至る反応に関与するマロニル-CoA レダクターゼ及びプロピオニル-CoA シンターゼ、炭酸固定酵素としてのビオチン依存型のアセチル-CoA カルボキシラーゼ及びプロピニル-CoA カルボキシラーゼである。

3-HP/4-HB 回路及び DC/4-HB 回路は、新規な炭酸固定経路として近年ドイツの Fuchs らのグループによって立て続けに報告されたものである[11, 12]。いずれも既存の炭酸固定経路の変形回路であり、3-HP/4-HB サイクルは 3-HP 回路の変形で、スクシニル-CoA から 4-ヒドロキシ酪酸を経由してアセチル-CoA を生成し回路を形成している点が 3-HP 回路と異なる[11]。DC/4-HB 回路は還元的 TCA 回路と 3-HP/4-HB 回路が融合したものと考えられる[12]。

3. 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株

近年のメタゲノム研究により、多様な低栄養環境には数多くの微生物が存在することが明らかとなっている[16, 17]。そのような極限栄養状態の環境下においても増殖が可能な細菌群は、一般的に低栄養性細菌と呼ばれる。Kuznetsov ら[18]は低栄養性細菌を「1-15 mg C/L 以下の炭素源でも生育可能な微生物」と炭素源の濃度を基準に定義している。当研究室では「1 mg C/L 以下の炭素源でも生育可能な微生物」とより厳密に定義している。最近、シアノバクテリアを含む独立栄養性細菌が低栄養環境において発見されており、それらの細菌は栄養が制限された条件においても CO_2 を固定できる可能性がある[19, 20]。従って、低栄養環境は CO_2 を固定する微生物、あるいは生育に CO_2 を要求する微生物のスクリーニング源となり得る。

当研究室において備蓄原油中より単離したグラム陽性桿菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株（以下、N9T-4 株）は、炭素源無添加の完全無機塩培地（BM 培地）で良好に生育し、その生育に CO_2 を要求するという超低栄養性を示す（図 3）[21, 22]。しかしながら、既存の独立栄養性細菌に見られるような光、水素、金属などのエネルギー源の「添加」を全く必要としない。ただし、これらの還元的エネルギーを必要としないということではなく、これまでの独立栄養性細菌を培養する時のように培地中あるいは培養環境中に「添加」する必要があるということである。当研究室ではこれまでに N9T-4 株の無細胞抽出液及び膜画分を用い、既知の微生物炭酸固定経路の鍵酵素活性の測定を試みたが、活性は全て検出されなかった[4, 23]。以上のことから、本菌は従来とは異なるユニークな「低エネルギー型炭酸固定系」を有していることが予想された。

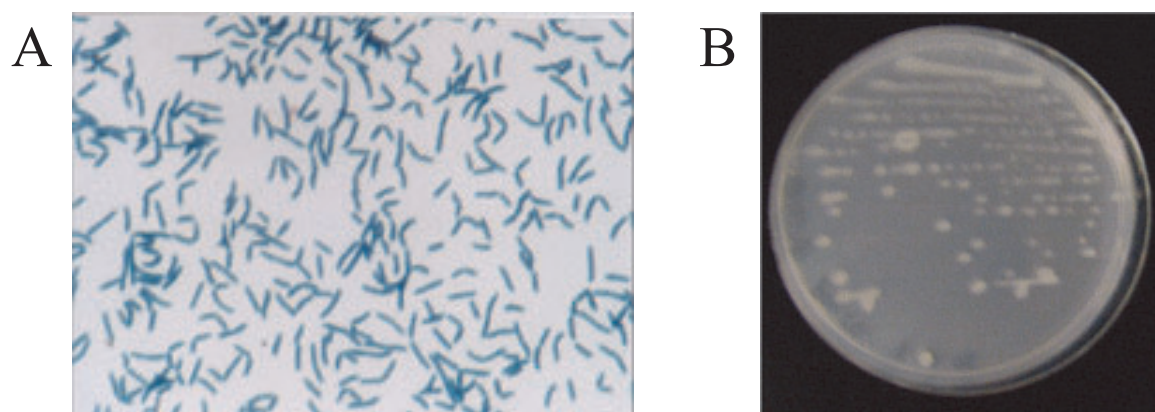


図 3. 超低栄養性細菌 *R. erythropolis* N9T-4 株

A. N9T-4 株のグラム染色像.

B. N9T-4 株の BM プレート培地上における低栄養生育.

N9T-4 株の他にも、N9T-4 株と同様の生育を示すバクテリアが当研究室において単離されている[24]。それらはいずれも *Streptomyces* 属あるいは *Rhodococcus* 属であったことから、炭素源無添加の培地で生育する超低栄養性は放線菌における共通の特徴であることが示唆された。Senechkin ら[25] は 16S rRNA 配列解析により低濃度炭素源培地（10 mg C/L）で生育する土壤微生物の多様性を報告している。全 16 種類の低栄養性細菌が単離され、それらはプロテオバクテリア門（ α -、 β -、 γ -）、スフィンゴバクテリア門、放線菌門（2 種の *Rhodococcus* 属細菌と 1 種の *Mycobacterium* 属細菌）に属していた。

当研究室ではこれまでに、N9T-4 株の炭素代謝を明らかにする目的でプロテオーム解析及びトランスクリプトーム解析を行った。その結果、グラム陽性細菌のメタノール酸化に関与する 2 つの酵素である、*N,N'*-dimethyl-4-nitrosoaniline（NDMA）依存性メタノールデヒドロゲナーゼ（MDH）、NAD 依存性ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（nFADH）が低栄養条件特異的に高発現していた[22, 26]。MDH はメタノールデヒドロゲナーゼ活性に加えて顕著なホルムアルデヒドディスムターゼ活性を有しており、2 分子のホルムアルデヒドをメタノールとギ酸に不均化する反応を触媒する[22, 27]。このように、N9T-4 株は低栄養生育に関与する 2 つのホルムアルデヒド酸化系を有しており、ホルムアルデヒド代謝とリンクする独特な炭酸固定系を持つことが示唆された。しかしながら、現在までに炭酸固定とホルムアルデヒド代謝をつなぐ反応の同定には至っていない。

最近、N9T-4 株は窒素源無添加の培地において、大気由来の窒素源を資化して生育していることが明らかになった[28, 29]。DNA マイクロアレイ解析の結果、富栄養条件（LB 培地）と比較して、窒素源無添加 BM 培地（BM-N 培地）あるいは NaNO_3 を窒素源とした通常の BM 培地では、アンモニアトランスポーター（AmtB）をコードする遺伝子（*amtB*）の発現量が顕著に上昇していた。また、低濃度 NH_4^+ 存在下では親株と比較して *amtB* 欠損株の生育が低下した。以上の結果を踏まえ、当研究室では現在、「本菌は低栄養生育時に AmtB を介してアンモニアなどの微量な窒素源を取り込み資化する」という独特な窒素代謝のモデルを提唱している。

加えて、N9T-4 株は硫黄源についても低栄養性であることが明らかになってきている。BM 培地には硫黄源として MgSO_4 が含まれているが、 MgSO_4 の代わりに MgCl_2 を用いると密閉系では生育が悪くなったことから、本菌は硫黄源についても大気中から得ていることが示唆された[28, 29]。

従って、N9T-4 株は生体を構成する多量元素である炭素源、窒素源、硫黄源の全てを大気から取得できる可能性がある。BM 培地の組成にはエネルギー源になり得る物質が含まれておらず、本菌はエネルギー源も大気中から獲得している可能性が高い。現時点でのエネルギー源の候補として、ガス状の

C1 化合物、アルデヒド類（ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドなど）が考えられる。以上のように、N9T-4 株の「低栄養性」は多岐に渡っており、「CO₂ 要求性」と並んで本菌の特筆すべき性質といえる。

N9T-4 株は極端な低栄養性を示し、独特な炭酸固定系を持っていると示唆されたことから、細胞内にも独特な構造体が存在すると予想された。そこで、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて本菌の細胞内部を観察したところ、低栄養生育させた細胞には比較的大きな球形の構造体の一つの細胞内に一つだけ形成されていた。この構造体は富栄養の LB 培地で生育させた細胞では見られないか、非常に小さいものとなっていた。当研究室ではこの構造体を「オリゴボディー」と名付け、以後本菌の低栄養生育との関連性が調べられてきた[30]。透過型エネルギー分散型 X 線分光法（TEM-EDX）による元素分析の結果、このオリゴボディー内部には細胞質と比べてリンを示す顕著なピークが検出された。その後の生化学的な解析から、オリゴボディーには無機ポリリン酸が蓄積していることが明らかとなっている[31]。本菌の低栄養生育における無機ポリリン酸の生理学的役割は未だ不明であり、今後の課題である。特に、無機ポリリン酸の蓄積が本菌の代謝とどのように関係しているかに興味を持たれる。

4. 本研究の目的

本研究では、まず N9T-4 株の生理学的な諸性質を再検討し、本菌に関する知見を再整理することを目指した。具体的には、これまで厳密に検討されていなかった、本菌の生育におけるガス状炭素化合物の添加効果について明らかにすることを目的とした（第一章）。

線状 DNA 断片を用いたランダム変異導入法により変異株ライブラリーを構築し、低栄養性が失われた変異株を取得した。変異株の変異箇所を特定することで、本菌の低栄養生育に必要な遺伝子の同定を試みた（第二章）。

得られた必須遺伝子の情報をもとに、本菌の炭素代謝について複数の仮説を立て、主に生化学的な検討を行うことにより各仮説の立証を試みた。最後に本研究で得られた成果を統合し、本菌の低栄養性と炭素代謝（炭酸固定経路を含む）に関する考察を行った（第三章）。

第一章 N9T-4 株の CO 資化性と CO 脱水素酵素の関連性

1-1. 緒言

本菌の培養条件に関して、様々な炭素源の検討を試みた結果、有機炭素源を添加しなくても、CO₂ 要求性を伴う低栄養生育を示すことが判明した。しかしながら、これまで本菌の生育におけるガス状炭素化合物の添加効果については厳密な検討がなされていなかった。本菌は CO₂ 以外の大気中の微量な炭素源も資化できる能力を有していると考えられた。そこでまず、本菌のガス状 C1 化合物 (CO₂、CO、CH₄) の資化性及び生育への影響について検討を行った。

1-2. 実験材料及び方法

1-2-1. 試薬

使用した試薬については以下、順次製造元を記載し、特に記述がない場合は和光純薬工業社またはナカライテスク社のものを使用した。

1-2-2. 菌株

R. erythropolis N9T-4 株 (野生型株) は、鹿児島県志布志市の備蓄原油中から分離された[22, 24]。本菌は NBRC 株コレクションから参照番号 110906 で入手可能である。本研究では遺伝子変異株及び欠損株の親株として、N9T-4 株のカナマイシン耐性遺伝子を破壊した N9T-4KS 株を用いた。N9T-4KS 株及び *coxL* 欠損株は当研究グループで作製され、保存されていたものを用いた。標的遺伝子欠損株は、過去の文献に従い相同組換え法により作製した[28]。

1-2-3. 培地

N9T-4 株の低栄養生育に用いる無機塩培地 (BM 培地) の組成[22]は、0.1% NaNO₃、0.1% K₂HPO₄、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄・7H₂O、0.01% CaCl₂・2H₂O、0.1% (v/v) ビタミン溶液とし、pH を 7.0 に調整した。ビタミン溶液は、超純水 (Milli-Q 水) 100 ml に 1 mg チアミン塩酸塩、2 mg リボフラビン、2 mg パントテン酸 Ca 塩、2 mg ピリドキシン塩酸塩、0.1 mg ビオチン、1 mg *p*-アミノ安息香酸、2 mg ニコチン酸、0.1 mg 葉酸を溶解することにより作製した。NaNO₃、K₂HPO₄、KH₂PO₄ は 10 倍濃度になるように混合し、MgSO₄、CaCl₂、ビタミン溶液はそれぞれ 1000 倍濃度の溶液を調製して、別々にオートクレーブしたもの (ビタミン溶液はフィルター滅菌) を、オートクレーブ後の

Milli-Q 水に添加して作製した。BM プレート培地を作製する場合は、精製寒天(ナカライテスク社)を 1.5%になるように添加した。

LB 培地は、1%トリプトン（ベクトン・ディッキンソン社）、0.5%酵母エキス（ベクトン・ディッキンソン社）、1% NaCl とした。LB プレート培地は、2%寒天 SSP（三井製糖社）を添加した。

必要に応じて、10 µg/ml カナマイシンを培地に添加して用いた。

1-2-4. 培養方法

N9T-4 株は、-80℃で保存しているストックから直接 BM プレート培地に画線し、培養して得られたコロニーを実験に使用した。

集菌目的のプレート培養を行う際は、菌体を白金耳で 0.85% KCl に適当に懸濁させ、プレートに塗布した。培養終了後（BM 培地の場合約 5 日、LB 培地の場合約 3 日）プレート培地からの集菌は 0.85% KCl を用い、スプレッダーで菌体をかき集めることにより行った。菌体の回収は遠心分離（5,800 ×g）により行い、その洗浄は 0.85% KCl を用いて行った。得られた OD₆₆₀ = 100 の菌体を 500 µl または 750 µl ずつスクリーキャップ付き 2 ml チューブに分注し、遠心して上清を取り除いたものを菌体ストックとし、-40℃下で保存した。

BM プレートを用いた培養実験を行う際は、まず菌体を LB 培地で一晚培養し、遠心分離（5,800 ×g）により集菌した。0.85% KCl による洗浄の後、それに懸濁させ一度 OD₆₆₀ = 0.1（ 3.4×10^7 cells/ml）に調整してから希釈系列を作製した。それらは適宜各生育試験に用いた。

BM 液体培養を行う際も、まず菌体を LB 培地で一晚培養し、遠心分離（5,800 ×g）により集菌した。0.85% KCl による洗浄の後、それに懸濁させて OD₆₆₀ を測定し、初発の菌体濃度が OD₆₆₀ = 0.02 となるように培地に接種し本培養を行った。

N9T-4 株の培養は培地、培養条件に関係なく全て 30℃で行った。

1-2-5. ガス状 C1 化合物の吹き込みによる培養

1) 標準ガス

各種ガス（CO₂、CO、CH₄）はいずれも純度 99.9%のもの（CO₂、CH₄は太陽日酸社、COは住友精化社）を用いた。

2) 各種ガス吹き込みによる BM プレート培養

OD₆₆₀ = 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} に希釈した菌液を各 100 µl 塗布した BM プレートを用意し、プラスチックパウチ袋（300 mm×440 mm; 三菱ガス化学社）に入れ、専用のシーラーで密封させた。その後、体積 50 ml の各種ガス（CO₂、CO、CH₄; 注入後の濃度約 2.5%）をシリンジで注入し、速やか

にテープで注入孔を閉じた。注入孔の内側でもシーラーによる密封を行った。静置で約 1 週間培養を行い、生育の度合いを観察した。

3) CO 添加による BM 液体培養

菌が接種された BM 液体培地 100 ml が入った 500 ml 三角フラスコを用意し、ガス置換コック付きシリコン栓で密封した。その後、CO ガスあるいは空気（コントロール）50 ml を注入置換し、5 日間 30℃ 水浴でスターラーによる攪拌培養を行った。攪拌速度は 200～300 rpm となるように設定した。

1 日おきに菌液 1 ml を取り出し、その OD₆₆₀ 値を測定した。OD₆₆₀ 測定後、再度ガス置換コック付きシリコン栓で密封し、培養開始時と同様のガス注入置換を行い、攪拌培養を再開した。以上の操作は実験終了まで毎日継続して行った。

4) CO₂ 制限条件下における CO ガス添加効果

まず、OD₆₆₀ = 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} に希釈した菌液を各 3 μ l 同一プレートにスポットした BM プレート（スポット試験用）、OD₆₆₀ = 1.0×10^{-4} に希釈した菌液を各 100 μ l 塗布した BM プレート（スプレッド試験用）を用意した。用意したプレートを約 15 g の CO₂ 吸着剤（Soda Sorb; W. R. グレース社）を入れたシャーレと共にプラスチックパウチ袋（300 mm×440 mm; 三菱ガス化学社）に入れ、専用のシーラーで密封させた（CO₂ 制限条件）。CO₂ 制限条件を作製した後、次の 4 種類（a～d）の条件でそれぞれ培養を行った。

（a）CO₂ 吸着剤を 3 日間共存させた後にパウチ袋からプレートを取り出し、大気下に開放した。その後パウチ袋にプレートに戻してシーラーで密封し、更に 7 日間培養を行った。（b）CO₂ 吸着剤存在下で 3 日間 CO₂ を完全に除去した後に、パウチ袋内で BM プレートと吸着剤を分離してさらに 7 日間培養を行った（代替 CO₂ 制限条件、CO 注入なし）。（c）CO₂ 吸着剤存在下で CO ガス 150 ml（注入後の濃度約 7.5%）を吹き込み、3 日間 CO₂ を完全に除去した後に、パウチ袋内で BM プレートと吸着剤を分離してさらに 7 日間培養を行った（代替 CO₂ 制限条件、CO 注入あり）。（d）CO₂ 吸着剤存在下で CO ガスを吹き込み、10 日間（全日）放置した。

1-2-6. 遺伝子の発現誘導

1) 液体培地での誘導

2×LB 液体培地（NaCl 以外の組成が 2 倍になっている）で 30℃、20 時間培養した菌体を菌体濃度が OD₆₆₀ = 0.02 となるように 200 ml の LB 液体培地に接種し、30℃、12 時間培養した。その後集菌し、0.85% KCl で洗浄した後、OD₆₆₀ = 5.0 となるように BM 液体培地に懸濁した。これらを 16.5 mm×165 mm 試験管を用いて 5 ml ずつ振とうし、酵素遺伝子の誘導を行った。

2) 固体培地での誘導

1-2-5-4 の (a) 及び (c) と同様の方法で静置培養を行った。

1-2-7. リアルタイム PCR

1-2-7-1. 使用したプライマー

使用したプライマーは Primer Express Version 2.0 (Applied Biosystems 社) を用いて設計した。プライマーの合成はファスマック社に依頼した。使用したプラスミドの一覧を表 1 に示す。

表 1. リアルタイム PCR に使用したプライマー

酵素名*	遺伝子名	方向性	塩基配列 (5'-3')
16S rRNA		Fw	AAT CCG TGC CGT AGC TAA CG
		Rv	TTA GCC TTG CGG CCG TAC T
nFADH	<i>aldA</i>	Fw	TGG CAA GAG CCC CAA CAT
		Rv	TGT CCT GGT AGT CGT CGT TTG A
MDH	<i>mnoA</i>	Fw	GAG GCC ACC GGA GTT GAA
		Rv	GGA ATG ATG AAC GCG CAG TA
CODH	<i>coxL</i>	Fw	CAC GAC AAC GGT GCC TAC CT
		Rv	GCG TCG CGG TGT TGA TC

*nFADH: NAD 依存性ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ, MDH: NDMA 依存性メタノールデヒドロゲナーゼ, CODH: CO デヒドロゲナーゼ。

1-2-7-2. cDNA 調製及びリアルタイム PCR の条件

1) 全 RNA の抽出

菌体に ISOGEN (ニッポンジーン社) 1 ml と 0.1 mm 低アルカリガラスビーズ (安井器械社) 0.5 g を加えてミニ・ビードビーター (Model 13110BX、バイオスペック社) にて 20,400 ×g で 5 分間遠心分離を行い、上清を得た。その後は取扱説明書に準じて RNA を抽出した。得られた RNA サンプルに 70 µl の RDD バッファー (キアゲン社)、10 µl の DNase (キアゲン社) を加え、室温で 30 分静置した。その後 100 µl の RNase フリー水を加えてメスアップし、サンプル+DNase+RNase フリー水と等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液 (PCI) を加えてボルテックスし、室温で 20,400 ×g で 15 分間遠心分離した。水層を取り、200 µl のクロロホルムを加えてボルテックスし、室温、20,400 ×g で 5 分間遠心分離した。水層を取り 3M の酢酸ナトリウム水溶液 (pH 5.2) とイソプロパノールを加えて氷上で 15 分間静置し、4℃、20,400 ×g で 15 分間遠心後、沈殿を 70%エタノールで洗浄した。室温で 10 分間乾燥させ RNase フリー水を加えて、60℃で 5 分間保温し、全

RNA 溶液を得た。これらの操作は全てゴム手袋を着用して行い、試薬や器具も全て RNA 抽出専用のものを用いた。

2) cDNA の合成

cDNA の合成は、得られた全 RNA をテンプレートとし、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems 社) を用い、取扱説明書に従って行った。

3) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は cDNA を鋳型とし、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて行った。反応液組成は、20 ng の cDNA、1 × SYBR Green PCR Master Mix 液、プライマー溶液（終濃度 0.1 mM）からなり、最終容量 25 µl とした。反応条件は、50℃で 2 分間、95℃で 10 分間の加熱を行った後、95℃で 15 秒間と 1 分間の加熱を 40 回繰り返した。内在性コントロールとして 16S rRNA 遺伝子を用い、比較 Ct 法により各遺伝子の相対発現量を求めた。

1-2-8. アクセッション番号

本研究で用いた N9T-4 株 *cox* 遺伝子クラスター(*coxMSLG*)の配列情報は、アクセッション番号 AB678441 として DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている。

1-3. 結果

1-3-1. 本菌の生育におけるガス状 C1 化合物の添加効果

新たな炭酸固定経路を推定する前段階として本菌の生理学的な性質を改めて理解する必要がある、これまで検討されていなかった本菌の生育におけるガス状 C1 化合物 (CO₂、CO、CH₄) の影響について検討した。

炭素源無添加の完全無機塩プレート培地 (BM プレート培地) をパウチ袋内に置き、各種ガス (CO₂、CO、CH₄) を注入することにより、それらが生育に及ぼす効果を確かめた。前述のように、本菌は CO₂ 要求性であることから、CO₂ の吹き込みによって生育が良くなるものと期待された。CO 及び CH₄ に着目した理由としては、①これらの物質は大気中に微量であるが存在し (CO : 89 ppb [32] (世界平均、2009 年)、CH₄ : 1,803 ppb [1] (世界平均、2011 年))、本菌が炭素源として資化し得る、②CO は 2 電子、CH₄ は 8 電子分酸化され得ることからこれらをエネルギー源として生育することが可能と考えられる、の 2 点が挙げられた。

その結果、CO₂を添加した場合、大気下（コントロール）と比較して若干生育が良かったが、CO、CH₄の添加効果は見られなかった。COを添加した場合、無添加の条件と同等の生育を示したのに対し、CH₄を添加した場合の生育はそれよりも悪かった。

COについては添加後の培養条件を変えることで添加効果が出るのではないかと考え、CO吹き込みによるBM液体培養を試みた。これまでに、本菌はBM液体培地での大量培養が困難であることがわかっている。しかしながら、わずかながら液体培地においても菌体の増殖が確認できることから[28]、BM液体培養においてCO添加による生育促進効果が出ることを期待して実験を行った。結果として、密閉条件下でCOを添加した場合の生育は、無添加の場合と変わらなかった（図4）。以上のことから、BMプレート培養、BM液体培養、いずれの場合においても、密閉条件下でのCO添加による生育促進効果は見られなかった。

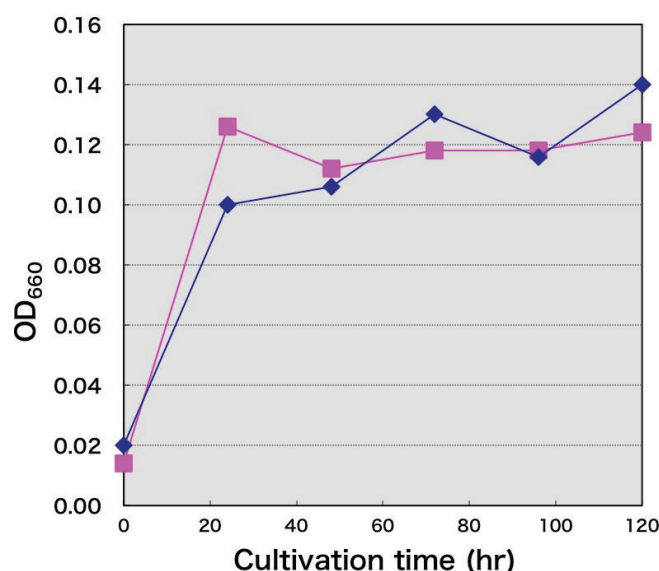


図4. COガス吹き込みによるBM液体培養

ピンク色の■はCOガス添加条件、紺色の◆はガス無添加条件（コントロール）の菌体の増殖変化を示す。縦軸は660 nmでのOD値、横軸は培養時間（時間）。

1-3-2. N9T-4株のCO資化性とCODHの関連性

本菌は生育にCO₂を要求するため、CO₂吸着剤によってCO₂を除去した環境（CO₂制限条件下）では生育を示さない。CO₂制限条件下においてCOを注入する培養を試みたが生育は見られなかった。しかし、この場合COから生成したCO₂が吸着剤によって除去され、結果として生育を示さなかった可能性が考えられた。そこで、CO₂吸着剤を3日間BMプレートと共存させてCO₂を完全に除去した後に、BMプレートと吸着剤を分離して更に7日間培養を行うという新たなCO₂制限条件を構築し（改変CO₂制限条件）、COの添

加効果をみる実験を行った。その結果、予め CO を注入した場合にのみ生育が確認できた（図 5）。スポット試験（図 5A）、スプレッド試験（図 5B）、どちらの試験でも CO の添加効果が確認できた。CO を単一炭素源及びエネルギー源として生育する微生物（CO 資化性菌）では CODH が鍵酵素となっていることが知られている。2008 年に当研究室で明らかにした N9T-4 株のドラフトゲノム配列を改めて解析すると、CODH 各サブユニットをコードする *cox* 遺伝子ホモログを含むオペロンが存在していた（図 6）。つまり、本菌において CODH 依存的に CO が CO₂ に変換される反応系の存在、また CO がエネルギー源となり得る可能性が示された。

そこで、本菌の CODH ラージサブユニットをコードすると思われる *coxL* について、リアルタイム PCR による発現解析を行った。まず、LB 培地で生育させた菌体を BM 液体培地に移し、振とう誘導させることによって遺伝子発現の解析を試みた。過去にこの条件で低栄養条件特異的な遺伝子発現を見られることが確認できている[26]。結果として、30 分後に 2 倍程度の発現の上昇が確認できた（図 7A）。これまでに低栄養特異的に発現する遺伝子として nFADH 遺伝子 *aldA*、MDH 遺伝子 *mnoA* が判明しているが、これらの発現は 30 分で 50-100 倍に上昇する[26]。そのことを考慮すると、*coxL* の発現はそれほど高いものではないと考えられた。次に、改変 CO₂ 制限条件下 CO を添加した場合の *coxL* の発現を解析した。結果として、大気条件下と比較して *coxL* の発現に変化は見られなかった（図 7B）。*aldA*、*mnoA* 両遺伝子の発現は若干の上昇が見られた。

次に、*coxL* 遺伝子欠損株を作製し、CO の影響を検討した。その結果、*coxL* 欠損株は大気下低栄養条件では親株と変わらない生育を示した。改変 CO₂ 制限条件下における CO の要求性についても、親株との有意な差は見られなかった（図 8）。

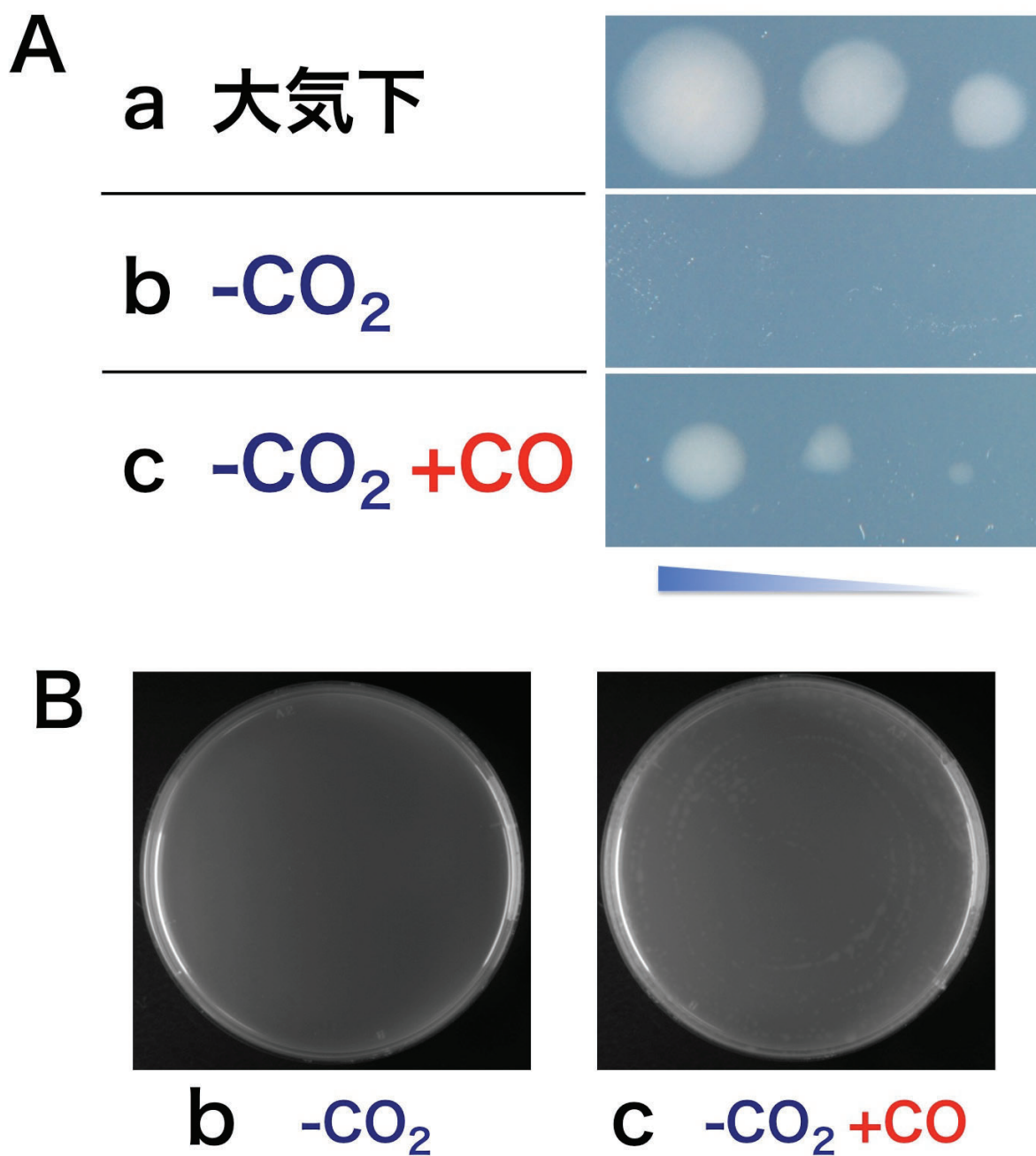


図 5. 本菌の生育における CO の添加効果（改変 CO_2 制限条件下）

（A）スポット試験，（B）スプレッド試験の結果．（a）大気下（ポジティブコントロール），（b）代替 CO_2 制限条件下（CO 吹き込みなし），（c）改変 CO_2 制限条件下（CO 吹き込みあり）．実験方法の詳細は実験材料及び方法の項 1-2-5-4 に記した．

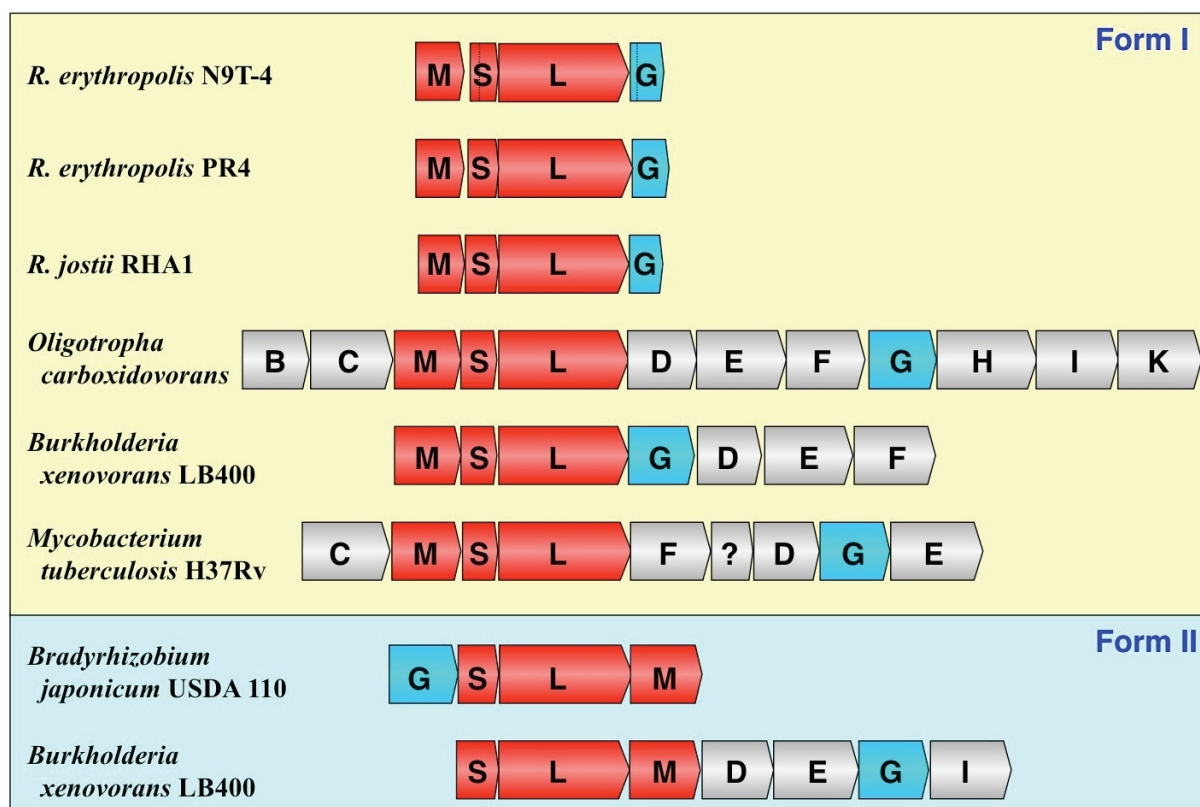


図 6. N9T-4 株ゲノムに存在する CODH 遺伝子 (*cox*) オペロンの構成

CODH の機能的なサブユニット群 (スモールサブユニット *coxS*, ミドルサブユニット *coxM*, ラージサブユニット *coxL*) を赤色のボックスで示した. G サブユニットをコードする *coxG* は水色のボックスで示した. Form I は CO を CO₂ に変換する CO 酸化反応の活性が報告されている機能的な CODH 遺伝子のグループ (代表例: *Oligotropha* 属, *Mycobacterium* 属, *Pseudomonas* 属), Form II は Form I と系統的に近いがクレードが異なる機能未知の推定 CODH 遺伝子のグループ (代表例: *Bradyrhizobium* 属, *Mesorhizobium* 属, *Sinorhizobium* 属) として知られる [33].

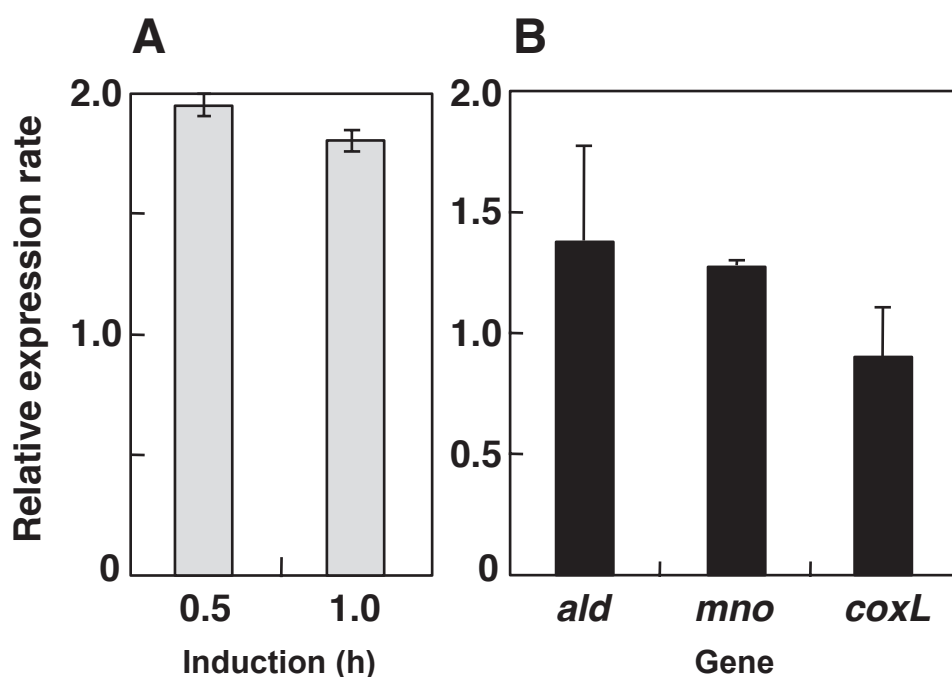


図 7. リアルタイム PCR による *cox* 遺伝子の発現解析

(A) BM 液体培地中での振とうによる発現誘導の結果. 0 時間目の遺伝子発現量を 1 として相対発現量をグラフ化した. 縦軸は相対発現量, 横軸は誘導時間 (時間) を表す. (B) BM プレート培地による発現誘導の結果 (改変 CO₂ 制限条件下). CO 無添加の場合の遺伝子発現量を 1 として CO 添加条件の各遺伝子の相対発現量をグラフ化した. 縦軸は相対発現量, 横軸は遺伝子名を表す. エラーバーは 3 回の独立した試験結果から得られた標準偏差の値を表す. 本解析に使用したプライマー配列は表 1 に示した.

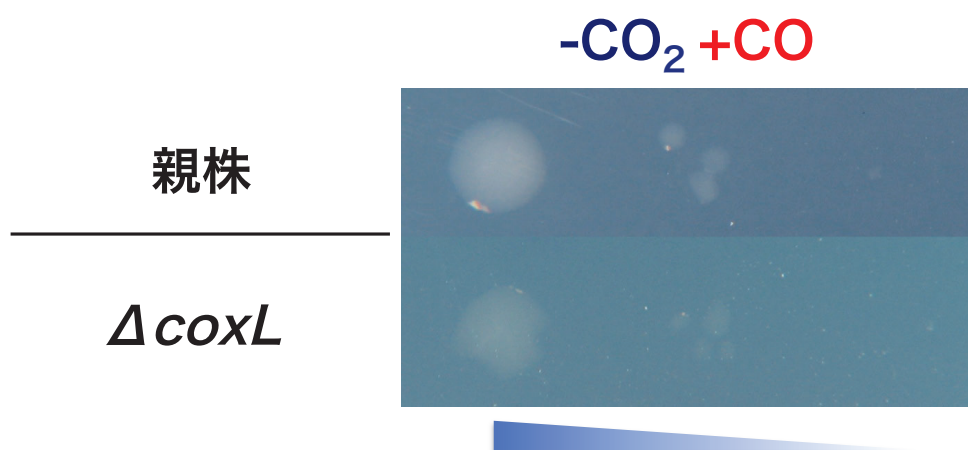


図 8. *coxL* 欠損株のスポット試験 (改変 CO₂ 制限条件下 CO 添加)

実験方法の詳細は実験材料及び方法の項 1-2-5-4 に記した.

1-4. 考察

一連の検討から、本菌は CO を資化できることが分かった。CODH を鍵酵素として持つ CO 資化性菌は、大きく好気性のものと嫌気性のものの 2 つに分類できる。嫌気性 CO 資化性菌には、上述の還元的アセチル-CoA 経路の鍵酵素である二機能性の CODH/ACS を持ち、炭酸固定を伴って生育するものがある。それら CODH の活性中心は Ni-Fe であることが知られている[34]。代表例として、酢酸生成菌 *Moorella thermoacetica* が挙げられる[35]。一方、*Oligotropha carboxidovorans* を始めとした好気性 CO 資化性菌の CODH は単一機能性であり、CO から CO₂ への変換に特化している。また、それらはモリブデン含有水酸化酵素のファミリーに属しており、Mo-Fe-フラビンの活性中心を有している[34]。以上のように、好氣的な CODH と嫌氣的な CODH の間には、その構造や反応メカニズムにおいて大きな違いがある。

本菌のゲノム上には好気性 CO 資化性菌の CODH 各サブユニットと相同性を示す *cox* 遺伝子オペロン (*coxMSLG*) が存在していた (図 6)。*coxL* の下流に位置する *coxG* 遺伝子は G サブユニットをコードしており、CODH の機能的なサブユニット (*coxS*、*coxM*、*coxL*) を細胞質膜に繋ぎ止める役割があると推測される。N9T-4 株と同様の遺伝子構成は *R. erythropolis* PR4 株や *R. jostii* RHA1 株で見られ、それは *O. carboxidovorans*、*Burkholderia xenovorans* LB400 株、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株と同じ好気性 CO 資化性菌が持つ遺伝子クラスター Form I に属していた[33]。*coxMSL* のサブユニットの並びは、Form I に共通した特徴として知られている。

本研究で標的としていた本菌の *coxL* は、低栄養条件においてそれほど高い発現を示さなかった。また、*coxL* 欠損株が改変 CO₂ 制限条件下 CO を添加した場合に親株と変わらない生育を示したことから、*coxL* は本菌の CO 資化には関与していないことが示唆された。本菌の *coxL* のアミノ酸配列を再度確認したところ、Form II (機能未知の推定 *cox* 遺伝子を有するグループ) の *coxL* に保存されている活性部位残基のモチーフ AYRGAGR に極めて類似した配列である PYRGAGR を見つけることができた[36]。しかしながら、Form I (CO 酸化能が確認されている、機能的な *cox* 遺伝子を有するグループ) の *coxL* に保存されている活性部位残基のモチーフ AYRCSFR は見つけることができなかった。これまでに、本菌の *cox* 遺伝子は、他の全ゲノムが解読されている *Rhodococcus* 属の遺伝子アノテーション情報、及び Form I の CODH に保存されている *coxMSL* のサブユニットの並びから推定された。従来の探索方法では候補酵素遺伝子の見落としがあったと考えられたので、今後は機能的な CODH の *coxL* に保存されている活性部位残基のモチーフあるいはそれに類似したアミノ酸配列を N9T-4 株のゲノム上で網羅的に探索し、実際に本菌の CO 代謝に影響を与えていると推定される CODH の遺伝子を絞り込ん

で解析していく必要がある。

最近、本菌の類縁菌である *M. tuberculosis* において興味深い知見が報告された。新規に見出された CO 耐性遺伝子 *cor* は、宿主への感染に必須というものである[37]。*M. tuberculosis* は、感染症を引き起こす微生物（結核菌）として広く知られている。*M. tuberculosis* の宿主となるヒトやマウスのマクロファージでは、ヘムオキシゲナーゼ（HO1）反応由来の CO が発生する。この CO の暴露に耐性を示す上で *cor* 遺伝子が不可欠であるということがわかってきた。BLAST 検索の結果、*M. tuberculosis* の *cor* は、*R. erythropolis* PR4 株、*R. jostii* RHA1 株、*R. equi* ATCC 33707 株に存在する機能未知遺伝子とアミノ酸レベルでそれぞれ 76%、74%、79%の相同性を示した。これらのうち *R. equi* は乾燥した土壌内に生息しており、*M. tuberculosis* と同じく動物に対して感染症を引き起こす微生物として知られている。今後は、本菌の CO 資化性と CO 耐性遺伝子の関連性にも着目していく必要があると考えている。

本研究で新たに確立した培養法（改変 CO₂ 制限条件）は、新しい CO 資化性菌をスクリーニングする上で今後有用なツールとなるのではないかと考えている。新規培養系の有用性を証明する上でも、培養時における CO 及び CO₂ の消費量は今後測定する必要があると考えている。

第二章 N9T-4 株の低栄養生育に必要な遺伝子の同定

2-1. 緒言

第一章で述べたように、培養条件を再検討することで、CO が生育に関与するという N9T-4 株の新たな生理学的特徴を明らかにすることができた。本菌が CO を資化できることは明らかであるが、実験結果（図 5）より CO から CO₂ への変換によって生育しているといえる。つまり CO は CO₂ の上流にあることから、現状は本菌の炭酸固定経路を明らかにすることを優先させるべきと考えられた。加えて、通常の大気に CO を添加しても N9T-4 株の生育促進効果は見られなかった。CO がエネルギー源になっている可能性は否定できないが、上記の理由から CO 代謝に関する詳細な検討については一旦保留し、本菌の新規炭酸固定経路を予想しそれを検証する研究に着手した。

本研究の開始以降、企業との共同研究により、N9T-4 株の低栄養生育に必要な機能的遺伝子の同定を目的として、カナマイシン耐性遺伝子 (Km^r) と転移因子を含む線状 DNA 断片を用いたランダム変異ライブラリーの作製が行われた。ライブラリー構築で実際に用いられた DNA 断片を図 9A に示す。種々のスクリーニングの結果、約 10,000 株のライブラリーから、BM 培地（炭素源無添加の低栄養培地）には生育せず、Luria-Bertani (LB) 培地（富栄養培地）で生育できる変異株（低栄養性欠失株）を計 96 株取得した。図 9B はスクリーニング時に使用した実際のプレート写真を示している。得られた多数の低栄養性欠失株候補から、BM+L-リンゴ酸（以下 BMM）培地あるいは BM+D-グルコース（以下 BMG）培地で生育する変異株、すなわち単一炭素源によって生育が回復する株を選抜した。

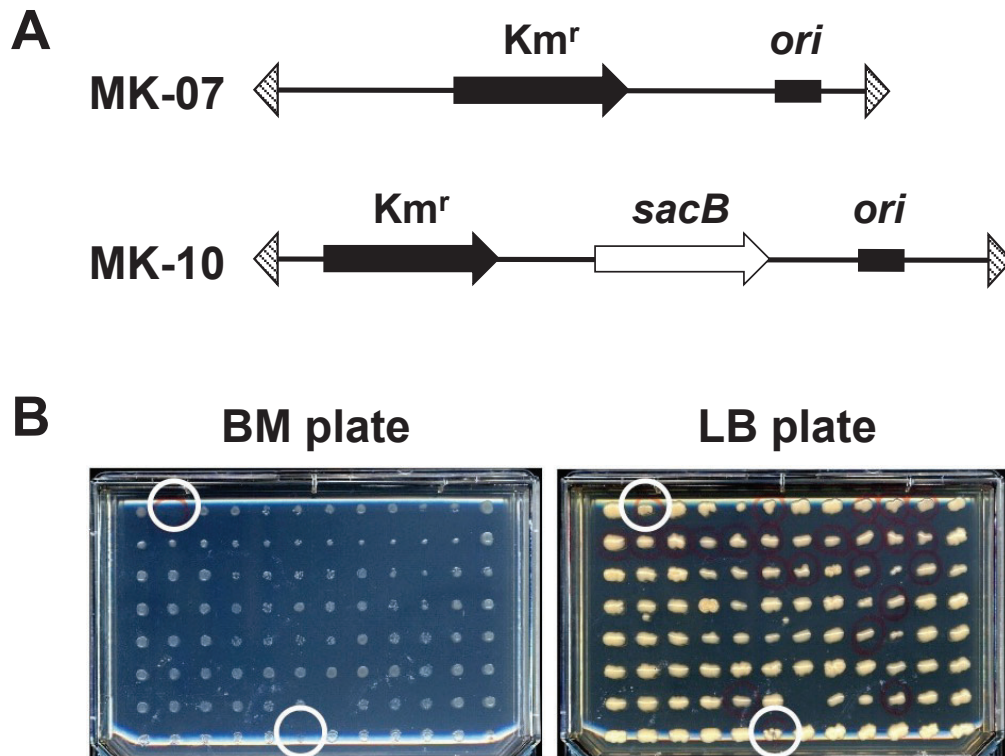


図 9. 線状 DNA 断片を用いたランダム変異ライブラリーの構築とスクリーニング

(A) pK19 ベースのプラスミド配列から構築した 2 つの線状 DNA 断片の模式図．各断片には大腸菌 *Escherichia coli* への形質転換の後に N9T-4 株の挿入変異を選抜するためのカナマイシン耐性遺伝子 (Km^r)，大腸菌 *E. coli* 由来の複製開始点 *ori* が含まれている．斜線の矢印はトランスポゼースの認識部位を示している．MK-10 上の *sacB* 遺伝子は将来的に挿入変異株からプラスミド配列を取り除くための負の選択マーカーとして導入した．(B) ランダム変異ライブラリーによるスクリーニングの一例．線状 DNA 断片により得られたカナマイシン耐性遺伝子挿入変異株について，96 穴マイクロプレートを用いてカナマイシン含有 LB 培地で培養を行った．培養後の変異株について，96 ピンレプリケーターを用いて BM 及び LB プレートの表面にスタンプし，その後の生育を観察した．白い丸で囲ったコロニーは，BM では生育を示さないが LB で生育可能な株である．このような表現型を示す株を低栄養性欠失株候補として選抜した．

2-2. 実験材料及び方法

2-2-1. 試薬

使用した試薬については以下、順次製造元を記載し、特に記述がない場合は和光純薬工業社またはナカライテスク社のものを使用した。

2-2-2. 菌株

R. erythropolis N9T-4 株は遺伝子変異株及び欠損株の親株として **1-2-2** に記載した株 (N9T-4KS 株) を使用した。低栄養欠失変異株の生育試験 (**2-2-7** の項に記載) では、親株として N9T-4KS $\Delta ligD ltsA::Km^r$ (N9T-4KS 株をホストとして *ligD* 遺伝子を完全欠失、さらに *ltsA* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子 Km^r を挿入することで破壊した株) を用いた。標的遺伝子欠損株の生育試験 (**2-2-8** の項に記載) では、親株として N9T-4KS を用いた。N9T-4KS 株の遺伝子をクローニングする際の宿主として、*Escherichia coli* DH5 α 株 [F⁻, $\Phi 80 lacZ \Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, *deoR*, *recA1*, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi*⁻¹, *gyrA96*, *relA1*] を用いた。N9T-4KS 株、N9T-4KS $\Delta ligD ltsA::Km^r$ 、低栄養欠失変異株及び標的遺伝子欠損株は当研究グループで作製され、保存されていたものを用いた。標的遺伝子欠損株は、過去の文献に従い相同組換え法により作製した[28]。

2-2-3. 培地

N9T-4 株の低栄養生育に用いる BM 培地ならびに従属栄養生育に用いる LB 培地の組成は、**1-2-3** に示した。BMM 及び BMG 培地は、10% L-リンゴ酸または 10% D-グルコースを終濃度 1% となるように BM 培地中に添加することにより作製した。10% L-リンゴ酸水溶液の pH は 5M NaOH により 7.0 に調整した。

必要に応じて、10 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを各種培地に添加して用いた。

2-2-4. 培養方法

N9T-4KS $\Delta ligD ltsA::Km^r$ 及びその変異株 (低栄養欠失変異株) は、-80°C で保存しているグリセロールストックから直接 10 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン含有 LB プレート培地に画線し、培養して得られたコロニーを実験に使用した。N9T-4KS 及びその変異株 (標的遺伝子欠損株) は、-80°C で保存しているグリセロールストックから直接 LB プレート培地に画線し、培養して得られたコロニーを実験に使用した。

各種プレートを用いた培養を行う際は、まず菌体を等張な 0.85% KCl に懸濁させ、一度 $OD_{660}=0.1$ (3.4×10^7 cells/ml) に調整してから希釈系列を作製した。それらを適宜各生育試験に用いた。

2-2-5. N9T-4 株の DNA 抽出

1.5 ml エッペンチューブ内に 30 µg の低栄養生育させた菌体ペレットを用意し、それをサンプルとして DNA 抽出を行った。抽出には市販のキット（ISOPLANT、ニッポンジーン社）を用い、その作業はキットに付属したマニュアルに従って行った。

2-2-6. ランダム変異ライブラリーの構築

1) 線状 DNA 断片の調製

ゲノム上にランダムに挿入するための線状 DNA 断片は、クローニング用プラスミドベクター pK19B 及び pK19sacB1 を用いて調製した[38]。DNA 断片 MK-07（図 9A）は表 2 に示すプライマーセットを用い、pK19B をテンプレートとして増幅した。DNA 断片 MK-10（図 9A）は表 2 に示すプライマーセットを用い pK19sacB1 をテンプレートとして増幅した。MK-10 上の *sacB* は *Bacillus subtilis* 由来のレバンスクラゼ[39]をコードしており、挿入変異株からプラスミド由来の配列を取り除くための負の選択マーカーとして使用した。線状 DNA 断片（MK-07 及び MK-10）の配列データは、特許情報として公開されている[38]。

表 2. DNA 断片を得るために使用したプライマー

DNA 断片	塩基配列 (5'-3')
MK-07 及び プライマー1	GGC TGT CTC TTA TAC ACA TCT CAA CCT GCC
MK-10	GCA AGC ACT CAG GGC GC
プライマー2	GGC TGT CTC TTA TAC ACA TCT CAA CCT GTC
	GTG CCA GCT GCA TTA ATG

下線部はトランスポーズの認識配列[40]を示す。

2) N9T-4KS 株エレクトロコンピテントセルの調製

40 µl の定常期に達した N9T-4KS 株培養液を 40 ml の LB が入った 500 ml 容三角フラスコに植菌した。30℃で振とう培養し、対数増殖期後期（OD₆₆₀ = 1.0）に達したところで氷上に移し、20 分間氷冷した。その後 1,800 ×g、4℃で 10 分間遠心し、集めた菌体を氷冷した滅菌 Milli-Q 水 10 ml で 3 回洗浄した。洗浄後の菌体を、滅菌済み 10%(v/v)グリセロール 2 ml に再懸濁した。得られた細胞懸濁液を 0.5 ml ずつ分注し、エレクトロコンピテントセルとして -80℃で保存した。

3) N9T-4 株の形質転換

上記で得られた 1 µl の各 DNA 断片を 40 µl のエレクトロコンピテントセルに穏やかに添加し、エレクトロキュベット（1-mm ギャップ）に移し、Gene

Pulser (バイオラッドラボラトリーズ社) にてエレクトロポレーションを行った (電界強度 1.6 kV/cm、抵抗 200 Ω)。処理後の細胞を直ちに保温しておいた 1 ml の LB 培地で希釈し、30℃で 5 時間振とうによる回復培養を行った。その後、細胞懸濁液を 10 µg/ml カナマイシン含有 LB プレート培地に塗布し、30℃で培養を行った。3 日後に生育が確認できた形質転換体の各コロニーをつつき、96 穴マイクロプレート上 10 µg/ml カナマイシン含有 LB 培地を用い 30℃で培養を行った。

4) 低栄養性欠失株候補の選抜

低栄養性欠失株を選抜するために、培養後の形質転換体について、コロニーピッカーを用いて BM 及び LB プレート (いずれも 10 µg/ml カナマイシンを含む) の表面にスタンプし、30℃で培養を行った。5 日後に生育を示した形質転換体の中から、BM (低栄養条件) では生育を示さないが、LB (富栄養条件) では生育可能な株を選抜し、低栄養性欠失株候補としてグリセロールストックを作製、-80℃で保存した。

5) 低栄養性欠失株の変異箇所の同定

低栄養性欠失株から DNA を抽出し (実験方法は **1-2-5** の項に記載)、*Bam*HI による制限酵素切断を行った。制限酵素処理後、切断済み DNA を抽出し、沈殿させた。得られた DNA 断片を滅菌 Milli-Q 水 20 µl に溶解させた。セルフライゲーション反応は、2 µl の DNA 断片溶液と 2 µl の Ligation Mix (DNA Ligation Kit <Mighty Mix>、タカラバイオ社) を混和した反応液を調製し、16℃で 16-20 時間行った。ライゲーション液を *E. coli* DH5α 株のエレクトロコンピテントセルに導入し、得られた形質転換体から調製したプラスミドのシーケンシングにより線状 DNA 断片が挿入された変異箇所を特定した。

2-2-7. 低栄養性欠失株の生育試験

親株としてカナマイシン含有培地で生育可能な N9T-4KS Δ*ligD ltsA::Km^r* を用いた。10 µg/ml カナマイシン含有のプレート各種 (BM、BMM 及び BMG) を用意し、OD₆₆₀ = 1.0 × 10⁻³、1.0 × 10⁻⁴、1.0 × 10⁻⁵、1.0 × 10⁻⁶ に希釈した菌液を各 3 µl 同一プレート上にスポットした。30℃で 5 日間培養を行い、培養後の生育を観察した。

2-2-8. 標的遺伝子欠損株の生育試験

親株として N9T-4KS を用いた。各種プレート (BM、BMM 及び BMG) を用意し、OD₆₆₀ = 1.0 × 10⁻³、1.0 × 10⁻⁴、1.0 × 10⁻⁵ に希釈した菌液を各 3 µl 同一プレート上にスポットした。30℃で 5 日間培養を行い、培養後の生育を観察した。

2-2-9. アクセッション番号

本研究で用いた N9T-4 株 *aceA*、*aceB*、*pckG* 各遺伝子の配列情報は、アクセッション番号 LC019150、LC019151、LC019152 としてそれぞれ DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている。

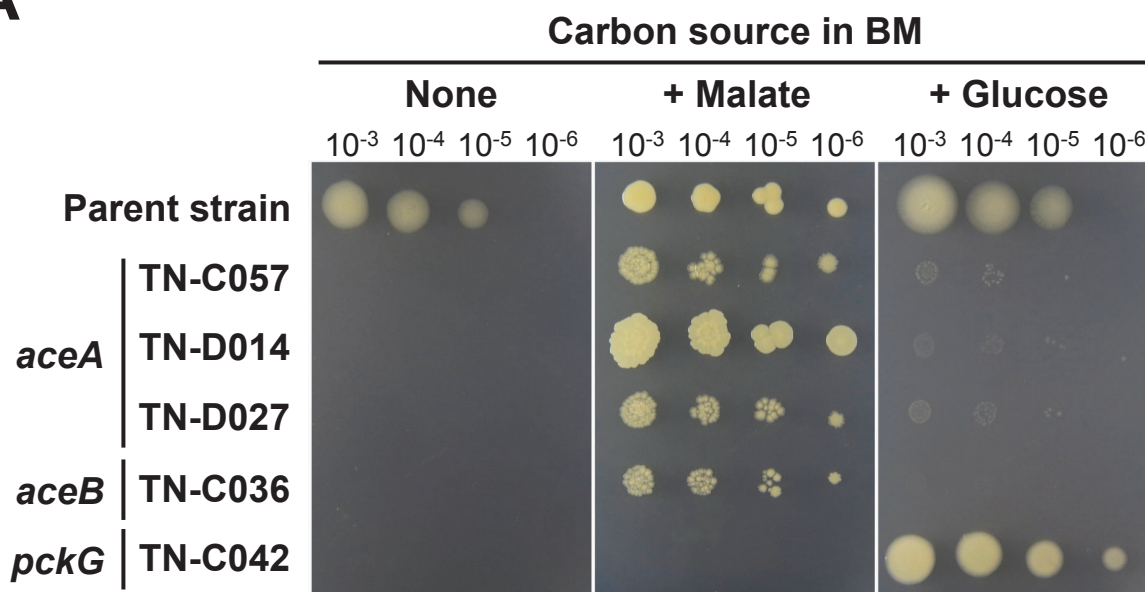
2-3. 結果

取得した低栄養性欠失株候補 96 株について、BM 培地ならびに単一炭素源添加 BM 培地 (BMM 及び BMG) を用いた生育試験を行った。その結果、計 5 株 (TN-C036、TN-C042、TN-C057、TN-D014、TN-D027) において BM 培地では生育せず、BMM 及び BMG 培地では生育が回復するという低栄養性欠失株の表現型が確認できた (図 10A)。変異箇所は線状 DNA 断片が挿入された近接領域の DNA 配列を決定することにより同定した。当初、トランスポゾンによるランダム変異ライブラリーの構築を試みていたが、その構築法を検討している段階でトランスポゼース認識部位及びトランスポゼースを加えなくても、大腸菌の複製起点を含む線状 DNA 断片を N9T-4 株に導入するだけで、ほぼランダムに DNA 断片がゲノムに挿入されることが分かった。興味深いことに、この挿入は数 10 bp から数 10 kbp の遺伝子欠失を伴っていた。ゲノム情報が明らかとなっている、本菌と遺伝子相同性が高い *R. erythropolis* PR4 株に線状 DNA 断片を導入した場合の形質転換効率は 1.5×10^4 colonies/ μ g DNA であり、それはトランスポゼース認識部位を持つ線状 DNA 断片とトランスポゼースを導入した場合と同等であった[38]。また、その *ligD* 欠損株 (非相同組換え能低下株) では、線状 DNA 断片を導入しても欠失変異は全く起こらないことが分かっている。これらの知見は線状 DNA 断片の挿入が非相同末端結合 (non-homologous end joining) によるものであることを示唆している。局所的な欠失を伴う線状 DNA 断片のランダムゲノム挿入は他の *Rhodococcus* 属のランダム変異ライブラリー構築にも有用と考えられる。

図 10B に示すように、TN-C057、TN-D014、TN-D027 においては、イソクエン酸リアーゼ (ICL) をコードする *aceA* 遺伝子を含む領域が欠失していた。これらの変異株の解析から、*aceA* とその下流の 2 つの遺伝子である、推定 3-hydroxybutyryl-CoA デヒドロゲナーゼ遺伝子 *hbd*、推定 cobalamin 非依存性メチオニンシンターゼ遺伝子 *metE* が N9T-4 株の低栄養生育に必須と予想された。そこで、それら 3 つの標的遺伝子欠損株を作製し再度生育試験を行ったところ、*aceA* は TN-C057、TN-D014、TN-D027 と同様の表現型を示した (図 11)。一方で、*hbd* 欠損株及び *metE* 欠損株は親株と変わらない表現型を示した。以上のことから、*aceA* のみが低栄養生育に必須であることが確認された。

TN-C036、TN-C042 においては、リンゴ酸シンターゼ (MS) をコードする *aceB* 遺伝子領域内、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) をコードする *pckG* 遺伝子領域内にそれぞれ欠失変異が起こっていた。*aceA* 及び *aceB* の欠失変異株は BMM プレート上において親株と同等の生育を示したが、BMG プレート上においての生育はわずかであった (図 10A)。BMM プレート上での顕著な生育と BMG プレート上での制限された生育はリンゴ酸を生成するグリオキシル酸 (GO) 経路の必要性によるものと考えられた。*pckG* 欠失変異株は BMG プレート上においてのみ生育の回復が見られた (図 10A)。*pckG* 遺伝子は低栄養条件下で糖を生成するのに重要な役割を担っていると考えられた。以上の結果は、*aceA*、*aceB*、*pckG* の各遺伝子が低栄養培地上での生育に必須であることを示しており、GO 経路及び糖新生経路が N9T-4 株の低栄養性に重要な役割を果たしていることが示唆された (図 12)。

A



B

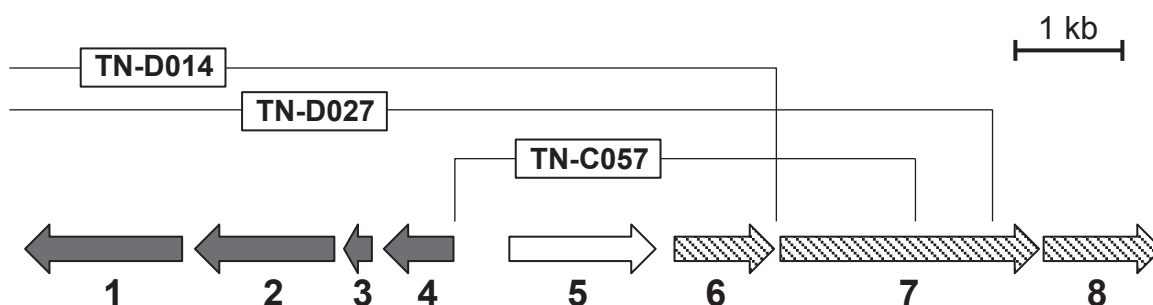


図 10. ランダム変異ライブラリーから得られた低栄養性欠失株の生育

(A)実験に用いた変異株は、LB プレート培地で前培養を行った後 OD₆₆₀ = 1.0 の菌懸濁液をもとに 10⁻³ から 10⁻⁶ の希釈系列を作製し、それらを 3 μl ずつ各 BM プレート培地にスポットした。3つの異なる固体培地（炭素源を含まない通常の BM、1% L-リンゴ酸を添加した BM (BMM)、1% D-グルコースを添加した BM (BMG)) を用意した。全ての培地に 10 μg/ml カナマイシンを添加した。30℃で 5 日間培養を行い、培養後の生育を観察した。TN-C057, TN-D014, TN-D027 は ICL をコードする *aceA* 周辺の遺伝子領域が欠失していた。TN-C036, TN-C042 は、MS をコードする *aceB* 遺伝子領域内、PEPCK をコードする *pckG* 遺伝子領域内にそれぞれ欠失変異が起こっていた。本試験では、親株として N9T-4KS Δ*ligD ltsA::Km^r* を用いた。TN-C 及び TN-D シリーズの変異株は DNA 断片 MK-07 及び MK-10 よりそれぞれ生成された。(B) *aceA* 周辺の遺伝子構成と各変異株の欠失領域。1, 推定 Xre family DNA 結合タンパク質; 2, アセトアミダーゼ; 3, 推定調節タンパク質; 4, 推定タンパク質; 5, ICL; 6, 推定 3-hydroxybutyryl-CoA デヒドロゲナーゼ; 7, 推定 cobalamin 非依存性メチオニンシンターゼ; 8, NADP 依存性アルコールデヒドロゲナーゼ。

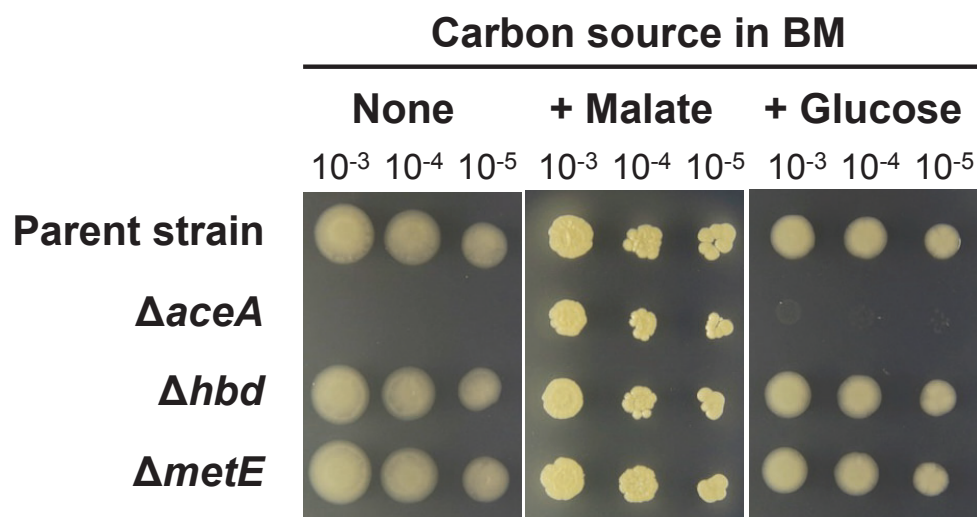


図 11. 標的遺伝子欠損株の生育

実験に用いた変異株は，LB プレート培地で前培養を行った後 $OD_{660} = 1.0$ の菌懸濁液をもとに 10^{-3} から 10^{-5} の希釈系列を作製し，それらを $3 \mu\text{l}$ ずつ各 BM プレート培地にスポットした．3 つの異なる固体培地（炭素源を含まない通常の BM，1% L-リンゴ酸を添加した BM (BMM)，1% D-グルコースを添加した BM (BMG)) を用意した． 30°C で 5 日間培養を行い，培養後の生育を観察した．本試験では，親株として N9T-4KS を用いた．*aceA*，*hbd*，*metE* は ICL，推定 3-hydroxybutyryl-CoA デヒドロゲナーゼ，推定 cobalamin 非依存性メチオニンシンターゼ（図 10B の 5-7）をそれぞれコードしている．

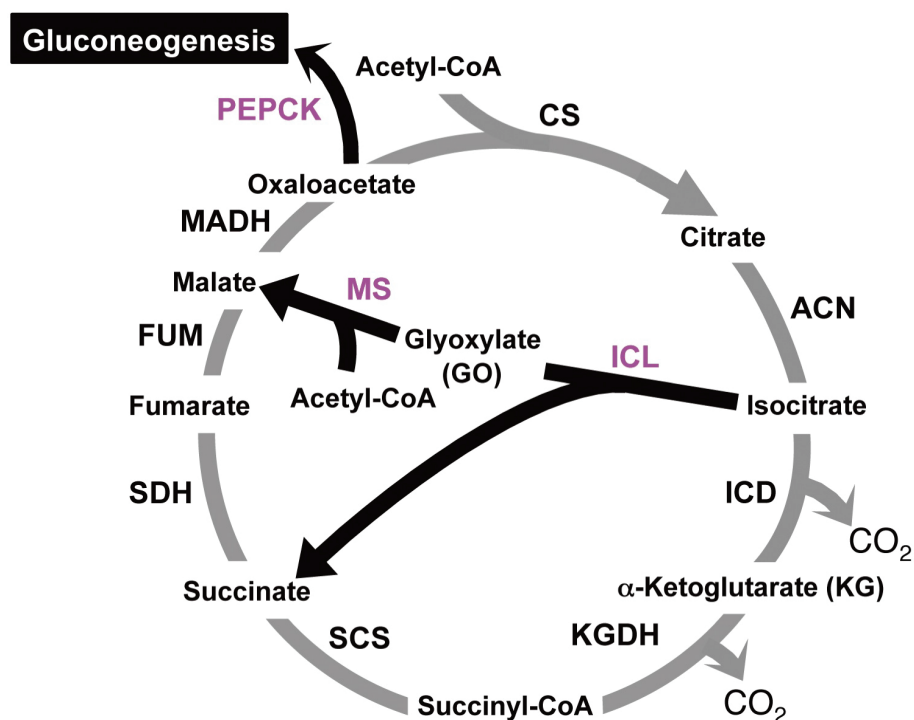


図 12. N9T-4 株の低栄養生育に必須となる酵素反応と TCA 回路

低栄養生育に必須な酵素反応は黒い太矢印で示した。低栄養生育に必須な酵素略称はピンク色で示した。CS, クエン酸シンターゼ; ACN, アコニターゼ; ICD, イソクエン酸デヒドロゲナーゼ; KGDH, α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ; SCS, スクシニル-CoA シンセターゼ; SDH, コハク酸デヒドロゲナーゼ; FUM, フマラーゼ; MADH, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ; ICL, イソクエン酸リアーゼ; MS, リンゴ酸シンターゼ; PEPCK, ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ。

2-4. 考察

ランダム変異ライブラリーは、様々な生物種における不明な代謝経路を解明する上で未だ強力なツールであるといえる。本研究では、N9T-4 株において線状 DNA 断片のユニークなランダムゲノム挿入法を見出した。興味深いことに、本研究で得られた変異株は全て局所的な欠失変異株であった。構築したランダム変異ライブラリーからは、目的の低栄養性欠失株が数株得られ、併せて N9T-4 株の低栄養生育に必須な遺伝子を 3 個同定した (図 10-12)。aceA と aceB を含む遺伝子領域が欠失した変異株は、BM 培地では生育を示さず、L-リンゴ酸あるいは D-グルコースを含む BM 培地では生育を示した。これらの結果は、GO 経路が N9T-4 株の低栄養生育に必要不可欠であることを強く示唆している。Beste ら[41]は、本菌の類縁菌である *Mycobacterium* 属細菌がグリセロール制限条件を伴う連続培養で緩やかな生育を示す際に、ICL が必須になることを報告している。また、 ^{13}C ラベルを用いた代謝フラ

ックス解析により GO 経路、炭酸補充経路 (PEPCK による PEP からの炭酸固定)、スクシニル-CoA の生成を伴うスクシニル-CoA シンセターゼ反応が関与する新規なピルビン酸酸化経路を提唱している。PEPCK による PEP からオキサロ酢酸への可逆的な変換は、異化反応と炭酸補充反応のバランスを微調整することで代謝の柔軟性に寄与しており、栄養が制限されたヒト宿主での生存に重要な役割を果たしている」と推察されている。病原性の結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* がマウスに耐性を示す際にも、ICL の寄与が知られている[42]。結核菌と同様の代謝経路の存在が N9T-4 株の低栄養生育においても考え得るが、N9T-4 株の低栄養培養においては炭素源を添加しない点、解糖系経路から C3 代謝産物が供給されない点が大きく異なる。加えて、結核菌は 2 つの機能的な ICL 遺伝子である *icl1* 及び *icl2* を有しており、いずれも感染宿主での生育に必須である[43]。一方で、N9T-4 株は単一の機能的な ICL 遺伝子である *aceA* のみを有している。N9T-4 株は炭素源及び窒素源を含まない完全無機塩培地で生育する際に CO₂ を要求する。さらに、当研究室において行われた予備的検討で、¹³CO₂ ガス添加条件で N9T-4 株を培養した際に、様々なアミノ酸や脂肪酸に ¹³C が取り込まれることが分かっており、このことは N9T-4 株の細胞内に炭酸固定反応が存在することを示唆している。N9T-4 株における炭酸固定経路は未だ明らかではないが、必須となる GO 経路は TCA 回路上 CO₂ 分子が生成する反応、すなわちイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICD) 反応及び α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (KGDH) 反応を抑えて炭素のロスを防ぐ役割があるのかも知れない。もしそうであれば、このメカニズムは N9T-4 株の低栄養性をより深く理解する上での手掛かりとなり得る。本研究においては、他の低栄養生育に必須な遺伝子として、*pckG* を同定した。*pckG* によってコードされている PEPCK は、ホスホエノールピルビン酸とオキサロ酢酸をつなぐ炭酸固定/解離反応を触媒するが、その主反応は糖新生方向の反応を促進する脱炭酸反応と考えられる。低栄養生育における糖新生の必要性は解糖系上の代謝産物を生成するような炭酸固定は起こらないことを示唆している。前述の知見と合わせて、GO 経路は低栄養生育において必須であり、この事実は GO、アセチル-CoA といった C2 化合物が N9T-4 株の炭素代謝において重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

Fischer ら[44]は、大腸菌がグルコース制限条件を伴う連続培養で緩やかな生育を示す際に、グルコース非制限条件下では見られない ICL、MS、PEPCK 反応を伴う炭素の流れが観察されることを、¹³C ラベルを用いた代謝フラックス解析により報告している。これは、低グルコース濃度条件下における「PEP の CO₂ に至る完全酸化」に関して、PEP と GO 経路の間に回路を形成する代謝 (PEP-GO 回路) が亢進することを示唆している。PEP-GO 回路は、NADPH を過剰生産するグルコース-6-リン酸イソメラーゼ変異株をグルコー

ス過多の培地でバッチ培養した際にも機能していたことから、この新規代謝経路の一つの役割として TCA 回路上 NADPH を生成する ICD 反応以降の代謝を分断することが推察された。低栄養生育させた N9T-4 株において、大腸菌で見出された PEP-GO 回路が機能しているかどうかは現時点では不明であり、今後検討していく必要がある。

第三章 N9T-4 株における炭酸固定経路の生化学的解析

3-1. 緒言

第二章で述べたように、N9T-4 株の低栄養生育には GO 経路と糖新生が必須であることが判明した。この情報を足がかりに本菌の炭素代謝（炭酸固定反応を含む）について複数の仮説を立て、主に生化学的な検討を行うことにより各仮説の立証を試みた。

3-2. 実験材料及び方法

3-2-1. 試薬

使用した試薬については以下、順次製造元を記載し、特に記述がない場合は和光純薬工業社またはナカライテスク社のものを使用した。

3-2-2. 菌株

R. erythropolis N9T-4 株は **1-2-2** に記載した株（野生型株）を使用した。N9T-4 株の遺伝子をクローニングする際の宿主として、*E. coli* DH5 α 株 [F^- , $\Phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, *deoR*, *recA1*, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi*⁻¹, *gyrA96*, *relA1*]を用いた。タンパク質異種発現を行う際は、*E. coli* BL21(DE3)株 [F^- , *ompT*, *hsdS*($r_B^- m_B^-$), *gal*, *dcm*, λ (DE3)]を宿主として用いた。作製した株については、別途記述した。

3-2-3. 培地

N9T-4 株の低栄養生育に用いる BM 培地ならびに従属栄養生育に用いる LB 培地の組成は、**1-2-3** に示した。必要に応じて 50 μ g/ml アンピシリン(Amp)を培地に添加して用いた。

3-2-4. 培養方法

N9T-4 株の培養方法は **1-2-4** に従った。大腸菌の培養方法については、以下適宜記述したが、培地、培養条件に関係なく全て 37°Cで行った。

3-2-5. 無細胞抽出液の調製

スクリーキャップ付き 2 ml チューブ内で 50 mM または 100 mM の各種バッファー（pH は各酵素反応に合わせて適切なものを選択）に懸濁した菌体に対して、約半量の 0.1 mm 低アルカリガラスビーズ（安井器械社）を加

え、ミニ・ビードビーター (Model 3110BX、バイオスペック社) にて 4,200 rpm で 30 秒間菌体破碎した後、即座に 1 分間氷冷した。この操作を 6 回繰り返した後、20,400 ×g、4℃で 10 分間遠心分離を行い、得られた上清を回収した。その後、目的抽出液の回収率を上げるため、スクリュウキャップ付き 2 ml チューブ内に再度バッファーを入れ、ミニ・ビードビーターにて 4,200 rpm で 30 秒間菌体破碎した後、即座に 1 分間氷冷した。20,400 ×g、4℃で 10 分間遠心分離を行い、得られた上清を回収した。以上の操作を計 2 回行った。得られた全てのの上清を一つにまとめたものをポアサイズ 0.45 μm のメンブレんフィルター (DISMIC-25CS、東洋濾紙社) に通し、無細胞抽出液とした。

調製した無細胞抽出液については、必要に応じて限外ろ過フィルター (Amicon Ultra 10K、メルク社) を用いて抽出液のタンパク質画分の濃縮あるいは分画を行った。また、酵素活性を維持するために、必要に応じてセリンプロテアーゼ阻害剤のフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) を終濃度 0.1 mM で添加した。

タンパク質濃度の測定は Bio-Rad Protein Assay (日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ社) にて行い、検量線は牛血清アルブミンを用いて作製した (ブラッドフォード法)。

3-2-6. 酵素活性の測定

全ての反応は 30℃で吸光光度計 (DU-800、ベックマン・コールター社) を用いて行った。各酵素の活性については、一部の酵素 (6、11、13) を除き、Tian ら[45]の報告を参考に改変した方法で測定を行った。

1) クエン酸シンターゼ (CS)

反応液組成は、50 mM リン酸カリウムバッファー (KPi) (pH 7.5)、2 mM EDTA、100 mM NaCl、0.2 mM オキサロ酢酸、0.14 mM アセチル-CoA、100 μM 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) 及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は 0.2 mM オキサロ酢酸及び 0.14 mM アセチル-CoA の添加により行い、経時的な 5-チオ-2-ニトロ安息香酸 (TNB) の生成を 412 nm の吸光度で測定した。1 分間に 1 μmol の TNB を生成する酵素量を 1 Unit として定義した。モル吸光係数 $13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を酵素活性の算出に用いた。

2) アコニターゼ (ACN)

反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、100 mM NaCl、0.1 mM *cis*-アコニット酸、及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は 0.1 mM *cis*-アコニット酸の添加により行い、経時的なアコニット酸の消費を 240 nm の吸光度で測定した。1 分間に 1 μmol のアコニット酸を消費する

酵素量を 1 Unit として定義した。モル吸光係数 $3,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を酵素活性の算出に用いた。

3) イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICD)

<正反応>

反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、10 mM MgCl_2 、2 mM NAD^+ または NADP^+ 、1 mM DL-イソクエン酸及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は DL-イソクエン酸の添加により行い、経時的な NADH または NADPH の生成を 340 nm の吸光度で測定した。1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の NADH または NADPH を生成する酵素量を 1 Unit として定義した。モル吸光係数 $6,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を酵素活性の算出に用いた。

<逆反応>

反応液組成は、50 mM KPi (pH 6.5)、10 mM MgCl_2 、0.4 mM NADH または NADPH、10 mM NaHCO_3 、10 mM α -ケトグルタル酸 (KG) 及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は KG の添加により行い、経時的な NADH または NADPH の消費を 340 nm の吸光度で測定した。

4) α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (KGDH)

反応液組成は、100 mM KPi (pH 6.5)、0.2 mM チアミンピロリン酸 (TPP)、1 mM MgCl_2 、2 mM NAD^+ または NADP^+ 、1 mM CoA、1 mM KG 及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は KG の添加により行い、経時的な NADH または NADPH の生成を 340 nm の吸光度で測定した。

5) スクシニル-CoA シンセターゼ (SCS)

反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、0.1 mM DTNB、0.25 mM ADP、0.15 mM スクシニル-CoA 及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始はスクシニル-CoA の添加により行い、経時的な TNB の生成を 412 nm の吸光度で測定した。

6) コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH)

Olsthorn ら[46]の報告を参考に改変した方法で行った。反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、50 μM 2,6-ジクロロインドフェノール (DCIP)、1 mM フェナジンメソサルフェート (PMS; 初期電子受容体として用いた)、1 mM KCN、20 mM コハク酸及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始はコハク酸の添加により行い、経時的な DCIP の還元を 600 nm の吸光度で測定した。1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の還元型 DCIP を生成する酵素量を 1 Unit として定義した。モル吸光係数 $20,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を酵素活性の算出に用いた。なお、この活性測定に用いる N9T-4 株の無細胞抽出液を調製する際は遠心分

離のスピードを $3,500 \times g$ に下げ、膜画分も回収した。

7) フマラーゼ (FUM)

反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、25 mM L-リンゴ酸及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は L-リンゴ酸の添加により行い、経時的なフマル酸の生成を 250 nm の吸光度で測定した。1 分間に 1 μmol のフマル酸を生成する酵素量を 1 Unit として定義した。モル吸光係数 $1,479 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を酵素活性の算出に用いた。

8) リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MADH)

反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、0.2 mM NADH、0.4 mM オキサロ酢酸及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始はオキサロ酢酸の添加により行い、経時的な NADH の消費を 340 nm の吸光度で測定した。

9) イソクエン酸リアーゼ (ICL)

反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、5 mM MgCl_2 、4 mM フェニルヒドラジン塩酸塩、1 mM イソクエン酸及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は 1 mM イソクエン酸の添加により行い、経時的な GO の生成を 324 nm の吸光度で測定した。1 分間に 1 μmol の GO を生成する酵素量を 1 Unit として定義した。モル吸光係数 $16,800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を酵素活性の算出に用いた。

10) リンゴ酸シンターゼ (MS)

反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、5 mM MgCl_2 、0.1 mM DTNB、30 μM アセチル-CoA、10 mM GO 及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は GO の添加により行い、経時的な TNB の生成を 412 nm の吸光度で測定した。1 分間に 1 μmol の TNB を生成する酵素量を 1 Unit として定義した。

11) α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ (KGD)

Tian ら[47]の報告を参考に改変した方法でフェリシアニドレダクターゼ活性により測定を行った。フェリシアニドを電子受容体とした α -ケト酸の酸化反応は、TPP、 Mg^{2+} 依存的に進行する脱炭酸反応として知られる[48]。

反応液組成は、100 mM KPi (pH 6.5)、0.3 mM TPP、1 mM MgCl_2 、0.8 mM フェリシアニド ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)、1 mM KG 及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は KG の添加により行い、経時的なフェリシアニドの還元 (フェロシアニドの生成) を 430 nm の吸光度の減少で測定

した。1 分間に 1 μmol のフェロシアニドを生成する酵素量を 1 Unit として定義した。モル吸光係数 $1,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を酵素活性の算出に用いた。

12) コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (SSADH)

<正反応>

反応液組成は、50 mM KPi (pH 7.5)、1 mM 2-メルカプトエタノール、2 mM NAD^+ または NADP^+ 、0.5 mM コハク酸セミアルデヒド (SSA ; シグマ・アルドリッチ・ジャパン社) 及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始は SSA の添加により行い、経時的な NADH または NADPH の生成を 340 nm の吸光度で測定した。

<逆反応>

反応液組成は、50 mM KPi (pH 6.5)、0.4 mM NADH または NADPH、1 mM コハク酸及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始はコハク酸の添加により行い、経時的な NADH または NADPH の消費を 340 nm の吸光度で測定した。

13) ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH)

Tian ら[47]の報告を参考に改変した方法で活性測定を行った。反応液組成は、100 mM KPB (pH 7.0)、0.2 mM チアミンピロリン酸 (TPP)、1 mM MgCl_2 、2 mM NAD^+ または NADP^+ 、0.165 mM CoA、1 mM ピルビン酸及び N9T-4 株の無細胞抽出液を加え、全量を 1 ml とした。反応開始はピルビン酸の添加により行い、経時的な NADH または NADPH の生成を 340 nm の吸光度で測定した。

3-2-7. N9T-4 株の粗酵素反応及び休止菌体反応

口径 16.5 mm の小試験管に各種バッファー、基質、補因子及び無細胞抽出液 (または菌懸濁液) を入れブチルゴム栓を付けて、30°C で一定時間振とうして反応させた。反応開始は基質の添加により行った。振とうには水浴付振とう機 (タイテック社) を用い、振とう速度は 150 min^{-1} で一定とした。反応停止は 100°C 10 分間の熱処理あるいは強酸の添加により行った。休止菌体反応に用いる反応液の最終菌濃度は $\text{OD}_{660}=5.0$ に調整した。各実験において粗酵素反応に用いた無細胞抽出液の最終タンパク質濃度は、以下適宜記述した。

3-2-8. リコンビナント KGD (rKGD) の発現と精製

3-2-8-1. 使用したプライマー

使用したプライマーは DNASIS Pro (日立ソリューションズ社) を用いて設計した。プライマーの合成はファスマック社に依頼した。使用したプライマーの一覧を表 3 に示す。

表 3. *sucA* 遺伝子のクローニングに使用したプライマー

プライマー名	方向性	塩基配列 (5'-3')	備考
Kgd_5_SacI_K	Fw	GAT GAG CTC ATG CGA AGA GCA GCA GTT CTA CAT CCC AAT TCG GAC AGA AC	pQE-2ベクター導入のための制限酵素サイト及びリジン残基付加, 開始コドンは除く. PCR増幅用.
Kgd_3_KpnI	Rv	GAT GGT ACC TCA GTT GGT CGG CAG GAA CGC CTC GTC CAA GAT	pQE-2ベクター導入のための制限酵素サイト付加, PCR増幅用.
Fw_primer2	Fw	GTC GTC AAG AAC ATG TCG CTC	配列確認用. KGD遺伝子領域 (421から441番目)
Fw_primer3	Fw	CGG TGC CGG CGC GAT GGA ATA C	配列確認用. KGD遺伝子領域 (921から942番目)
Fw_primer4	Fw	GTA CTG CCG CCA CGT CGG C	配列確認用. KGD遺伝子領域 (1413から1431番目)
Rv_primer2	Rv	GAA CTT GCC CGT CGT GAA GTC	配列確認用. KGD遺伝子領域 (3336から3316番目)
Rv_primer3	Rv	GTA CTC GTT GCC GGT CTT GCG	配列確認用. KGD遺伝子領域 (2847から2827番目)
Rv_primer4	Rv	GTC GTA CAT CGC CGG CTG GGT C	配列確認用. KGD遺伝子領域 (2361から2340番目)

3-2-8-2. *sucA* 遺伝子のクローニング

TAGzyme (キアゲン社) のシステムを用いて N 末端 6×His タグ融合 KGD タンパク質 (*sucA* 遺伝子産物) を得るための遺伝子クローニングを行った。まず、N9T-4 株の *sucA* を得るために PCR による増幅を行った。PCR は KOD plus (東洋紡社) を用いて行い、サーマルサイクラー (GeneAtlas 322、アステック社) を使用した。

N9T-4 株のゲノム DNA を鋳型に、プライマー Kgd_5_SacI_K 及び Kgd_3_KpnI を用いて PCR を行った。PCR 反応は 94℃ で 2 分間熱処理後、98℃ 10 秒→68℃ 5 分 30 秒を 30 サイクル行い、その後 68℃、3 分間熱処理した。

PCR 産物を確認するためのアガロースゲル電気泳動は、ミューピッド-EX (アドバンス社) を用いて行った。TAE を泳動バッファーとし、100 V で約 30 分間電気泳動を行った。アガロースゲルの濃度 (w/v) は 1% で調製した。DNA 分子量マーカーは、Wide-Range DNA ladder (100-5,000 bp) (タカラバイオ社) を用いた。

PCR 産物と pQE-2 プラスミドベクター (キアゲン社) を制限酵素 *SacI* 及び *KpnI* (NEB 社) で消化後、DNA ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ社) を用いてライゲーション反応を行った。反応を行う際のインサートとベクターのモル比は 10:1 とした。得られたプラスミドを形質転換により *E. coli* DH5 α 株に導入した。コロニー PCR 及び採取したプラスミドの制限酵素処理後のバンドパターンにより、目的の組換えプラスミドの構築を確認した。

得られた組換えプラスミド及び先に設計したプライマーを用いて、*sucA* の配列確認を行った。DNA シークエンシング反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ社) によりサーマルサイクラーを使用して行った。反応は 96°C で 1 分間熱処理後、96°C、10 秒→48°C、15 秒→60°C、4 分を 25 サイクル行った。塩基配列の解析には、Model 3100 Sequencer (アプライドバイオシステムズ社) を用いた。

塩基配列の確認を終えた 6×His タグ付き *sucA* 遺伝子が入った pQE-2 プラスミド pKgd-K を形質転換により *E. coli* BL21(DE3)株に導入した。得られた菌株 (*E. coli* BL21(DE3) pKgd-K) を KGD タンパク質の異種発現に用いた。

3-2-8-3. KGD タンパク質の異種発現と精製

E. coli BL21(DE3) pKgd-K を LB/Amp 液体培地 5 ml に植菌し、オーバーナイトで前培養を行った。得られた菌懸濁液 100 µl を 500 ml 三角フラスコ中 LB/Amp 液体培地 50 ml に植菌し 37°C で培養を開始した (本培養)。培養開始後約 3 時間の時点で OD₆₀₀=0.5 になったことを確認し、終濃度 0.5 mM のイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を培地に添加した。その後 18°C、20 時間培養を継続し、*sucA* の発現誘導を行った。培養終了後、遠心分離 (5,800 ×g、4°C) により集菌した。得られた菌体は、1×PBS バッファー (pH 7.4; 200 mg/L KCl、200 mg/L KH₂PO₄、8 g/L NaCl、1,150 mg/L Na₂HPO₄) で 2 回洗浄、遠心した後にペレット状にして以降の操作まで -40°C 下で保存した。

先に得られた菌体を 20 ml のバッファー A (pH 8.0 ; 20 mM リン酸ナトリウムバッファー、300 mM NaCl) に懸濁し、50 ml 容ファルコンチューブに移した後、終濃度 0.1 mM の PMSF を添加した。超音波破砕機 (SONIFIER 450、BRANSON 社) を用いて細胞懸濁液の破砕処理を行った。破砕は全て氷冷下で行い、30 秒の処理を計 10 回行った。各回の破砕の間には約 1 分間のインターバルを置いた。破砕終了後 15 分間、4°C で遠心分離 (5,800 ×g) した後上清を回収し、リコンビナント KGD (rKGD) 溶液とした。

次に、rKGD の精製を 6×His タグカラムを用いて行った。予め用いるレジン (TALON Metal Affinity Resin、ClonTech 社) は 15 ml 容ファルコンチューブ内バッファー A (pH 7.4) で平衡化を行った。その後、レジンへの rKGD タンパク質の結合をバッチ法により 4°C で行った。レジンへのタンパク質結合を終えたサンプルは 4°C 下スイングローター式の遠心機 (SRX-201、トミー精工社) で 15 分間遠心し (2,430 ×g)、上清を取り除いた。残ったレジンをバッファー A に懸濁させ、10 ml 容のカラムに移した。その後、バッファー B (バッファー A に 20 mM イミダゾールを加えたもの) でレジンを 2 回洗浄した。最後に、バッファー C (バッファー A に 250 mM イミダゾールを加えたもの) で結合タンパク質を溶出した。各ステップより分取したサンプル、

及び最後の溶出画分（精製 rKGD 画分）について、ブラッドフォード法によりタンパク質濃度を測定後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によるバンド確認を行った。

SDS-PAGE は、アクリルアミド濃度をランニングゲル 7.5%、スタッキングゲル 4.75%とした 10 cm × 10 cm の SDS ゲルを作製し、行った。電気泳動後のゲルは、クマシー・ブリリアント・ブルー（CBB）により染色した。

得られた精製 rKGD 画分は、限外ろ過フィルター（Amicon Ultra 10K）を用いて濃縮後、活性の低下を防ぐため 50 mM リン酸カリウムバッファー（終濃度 0.1 mM の PMSF を含む）にバッファー置換した。タンパク質濃縮、バッファー置換を終えたものを精製 rKGD とし、-20℃で各種アッセイに使用するまで保管した。精製 rKGD についてもブラッドフォード法によりタンパク質濃度の測定を行った。

3-2-9. ガスクロマトグラフィー（GC）による GO の検出

3-2-9-1. トリメチルシリル（TMS）誘導体化

1) ICL 反応後の GO の検出

酵素反応後のサンプル 200 μ l をスクリュウキャップ付小試験管に入れてから、50 g/l ヒドロキシルアミン塩酸塩 70 μ l、5M NaOH 15 μ l を順に加え、60℃の水浴中で 30 分間インキュベートした。室温に戻した後、6M HCl 20 μ l を加え、内部標準として 0.5 mg/ml トリデカン酸が溶解したアセトニトリル 200 μ l を添加した。その後、脱水目的で NaCl 0.1 g を入れ、十分に混和してから抽出溶媒である酢酸エチル 3 ml を加え、再度混和して 5 分程度静置した。必要に応じて遠心濃縮機（CVE-100D、東京理化社）を用いて遠心によるスピンドウンを行った。有機層（上層）と水層（下層）がはっきり分離したことを確認し、有機層 1.5 ml を新しいスクリュウキャップ付小試験管に移した。次に、有機層の溶液が入ったスクリュウキャップ付小試験管（キャップを外したもの）を遠心濃縮機に入れ、60℃でドライアップするまで遠心濃縮した。ドライアップ後、アセトニトリル 100 μ l に溶解させてから TMS 化剤として BSTFA+10% TMCS（シグマアルドリッチ社）100 μ l を加え、70℃、2 時間インキュベートした。インキュベート終了後のサンプルは、直ちに GC 分析に供した。

2) ICD 逆反応+ICL 反応後の GO の検出

酵素反応後のサンプル 1 ml をスクリュウキャップ付小試験管に入れてから、50 g/l ヒドロキシルアミン塩酸塩 210 μ l、5M NaOH 45 μ l を順に加え、60℃の水浴中で 30 分間インキュベートした。室温に戻した後、6M HCl 60 μ l を加え、内部標準として 0.5 mg/ml トリデカン酸が溶解したアセトニトリル 200 μ l を添加した。その後、脱水目的で NaCl 0.5 g を入れ、十分に混和して

から抽出溶媒である酢酸エチル 3 ml を加え、再度混和して 5 分程度静置した。必要に応じて遠心濃縮機を用いて遠心によるスピンドアウンを行った。有機層と水層がはっきり分離したことを確認し、有機層 2.4 ml を新しいスクリーキャップ付小試験管に移した。再度酢酸エチル 3 ml を加えて同様の抽出操作を行い、計 5.4 ml の有機層の溶液が入ったスクリーキャップ付小試験管（キャップを外したもの）を遠心濃縮機に入れ、60℃でドライアップするまで遠心濃縮した。ドライアップ後、アセトニトリル 100 μ l に溶解させてから TMS 化剤として BSTFA+10% TMCS 100 μ l を加え、70℃、2 時間インキュベートした。インキュベート終了後のサンプルは、直ちに GC 分析に供した。

3-2-9-2. GC 分析

TMS 誘導体化したサンプルは、ガスクロマトグラフィー装置（GC353B、ジーエルサイエンス社）を用いて GC 分析を行った。検出器は FID、カラムは DB-5（アジレント・テクノロジー社、長さ 30 m、内径 0.32 mm、膜厚 0.25 μ m）を使用した。サンプル注入量は 1 μ l とした。キャリアーガスとしてヘリウム、FID 検出のために水素及び空気を用いた。温度の初期設定は、注入口温度 230℃、カラムオーブン温度 70℃、検出器温度 250℃、とした。カラムオーブンの温度プログラム設定は、70℃（初期値）、5 分→昇温 5℃/min（10 分、120℃まで）→昇温 30℃/min（6 分、300℃まで）→300℃、1 分とし、1 分析あたり 22 分を要するプログラムとした。ガス流量は、カラム流量 1 ml/min、スピリット流量 50 ml/min、セプタムパージ流量 5 ml/min に設定した。先に横軸に内部標準との濃度比、縦軸に内部標準とのピーク面積比をとった検量線を作成し、GO の定量に用いた。

3-2-10. 薄層クロマトグラフィー（TLC）による酵素反応の解析

反応液中の KG 及び SSA を検出するため、TLC 分析を行った。酵素反応後のサンプル 500 μ l をスクリーキャップ付小試験管に入れてから、3 M HCl に溶解させた 6.3 mM 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）84 μ l を加え、50℃で 45 分間インキュベートした。室温に戻した後、抽出溶媒である酢酸エチル 1.5 ml を加えて十分に混和し、遠心濃縮機を用いて遠心によるスピンドアウンを行った。有機層と水層がはっきり分離したことを確認し、有機層 1.2 ml を新しいスクリーキャップ付小試験管に移した。有機層の溶液が入ったスクリーキャップ付小試験管（キャップを外したもの）を遠心濃縮機に入れ、30℃でドライアップするまで遠心濃縮した。ドライアップ後、酢酸エチル 20 μ l に溶解させて 10 cm 四方の TLC プレート（TLC Silica gel 60 F₂₅₄、メルク社）上にガラスキャピラリーでスポットし、風乾させてから 3% アンモニア水飽和 1-ブタノールで 2 回展開した。自然乾燥させた後 KG 及び

SSA のスポットを肉眼もしくは UV 光 (254 nm) 下で検出した。

3-2-11. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による酵素反応の解析

1) 反応液中の KG 及び SSA の検出

酵素反応後のサンプル 500 μl をスクリーキャップ付小試験管に入れてから、6 M HCl 20 μl と 3 M HCl に溶解させた 6.3 mM DNPH 42 μl を加え、50°C で 45 分間インキュベートした。室温に戻した後抽出溶媒である酢酸エチル 1.5 ml を加えて十分に混和し、遠心濃縮機を用いて遠心によるスピンドウンを行った。油層と水層がはっきり分離したことを確認し、油層 1.2 ml を新しいスクリーキャップ付小試験管に移した。油層が入ったスクリーキャップ付小試験管 (キャップを外したもの) を遠心濃縮機に入れ、30°C でドライアップするまで遠心濃縮した。ドライアップ後、150 μl の溶液 (20 mM NaH_2PO_4 (pH 2.5; 過塩素酸により pH 調整) とアセトニトリルを 1:1 で混合させたもの、v/v) に完全に溶解させたものをサンプルとして HPLC 分析に供した。

HPLC 分析用のカラムとして、ODS カラム (SP-120-5-ODS-AP、ダイソー社) を用いた。溶離液は、20 mM NaH_2PO_4 (pH 2.5; 過塩素酸により pH 調整) を A 液、アセトニトリルを B 液とした。分析時間は計 45 分とし、溶離液組成の時間変化は、A:B=95:5 (v/v, 0 min、0.5 ml/min) \rightarrow 20:80 (30 min、0.5 ml/min \rightarrow 1.0 ml/min) \rightarrow 20:80 (35 min、1.0 ml/min) \rightarrow 95:5 (40 min、1.0 ml/min \rightarrow 0.5 ml/min) \rightarrow 95:5 (45 min、0.5 ml/min) とした。検出波長は 365 nm、注入量は 20-60 μl とした。分析条件は過去の報告 [49] を参考に最適化した。先に横軸に濃度、縦軸にピーク面積をとった検量線を作成し、KG 及び SSA の定量を行った。

2) 反応液中のピルビン酸の検出

酵素反応後のサンプル 500 μl を直ちに限外ろ過フィルター (Amicon Ultra 10K) にかけて、得られた下画分 400 μl をスクリーキャップ付小試験管に移し、6 M HCl 20 μl と 3 M HCl に溶解させた 6.3 mM DNPH 30 μl を加え、50°C で 45 分間インキュベートした。以降は KG 及び SSA を検出する 1 の方法に従った。ただし、20 mM NaH_2PO_4 (pH 2.5) の代わりに 0.1% トリフルオロ酢酸を用いた。

3-2-12. 酵素法によるグルタミン酸の定量

グルタミン酸は NADP 依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GTD-209、東洋紡社) を用いた酵素法により定量を行った。BM 培地で生育させた N9T-4 株の無細胞抽出液を限外ろ過フィルター (Amicon Ultra 10K) にかけて得た下画分を水で 20 倍希釈したものをサンプル液とした。反応液組成は、100 mM

Tris-HCl (pH 9.0)、0.5 mM NADP⁺、20 Unit NADP 依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、32 μM PMS、120 μM ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)、サンプル液で全量 200 μl とした。先にサンプル液を除いた反応液 120 μl を 96 穴マイクロプレートに分注し、その後サンプル液 80 μl を加えて反応開始した。50℃、20 分間のインキュベーション後、マイクロプレートリーダー (Model 550、日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ社) で 595 nm の吸光度を測定した。作成した検量線をもとに、グルタミン酸の定量を行った。

3-2-13. DNA マイクロアレイ解析

1) DNA マイクロアレイの作製

N9T-4 株のドラフトゲノム情報 (総数 2,540 のコンティグ配列で構成される) をタカラバイオ社ドラゴンジェノミクスセンターに送付し、DNA マイクロアレイの作製を依頼した。アジレント・テクノロジー社 eArray のサービスを利用し、DNA マイクロアレイ用プローブ配列の設計後、得られたプローブ配列に基づき DNA マイクロアレイの作製が行われた。アレイフォーマットは 4×44K を選択した。

2) 遺伝子の発現誘導

LB 培地に N9T-4 株を植菌し、20 時間振とう培養 (前培養) を行った後、新しく用意した 200 ml の LB 培地に OD₆₆₀=0.02 となるように菌体を添加した。30℃で 12 時間培養後、10,000 ×g、4℃で 1 分間遠心分離を行い、集菌した。得られた菌体は各培地を冷却したもので洗浄した後、各培地に再懸濁し、30℃で 30 分間振とう培養することで遺伝子発現を誘導した。培地として BM 培地、LB 培地の 2 種類を用いた。

3) 全 RNA の抽出及びサンプル送付

1.5 ml エッペンチューブ内に遺伝子発現誘導後の菌体ペレットを用意し、それをサンプルとして RNA 抽出を行った。抽出には市販のキット (ISOGENII、ニッポンジーン社) を用いた。得られた約 200 μg の各 RNA サンプルをタカラバイオ社ドラゴンジェノミクスセンターに送付し、N9T-4 株のドラフトゲノム情報に基づき作製したアレイを用いる解析を依頼した (Agilent Expression Array 解析のサービスを利用)。得られたデータから必要な遺伝子発現比のデータを抽出し、表にまとめた。

3-2-14. アクセッション番号

本研究で用いた N9T-4 株 *sucA* 遺伝子の配列情報は、アクセッション番号 LC019149 として DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている。

3-3. 結果

3-3-1. N9T-4 株における TCA 回路関連酵素の活性測定

本菌の低栄養生育には GO 経路が必須であることが示されたことから、N9T-4 株における TCA 回路関連酵素の活性測定を試みた。その結果、BM 培地で生育させた細胞には TCA 回路内のほとんどの酵素活性が検出されたが、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (KGDH) については活性を検出することができなかった (表 4)。GO 経路の各酵素 (イソクエン酸リアーゼ (ICL)、リンゴ酸シンターゼ (MS)) について、顕著な酵素活性が確認できた。また、N9T-4 株の無細胞抽出液中には、顕著な NADP 依存性のイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICD) 活性が検出された。N9T-4 株のゲノム上には ICD 遺伝子

表 4. N9T-4 株における TCA 回路関連酵素の活性

酵素名		比活性 (x 10 ⁻² Unit/mg)	
TCA回路			
クエン酸シンターゼ			4.71
アコニターゼ			51.4
イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICD)	正反応	NAD ⁺	6.46
	(脱炭酸)	NADP ⁺	71.5
	逆反応	NADH	0.56
	(炭酸固定)	NADPH	3.79
α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (KGDH)		NAD ⁺	n.d.
		NADP ⁺	n.d.
スクシニル-CoAシンセターゼ			5.99
コハク酸デヒドロゲナーゼ			0.63
フマラーゼ			40.3
リンゴ酸デヒドロゲナーゼ			77.8
グリオキシル酸経路			
イソクエン酸リアーゼ (ICL)			19.1
リンゴ酸シンターゼ (MS)			0.59
コハク酸セミアルデヒドを介するTCAバイパス経路			
α-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ (KGD)			1.07
	TPP, Mg ²⁺ なし		0.48
コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (SSADH)	正反応	NAD ⁺	0.77
		NADP ⁺	0.63
	逆反応	NADH	n.d.
		NADPH	0.17

単位 Unit = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, n.d.は検出されなかったことを意味する。

のオーソログが 1 つだけ存在し、その推定分子量は約 45,000 であり、これは一般的な原核生物が 40,000 から 57,000 の同一サブユニットを持つ NADP 依存性の ICD のみを有しているという事実と良く一致している[50]。さらに、炭酸水素ナトリウムを CO_2 源として用いる ICD 逆反応（炭酸固定反応）の活性が検出されたことは、ICD 反応が N9T-4 株の CO_2 要求性にも関与していることを示唆している。

3-3-2. KG から GO を生成する反応の解析（ICD 逆反応+ICL 反応）

前述の活性測定の結果を踏まえて、ICL 反応及び ICD 逆反応について更なる解析を行った。解析を行うにあたり、反応生成物の GO を定量するために、ガスクロマトグラフィー（GC）を用いて独自の分析法を確立した。

まず、N9T-4 株の無細胞抽出液を用いて、イソクエン酸から開裂反応によりグリオキシル酸及びコハク酸が生成する ICL 反応の確認を行った。種々の条件を検討した結果、基質としてのイソクエン酸、補因子として Mg^{2+} を用いて反応を行うことにより、反応時間 90 分で 1.48 mM のグリオキシル酸の生成を確認できた（図 13A）。 Mg^{2+} 無添加の条件でも反応は進行したが、その反応性は添加した条件に比べて著しく低下した。

次に、 α -ケトグルタル酸（KG）から GO を生成する反応（ICD 逆反応+ICL 反応）の検出を試みた。N9T-4 株の無細胞抽出液を用いた分光学的方法で ICD の正逆両反応を検出できたため（表 4）、これを参考に反応条件を検討し、基質として終濃度 5 mM の KG、補因子として炭酸水素イオン、NADPH、 Mg^{2+} を加える条件で、リン酸カリウムバッファー（KPi）中で粗酵素反応を行った。その結果、反応時間 180 分で 0.13 mM の GO を検出することができた（図 13B）。加えて、 CO_2 源である炭酸水素イオン無添加の場合、GO の生成量が減少することを確認した。以上の結果から、本菌の無細胞抽出液は KG から炭酸固定反応を経て GO 経路に入り GO に至る反応を触媒できることが明らかとなった（図 14）。

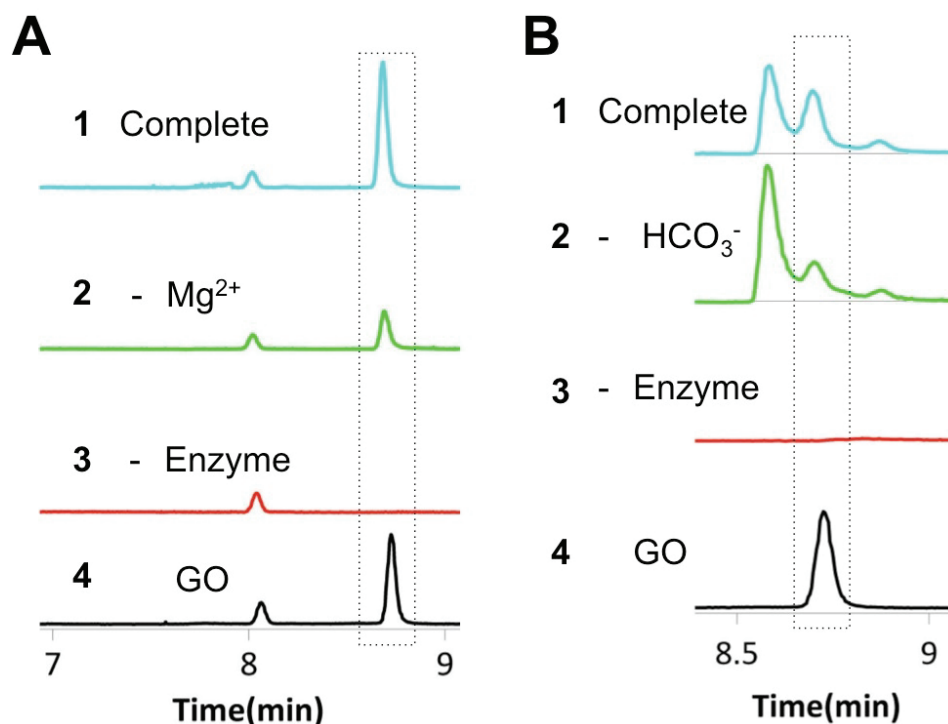


図 13. GC による粗酵素反応生成物 GO の検出

(A) ICL 反応の結果得られたピーク重ね書き図. 完全条件 (1), 補因子 Mg^{2+} 無添加条件 (2), 酵素無添加条件 (3), 標品 GO (4). 1 の GO ピーク定量結果は, 1.48 mM であった. 反応時間は 90 分, 反応組成 (液量 600 μl) は 5 mM イソクエン酸, 5 mM MgCl_2 , 0.3 mg/ml 無細胞抽出液, 50 mM KPi (pH 6.5) とした. (B) ICD 逆反応+ICL 反応の結果得られたピーク重ね書き図. 完全条件 (1), 補因子 HCO_3^- 無添加条件 (2), 酵素無添加条件 (3), 標品 GO (4). 1 の GO ピーク定量結果は, 0.13 mM であった. 反応時間は 180 分, 反応組成 (液量 1,100 μl) は 5 mM KG, 10 mM MgCl_2 , 2 mM NADPH, 10 mM NaHCO_3 , 0.3 mg/ml 無細胞抽出液, 50 mM KPi (pH 6.5) とした. A, B 共に GO のピーク位置 (保持時間 8.7 分) を破線で囲み, 示した.

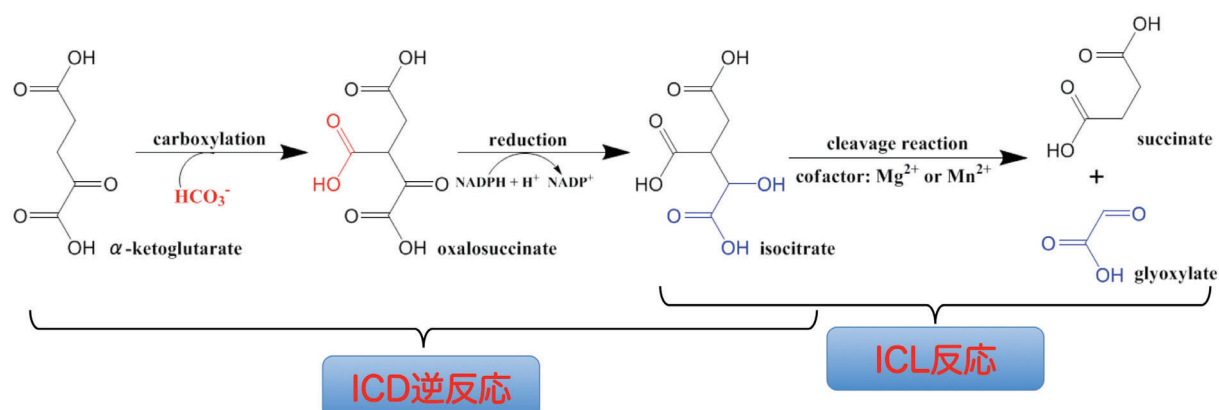


図 14. ICD 逆反応と ICL 反応の化学反応式

KG からのカルボキシル化反応によりオキサロコハク酸に変換の後, NADPH による還元でイソクエン酸となる (ICD 逆反応). イソクエン酸からの開裂反応によりグリオキシル酸及びコハク酸が生成する (ICL 反応).

3-3-3. N9T-4 株における TCA バイパス経路の活性測定

KGDH 活性が見られない場合に、本菌の類縁菌である *M. tuberculosis* (*Mtb*) は、KG からコハク酸セミアルデヒド (SSA) と CO₂ が生成する KGD 活性を示す[45, 47]。一般的に、KGDH 複合体は SucA (E1)、DlaT (E2)、Lpd (E3) の 3 つのコンポーネントで構成される。KGDH 複合体の各コンポーネントをコードする遺伝子が N9T-4 株のゲノム上に確認できた。*E. coli* の SucA に相当する *Mtb* KGD は多機能酵素として知られる[51]。前述の KGD 反応に加えて GO が関与するカルボリガーゼ反応を触媒する。また、KGDH 反応のスクシニル基転移にも関与する。これらの知見をもとに、N9T-4 株の無細胞抽出液を用いた KGD 活性の測定を試みた。その結果、KG によるフェリシアニドの還元を伴う顕著な KGD 活性が検出された (表 4)。*Mtb* の KGD は補因子として TPP、Mg²⁺を必要とする[45, 47]。これらの補因子がない場合、N9T-4 株の KGD 活性は半減した。LB (富栄養培地) で生育させた細胞から調製した無細胞抽出液の KGD 活性は BM で生育させた細胞を用いた場合に比べてわずかに高くなった。このことは KGD 活性が生育培地の栄養条件に非依存であることを示している。加えて、KGD によって生成された SSA をコハク酸に変換する SSADH 活性が N9T-4 株の粗酵素液中に検出された。実際に、SSADH をコードする *gabD* 遺伝子 (*R. erythropolis* PR4 株の RER_05830、RER_44340 に相当)、*gabD2* 遺伝子 (*R. erythropolis* PR4 株の RER_00920 に相当) が N9T-4 株のゲノム上に存在していた。以上の結果は、N9T-4 株が KGD 及び SSADH 反応による SSA を介した KG からコハク酸へのバイパス経路を伴う、*Mtb* と同様の変形 TCA 回路を有していることを示している[45, 47]。

3-3-4. N9T-4 株由来の rKGD の機能

N9T-4 株に存在する SucA のオーソログによる KGD 反応を特徴付けるために、N9T-4 株ゲノム上の推定 *sucA* 遺伝子を PCR で増幅し、大腸菌内で発現させた。シーケンス解析の結果、その *sucA* 遺伝子は全長 3,762 bp (1,253 アミノ酸残基) で、分子量は 137,000 であることが判明した (図 15A)。BLAST 検索によるアミノ酸相同性比較を行ったところ、N9T-4 株の KGD は、*R. erythropolis* PR4 株、*R. jostii* RHA1 株、*M. smegmatis* mc² 155 株、*M. tuberculosis* H37Rv 株のものと高い相同性を示した (それぞれ 99%、86%、75%、74%)。

N9T-4 株の KGD を含む細菌の KGDH E1 コンポーネントの遺伝子構造を図 15C に示す。KGDH E1 ドメインの N 末端部とアノテーションされる N9T-4 株 KGD の N 末端側 42 アミノ酸残基は、推定らせん構造を有する高度に保存されたモチーフを含んでおり、それは *Mtb* KGD、*Corynebacterium glutamicum* OdhA (Cg OdhA)、*E. coli* SucA においても見られた[52, 53]。加えて、N9T-4 株 KGD の N 末端領域は *Mtb* KGD、Cg OdhA に見られるアラニン/プロリンが多く配列に含まれたフレキシブルなリンカードメイン (87 ア

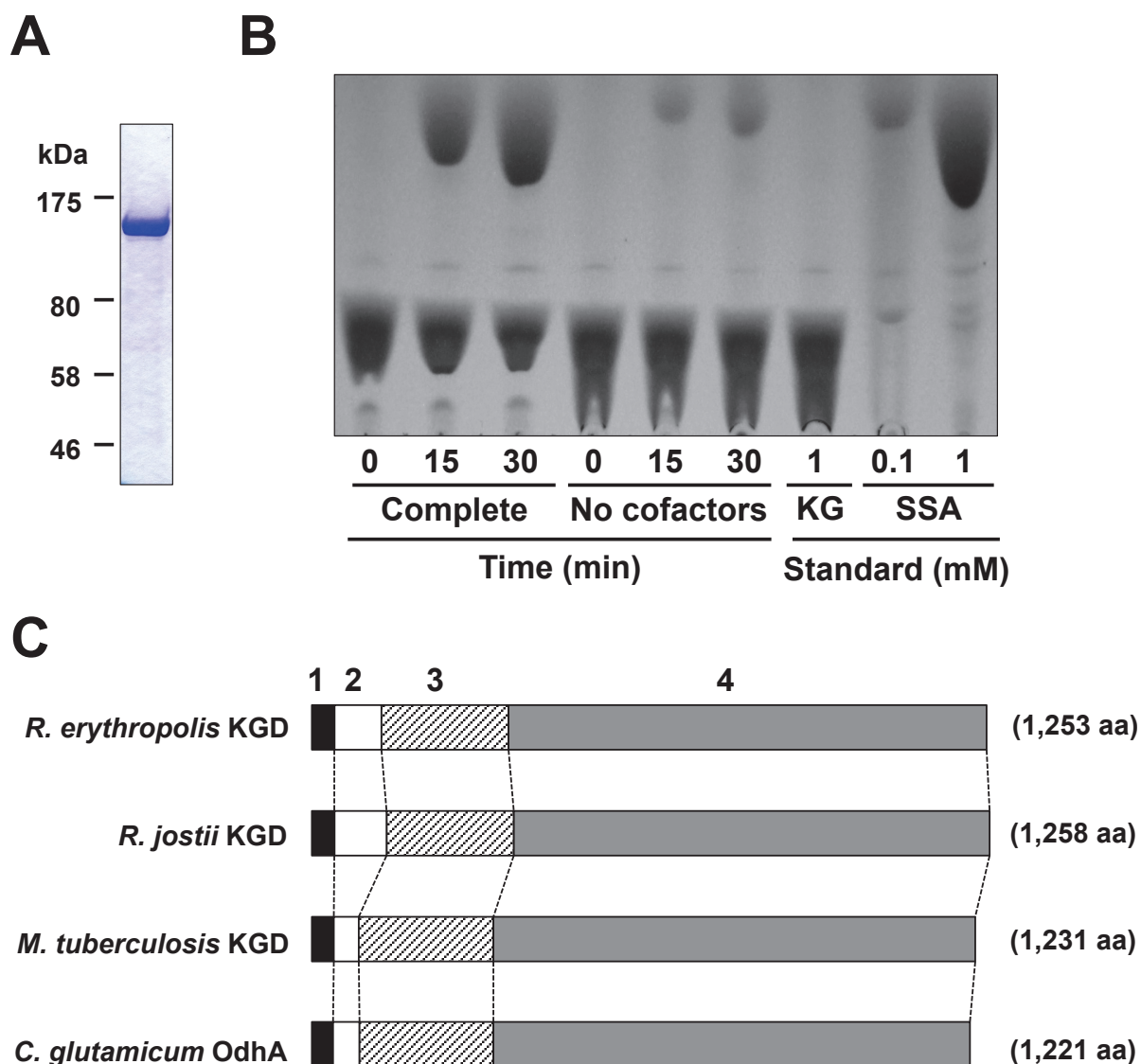


図 15. N9T-4 株由来の rKGD の機能

(A) SDS-PAGE 後の精製 rKGD のバンド図. 2 μ g の rKGD を 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルで展開し, CBB により染色した. 推定分子量は 137 kDa. (B) 精製 rKGD を用いた KGD 反応の TLC 分析. 反応時間は 0, 15, 30 分, 図中“Complete”の反応組成 (液量 500 μ l) は 1 mM KG, 0.3 mM TPP, 1 mM MgCl_2 , 1 μ M 精製 rKGD, 100 mM KPi (pH 6.5) とした. 補因子依存性を調べるために TPP, Mg^{2+} なしの反応も同時に行った (図中“*No cofactors*”). 反応の開始は基質の添加により行い, 静置条件 30°C で反応させた. DNPH による誘導体化の後, TLC 分析を行った. 標品 KG と SSA のスポットの Rf 値はそれぞれ 0.14, 0.54 であった. (C) 4 種のバクテリア (*R. erythropolis* N9T-4, *R. jostii* RHA1, *M. tuberculosis* H37Rv, *C. glutamicum* ATCC 13032) の KGDH E1 コンポーネント一次構造を図示した. 1, KGDH E1 ドメイン (N 末端部); 2, アラニン/プロリンが多く配列に含まれたフレキシブルなリンカードメイン; 3, KGDH E2 触媒ドメイン; 4, KGDH E1 ドメイン (C 末端部).

ミノ酸残基)、E2 酵素のスクシニル基転移酵素を触媒するドメイン (236 アミノ酸残基) で構成されていた[52, 54]。これらの領域は KGDH E1 コンポーネントと E2 コンポーネントの間のタンパク質-タンパク質相互作用に重要と推定されている。以上のように、N9T-4 株の KGD は KGDH 活性に必要と思われる全てのドメインを有しており、そのドメイン構造の並びは *R. jostii* RHA1 株のような他の *Rhodococcus* 属細菌と全く同一であった (図 15C)。しかしながら、一連の一次構造情報は N9T-4 株の無細胞抽出液中に KGDH 活性が検出できないという知見と一致しないため、他にその根本的な理由があると考えられる。

大腸菌内で発現させたリコンビナント KGD タンパク質 (rKGD) は可溶性画分から得られ、顕著な KGD 活性を示した ($5.05 \pm 0.21 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)。補因子がない場合、その活性は著しく減少した (TPP なし: $1.41 \pm 0.22 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; TPP, Mg^{2+} なし: $1.05 \pm 0.07 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)。rKGD 反応における TPP、 Mg^{2+} 依存性は TLC 分析においても確認された (図 15B)。rKGD 反応による KG から SSA への変換は時間依存的に進行し、SSA の生成は補因子がない場合強く制限された。

3-3-5. SSA から KG を生成する反応の解析 (KGD 逆反応)

ICD が同一サブユニットにより炭酸固定反応を触媒できると考えられたことから、KGD も同様に逆反応が成立し、炭酸固定反応を触媒できるのではないかと考えた。そこで、KG が $0.5 \mu\text{M}$ 程度の濃度まで感度良く検出できる HPLC の系を確立し、精製 rKGD を用いて SSA からの KG 生成反応を試みた。しかしながら、いずれの条件でも KG を検出することはできなかった。また、①バッファー濃度を高くして高濃度炭酸水素イオンが存在する条件下で反応させる (あるいは炭酸-炭酸水素バッファー中で反応させる)、②想定された補因子として TPP、 Mg^{2+} の他に ATP、CoA、ピリドキサルリン酸 (PLP) を加える、③その他の微量元素元素を添加する、など種々の検討を行ったが、効果は見られなかった。以上のことから、本研究の範囲では当初予想した KGD の逆反応は進行しないと結論付けた。SSA を基質とした粗酵素反応及び休止菌体反応を行い、TLC による反応生成物 KG の検出を試みた。その結果、酵素反応特異的に予想された生成物として KG が検出された (図 16)。しかしながら、アミノ酸分析の結果、用いていた N9T-4 株の無細胞抽出液にはグルタミン酸が 2.5 mM 程度含まれていたことがわかり、グルタミン酸存在下でのみ SSA から KG を生成する反応が進行した。これは、SSA にグルタミン酸のアミノ基が転移し、結果として γ -アミノ酪酸 (GABA) と KG が生成する反応、いわゆる GABA トランスアミナーゼ (GABA-T) 反応であると考えられる。従って、粗酵素反応及び休止菌体反応に見られた SSA から KG の反応は炭酸固定を伴わない GABA-T 反応によるものと推定された。

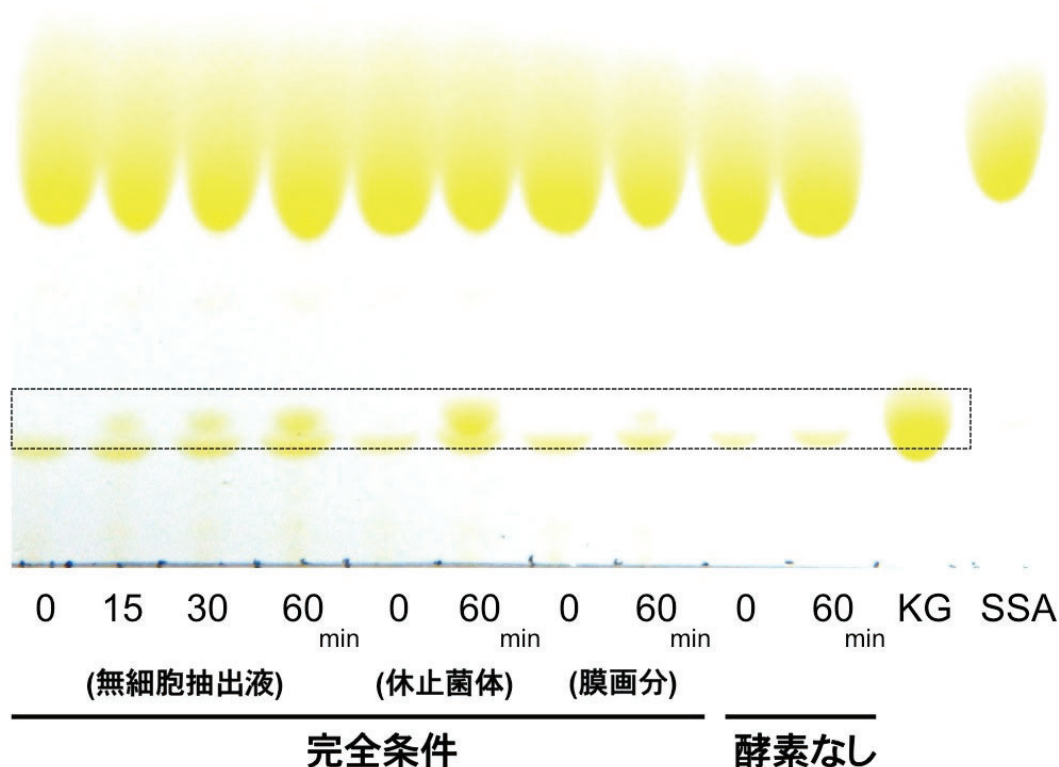


図 16. 無細胞抽出液及び休止菌体を用いた KG 生成反応の TLC 分析

反応組成（液量 500 μ l）は、5 mM SSA, 1 mM TPP, 10 mM MgCl_2 , 10 mM NaHCO_3 , 0.3 mg/ml 無細胞抽出液（あるいは休止菌体、無細胞抽出液を調製する際に分離した膜画分）、50 mM KPi（pH 6.5）とした。この結果から当初 SSA から炭酸固定を伴って KG を生成する反応の存在が予想されたが、後に炭酸固定を伴わない GABA トランスアミナーゼ反応により SSA から KG への変換が起こったものと推定された。

3-3-6. DNA マイクロアレイ解析

TCA 回路に着目して生化学的な解析を行った結果、N9T-4 株は通常の TCA 回路と一部が異なる独特な「変形 TCA 回路」を有していることが明らかになった。特に、TCA 回路の周辺で炭酸固定反応が起きている可能性として、ICD 逆反応の存在が明らかとなった。一方で、KGD 逆反応による炭酸固定の可能性は否定された。ICD 逆反応と KGD 逆反応の両方が成立すれば、コハク酸から変形 TCA 回路上の反応が還元的に進行し、イソクエン酸から GO 経路に入ることでもたコハク酸が生成するという回路を描くことができ、1 サイクルで 2 分子の CO_2 が固定され、1 分子の GO が生成することが期待できた。しかしながら、KGD 逆反応の不成立により、変形 TCA 回路上に新規な炭酸固定経路は存在しない可能性が高まった。そこで、新たな炭酸固定経路を推定する足がかりとして、網羅的な全遺伝子発現解析（DNA マイクロアレイ解析）を行った。LB（富栄養培地）で培養した菌体を用い、BM（炭

素源無添加の低栄養培地)あるいはLBで短時間振とうすることにより、遺伝子の誘導を行った。誘導後に得られた菌体から全RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行うことで、低栄養条件特異的に発現する遺伝子の更なる同定を試みた。N9T-4株の中央炭素代謝に関係する遺伝子群について、遺伝子発現比(BM/LB)の結果を表にまとめた(表 5-1, 5-2)。表中の各遺伝子について相当する *R. erythropolis* PR4 株の ORF をそれぞれ示した。以下、酵素名の略称は表 5-1, 5-2 に示したものをを用いた。

SSA を介するバイパス経路を含む TCA 回路上の酵素遺伝子について、それらのほとんどが 1 倍以下の発現比を示した(表 5-1)。低栄養条件では全体的な代謝レベルが低下するので、これは妥当な結果と考えられる。発現が確認できた 3 つの SSADH 遺伝子のうち、2 つは *Mtb* において活性が確認されている ORF のオーソログで、それは *gabD* (相当する *R. erythropolis* PR4 株の ORF は RER_05830) と *gabD2* (相当する *R. erythropolis* PR4 株の ORF は RER_00920) であった[45]。前者は 0.05 倍と著しく発現比が下がったが、後者は 4.3 倍と発現比が上昇した。その他の 1 つの *gabD* (相当する *R. erythropolis* PR4 株の ORF は RER_44340) は発現比が上昇していた。以上の結果は、富栄養条件と炭素源無添加の低栄養条件で特異的に発現する SSADH 遺伝子が異なることを示唆している。N9T-4 株は 2 つの SDH 複合体を有しており、一方の SDH 遺伝子オペロン (*sdhCAB*) が低栄養条件で 18.3 倍~61.4 倍と大幅に発現上昇していた。この *sdhCAB* の高発現は、後述する低栄養条件下におけるグルタミン酸から GABA を経て SSA が生成する反応経路の亢進と関係している可能性が考えられた。

第二章でランダム変異ライブラリーにより低栄養生育に必須な遺伝子として同定された *aceA*、*aceB*、*pckG* は全て発現比が低下していた(表 5-1)。これは「低栄養生育に必須である」ことが、「低栄養条件特異的に発現量が上昇する」とことと相関しないことを意味している。

炭酸補充経路(アナプレロティック反応)において、PC、PEPCK 両遺伝子は発現比が低下していた。PEPC 遺伝子は発現比が 1.6 倍であり、大きな発現量の変化は見られなかった。一方で ME は発現比が 7.7 倍も上昇していた(表 5-1)。ME はリンゴ酸を NAD⁺あるいは NADP⁺依存的に脱炭酸してピルビン酸を生成する酵素として知られる酸化還元酵素であることから、両方向の反応が可能であり、ピルビン酸からの炭酸固定反応を触媒する可能性もあり得る。以上のことから、炭酸補充経路で ME が低栄養生育における炭酸固定反応に関与している可能性が示唆された。

ホスホエノールピルビン酸(PEP)からアセチル-CoA を連結する経路は、PEP をピルビン酸に変換する PK とピルビン酸をアセチル-CoA に変換する PDH の 2 反応から成る。PDH については複数のアノテーションされた遺伝子が得られたが、KGDH と同様に PDH 複合体を形成するのは *aceE* のみであ

り、これが主に PDH として機能していると考えられる。PDH 複合体は、AceE (E1)、DlaT (E2)、Lpd (E3) の 3 つのコンポーネントで構成される。E2、E3 コンポーネントは KGDH 複合体と共通している。PK 遺伝子、PDH 遺伝子 (*aceE*) の発現比はそれぞれ 0.6 倍、1.8 倍であり、共に大きな発現量の変化は見られなかった (表 5-1)。他の推定 PDH 遺伝子については、発現上昇が見られたものが複数存在するが、実際に PDH として機能するかどうかは不明である。中でも *bkdA* (*pdhA*)、*bkdB* (*pdhB*) は、類縁菌の *Mtb* において PDH のコンポーネントをコードすると推定されていたものの、PDH の一部ではなかったことが報告されている[47]。よって、低栄養条件下で機能的な PDH 遺伝子が高発現していると現時点で結論付けることは難しい。低栄養条件下で生育させた菌体を用いて PDH 複合体の粗酵素活性を測定したところ、 $2.7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (補因子 NAD^+)、 $2.0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (補因子 NADP^+) とかなり低い値であるが検出された。先述のように、PDH 複合体と KGDH 複合体は DlaT (E2) と Lpd (E3) が共通している。PDH の方が KGDH よりも E1 と E2 及び E3 の相互作用が大きく、PDH 複合体形成に必要な DlaT と Lpd が使われた結果、表 4 のように KGDH の粗酵素活性が検出されなかった一方で、PDH の粗酵素活性は検出された可能性が考えられる。その他、糖の取り込み制御に関与する Phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system

(PTS) の初発反応 (PEP のリン酸をタンパク質に付与しピルビン酸が生成する) を触媒する酵素遺伝子 *ptsI* の発現比が低栄養条件下で上昇していた。*ptsI* が低栄養培地で発現上昇する理由は不明であるが、PK は PEP をピルビン酸に変換する不可逆反応であるのに対し、PTS は可逆的に PEP とピルビン酸を相互変換し得るという点で意味があるのかも知れない。

本菌の窒素代謝に着目すると、アンモニアトランスポーター遺伝子 (*amtB*) が顕著に高発現しており、その他 GDH、GD、GLNN といった酵素遺伝子が高発現していた (表 5-1) [28, 29]。GABA-T については、本菌ゲノム上でコードする 2 つの遺伝子のうち 1 つ (相当する *R. erythropolis* PR4 株の ORF は RER_55640) が高発現していた。以上のことから、AmtB により細胞内に取り込まれたアンモニアを利用し、GDH、GLNN によって KG からグルタミン酸を経てグルタミンが生成する反応が低栄養条件下で促進されていると考えられる。また、GD、GABA-T によりグルタミン酸から GABA を経て SSA が生成する反応も低栄養条件下で促進されていると考えられる。

表 5-1. 低栄養条件特異的に発現する遺伝子の同定を目的とした DNA マイクロアレイ解析（変形 TCA 回路ほか）

遺伝子名	遺伝子産物	酵素名略称	相当するPR4株のORF	発現比(倍)
TCA回路(コハク酸セミアルデヒドを介するバイパス経路を含む)				
<i>glcA</i>	citrate synthase	CS	RER_46120	0.1
<i>acn</i>	aconitase	ACN	RER_30680	0.5
<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase	ICD	RER_20050	0.1
<i>sucA</i>	alpha-ketoglutarate decarboxylase (KGDH E1 component)	KGD	RER_41220	0.2
<i>gabD</i>	succinic semialdehyde dehydrogenase	SSADH	RER_05830	0.05
<i>gabD</i>	succinic semialdehyde dehydrogenase	SSADH	RER_44340	3.2
<i>gabD2</i>	succinic semialdehyde dehydrogenase	SSADH	RER_00920	4.3
<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase beta subunit	SCS	RER_44290	0.1
<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	SCS	RER_44280	0.1
<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase cytochrome b subunit	SDH	RER_20450	0.2
<i>sdhD</i>	succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein	SDH	RER_20440	0.2
<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	SDH	RER_20430	0.1
<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	SDH	RER_20420	0.2
<i>sdhC</i>	putative succinate dehydrogenase cytochrome b subunit	SDH	RER_55300	61.4
<i>sdhA</i>	putative succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	SDH	RER_55310	35.3
<i>sdhB</i>	putative succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	SDH	RER_55320	18.3
	fumarase class I	FUM	RER_42110	0.1
<i>fumC</i>	fumarase class II	FUM	RER_42400	1.0
<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	MADH	RER_29370	0.5
グリオキシル酸経路				
<i>aceA</i>	isocitrate lyase	ICL	RER_15740	0.3
<i>aceB</i>	malate synthase	MS	RER_32170	0.1
炭酸補充経路(アナプレロティック反応)				
<i>pyc</i>	pyruvate carboxylase	PC	RER_24250	0.4
<i>ppc</i>	phosphoenolpyruvate carboxylase	PEPC	RER_30340	1.6
<i>pckG</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	PEPCK	RER_10900	0.1
	malic enzyme	ME	RER_41320	7.7
PEPとAcetyl-CoAをつなぐ経路				
<i>pyk</i>	pyruvate kinase	PK	RER_33460	0.6
<i>ptsI</i>	phosphoenolpyruvate:protein phosphotransferase	PTSI	RER_39590	5.3
<i>ptsI</i>	phosphoenolpyruvate:protein phosphotransferase	PTSI	RER_27730	2.5
<i>aceE</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component	PDH	RER_36700	1.8
<i>bkdA (pdhA)</i>	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 alpha subunit	PDH?	RER_59860	32.2
<i>bkdA (pdhA)</i>	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 alpha subunit	PDH?	RER_39920	5.6
<i>bkdB (pdhB)</i>	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit	PDH?	RER_59850	88.6
<i>bkdB (pdhB)</i>	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit	PDH?	RER_39930	3.4
<i>poxB</i>	pyruvate dehydrogenase	PDH?	RER_35280	1.3
	putative pyruvate dehydrogenase E1 component	PDH?	RER_00600	2.1
窒素代謝関連酵素				
<i>amtB</i>	ammonium transporter	AM-T	RER_02870	44.3
<i>gdh</i>	glutamate dehydrogenase	GDH	RER_38310	4.9
	glutamate decarboxylase	GD	RER_35380	33.6
<i>glnN</i>	glutamine synthetase III	GLNN	RER_38440	2.8
<i>gabT</i>	GABA transaminase	GABA-T	RER_55640	3.2
<i>gabT</i>	GABA transaminase	GABA-T	RER_05820	0.04

発現比は、LB 培地を用いた振とうによる遺伝子発現に対して BM 培地を用いた振とうによる遺伝子発現が何倍高かったかを示している。2 倍以上発現比が上昇したものを赤、0.5 倍未満に低下したものを青で示した。

表 5-2. 低栄養条件特異的に発現する遺伝子の同定を目的とした DNA マイクロアレイ解析（低分子アルデヒド類の固定、NADH デヒドロゲナーゼ）

遺伝子名	遺伝子産物	酵素名略称	相当するPR4株のORF	発現比(倍)
低分子アルデヒド類の固定経路				
<i>mnoA</i>	NDMA-dependent methanol dehydrogenase	MDH	RER_17770	364.6
<i>aldA</i>	NAD-dependent formaldehyde dehydrogenase	nFADH	RER_18100	352.1
<i>acs</i>	acetyl-CoA synthetase (acetate-CoA ligase)	ACS	RER_04960	34.1
<i>prpE</i>	propionate-CoA ligase	PCS	RER_45700	6.9
<i>accD6</i>	acetyl-/propionyl-CoA carboxylase beta subunit	ACC/PCC	RER_36750	48.5
<i>accA2</i>	acetyl-/propionyl-CoA carboxylase alpha subunit	ACC/PCC	RER_17550	2.9
<i>pccB</i>	propionyl-CoA carboxylase beta subunit	ACC/PCC	RER_21310	0.3
<i>accD4</i>	propionyl-CoA carboxylase beta subunit	ACC/PCC	RER_02220	0.1
<i>accA1</i>	acetyl-/propionyl-CoA carboxylase alpha subunit	ACC/PCC	RER_18310	0.1
<i>accA3</i>	acetyl-/propionyl-CoA carboxylase alpha subunit	ACC/PCC	RER_21210	0.1
	putative acyl-CoA carboxylase		RER_40770	0.6
NADHデヒドロゲナーゼ				
<i>nuoA</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain A	NUO	RER_27270	69.1
<i>nuoB</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain B	NUO	RER_27260	NF
<i>nuoC</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain C	NUO	RER_27250	17.1
<i>nuoD</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain D	NUO	RER_27240	82.7
<i>nuoE</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain E	NUO	RER_27230	69.6
<i>nuoF</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain F	NUO	RER_27220	61.8
<i>nuoG</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain G	NUO	RER_27210	27.3
<i>nuoH</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain H	NUO	RER_27200	29.7
<i>nuoI</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain I	NUO	RER_27190	3.3
<i>nuoJ</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain J	NUO	RER_27180	37.8
<i>nuoK</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain K	NUO	RER_27170	20.5
<i>nuoL</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain L	NUO	RER_27160	36.3
<i>nuoM</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain M	NUO	RER_27150	5.7
<i>nuoN</i>	NADH:quinone oxidoreductase chain N	NUO	RER_27140	4.6
<i>ndh</i>	probable NADH dehydrogenase	NDH	RER_31110	3.8

発現比は、LB 培地を用いた振とうによる遺伝子発現に対して BM 培地を用いた振とうによる遺伝子発現が何倍高かったかを示している。2 倍以上発現比が上昇したものを赤、0.5 倍未満に低下したものを青で示した。NF は、該当する遺伝子のデータが存在しないことを意味する。

低分子アルデヒド類の固定に関わる酵素遺伝子に着目すると、まず MDH、nFADH の両酵素遺伝子が低栄養条件で極めて高発現（300 倍以上）していることが示された（表 5-2）。これは、過去に当研究室で行われたプロテオーム解析及びトランスクリプトーム解析の結果と良く一致している[22, 26]。

酢酸と CoA を基質としたリガーゼ反応によりアセチル-CoA を生成する ACS、プロピオン酸と CoA を基質としたリガーゼ反応によりプロピオニル-CoA を生成する PCS の遺伝子も、それぞれ 34.1 倍（ACS）、6.9 倍（PCS）と高い発現比を示した（表 5-2）。以上のことから、低栄養生育時に nFADH あるいは MDH によるアセトアルデヒド（プロピオンアルデヒド）から酢酸（プロピオン酸）への変換、ACS または PCS による酢酸（プロピオン酸）からアセチル-CoA（プロピオニル-CoA）への変換が連続的に起きているこ

とが予想された。nFADH は N9T-4 株の野生型株から得られた精製タンパク質を用いた検討により、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒドを十分基質として利用できることが判明している[55]。本菌の MDH がアセトアルデヒド及びプロピオンアルデヒドを基質として利用できるかどうかは不明であるが、他の *Rhodococcus* 属細菌でホルムアルデヒド以外のアルデヒドを不均化する報告があり[56]、本菌の MDH も同様の機能を有している可能性はある。本菌の MDH は正逆両方向で同程度の、非常に高いホルムアルデヒドディスムターゼ活性を持つ。MDH が単にアルデヒドから酸を得る役割を持っているのであれば、アセトアルデヒドを利用してエタノールが蓄積すると考えられる。これまでに当研究室では、低栄養生育させた N9T-4 株の菌体成分を GC 分析によって調べたが、エタノールの蓄積は確認できていない。MDH の主な生理学的役割は、恐らくは不均化反応によりアルデヒドの毒性を一時的に回避するものであると推察できる。

アセチル-CoA をカルボキシル化してマロニル-CoA を生成するアセチル-CoA カルボキシラーゼ (ACC) は脂肪酸合成の初発酵素として重要である。また、プロピオニル-CoA をカルボキシル化して (*S*) -メチルマロニル-CoA を生成するプロピオニル-CoA カルボキシラーゼ (PCC) は奇数鎖脂肪酸が β 酸化されてできるプロピオニル-CoA を TCA 回路上のスクシニル-CoA に変換する反応経路の初発酵素として重要である。これらのことから、アセチル-/プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ (ACC/PCC) はどの生物種においても生育に必須といわれている。7 つの ACC/PCC あるいはアシル-CoA カルボキシラーゼとアノテーションされる遺伝子について、うち 5 つは低栄養条件で発現量が低下していたが、他 2 つの遺伝子は発現量が上昇していた (表 5-2)。accD6 (相当する *R. erythropolis* PR4 株の ORF は RER_36750) は ACC/PCC の β サブユニットとアノテーションされる遺伝子で、48.5 倍発現量が上昇していた。accA2 (相当する *R. erythropolis* PR4 株の ORF は RER_17550) は ACC/PCC の α サブユニットとアノテーションされる遺伝子で、2.9 倍発現量が上昇していた。発現量上昇が見られたこれら 2 つの酵素遺伝子については、今後低栄養条件で実際に機能しているかどうかを検討する必要がある。

NADH デヒドロゲナーゼに着目すると、NADH:キノンオキシドレダクターゼ (NUO) を構成する遺伝子クラスターのサブユニット全て (chain B を除く) が低栄養条件で高発現していた (表 5-2)。推定 NADH デヒドロゲナーゼとアノテーションされる NDH 遺伝子も 3.8 倍発現量が上昇していた。NADH デヒドロゲナーゼは、解糖系や TCA 回路で得られた NADH を酸化し、電子をキノンに受け渡す反応を触媒することから細胞内でのエネルギー獲得に不可欠な酵素である。細菌の NADH デヒドロゲナーゼは I 型 NADH デヒドロゲナーゼ (NDH-I) と II 型 NADH デヒドロゲナーゼ (NDH-II) に分類される。NDH-I は *nuo* 遺伝子クラスターでコードされる複数のサブユニッ

トから構成されており（N9T-4 株の場合 *nuoA-N* の 14 個）、真核生物のミトコンドリアの複合体 I と相同性を示す。プロトンポンプ能を有しており、1 電子の伝達あたり 2 つのプロトンを膜の外にくみ出す。一方、NDH-II は *ndh* 遺伝子でコードされる膜表在性タンパク質として知られ、NDH-I とは異なりプロトンポンプ能を有していない。NDH-I と NDH-II の組み合わせは生物種によって異なる。N9T-4 株は類縁菌 *Mtb* と同様に NDH-I と NDH-II を持っているが、*Mtb* は 2 つの NDH-II に属する酵素遺伝子（*ndh*、*ndhA*）を有しているのに対し、N9T-4 株はそれが 1 つのみ（*ndh*）という点が異なる。NDH-I と NDH-II 両方を持つ生物は酸素濃度により 2 つの酵素を使い分けている場合があり、*Mtb* は宿主感染直後の好氣的な条件では NDH-I を、感染後期のより嫌氣的な条件では NDH-II をそれぞれ使っていることが実験的に示唆されている[57]。N9T-4 株においても酸素濃度による NDH-I と NDH-II の使い分けがあるのかも知れない。低栄養条件特異的に顕著な高発現を示す nFADH は NAD 依存性であり、nFADH によってアルデヒドがカルボン酸に変換される際に、NAD⁺は NADH に変換される。nFADH の働きで生成した NADH から電子伝達系によりエネルギーを獲得するために NUO が高発現していると推察できる。

3-3-7. 炭酸固定を経てピルビン酸を生成する反応の解析

これまでの検討で、TCA 回路上で炭酸固定反応が起きている可能性は低いと判断された。しかしながらまだ TCA 回路の周辺で炭酸固定反応が起きている可能性として、アセチル-CoA あるいはアセトアルデヒドからの炭酸固定を伴うピルビン酸の生成が考えられた。還元的 TCA 回路上の炭酸固定酵素（鍵酵素）の一つである POR は、アセチル-CoA からのピルビン酸生成を触媒する[8, 9]。しかしながら、N9T-4 株のゲノム上には POR とアノテーションされる遺伝子は存在しなかった。アセトアルデヒドからのピルビン酸生成を触媒する炭酸固定酵素は報告がないが、炭酸-炭酸水素バッファー中、ビール酵母由来のピルビン酸デカルボキシラーゼによりアセトアルデヒドから炭酸固定を経てピルビン酸が生成するという反応例が存在する[58]。そこで、ピルビン酸が 0.5 μ M 程度の濃度まで感度良く検出できる HPLC の系を確立し、予備的な検討としてアセチル-CoA あるいはアセトアルデヒドを基質としたピルビン酸を生成する反応の解析を試みた。結果として、アセチル-CoA を基質としたピルビン酸を生成する反応は検出できなかったが、アセトアルデヒドを基質としたピルビン酸を生成する反応については非常に低い活性が検出できた（表 6）。この結果は、N9T-4 株がアセトアルデヒドをピルビン酸に変換する炭酸固定反応を有している可能性を示唆している。

表 6. N9T-4 株におけるアセトアルデヒドから炭酸固定によりピルビン酸が生成する反応の粗酵素活性（予備的検討）

反応条件	比活性 ($\times 10^{-3}$ Unit/mg)
炭酸水素塩あり	0.60
炭酸水素塩なし	0.41
基質なし（ブランク）	n.d.

単位 Unit = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 1 分につき 1 μmol のピルビン酸が生成する酵素活性を 1 Unit と定義した. n.d. は検出されなかったことを意味する. 反応組成（液量 500 μl ）は, 0.5 mM アセトアルデヒド, 0.1 mM TPP, 0.1 mM MgCl_2 , 50 mM NaHCO_3 , 0.2 mg/ml 無細胞抽出液 a 画分, 100 mM KPi (pH 8.0) とした. 低栄養生育させた N9T-4 株菌体由来の無細胞抽出液を分画分子量 10,000 の限外ろ過フィルターでろ過した. ろ過後得られたタンパク質画分を無細胞抽出液 a 画分とし, 粗酵素反応に用いた. 反応時間 0 分と 30 分のサンプルを回収した後, DNPH 誘導体化し, HPLC により反応液中のピルビン酸を定量した. 反応後（反応時間 30 分）の定量値から反応前（反応時間 0 分）の定量値を差し引いたものを 30 分間で生成したピルビン酸量とし, その値を比活性の算出に用いた.

3-4. 考察

3-4-1. N9T-4 株における変形 TCA 回路

これまで得られた知見をもとに、バイパス経路を有する変形 TCA 回路の特徴を図にまとめた (図 17)。BM 培地で生育させた菌体から無細胞抽出液を調製し、粗酵素活性を測定した。その結果、顕著な KGD 及び SSADH の活性が検出された一方で、KGDH 活性は全く検出されなかった (表 4)。このことは、*Mtb* に見られるような変形 TCA 回路が N9T-4 株で機能していることを示唆している。しかしながら、*Mtb* は KGDH 活性の代替となる嫌気性タイプの KGOR も有している。*Mtb* の KGOR は酸素暴露に耐性があることが示されているが、一般的にこの酵素は嫌気性菌に見られるもので、KGOR 遺伝子をコードする *korAB* 遺伝子は低 CO₂ 濃度の環境で生育する上で必須となる [59]。しかしながら、N9T-4 株のゲノム上には *korAB* 遺伝子のオーソログは存在しなかった。

ICD によるカルボキシル化反応は N9T-4 株の低栄養性に関わる炭酸固定反応の候補である。細菌における炭酸固定経路の 1 つである還元的 TCA 回路において、ICD は炭酸固定反応と脱炭酸反応を同レベルで触媒する [60]。N9T-4 株における KGD 反応は単一のタンパク質分子 (KGDH E1 コンポーネントである KGD) のみで触媒されることから、KGD が炭酸固定を伴う SSA から KG を生成する逆反応を触媒できる可能性が考えられた。しかしながら、精製 rKGD を用いた検討では、逆反応の活性を検出することはできなかった。KGD 以外のタンパク質が KGD 逆反応を触媒する可能性も考え、粗酵素反応を用いた検討も試みたが、目的の活性を見出すことはできなかった。

SSA を介する TCA バイパス経路の生理学的役割は未だ不明である。しかしながら、*Rhodococcus* 属細菌においてバイパス経路の存在を示したのは本研究が初めてであり、TCA バイパス経路を含む回路は放線菌に共通の特徴である可能性がある。最近、シアノバクテリアが SSA を介する同様の TCA バイパス経路を有していることが報告された。しかし、KGD と SSADH をコードする遺伝子がオペロンを形成しているという点が、N9T-4 株と異なっている [61, 62]。シアノバクテリアにおいては、バイパス経路はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) によって生成するグルタミン酸を介して GABA 経路に連結している。一つの仮説として、その TCA 経路は低酸素条件に関係しており、酸化的な反応を介して KG 及びグルタミン酸に向かう経路と還元的な反応を介してコハク酸に向かう経路に分かれている、という可能性が考えられる [62]。

N9T-4 株において、スクシニル-CoA を介さない TCA バイパス経路の生理機能としては、CoA の供給を促進していることが考えられ、それによって細胞内のアセチル-CoA レベルを十分量維持できる可能性がある。N9T-4 株に

における TCA バイパス経路の生理学的役割を明確にするために、現在 *sucA* 欠損株の構築を進めており、早期の目的株の取得と表現型解析が今後の課題である。

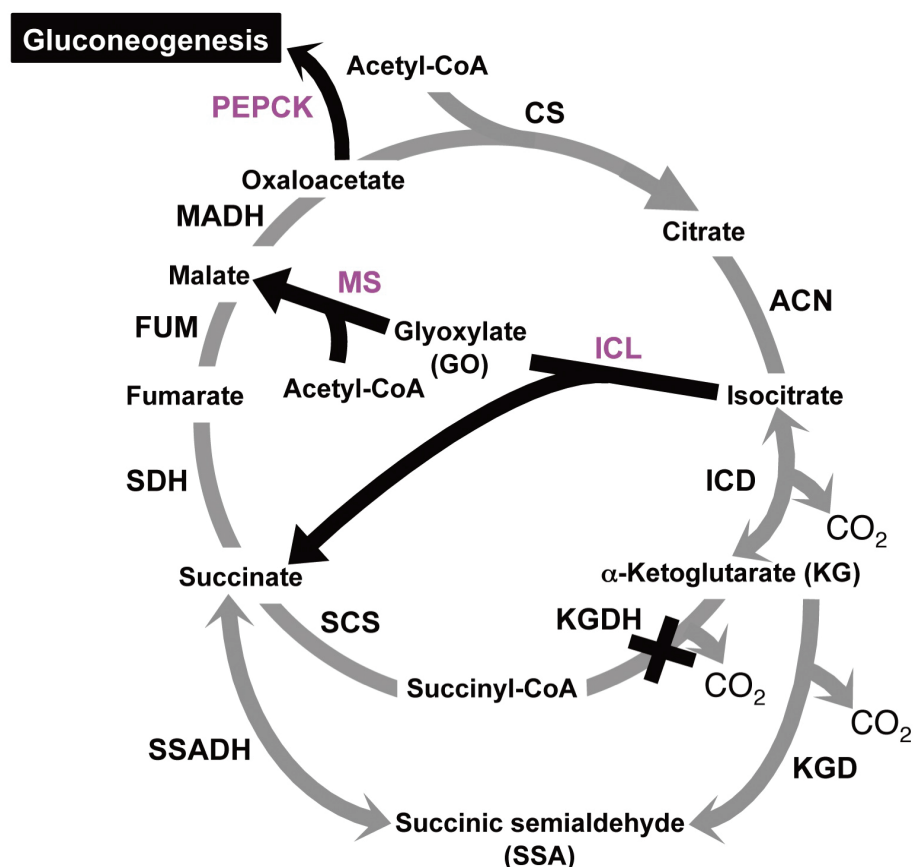


図 17. N9T-4 株が有する変形 TCA 回路

低栄養生育に必須な酵素反応は黒い太矢印で示した．低栄養生育に必須な酵素略称はピンク色で示した．BM 培地で生育させた菌体から調製した無細胞抽出液には KGDH 活性が検出されなかった．N9T-4 株が有する TCA 回路において SSA を介して KG とコハク酸を連結するバイパス経路の存在が予想された．バイパス経路で使用されない CoA は GO 経路で必要となるアセチル-CoA の合成に寄与している可能性がある．CS, クエン酸シンターゼ；ACN, アコニターゼ；ICD, イソクエン酸デヒドロゲナーゼ；KGDH, α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ；SCS, スクシニル-CoA シンセターゼ；SDH, コハク酸デヒドロゲナーゼ；FUM, フマラーゼ；MADH, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ；ICL, イソクエン酸リアーゼ；MS, リンゴ酸シンターゼ；PEPCK, ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ；KGD, α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；SSADH, コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ．

3-4-2. 新たな炭酸固定経路の推定

N9T-4 株における TCA 回路関連酵素の活性測定を足がかりに生化学的な解析を進めた結果、TCA 回路上には新規な炭酸固定系は存在しないと考えられた。そこで、DNA マイクロアレイ解析によって得られた知見をもとに新たな炭酸固定経路を推定するに至った。結果として予想された炭素代謝（炭酸固定経路）を図にまとめた（図 18）。本菌が有する炭酸固定経路について、以下の 2 つの仮説を立てた。

<仮説 1>

低栄養条件における一連の酵素遺伝子（MDH、nFADH、ACS）の高発現から、アセトアルデヒド→酢酸→アセチル-CoA の代謝が示唆された。遺伝子発現が確認できた複数の ACC/PCC 推定遺伝子のうち、一部が低栄養条件特異的に上昇していた。ACC によるアセチル-CoA への炭酸固定は脂肪酸合成に必須である。しかしながら、グルコースなどの有機炭素源を資化する場合、代謝物の酸化に伴って発生する CO₂ で ACC を初発酵素とする脂肪酸合成は可能であると考えられる。一方で、N9T-4 株は炭素源無添加の完全無機塩培地で生育することから、ACC/PCC が関与する経路上での炭酸固定が生育に必須となっている可能性が考えられる。つまり、アセトアルデヒドからの中央代謝経路はアセチル-CoA を経由する C2 代謝であり、N9T-4 株の CO₂ 要求性は脂肪酸合成に関与するという説である。C2 代謝を基本とすることは GO 経路が必須であるという事実とも合致する。

仮説 1 の問題点として、脂質合成経路上、ACC による炭酸固定が行われた後、マロニル-CoA とアセチル-CoA が縮合する過程で脱炭酸反応が起き、一旦固定された CO₂ がすぐに脱離してしまうことが挙げられる。前述のように本菌の CO₂ 要求性は脂質合成における ACC 反応の必須性に関与すると予想しているが、細胞構成成分に CO₂ 由来の炭素が取り込まれることを考えた場合、これだけでは説明がつかない。奇数個の炭素鎖を持つ脂肪酸が酸化される際に生成する C3 単位のプロピオニル-CoA は最終的にスクシニル-CoA に変換され、TCA 回路に入る。この過程で PCC による炭酸固定が必須となるので、PCC 反応と合わせて細胞構成成分に CO₂ 由来の炭素が取り込まれると考えることは可能である。

<仮説 2>

アセトアルデヒドからピルビン酸が生成する炭酸固定反応は、活性が非常に低いものの確認できている（表 6）。生成したピルビン酸は、低栄養条件で高発現する ME により炭酸固定を伴ってリンゴ酸に変換され、TCA 回路に流れ込む可能性がある。また、ピルビン酸→PEP の方向に反応が進めば、アセトアルデヒドから短絡的に糖を生成する経路として機能する可能性があ

る。PDH 反応（脱炭酸反応）が容易に起こる場合、この仮説は成立しないが、低栄養生育させた N9T-4 株の菌体から調製した無細胞抽出液の PDH 活性は極めて低かったことから、この仮説は可能性として考えられる。

本仮説では、経路上に 2 つの炭酸固定反応が存在する。よって、アセトアルデヒドからのリンゴ酸生成の過程で 2 分子の CO_2 が固定され、TCA 回路に流れ込んだ後に GO 経路に入り、1 分子の GO が生成すると予想できる。

いずれの仮説も「N9T-4 株は大気中のアルデヒドを炭素源・エネルギー源として効率よく固定し、利用できる」という考えに基づいている。両仮説で鍵となるアセトアルデヒドは、大気中に極めて微量であるが存在する（平均値 $2.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、大気温度 25°C とした場合 1.3 ppb 、環境省実施の有害大気汚染物質モニタリング調査結果（2012 年度）による [63]）。条件にもよるが、室内では大気中と比べてその値が 10 倍程度に跳ね上がる[64]。現在、当研究室では本菌が有する低濃度アルデヒドの資化能について詳細な検討を開始している。

DNA マイクロアレイ解析の結果、遺伝子発現が上がっていることで特定の経路が関わっていると結論付けることは通常困難である。しかしながら、本研究で得られた「炭素源を全く加えていない条件である炭素代謝関連遺伝子が著しく発現していた」という知見は、本菌の低栄養性との関連性を強く示唆するものである。低栄養条件特異的に高発現する *aldA* を破壊すると、本菌は BM 培地で生育できなくなる[22]。その結果も低栄養生育において *aldA* が重要な役割を果たしているという一つの可能性を示すものである。今後、推定した炭酸固定経路を完全証明するためには複数のアプローチ（粗酵素や精製酵素を用いた生化学的解析、トランスクリプトーム解析、同位体を用いたメタボローム解析、遺伝子破壊による表現系確認など）による検討が必須となる。

現在、 ^{13}C ラベルが入ったアセトアルデヒド及びアセチル-CoA、炭酸水素塩を基質として用いる休止菌体反応を行い、代謝産物への ^{13}C ラベルの蓄積を経時的に観察するメタボローム解析を試みている。本解析は静岡大学グリーン科学技術研究所に受託解析を依頼し、行っている。装置としては、極性の低分子化合物（有機酸、アミノ酸、糖類）の分離能が高い親水性相互作用クロマトグラフィー用充填カラムを取り付けた HPLC 装置を MS 装置と接続させて、四重極形 LC-MS/MS システムを構築し、用いている。 ^{13}C ラベルがどの代謝産物に最初に入っていくかを見ることによって、ラベル化合物が取り込まれる場を同定することができる。また、 ^{13}C 濃縮度が上がっていく代謝産物が同一経路上に並べば、その経路が試験した条件で機能していると推測できる。鍵となる新規な酵素反応が見つかった場合は、生化学的にそれを

同定することが必要となる。以上のように、低栄養生育時における本菌の炭素フローを明確化する上で、 ^{13}C ラベルを用いたメタボローム解析は必須と考えている。推定した炭酸固定経路（図 18）について、仮説 1、仮説 2 のどちらがより信憑性が高いかは、メタボローム解析の結果である程度判明するものと考えている。

現時点の他の課題として、ゲノム情報を最大限に活用できていないことが挙げられる。当研究室は N9T-4 株のドラフトゲノム情報を所持しているが、まだ完全なゲノム配列は明らかにできていない。現在、当研究グループでは本菌が有するゲノム配列の完全解読を進めている。全ゲノム配列決定後は類縁菌との詳細な比較ゲノム解析、ゲノム情報を生かした代謝シミュレーション解析などをメタボローム解析と並行して行うことで、本菌のユニークな炭素代謝（炭酸固定経路）の全容解明を早期に達成できるものと考えている。

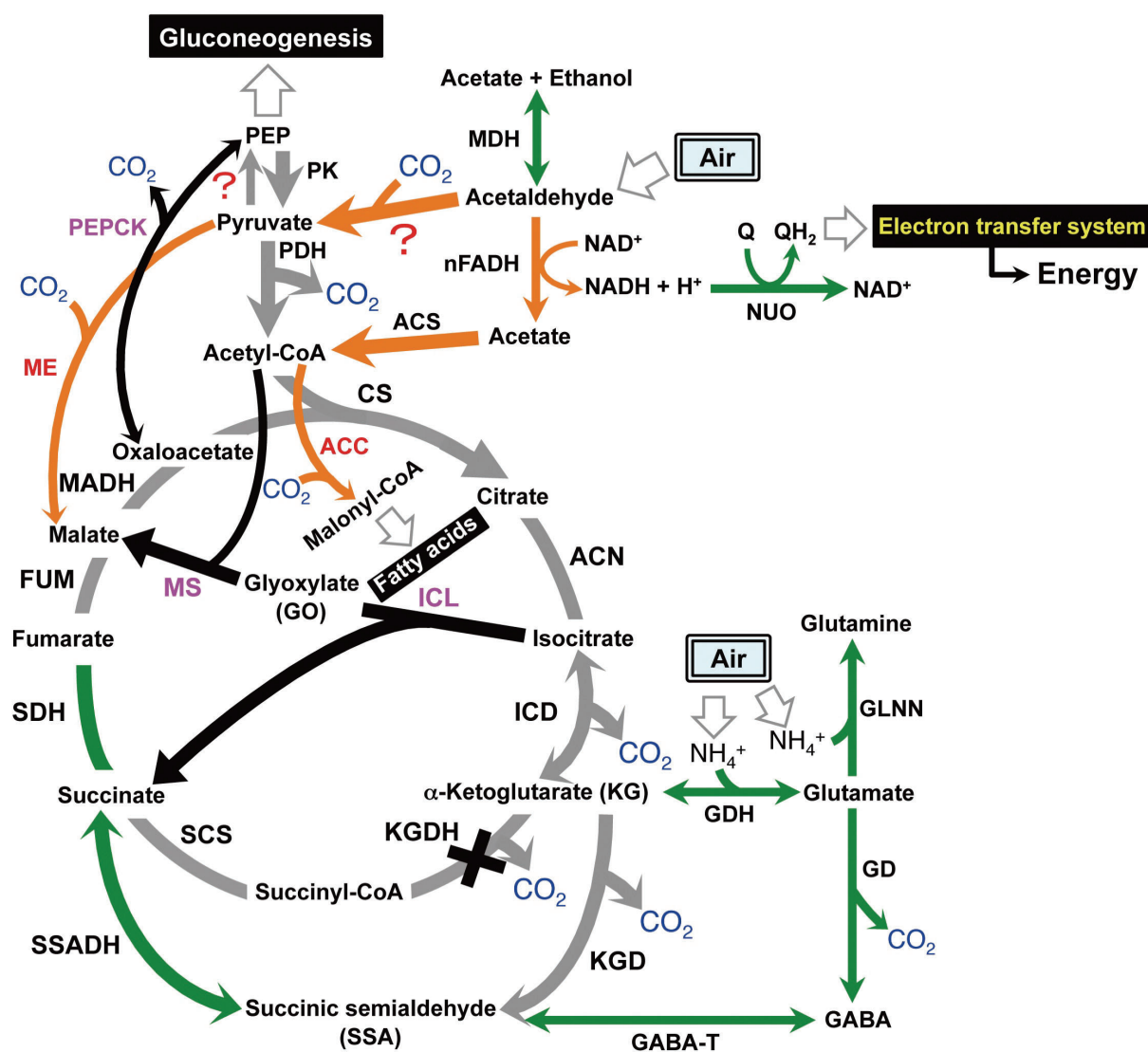


図 18. 新たに予想された N9T-4 株の炭素代謝（炭酸固定経路）

推定した炭酸固定経路上の酵素反応はオレンジの矢印あるいは線で示した。DNA マイクロアレイ解析の結果低栄養条件で高発現していた酵素反応（酵素名略称を付記）はオレンジまたは緑の矢印あるいは線で示した。炭酸固定に関与すると考えられる酵素名略称は赤色で示した。低栄養生育に必須な酵素反応は黒い太矢印で示した。低栄養生育に必須な酵素名略称はピンク色で示した。酵素名略称は全て表 5-1, 5-2 に対応している。アセトアルデヒドからピルビン酸が生成する炭酸固定反応は粗酵素活性から存在が予想された。ピルビン酸→PEP の方向に反応が進めば、アセトアルデヒドから短絡的に糖を生成する経路として機能する可能性がある。MDH はアセトアルデヒドを酢酸とエタノールに不均化する反応を触媒し、アルデヒドの毒性回避に寄与する。低栄養条件で高発現した nFADH により NADH が生成し、同じく高発現した NUO の働きにより NADH から電子伝達系を経てエネルギーを獲得する。NUO 反応上の Q は電子受容体としてのキノンを意味する。

総括

第一章では、N9T-4 株が大気中に含まれるガス状炭素化合物を資化できるかという点に着目し、検討を行った。その結果、本菌は CO_2 のみならず CO も資化できることが判明した。また、CODH 依存的な CO から CO_2 への変換系の存在、 CO がエネルギー源となり得る可能性が示唆された。まだ本菌において機能的な CODH は特定できていないが、今後、他の好気性 CO 資化性菌で明らかとなっている機能的な CODH の活性部位残基のモチーフを本菌のゲノム上で網羅的に探索することで、機能的な CODH の特定が可能と考えられた。

第二章では、N9T-4 株の低栄養生育に必須な酵素遺伝子を同定するために線状 DNA 断片を用いたランダム変異導入法により変異株ライブラリーの構築を行った。BM 培地には生育できず、BM+リンゴ酸培地あるいは BM+グルコース培地で生育できる株を計 5 株取得した。これらの変異株では、イソクエン酸リアーゼ遺伝子 *aceA*、リンゴ酸シンターゼ遺伝子 *aceB*、PEP カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子 *pckG* の内部及び周辺領域に欠失変異が生じていた。AceA と AceB は GO 経路の酵素であり、PEPCK はオキサロ酢酸からの糖新生に関与する酵素であることが知られている。従って、本菌の低栄養生育には GO 経路と糖新生経路が必須であり、重要な役割を果たしていることが予想された。GO 経路は TCA 回路上脱炭酸反応による炭素のロスを防ぐ役割があると考えられた。

第三章では、まず N9T-4 株における TCA 回路関連酵素の活性測定を試みた。その結果、BM 培地で生育させた菌体には TCA 回路におけるほとんどの酵素活性が検出されたが、KGDH の活性は検出できなかった。本菌は KGDH 活性を持たない代わりに、KGDH E1 コンポーネント単体 SucA による KGD 活性を有していた。さらに、KGD 反応によって生成するコハク酸セミアルデヒド (SSA) をコハク酸に変換する SSADH 活性が確認できたことから、本菌の TCA 回路においては KG から SSA を経てコハク酸に至るバイパス経路を含んでいる可能性が示された。TCA バイパス経路の役割としては、CoA を節約し、アセチル-CoA の生成、供給量を増やすことが考えられた。ICD 逆反応の存在からバイパス経路を含む変形 TCA 回路上に新規な炭酸固定経路が存在すると予想し、種々の検討を行ったが、KGD 逆反応の不成立から次の可能性を検証する方向にシフトし、DNA マイクロアレイ解析の結果から新たな炭酸固定経路の仮説を立てた。今後新たな予想に基づき主に ^{13}C ラベル化合物を用いたメタボローム解析を行うことで、本菌の炭酸固定経路の全体像を明確化できると考えられた。

N9T-4 株のユニークな特徴は、「低栄養性」でかつ「CO₂ 要求性」を示すという点にある。本研究で得られた知見から、本菌は特異な代謝を持つというよりは微生物が一般的に持つ代謝を駆使して低栄養生育を可能にしていると考えられた。エネルギー問題が逼迫している 21 世紀の社会において、本菌のような微生物の生存戦略から学べることは多いと考えている。健康、環境、エネルギー、情報、物質材料の課題解決に貢献する 10 年先の分子技術の一つとして、「CO₂ の炭素資源化」が期待されている [65]。本菌の「低エネルギー型炭酸固定系」を実証し、既存の微生物反応とハイブリッド化させることで様々な有用物質を CO₂ から合成することが可能になり、微生物によるカーボンニュートラルな物質生産に大きく貢献できるものと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました、本学バイオサイエンス研究科ストレス微生物科学研究室の高木 博史教授に深い感謝の意を表します。

また、本研究の全般にわたり直接の御指導を賜りました同研究室の吉田 信行助教（現・静岡大学大学院工学研究科・准教授）に心より御礼申し上げます。そして、同研究室の天津 厳生助教、渡邊 大輔助教、河野 祐介博士研究員、那須野 亮博士研究員の御助言も非常に有用なものでした。

さらに、研究指導アドバイザーとして本研究の遂行にあたり様々な御指摘、御助言を賜りました本学バイオサイエンス研究科の横田 明穂教授（分化・形態形成学研究室）、森 浩禎教授（システム微生物学研究室）、秋山 昌広准教授（原核生物分子遺伝学研究室）に心より御礼申し上げます。

共同研究としてランダム変異ライブラリーの作製などを行っていただいた株式会社三菱化学科学技術研究センターの湯 不二夫氏、若松 美紀氏に心より御礼申し上げます。

本研究で MS 分析を行うにあたって、依頼に快く応じていただいた本学バイオサイエンス研究科技術職員の倉田 理恵氏、塚本 潤子氏（現・本学産官学連携推進本部・専門職員）に心より御礼申し上げます。

最後に本研究、学生生活において苦楽を共にしたストレス微生物科学研究室の皆様、私を快く大学院に進学させてくれた両親に心から感謝いたします。

参考文献

1. *In* Climate change 2013: The physical science basis. Working group 1 (WG1) contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) 5th Assessment Report. (2013) Cambridge University Press.
2. Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B.E., and Fuchs, G. (2010) Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Microbiol* 8, 447-460.
3. Hügler, M., Huber, H., Stetter, K. O., and Fuchs, G. (2003) Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Arch Microbiol* 179, 160-173.
4. Berg, I. A. (2011) Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Appl Environ Microbiol* 77, 1925-1936.
5. Calvin, M., and Bassham, J. A. (1962) *In* The photosynthesis of compounds. (W. A. Benjamin, Inc., New York).
6. Ljungdhal, L. (1986) The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 40, 415-450.
7. Oelgeschläger, E., and Rother, M. (2008) Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria and archaea. *Arch Microbiol*, 190, 257-269.
8. Evans, M. C., Buchanan, B. B., and Arnon, D. I. (1966) A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55, 928-934.
9. Hugler, M., Wirsén, C. O., Fuchs, G., Taylor, C. D., and Sievert, S. M. (2005) Evidence for autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the epsilon subdivision of proteobacteria. *J Bacteriol* 187, 3020-3027.
10. Zarzycki, J., Brecht, V., Müller, M., and Fuchs, G. (2009) Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21317-21322.
11. Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W., and Fuchs, G. (2007) A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. *Science* 318, 1782-1786.
12. Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I. A., Kockelkorn, D., Eisenreich, W., and Fuchs, G. (2008) A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7851-7856.
13. Sato, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007) Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science* 315, 1003-1006.
14. Aono, R., Sato, T., Yano, A., Yoshida, S., Nishitani, Y., Miki, K., Imanaka, T., and

- Atomi, H. (2012) Enzymatic characterization of AMP phosphorylase and ribose-1, 5-bisphosphate isomerase functioning in an archaeal AMP metabolic pathway. *J Bacteriol* 194, 6847-6855.
15. Ishii, M., Chuakrut, S., Arai, H., and Igarashi, Y. (2004) Occurrence, biochemistry and possible biotechnological application of the 3-hydroxypropionate cycle. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 605-610.
 16. Bonilla-Rosso, G., Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Hernández, I., Eguiarte, L. E., Olmedo-Alvarez, G., and Souza, V. (2012) Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: Community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology* 12, 659-673.
 17. Siering, P., Wolfe, G., Wilson, M., Yip, A., Carey, C., Wardman, C., Shapiro, R., Stedman, K., Kyle, J., and Yuan, T. (2013) Microbial biogeochemistry of boiling springs lake: A physically dynamic, oligotrophic, low-pH geothermal ecosystem. *Geobiology* 11, 356-376.
 18. Kuznetsov, S., Dubinina, G., and Lapteva, N. (1979) Biology of oligotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 33, 377-387.
 19. Bombar, D., Heller, P., Sanchez-Baracaldo, P., Carter, B. J., and Zehr, J. P. (2014) Comparative genomics reveals surprising divergence of two closely related strains of uncultivated UCYN-A cyanobacteria. *ISME J* 8, 2530-2542.
 20. Könneke, M., Schubert, D. M., Brown, P. C., Hügler, M., Standfest, S., Schwander, T., Schada von Borzyskowski, L., Erb, T. J., Stahl, D. A., and Berg, I. A. (2014) Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 8239-8244.
 21. Yoshida, N., Yagi, K., Sato, D., Watanabe, N., Kuroishi, T., Nishimoto, K., Yanagida, A., Katsuragi, T., Kanagawa, T., Kurane, R., and Tani, Y. (2005) Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *J Biosci Bioeng* 99, 143-149.
 22. Ohhata, N., Yoshida, N., Egami, H., Katsuragi, T., Tani, Y., and Takagi, H. (2007) An extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4, isolated from crude oil. *J Bacteriol* 189, 6824-6831.
 23. 大畑 奈緒子 (2008) 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の CO₂ 要求性について, 奈良先端科学技術大学院大学博士論文.
 24. Yoshida, N., Ohhata, N., Yoshino, Y., Katsuragi, T., Tani, Y., and Takagi, H. (2007) Screening of carbon dioxide-requiring extreme oligotrophs from soil. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 2830-2832.
 25. Senechkin, I. V., Speksnijder, A. G., Semenov, A. M., van Bruggen, A. H., and van Overbeek, L. S. (2010) Isolation and partial characterization of bacterial strains on low organic carbon medium from soils fertilized with different organic amendments. *Microb Ecol* 60, 829-839.

26. Yoshida, N., Hayasaki, T., and Takagi, H. (2011) Gene expression analysis of methylotrophic oxidoreductases involved in the oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 123-127.
27. Bystrykh, L. V., Govorukhina, N. I., van Ophem, P. W., Hektor, H. J., Dijkhuizen, L., and Duine, J. A. (1993) Formaldehyde dismutase activities in Gram-positive bacteria oxidizing methanol. *J Gen Microbiol* 139, 1979-1985.
28. 稲葉 慧 (2013) 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株における窒素代謝, 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.
29. Yoshida, N., Inaba, S., and Takagi, H. (2014) Utilization of atmospheric ammonia by an extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4. *J Biosci Bioeng* 117, 28-32.
30. 毛戸 香織 (2012) 超低栄養性細菌に見出した新規な細胞内構造体 (オリゴボディー) の解析, 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.
31. 藤好 拓也 (2014) *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株が低栄養生育時に形成するオリゴボディーの機能解析, 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.
32. 気象庁 (2011) 大気・海洋環境観測報告 第 11 号 平成 21 年観測結果.
33. King, G. M., and Weber, C. F. (2007) Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 5, 107-118.
34. Meyer, O., Frunzke, K., Tachil, J., and Volk, M. (1993) Biochemistry of aerobic utilization of carbon monoxide, 433-459, *In* Murrel, J. C. and Kelly, D. P. (Eds.), *Microbial growth on C1 compounds*. (Intercept, Ltd., Andover, MA).
35. Ragsdale, S. W., and Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim Biophys Acta* 1784, 1873-1898.
36. King, G. M. (2003) Molecular and culture-based analyses of aerobic carbon monoxide oxidizer diversity. *Appl Environ Microbiol* 69, 7257-7265.
37. Zacharia, V. M., Manzanillo, P. S., Nair, V. R., Marciano, D. K., Kinch, L. N., Grishin, N. V., et al. (2013) *cor*, a novel carbon monoxide resistance gene, is essential for *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Mbio* 4, e00721-13.
38. 湯 不二夫, 若松 美紀 (2011) ロドコッカス細菌のためのランダムゲノム挿入及び欠失ツール, 特開 2011-223925 (P2011-223925A).
39. Pelicic, V., Reyrat, J. M., and Gicquel, B. (1996) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* 178, 1197-1199.
40. Goryshin, I. Y., Jendrisak, J., Hoffman, L. M., Meis, R., and Reznikoff, W. S. (2000) Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat Biotechnol* 18, 97-100.
41. Beste, D. J., Bonde, B., Hawkins, N., Ward, J. L., Beale, M. H., Noack, S., Nöh, K., Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G., and McFadden, J. (2011) ¹³C metabolic flux analysis identifies an unusual route for pyruvate dissimilation in mycobacteria which requires

- isocitrate lyase and carbon dioxide fixation. *PLoS Pathog* 7, e1002091.
42. McKinney, J. D., Höner zu Bentrup, K., Muñoz-Elías, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchettini, J. C., Jacobs, W. R., Jr, and Russell, D. G. (2000) Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735-738.
 43. Muñoz-Elías, E. J., and McKinney, J. D. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med* 11, 638-644.
 44. Fischer, E., and Sauer, U. (2003) A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278, 46446-46451.
 45. Tian, J., Bryk, R., Itoh, M., Suematsu, M., and Nathan, C. (2005) Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of α -ketoglutarate decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10670-10675.
 46. Olsthoorn, A. J., Otsuki, T., and Duine, J. A. (1998) Negative cooperativity in the steady-state kinetics of sugar oxidation by soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Eur J Biochem* 255, 255-261.
 47. Tian, J., Bryk, R., Shi, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Nathan, C. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* appears to lack α -ketoglutarate dehydrogenase and encodes pyruvate dehydrogenase in widely separated genes. *Mol Microbiol* 57, 859-868.
 48. Hager, L. P. (1957) Trypsin activation of a ferricyanide-linked pyruvic acid oxidation. *J Biol Chem* 229, 251-263.
 49. Lea, A. G., Ford, G. D., and Fowler, S. (2000) Analytical techniques for the estimation of sulphite binding components in ciders and wines. *Int J Food Sci Technol* 35, 105-112.
 50. Muro-Pastor, M. I., and Florencio, F. J. (1994) NADP(+)-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: Purification and characterization of the enzyme and cloning, sequencing, and disruption of the *icd* gene. *J Bacteriol* 176, 2718-2726.
 51. de Carvalho, L. P., Zhao, H., Dickinson, C. E., Arango, N. M., Lima, C. D., Fischer, S. M., Ouerfelli, O., Nathan, C., and Rhee K. Y. (2010) Activity-based metabolomic profiling of enzymatic function: Identification of Rv1248c as a mycobacterial 2-hydroxy-3-oxoadipate synthase. *Chem Biol* 17, 323-332.
 52. Hoffelder, M., Raasch, K., van Ooyen, J., and Eggeling, L. (2010) The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. *J Bacteriol* 192, 5203-5211.
 53. Wagner, T., Barilone, N., Alzari, P. M., and Bellinzoni, M. (2014) A dual conformation of the post-decarboxylation intermediate is associated with distinct

- enzyme states in mycobacterial KGD (α -ketoglutarate decarboxylase). *Biochem J* 457, 425-434.
54. Usuda, Y., Tujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O., and Matsui, H. (1996) Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology* 142, 3347-3354.
55. 早崎 琢也 (2010) *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の新規炭酸固定系に関わるメタノール代謝関連酵素の遺伝子発現解析, 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.
56. Van Ophem, P. W., Van Beeumen, J., and Duine, J. A. (1993) Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica*. *Eur J Biochem* 212, 819-826.
57. Shi, L., Sohaskey, C. D., Kana, B. D., Dawes, S., North, R. J., Mizrahi, V., and Gennaro, M. L. (2005) Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under *in vitro* conditions affecting aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15629-15634.
58. Miyazaki, M., Shibue, M., Ogino, K., Nakamura, H., and Maeda, H. (2001) Enzymatic synthesis of pyruvic acid from acetaldehyde and carbon dioxide. *Chem Commun*, 1800-1801.
59. Baughn, A. D., Garforth, S. J., Vilchèze, C., and Jacobs, W. R., Jr (2009) An anaerobic-type α -ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase completes the oxidative tricarboxylic acid cycle of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 5, e1000662.
60. Kanao, T., Kawamura, M., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2002) Characterization of isocitrate dehydrogenase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Eur J Biochem* 269, 1926-1931.
61. Zhang, S., and Bryant, D. A. (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* 334, 1551-1553.
62. Steinhauser, D., Fernie, A. R., and Araújo, W. L. (2012) Unusual cyanobacterial TCA cycles: Not broken just different. *Trends Plant Sci* 17, 503-509.
63. 環境省 (2014) 平成 24 年度 大気汚染状況について (有害大気汚染物質モニタリング調査結果).
64. 立野 英嗣, 恵花 孝昭, 山本 優, 浦嶋 幸雄, 小塚 信一郎, 向原 紀彦, 藤田 晃三 (1999) 室内空気中のアルデヒド類・ケトン類濃度 (第 1 報). 札幌市衛研年報 26, 54-58.
65. 村井 眞二 (2012) 「分子技術イニシアティブ」とは何か : 時代の背中を押す National pride の再認識を促す. 化学 67, 32-35.