

Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4のブタノール産生に及ぼす
取込型ヒドロゲナーゼの機能

九州大学大学院・生物資源環境科学府・生物機能科学専攻

中山 俊一

九州大学大学院・農学研究院・生物機能科学部門

吉野 貞蔵、古川 謙介

要約

Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 は対数増殖期に有機酸、定常期にアセトン、ブタノール等溶剤を生成する代謝転換機構を有する。本代謝系において余剰電子は、酸生成期では水素として廃棄され、溶剤生成期では NADH へと変換されブタノール生成に利用されるが、その分子レベルでの制御機構は解明されていない。本研究では、水素生成に関与する *hydA* (放出型) 及び水素からの NADH 生成に関与する *hupCBA* (取込型) を取得し、代謝制御機構の解明を試みた。*hydrogenase* 遺伝子の取得を試みた結果、単一の *orf* からなる *hydA* 及び 3 つの *orf* からなる *hupCBA* を取得した。構造解析の結果、*hydA* は放出型、*hupCBA* は取込型 *hydrogenase* と相同性を示した。また、*hydA* は酸生成期、溶剤生成期ともに転写されているが、*hupCBA* の転写は定常期において誘導されており、溶剤生成との関連性が示唆された。*HupCBA* 発現抑制株においては NADH 生成を伴うブタノール生成量の減少と、NADH 生成を伴わないアセトン生成及び水素生成量の増加がみられた。このことから *HupCBA* は水素から NADH を生成する水素取込型 *hydrogenase* として機能し、溶剤生成期における高ブタノール生産に重要であることが明らかとなった。

1. はじめに

Clostridium 属細菌のいくつかは各種糖質を利用した発酵によりアセトン、ブタノール等の溶剤を生成することからアセトン・ブタノール菌と称され新たなバイオマス産業を担う菌として注目されている。アセトン・ブタノール菌は対数増殖期において酢酸、酪酸を生成し、定常期においてアセトン、ブタノール等溶剤を生成するという特異な代謝転換機構を有している。これまでの研究から、代謝転換は溶剤生

成遺伝子の転写レベルでの発現誘導により引き起こされることが明らかとされてきており、そのメカニズムについての解析が盛んに行われてきた。しかしながら、発酵性嫌気性細菌における重要な電子処理システムであるエレクトロンフローについての分子レベルでの解析は現在までほとんど行われていない。発酵性嫌気性細菌は酸化的リン酸化を伴う呼吸系を持たないため、代謝系で生成された電子は水素もしくは NADH として廃棄される。アセトン・ブタノール生成性 *Clostridium* 属細菌は酸生成期においては解糖系で生じる NADH は酪酸生産系の過程で消費されるため、ピルビン酸酸化で生じる電子はフェレドキシンへと伝達され、還元型のフェレドキシンはさらに hydrogenase によって水素として廃棄される (放出型 hydrogenase)。一方、ソルベント生成期においては水素生成が低下することから、ピルビン酸酸化で生じる電子は水素として廃棄されるのではなくブタノール生産のため NADH 生成へと向かうと考えられている^(1,2)。ソルベント生成に伴い水素生成が低下することから、これまでに hydrogenase の活性制御について研究がなされてきた。ソルベント生成期におけるヒドロゲナーゼ活性は酸生成期に比べ低下していることが報告されており、このことが代謝転換に伴うエレクトロンフロー制御を担うと考えられてきた⁽³⁾。しかしながら、*Clostridium acetobutylicum* P262 の *hydA* 遺伝子は酸生成期、ソルベント生成期ともに発現しており、従来の概念では矛盾する結果が報告されている⁽⁴⁾。

hydrogenase は多くの生物から見出されており、真核生物、硫酸還元菌、水素酸化細菌、*Clostridium* 属細菌に広く存在しており、機能的に2つのタイプに分類される。一つは水素生成に関与する 放出型 hydrogenase で、もう一つは水素から NADH を生成する 取込型 hydrogenase である。*Clostridium pasteurianum* においてはこれら機能的に異なる hydrogenase、CpI 及び CpII が存在する事が報告されている。アセトン・ブタノール菌においてもこのように機能的に異なる2つの hydrogenase が存在すると推考できる。つまり、酸生成期における水素生成は放出型 hydrogenase により制御され、ソルベント生成期においては放出型 hydrogenase の活性が低下するのではなく、取込型 hydrogenase が発現することにより見かけ上水素生成が低下し、その結果 NADH が生成されるというモデルである。種の異なる *C. pasteurianum* においても機能的に相反する2つの hydrogenase CpI、CpII を有しており、*C. saccharoperbutylacetone* N1-4 においても同様のシステムを有すると仮定し、本研究ではこれら2つの hydrogenase を取得し、遺伝子構造、転写、機能解析を行うことで、代謝制御機構の解明を試みた。

2. hydrogenase 遺伝子 *hydA* 遺伝子のクローニングおよびシーケンス解析

これまでに報告されている放出型 hydrogenase の保存領域を元にプライマーを設計し、*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 のゲノム DNA を鋳型に nested PCR を行った。その結果、期待される 600 bp の DNA 断片が増幅された。シーケンス解析の結果、*Ethanoligenens harbinense* の Fe-hydrogenase と最も高い相同性 (72%) を示し、取得した 600 bp の DNA 断片が hydrogenase であることを確認し *hydA* と名付けた。この配列を元に近頃明らかになった *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 のゲノム情報と照合し、その上流及び下流域の配列を取得後、完全長の DNA 配列を取得した。*hydA* は 1,764 bp、586 aa から形成されていた。また、*hydA* 周辺領域の遺伝子についても比較解析を行った。*hydA* 上流には hypothetical protein 2つと、pyridine nucleotide disulphide oxidoreductase、下流には hypothetical protein 及び *yagB* が存在しており、単一の遺伝子構造を形成していた (図 1)。

ホモロジー解析の結果、*C. acetobutylicum* ATCC 824 の *hydA* (583 aa) と 33.8%、*C. acetobutyricum* P262 の *hydA* (575 aa) と 33.1%の相同性を示し、*C. pasteurinum* の *hydA*、*C. perfringense* の *hydA* とも相同性を示した。アミノ酸解析の結果、HydA は N 末端に 2Fe-2S cluster 1 つを、中心付近に 4Fe-4S cluster を 3 つ形成していた。また、C-末端には Fe-hydrogenase に特有の触媒部位として考えられている H-cluster が保存されていた。

3. hydrogenase 遺伝子 *hupCBA* 遺伝子のシーケンス解析

先の研究によりクローニングされた hydrogenase 遺伝子は、3 つの隣接した *orf* (*hupC*、*hupB*、*hupA*) からなる hydrogenase cluster を形成していた。また、*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 のゲノム解析から明らかになったシーケンス配列を比較し、*hupCBA* 周辺領域の遺伝子についても比較解析を行った。*hupCBA* 上流には alanine racemase、hypothetical protein、specialised sigma factor、下流には NimC/NimA、L-amino acid oxidase が存在しており、hydrogenase と関連性のある遺伝子は見出されなかった (図1)。

また、それぞれの *orf*、*hupC*、*hupB*、*hupA* についてホモロジー検索を行った。その結果、HupA (587 aa) は *C. acetobutylicum* ATCC 824 の HydA (583 aa) と 33.8%、*C.*

acetobutyricum P262 の HydA (575 aa) と 33.1%の相同性を示し、*C. pasteurinum* の HydA、*C. perfringense* の HydA とも相同性を示し、Fe-hydrogenase と高い相同性を示した。しかしながら、構造的に最も類似していたのは *Thermotoga maritima* の *hydCBA* 遺伝子群であった。HupA は 41.0%、HupB は 54.0%、HupC は 47.0%と高い相同性を示した。

アミノ酸解析の結果、HupA には水素生成に関与する H-cluster の他に、4Fe-4S cluster が 3 つ、2Fe-2S cluster が 1 つ存在しており、この構造は *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 のHydA、*T. maritima* の HydA においても同様に保存されていた。HupB においては、4Fe-4S cluster が 3 つ、2Fe-2S cluster が 1 つ存在していた。さらに、FAD-binding site、NAD-binding site が存在していた。HupC においては 2Fe-2S cluster が 1 つ存在していた。

HupCBA クラスターは機能的な *orf* が隣接して存在しており、このような構造は報告されている他のアセトン・ブタノール菌の hydrogenase とは構造的に異なっていた。特に、*C. acetobutylicum* ATCC 824 は全ゲノム解析明らかとなっているが、このような cluster を形成する hydrogenase は見いだされなかった。

これらの結果から、*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4の hydrogenase は他のアセトン・ブタノール菌のそれとは異なる特異な hydrogenase であることが明らかとなった。

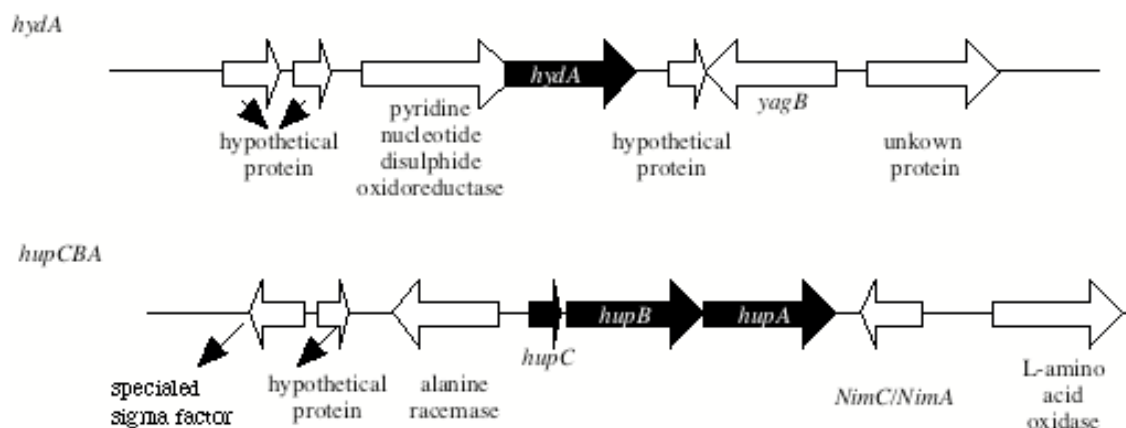


図1. *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 のhydrogenase遺伝子 *hydA*、*hupCBA*の周辺遺伝子

4. *hydA*, *hupCBA* の転写解析

hydrogenase 遺伝子は水素の生成および開裂反応を可逆的に触媒することが可能であり、遺伝子配列からその機能を推定することは困難である。本菌の代謝制御における *hydA*、*hupCBA* の機能について知見を得るため、両遺伝子及び構成的に発現することが明らかとなっているソルベント生成に関与する *bdh* (butanol dehydrogenase) の転写様式の比較をノーザンドットプロット解析により行った (図2)。野生株において *hydA* の転写量は培養初期、培養後期ともに構成的に発現しているのに対して、*hupA* の転写量は培養初期では著しく低くかった。しかしながら、*hupA* の転写量は培養後期において、特に培養 15 h から増大しており定常期に最大となった。また、コントロールとして用いた *bdh* の転写量は培養を通してほぼ一定であることからこれらの転写量の増減がその分解に寄与していないことが明らかとなった。

hydA は培養を通して発現していることから水素生成に関与する放出型 hydrogenase であることが強く示唆された。一方、*hupA* はソルベント生成と対応して *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4において増加することからソルベント生成と密接に関連していることが明らかとなった。

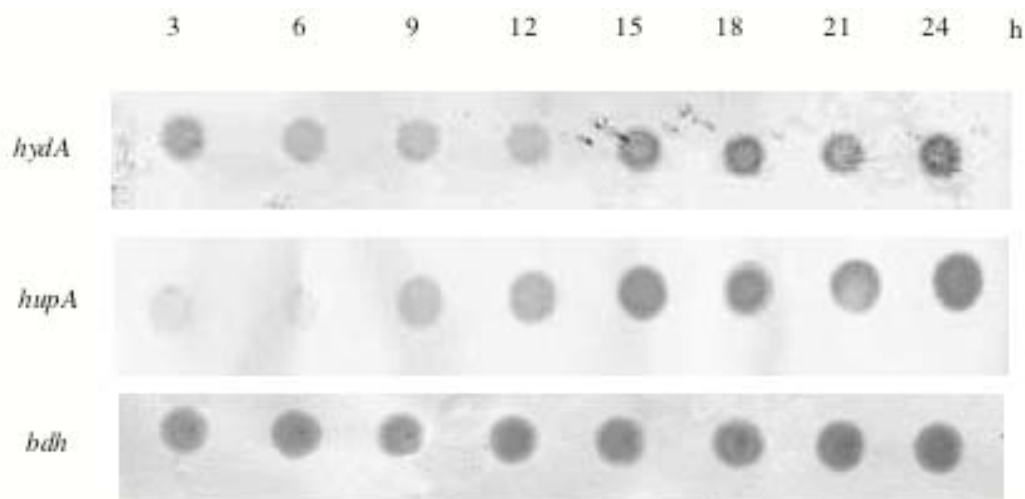


図2. *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 の hydrogenase 遺伝子の転写解析. 各培養時間から抽出したRNAに対して *hydA*、*hupA*、*bdh* をプローブにノーザンドットプロット解析を行った。

4、8、12、24 h 培養後のトータル RNA に対してノーザンプロット解析を行った結果、24 h 培養後抽出した RNA のレーンに *hupCBA* クラスターに相当する 4.0 kb のバンドを確認した。また、*hupC*、*hupB* および *hupB*、*hupA* 各遺伝子間について RT-PCR

解析を行ったところそれぞれ期待されるバンドが確認できた。これらのことから、*hupCBA* はポリシストロニックなオペロンを形成しており、その転写量はソルベント生成と対応することが明らかとなった。

また、プライマーエクステンション法により転写開始点を決定したところ開始コドンの 37 bp 上流に位置していた。

5. アンチセンス RNA 法を用いた *hupCBA* 遺伝子発現抑制による機能解析

(a) アンチセンス RNA 法による HupCBA の機能解析

転写解析により *hupCBA* がソルベント生成と密接な関連性があることが明らかとなった。*hydrogenase* は可逆的に水素の生成および取込を行うことが可能であり、生理的な機能を解明するには *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 においてこれらの発現を抑制し解析する必要がある。しかしながら、*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 における相同組換えによる *hupCBA* の遺伝子破壊を試みたがその破壊株の取得は困難であった。そこで、新たな遺伝子発現抑制法として注目されているアンチセンス RNA 法を用いて遺伝子発現抑制を行った。

アンチセンス RNA の発現には構成的な発現を制御する *bdh* プロモーターを用い、転写終結には *hupA* の下流領域を用いた。発現させたアンチセンス RNA は *hupCBA* の転写開始点 2 nt 上流からその下流 180 nt を用い、*hupCBA* の mRNA とハイブリダイズし、リボソームの結合を阻害することで HupC が発現抑制を行うようデザインした。それぞれの DNA 断片を予め制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて PCR にて増幅し、連結した後 *Escherichia coli*-*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 間のシャトルベクターである pNAK1 に挿入しアンチセンス発現プラスミド pNAK2 を構築した。コントロールとして pNAK1 を用い、これら両プラスミドを用いて *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 を形質転換し、形質転換体を取得後、それぞれ N1-4pNAK2 及び N1-4pNAK1 とした。

アンチセンス RNA が効果的に遺伝子発現を抑制するかどうかを調べるため N1-4pNAK1 及び N1-4pNAK2 における HupC タンパクの存在を抗 HupC 抗体を用いてウエスタンブロット解析により検討した。その結果、N1-4pNAK1 においては HupC のシグナルが検出されたのに対して、N1-4pNAK2 においてはそのシグナルが検出されなかった。このことから、180 nt のアンチセンス RNA が効果的に HupC の発現を抑

制していることが明らかとなった。

また、その際の *hydrogenase* 活性を検出するため両形質転換体の無細胞抽出液に対して *hydrogenase* 活性染色を行った。その結果、N1-4pNAK1 においては早い移動度と遅い移動度の2つのシグナルが検出されたのに対して、N1-4pNAK2 においては早い移動度を示す一つのシグナルのみが検出された。触媒活性を持たない HupC の発現抑制を行ったにもかかわらず、*hydrogenase* 活性染色においてシグナルが検出されなかったことは、HupCBA が複合体を形成し機能していることを示唆している。HupCBA と最も高い相同性を示す *T. maritima* の HydABC も複合体を形成していることを考慮すると N1-4 pNAK2 で消失したシグナルが HupCBA タンパクに対応するものと推考され、アンチセンス RNA により効果的に遺伝子発現が抑制されることが確認された。

HupCBA が水素生成型もしくは水素取込型として機能しているかどうか検討するため、両形質転換体の水素生成量を測定した。その結果、両株とも培養 12 h までは水素生成量はほぼ同等であったが、その後 N1-4pNAK2 において急激な水素生成が確認され最終的に N1-4 pNAK2 株の水素生成量は N1-4pNAK1 の 3.1 倍に達した。HupC の発現抑制株である N1-4pNAK2 において水素生成量が増加したことは HupCBA が取込型 *hydrogenase* であることを強く示唆している。

(b) *hupCBA* アンチセンス発現株における代謝解析

推定の水素取込型ヒドロゲナーゼ HupCBA と溶剤生成との関連性を明らかにするため、N1-4pNAK1 と N1-4pNAK2 における発酵産物量の測定を行った。両株ともほぼ同等の生育速度を示したことから HupCBA は生育には影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、酸生成期における酢酸、酪酸生成量も同程度であった。

しかしながら、溶剤生成能において重大な差が見られた。両株ともほぼ同時期に代謝転換を誘起し、溶剤を生成したが、最終的なブタノールとアセトンの生成比は N1-4pNAK1 では3.4 (ブタノール 174.7 mM、アセトン 51.3 mM) であり、N1-4pNAK2 では1.4 (ブタノール 130.3 mM、アセトン 95.1 mM) とほぼ等量の産物量であった。各産物量を比較すると、N1-4pNAK2 においてブタノールの生成量は N1-4pNAK1 に比べ 74.5% 減少しており、一方アセトン生成量は 3.4 倍に増加していた。

N1-4pNAK2 におけるブタノール減少がブタノール生成酵素 *butylaldehyde dehydrogenase* (Bld) 及び *butanol dehydrogenase* (Bdh) の酵素活性の低下によるものか

どうかを調べるためこれら両酵素活性を測定した。その結果、 NAD^+ を基質として測定した場合、Bld 活性は 18.54 mU/mg (N1-4pNAK1) および 31.20 mU/mg (N1-4pNAK2) であり、N1-4pNAK2 においてむしろ高い活性を示した。また、Bdh 活性は 56.81 mU/mg (N1-4pNAK1) および 67.34 mU/mg (N1-4pNAK2) でありほぼ同等の活性値を示した。これらのことから N1-4pNAK2 におけるブタノール生成量の減少がブタノール生成に直接関わる Bld、Bdh 活性の低下によるものではないことが明らかとなった。

以上のことから HupCBA は水素から NADH を生成する水素取込型 hydrogenase として機能することが推定され、HupCBA によるエレクトロンフローの制御がソルベント生成期における高ブタノール生産に重要であることが明らかとなった。

6. おわりに

本研究ではエレクトロンフローを制御する hydrogenase の機能を解析することでアセトン・ブタノール菌の代謝制御機構の解明を行った。本研究で解析した *hupCBA* 遺伝子をはじめソルベント生成に関与する遺伝子群は転写レベルで発現誘導されている。今後、これらの発現誘導を制御する転写因子の単離により代謝転換機構の分子レベルの解明が期待される。

参考文献

- (1) **Kim, B. H., J. G. Zeikus.** Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutylicum*. *Dev. Ind. Microbiol.* 1985. **26**:1-14.
- (2) **Martin, J. R., H. Petitdemange, J. Ballongue, and R. Gay.** A study of NAD(P) oxydoreductase of *Clostridium acetobutylicum* uninvolved in the metabolism of glucose, *Production d'intermeducares industriels par culture anaerobe.* 1982 123-128.
- (3) **Jones, D. T., and D. R. Woods.** Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 1986. **50**:484-524.
- (4) **Santangelo, J. D. , P. Durre, D. R. Woods.** Characterization and expression of the hydrogenase-encoding gene from *Clostridium acetobutylicum* P262. *Microbiology* 1995 **141**:171-80