

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-531055

(P2008-531055A)

(43) 公表日 平成20年8月14日(2008.8.14)

(51) Int.Cl.

C 12 P 3/00 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 1/21 (2006.01)

F 1

C 12 P 3/00
C 12 N 15/00
C 12 N 15/00
C 12 N 1/21

Z
Z N A A
A

テーマコード (参考)
4 B 0 2 4
4 B 0 6 4
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2007-558147 (P2007-558147)
(86) (22) 出願日 平成18年2月28日 (2006. 2. 28)
(85) 翻訳文提出日 平成19年10月29日 (2007. 10. 29)
(86) 國際出願番号 PCT/US2006/007153
(87) 國際公開番号 WO2006/093998
(87) 國際公開日 平成18年9月8日 (2006. 9. 8)
(31) 優先権主張番号 60/656, 957
(32) 優先日 平成17年2月28日 (2005. 2. 28)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

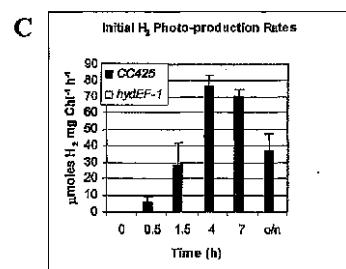
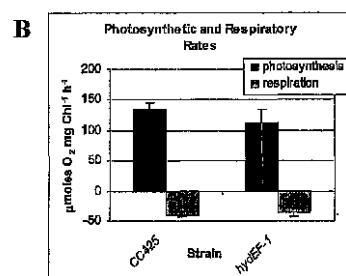
(71) 出願人 500066207
ミッドウエスト リサーチ インスティチュート
アメリカ合衆国、64110 ミズーリ州
、カンザス シティ、ボルカー ブールバード 425
(71) 出願人 507287102
ギラルディ、マリア ルシア
アメリカ合衆国、80228 コロラド州
、レイクウッド、エス ジニア ウェイ
221

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】活性 [Fe Fe] - ヒドロゲナーゼの発現および過剰発現させる方法および遺伝子

(57) 【要約】

構造ヒドロゲナーゼ遺伝子（複数）および/または成熟遺伝子 *HydE*、*HydF* および *HydG* を、これらの遺伝子を含有する生物から発現プラスミドへクローニングすることと、このプラスミドを、生来の [Fe Fe] - ヒドロゲナーゼを欠くか、または破壊された [Fe Fe] - ヒドロゲナーゼを有する生物に導入してそれを好気性培養することと、および嫌気生活に誘導して [Fe Fe] - ヒドロゲナーゼ生合成および H_2 生成をさせることを含む、[Fe Fe] - ヒドロゲナーゼの構造遺伝子（複数）および/または成熟遺伝子 *HydE*、*HydF*、および *HydG* のホモローグのいずれかを含まない宿主生物で活性 [Fe Fe] - ヒドロゲナーゼを発現させる方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

[F e F e] - ヒドロゲナーゼの構造遺伝子（複数）および／または該成熟遺伝子H y d E、H y d F、およびH y Gのホモローグのいずれかを含まない宿主生物において活性[F e F e] - ヒドロゲナーゼを発現させる方法であって、

構造ヒドロゲナーゼ遺伝子（複数）および／または成熟遺伝子H y d E、H y d FおよびH y d Gを、これらの遺伝子を含有する生物から発現プラスミドへクローニングすることと、

該プラスミドを、生来の[F e F e] - ヒドロゲナーゼを欠くか、または破壊された[F e F e] - ヒドロゲナーゼを有する生物に導入してそれを好気性培養することと、および嫌気生活に誘導して[F e F e] - ヒドロゲナーゼ生合成およびH₂産生をさせることを含む方法。
10

【請求項 2】

前記[F e F e] - ヒドロゲナーゼを含有する生物が緑藻である請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記生物が[F e F e] - ヒドロゲナーゼを含有する任意の真核生物または原核生物である請求項2記載の方法。
20

【請求項 4】

前記生物が、C. ラインハーディH y d E F およびH y d G 遺伝子のホモローグを含有する請求項3記載の方法。
20

【請求項 5】

C. ラインハーディH y d E F およびH y d G 遺伝子のホモローグを含有する前記ホモローグが、限定はされないが、T. マリティマ、T. ネアポリタナ、C. サーモセラム、C. パステリアヌム、B. セタイオタオミクロン、T. テンコンゲンシス、D. ブルガリス、C. アセトブチリカム、C. パーフリンジエンス、D. デスルフリカンス、C. ボツリヌム、C. ディフィシル、S. オネイデンシス、およびC. テタニからなる群より選択される請求項4記載の方法。
30

【請求項 6】

生来の[F e F e] - ヒドロゲナーゼを欠く前記生物がE. コリである請求項1記載の方法。
30

【請求項 7】

生来の[F e F e] - ヒドロゲナーゼを欠く前記生物が、破壊された不活性[F e F e] - ヒドロゲナーゼを含有する任意の生物である請求項1記載の方法。生来の[F e F e] - ヒドロゲナーゼを欠く前記生物が、[N i F e] - ヒドロゲナーゼを含有する任意の生物である請求項1記載の方法。
40

【請求項 9】

嫌気生活に誘導することが、暗中で中性ガスをバージすることによるか、還元剤を添加することによる請求項1記載の方法。

【請求項 10】

前記中性ガスはアルゴンである請求項9記載の方法。
40

【請求項 11】

嫌気生活に誘導することが、硫黄欠乏培養物を露光させることによる請求項1記載の方法。
50

【請求項 12】

前記H y d E、H y d F およびH y d G 遺伝子が、C. アセトブチリカムから選択され、かつ前記ヒドロゲナーゼ構造遺伝子、H y d E、H y d F およびH y d G 遺伝子が発現することになる前記宿主生物がE. コリである請求項5記載の方法。

【請求項 13】

前記C. ラインハーディH y d E、H y d F、H y d Gのホモローグおよび前記ヒドロゲナーゼ構造遺伝子（複数）を同時発現するE. コリ。
50

【請求項 1 4】

前記生来のヒドロゲナーゼ（[FeFe] または [NiFe] のいずれか）遺伝子（複数）が破壊され、HydE、HydF、HydG および [FeFe] - ヒドロゲナーゼ構造遺伝子を同時発現し、かつ活性 [FeFe] - ヒドロゲナーゼを合成する宿主生物。

【請求項 1 5】

前記生物が限定されないが、E. coli である請求項 1 4 記載の宿主生物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、2005年2月28日出願の仮出願第60/656,957号の利益を主張する。 10

【0002】**[本発明の契約上の起源]**

米国政府は、米国エネルギー省とミッドウェスト リサーチ インスティチュート (Midwest Research Institute) との間の契約番号第 DE-AC36-99GO10337号に従って、本発明の権利を有する。

【0003】**【技術分野】**

本発明は、適切な生物由来の遺伝子の[FeFe] - ヒドロゲナーゼアセンブリを用いて、任意の適切な宿主において発現する、任意の活性 [FeFe] - ヒドロゲナーゼの発現および過剰発現を提供するための遺伝子の使用に関する。 20

【背景技術】**【0004】**

水素を無公害性燃料として用いることで、化石燃料の利用に伴う環境的および政治的懸念が軽減される可能性は非常に高い。

【0005】

最も効率的なH₂産生触媒の中で、光合成緑藻のクラミドモナス・ラインハーディ (Chlamydomonas reinhardtii) などの多くの微生物に見られる [FeFe] - ヒドロゲナーゼ酵素が既知である。水から水素を生成させるために、緑藻類としても知られるクラミドモナス・ラインハーディを用いることは、60年以上も前から認識されていた。水素を生成する反応は、短期間の嫌気生活に曝すと細胞に誘導される酵素である可逆性ヒドロゲナーゼにより触媒される。この酵素の活性は、光が当たると、光合成で発生したO₂により可逆性ヒドロゲナーゼが直ちに不活性化してしまうため、速やかに失われてしまう。 30

【0006】

Ghirardiらは、「水素の光生成用生物学的システム (Biological Systems For Hydrogen Photoproduction)」(FY 2004 Progress Report)において、O₂耐性を高めて好気性H₂生成系で機能するようにした藻類ヒドロゲナーゼ変異体を生み出す方法を開示しているが、これは藻類の生成システムを用いるH₂光生成にさらに最適化される。これは、酵素の触媒部位にO₂が到達するための経路が閉鎖されることによりO₂耐性が高まった [FeFe] - ヒドロゲナーゼ発現組換え藻を生み出す。 40

【0007】

T.Happeらは、「緑藻クラミドモナス・ラインハーディにおける嫌気性適応中のFeヒドロゲナーゼの差異調節 (Differential Regulation Of The Fe-Hydrogenase During Anaerobic Adaptation In The Green Alga Chlamydomonas reinhardtii)」(Eur. J. Biochem. 269, 1022-1032 (2002))において、抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション (suppression subtractive hybridization) (SSH) 法の使用を開示しており、その中で嫌気生活下での遺伝子の差次の発現が分析された。細菌Fe - ヒドロゲナーゼの遺伝子と類似性を有するPCRフラグメントが単離され、C. reinhardtii の嫌気性cDNA発現ライブラリーをスクリーニングするのに用いられた。HydAのcDNA配列は、見掛けの分子量が53.1kDaのタンパク質をコードする1494-bpのORFを含有す 50

る。ヒドロゲナーゼ遺伝子の転写は、細胞の嫌気性適応中に非常に速やかに誘導される。推定アミノ酸配列は、単離された生来のタンパク質の配列分析により決定された2つのポリペプチド配列に対応する。Fe-ヒドロゲナーゼは56アミノ酸の短い輸送ペプチドを含有し、これがヒドロゲナーゼから葉緑体ストロマへの経路である。単離されたタンパク質はFe-ヒドロゲナーゼのクラスに属する。4個のシステイン残基と他のアミノ酸12個は全て、Fe-ヒドロゲナーゼの活性部位(H-クラスター)に完全に保存され、同定されている。C.ラインハーディのタンパク質のN末端は、他の非藻類Fe-ヒドロゲナーゼと比較して明らかに切断されている。しかも、他のFe-ヒドロゲナーゼでは付加的なFe-S-クラスターに配位するシステインが保存されているが、それが失われている。天然の電子供与体であるフェレドキシンP_{et}Fは、C.ラインハーディ由来のヒドロゲナーゼを光合成電子伝達鎖に繋げる。ヒドロゲナーゼは、還元当量から電子を酵素に伝達することにより、嫌気性条件下で緑藻類が生存することを可能にする。

10

【0008】

緑藻、クラミドモナス・ラインハーディ由来の第二の[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子の単離および同定、ここで505アミノ酸からなるタンパク質をコードするHydA2遺伝子はC.ラインハーディ由来の既知のHydA1ヒドロゲナーゼと74%類似であり68%同一である。HydA2は、Forestierらによって「嫌気性条件下でのクラミドモナス・ラインハーディの2つの[Fe]-ヒドロゲナーゼの発現(Expression Of Two [Fe]-Hydrogenase In Chlamydomonas reinhardtii Under Anaerobic Conditions)」、Eur. J. Biochem. 270, 2750-2758 (2003)で開示した[FeFe]-ヒドロゲナーゼのファミリーの触媒核に見いだされる保存された残基およびモチーフを全て含む。HydA1転写物およびHydA2転写物の両方が、嫌気性誘導の際発現し、中性ガスバージまたは培地の硫黄欠乏のいずれかにより完成(achieve)されることが実証されている。さらに、両転写物の発現レベルは、嫌気生活の長さ、O₂の再添加、酢酸エステルの存在、および/または成長中の硫酸塩などの栄養素の欠如などのインキュベーション条件により調節される。HydA2に特異的な抗体が、嫌気性誘導したC.ラインハーディ細胞からの抽出物中の約49kDaのタンパク質を認識し、このことはHydA2が発現したタンパク質をコードすることを強く示唆している。HydA2ヒドロゲナーゼの相同性に基づく3Dモデリングは、その触媒部位が、H₂ガスチャンネルも含めてクロストリジウム・パステリアヌム(Clostridium pasteurianum)CpIの既知構造とよく似ていることを示す。HydA1、HydA2とCpIとの主な違いは、N末端Fe-S中心がないこと、および藻類酵素には余分な配列が存在することである。

20

【0009】

「エンタモエバ・ヒストリティカおよびジアルジア・ランブリアの鉄依存性ヒドロゲナーゼ：組換えエンタモエバ酵素の活性および水平遺伝子伝達の証拠(Iron-Dependent Hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardialamblia*:Activity of the Recombinant Entamoebic Enzyme and Evidence for Lateral Gene Transfer)」、Biol. Bull. 204: 1-9. (2003年2月)には、エンタモエバ・ヒストリティカおよびスピロヌクレウス・バルカヌス(Spironucleus barkhanus)は短い鉄依存性ヒドロゲナーゼ(Fe-ヒドロゲナーゼ)をコードする遺伝子を有するが、これらの原生生物はヒドロゲノソームが欠けていることが開示されている。E.ヒストリティカの組換え短Fe-ヒドロゲナーゼを調製し、その活性をインビトロで測定する。短Fe-ヒドロゲナーゼをコードするジアルジア・ランブリア遺伝子をショットガンゲノム(shotgun genomic)配列から同定すると、RT-PCRにより培養したエンタモエバおよびジアルジアがmRNAで短Feヒドロゲナーゼを転写することが示された。長Fe-ヒドロゲナーゼをコードするE.ヒストリティカの第二の遺伝子をショットガンゲノム配列から同定した。系統発生学的分析は、エンタモエバとディプロモナス類の短Fe-ヒドロゲナーゼ遺伝子は祖先を共有するのに対して、エンタモエバの長Fe-ヒドロゲナーゼ遺伝子は細菌から外部(laterally)伝達されたようであることを示した。これらの結果は、こうした原生生物の発酵酵素をコードする遺伝子の起源についての競合する意見の脈絡において議論される。

30

40

50

【0010】

米国特許出願公開第2004/02009256号明細書は、水素を産生させるために微生物を操作する方法および組成物を開示する。本発明の方法の中には、ヒドロゲナーゼ遺伝子の記録と続いて記録された遺伝子をアニーリングに基づく組換え法にかけることを含むものがある。本発明はさらに、異なるゲノム配列を含む他の生物で再コード化し組み換えられたヒドロゲナーゼ遺伝子で形質転換された生物を交配する方法を提供する。

【0011】

多数の微生物（C. ラインハーディを含む）で見いだされる [F e F e] - ヒドロゲナーゼ酵素のH₂産生触媒の分野では、C. ラインハーディ遺伝子の同時発現なしに藻類 [F e F e] ヒドロゲナーゼ構造遺伝子が発現すると不活性 [F e F e] - ヒドロゲナーゼの蓄積がもたらされるという事実があるため、活性藻類 [F e F e] - ヒドロゲナーゼ酵素の形成に必要な遺伝子を同定する必要がある。

10

【0012】

その上さらに、[F e F e] - ヒドロゲナーゼ酵素のH₂産生触媒の分野では、E. コリにおけるC. ラインハーディ遺伝子と藻類 [F e F e] - ヒドロゲナーゼ構造遺伝子との同時発現により生来の [F e F e] - ヒドロゲナーゼを欠くこの細菌で活性 [F e F e] - ヒドロゲナーゼの合成をもたらす必要がある。

【0013】

[F e F e] - ヒドロゲナーゼ酵素のH₂産生触媒の分野では、安定な組換えE. コリ系で活性 [F e F e] - ヒドロゲナーゼを過剰発現させる方法を実証および提供すること、および、C. アセトブチリカムのHydE、HydFおよびHydGタンパク質を用いてHクラスターをC. ラインハーディ [F e] - ヒドロゲナーゼにアセンブリおよび挿入して非同種 [F e F e] - ヒドロゲナーゼの活性化を達成することというさらに別の必要があり、これはC. アセトブチリカムの [F e F e] ヒドロゲナーゼアセンブリ遺伝子、C. アセトブチリカムもしくはC. ラインハーディの構造遺伝子、または発現宿主としてのE. コリの使用に限らず、任意の適した生物由来の [F e F e] - ヒドロゲナーゼアセンブリ遺伝子を用いて、任意の適した宿主で発現する、任意の [F e F e] - ヒドロゲナーゼの発現を達成することである。

20

【発明の開示】

【0014】

30

本発明の1つの目的は、C. ラインハーディ遺伝子を同時発現しない藻類 [F e F e] - ヒドロゲナーゼ構造遺伝子の発現が、不活性 [F e F e] - ヒドロゲナーゼの蓄積をもたらすことを考えれば、活性藻類 [F e F e] - ヒドロゲナーゼ酵素の形成に必須である遺伝子を同定することである。

【0015】

本発明の別の目的は、C. ラインハーディ遺伝子と藻類 [F e F e] - ヒドロゲナーゼ構造遺伝子の同時発現を利用してC. ラインハーディで活性藻類 [F e F e] - ヒドロゲナーゼをアセンブリすることができる方法を提供することである。

【0016】

40

本発明のさらなる目的は、E. コリでC. ラインハーディ遺伝子と藻類 [F e F e] - ヒドロゲナーゼ構造遺伝子を同時発現させて生来の [F e] - ヒドロゲナーゼを欠くこの細菌で活性 [F e F e] - ヒドロゲナーゼを合成されることである。

【0017】

50

本発明のさらに別の目的は、安定な組換えE. コリ系で活性 [F e F e] ヒドロゲナーゼを過剰発現させ、またC. アセトブチリカムのHydE、HydFおよびHydGタンパク質を用いてHクラスターをC. ラインハーディ [F e F e] - ヒドロゲナーゼにアセンブリし、および挿入して非同種 [F e F e] - ヒドロゲナーゼの活性化を達成する方法を実証かつ提供することであり、これはC. アセトブチリカム由来の [F e F e] - ヒドロゲナーゼアセンブリ遺伝子、C. アセトブチリカムもしくはC. ラインハーディ由来の構造遺伝子、または発現宿主としてのE. コリの使用に限らず、適した任意の生物由来の

[FeFe] - ヒドロゲナーゼアセンブリ遺伝子を用いて、適した任意の宿主で発現する、任意の[FeFe] - ヒドロゲナーゼの発現を達成することもある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

実験手順 株

C. ラインハーディ株CC425 (cw15, sr-u-60, arg7-8, mt+)を、Anastasios Melis教授(カリフォルニア大学、バークレー、CA)により提供されたpJD67プラスミド(Davies, J. P.ら、[1999] Plant Cell 11, 1179-1190)で形質転換することにより、挿入変異ライブラリーを作製した。

【0019】

水素および酸素アッセイ

トリス - アセテート - ホスフェート(TAP)塞天板上で増殖するコロニーを用いて化学クロミック(chemochromic)スクリーニングを行った。ヒドロゲナーゼ活性を暗中で嫌気性誘導し、翌日H₂の光生成を観察した。液体培養物での光合成、呼吸、およびH₂の光生成率を求めた(M. Forestierら、[2003] Eur. J. Biochem. 270, 2750-2758)。

【0020】

バリアン(Varian)3700型ガスクロマトグラフ(GC)を用いて、嫌気性に密閉した培養物のヘッドスペースの水素をアッセイした。ヒドロゲナーゼ活性のメチルビオロゲン(MV)アッセイのため、細胞を取り除いて、密閉した嫌気性バイアル中、等量の嫌気性2×MV溶液(100mMのMV(酸化)、50mMのトリス、pH8.0、および0.2%のTriton X-100)を添加した。脱気した亜ジチオン酸ナトリウムを、最終濃度が4mMとなるように添加して、還元されたMVからH₂生成を開始させた。

【0021】

細胞懸濁液の嫌気性誘導

C. ラインハーディ培養物を、TAP培地で、クロロフィル合計が約20μg/mlになるまで増殖させ、2500gで5分間遠心分離し、50mMのリン酸カルシウム(pH7.0)および3mMのMgCl₂を含む誘導緩衝液(AIB)に10分の1の体積で再懸濁させた[27]。試料を、遮光用アルミホイルを巻いてゴムのセプタムで栓をしたバイアルに入れ、アルゴンを15分間フラッシュし、そして室温で暗中嫌気下インキュベートした。

【0022】

サザンプロット分析およびノーザンプロット分析

標準的な方法でサザンプロット実験を行った。DNeasy Plantミニキット(キアゲン(Qiagen))を用いて、ゲノムDNAを抽出して精製した。既に記載したように、各サンプルについて10μgの総RNAを用いてノーザンプロット分析を行った。⁻³²dCTP(I CN)およびredi prime II DNAランダムプライム標識化システム(アマシャム・ファルマシア・バイオテック(Amersham Pharmacia Biotech))を用いてプローブを標識した。

【0023】

ウェスタンプロット分析

嫌気性誘導の4時間後、嫌気性条件下で細胞を溶解した。好気性対照試料を、AIBに再懸濁後直ちに溶解した。細胞を溶解緩衝液(50mMのトリス、pH8.5、および0.25%のTriton X-100)中で30分間穏やかに振動して破壊し、細胞抽出物を10分間10,000gで遠心分離した。厳密な嫌気性条件下、ヒドロゲナーゼ活性を有する溶解性上澄をQセファロースファストフローカラム(ファルマシア(Pharmacia))にかけることで、嫌気性誘導した細胞および嫌気性誘導していない細胞からヒドロゲナーゼタンパク質を部分的に精製した。カラムを、カラム2つ分の体積の洗浄緩衝液(50mMのトリス、pH8.5、100mMのKCl)で1度洗浄して、カラム2つ分の体積の溶出緩衝液(50mMのトリス、pH8.5、250mMのKCl)で溶出させた。部分精製したフラクションでは、嫌気性誘導したWT培養物の粗溶解物で検出されたヒドロ

10

20

30

40

50

ゲナーゼ活性の約 8.5 %を取り戻した。Amicon タンパク質濃縮セルと YM10 膜を用いてタンパク質試料を濃縮した。標準的な SDS-PAGE 方法で等量のタンパク質 (A₂₈₀) をロードして分離した。Bio Rad Mini-Protean III 電気泳動およびプロッティング装置を用いて、ウェスタンプロッティングを行った。一次ヒドロゲナーゼ抗体は、HydA1 および HydA2 タンパク質の両方に共通する配列を含む合成ペプチド (DKAKRQAAALYNL) に由来し、市場用にウサギにおいて産生されたものである (シグマ ジェノシス (Sigma GenoSys))。二次抗体はアルカリホスファターゼコンジュゲートとして市販されており (バイオラッド (Bio Rad))、ヒドロゲナーゼ検出に標準的な化学クロミック検出技術を利用した。

【0024】

10

遺伝子同定

ゲノム歩行法で pJD67 の挿入部位に隣接する DNA 領域を決定した。ユニバーサルゲノム歩行キットおよびアドバンテージ - GC ゲノミック PCR ミックス (共にクローンテック) に概要される PCR 法に従って、挿入部位の下流の DNA を増幅した。HydE F および HydG タンパク質の両方について、両遺伝子に対応する cDNA を配列決定することによりコード配列を求めた。cDNA 構築物は、かずさ DNA 研究所 (Kazusa DNA Research Institute, (<http://www.kazusa.or.jp/>)) から入手した。全ての DNA 生成物は、カリフォルニア大学 (Davis) により配列決定された。

【0025】

20

相補性

HydE F および HydG 遺伝子を含む BAC クローンをクレムソン大学遺伝子センター (Clemson University Genetics center) から入手した。BAC クローンの KpnI 消化によりゲノム HydE F 遺伝子を得て、プロモーター配列および末端配列とともに全長 HydE F 遺伝子を含むインサートを、pSP124S (Saul Purton, University College, ロンドンより) の KpnI 部位にクローニングした。得られたプラスミド、pMP101 は、HydE F 遺伝子および嫌気性選別に用いられる Blle' 遺伝子を含んでいる。pMP101 プラスミドを SwaI で消化して直線化して Kindle のガラスピーズ法 (K. L. Kindle [1990] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1228-1232) を用いて hydE F - 1 変異体に転換した。細胞のみまたは 1 μg の pSP124S (V. Lumbrerasら、[1998] Plant j., 441-448) を用いた対照も使用した。

30

【0026】

異種発現および精製

HydFF および HydG cDNA 構築物を、T7 プロモーターにより駆動される E. coli 発現プラスミドにクローニングして、活性 C. ラインハーディ HydA1 の発現を達成した。2つの遺伝子を pACYC-Duet 発現プラスミド (ノバゲン (Novagen)) にクローニングした。HydE F または HydG 遺伝子のみを含む別の対照プラスミドもまた、pACYC プラスミドにクローニングした。C. ラインハーディ HydA1 遺伝子を pETBlue-1 にクローニングし、HydA1 のアフィニティ精製用に Strep-Tactin アフィニティタグ (Strep-Tag II) をその C 末端に付加した。プラスミドを E. coli B1-21 (DE3) 細胞 (ノバゲン) に同時形質転換した。適したプラスミドの存在を、限定解析および配列決定により確認した。タグ付き HydA1 の発現および精製を以下のように行った：形質転換 BL21 (DE3) の一晩培養物からの種菌を、適した抗生物質含有 LB プロス中で増殖させた。OD₆₀₀ が 0.5 ~ 0.7 に達するまで細胞を増殖させて、イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (IPTG) (ノバゲン) を 1.0 mM まで加えた。1 時間の好気性誘導後、培養物をアルゴンでバージして 5 時間嫌気性とした。細胞を収穫して、氷上で超音波処理により破壊した。HydA1-Strep Tag II を、Strep-Tactin セファロース (IBA) を用いて精製して、MV を用いてヒドロゲナーゼ活性についてアッセイした。

40

【0027】

C. アセトブチリカム HydA、HydE、HydF および HydG の発現クローニング

50

P C R 増幅により、精製ゲノムD N A (株 A T C C 8 2 4) から C . アセトブチリカム H y d 遺伝子を単離した。遺伝子特異的プライマーは、 H y d A の既知配列 (G e n b a n k 受入番号第 A A B 0 3 7 2 3 号) (1 9 、 2 0) 、ならびに H y d E (G e n b a n k 受入番号第 C A C 1 6 3 1) 、 H y d F (G e n b a n k 受入番号第 C A C 1 6 5 1) 、 H y d G (G e n b a n k 受入番号第 C A C 1 3 5 6) および H y d B (G e n b a n k 受入番号第 C A C 3 2 3 0) の配列 (C . ラインハーディ H y d E F 、 H y d G および H y d A 2 ペプチド配列を用いて N C B I で C . アセトブチリカムゲノムの t B L A S T n 相同性サーチにより同定された) 、に基づくものであった。各 H y d 遺伝子 (I D T テクノロジーズ) の末端が一致するように、また、発現クローニングに適した制限部位を含むように、遺伝子特異的プライマーを設計した。約 2 0 μ g のゲノムD N A を B a m H I で一晩消化して、 2 0 0 n g を K O D ポリメラーゼ (ノバゲン) で行う P C R 増幅反応用テンプレートとして用いた。 P C R フラグメントをゲル精製し、制限酵素で一晩消化し、そしてプラスミド p C D F D u e t - 1 (ノバゲン) (H y d F および H y d G) の二重マルチクローニング部位 (M C S) にサブクローニングして p C a F G を形成するか、 p E T D u e t - 1 (ノバゲン) (H y d A または H y d B および H y d E) で p C a A E および 8 p C a B E を形成するかのいずれかを行った。 P C R 増幅の間に S t r e p I I - タグ配列 W S H P Q F E K を [F e F e] - ヒドロゲナーゼ構造遺伝子、 H y d A および H y d B の C 末端に付加した。各遺伝子の配列および読み枠を D N A 配列決定により確認した (Davis Sequencing, LLC) 。

【 0 0 2 8 】

他の [F e F e] - ヒドロゲナーゼ遺伝子の発現クローニング

C . ラインハーディおよびクロストリジウム・パステリアヌム由来の [F e F e] - ヒドロゲナーゼ構造遺伝子を、以下のように精製ゲノムD N A からクローニングした。 C . パステリアヌム H y d A をクローニングするのに、 A T C C 株 6 0 1 3 を強化クロストリジウム培地上嫌気性で培養して、ゲノムD N A を Q i a g e n D N A e a s y T i s s u e K i t (キアゲン) で精製した。精製D N A (5 0 0 n g) を B a m H I で一晩消化し、インフレームクローニング用に 5 ' - N c o I および 3 ' - B a m H I 部位を含む H y d A 特異的オリゴヌクレオチドでの P C R 反応に 1 0 0 n g を用いた。遺伝子フラグメントをゲル精製し、 N c o I および B a m H I で消化し、 p C a E 2 の M C S 1 にクローニングして p C p I E を作った。

【 0 0 2 9 】

上記に記載されるように、 C . ラインハーディ H y d A 1 および H y d A 2 の c D N A のクローンを、 5 ' - および 3 ' - 末端制限部位とともに設計されたオリゴヌクレオチドでの P C R 増幅用のテンプレートとして用いた。 S t r e p I I タグ配列 W S H P Q F E K を、 H y d A 1 の 5 ' - 端オリゴヌクレオチドに、および H y d A 2 の 3 ' - 端オリゴヌクレオチドに付加した。遺伝子フラグメントをゲル電気泳動により単離し、消化し、そして p C a E 1 の M C S 部位 2 (M C S 部位 1 で H y d E を有する p E T D u e t - 1) にサブクローニングして p E C r 1 (H y d A 1) 、および p E C r 2 (H y d A 2) を形成した。読み枠および遺伝子配列を、 D N A 配列決定により確認した。

【 0 0 3 0 】

E . コリにおける [F e F e] - ヒドロゲナーゼ発現

構築物の発現試験のため、 T 7 調節された H y d 遺伝子の完全セットを抱えているプラスミドを、 A p , (p E T D u e t - 1 クローン) および S m , (p C D F D u e t クローン) を同時選択するとともに、 E . コリ株 B L 2 1 (D E 3) (ノバゲン) に同時形質転換した。形質転換細胞を、抗生物質を加えた L B 培地 (シグマ) で一晩増殖させ、翌日、抗生物質および 1 0 0 μ M の F e クエン酸を補充した新鮮な L B 培地 1 1 5 m l 中にサブクローニング (1 : 5 0 希釈) した。ロータリーシェーカー上 2 5 0 r p m で、培養物を O D ₆₀₀ が 0 . 5 ~ 0 . 7 になるまで、嫌気性、 3 7 ° で増殖させた。イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) (ノバゲン) を最終濃度 1 . 5 m M で添加して、培養物を室温で約 1 0 0 r p m で震盪して嫌気性誘導前の H y d 発現のプレインキュ

10

20

30

40

50

ベーションとした。1時間後、培養物を120mlの血清バイアルに移し、ゴムのセプタムで栓をして、室温で3~5時間アルゴンでバージして嫌気性条件と[FeFe]-ヒドログナーゼの誘導を達成した。アフィニティ精製用の[FeFe]-ヒドログナーゼの発現を最小培地で行った。0.5%のグルコース、0.4%のカゼイン加水分解物、100MのFeクエン酸、300g/mlのアンピシリン、および50g/mlのストレプトマイシンを補充した5mlのM63中、形質転換細胞を一晩培養した。一晩増殖した培養物を、25mlの新鮮な培地に1:50で希釈し、OD₆₀₀が0.5に達するまで37で増殖させ、そして1LのM63(Feクエン酸を含まず)に播種するのに用いた。1L培養物をOD₆₀₀が0.5になるまで37で増殖させた。Feクエン酸の1M溶液を、最終濃度100μMで添加して、培養物をさらに10分間37でインキュベートした。IPTG(1.5mM)を添加して、培養物を、室温で1時間、100rpmで震盪した。最初の誘導期に続いて、培養物を密閉した1Lフラスコに移し、室温で一晩、アルゴンでスパージャして[FeFe]-ヒドログナーゼの生合成を誘導した。

10

20

30

40

50

【0031】

組換えStrepIIタグ付き[FeFe]-ヒドログナーゼの精製

精製工程は嫌気性条件下で行った。StrepIIタグ付き[FeFe]-ヒドログナーゼを発現する細胞を、6000×gで10分間遠心分離して集めた。細胞ペレットを、破壊緩衝液(BB)(150mMのトリス-HCl、pH8.0、100mMのNaCl、1mMのDTT、1mMの亜ジチオニ酸Na、100μMのPMSF、5%のグリセロール)に再懸濁させ、フレンチプレスで破壊した。ビオチンとビオチン化タンパク質の結合をロックするために、アビジンを3nMで添加した。破壊された細胞懸濁液を19,000×gで30分間遠心分離して細胞デブリをペレットにした。清澄な粗抽出物を、あらかじめ緩衝液BBで平衡化したストレプタクチン-セファロース(IBA)アフィニティカラムに通した。カラム3~5本分の容積の氷冷BBでカラムを洗浄し、StrepIIタグ付きヒドログナーゼを2.5mMのデスチオビオチン含有BBで溶出させた。

【0032】

異種発現したタンパク質のSDS-PAGEおよびウェスタンプロット

SDS-PAGEのため、タンパク質試料を1×SDS-PAGEロード緩衝液(ノバゲン)に希釈して、10分間煮沸し、氷上で冷却した。試料を12%SDSゲル上にロードして、45mAで2時間走らせた。電気泳動に続いて、タンパク質をPVDF膜にプロッティングして、ストレプタクチン-アルカリホスファターゼ複合体検出キット(IBA)を用いて検出した。

30

40

50

【0033】

[FeFe]-ヒドログナーゼ活性アッセイ

精製した[FeFe]-ヒドログナーゼまたは全細胞抽出物の活性を、還元メチルビオロゲン(MV)から生成するH₂ガスとしてルーチンで測定した。嫌気下で調製した、2×全細胞反応緩衝液(50mMのリン酸カリウム、pH7; 10mMのメチルビオロゲン; 20mMの亜ジチオニ酸ナトリウム; 6mMのNaOH; 0.2% Triton X-100)1mlおよび1mlの細胞を入れてアルゴンフラッシュした13.5mlの密閉血清バイアルで、全細胞の活性アッセイを行った。精製した酵素のアッセイは、1mlの嫌気下で調製した、2×酵素反応緩衝液(50mMのリン酸カリウム、pH7; 10mMのメチルビオロゲン; 20mMの亜ジチオニ酸ナトリウム; 6mMのNaOH)を入れてアルゴンフラッシュしたバイアル中、アリコート(25~50l)を1mlの嫌気下で調製したBB緩衝液で希釈して行った。全ての反応は37°Cでインキュベートした。インキュベーション後、400lのヘッドスペースガスを気密シリングで取り出してガスクロマトグラフィー(ヒューレットパッカー(Hewlett Packard)、5820)でH₂レベルを測定した。

【0034】

結果

変異体特性決定

C. ラインハーディでは、2つの[F e F e] - ヒドロゲナーゼ酵素、HydA1およびHydA2が既知である。これらの酵素の発現および活性に必要な遺伝子を同定する目的で、本発明者らは、化学クロミックH₂センサー⁴を用いて、必要な嫌気性誘導に続いてH₂を光生成できないクローンについて、ランダム変異導入ライブラリーをスクリーニングした。Arg7遺伝子をアルギニン栄養要求性であるC. ラインハーディ株CC425に形質転換して、変異体を作製した。Arg7遺伝子はランダムにC. ラインハーディゲノムに組み込まれて野生型(WT)ゲノムDNAの小セクションを分裂させる。図1Aに示されるとおり、変異体hydEF-1は検出可能な量のH₂を産生できることにより同定される。同一ライブラリー由来の他の5つのコロニーについて観測された暗青色スポットは、WTのH₂産生能力を示している。

10

【0035】

変異体hydEF-1を、CO₂を唯一の炭素源として用いて最小培地の塞天板上で増殖させ、それにより細胞が光合成コンピテントであることを実証した。さらに、親株およびhydEF-1株両方の光合成および呼吸率を、Clark型電極を用いて液体培地で測定した(図1B)。WTと比較して、hydEF-1変異体は通常の呼吸率および光合成O₂放出率を示した。このことは、hydEF-1がH₂光生成活性を欠いていることは、二次代謝や光合成電子輸送欠陥の結果ではなく、むしろヒドロゲナーゼ酵素に特異的であることを実証している。

【0036】

暗中で不活性ガス(または外因性還元剤)を用いて密閉した培養物からO₂をバージすることによるか、または明中で密閉した培養物から硫黄を奪う(これにより光合成O₂放出の速度を減弱する)ことによるかのいずれかにより達成された嫌気生活でC. ラインハーディのヒドロゲナーゼ活性を誘導する。暗中嫌気性誘導に続く水素産生を、複数の技法を用いて、WTおよびhydEF-1変異体培養物でモニタリングした:(1)H₂光生成の初期速度(図1C)をClark型電極を用いてアッセイし、(2)還元されたMVが介するヒドロゲナーゼ活性をGCで検出し、そして(3)発酵性H₂産生をGC分析でアッセイした。WT培養物とは対照的に、これらのアッセイのいずれでもhydEF-1変異体培養物からH₂生成は検出されなかた。その上、硫黄剥奪条件下、明中嫌気性誘導したhydEF-1変異体培養物は、どのような検出可能なH₂も生成できなかつた。1リットルのCC425WT培養物は、初期条件下で数日間にわたり、一貫して少なくとも70mlのH₂を生成した。従って、本発明者らは、hydEF-1変異体が、本研究の誘導およびアッセイ条件の全てにおいて、活性[F e]ヒドロゲナーゼを合成することができないと結論づけた。

20

【0037】

HydEF遺伝子およびHydG遺伝子の同定

hydEF-1変異体の実際の表現型の原因である遺伝子変異を決定するために、本発明者らは、ゲノム歩行戦略を用いて、変異誘発するArg7インサートに隣接するゲノムDNAをクローニングして配列決定した。隣接WT配列を、配列決定されたC. ラインハーディゲノムと比較して、Arg7挿入により破壊された遺伝子を求めた。hydEF-1で欠失された遺伝子、HydEFと示すが、これは2つの独特なドメインを有するタンパク質をコードすることが示された。HydEFタンパク質のN末端部分は、今まで[F e F e] - ヒドロゲナーゼを含有する原核生物でしか見つかってなくかつラジカルSAMタンパク質スーパーファミリーのこれまで特性決定されてないサブセットに所属する、タンパク質の特異的グループと相同である(H. J. Sofiaら、[2001] Nucleic Acids Res. 1097-1106)。HydEFタンパク質のC-末端部分は、予測されるGTPアーゼ活性を有するドメインを含む。このドメインは、原核生物タンパク質の第二の特異的グループ(これらもまた[F e F e] - ヒドロゲナーゼを含有する生物に独特である)と相同である。C. ラインハーディで破壊されたHydEF遺伝子に直接隣接するのは、第二の遺伝子、HydGであり、これは、同じプロモーター領域からの分岐発現を思わせる順序で配置されている。BLASTサーチにより、HydGと相同なタンパク質が独特なタンパク質の

30

40

50

第三のセット（これもラジカルSAMタンパク質スーパーファミリーに属する）を含むことが明らかになった。HydEおよびHydFでそうであるように、HydGホモローグは[FeFe]-ヒドロゲナーゼを有する原核生物でのみ見つかる。C.ラインハーディのHydEFおよびHydGに相当するcDNAを入手して配列決定し、2つの遺伝子のタンパク質コード配列を確認した。C.ラインハーディ遺伝子のゲノム構成の概要およびHydEF破壊部位を図2Aに示す。

【0038】

明らかに、バクテロイデス・セタイオタオミクロン、デスルホビブリオ・ブルガリス、デスルホビブリオ・デスルフリカンス、およびシュワネラ・オネイデンシスのゲノムでは、HydE、HydFおよびHydG遺伝子は[FeFe]-ヒドロゲナーゼ構造遺伝子とともに推定オペロンを形成する（図3）。しかしながら、HydE、HydFおよびHydGの機能は、今までのところ割り当てられていない。以下に記載されるように、本発明者らのデータは、これらのタンパク質が活性[FeFe]-ヒドロゲナーゼのアセンブリに必要であることを示唆し、従って、本発明者らは提案されているヒドロゲナーゼ命名法（P. M. Vignaisら、[2001] FEMS Microbiol. Rev. 25, 455-501）に従って、C.ラインハーディ遺伝子、HydEFおよびHydGを命名した。C.ラインハーディでは、HydEF遺伝子は、原核生物で観測される2つの異なる遺伝子に相当するように2つの文字EとFが割り当てられる。図3では、C.ラインハーディHydEFおよびHydGタンパク質ホモローグを[FeFe]-ヒドロゲナーゼを含む原核生物と比較している。この図は、これらの生物内での推定[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子と関連づけてHydE、HydFおよびHydGの読み取り枠の組織も示す。先に記載された生物で観測される、提案されている[FeFe]-ヒドロゲナーゼアセンブリ遺伝子は、[Fe]-ヒドロゲナーゼ構造遺伝子とともに推定オペロンで見いだされるものの、図3に示される生物の大半で提案されるアセンブリタンパク質は、構造遺伝子とは離れて見いだされる。

10

20

30

40

【0039】

HydEF遺伝子の相補性

C.ラインハーディhydEF-1変異体で観測されるH₂生成の欠如をHydEFの破壊と結びつけるため、本発明者らは遺伝子相補性を利用した。WT HydEF遺伝子を含むゲノムDNAを、C.ラインハーディゲノムDNAのライブラリーで見いだされるシングルBACクローンから得た。HydEF遺伝子を含有するBACプラスミドを、適切な制限酵素で消化して、全長HydEFゲノム遺伝子およびその推定プロモーターのみを含むと予測されるフラグメントを作成した。このインサートを、プラスミドSP124S（これは抗生物質ゼオシンに対する抵抗性を与えるB1e遺伝子を含む）にクローニングした。図2Bに示すとおり、hydEF-1変異体をこの構築物で形質転換し、ゼオシンを含むTAP寒天板上で増殖させ、復活したH₂生成能力を有するクローンを得た。相補遺伝子の統合および変異体バックグラウンドの照合をサザンプロット法で確認した（図2C）。CC425試料は、変異体および相補されたクローンの両方に存在しないWTバンドを示す。相補されたクローンは、形質転換HydEFゲノムフラグメントの変異体ゲノムへの複数ランダム統合に相当する2つの強いバンド、ならびにHydEF遺伝子の一部のみの統合を示すと思われるかすかなバンドを示す。

30

【0040】

遺伝子発現および[FeFe]-ヒドロゲナーゼ蓄積の分析

次いで、ノーザンプロット分析を行って、（a）変異体でヒドロゲナーゼ活性の欠如が観測されたのがHydA1および/またはHydA2遺伝子転写の破壊によるものなのかどうか、および（b）HydEFおよびHydGがヒドロゲナーゼ遺伝子とともに嫌気性で同時発現するかどうかを決定した。WTおよびhydEF-1変異体の好気性培養物、ならびに暗中で0.5時間および4.0時間嫌気性誘導したWTおよびhydEF-1変異体からRNAアリコートを収集した。図4A～Dはそれぞれ、CC425親WTおよびhydEF-1変異体培養物の両方からのHydA1遺伝子、HydA2遺伝子、HydG遺伝子、およびHydEF遺伝子の発現プロファイルを比較するものである。データは

50

、WT培養物で、HydEFおよびHydGが、HydA1遺伝子およびHydA2遺伝子とともに嫌気性誘導されることを示す。同様に、HydA1、HydA2、およびHydG転写物もhydEF-1変異体で嫌気性誘導され、そして予想されるとおり、HydEF転写物はない。嫌気性誘導されたhydEF-1培養物におけるHydA1およびHydA2転写物の存在は、HydEF遺伝子の破壊がどのような有意義な様式でもヒドロゲナーゼ転写に悪影響を与えないこと、hydEF-1培養物におけるH₂生成の欠如はヒドロゲナーゼ遺伝子転写の欠陥の結果ではないことを、はっきりと示す。

【0041】

次いで、ウェスタンプロットを得て、ヒドロゲナーゼタンパク質レベルに対するHydEF遺伝子破壊の結果を求めた(図4E)。C.ラインハーディHydA1およびHydA2の両方を認識するように設計された抗体を、ヒドロゲナーゼタンパク質の存在を探索するのに用いた。予想通り、部分精製したWT試料(実験手順を参照)は、2種のヒドロゲナーゼの同時移動による、約47~48kdの電気泳動移動度を持つ1つの嫌気性誘導バンドのみを示す。C.ラインハーディの全長HydA1ヒドロゲナーゼ酵素および全長HydA2ヒドロゲナーゼ酵素はそれぞれ53.1kdおよび53.7kdの推定質量を有するものの、HydA1は葉緑体輸送ペプチド配列のN末端タンパク質分解プロセシングを受けて、葉緑体に局在する47.5kdの成熟タンパク質となる(T. Happeら、[1993] Eur. J Biochem. 214, 475-481)。HydA2タンパク質は、同様なプロセシングを受けて推定47.3kdの成熟タンパク質になると予測される(M. Forestierら、[2003] Eur. J. Biochem. 270, 2750-2758)。嫌気性誘導されたhydEF-1培養物のウェスタンプロットのデータは、検出可能な酵素活性がないにもかかわらず免疫学的に検出可能な酵素もhydEF-1変異体培養物で見いだされることを示す。hydEF-1変異体培養物のヒドロゲナーゼバンドの電気泳動移動度は、WTバンドに比べてわずかに低い方に移動し、プロセシングされていないC.ラインハーディヒドロゲナーゼの電気泳動移動度と一致する。[NiFe]-ヒドロゲナーゼの場合、タンパク質分解プロセシングはNiの挿入後に起こり、プロセシングされていない[NiFe]-酵素に比べて移動したウェスタンバンドをもたらす(N. K. Menonら、[1991] J. Bacteriol. 173, 4851-4861)(A. Jacobiら、[1992] Arch. Microbiol. 158, 444-451)。嫌気性誘導されたhydEF-1タンパク質の抽出物に移動したバンドが存在することは、完全にアセンブリされた活性部位を欠くC.ラインハーディ[Fe]ヒドロゲナーゼの場合にも生じるかもしれないことを示唆する。

【0042】

E.コリでのC.ラインハーディHydA1の異種発現

HydEFタンパク質およびHydGタンパク質が活性[Fe]-ヒドロゲナーゼの形成に必要であるという結論を支持するさらなる証拠は、生来の[FeFe]-ヒドロゲナーゼを欠く細菌であるE.コリでの活性C.ラインハーディHydA1タンパク質の異種発現により示される。HydA1タンパク質は、Strep-TagIIアフィニティー配列を含む融合タンパク質として発現し、E.コリ抽出物から精製された。図5に示すとおり、E.コリでのHydA1構築物単独の発現またはHydA1とHydEF、もしくはHydA1とHydG遺伝子の同時発現は全て、精製後機能しないHydA1タンパク質の発現をもたらした。しかしながら、嫌気性E.コリ培養物でHydEFおよびHydG両方と一緒にC.ラインハーディHydA1が同時発現すると、活性HydA1酵素が得られた(図5)。発現系が最適化されていないため、それぞれの実験で得られた活性HydA1の量は少なく、かつ大きく変化する。それでも、機能性[FeFe]-ヒドロゲナーゼは3種の遺伝子全てが発現して存在してのみ得られた。ラジカルSAMタンパク質の中には非常に少ない代謝回転数で作用し、反応物質でしかなかったり、触媒にさえならないものもあることが注目される(H. J. Sofiaら、[2001] Nucleic Acids Res. 29, 1097-1106)。

【0043】

ラジカルSAM相同性

10

20

30

40

50

HydEF および HydG タンパク質は、ラジカルSAM (AdoMet ラジカルとしても既知である) スーパーファミリーに属する。これらのタンパク質は多数の生化学反応に参加しており、反応として硫黄挿入、ラジカル形成、有機環合成、および嫌気性酸化が上げられるがこれらに限定されない。HydG タンパク質および C. ラインハーディ HydEF タンパク質の HydE ドメインの両方が、ラジカルSAM タンパク質スーパーファミリー内で典型的に見いだされるサイン Cys-X₃-Cys-X₂-Cys モチーフを含む(図6)。このモチーフは、還元条件下、酸化還元活性 [4Fe4S] クラスターに配位する。ラジカルSAM タンパク質が行う反応は、典型的には、[4Fe4S] クラスターでの S-アデノシルメチオニン (SAM) の還元的開裂、これによりメチオニンと 5'-デオキシアデノシルラジカルが生じて、フリーラジカルが発生することにより開始される。次いで、この高エネルギー有機ラジカルは、各ラジカルSAM タンパク質に独特である基質から水素原子を抽出する。

10

20

30

40

50

【0044】

Hyd クラスター アセンブリにおける HydEF および HydG の役割

ラジカルSAM タンパク質は、複雑な生分子および不安定であることが多い協調的異常 [FeS] クラスターの嫌気性合成に係わっていることが多い。これらの特性は、Hyd クラスターの独自リガンドを合成するのに、そして [FeFe] ヒドロゲナーゼ触媒クラスターをアセンブリするのに必要な化学種の種類と一致する。ラジカルSAM スーパーファミリーの最近の分類では、ビオチンシンターゼ (Biob) およびニトロゲナーゼアクセサリータンパク質 NifB をはじめとする関連性がもっとも低いタンパク質が、S 伝達に関与しているらしいことが示されている。目立つのは、NifB の代謝産物、NifB 補因子に由来する Fe および S が、最終的に、H₂ を生成し得る別の酵素であるジニトロゲナーゼの [FeMo] 補因子に組み込まれることである (R. M. Allen [1995] J. Biol. Chem. 270, 26890-26896)。従って、[Fe] - 金属酵素の触媒金属クラスターに Fe を提供するのにラジカルSAM タンパク質が関与しているという前例から、本発明者らは、[FeFe] - ヒドロゲナーゼ Hyd クラスターのアセンブリのための Fe 動員に、HydE および / または HydG タンパク質が同様な役割を果たすことを提案する。

【0045】

Hyd クラスターは、CN、CO、および推定ジ(チオメチル)アミンリガンドも必要とする。上記のアクセサリータンパク質 HydEF および / または HydG もまた Fe に配位するこれら生成物の生合成およびアセンブリの原因であると考えられる。CN および CO は生物学的に最も毒性のある化合物に含まれ、また細胞内では自由に存在していないようであるので、これらのリガンドを Hyd クラスター アセンブリ 部位で合成する必要があるだろう。[NifFe] - ヒドロゲナーゼの場合、HypE タンパク質および HypF タンパク質により、前駆体としてカルバモイルホスフェートを用いてチオカルバメートを形成して、CN および CO が合成されることを示す強力な証拠があるが、しかしながら、HypE および HypF タンパク質のホモローグは、C. ラインハーディでも、[FeFe] - ヒドロゲナーゼのみを含む他の生物でも観測されていない。このことは、CN および CO 合成の代替経路またはチオカルバメートを形成する代替手段を示唆する。ラジカルSAM タンパク質は、有機ラジカル形成、過硫化物形成、ピロキシタルホスフェート活性化、チオカルボニル形成、およびアミン移動をはじめとする化学反応を利用し、これらの全てまたはいずれか 1 つが Hyd クラスター 有機リガンドの合成に関与し得る。

【0046】

C. ラインハーディ HydEF および HydG とこれらのタンパク質分解ホモローグとの間の相同性配列比較を図6に示す。ラジカルSAM モチーフに加え、HydG タンパク質および HydF タンパク質は、金属イオンに配意する可能性を持つ他の保存配列を有する。これらには、HydF ドメインの C-末端近くの E (A/G) CXH モチーフおよび (L/V) HC (G/A) (G/A) C モチーフ、ならびに HydG タンパク質の C-末端近くの CT (A/G) CYR モチーフが含まれる。これら 3 つのモチーフは全て [FeFe] - ヒドロゲナーゼ アセンブリ タンパク質にはしっかりと保存されているが、他のラ

ジカルSAMタンパク質では存在せず、このことは、これらのモチーフが [FeFe] - ヒドロゲナーゼアクセサリータンパク質に独特であることを示唆している。いくつかの他の保存アミノ酸は HydEFタンパク質およびHydGタンパク質中で見いだされる。しかしながら、 [FeFe] - ヒドロゲナーゼのアセンブリにおけるこれらの決定因子の役割および考えられる金属結合モチーフの解明は将来の研究を待つしかないようである。 HydEFタンパク質のHydFドメインが推定GTPアーゼドメインを含み、そして、同じくGTPアーゼ活性を有するHypBタンパク質がNiの [NiFe] - ヒドロゲナーゼ活性部位への組み込みを促進することにも注目するべきである。興味深いことに、 HydEFタンパク質またはHydGタンパク質のいずれも、 T. マリティマから特性決定されたTM1420タンパク質と相同性は高くない (G. Panら、 [2003] *J Biol. Inorg. Chem.* 8, 469-474)。後者は、 8.5 kD長しかなく、特徴的なラジカルSAMモチーフを含有しない。このことは、 TM1420が、今までに特性決定された中で最も複雑な [FeFe] ヒドロゲナーゼを有する T. マリティマに独特なものである可能性を示唆する。

【0047】

クラミドモナス [FeFe] - ヒドロゲナーゼの異種発現

C. ラインハーディ HydA1 の E. コリでの異種発現は、 2種の C. ラインハーディ 遺伝子産物、 HydEF および HydG (3種の原核生物遺伝子に等しい) のみが HydA1 のアセンブリに必要であることを実証する。しかしながら、活性 [NiFe] - ヒドロゲナーゼ酵素の形成に最小限で 7つのアクセサリー遺伝子産物が必要である (L. Casalotら、 [2001] *Trends Microbiol.* 9, 228-237)。このことは、 [FeFe] - ヒドロゲナーゼが Ni を欠く (P. M. Vignaisら、 [2001] *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455-501) ことからこれらの酵素は成熟タンパク質を多くは必要としないかも知れないという推定と一致する。 [FeFe] - ヒドロゲナーゼのアセンブリに必要とされる完全に独特な成熟タンパク質の存在は、 [NiFe] - ヒドロゲナーゼと [FeFe] - ヒドロゲナーゼとの系統学的関連性がないことと一致する。

【0048】

CpI または DdH [FeFe] - ヒドロゲナーゼ酵素を E. コリで発現させる先の試みは、 H₂ガスを放出させるまたは摂取することができない不活性タンパク質の合成という結果になった (G. Voordouwら、 [1987] *Eur. J Biochem.* 162, 31-36) (Y. Asadaら、 [2000] *Biochim. Biophys. Acta.* 1490, 269-278)。対照的に、シアノバクテリア、シネココッカス (*Synechococcus*) PCC7942を、 CpI [FeFe] - ヒドロゲナーゼ構造遺伝子で形質転換させると、活性 [FeFe] - ヒドロゲナーゼを発現する株をもたらした。シネココッカス PCC7942に [FeFe] - ヒドロゲナーゼが存在するという生化学的または遺伝的証拠がないことを考えると、シネココッカス [NiFe] - ヒドロゲナーゼのアセンブリ化をつかさどるアクセサリータンパク質は、 Cpl [FeFe] - ヒドロゲナーゼ酵素も活性化するのに十分な柔軟性を持っているようである。どうしてこれがシネココッカスでは可能であり E. コリでは不可能なのかははっきりしないが、これらの結果は、異なる微生物でのヒドロゲナーゼ発現および活性化が複雑なものであることを強調する。

【0049】

C. アセトブチリカム [FeFe] - ヒドロゲナーゼ HydA の E. コリでの発現および生合成

上記のように E. コリで発現した藻類 [FeFe] - ヒドロゲナーゼを精製しても活性であるが、発現プラスミドが不安定なため形質転換体が増殖することは難しく、このことが HydA1 発現レベルの低さをもたらしている。藻類遺伝子の DNA 組成物は、全体で 64%、第三コドン部位では 90% と非常に GC 傾向している。遺伝子安定性および発現におけるコドン偏向効果に対処するため、本発明者らは、様々な嫌気性微生物の配列決定されたゲノムで、藻類の良い電子の代替物として用いるための HydEF および HydG のホモローグを探査した。 C. アセトブチリカムのゲノムは、この生物で報告された可溶性、単量体 [FeFe] - ヒドロゲナーゼ (CaHydA) の特性決定と一致して、 Hy

10

20

30

40

50

d E ホモローグ、H y d F ホモローグ、およびH y d G ホモローグを保有することがわかった。C . ラインハーディH y d E F 遺伝子(70%)およびH y d G 遺伝子(65%)のG C 含有量が高いのとは異なり、C . アセトブチリカム遺伝子はよりA T が豊富であり(G C 含有量; H y d E 、32%; H y d F 、33%; H y d G 、35%)、従ってより安定かつE . コリでよりよく発現されると期待された。C . アセトブチリカムH y d E 、H y d F およびH y d G 遺伝子をP C R 増幅して、産物をT 7 発現プラスミドのセットに[F e F e] - ヒドロゲナーゼをコードするH y d A 遺伝子と一緒にクローニングした(図7)。C . アセトブチリカム成熟遺伝子および構造遺伝子の完全セットを保有するプラスミドをI P T G 誘導発現のためE . コリ株B L 2 1 (D E 3)に転換した。E . コリでの増殖の際なんらかの再配置を受けることが観測された(未発表の結果)プラスミドコード化C . ラインハーディH y d E F 遺伝子およびH y d G 遺伝子と比較して、プラスミドコード化C . アセトブチリカムH y d E 遺伝子、H y d F 遺伝子、およびH y d G 遺伝子は、どのような配列変更も示さなかった。C . アセトブチリカム遺伝子の方が安定性が高いことで、形質転換細胞の数も増え、発現条件下での増殖速度も速くなる(データは示さず)。

10

【0050】

E . コリを発酵性糖の不在下嫌気性増殖で培養する場合、内因性[N i F e] - ヒドロゲナーゼ、H y d 1 、H y d 2 、およびH y d 3 はギ酸エステルの欠乏のため誘導されない。ギ酸エステルは、それぞれ成熟遺伝子およびH y d 3 構造遺伝子をコードするh y p オペロンおよびh y c オペロンの転写活性化に必要な発酵性代謝産物である。結果として、ギ酸エステルの欠乏下でのE . コリの嫌気性増殖は、表1に示すとおり、全細胞抽出物での[N i F e] - ヒドロゲナーゼ活性の基礎レベルとなる。表1はE . コリでC . アセトブチリカム成熟タンパク質と嫌気性同時発現した[F e F e] - ヒドロゲナーゼの活性の展開も示す。

20

【0051】

【表1】

表 I

生物	[FeFe] ヒドロゲナーゼ	全細胞抽出物 ^a (nmol H ₂ ml ⁻¹ min ⁻¹)	アフィニティー精製物 (nmol H ₂ mg ⁻¹ min ⁻¹)
E . コリ		0.35 ^b	ND ^c
C . ラインハーディ	HydA1	61	150
C . ラインハーディ	HydA2	108	116.1
C . アセトブチリカム	HydA	96	75.2
	HydAΔN	6	31.6
	HydB	13	8.6
C . パステリアヌム	HydA	150	ND
	HydAΔN	15	ND

30

a 0 . 1 % Triton X - 100 で溶解した全細胞

b [F e F e] - ヒドロゲナーゼ構造および成熟タンパク質非存在下での全細胞活性

40

c ND、不検出

【0052】

こうした増殖条件下での基礎[N i F e] - ヒドロゲナーゼ活性により、組換え発現した[F e F e] - ヒドロゲナーゼの成熟および生合成の研究ができる。表1に示すとおり、C a H y d A とともにC . アセトブチリカム成熟系を発現するE . コリ細胞を嫌気性増殖して抽出したものは、非形質転換細胞の抽出物における活性よりも倍大きい還元M V 触媒化、H₂放出活性を示した。こうしたヒドロゲナーゼ活性の上昇は、高レベルでのプラスミドコード化C . アセトブチリカム遺伝子発現およびC a H y d A [F e F e] - ヒドロゲナーゼ生合成に直接起因する。

【0053】

50

C. アセトブチリカム成熟系は、1リットル当たりmg量でのCaHydAを生成するが、本発明者らの先のC.ラインハーディ成熟系は1リットル当たりμg量でしかC.ラインハーディHydA1を生成しない。表1に示すとおり、アフィニティ精製したStep1タグ付きCaHydAによる還元MV触媒化、H₂放出の特異的活性は75μモルH₂mg⁻¹min⁻¹であり、Girbalらにより報告されたC.アセトブチリカムから精製したCaIの値(L. Gerbalら、Appl. Env Microbiol. 71, 2777-2781)より7.5倍高い。

【0054】

C.アセトブチリカム成熟系による異種[F e F e] - ヒドロゲナーゼの合成

緑藻類C.ラインハーディで見いだされる[F e F e] - ヒドロゲナーゼの生化学的性質および構造特性の研究で本発明者らは興味を引かれてC.アセトブチリカムの藻類酵素を合成する能力の試験を行った。藻類[F e F e] - ヒドロゲナーゼペプチド配列の特徴は、高度に保存されたHクラスター/触媒ドメインにとって補助的なアクセサリー鉄硫黄クラスタードメインが欠けていることである(図9)。この構造的複雑さの縮小により藻類ヒドロゲナーゼは、今まで特性決定されている中で最も簡単なものに分類される。C.ラインハーディにおいて、CrHydA1[F e F e] - ヒドロゲナーゼは細胞質から葉緑体ストローマへ転位置した結果としてN末端プロセシングを受ける。CrHydA1と同様に、CrHydA2のN末端配列も61位アミノ酸近くの推定開裂部位とともにシグナル配列特性を保有する。E.コリでの発現のため、切り詰めたHydA2を62位でN末端を作る発現プラスミドpCaEにクローニングした。これは、プロセシングされた産物と推定されるものに相当する。表1に示すとおり、CrHydA1およびCrHydA2両方の成熟型が、E.コリで活性酵素として合成された。アフィニティ精製に続くこれらのタンパク質の代表的な収率は、1リットルの培養物あたり0.8~1.0mgの範囲であった。精製CrHydA1およびCrHydA2の、還元MVからのH₂生成活性はそれぞれ、150および116μmolH₂mg⁻¹min⁻¹であった。本E.コリ発現系から精製されたCrHydA1について測定されたこの活性は、組換え体または天然源から精製したこの酵素の活性についてすでに報告されたものより5~6倍低い。嫌気性条件下、C.ラインハーディはインビオH₂産生のため還元[2Fe2S] - フェレドキシンを[F e F e] - ヒドロゲナーゼへの電子供与体として利用することが確立されている。部分精製したC.ラインハーディヒドロゲナーゼおよび還元C.ラインハーディ[2Fe2S]フェレドキシンを用いたH₂放出速度の先の測定は、10μMのK_mを示した。この研究で、精製HydA2についての還元ホウレンソウ[2Fe2S] - フェレドキシンのK_mは31μMと測定された。この値は、精製HydA1と還元ホウレンソウフェレドキシンについて先に報告された35μMという値と近く、このことはHydA2にC.ラインハーディでインビオH₂産生を触媒する能力があることを示唆している。

【0055】

まとめると、C.ラインハーディで見いだされた2種の新規遺伝子、HydEFおよびHydGは、[F e] - ヒドロゲナーゼを含有する生物で厳密に保存されている。HydEFおよびHydG遺伝子は、C.ラインハーディで、HydA1およびHydA2[F e] - ヒドロゲナーゼ遺伝子とともに、嫌気下平行して転写される。HydEFの破壊は、全てのH₂生成を駄目にし、またウェスタンプロットティング法により全長ヒドロゲナーゼタンパク質が検出されても酵素活性は観測されない。水素生成は、HydEF遺伝子を含有するWTゲノムDNAでhydEF-1変異体を補完すると回復する。その上、本発明者らは、E.コリでのC.ラインハーディHydEF遺伝子、HydG遺伝子、およびHydA1遺伝子の同時発現およびこの微生物での活性[F e F e] - ヒドロゲナーゼの合成の初めての成功を報告する。最近の研究も、新規クラスの金属 - 酵素アクセサリータンパク質を同定し、そしてラジカルSAMスーパーファミリーのサブセットに属する2種のタンパク質に対するアセンブリ機能を割り当てている。こうした[F e F e] - ヒドロゲナーゼアセンブリタンパク質の特性決定は、自然界で[F e] - ヒドロゲナーゼを合成する機構のさらなる調査を大きく促進するだろう。

10

20

30

40

50

【0056】

本発明者らの結果は、Hクラスターの生合成が高度に保存された方法であることをはっきりと示す。[FeFe]-ヒドロゲナーゼCp1（本研究ではCpHydAと示す）およびDdHの最近の構造データと合わせて、本発明者らの研究は、様々な[FeFe]-ヒドロゲナーゼが基本的に同一なHクラスターを保有するという初期の観測を支持する。このことは、おそらく、CaHydAと低い配列相同性（約19%）しか有さないが、C.アセトブチリカムタンパク質の同一セットにより成熟させられるCaHydBの場合においてより明らかであるだろう。

【0057】

化石燃料の生物学的代替物を開発する努力は、多数のエネルギーキャリアの生成源としての微生物の利用における継続的な興味を刺激する助けとなってきた。大きいスケールのH₂生成源として利用するために、H₂生成生物の生理、およびH₂代謝を媒介するヒドロゲナーゼが熱心に研究されてきた。ヒドロゲナーゼがどのように生合成されるのか、そしてそれらの独特的な構造が生化学的および代謝機能にどう寄与しているかの理解がさらに進めば、生物学的および生物にヒントを得たH₂生成システムの両方の継続的な開発に役立つだろう。

10

【0058】

好適な実施形態を挙げて本発明を詳細に記載してきたが、この記載は例示にすぎず、制限とは解釈されないことが理解されるべきではない。従って、本発明の実施形態の詳細における多数の変更および本発明のさらなる実施形態は当業者に明らかであり、そしてこの記載を参照して当業者によりなされ得る。そしてそのような変更およびさらなる実施形態の全てが、本明細書中以下に請求されるとおり、本発明の精神の範囲内にある。

20

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】C.ラインハーディhydEF-1変異体の初期特性決定を示し、図中（A）TAP寒天板上で成長するC.ラインハーディ挿入変異体のコロニー（左）および嫌気性誘導に続くH₂光生成を、化学クロミック（chemochromic）センサーで視覚的に検知したもの（右）、暗青色点の4つのコロニー（下部、左）は比色検出するのに十分なH₂を生成するのに失敗；（B）は藻類の光合成率および呼吸率を示す；ならびに（C）は暗中嫌気性誘導された培養物からの初期のH₂光合成率を示す。WTのみがH₂を生成した。

30

【図2】hydEF-1変異体における遺伝子破壊および変異体表現型の相補性を示し、図中（A）はC.ラインハーディゲノムにおけるHydEF遺伝子およびHydG遺伝子の組織の概略図を示す（上部）。エクソンは三角、HydGおよびHydEFはそれぞれ灰色または黒で示される。5'UTRはそれぞれのATG開始コドンで終わるプロック矢印で示される。終止コドンもアスタリスクで示され3'UTRが続いている。HydEFへのarg7遺伝子挿入位置は、逆向きの三角で示される。HydEF遺伝子のうちこの三角より右の部分は、HydEF-1変異体では消去されている。推定プロモーター領域は白色三角で示される。プロモーター領域とそれに続く最初の2つのエクソンの拡張模式図を以下に示す；（B）は（1-r）親株（CC425）、hydEF-1変異体、およびHydEF遺伝子で補完されたhydEF-1変異体で測定したH₂光生成を示す（暗中嫌気性誘導の4時間後にアッセイ）。平均からの平均偏差が示される。および（C）は（B）に示されたのと同じコロニーのササンプロット法を示す。ゲノムDNAをNcoIで消化し、プロッティングし、そしてhydEF-1変異体すでに消去されているDNA配列を用いて探索した。

40

【図3】各生物で見いだされるC.ラインハーディHydA1、HydEF（両方ともそれぞれHydEDメインおよびHydFドメイン）およびHydGの推定類似性を配列決定されたゲノムと並べて示す。C.ラインハーディタンパク質に対する遺伝子同定、同一アミノ酸パーセント（%I）、E値、相同性長および相同性ランクを示す。生物のゲノム内の各遺伝子の組織も含まれる。

【図4】CC425またはhydEF-1培養物から単離した（A）HydA1転写物、

50

C B) Hyd A 2 転写物、(C) Hyd G 転写物、および(D) Hyd E F 転写物のノーザンプロットを示す。0時間、0.5時間、および4時間の嫌気性誘導が示される。ノーザンプロット実験で一緒にWTおよびhyd E F - 1 培養物からのRNAを電気泳動させ、プロッティングし、そして探索した。リボソーム23S RNAバンドは、各ノーザンプロットの下部にロード対照として示される。(E)では、ウェスタンプロットは、好気性および嫌気性誘導された試料からの一部精製されたタンパク質抽出物のものである。C. ラインハーディ Hyd A 1 および Hyd A 2 の両方を認識するように設計された抗体でプロットを探索した。

【図5】異種Hyd A 1を単独で発現、または指示されたHydタンパク質とともに同時発現のいずれかである精製されたE. コリからの水素産生速度を示す。水素産生はメチルビオロゲンを利用したアッセイで測定した。表示されるデータは、4回の独立した実験の平均を表し、平均からの平均偏差が示される。

【図6】C. ラインハーディ (A) Hyd E F アミノ酸配列および(B) Hyd G アミノ酸配列と他の生物で見いだされる対応する推定類似物との配列比較を示す。アミノ酸配列は、C. ラインハーディ c DNA に由来した。同一アミノ酸領域は黒色で示し、同様なアミノ酸の領域は灰色で影をつけてある。(A)に示されるのは、Hyd E 類似体、続いてC. ラインハーディリンカー領域、そして最後にHyd F 類自体である。配列比較に示される生物は以下を含む：サーモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*)、クロストリジウム・サーモセラム (*Clostridium thermocellum*)、クロストリジウム・テタニ (*Clostridium tetani*)、デスルホビブリオ・デスルフリカンス (*Desulfovibrio desulfuricans*)、シュワネラ・オネイデンシス (*Shewanella oneidensis*)、バクテロイデス・セタイオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、クロストリジウム・パークリンジエンス (*Clostridium perfringens*)、およびクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)。

【図7】[FeFe] - ヒドロゲナーゼ成熟遺伝子および構造遺伝子のT7プロモーター発現用のプラスミド構築物を示す。(A) バックボーン pCaE 2 を用いて Hyd E をC. アセトブチリカム由来の CaHyd A (pCaAE) (図中に表示) 、 CaHyd B (pCaBE) 、または CaHyd A N (pCaAN) 、または C. パステリアヌム (*C. pasteurianum*) 由来の CpHyd A (pCpAE) または CpHyd A N (pCpAN) のいずれかと同時発現させた。(B) バックボーン pCaE 1 を用いて Hyd E をC. ラインハーディ CrHyd A 1 (pECr1) (図中に表示) または CrHyd A 2 (pECr2) のいずれかと同時発現させた。(C) pCaFG は C. アセトブチリカム Hyd F および Hyd G と同時発現する。(D) pCaHyd A は C. アセトブチリカム Hyd A を発現する。(E) pCaE 1 (MCS1 の NcoI BamHI 部位における Hyd E) および pCaE 2 (MCS2 の NdeI - BglII 部位における Hyd E) 。(F) pCaF は C. アセトブチリカム Hyd F を発現する。(G) pCaG は C. アセトブチリカム Hyd G を発現する。

【図8】精製した、Strep IIタグ付き[FeFe] - ヒドロゲナーゼのウェスタンプロット分析を示す。レーン1、C. アセトブチリカム Hyd A (1.5 μg, 65 Kd) ; レーン2、C. アセトブチリカム Hyd A N (2 μg, 43 Kd) ; レーン3、C. アセトブチリカム Hyd B (5 μg, 50 Kd) ; レーン4、C. ラインハーディ Hyd A 1 (2.25 μg, 49 Kd) ; レーン5 C. ラインハーディ Hyd A 2 (1 μg, 49 Kd) ; レーン6、分子量マーカー、75, 50, および35 Kd。

【図9】本研究で用いた[FeFe] - ヒドロゲナーゼの配列比較の模式図である (Ca = C. アセトブチリカム、Cp = C. パステリアヌム、Cr = C. ラインハーディ)。最上部の図は、溶解性[FeFe] - ヒドロゲナーゼで見られる保存Fクラスター結合ドメイン (平行斜線がけ) 、およびHクラスター結合モチーフ HC1 (TSCCP) および HC2 (MACPGGC) (塗りつぶし棒) の相対位置を表す。矢印の頭は、C. アセトブチリカムおよびC. パステリアヌム Hyd A N 構造物では消去された保存Fクラスター結合ドメインのN末端を示す。

10

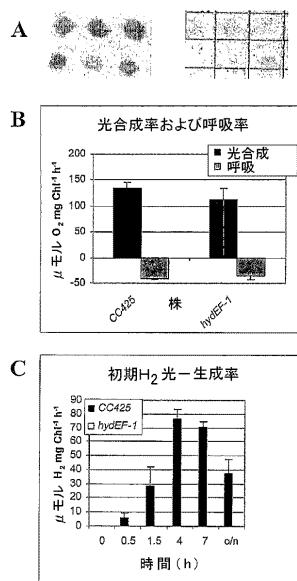
20

30

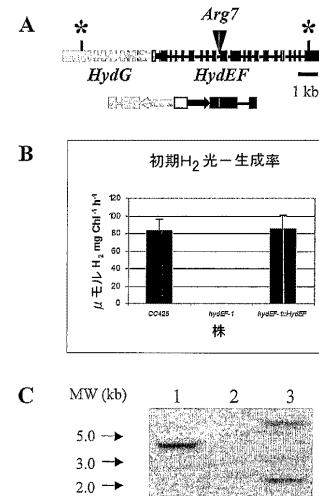
40

50

【図1】



【図2】



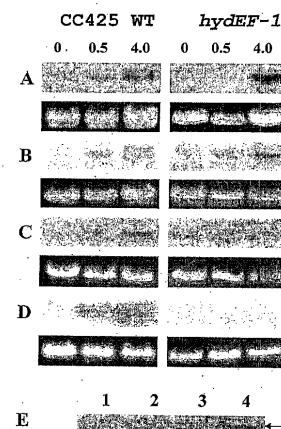
【図3】

C. ラインハーディ推定[Fe]-ヒドログナーゼ成熟タンパク質のホモローグ

生物	Orf	%	E値	ホモロジー長	ランク	ゲノム構成
T. マリティマ (<i>T. maritima</i>)	HydG	45	-122	75-565	2	推定遺伝子/オペロン: HydG, 未知, HydE, シタオニニア・シングルターゼ, 蘭類[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子に対する推定ホモローグはグループ化されていない。
	HydE	35	-57	104-483	4	
	HydF	29	-36	12-404	10	
	HydA1	46	-104	66-497	1	
C. サモセラム (<i>C. thenoculum</i>)	HydG	46	-122	74-568	3	蘭類[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子および成熟タンパク質に対する推定ホモローグはグループ化されていない。
	HydE	35	-53	122-474	5	
	HydF	30	-42	5-384	12	
	HydA1	45	-93	86-485	3	
B. セイタオミクロン (<i>B. thetaiodaomicron</i>)	HydG	46	-112	122-564	7	推定遺伝子/オペロン: [Fe]-ヒドログナーゼ, HydE, HydG, HydF, アニールン・ブロムフェナチルペチダーゼ, ポリ-ヒドロキシブレットデミメラーゼ。
	HydE	32	-47	124-474	6	
	HydF	27	-39	12-447	3	
	HydA1	42	-89	67-485	5	
T. テンコンゲンシス (<i>T. tengcongensis</i>)	HydG	38	-93	61-566	11	推定[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子および成熟タンパク質に対する推定ホモローグはグループ化されていない。
	HydE	35	-59	100-480	3	
	HydF	29	-36	12-488	5	
	HydA1	44	-96	84-485	2	
D. ブルガリス (<i>D. vulgaris</i>)	HydG	47	-124	73-567	1	推定オペロン: HydA([Fe]-ヒドログナーゼ, 大サブユニット), HydF([Fe]-ヒドログナーゼ, サブユニット), HydE, HydG, HydF, 未定アスペチギン・酸アミドアセチル化。
	HydE	31	-37	123-452	10	
	HydF	30	-36	12-455	4	
	HydA1	41	-81	90-485	8	
C. アセトブリカリム (<i>C. acetobutylicum</i>)	HydG	41	-105	74-564	9	蘭類[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子および成熟タンパク質に対する推定ホモローグはグループ化されていない。
	HydE	35	-62	128-479	1	
	HydF	28	-33	12-398	11	
	HydA1	37	-72	66-485	9	
C. パーフリンジエンス (<i>C. perfringens</i>)	HydG	41	-108	71-565	8	蘭類[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子および成熟タンパク質に対する推定ホモローグはグループ化されていない。
	HydE	34	-60	99-480	2	
	HydF	28	-36	12-484	8	
	HydA1	37	-71	66-485	10	
D. デスルフリカニス (<i>D. desulfuricans</i>)	HydG	44	-116	73-567	5	推定オペロン: HydF([Fe]-ヒドログナーゼ, 大サブユニット), HydS([Fe]-ヒドログナーゼ, 小サブユニット), 未知, HydG, HydF。
	HydE	30	-34	126-479	12	
	HydF	29	-38	56-467	9	
	HydA1	45	-88	88-485	6	
C. ボツリヌム (<i>C. botulinum</i>)	HydG	41	-101	129-566	12	推定遺伝子/オペロン: HydE, HydG, HydF, 蘭類[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子に対する推定ホモローグはグループ化されていない。
	HydE	44	-43	272-474	8	
	HydF	28	-40	1-468	1	
	HydA1	46	-91	86-485	4	
C. ディフィシル (<i>C. difficile</i>)	HydG	42	-102	75-567	10	推定遺伝子/オペロン: HydG, HydE, HydF, 蘭類[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子に対する推定ホモローグはグループ化されていない。
	HydE	29	-45	121-474	7	
	HydF	28	-40	12-430	2	
	HydA1	40	-82	85-485	7	
S. オネイデンシス (<i>S. oneidensis</i>)	HydG	41	-112	50-567	6	推定遺伝子/オペロン: HydA([Fe]-ヒドログナーゼ, 大サブユニット), HydF([Fe]-ヒドログナーゼ, 小サブユニット), チカラム白型, 未知, HydG, HydE, HydF。
	HydE	32	-37	43-318	11	
	HydF	28	-36	12-469	7	
	HydA1	35	-62	91-486	11	
C. テタニ (<i>C. tetani</i>)	HydG	43	-116	28-477	4	推定遺伝子/オペロン: HydG, HydE, HydF, HydD ^{sp} (スパンディング), HydE ^{sp} (スパンディング), HydF ^{sp} (スパンディング), 蘭類[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子に対する推定ホモローグはオペロン/推定膜架橋(spanning)タンパク質, 蘭類[Fe]-ヒドログナーゼ遺伝子に対する推定ホモローグはグループ化されていない。
	HydE	30	-40	100-449	9	
	HydF	27	-38	12-451	6	
	HydA1	30	-13	72-333	12	

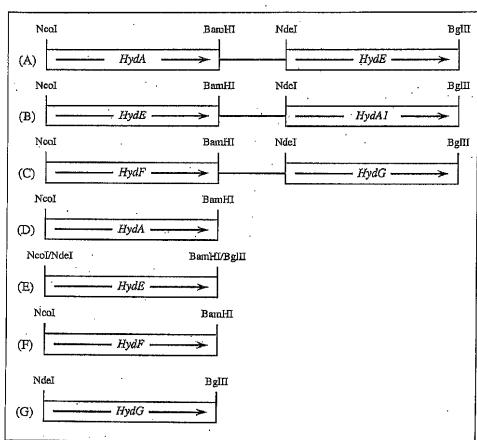
【図4】

Figure 4



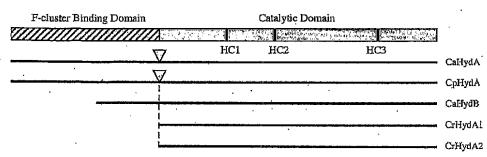
【図7】

FIGURE 7

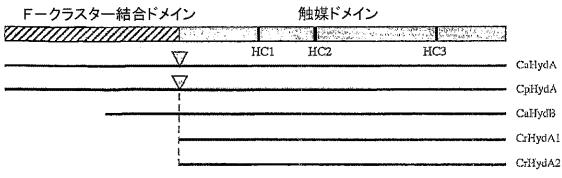


【図9】

FIGURE 9

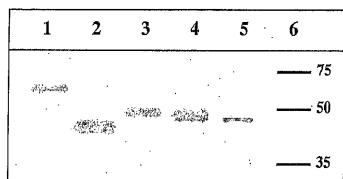


【図11】

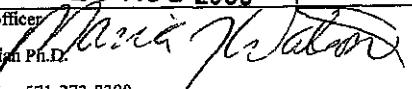


【図8】

FIGURE 8



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/07153						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12P 21/00(2006.01),C12N 1/20(2006.01),1/21(2006.01) USPC: 435/71.1,252.1,252.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/71.1, 252.1, 252.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: embase biosis caplus								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">KING, P.W. et al. Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an Escherichia coli Biosynthetic System. Journal of Bacteriology, March 2006, Vol 188. No. 6, pages 2163-2172.</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	KING, P.W. et al. Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an Escherichia coli Biosynthetic System. Journal of Bacteriology, March 2006, Vol 188. No. 6, pages 2163-2172.	1-15
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
A	KING, P.W. et al. Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an Escherichia coli Biosynthetic System. Journal of Bacteriology, March 2006, Vol 188. No. 6, pages 2163-2172.	1-15						
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.						
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
Date of the actual completion of the international search 21 July 2006 (21.07.2006)		Date of mailing of the international search report 16 AUG 2006						
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  Celine X. Qian Ph.D. Telephone No. 571-273-8300						

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,L,R,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 507287113

キング、ポール ダブリュ
アメリカ合衆国、80401 コロラド州、ゴールデン、デンバー ウエスト ドライブ 191
9、アパートメント 1228 (番地なし)

(71)出願人 507287124

ポウズウィッツ、マシュー シー
アメリカ合衆国、80401 コロラド州、ゴールデン、トゥエルフス ストリート 1011

(71)出願人 507287135

スマリンスキ、シャロン エル
アメリカ合衆国、80127 コロラド州、リトルトン、エルクヘッド レインジ ロード 1
1876

(74)代理人 100065226

弁理士 朝日奈 宗太

(72)発明者 セイバート、マイクル

アメリカ合衆国、80228 コロラド州、レイクウッド、ダブリュ エイル プレイス 131
34

F ターム(参考) 4B024 AA17 BA08 CA04 DA06 EA04 GA11 GA25

4B064 AA03 AG01 CA02 CA19 CC24 DA20

4B065 AA26X AA83Y AB01 BA02 CA01 CA28 CA60