

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 尹 ナ レ

Hydrogenobacter thermophilus TK-6は、生育至適温度70℃の好熱性の絶対独立栄養細菌で、水素ガスを唯一のエネルギー源として還元的TCAサイクルにより炭素固定を行うことが示されている。本菌は16S rRNAの塩基配列による系統分類によると、*Aquifex*とともに他の微生物から非常に早い時期に分岐した真正細菌で、進化系統学的にも興味深いものである。還元的TCAサイクルでは4ヶ所で炭素固定反応を行い、そのうち2つは2-オキソ酸オキシドレダクターゼ(OR)ファミリーに属するpyruvate:ferredoxin oxidoreductase(POR)と2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase(OGOR)により触媒される。これらの酵素は既に精製され、物理化学的性質が明らかになっているが、その遺伝子構造に関する解明は進んでいない。本研究はOGORの遺伝子構造と機能の解析を目的とし、TK-6株から2つのOGOR遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現、転写調節の解析を行い、さらに翻訳配列からORの進化的な考察を試みたもので、5章より構成されている。

第1章で、研究の背景と意義、目的について概説した後、第2章では、TK-6株由来OGORの遺伝子(*kor*)のクローニング、構造解析と機能的発現について述べられている。*kor*遺伝子群は、酵素の構造遺伝子*korA*, *korB*と、機能未知の遺伝子*orf3*, *orf4*から構成され、それぞれ68-(KorA), 33-(KorB), 22-(Orf3), 24-kDa(Orf4)の蛋白質をコードしていた。*korAB*の翻訳アミノ酸配列には、ORファミリーの酵素に典型的な保存配列があった。ORF3は複数のcysteine残基を持ち、電子伝達体と予想された。ORF4はラン藻*Synechocystis*の染色体上に複数存在する機能未知のslr1203ファミリーの遺伝子産物と相同性を示した。さらに、大腸菌を宿主として*kor*遺伝子群を発現させ、TK-6由来の蛋白質と同様のサブユニット構造と基質特異性を示す複製酵素を得ることができた。また、*orf3*と*orf4*は活性型酵素の発現には必要ではないことが示された。

第3章では、*kor*遺伝子群の上流逆向きに別のOR酵素の遺伝子群(*for*)を新たに発見し、その遺伝子構造と機能的発現について研究を行った。*for*遺伝子群は*forD-forA-forB-forG-fdx-orf6*の順で並んでおり、それぞれ27-(ForD), 43-(ForA), 32-(ForB), 25-(ForG), 8-(Fdx), 11-kDa(Orf6)の蛋白質をコードしていた。ForABGの翻訳アミノ酸配列には、ORに典型的な保存配列が存在したが、ForDには、他に保存されているFe-Sクラスターの結合配列がなかった。大腸菌を宿主として*for*遺伝子群を発現させた結果、KORと同様に2-oxoglutarateに高い基質特異性を示す複製酵素(FOR)が生産され、TK-6株が2つのOGORを持つことが示された。

第4章では、TK-6株が持つ2つのOGOR遺伝子群の転写レベルでの解析を行った。RT-PCRによる解析により、*for*, *kor*遺伝子群は、それぞれオペロンとしてTK-6株中で転写されていることが示され

た。また、プライマー伸張法により、*for-kor*間にある両遺伝子群の転写開始点を決定した。大腸菌でプロモーター活性を調べたところ、JM109株で *for*、*kor*とも嫌気条件下で誘導された。*for*プロモーターの嫌気誘導は好気-嫌気の調節因子 ArcAB 依存であり、FNRにより好気条件で活性が抑制されることが示された。

第5章では、ORファミリー蛋白質の進化系統について論じている。TK-6株は3種のOR (KOR, FOR, POR) を持っている。これらと、古細菌、真正細菌、一部の真核生物で見られる他のORとの系統解析を行った。その結果、ORファミリーは6個のサブファミリーに分けられ、遺伝子重複、水平伝播、欠失などの現象がORの進化中に起きたことが予想された。還元的炭酸固定反応を触媒するTK-6株のORは、酸化的脱炭酸反応を触媒する他のORと相同性を示した。KORは古細菌に、FOR, PORは真正細菌に近い関係があることを示し、還元的TCAサイクルは少なくとも先祖型ORが真核生物、真正細菌、古細菌に分かれる前から存在したと考えられた。

以上、本論文は *H. thermophilus* TK-6の2つのOGOR遺伝子群の構造解析、機能的発現と転写調節機構の解析を行うと同時に、ORファミリー酵素の分子系統学的解析により、ORに関する新知見を与えたものとして、学術上、貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。