

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 長谷川倫男

硝酸呼吸のうち、硝酸を最終的に亜酸化窒素  $N_2O$ 、あるいは分子状窒素  $N_2$  にまで還元し、気体として放出するものを脱窒と呼ぶ。細菌の場合、酵素の構造遺伝子をはじめ脱窒に関連した蛋白質をコードする遺伝子は、多くの場合染色体やプラスミド上にクラスターを形成し、近接して存在している。*Pseudomonas aeruginosa* においては、NIR と NOR に関連した遺伝子群が隣り合って存在する。NIR に関連する遺伝子はオペロンを形成し、そこには構造遺伝子、NIR に結合し触媒中心となる heme  $d_1$  の生合成に関与する遺伝子群、NIR への電子供与体である cytochrome  $c_{551}$  をコードする *nirM* のほか、c 型 cytochrome と思われる蛋白質をコードする遺伝子 *nirC*、*nirN* が存在する。

本研究は、*P. aeruginosa* の *nir* オペロン中にある機能不明の遺伝子 *nirC*、*nirN* 産物の機能を特定し、それが NIR の反応にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とし、序論、本文 5 章、総括より構成される。

序論では研究の背景、過去の研究経過、本研究の目的が書かれている。

第一章では *nirM*、*nirC*、*nirN* の欠損株を作製し生育、NIR の発現、活性を調べている。NIR の活性はそれぞれ約 20%、40%、80% に低下していたが、直接影響は観察できなかった。*NirC* は NIR への heme  $d_1$  の結合の際に必要であると推定されている。しかし *nirC* 欠損株における酵素活性から、*NirC* は NIR の成熟化に必ずしも必要ではないと結論した。

第二章では *NirC*、*NirN* を精製し、機能を解析した。これらの cytochrome と NIR との電子伝達を調べたところ、*NirC* は NIR へ電子を伝達し、また、膜画分によってコハク酸依存的に還元された。さらに *in vitro* で、細胞の電子伝達経路を再構成した実験結果から、*NirC* の機能は NIR への電子伝達であると判断できた。

*NirC* が NIR への電子供与体として機能することから、第三章では、NIR との相互作用について調べた。本菌の NIR は *in vitro* で、酸素還元活性と亜硝酸還元活性を示す。酸素還元時の *NirM*、*NirC* に対する  $K_m$  は大きな差を示さなかったが、亜硝酸還元時は *NirC* に対する  $K_m$  は *NirM* に対するものより著しく高かった。このような性質を示す相互作用について、*NirM* を用いて詳しく調べることにした。NIR との親和性に関わると言われる Lys8、Lys10 を Asp に置換し、NIR の両反応時の  $K_m$  値を測定した。しかし野生型との差異はみられず、相互作用に蛋白質の電荷は影響しないと結論した。さらにこれらの相互作用は疎水的な力によると思われ、報告されている静電的な力によるものとは異なると考えられた。

第四章ではこれらの *c* 型 cytochrome が cytochrome  $bc_1$  から直接電子を受け取り、これが唯一の経路であることをコハク酸依存的な還元反応を調べる実験から明らかにした。さらに銅蛋白 azurin も、これらの cytochrome を substitute できる可能性を示した。

第五章では転写調節について調べた。転写は  $NO$  で促進されるという従来の節に従えば、cytochrome  $bc_1$  欠損株では NIR は発現しない。しかしながら本欠損株で NIR は発現し、これは  $NO_2^-$  による制御を受けていることが考えられた。このことから単純に判断すれば、脱窒遺伝子群は少なくともふたつ以上の基質に対応した制御系を持つと言える。

総括として、本研究で明らかになったことは、1) NirC が NIR への電子供与体として機能すること、2) NIR の触媒するふたつの反応において、NirC に対する親和性が異なること、3) NIR と NirM との作用に、静電的な力はおおきく影響しないということであるとしている。ここから、本菌の NIR は電子供与体と疎水的な力で結合すると考察し、また 2) から、こうした親和性の違いは両反応時に、酵素の電子受容部位の立体構造が変化することによるものではないかと考察した。近年、NIR の触媒機構について、構造生物学的立場からの詳細な研究が多く報告されるようになった。NirC の立体構造に関する知見などを得ることで、NIR の反応と conformation 変化について、多角的なアプローチができる可能性を提唱している。

以上を要するに本論文は、細菌の脱窒遺伝子群中の機能不明遺伝子の機能の同定およびその産物の単離に成功し、硝酸呼吸系の電子伝達経路および蛋白質間の相互作用について新たな知見を与え、学術上貢献するところが少なくない。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。