

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 上田 康史

水素は化石燃料に代わる次世代のクリーンなエネルギーとして注目されている。しかしながら、現在利用可能な水素発生装置、水素をエネルギー源とした燃料電池は大型でエネルギー効率の低く、コストも高いものが多い。このため、より小型で効率的な装置を作るための基礎となる知見を得る対象として、微生物やらん藻による水素発生、水素酸化の機構や水素に関する直接的な反応を触媒する酵素、ヒドロゲナーゼが注目され、近年、世界の各所で研究が行われている。特に水素細菌は気相の水素から直接エネルギーを獲得して生育しており、その水素酸化機構は効率的で、その初発酸化酵素であるヒドロゲナーゼは安定かつ高効率であることが見込まれる。

本論文はこのような背景をふまえ、好熱性の絶対独立性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株を対象としてその水素酸化機構、主にヒドロゲナーゼについて分子生物学的手法を使って、検討を行ったものである。また、本菌は真正細菌の中で最も古い起源を有するとされており、本菌に関する研究は微生物の進化という点でも学術的に大きく寄与するものである。本論文は序論、第1章（8節）、第2章（7節）、総括と展望から成っている。

第1章は第1節から第8節までであり、TK-6株における水素酸化経路に関して述べたものである。第1節は本菌で既に精製されているヒドロゲナーゼのタンパク質的性質と本菌に近縁の *Aquifex aeolicus* のヒドロゲナーゼ様遺伝子の遺伝情報の概略を述べたものである。第2節はTK-6株の培養条件について述べている。第3節は染色体DNAの抽出方法について述べ、第4節、第5節ではサザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションを用いたヒドロゲナーゼ遺伝子群の取得について述べている。その結果、既に精製されているヒドロゲナーゼのN末端アミノ酸シーケンスと、*A. aeolicus* の遺伝情報もとにTK-6株の染色体DNAから4種の異なるヒドロゲナーゼ遺伝子群を新規に単離することに成功した。これらのヒドロゲナーゼ遺伝子群はそれぞれ *hox*, *hyd1*, *hyd2*, *hyd3* と命名した。*hox* 遺伝子群は既に精製されているヒドロゲナーゼのN末端アミノ酸シーケンスをもとに単離されたものであり、それ以外のは *A. aeolicus* の遺伝情報をもとに単離されたものである。取得されたヒドロゲナーゼ遺伝子群を第6節において、small subunit, large subunit のそれぞれにおいて構造モチーフの比較や、系統樹の作成による分子進化的な考察を行っている。この検討により、すべての遺伝子群が NiFe 型のヒドロゲナーゼの遺伝子で

あること、中でも *hox* はこれまでに見つかった膜結合型ヒドロゲナーゼとは異なるタイプであることが示された。第 7 節では本菌の炭酸固定経路である還元的 TCA サイクルへの還元力供給源として無細胞抽出液中の NAD 還元活性に注目し、検討を行っている。無細胞抽出液中の NAD 還元活性を行う酵素を精製するために diaphorase 反応を指標に硫酸沈澱、陰イオン交換カラム、疎水カラム、ヒドロキシアパタイトカラム、ゲル濾過カラムを使用した結果、2 つの異なるサブユニットから構成される酵素を得た。各サブユニットの N 末端アミノ酸シーケンスを決定し、データベース上で相同性検索を行ったが、相同性のある配列はなかった。また、この酵素は diaphorase 活性はもっているが水素依存の NAD 還元活性はもっていなかったため、新規の NADH oxidase であると考えられた。

第 8 節では 1 章の結果のまとめを述べている。

第 2 章は全 7 節からなり、第 1 章で得られた 4 種のヒドロゲナーゼ遺伝子群の発現解析を RT-PCR の手法を用いて行ったものである。第 1 節ではこれらの解析の目的を述べている。第 2 節では水素、酸素、二酸化炭素の混合ガスを使用して Jar 培養を行った対数増殖期の菌体について RNA を抽出し RT-PCR を行っている。第 3 節、第 4 節では混合ガス中の水素、酸素の濃度（分圧）をそれぞれ変更することにより、遺伝子群の転写パターンに変化が生じるかを調べている。これらの検討の結果、通常の培養条件下では全てのヒドロゲナーゼ遺伝子群が m-RNA レベルで発現していることが示された。水素濃度を全体の 20% に下げた系では 1 種類のヒドロゲナーゼ遺伝子群の発現がみられなくなった。第 6 節では RNA を得ることのできなかつた培養系について述べている。第 7 節は第 2 章の結果のまとめを述べている。

総括と展望では第 1 章と第 2 章の結果を総合することにより、本菌の水素酸化系における 4 つの遺伝子群の役割を推測し、本菌の水素酸化経路が複雑なものであることを推定するとともに、今後の研究の方向性を示している。

以上要約すると、分子生物学的な手法を用いて、絶対独立栄養性水素細菌という興味深い栄養獲得様式の菌について、新規の 4 種のヒドロゲナーゼ遺伝子群を取得した。また、その機能を推定することや水素酸化経路の構成要素と考えられる酵素を精製することにより本菌の水素酸化機構が複雑なものであることを示したもので、学術上、応用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のあるものと認めた。