

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 鈴木 美帆

Hydrogenobacter thermophilus TK-6株は 16S rDNA 塩基配列による解析から、系統分類学的に最も初期に分岐した真正細菌であることが知られている。本研究では、このような興味深い系統分類学的位置付けにある TK-6株を対象とし、微生物における呼吸代謝の進化に関する知見を得ることを目的とした。本菌と近縁にある真正細菌 *Aquifex pyrophilus* は硝酸呼吸によって生育が可能であることが報告されている。本菌の硝酸呼吸について、その特徴を生化学的に解明するために、まず生育特性を調べ、さらに異化型硝酸呼吸の鍵酵素である亜硝酸還元酵素 (nitrite reductase; NIR) と一酸化窒素還元酵素 (nitric oxide reductase; NOR) がどのような性質を持つのかについて解析を行った。本論文は序論および4章からなる。

第1章では、本菌が硝酸呼吸能を持つことが実証された。分子状水素をエネルギー源とし、嫌気条件下で硝酸を最終電子受容体として培養を行った際に、菌の生育が認められ、亜硝酸が培養液中に検出された。続いて、 $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ を用いた培養における気相のガス分析により、 ^{15}NO 、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 、 $^{15}\text{N}_2$ が検出され、本菌が N_2 生成型硝酸呼吸(脱窒)を行うことが示された。次に、硝酸呼吸により嫌氣的に培養した菌体の粗酵素液に対し、Western blottingを行った。cytochrome cd_1 型 NIRを持つ *Pseudomonas aeruginosa* および Cu型 NIRを持つ *Alcaligenes faecalis* S6の NIR抗体を用いたところ、前者とに結合が観察されたことから、本菌の NIRは cytochrome cd_1 型であることが示された。また、同粗酵素液についてヘム染色での発色も確認された。

第2章では、硝酸により培養した菌体から NIRの完全精製を行い、NIR遺伝子 (*nirS*)の全塩基配列を決定した。cell-free extractを調製し、硫安分画、疎水性カラム (Phenyl Sepharose および Resource PHE)、陽イオン交換カラム (MonoS)の順に分離を行い、精製酵素が得られた。次に NIR遺伝子 (*nirS*)の解析を行った。精製 NIR から N末アミノ酸配列は修飾のため得られなかったため、内部アミノ酸配列と *nirS* 保存領域の配列を基としてプローブを作製した。このプローブを用いて PCR断片を取得し、さらに primer walkingにより *nirS* と周辺領域の塩基配列を決定した。その結果、*nirS* のプロモーター領域には -10 および -35 配列が存在した。本菌の *nirS* にはこれまでに知られている DNRタイプか σ^{54} 依存型のタイプに見られるプロモーター配列が存在しなかったことから、既知のものとは異なる調節機構が働いていると考えられた。また、ホモロジー解析により、*nirS* 下流には *nirN* が存在することがわかった。

第3章では、*norCB* 保存領域の配列を基にプローブを作製し、本菌の *norCB* のクローニ

ングを行った。コロニーハイブリダイゼーションにより、4.5 kb *SacI* 断片と 5.2 kb *SacI*-*BamHI* 断片が取得され、この二つの断片により *norCB* とその近傍の塩基配列を決定した。その結果、周辺には NOR の活性化に必要とされる *norQ* や *norD* 等の遺伝子が存在せず、他の脱窒菌とは異なる構造を持つことが示された。また、*nirS* と同様に *norCB* のプロモーター領域にも -10 および -35 配列が存在した。*norCB* においても本菌の調節機構が DNR タイプや NorR タイプとは異なるものであることが示唆された。ハイドロパシーにより本菌の NorC は 2 回膜貫通構造を持つことが示され、他の菌とは構造が異なることが明らかとなった。NorC および NorB の系統樹からは、どちらのサブユニットも *Methylococcus capsulatus* と最も近い位置にあることが示された。

第 4 章では、脱窒菌である *P. aeruginosa* を宿主として、NIR および NOR 発現を試みた。宿主には RM488 (-*nirS* 株)、RM495 (-*norCBD* 株)、PAO1 (wild type) の菌株を用いた。NIR および NOR の形質転換体は、どちらも脱窒による嫌氣的生育は相補できず、むしろその発現により生育阻害が起こり、宿主の native 酵素との間に構造的に相違があることが示唆された。粗酵素液に対しヘム染色を行ったところ、RM488+HT*nirS* はバンドが出たが、RM495+HT*norCB* は出なかった。RM488+HT*nirS* については Western blotting も行い、バンドの出現を確認した。さらに、同粗酵素液が NIR 活性を持つことが示された。このように、TK-6 株由来の NIR は *P. aeruginosa* の細胞内で機能的に発現していることが示された。しかし、RM495+HT*norCB* の粗酵素液に NO 還元活性は認められなかったため、NOR は機能的に発現していないと考えられた。

以上、本論文は TK-6 株の NIR・NOR およびその遺伝子について、他菌種との構造や性質の相違を示したものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査員一同は、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。