

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ソングラン チャクラット

独立栄養生物における炭酸固定経路として、現在までに4種類のもが知られている。この内、3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルは当初は緑色非イオウ細菌である *Chloroflexus auranticus* で提案されたものであるが、最近ではアーキアでも機能性が示唆されている。なお、*Chloroflexus auranticus* においては3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルの酵素の内、Malonyl-CoA reductase と Propionyl-CoA synthase が既に精製されているが、本サイクルの鍵酵素とも言える炭酸固定酵素 (Acetyl-CoA carboxylase と Propionyl-CoA carboxylase) は未だ精製されていない。そこで申請者は、炭酸固定経路として3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルを機能させている *Acidianus brierleyi* (生育至適温度 70°C 及び生育至適 pH1.5~2 を有する通性嫌気性、好熱性、通性独立栄養性の硫黄代謝性アーキア) の Acetyl-CoA carboxylase と Propionyl-CoA carboxylase の精製と生化学的性質を明らかにすることを目的として研究を行った。

以下に、本論文の概要を述べる。

第1章の緒言においてはこれまでの知見と本研究の意義付けについて詳細に述べている。第2章においては、*Acidianus brierleyi* の独立栄養的増殖に関して詳細な検討を加えた結果を述べている。まず、*A. brierleyi* を、通気ガス (10% CO<sub>2</sub> 並びに 90% 空気, 流量: 3.5 L min<sup>-1</sup>) 中の炭酸ガスを唯一炭素源、培地中のテトラチオン酸 (S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>) を唯一エネルギー源として、完全無機培地を用いて独立栄養的に培養した。70°C かつ pH 2.0 なる至適培養条件下で本菌は、回分培養において  $\mu_{\max} 0.057 \pm 0.010$  h<sup>-1</sup> (倍化時間: 18.0 ± 3.1 h) で、fed-batch 培養において  $\mu_{\max} 0.034 \pm 0.006$  h<sup>-1</sup> (倍化時間: 29.7 ± 5.8 h) で生育した。全体として、46L の培養液から約 30.6g の湿菌体を調製できた。

第3章においては、*Acidianus brierleyi* からの Acyl-CoA carboxylase の精製と特徴付けについて述べている。Streptavidin-peroxidase conjugate を用いたブロッティング実験から本菌中には1種類だけの Acyl-CoA carboxylase が存在していることが示唆された。本酵素は、Streptavidin を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーと Superose 6 を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製された。精製酵素の比活性は Acetyl-CoA carboxylase ベースでは  $14.5 \pm 1.01$   $\mu$ mol fixed CO<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> であり、Propionyl-CoA carboxylase ベースでは  $11.9 \pm 0.92$   $\mu$ mol fixed CO<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> であり、酵素の二機能が示された。また、精製酵素の活性がアビジンにより阻害されたことから、精製 Acyl-CoA carboxylase がビオチン酵素であることが明らかとなった。さらに本酵素は、見かけの分子量がそれぞれ

れ62、59、20 kDaである3サブユニットからなる、新規なサブユニット数を有することが示された。また、全体の分子量が540 kDaであることが示され、サブユニット構造としては $\alpha_4\beta_4\gamma_4$ 構造をとっていることが示唆された。アミノ末端アミノ酸配列解析からは、59 kDaの蛋白質が Biotin Carboxylase (BC) であり、20 kDaの蛋白質が Biotin carboxyl carrier protein (BCCP)であることが示された。精製酵素の至適温度・至適pH・各基質に対する見かけ上の $K_m$ 値並びに $V_{max}$ 値も求めている。なお、Acetyl-CoA carboxylase 活性も Propionyl-CoA carboxylase 活性も、malonyl-CoA, methymalonyl-CoA, succinyl-CoA あるいは Coenzyme A により阻害されたが、palmitoyl-CoA によっては阻害されなかった。

第4章においては、*A. brierleyi*からの Acyl-CoA carboxylase をコードする遺伝子のクローニングと配列解析について述べている。Southern hybridization のための DNA プローブは、BC と BCCP のそれぞれのアミノ末端のアミノ酸配列をもとに合成したプライマーを用い、PCR により調製した。BC サブユニットは *accC* (position 2036-3565)によりコードされており、509 アミノ酸残基から成っていた。また、BCCP サブユニットは *accB* (position 3565-4068) によりコードされており、167 アミノ酸残基から成っていた。なお、*accB* の開始コドンの初めのヌクレオチドは *accC* のストップコドンの3番目のヌクレオチドと重なっていた。5番目の ORF (*pccB*, position 4149~5723)はカルボキシトランスフェラーゼ (CT)をコードしていた。本菌の Acyl-CoA carboxylase 遺伝子のプロモーター配列、リボゾーム結合部位 (RBS)、並びに転写終結シグナルはアーキアの既知の配列との比較によって同定された。結果としては、*accC* と *accB* はオペロンとして、*pccB* は単独の mRNA として転写されていることが示唆された。蛋白質の Multiple sequence alignment 解析によっては、本菌由来のアミノ酸配列は、ユーカリアよりも寧ろバクテリアにより近いことが示された。

第5章においては、Acyl-CoA carboxylase 遺伝子の大腸菌変異株における機能的発現について述べている。*E. coli* JM109 株を用いて ACC 遺伝子群を発現させた場合、極少量の BCCP 蛋白質のみが可溶性画分もしくはインクルージョンボディー画分に生産されるだけであった。一方、*E. coli* BL21 (DE3) 株を用いた場合には、著量の BCCP が可溶性画分に検出された。*A. brierleyi* の BCCP が *E. coli* の BCCP を相補できるか否かを決定するために、*E. coli* L8 [*accB22* (Ts)] を用いた実験を行ったが、*A. brierleyi* の BCCP は *E. coli* の BCCP を相補できないことが示された。最後に、recombinant 酵素を活性型として得るために、*E. coli* BL21 (DE3) 株を用いて、*accC-accB* と *pccB* を別々に発現させることを試みた。この場合、BC と CT はインクルージョンボディーとして生産され、6 M guanidine-HCl により可溶化された。しかしながら、希釈並びに透析による renaturation の過程で蛋白質の aggregation が生じたため、可溶化蛋白質を再構成することは出来なかった。

第6章においては、総括と展望を述べている。

以上本論文は、3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルの炭酸固定酵素に関して、生化学的・遺伝学的に多くの知見を得たものであり、学術上応用上貢献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。