

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山本 正浩

好熱好気性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株は絶対化学独立栄養性で炭酸固定経路として還元的 TCA サイクルを使用する。2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase (OGOR)は本サイクルの鍵酵素のひとつであり、succinyl-CoA から 2-oxoglutarate への炭酸固定反応を触媒する。TK-6 株は For と Kor と名付けられた 2 種類の OGOR を持つと予想されていた。本論文は、これら二つの OGOR に関して酵素学的特徴と生理的意義について知見を深めるべく行われた研究をまとめたもので、序論、4 章から成る本論、及び総合討論で構成されている。

序論では *H. thermophilus* TK-6 株および OGOR に関する研究開始時までの知見、未解明な問題点について述べている。*H. thermophilus* TK-6 株は様々な独特な特徴を有し、研究の歴史も長い。なかでも OGOR は炭素同化の鍵酵素として興味を持たれる。For と Kor をそれぞれコードする遺伝子クラスターは染色体上に並んで逆向きに存在し、両者の機能の違いから使い分けられていることが期待された。

第 1 章では OGOR の大腸菌での発現と精製、および酵素学的特徴付けを行った。本酵素が耐熱性であることから、大腸菌で発現させた後に熱処理を加えることで精製行程を簡便化・効率化することができた。精製された For は SDS-PAGE により 5 種類のサブユニットから成ることが示され、既知の類縁酵素とは異なる新規性の高いサブユニット構造であることが判明した。For と Kor の特徴の差について、酸素感受性の違いに興味を持たれた。TK-6 株の至適生育条件である 70°C、好気条件では For は比較的安定なのに対し、Kor は大部分が失活した。既知の OGOR 類縁酵素の多くは酸素耐性が低いが、TK-6 株の OGOR の酸素耐性は比較的高く、特に For においてその特徴が顕著であった。TK-6 株の OGOR が好气的環境に順応していることが考えられた。

第 2 章では OGOR による炭酸固定反応の活性測定を試みた。これまで、試験管内での炭酸固定活性測定は、電子供与体の枯渇などの原因により困難であるとされてきた。本章では測定系に改良を加え、本酵素による炭酸固定反応の動力学的解析を可能にしている。電子供与体である還元型 Fd の供給が系内で維持されるために、Fd を還元する酵素として pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (POR)を系に加えた。また、glutamate dehydrogenase (GDH)の添加により炭酸固定反応の生成物である 2-oxoglutarate を系内から追い出すことで反応を促進させると共に NADH の酸化でもって分光光学的に追跡できるようにした。測定系に必要な蛋白質をすべて精製し条件検討を行うことで、これらの蛋白質とカップリングさせた炭酸固定活性測定系を構築した。この測定系を用いることで For、Kor 共に、試験管内で炭酸固定反応を触媒することが示された。For、Kor 共に、炭酸固定反応速度は脱炭酸反応速度を下回ったことから、還元的な反応の進行は細胞内の還元型 Fd の濃度が高いことが条件であると予想された。

第 3 章では OGOR の発現と遺伝子破壊に関して解析した。ウエスタンブロットによる For と

Kor の発現解析の結果、Kor は酸素呼吸・硝酸呼吸の両条件において定常的に発現していた。For は、酸素呼吸条件においては定常的に発現しているものの、硝酸呼吸条件においてはほとんど発現を観察することができなかった。次に、TK-6 株において遺伝子破壊系を構築し、*for* 変異株と *kor* 変異株をそれぞれ取得することを試みた。遺伝子破壊はプラスミドを用いた相同組換え法で行った。条件検討の結果、高効率の遺伝子破壊系を構築し、目的の遺伝子破壊株、すなわち *for* 変異株と *kor* 変異株の取得に成功した。これら変異株の生育を観察したところ、*kor* 変異株は好気条件において野生株と変わらぬ旺盛な生育を示したが、嫌気条件では全く生育しなかった。対照的に、*for* 変異株は嫌気条件では野生株と同様の生育を示したが、好気条件では野生株の生育を大きく下まわった。これらの結果は、For は好気条件の時にのみ発現され、TK-6 株の好気条件時の旺盛な生育を支持していると考えられた。

第4章では OGOR オペロンにコードされる機能未知蛋白質群の解析を行った。精製蛋白質を用いた *in vitro* での解析では機能や OGOR との関連性を解明することは出来なかった。一方、遺伝子破壊株における発現解析といった *in vivo* での実験結果からこれらの蛋白質群の相関関係を見い出した。

総合討論では、本研究のまとめと今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、不明な点が多かった *H. thermophilus* TK-6 株の二つの OGOR に関して、酵素学的な特徴および生理的な役割について明らかにしたものであり、学術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のあるものと認めた。