

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉沢 洋一

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) は、カルビン回路の中の鍵酵素であり、二酸化炭素を有機物に変換する炭酸固定反応を触媒する。ほとんど全ての生物が最終的にこの反応に依存しているため、RubisCO は地球上で最も重要な酵素と言っても過言ではない。また、微生物による炭酸固定反応は地球上の炭素循環の中で一翼を担っているため、分子レベルでの炭酸固定反応の発現制御等の解析は重要である。本研究では、二酸化炭素濃度を唯一の炭素源として生育する絶対独立栄養性水素細菌 *Hydrogenovibrio marinus* MH-110 株を用いて、二酸化炭素濃度が MH-110 株に及ぼす影響について研究を行っている。本論文は、第 1 章の序論、第 6 章の結論を含む 6 章から構成されている。

第 2 章では、MH-110 株が保有する 3 種類の RubisCO の遺伝子クラスター構造を解明しており、*cbbLS-1* の上流には、RubisCO の転写制御因子である *cbbR1*、下流には RubisCO の翻訳後構造の安定化に寄与すると考えられる遺伝子 *cbbQ1*、*cbbO1* を、*cbbLS-2* の下流にはカルボキシソームの殻タンパク質をコードする遺伝子群とそれに引き続く 3 つの ORF を、*cbbM* の下流に存在する既知の *cbbQm* のさらに下流に *cbbOm*、カルボニックアンヒドラーゼをコードする遺伝子 *can* を同定したことが述べられている。

第 3 章では、CO₂ 応答による RubisCO とカルボキシソームの発現について解析を行っている。より具体的には、異なる CO₂ 濃度(15%、2%、0.15%、0.03%)において、3 種類の RubisCO 発現をタンパク質レベル、転写レベルで解析した結果がまとめられている。高 CO₂ 濃度(15%、2%)で主に炭酸固定を行う *CbbM*、低 CO₂ 濃度(0.15%、0.03%)で炭酸固定を行う *CbbLS-2*、それら二つの炭酸固定活性を補填する *CbbLS-1* と、各 RubisCO の発現パターンが異なることから炭酸固定に適した環境が異なることが示唆されている。また電子顕微鏡観察によって、低 CO₂ 濃度で培養した菌体にはカルボキシソームが多数観察され、低 CO₂ 濃度におけるカルボキシソームの重要性が指摘されている。

第 4 章では、カルボキシソームオペロンとカルボキシソーム遺伝子破壊株の解析を行っている。*cbbLS-2* とカルボキシソーム遺伝子群の転写解析は RT-PCR によって行われ、その結果からカルボキシソーム遺伝子クラスターは、二つのオペロンから構成されることが示されている。そしてプライマーエクステンション法によって、カルボキシソーム遺伝子クラスター内部の転写開始点が決定された。

また、カルボキシソーム遺伝子の一つである *csoS2* の破壊株(dCS2)とカルボキシソーム

遺伝子下流の機能未知の遺伝子 *bfr* の破壊株(dBF)を構築し、それらの解析を行っている。両破壊株とも低 CO₂ 濃度では生育できない、高 CO₂ 要求性の変異株であることが示された。各 RubisCO の発現パターンを調べており、低 CO₂ 濃度では、両破壊株とも CbbLS-2 の発現に加え、CbbLS-1 の発現が上昇していることが明らかとされた。さらに、低 CO₂ 濃度で培養した両破壊株の電子顕微鏡観察を行い、カルボキシソームは確認されなかったことからカルボキシソームが必須であることが示された。また、dBF ではカルボキシソームの形成異常と考えられる繊維状の構造が見られたことから、*bfr* またはその下流の二つの機能未知の ORF もカルボキシソームの形成に関与していることが示唆された。

第 5 章では、CO₂ 濃度の違いによって細胞にどのような変化が生じるのかを遺伝子の発現パターンの変化により解析している。RNA Arbitrarily Primed (RAP) PCR 法によって、MH-110 株が保有する既知の 2 つの *cbbR* とは異なる第 3 の *cbbR* が単離されたことが述べられている。この遺伝子は、低 CO₂ 濃度で特異的に発現していることが確認された。また、新規 *cbbR* を含む DNA 断片のクローニングを行った結果、*cbbLS-2* の約 10kb 下流に位置することが示されたため、新規遺伝子を *cbbR2* と命名している。さらにこの遺伝子産物と *cbbLS-2* のプロモーターの結合能を調べており、結合することが示唆されている。

以上、本研究は絶対独立栄養細菌における炭酸固定の複雑なメカニズムの一端を解明したものであり、これまで研究例のなかった単一の細菌において、*in vivo* における 3 種類の RubisCO の発現パターン解明、低 CO₂ 濃度で重要な役割を担うカルボキシソームの分子生物学的解析、新たな *cbbR2* 遺伝子の同定、と多くの基礎的知見を得たものであり、学術上非常に有意義な研究である。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。