

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 直樹

---

嫌気鉄呼吸は  $\text{Fe}^{3+}$  を電子受容体として用いる微生物の嫌気呼吸の 1 つである。嫌気鉄呼吸は、硫黄呼吸と並んで進化初期に獲得された呼吸代謝であることが提唱されている。また嫌気鉄呼吸による鉄還元は、菱鉄鉱や磁鉄鉱などの形成や不溶性金属の流出など環境中の土壌形成に大きく寄与している事が示唆されている。このように微生物の嫌気鉄呼吸は生物学および地質学的に重要な代謝として注目されている。

本論文は好熱性好酸性アーキア *Acidianus manzaensis* において嫌気鉄呼吸の鉄還元機構に関する研究結果を述べたものであり、5 章で構成されている。

第 1 章では、高温・酸性条件下において  $\text{H}_2$  を電子供与体、 $\text{Fe}^{3+}$  を電子受容体として独立栄養的に嫌気生育する微生物の取得および同定について述べられている。得られた微生物は 16S rDNA 配列解析などの分類学的解析から新種であることが示唆され、*Acidianus manzaensis* NA-1 株(NBRC 100595<sup>T</sup>)と命名した。本菌は pH1.2、80°C において  $\text{H}_2$  を電子供与体、 $\text{Fe}^{3+}$  を電子受容体として独立栄養的に嫌気生育し、好熱性・好酸性の鉄還元微生物として初めての報告である。 $\text{Fe}^{3+}$  の他に  $\text{O}_2$  を電子受容体として好気生育もおこなう通性嫌気性を示していた。また、グルコースや Yeast Extract を電子供与体とした従属栄養性を有していた。

第 2 章では、嫌気鉄呼吸鎖における鍵酵素として呼吸鎖末端に位置する鉄還元酵素の精製および生化学的解析をおこなっている。pH1.5、70°C における  $\text{Fe}^{3+}$  還元活性を指標に鉄還元酵素を精製した結果、分子量 64,200Da を示すモノマーとして精製された。本鉄還元酵素(Ferric-Iron Reductase; Fir)は高スピン- $\text{Fe}^{3+}$ ヘム鉄を有するチトクロムであることが示唆された。さらに Fir の活性中心であるヘムのピリジンフェロヘモクロム体における吸収帯が既存のヘムに一致しなかったことから、Fir に含まれるヘムは新規構造を有していることが示唆された。サイクリックボルタンメトリー法により決定された酸化還元電位は  $E=+0.61\text{V}$  (vs NHE)であり、 $\text{Fe}^{3+}$  ( $E=+0.77\text{V}$ , vs NHE)を還元しうる酸化還元電位を有していた。さらに Fir は 50kDa のタンパクに 14kDa 相当の糖が付加した糖タンパクであり、イオンクロマトグラフィー解析からその成分として Rha:Gls:Gal:Man:Glc:GlcNAc:GalNAc=1.5:1:3:1:8:6.5:3.5 が検出された。以上から、Fir は鉄呼吸鎖末端酵素として機能していることが示唆された。

第 3 章では鉄還元酵素遺伝子(Ferric Iron Reductase gene; *fir*)解析を述べている。*fir* は *Sulfolobus acidocaldarius* において低濃度酸素条件下で発現するチトクロム *b*<sub>558/566A</sub> サブ

ユニット遺伝子(*CbsA*)と 66%の相同性を有していた。また、*fir* の下流には少なくとも 3 つの ORF(*orf-1,2,3*)が存在し、それぞれ *S. acidocaldarius* 由来チトクロム *b<sub>558/566</sub>B* サブユニット(*CbsB*)、B 型チトクロムおよび Rieske 鉄-硫黄中心を有するタンパクと相同性を有していた。後者 2 つは *S. acidocaldarius* において酸素呼吸鎖構成酵素として報告例があり、本遺伝子も同様の酵素を発現している事が考えられる。*fir* および *orf-1* の各上流にはリボソームバインディングサイトおよび BoxA 様プロモーター配列が存在していた。しかしながら、*CbsA* および *CbsB* は共転写されること、ORF-1 と *CbsB* の相同性は 39% と低いこと、粗精製したチトクロム *b<sub>558/566</sub>* には鉄還元活性が見られないこと、および *S. acidocaldarius* は嫌気鉄呼吸生育をしないことから、Fir は嫌気鉄呼吸に特徴的な酵素であることが示唆された。

第 4 章では、*A. manzaensis* における鉄還元のメカニズムを解明するために、Fir の局在性と配向性を解析している。Fir が菌体膜表面に鉄還元活性中心(ヘム)を位置する形で鉄還元をおこなっていることを示した。

第 5 章では、Fir の cofactor であるヘム分子の構造解析をおこなっている。精製 Fir から氷冷酸アセトン法により抽出・精製したヘムを LC-MS/MS により分子量および側鎖構造を推定した結果、分子量 1008.5m/z を示す  $C_{59}H_4N_4O_7Fe$  であることが予測された。本分子量に合致するヘムは報告されておらず、新規ヘムであることが裏付けられた。MS/MS 解析によりポルフィリン各側鎖がフラグメントとして検出され、構造式が推定された。ゲラニルゲラニオールに類似すると考えられる不飽和炭素鎖  $C_{21}H_{35}$  を有することが本ヘムの特筆すべき特徴であり、高温・酸性下での鉄還元における鍵構造であることが考えられた。

以上、本論分はこれまで例のなかった高温・酸性環境における鉄還元微生物と、その嫌気鉄呼吸鎖における鉄還元酵素について、多くの新規な基礎的知見を得たものであり、また本研究が唯一のものである。特に Fir が呼吸酵素として既存のものとは全く異なる起源・進化を有することを示した点は学術上高く評価された。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。

- ※ 使用アプリケーションで作成したもの。  
プリントアウトしたもののほか電子データ (媒体は F D, MO 可) で提出する。  
ファイル名は「申請者氏名」(例: 東大太郎.doc)