

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池田 丈

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株(以下 TK-6 株)は還元的 TCA サイクルを用いて炭酸固定を行う絶対独立栄養性のグラム陰性細菌である。本論文は、還元的 TCA サイクルの鍵酵素であるピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ (以下 POR)の精製を行い、その炭酸固定反応について解析を行っている。また、POR 反応における電子伝達体として機能する鉄硫黄タンパク質フェレドキシンや関連酵素についても解析を行い、TK-6 株中におけるエネルギー代謝に関して重要な知見を得ている。

第一章では、TK-6 株由来の POR の遺伝子を大腸菌内で発現し、得られた組換え体を嫌氣的に精製することに成功している。得られた精製酵素が 5 種類のサブユニットからなることを SDS-PAGE 的に明らかにし、本菌の POR は既知のものとは異なり、新規の 5 サブユニット構造をとることを明らかにしている。また、既知の酵素との進化的関連性についても考察を行い、本菌の POR に特徴的なサブユニットが進化の過程で獲得された可能性について考察している。

第二章では、POR 反応における電子伝達体として機能する鉄硫黄タンパク質フェレドキシンの遺伝子を二種類クローニングし、大腸菌内で機能的に発現することに成功している。得られた組換え体を精製し、その分光学的諸性質を解析することで、二種類のフェレドキシンのいずれもがひとつの 4 鉄 4 硫黄クラスターを持つことを明らかにしている。各遺伝子の発現解析も行っており、そのうち片方が主要なフェレドキシンとして機能していることを明らかにしている。

第三章では、フェレドキシンの酸化還元に関わる酵素として TK-6 株のドラフトゲノム配列から発見されたフェレドキシン NADP⁺オキシドレダクターゼ(以下 FNR)の解析を行っている。本菌の FNR は既知のものとは異なり、FAD ではなく FMN をコファクターとして有する新規の酵素であることを明らかにしている。また、活性測定の結果から、本酵素は生体内で還元型フェレドキシンを電子供与体として NADP⁺の還元を行い、生体内における様々な同化的反応に還元力を供給していると予想している。また、TK-6 株におけるエネルギー代謝のメカニズムについても考察している。

第四章では、第一章・第二章でそれぞれ精製した POR とフェレドキシンを用いて、POR

の炭酸固定反応の測定系を構築している。同菌由来の 2-オキソグルタル酸フェレドキシンオキシドレダクターゼと好熱菌 *Thermus caldophilus* 由来の乳酸デヒドロゲナーゼをカップリング反応に利用することで、試験管内で POR による炭酸固定反応を再現し、本菌の POR が炭酸固定反応を触媒することを証明している。さらに電子常磁性共鳴法を用いて、同反応における中間体酵素の解析を行い、反応中に、活性中心である TPP と基質であるアセチル CoA が結合して生じるヒドロキシエチル TPP ラジカルが重要な反応中間体であることを示している。同時に、外部電子伝達体であるフェレドキシンからの電子の供給が同ラジカル中間体の生成に必要なことを明らかにしている。得られた結果から、POR による炭酸固定反応機構のモデルを提唱している。

以上、本論文では TK-6 株由来の POR を材料に、その炭酸固定反応機構の解析を行っている。本研究は TK-6 株のエネルギー代謝・炭素代謝について重要な知見を明らかにしただけでなく、POR による炭酸固定反応が多くの嫌気性独立栄養微生物において重要な反応であることから、地球上の炭素サイクルを理解する上でも重要な研究であるといえる。また、地球上の二酸化炭素有機化能力を評価するという面において、二酸化炭素による地球温暖化の評価にも寄与する研究である。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位としてふさわしいと認めた。