

氏名	かな お ただ よし 金 尾 忠 芳
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2200 号
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON THE REDUCTIVE TRICARBOXYLIC ACID CYCLE FROM THE GREEN SULFUR BACTERIUM <i>CHLOROBIVM LIMICOLA</i> (緑色硫黄細菌 <i>Chlorobium limicola</i> における還元的 TCA 回路に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 中 忠 行 教 授 青 山 安 宏 教 授 木 村 俊 作

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、非カルビン型炭酸固定代謝経路の一つである還元的 TCA 回路により独立栄養的に生育する緑色硫黄細菌を自然界から単離・同定し、その還元的 TCA 回路の鍵酵素について遺伝子構造と酵素学的性質を解明することにより、炭酸固定代謝の制御についてまとめたものであり、序論、本論4章、および結論からなっている。

序論では、地球温暖化の原因となる大気中の CO<sub>2</sub> 濃度の上昇と、その対策として生物的炭酸固定の多様性と重要性、および還元的 TCA 回路について述べた後、還元的 TCA 回路により独立栄養増殖する緑色硫黄細菌について、その生態系での役割や酸素非発生源型光合成の特徴と研究の現状が述べられている。

第1章は、自然界からの非カルビン型独立栄養微生物の分離と、得られた緑色硫黄細菌の菌学的諸性質の検討結果についてまとめたものである。単離された緑色硫黄細菌 M1 株は、中温性の絶対嫌気性光合成独立栄養細菌で 16S rRNA の塩基配列および光合成色素による生菌体吸収スペクトルなど菌学的諸性質は *Chlorobium limicola* のものとほとんど一致した。従って本菌株を *Chlorobium limicola* M1 株と同定した。

第2章は、*C. limicola* M1 株における還元的 TCA 回路の鍵酵素である ATP-citrate lyase (ACL) の部分精製、N-末端アミノ酸配列の解析、ACL 遺伝子のクローニングと解析、および組換え型酵素の生化学的性質についてまとめたものである。ホモ4量体構造を持つ哺乳類由来の ACL とは異なり、*Ci*-ACL は *aclB*, *aclA* の2つの遺伝子由来のサブユニットからなるヘテロ8量体構造 ( $\alpha\beta$ )<sub>4</sub> であることが判明し、両サブユニットとも活性には必須であった。精製酵素には逆反応である citrate synthase 活性は検出されず、本酵素が回路の方向性を決定していることを明らかにした。この結果は、還元的 TCA 回路に関する ACL について初めて得られた成果である。

第3章では、組換え型 *Ci*-ACL の生化学的的特性の解析および反応機構の解明に焦点を絞り述べられている。反応速度論的な解析では、基質であるクエン酸に対して強い負の協同性を示すこと、および各サブユニットに対する解離定数を決定している。ACL についてこのような負の協同性が示されたのは初めてである。ATP に関してはミカエリス-メンテン型の反応速度論に従っており ( $K_m=0.21\pm 0.04\text{mM}$ )、また ADP は ATP に対して競争阻害 ( $K_i=0.037\pm 0.006\text{mM}$ ) していた。本酵素の持つこれらの性質から、*Ci*-ACL は還元的 TCA 回路の方向を決めるだけでなく、細胞内のエネルギー状態に依存して代謝流束を調節する役割を持つという生理的意義が示された。さらにタンパク質の一次構造解析、当該遺伝子の部位特異的変異、および放射能標識された ATP を用いた実験により、*AclA* の His273 残基がリン酸化されることが必須であり、この反応段階が活性を左右することを示した。両サブユニットを解離させる実験から、*AclB* は高効率のリン酸化と構造の安定化に寄与していると考えられた。

第4章では、炭酸固定反応に関わる isocitrate dehydrogenase (IDH) についての解析結果が述べられている。一般に IDH は TCA 回路においても存在し、イソクエン酸の脱炭酸と NAD(P)H などの還元力を提供する役割を担っている。脱

炭酸酵素としての働きについては多くの研究が行われているが、これを炭酸固定酵素として捉えた研究の報告例は皆無に等しい。筆者らは本菌の IDH 遺伝子を大腸菌内で発現させ、組換え型酵素を精製して炭酸固定酵素としての性質検討を行い、酵母由来の IDH と比較検討した。その結果、酵素の至適 pH における各基質に対する  $K_m$  値などに大きな差は観察されず、両者とも脱炭酸反応を優位に触媒する傾向が見られた。しかしながら生理的な菌体内 pH である中性付近では、本菌由来の IDH は炭酸固定に適していたが、酵母由来の IDH の炭酸固定反応は脱炭酸反応の僅か 5 分の 1 程度であった。従って本菌由来の IDH は、より炭酸固定反応を触媒するのに適したものである事が証明された。更に回路の中間代謝物であるオキサロ酢酸で顕著に阻害される事から、オキサロ酢酸による本回路のフィードバック代謝制御が示された。

結論では、本論文で得られた成果について要約している。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、非カルビン型炭酸固定代謝経路の一つである還元的 TCA 回路により独立栄養的に生育する緑色硫黄細菌を自然界から単離・同定し、その還元的 TCA 回路の鍵酵素について遺伝子構造と酵素学的性質を解明するとともに、炭酸固定代謝の制御特性についてまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 自然界より緑色硫黄細菌を単離し、菌学的諸性質を検討した結果、*Chlorobium limicola* と同定した。
2. 単離された *C. limicola* M1 株を題材に還元的 TCA 回路の鍵酵素の一つである ATP-citrate lyase (ACL) について解析を行った。本菌の ACL は、哺乳類由来の ACL (ホモ 4 量体構造) とは異なり、*aclB*, *aclA* の 2 つの遺伝子由来のサブユニットから構成されたヘテロ 8 量体構造 ( $\alpha\beta$ )<sub>4</sub> であり、*AclB*, *AclA* 両サブユニットともに活性には必須であった。組換え型 ACL は逆反応を触媒せず、ADP により阻害される事、および基質であるクエン酸に対して強い負の協同性を示す事を明らかにした。これらの性質から ACL は回路における代謝の流束と方向をエネルギー状態によって制御していることを示した。この結果は、還元的 TCA 回路における ACL の役割を初めて明快に示したものである。
3. ACL の複雑な反応機構の解明を行った。ATP により *AclA* の His273 残基がリン酸化される事を、一次配列の解析、放射能標識された核酸や部位特異的変異酵素を利用して明らかにした。さらに *AclA*, *AclB* 各サブユニットの役割についても推定した。
4. 還元的 TCA 回路の Isocitrate dehydrogenase (IDH) について、炭酸固定酵素としての性質を明らかにした。本菌の IDH は、生理的 pH で脱炭酸と炭酸固定の両反応を触媒するので、還元的 TCA 回路における炭酸固定酵素として充分機能し得ることが判明した。

以上、要するに、本論文は非カルビン型炭酸固定代謝経路の一つである還元的 TCA 回路に関する酵素の諸性質を生化学的に検討することにより、代謝制御機構を明らかにしたものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成14年10月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。