

氏名	ぬの　　うら　　たく　　ろう 布　　浦　　拓　　郎
学位(専攻分野)	博　　士　(農　　学)
学位記番号	農　　博　　第　1258　号
学位授与の日付	平成 14 年 3 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	農学研究科応用生物科学専攻
学位論文題目	Study of Aerobic Respiratory Chain of Novel Facultative Aerobic and Hyperthermophilic Archaeon <i>Pyrobaculum oguniense</i> (通性好気性の新規超好熱古細菌 <i>Pyrobaculum oguniense</i> の好気呼吸鎖に関する研究)
論文調査委員	(主　査) 教授 内田有恆　　教授 加藤暢夫　　助教授 左子芳彦

論　文　内　容　の　要　旨

好気的環境への適応は、生物の進化に大きな影響を与えたと考えられる。好気的環境への適応には酸素が有する毒性に対する防御機構の発達と共に、好気呼吸の獲得が必要不可欠であった。好気呼吸鎖は大腸菌などの常温菌やミトコンドリアにおいて研究が進められ、その機構がほぼ明らかにされている。一方、超好熱菌では、酵素化学的研究とそれらの遺伝子の分子進化に関する研究が行われ、Bacteria と Archaea の分岐以前の生物が既に好気呼吸を行っていたのではないかとする説が提唱されている。しかし *in vivo* における解析は極めて限られているのが現状である。そこで本論文では好気性超好熱古細菌における好気呼吸鎖成分の解明と、好気環境への適応機構を明らかにするため、新規な通性好気性超好熱古細菌 *Pyrobaculum oguniense* の好気呼吸鎖成分を生化学的に解析すると共に、好気呼吸鎖に関わる遺伝子群の転写解析を行っている。主な内容は以下の通りである。

第 1 章においては、これまでの好気性超好熱菌での好気呼吸に関する研究背景について論述し、本研究の目的を明確にしている。

第 2 章においては、熊本県阿蘇郡小国町の杖立温泉より新規な通性好気性超好熱古細菌 *Pyrobaculum oguniense* を分離し、その諸性質を明らかにし、本菌が既知の *Pyrobaculum* 属とは種レベルで異なることを示している。

第 3 章においては、本菌の好気培養細胞及び嫌気培養細胞の細胞膜成分を調製し、酸素消費を測定したところ、好気培養細胞では NADH 及び succinate を基質とした酸素消費が、また嫌気培養細胞からも NADH を基質とした酸素消費が認められることを明らかにし、さらに、好気培養細胞、嫌気培養細胞のいずれからも TMPD oxidase 活性及び bovine cytochrome *c* oxidase 活性が検出されることを示している。

第 4 章では、好気及び嫌気培養細胞の細胞膜画分の酸化還元スペクトル、CO 吸収差スペクトルの測定、細胞膜画分中のヘムタンパクの解析等を行い、好気培養細胞中のみ heme As を含む cytochrome *aa3* あるいは *ba3* 型の末端酸化酵素の存在することを示唆している。また、好気及び嫌気培養細胞に heme Opl を含む *bo3* 型の末端酸化酵素が存在すること、ヘム染色により好気及び嫌気培養細胞に存在する cytochrome *c* は両培養細胞で恒常的に存在することも明らかにしている。

第 5 章では、近縁種 *P. aerophilum* の末端酸化酵素遺伝子情報に基づき、末端酸化酵素遺伝子を探索したところ、*P. oguniense* は SoxM 型、SoxB 型の 2 種の末端酸化酵素遺伝子を持つこと、また SoxB 型末端酸化酵素遺伝子と cytochrome *bc* complex 遺伝子がクラスターを形成することを明らかにしている。また、2 種の末端酸化酵素の subunit II のアミノ酸配列には CuA 結合残基が保存されており、いずれの末端酸化酵素も cytochrome *c* oxidase であること示している。これら 2 種の末端酸化酵素及び cytochrome *bc* complex 遺伝子の転写量の変化を解析したところ、SoxM 型末端酸化酵素は好気条件下で多量に転写されること、また、cytochrome *bc* complex 及び SoxB 型末端酸化酵素は嫌気条件下でも好気条件下と同様、恒常的に転写されていることを明らかにしている。一方、好気培養細胞の細胞膜画分より、heme As を含む末端酸化酵素の精製をおこない、cytochrome *aa* を含む成分が *aa3* 型の末端酸化酵素であるとしている。*aa3* 型の末端酸化酵素に含まれ

る heme As は好気培養細胞からのみ検出され、遺伝子解析で明らかになった SoxM 型末端酸化酵素に相当すると考えている。さらに、cytochrome *bo* を含む成分の部分精製をおこない、この cytochrome *bo* が末端酸化酵素である可能性を示唆している。この cytochrome *bo* に含まれる heme Opl は嫌気培養細胞の細胞からも検出されており、cytochrome *bo* は恒常的に発現していると考えている。従って、この cytochrome *bo* は、遺伝子解析で明らかになった SoxB 型末端酸化酵素に相当するものと推定している。

第 6 章では、以上の研究を総括して、通性好気性超好熱古細菌 *P. oguniense* は好気呼吸鎖として NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome *bc* complex, *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase 及び *bo* 型 cytochrome *c* oxidase を持つこと、さらに *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase を除く成分は嫌気培養時にも発現しているものと結論づけている。

論文審査の結果の要旨

80°C 以上の高温環境を至適条件とする超好熱菌の生息環境は非常に還元的であると考えられる。これまで酸素呼吸は進化的に新しいシステムであると考えられていたこともあり、好気条件下で増殖する超好熱菌の報告は極めて少なく、その呼吸鎖の研究は遅れていた。本研究は進化的に古いと考えられる超好熱古細菌の好気環境への適応機構及び好気呼吸系の進化を知るため、新規な好気性超好熱古細菌の分離を行い、その好気呼吸鎖を生化学的、分子生物学的手法を用いて解析したものである。

評価すべき点は以下の通りである。

(1)熊本県阿蘇郡小国町の杖立温泉より新規な通性好気性超好熱古細菌 *Pyrobaculum oguniense* を分離し、DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより、既知の *Pyrobaculum* 属の種と遺伝子レベルで大きく異なることを明らかにすると共に、増殖生理における他種との違いを明らかにした。*P. oguniense* とその近縁種 *P. aerophilum* は、超好熱古細菌では初めて見いだされた好気性種と微好気性種が近縁関係にある例である。さらに、これら 2 種を除く *Pyrobaculum* 属の種はいずれも偏性嫌気性であり、偏性嫌気性種と好気性種が一つの属の中に存在する例も *Pyrobaculum* 属のみである。このように、本菌並びに *Pyrobaculum* 属は、超好熱古細菌が好気環境へ適応する仕組みを研究する上で貴重な材料を提供した。

(2)末端酸化酵素を含む好気呼吸鎖が嫌気培養細胞にも存在することを、細胞膜画分の生化学的解析ならびに、末端酸化酵素および cytochrome *bc* complex 遺伝子の転写解析により明らかにした。嫌気条件における末端酸化酵素の存在はこれまで *Rhodobacter sphaeroides* 等の紅色非硫黄細菌で酸素センサーとして機能していることが知られているのみであり、古細菌では初めての知見であるばかりでなく、好気呼吸系の機能や進化を考える上でも非常に貴重な例である。

(3)SoxB 型及び SoxM 型の 2 種の末端酸化酵素を有することを明らかにし、転写解析の結果、酸素分圧によりそれぞれが別々の制御を受けていることを示した。呼吸鎖の研究が行われている既知の好気性超好熱古細菌のほとんどが SoxB 型及び SoxM 型の 2 種の末端酸化酵素を有することが明らかになっているが、本研究は 2 種の末端酸化酵素が別々の制御を受けていることを明らかにした初めての知見である。

(4)好気培養細胞より末端酸化酵素の精製を試み、*aa3* 型末端酸化酵素及び末端酸化酵素である可能性の高い cytochrome *bo* の部分精製に成功した。*Sulfolobales* 目を除く超好熱古細菌で末端酸化酵素が精製された例としては *Aeropyrum pernix* に次ぐものであり、また *Thermoproteales* 目では初めてである。更に、*bo* 型の cytochrome を古細菌で初めて見つけている。

以上のように、本論文は通性好気性超好熱古細菌 *Pyrobaculum oguniense* の好気呼吸鎖を解析し、その制御及び構成成分を明らかにした研究をまとめたものであり、極限環境微生物学や微生物生理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年2月19日、論文並びにそれ関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。