

氏名	新 家 康 弘
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	工博第2956号
学位授与の日付	平成20年3月24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 Oxidative Stress and Heat Stress Response Systems in a Hyperthermophilic Archaeon (超好熱始原菌における酸化ストレス、高温ストレス応答機構に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 今中忠行 教授 青山安宏 教授 森 泰生

論文内容の要旨

本論文は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* における酸化ストレスおよび高温ストレスへの応答機構について注目し、論じた結果をまとめたものであり、序論、本論3章、結論から構成されている。

序論では、超好熱菌の進化的な位置づけ、本研究に用いた *T. kodakaraensis* の諸性質、酸化ストレス応答機構の例及び methionine sulfoxide reductase の諸性質、微生物における熱ストレス応答機構と、細菌に見られるシャペロニンの発現調節機構、および本研究の意義などがまとめられている。

第1章では、*T. kodakaraensis* より発見された methionine sulfoxide reductase (Msr) の生化学的解析を行っている。*T. kodakaraensis* は、現在ゲノム情報が公開されている細菌、始原菌を含めた超好熱菌の中で唯一 Msr タンパク質の相同遺伝子を保有していた。Methionine sulfoxide (MetO) は酸化した硫黄原子がキラル中心となり S 体および R 体の二種類の光学異性体の形をとる。Msr は二つの光学異性体を識別し、S 体に対して MsrA が、R 体に対し MsrB が MetO を還元する。*T. kodakaraensis* 由来 Msr の一次構造を、データベース上の Msr タンパク質の一次構造と比較したところ、本菌由来 Msr は他種常温性始原菌由来 Msr タンパク質より、むしろ常温性細菌由来 MsrAB 融合型タンパク質と高い相同性を示すことが明らかになった。組換え型 Msr タンパク質は methionine sulfoxide を還元する活性を有したが、*T. kodakaraensis* 由来タンパク質としては極めて低い耐熱性を示し、その半減期は、*T. kodakaraensis* の至適生育温度以下の 80℃ で約 30 分、85℃ では 2.5 分であった。また、本酵素の最大活性は MsrA ドメインでは 60℃、MsrB ドメインでは 30℃ と、いずれの場合も *T. kodakaraensis* の至適生育温度 85℃ よりも低い温度で最大活性を示すことを明らかにした。これらの生化学的特性から本菌由来 Msr タンパク質は、常温性細菌からの遺伝子の水平伝播により *T. kodakaraensis* 内に存在することが示唆され、低温領域に特異的に機能する酵素であることが示された。

第2章では、第1章にて *in vitro* 解析を行った *T. kodakaraensis* 由来 Msr タンパク質について、細胞内での発現状況や遺伝学的解析を進めている。様々な温度で *T. kodakaraensis* を培養し、Western blot 解析を行った結果、Msr タンパク質は *T. kodakaraensis* 細胞中で、生育下限温度付近 (60-75℃) でのみ発現していることを明らかにした。また、様々な溶存酸素濃度下における *T. kodakaraensis* 細胞中の Msr タンパク質の発現量について解析を進めた結果、低温域では酸素ストレスの大きさに応答して Msr の発現量が増大することを明らかにした。さらに *T. kodakaraensis* の *msr* 遺伝子破壊株を構築し、酸素ストレス下での増殖特性を野生株と比較した。その結果、低温領域特異的に破壊株の酸素耐性が低下していることが観察された。これらの結果から、*T. kodakaraensis* の Msr は温度の低下に伴う溶存酸素濃度の上昇に対する本菌の防御機構の一端を担っていることが明らかとなった。

第3章では、*T. kodakaraensis* における高温ストレスに対する応答の一つとして、chaperonin の発現機構について注目し論じている。高温ストレスに対する応答機構を解析するにあたり、筆者は新しいアプローチを検討した。*T. kodakaraensis* で開発された遺伝子操作技術を利用し、耐熱性の低いタンパク質を *T. kodakaraensis* 内で発現させ、その

タンパク質の機能維持のための応答を解析する戦略をとった。耐熱性の低いタンパク質として至適生育温度60℃の中等度好熱始原菌 *Thermoplasma volcanium* 由来PyrFタンパク質を導入した。粗酵素溶液を使用した耐熱性試験の結果、*T. volcanium* 由来PyrFは75℃で変性が始まることを明らかにした。*T. volcanium* 由来PyrF導入株についてchaperoninの発現量を野生株と比較した所、本来 *T. kodakaraensis* が至適生育温度以上の高温ストレスを受けた場合にのみ誘導合成されるchaperoninが、耐熱性の低いタンパク質 (*T. volcanium* 由来PyrF) の存在により至適生育温度以下の温度においても発現量が増加していることが明らかとなった。これにより細菌・真核生物でしか報告されていなかったunfolded protein response (変性タンパク質に対する応答) が始原菌にも存在することを明らかにした。

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、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* における酸素ストレス及び、高温ストレスに対する応答機構の解明を目標に研究した成果についてまとめたものである。得られた成果は次の通りである。

(1) *T. kodakaraensis* より発見されたmethionine sulfoxide reductase (Msr) の生化学的解析を行った。組換え型Msrはmethionine sulfoxideを還元する活性を有したが、*T. kodakaraensis* 由来タンパク質としては極めて低い耐熱性を示し、さらに、本酵素は *T. kodakaraensis* の至適生育温度85℃よりも低い温度で最大活性を示すことを明らかにした。さらに、Msrが *T. kodakaraensis* 細胞内で生育下限温度付近 (60-75℃) でのみ発現していることを明らかにした。*T. kodakaraensis* のmsr遺伝子破壊株を構築し、酸素ストレス下での増殖特性を野生株と比較、低温領域特異的に破壊株の酸素耐性が低下していることを明らかにした。以上の結果から、*T. kodakaraensis* のMsrが温度の低下に伴う溶存酸素濃度の上昇に対する本菌の防御機構の一端を担っていることを明らかにした。

(2) 高温ストレスに対する応答を調べるために新しいアプローチとして、本菌で開発された遺伝子操作技術を利用し、耐熱性の低いタンパク質を *T. kodakaraensis* 内で発現させ、そのタンパク質の機能維持のための応答を解析する戦略をとった。その結果、本来 *T. kodakaraensis* が至適生育温度以上の高温ストレスを受けた場合にのみ誘導合成されるchaperoninが、耐熱性の低いタンパク質の存在により至適生育温度以下の温度においても発現量が増加していることを明らかにした。これにより細菌・真核生物でしか報告されていなかったunfolded protein response (変性タンパク質に対する応答) が始原菌にも存在することを証明した。

以上、本論文では、*T. kodakaraensis* における酸素ストレス、高温ストレスに対する新規の防御機構を明らかにし、学術上および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定した。また、平成20年2月22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。