

氏 名	あも う なく 天 羽 拓
学 位 の 種 類	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2401 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 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 a novel aerobic hyperthermophile, <i>Pyrobaculum calidifontis</i> (新規好気性超好熱菌 <i>Pyrobaculum calidifontis</i> 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、新種の好気性超好熱菌 *Pyrobaculum calidifontis* に関する研究、具体的には好気性超好熱菌の分離とその酸素応答に関連する酵素 catalase と superoxide dismutase の解析、およびそれらの遺伝子の転写調節に関する研究の結果をまとめたものであって、序章、本論 4 章、結論から構成されている。

序論では、超好熱菌の系統学的位置付けおよびその多様なエネルギー獲得様式について現在までに明らかになっている事項がまとめられている。また活性酸素除去機構について、生物一般と超好熱菌の場合に分けて研究の現状がまとめられている。

第 1 章は、新種の好気性超好熱菌 *Pyrobaculum calidifontis* の分離、同定についてまとめたものである。筆者は好気性超好熱菌のスクリーニングを行い、フィリピンの上陸温泉より大気条件下でも生育する超好熱菌 VAI 株を分離している。VAI 株は桿菌で、好気条件下では酸素を、嫌気条件下では硝酸イオンを最終電子受容体として生育する菌であり、16S rRNA の塩基配列に基づく系統解析の結果、*Pyrobaculum* 属であることを明らかにした。しかし生理学的特性、DNA-DNA hybridization などから VAI 株は新種であることを明らかとし、*Pyrobaculum calidifontis* と名付けている。

一般に好気性生物には、酸素を代謝するのに伴い生じる活性酸素などの酸化ストレスに対する防御機構が不可欠であり、そこでさらに *P. calidifontis* の酸化ストレス防御機構について研究が進められている。

第 2 章では、*P. calidifontis* より catalase を精製し、その酵素化学的特性を解析している。精製した catalase は一般的によく知られているヘムを有する catalase ではなく、Mn catalase であることを含有金属の測定、生化学的解析、遺伝子の解析などにより明らかにしている。Mn catalase は始原菌で初めての報告である。また近年多くの始原菌の全ゲノム配列が明らかになっているにもかかわらず、いずれにも Mn catalase の相同遺伝子が存在しないことから、この遺伝子が好熱性細菌からの水平伝播により獲得されたのではと結論づけている。

第 3 章では、*P. calidifontis* より superoxide dismutase (SOD) を精製し、解析している。精製した SOD には活性中心の金属として Mn のみが含まれていたが、組換え酵素を用いた *in vitro* の実験により Mn でも Fe でも SOD 活性を示すことを明らかにしている。比活性値は Mn-SOD の方が高いが、Fe の方が SOD に取り込まれやすいことから、*P. calidifontis* の細胞内でも Fe を利用しているのではないかと仮定をたて、いくつかの培養条件から SOD を精製し、その結果、嫌気条件下で培養した菌体から精製した SOD には主に Fe が含まれていること、および好気条件では MnSOD が利用されていることを明らかにしている。

第 4 章は、Mn catalase と SOD の発現調節についてまとめている。両酵素活性は好気培養細胞でのみ顕著に認められ、さらに両遺伝子が構成的に発現しているのではなく、外的環境により転写レベルで調節されていることを Northern blot 解析により明らかにしている。また細胞を酸素にさらすと両酵素が素早く生合成されることを Western blot 解析により明らかにしている。これらの結果から、酸素あるいは酸化ストレスによりこの応答を引き起こす転写因子が存在すると考えられ

たので、両遺伝子上流配列と細胞破碎液中のタンパク質との結合を調べ、catalase 遺伝子上流-56~-28塩基の領域に転写因子と予想されるタンパク質が特異的に結合していることを明らかにしている。

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、超好熱菌の中でもめずらしい好気性菌を分離・同定、さらにその酸素応答機構に関する研究を行い、その成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 好気条件下で生育する超好熱菌をフィリピンの上陸温泉より分離した。
2. 分離した超好熱菌の生理学的特性の解析、16S rRNA の配列に基づく系統解析などから新種であることを明らかにし、*Pyrobaculum calidifontis* と名付けた。
3. *P. calidifontis* より catalase を精製し、生化学的解析などを行い、一般的なヘムを有するタイプの catalase ではなく Mn catalase であることを明らかにした。
4. Mn catalase は始原菌で初めての報告であり、この遺伝子の相同遺伝子が他の始原菌ゲノム中になく、遺伝子の水平伝播により獲得されたものと推定した。
5. *P. calidifontis* より superoxide dismutase (SOD) を精製、生化学的解析などを行い、活性中心の金属が Mn でも Fe でも SOD 活性を示すことを明らかにした。
6. *in vitro* および *in vivo* において、Mn と Fe の SOD 活性中心への取り込みを比較した。好気条件下では MnSOD が、嫌気条件下では FeSOD が利用されていることを示した。
7. Mn catalase と SOD 遺伝子が酸素の存在により転写レベルで調節されていることを明らかにした。
8. Mn catalase 遺伝子の転写調節タンパクの DNA 結合領域を明らかにした。

以上、本論文は耐熱性酵素の供給源である超好熱菌の中ではめずらしい好気性菌を分離、分子状酸素の関与する酵素およびその遺伝子調節を解析したものであり、学術上、実際に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16年2月19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。