

# 論文内容の要旨

申請者氏名 大畑 奈緒子

低栄養性細菌は極限栄養状態の環境下においても増殖可能な細菌群であり、明確な定義はないが、1-10 mg/L 以下の炭素源でも生育可能な微生物とするのが一般的である。低濃度の炭素源で生育できることから、応用微生物学上有用であると考えられるが、低栄養性細菌についての研究はほとんど行われていない。そこで本研究では備蓄原油から単離した超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株のユニークな CO<sub>2</sub> 要求性に着目し、本菌の炭酸固定に関する解析を行った。

まず、備蓄原油サンプルから種々の濃度の栄養培地を用い、低栄養性細菌の単離を試みた。単離された微生物は全体的に高 GC グラム陽性菌いわゆる放線菌の割合が高かったが、炭素源無添加の最少培地 (BM) からは N9T-4 株のみが単離され、16S rDNA 解析、形態学・生理学的特徴から *Rhodococcus erythropolis* と同定した。本菌は極端な低栄養生育を示し、寒天やシリカゲルを支持体とした BM プレートに良好に生育するが、CO<sub>2</sub> 制限下では生育せず、また炭酸水素塩の添加により CO<sub>2</sub> 制限下でも生育を示したことから、本菌の超低栄養生育は CO<sub>2</sub> に依存していることが示唆された。しかしながら、既存の炭酸固定経路の鍵酵素活性は検出されず、エネルギー源の添加も必要としないことから、本菌は新規で高効率な炭酸固定経路を有している可能性が示唆された。また、同様の培養条件を用いて、自然界から微生物の単離を試みたところ *Rhodococcus* 属、*Streptomyces* 属の放線菌が単離され、N9T-4 株のような CO<sub>2</sub> 要求性超低栄養性細菌は自然界に広く分布している可能性を示した。

次に N9T-4 株の低栄養生育時に発現するタンパク質についてディファレンシャル二次元電気泳動解析を行った。その結果、メタノール:NDMA オキシドレダクターゼ (MNO) とアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) が低栄養特異的に発現していることを見いだした。両酵素はメタノール代謝に関連する酵素であることから、ホルムアルデヒド分解能について検討した結果、本菌は高濃度のホルムアルデヒド除去能を持ち、その活性が低栄養特異的に発現することを明らかにした。さらに、その活性は CO<sub>2</sub> によっても誘導され、上記2種の酵素が関与することを示した。また、ALDH についてはその遺伝子破壊株の取得に成功し、低栄養生育に必須であることも明らかにした。

ホルムアルデヒド固定経路としてリブローズモノリン酸経路 (RuMP 経路) の存在も示唆し、結果として N9T-4 株の低栄養生育における CO<sub>2</sub> 要求メカニズムを以下のように推定した。

(1) ALDH が関与している可能性がある未知の反応により CO<sub>2</sub> からホルムアルデヒドが生成する。(2) 生成したホルムアルデヒドは MNO によって一時的に不均化され、無毒化される。(3) MNO の逆反応により必要に応じてホルムアルデヒドが生成し、RuMP 経路により同化される。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 大畑 奈緒子

近年、地球温暖化に対する関心が高まっており、その原因の一つである CO<sub>2</sub> の排出削減が世界的な問題となっている。さらに利用可能な資源の脱石油化、いわゆるグリーンバイオの観点から、現大気中の CO<sub>2</sub> 由来のバイオマス資源の増産はこれからの地球にとって至上命題である。従って、生物による効率の良い CO<sub>2</sub> 固定（炭酸固定）系の構築はバイオサイエンスにおける重要課題の一つである。申請者が所属する研究室では産業上有用な微生物の検索および育種について研究を進めているが、本研究は低栄養性細菌に着目し、その検索の過程で見いだされた新しい CO<sub>2</sub> 要求性に関するものである。低栄養性細菌についての基礎的研究はほとんど行われておらず、応用についても限られているのが現状であるが、培養コストなどの観点から今後重要視され得る微生物群である。

申請者はまず、研究室の別プロジェクトで使用されていた備蓄原油を微生物源とし、様々な栄養源濃度の培地を用い、低栄養性細菌の単離を試みた。その中から炭素源無添加の無機塩からなる培地で生育可能なグラム陽性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株を単離した。申請者は培養環境中から CO<sub>2</sub> を除去する方法を独自に考案し、これまでの独立栄養性細菌に必要なエネルギー源の添加を必要としないユニークな CO<sub>2</sub> 要求性を見いだした。さらに、N9T-4 株のような CO<sub>2</sub> 要求性を示す超低栄養性細菌は広く自然界にも存在している可能性を示した。

次に対象を N9T-4 株に絞り、その CO<sub>2</sub> 要求性について生化学・分子生物学的検討を進めた。まず、プロテオーム解析により本菌の低栄養生育に特異的に発現するタンパク質として MNO と ALDH を同定した。両酵素はメタノール代謝関連酵素であることから、本菌のホルムアルデヒド除去活性に着目し、低栄養条件で培養した菌体が高濃度のホルムアルデヒドを除去する活性を有していることを示すと同時に、上記酵素が誘導されていることを見いだした。さらに、両酵素活性は CO<sub>2</sub> によっても誘導されることを明らかにし、低栄養条件で CO<sub>2</sub> からホルムアルデヒドが生成している可能性を示した。上記酵素のうち、ALDH についてはその遺伝子破壊株の取得に成功し、本菌の低栄養生育に必須であることを明らかにしている。「低栄養性」と「CO<sub>2</sub> 要求性」という現象に、生化学的検討で見いだした「ホルムアルデヒド代謝」を加えることにより、CO<sub>2</sub> からホルムアルデヒドが生じ、既知のホルムアルデヒド固定経路へと流れる新しい CO<sub>2</sub> の固定メカニズムを提唱するに至った。

以上のように、本論文は超低栄養性細菌のユニークな CO<sub>2</sub> 要求性と新しい炭酸固定経路の提唱を行ったものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。