

論文内容の要旨

申請者氏名 矢野 嵩典

当研究室で備蓄原油中より単離したグラム陽性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素源無添加の完全無機塩からなる固体培地で良好に生育し、その生育に CO_2 を要求するという超低栄養性を示す。しかしながら、既知の独立栄養性細菌に見られるような光、金属などのエネルギー源の添加を全く必要としない。従って、本菌は従来の菌とは異なるユニークな「低エネルギー型炭酸固定系」を有している可能性がある。本研究では本菌の炭酸固定経路の全容解明を目的として、(1)ガス状炭素化合物の資化性、(2)ランダム変異導入ライブラリーを用いた低栄養生育に必須な遺伝子の同定、(3)トランスクリプトーム解析による低栄養条件で特異的に発現する遺伝子の同定などから、本菌の低栄養生育における炭素代謝を考察した。

最初に、これまでに検討されていなかった大気中に存在し得るガス状炭素化合物 (CO_2 , CO , CH_4) の資化性および生育への影響を調べた。その結果、 CO_2 制限条件下において、 CO が炭素源になることを見出した。しかしながら、この CO 資化性とゲノム上に存在する CO 脱水素酵素遺伝子との関連性は認められなかった。

次に、低栄養生育に必須な遺伝子の同定を目的として、新たに本菌のランダム変異ライブラリーを構築し、低栄養生育不能な変異株の取得を試みた。得られた変異株は、イソクエン酸リアーゼ遺伝子 (*aceA*)、リンゴ酸シンターゼ遺伝子 (*aceB*)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子 (*pckG*) の一部または全てを欠失している 3 つのグループに分かれた。*AceA* および *AceB* はグリオキシル酸経路を構成する酵素であることから、本菌の低栄養生育にはグリオキシル酸経路を必須であることが明らかとなった。また、*PckG* は糖新生に関与する酵素の 1 つであることも合わせて、本菌の低栄養性は TCA 回路を基軸とする炭素代謝に関与している可能性が示唆された。そこで、本菌の TCA 回路を検証した結果、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素の代わりに、 α -ケトグルタル酸脱炭酸酵素が関与する変形 TCA 回路が機能していることが明らかとなった。

次にマイクロアレイ解析による低栄養条件で特異的に発現する遺伝子の同定を試みた。その結果、メタノール脱水素酵素、ホルムアルデヒド脱水素酵素、NADH オキシダーゼをコードする各遺伝子の著しい発現が認められた。また、アセチル-CoA シンターゼ、アセチル-CoA カルボキシラーゼをコードする各遺伝子の高発現も確認できた。以上の結果から、本菌の低栄養性に関する以下のような仮説を立てた。(1)大気中に存在する微量アルデヒドを酸化し、エネルギー源として利用する、(2)アルデヒドから酢酸を経てアセチル-CoA に変換し、C2 代謝が起こる、(3)本菌の CO_2 要求性は主としてアセチル-CoA への炭酸固定、つまり脂質合成に関連すると予想できる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 矢野 嵩典

当研究室で単離された *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素源無添加の完全無機塩からなる固体培地で良好に生育し、その生育に CO_2 を要求するが、その生育には光、金属などのエネルギー源の添加を全く必要としないという極めてユニークな超低栄養性を示す。これまでにない低エネルギー型炭酸固定系を有し、産業応用的にも可能性を秘めていると考えられたので、これまでに様々な検討がなされてきたが、本菌の低栄養性、炭酸固定経路の全容解明には至っていない。申請者は主に生化学的な手法を駆使することにより、これまでとは別の視点から本菌の炭素代謝に関する研究を展開し、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

1) 本菌のガス状炭素化合物の資化性、生育への影響を検討し、 CO_2 制限条件下で CO も炭素源として資化できることを明らかにした。ゲノム上に存在する CO 脱水素酵素遺伝子オルソログの関与は否定されたが、本菌が CO_2 以外の大気中成分を利用できるという重要な知見である。

2) ランダム変異ライブラリーから低栄養性欠損株を取得し、*aceA*、*aceB* および *pckG* が低栄養生育に必須であることを明らかにした。これらの結果より、グリオキシル酸経路と糖新生が低栄養生育に必須であることを明らかにした。また、本菌においては変形 TCA 回路が機能していることを予想した。変形 TCA 回路の存在は数種の生物で認められているが、その機能は不明である。申請者は後述のアセチル-CoA の合成に関連して、CoA の節約という新たな機能を提唱している。

3) マイクロアレイ解析によって低栄養条件で特異的に発現する遺伝子として、メタノール脱水素酵素 (MDH)、ホルムアルデヒド脱水素酵素 (nFADH)、NADH オキシダーゼ (NUO) をコードする各遺伝子を同定した。MDH および nFADH の発現については過去のプロテオーム解析と一致する結果であるが、NUO の高発現は新たな知見であり、後述のアルデヒドからのエネルギー獲得を示唆するものである。その他、発現が高かったものとして、アセチル-CoA シンテターゼ、アセチル-CoA カルボキシラーゼをコードする各遺伝子を同定し、大気中に存在するアルデヒド類をエネルギー源かつ炭素源とし、 CO_2 要求性はアセチル-CoA への炭酸固定に依るものであるというユニークな仮説を提唱した。アセチル-CoA を初発とする C_2 代謝の可能性は上記グリオキシル酸経路の重要性を支持するものである。本研究ではその証明には至らなかったが、現在 LC-MS などを用いたメタボローム解析によって仮説の証明を試みている。

以上のように、本論文はこれまで未知であった N9T-4 株の炭素代謝の一端を明らかにし、新たな仮説を提唱したものであり、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。