

論文内容の要旨

申請者氏名 河野 卓成

カルビンサイクルは植物や藻類、光合成細菌等の光合成生物が利用する、光合成反応における主要な CO₂ 固定経路であり、11 種の酵素が触媒する 13 反応ステップから構成されている。その中でも CO₂ 固定酵素である ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) と、ribulose-5-phosphate (Ru5P) から RuBisCO の CO₂/O₂ アクセプター基質である ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) を合成する phosphoribulokinase (PRK) は、RuBisCO とともに本回路の鍵酵素である。本研究では、非光合成生物であるアーキアが有する 2 つのカルビンサイクル鍵酵素ホモログの機能及びアーキアと光合成生物の関連性の解明を目的とした。

本研究では、メタン菌 *Methanospirillum hungatei* を主な研究対象として解析を進めた。*M. hungatei* 由来 RuBisCO ホモログと PRK ホモログを大腸菌から組換えタンパク質として精製し、解析したところ、それぞれ CO₂ 固定活性と PRK 活性が検出された。また、アーキア型と光合成型 PRK の構造比較を行うため、松村浩由博士ら (立命館大) との共同研究として、*M. hungatei* PRK の結晶構造解析を行った。その結果、*M. hungatei* PRK とバクテリア型、植物型 PRK とのアミノ酸配列相同性は約 30% 程度と低いものの、単量体構造は両者とも非常に類似性が高いことを明らかにした。

さらに、蘆田弘樹博士、蓮沼誠久博士ら (神戸大) との共同研究として、アーキア生体内における RuBisCO と PRK が機能する代謝経路を明らかにするために、NaH¹³CO₃ を用いた ¹³C 標識メタボローム解析を行った。その結果、*M. hungatei* を始めとする RuBisCO と PRK を持つアーキアにおいて、カルビンサイクルとは一部の反応ステップのみが異なっている「原始カルビンサイクル」とも言える新規炭素代謝経路「Reductive hexulose phosphate pathway (RHP) 経路」の存在を明らかにした。

本研究によって、これまでに同定されていた光合成型 PRK に加え、アーキア型 PRK の存在を明らかにした。また、*M. hungatei* を含む一部のアーキアにおいて、RuBisCO と PRK を利用した新規炭素代謝経路 (RHP 経路) を発見した。RHP 経路とカルビンサイクルは数ステップのみが異なっていること、またアーキアの進化的位置から、この RHP 経路がカルビンサイクルの進化的原型であると考えられる。本研究では、アーキアにカルビンサイクルの祖先経路を見出し、光合成システムの基盤がアーキアで構築されていたことを明らかにしたものである。今後、アーキアからの光合成生物進化を議論する上で、重要な知見になると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 河野 卓成

植物をはじめとする光合成生物が CO₂ 固定に利用しているカルビンサイクルは、これまで光合成生物のみが利用し、その進化的議論もこれら生物間でのみ行われてきた。そのため、カルビンサイクルがどのように確立されてきたのか、またその進化的起源はどのような代謝系だったのかは、これまで全く不明であり、光合成研究分野の興味を大いに惹いていた。これらの課題にアプローチするために、本論文では、非光合成生物であり、生物進化的に光合成生物が出現するよりも前に出現したと考えられているアーキアであるメタン菌に発見したカルビンサイクルに特有の酵素である ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) と phosphoribulokinase (PRK) の遺伝子ホモログの機能解析を行っている。

メタン菌である *Methanospirillum hungatei* の RuBisCO と PRK ホモログを大腸菌から組換えタンパク質として精製し、解析したところ、それぞれが RuBisCO と PRK としての酵素触媒能を有していることを明らかにした。また PRK に関して、X 線結晶構造解析を行うことにより、非光合成生物型 PRK の立体構造を初めて決定するとともに、メタン菌 PRK と光合成 PRK の全体的な構造と触媒部位の構造が類似していることを明らかにした。さらに、*M. hungatei* における RuBisCO と PRK の生体内機能を解析するために、菌体を用いた ¹³C 標識メタボローム解析を行うことで、取り込まれた炭素の行方の経時変化を追跡した。その結果、本メタン菌においては、RuBisCO によって固定された炭素が解糖系や糖新生へ供給されていることが明らかになった。さらに、メタボローム解析の結果により、RuBisCO と PRK が機能する新規な炭素代謝経路である Reductive hexulose phosphate pathway (RHP) 経路を発見した。RHP 経路は、光合成カルビンサイクルの fructose-6-phosphate から ribulose-5-phosphate までの代謝ステップがアーキアやバクテリアに特有な ribulose monophosphate pathway に置換されたカルビンサイクルと ribulose monophosphate pathway のハイブリッド経路であった。ribulose monophosphate pathway 部分で機能する 6-phospho-3-hexuloisomerase と hexulose-6-phosphate synthase の遺伝子も同定している。これらの結果とアーキアの進化的位置から、RHP 経路が光合成カルビンサイクルの進化的原型であるという光合成の進化仮説を提唱している。

以上のように、本論文はアーキアであるメタン菌において、RuBisCO と PRK が機能する光合成カルビンサイクルの進化的原型と考えられる新規な炭素代謝経路を明らかにするとともに、光合成カルビンサイクルの進化仮説を提唱したもので、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。