

論文内容の要旨

博士論文題目 Cloning and Characterization of *nif* Structural and Regulatory Genes in the Purple Sulfur Bacterium, *Halorhodospira halophila*
紅色硫黄細菌 *Halorhodospira halophila* 由来ニトロゲナーゼ遺伝子のクローニングとその性質

氏 名 對比地 久義

(論文内容の要旨)

次世代エネルギー生産技術の1つに光合成細菌を用いた光生物学的水素生産が注目されている。こうした試みは主にUV照射による変異体の単離により行われているが、水素発生効率の向上には限界がある。本研究では好塩性の紅色硫黄細菌 *Halorhodospira halophila* (*H. halophila*) の光生物学的水素発生を応用することを念頭に置き、水素の生産に関与するタンパク質の性質を明らかにすることを目的として研究を行った。

H. halophila が光培養条件下で水素発生を行うことを確認した。文献的にはこの細菌の水素発生に関しては明確な記述がなかったが、培養中に発生する気体は99%が水素であることをはじめて示した。また、ニトロゲナーゼの構成遺伝子 *nifH*、*nifD* の全長、*nifK* の部分断片、転写調節タンパク質 NifA の全長と周辺遺伝子のクローニングに成功し、水素発生がニトロゲナーゼによるものであることを示した。これは、*H. halophila* における *nif* 遺伝子クローニングの最初の報告例である。配列比較からクローニングされた遺伝子は、同じ光合成細菌に分類される紅色無硫黄細菌の遺伝子よりも、遊離型根粒菌由来の遺伝子に近いことが示された。遊離型根粒菌は NifA を制御するタンパク質 NifL を持つが、*H. halophila* では NifL が欠損していた。NifL を持たない紅色無硫黄細菌の NifA に見出されている調節に重要な残基は、*H. halophila* の NifA には保存されていなかった。したがって、*H. halophila* のニトロゲナーゼ発現調節は別の機構によるものであることが示唆される。また、これらの結果から、分子進化と機能獲得は必ずしも一致しないことが示唆された。

転写の調節は水素発生を触媒するニトロゲナーゼを効率的に生産する上で最も重要なプロセスである。*H. halophila* の NifA の調節機構はこれまでに報告されていない機構を用いている可能性が高い。また、NifA は、エンハンサー結合タンパク質の典型例でもある。*H. halophila* の NifA の構造と性質を調べるために大量発現系の構築を行った。全長の NifA(GAF/AAA+/HTH)は精製後すぐ会合を起こし、物理化学的測定を行うことができなかった。一方、C末端部の HTH を欠損させた GA(GAF/AAA+)および GAF と THT を欠損させた TA (AAA+) は、大量精製が可能で、全長の NifA に比べて安定であった。TA は ATPase 活性部位そのものであるにもかかわらず、活性は GA が圧倒的に高く、GAF ドメインが NifA の活性を促進していることが示された。これまでエンハンサー結合タンパク質では、N 端のドメインは ATPase 活性を阻害していたが、促進するドメインはこれが最初の発見例である。

X線溶液散乱により、GAは2量体、TAは濃度依存的に環状構造の多量体を形成することが示された。他のエンハンサー結合タンパク質のAAA+ドメインの結晶構造解析から、ATPase 活性にはAAA+ドメインの環状多量体構造が必須とされていたが、GAとTAのアラニン置換変異体の実験結果から、環状構造の形成ではなくインターフェイスの形成が活性に必須であることを示唆し、これまでの説を否定した。

以上の結果に基づき、ニトロゲナーゼによる水素発生機構と転写調節機構の視点から、高効率水素生産実現への展望と問題点について議論した。

(論文審査結果の要旨)

光合成細菌の光生物学的水素発生をエネルギー源にしようとする試みが盛んに行われている。光合成細菌において、水素発生はニトロゲナーゼによる窒素固定の副産物として生じるが、水素発生効率はずしも高いものではない。水素発生効率の向上のために、変異体を分離する試みは多く行われているが、水素発生のメカニズムに基づく水素発生効率の向上を目指した研究はほとんどない。本論文は、好塩性の紅色硫黄細菌、*Halorhodospira halophila*、の水素発生を念頭に置き、ニトロゲナーゼおよびその発現調節にかかわる遺伝子のクローニングとタンパク質の性質を明らかにしようとしたものである。得られた主要な成果は、以下の通りである。

1. *Halorhodospira halophila* が光生物学的水素発生を行うこと、またその水素発生がニトロゲナーゼによるものであることを明らかにした。このバクテリアに関して、明確に水素発生を特定したのは、本論文が初めてである。
2. *Halorhodospira halophila* のニトロゲナーゼ構造遺伝子 *nifH*、*nifD* の全長および *nifK* の部分断片、調節遺伝子である *nifA* およびその近傍を得、配列を明らかにした。*H. halophila* の *nif* 遺伝子の記述はこれが初めてである。また、配列の解析から、*H. halophila* の進化系統樹での位置づけがなされた。
3. *H. halophila* では、*NifA* の活性を調節する *NifL* が保存されていないことが示された。系統樹の解析から、分子進化と機能獲得はずしも一致していないことが示唆された。
4. *NifA* を構成する GAF、AAA+、HTH ドメインのうち、GAF-AAA+および AAA+ドメインが発現、精製された。GAF ドメインは、AAA+ドメインの ATPase 活性を促進していることが示された。これまでエンハンサー結合タンパク質では、AAA+ドメインの ATPase 活性は N 端側ドメインで抑制されているとする一般説に変更を促す重要な発見である。
5. GAF-AAA+ドメインおよび AAA+ドメインの溶液構造が明らかにされた。AAA+ドメインの ATPase 活性の発現に環状構造が必要であるとされていたが、必ずしも必要でないことが示された。

以上のように、本論文では *H. halophila* の水素発生の発見、ニトロゲナーゼ遺伝子のクローニングと配列決定、調節遺伝子産物である *NifA* の活性と構造の解明と多彩な成果を得ている。*NifA* の活性と構造の評価では、これまで一般的に信じられていた説に変更を求める新しい知見を得た。これらの成果は、基礎微生物学的にもタンパク質科学的にも重要である。よって、審査員一同は、本論文が博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。