

審査の結果の要旨

氏名 グエン フー チー

本論文は、50°Cに生育至適温度を有する高温性水素細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 の炭素並びにエネルギー代謝を明らかにすることを目的としたものであり、5章からなる。

序章において、*H. thermoluteolus* TH-1 の生理等について歴史的な事柄を述べた後、研究の目的、即ち、種々の栄養条件における同菌の炭素並びにエネルギー代謝を明らかにすること、さらに、同菌を用いて有用物質を作ること、を述べている。

第一章においては、*H. thermoluteolus* TH-1 の増殖性について調べた結果を述べている。同菌は独立栄養的条件においては、最大比増殖速度 0.60h^{-1} で増殖した。従属栄養条件においては、リンゴ酸を炭素源とした時に最も高い比増殖速度 0.73h^{-1} で増殖した。さらに、二酸化炭素と有機物との混合栄養条件における増殖性についても精査し、有機物としてリンゴ酸を用いた時に最も高い比増殖速度 1.00h^{-1} で増殖することを明らかにした。同菌は、酢酸や酪酸を炭素源とした時、酢酸では 0.39h^{-1} 酪酸では 0.48h^{-1} という高い従属栄養的生育能を示したが、これらの有機物と二酸化炭素との混合栄養条件下で培養を行ったところ、30時間程度という極めて長い生育遅延が認められた。一方本菌は、カルビンベンソンサイクルによって二酸化炭素ガス固定が行われていることが既に示されている。そこで、同サイクルの鍵酵素、リブロービスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ、の活性を各種条件下で培養を行った菌体を用いて測定した。結果は、独立栄養的に培養を行った菌体から最も高い活性が得られ、次いで、混合栄養条件で培養を行った菌体からの活性が続き、従属栄養的に培養を行った菌体からは、活性は殆ど得られなかった。

第二章においては、酢酸、酪酸を炭素源として従属栄養的に生育時の各種代謝系に関して調べた結果を述べている。*H. thermoluteolus* TH-1 のゲノム中にはグリオキシル酸サイクル関連の遺伝子とピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素 (POR) の遺伝子が見出されたため、酢酸あるいは酪酸が代謝されアセチル-CoA が生成されると、グリオキシル酸サイクル経路で代謝される可能性と POR 経路で代謝される可能性とが考えられた。そこで実際に各種酵素活性を測定したところ、POR が機能しているとは認められず、一方でイソクエン酸リアーゼとリンゴ酸合成酵素の強い活性が見出されたため、同菌はグリオキシル酸

サイクルを用いて酢酸、酪酸を代謝していることが示された。

第三章では、第一章で認められた生育遅延の生化学的理由を探った結果を述べている。リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼは、その名の通り、酸素が存在しているとオキシゲナーゼ活性も示す酵素である。オキシゲナーゼ活性が機能すると、2-ホスホグルコン酸が生成される。2-ホスホグルコン酸はグリコール酸さらにはグリオキシル酸を經由して代謝されることが予想される。さらに、これらの物質には毒性が認められている。こうした背景を踏まえ、培養気相中の酸素濃度を高めていったところ、30%まで上げると、もはや生育できなくなることが見出された。このことは、オキシゲナーゼ活性により引き起こされる代謝産物が生育に対し阻害的に作用することを示している。次いで、酪酸と二酸化炭素との混合培養条件で培養を開始し（気相は、水素、酸素、二酸化炭素の混合ガス）、10時間後に一方の気相を空気に変えて培養を行ったところ、空気に変えた群はそうでない群よりも速やかに増殖が開始されることが判明した。別の実験において、二酸化炭素ガスが存在すると増殖遅延が引き起こされることが示されたため、酪酸と二酸化炭素ガスの混合培養条件下での生育遅延は、二酸化炭素ガスによるリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの誘導、さらには、誘導された酵素が発揮するオキシゲナーゼ活性により作られる代謝産物が生育に対し阻害的に作用することを示している。生育遅延から回復した菌体を用いて酵素活性測定を行い、上述したグリオキシル酸は、リンゴ酸合成酵素により代謝され得ることを示した。一方では、グリコール酸がグリオキシル酸に変換される時に生成される過酸化水素がどのように代謝され得るのかについては、以下に委ねられた。

第四章においては、独立栄養条件、酪酸を炭素源とした従属栄養条件、酪酸と二酸化炭素ガスを炭素源とした混合栄養条件下で培養を行った菌体を対象として、トランスクリプトーム解析を行った結果を述べている。上述の過酸化水素代謝系については、シトクロムペルオキシダーゼが有力な候補として上がってきている。

第五章においては、ポリβヒドロキシ酪酸 (PHB) 生成について、成分の定量や電子顕微鏡観察などからの結果を述べている。リンゴ酸を炭素源とした従属栄養条件においては mg 菌体あたり 0.54mg の PHB を 3 時間で蓄積すること、独立栄養条件においては mg 菌体あたり 0.39mg の PHB を 6 時間で蓄積することを明らかにし、*H. thermoluteolus* TH-1 が PHB の生産菌として優れたものであることを示した。さらに、将来展望についても述べている。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。