

審査の結果の要旨

氏名 金 克泰

本論文は、絶対独立栄養性好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株 (以下 TK-6 株と略) のホスホセリンホスファターゼとセリン関連代謝を調べたもので、2 章から成る。

General introduction として、絶対独立栄養性などの TK-6 株の特質を述べ、さらにホスホセリンホスファターゼ、並びにチオールを生化学的役割についても述べている。TK-6 株で見出されたホスホセリンホスファターゼに関しては以下の事柄が既に分かっていた。① 他のホスホセリンホスファターゼが金属イオンとしてマグネシウムを含んでいるのに対し、TK-6 株のホスホセリンホスファターゼは金属イオンを含んでいないこと、② ホスホセリンホスファターゼには A サブユニットと B サブユニットの 2 つのサブユニットがあり、2 量体を形成しているものの、AA あるいは AB の 2 種類だけが見出されており、BB から成る酵素は見出されていないこと、③ ホスホセリンホスファターゼの活性は A 残基が担っていること、④ 大腸菌で発現させた AA 酵素の結晶構造解析から、AA 酵素には SS 結合の存在が示されていること、である。

以上の事柄を背景として、本研究は、ホスホセリンホスファターゼは菌体内でも SS 結合を形成しているのだろうか、ホスホセリンホスファターゼは TK-6 株のセリン～グリシン代謝においてどのような役割を演じているのだろうか、ということをも明らかにするべく実施された。

第 1 章では、ホスホセリンホスファターゼの SS 結合について調べた結果を述べている。

大腸菌を用いて調製した AA 酵素さらには AB 酵素を用いて、以下を明らかにした。

AA 酵素は SS 結合を有するものと SS 結合を有さないものの混合物から成るものの、SS 結合を有さないものも 2 量体として存在し、存在比としては、SS 結合を有さない割合の方が高いことを示した。さらに、AB 酵素はほぼ 100% が SS 結合を有するものとして存在していることも明らかにした。

次いで、TK-6 株並びに A サブユニットに対する抗体を用いて菌体内の AA 酵素さらには AB 酵素の存在様式を決定した。

まず、AA 酵素は SS 結合を有するものと SS 結合を有さないものの混合物から成ることを示し、AB 酵素は SS 結合を有するものだけから成ることを明らかにした。

さらに、熱安定性と SS 結合との関係性を調べ、AA 並びに AB 酵素は SS 結

合を増やす条件下（過酸化水素存在条件下）に在ると、熱安定性が増し、SS 結合が減る条件下（ジチオスレイトール存在下）に在ると、熱安定性が減ることを示した。

外部溶液の酸化還元状態（ORP）を人為的に変化させた時の酵素の存在様式変化をゲル電気泳動により解析した結果、ORP が高くなると電気泳動における移動度が小さくなること、さらに、高 ORP 環境に置かれた酵素を低 ORP 環境に戻すと、活性が回復することを示した。高 ORP 環境下では、ヒスチジン残基の酸化やリジン・アルギニン残基のカルボニル化が生じることが期待される。一方、ホスホセリンホスファターゼでは、ヒスチジンが活性を担う残基であり、加えてヒスチジンの酸化は不可逆な反応であるため、全体を通じて起こっていることは、リジンかアルギニンのカルボニル化が生じ、電気泳動度が小さくなっているのであろうことが示唆された。なお、当該残基のカルボニル化により、その間接的な結果として活性中心のヒスチジン残基の酸化が防がれていることも示唆された。

第二章では、遺伝学的解析により、ホスホセリンホスファターゼに関する知見をさらに集積した結果を述べている。

ホスホセリンホスファターゼにおいては、サブユニット A が活性を担っているため、A 欠損株はセリンを培地に添加することにより単離した。A 欠損株は二酸化炭素だけあるいはセリンだけを炭素源とした培地には生育できず、栄養要求性株として単離された。本菌は二酸化炭素を唯一炭素源とする細菌であるため、栄養要求性株が取得されたことは、本菌の生育モードを絶対独立栄養性から混合栄養性に変えたこととなる。本実験は、微生物の栄養性を人為的に変化したこととなり、学術的に極めて興味深い事柄と言える。

上記の事柄と、セリン～グリシン間の代謝を考え合わせ、以下が討論されている。即ち、TK-6 株には二酸化炭素からグリシンを生合成する系は働いてはならず、かつ酵素学的には可逆なセリン～グリシン間の反応は、セリンからグリシン方向に働いている、という 2 点である。

サブユニット B は活性を担っていないため、B 欠損株は通常の方法により単離することができた。なお、B 欠損株をトランスクリプトーム解析に供したところ、コバルトに関わるトランスポーターの発現が亢進していることが明らかとなった。

最後に、総括と展望が述べられ、本論文は締め括られている。

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。