

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成27年度博士課程 進学
氏名 小倉 一将
指導教員 石井 正治 教授

論文題目

The metabolism of thiosulfate in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
(*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のチオ硫酸代謝)

序章

硫黄は自然界で硫化物イオン (S^{2-})から硫酸イオン (SO_4^{2-})まで幅広い酸化状態を示し、炭素、水素、酸素、窒素などと並んで、生命活動に必須な元素の一つである。生体活動において硫黄はアミノ酸やビタミンに含まれる。また還元的な無機硫黄化合物は一部の進化的に古い真正細菌や古細菌のエネルギー源となることが知られており、初期生命の代謝においては硫黄がエネルギー源とされていた可能性が示唆されている。しかし、これらの生物の硫黄代謝に関する知見は少ないのが現状である。

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 は真正細菌において最も早く分岐したと考えられている *Aquificales* に属する絶対独立栄養性の好熱性水素細菌である。これまでに本菌は、炭素代謝を始めとして多くの代謝が研究されており、その結果、特徴的な二酸化炭素固定経路である還元的 TCA サイクルや、進化的に古い可能性が示唆される数多くの新規酵素・代謝経路が発見されてきた。さらにゲノム解析は終了しており、本菌を用いた遺伝子操作技術が確立されていることから、代謝系を明らかにする上で強力なツールとなるオミックス解析、生理生化学的解析を行うことが可能である。

本菌は水素のみならず、チオ硫酸を唯一の電子源として利用することが可能である。本菌をチオ硫酸酸化条件で培養すると、培地中の pH の減少、硫黄由来の粒子の形成が確認される。さらに培養を続けると生成した硫黄粒子は減少し

ていく。これらの現象と本菌のゲノム情報を比較することで、本菌はペリプラズムの Sox システムと呼ばれる代謝でチオ硫酸を硫酸と不溶性の硫黄化合物に酸化し、サイトプラズム内で生成した不溶性硫黄化合物をさらに酸化すると考えられた。

本菌において Sox システムに関わる酵素の研究は行われているが、サイトプラズムにおける硫黄の酸化機構は推測にとどまっていた。そこで本研究では、本菌における硫黄代謝に着目し、その全貌を明らかにすることを目的とした。第1章、第2章ではそれぞれ本菌のサイトプラズムにおける硫黄酸化酵素、亜硫酸酸化酵素に着目し、第3章においては、本菌が細胞外に生成する硫黄粒子に着目して研究を行った。

第1章 Sulfur-oxidizing enzyme

第1節 Physiological analysis of sulfur-oxidizing gene

硫黄を酸化する真正細菌、古細菌のトランスクリプトーム解析によって、Heterodisulfide reductase (Hdr)-like enzyme がサイトプラズム内での硫黄の酸化を行うことが示唆されてきた。Hdr はメタン生成菌において初めて同定された酵素で、メタン生成経路の最終ステップにおいて CoM-S-S-CoB のジスルフィド結合を開裂する反応を触媒する酸化還元酵素である。Hdr を有する真正細菌では、元素硫黄をエネルギー源とした際にこの遺伝子群の発現レベルが上昇することから、メタン生成菌の Hdr とは全く異なる、硫黄の酸化反応を触媒するのではないかと示唆されてきた。一方で、本遺伝子の生理学的見解は得られてこなかった。そこで遺伝子破壊株を作製し、その表現型の解析を行った。

その結果、*hdrA* 破壊株 ($\Delta hdrA$) は野生株と比較して、生育が非常に悪くなった。チオ硫酸の消費速度は変化がなかったが、培地中の硫酸量が約半分になった。また pH の変化も見られなくなった。さらに変異株では培養液中の元素硫黄量が増加し、培養後期においても、全ての元素硫黄は酸化されなかった。従って、*hdrA* は生体内で硫黄の酸化と、チオ硫酸からのエネルギー獲得に重要な働きをすることが示唆された。

Hdr と機能的に関連する遺伝子を調べるために、マイクロアレイ解析を行った。野生株と $\Delta hdrA$ をチオ硫酸存在下で培養し、遺伝子発現プロファイルを比較した。

その結果、特に呼吸関連遺伝子について大きな発現レベルの変動が見られ、 $\Delta hdrA$ では、エネルギーをより効率的に利用しようとする傾向が見られた。また、 $\Delta hdrA$ では一部のヒドロゲナーゼの発現レベルが低下したことから、Hdr とヒドロゲナーゼの機能的関連が示唆された。

第2節 Functional analyses of glycine cleavage system genes present in *hdr* cluster

hdr クラスタは比較的大きな遺伝子クラスタであり、真正細菌では Hdr 複合体のサブユニット以外にも保存された遺伝子が存在する。グリシン開裂系の H タンパク質である *gcvH* も *hdr* クラスタ中に保存された遺伝子の一つである。本菌が持つ *hdr* クラスタ中の *gcvH* (*gcvH3* および *gcvH4*) は構成的に発現しているのにも関わらず、グリシン開裂系の酵素活性は検出されていない。そこで、*gcvH3* および *gcvH4* を異種発現し、その機能を調べた。2つの GcvH と相互作用するタンパク質を本菌の可溶画分中、膜画分中から探索したが、相互作用の力が弱かったためか、タンパク質を同定することはできなかった。

第2章 Sulfite-oxidizing enzyme

亜硫酸は主要な硫黄の酸化過程で生じる主要な中間体である。亜硫酸は強い還元力を有するため、DNA やタンパク質と容易に反応して毒性を発揮する。そのため生物は亜硫酸に対する解毒メカニズムをそれぞれ持っている。本菌ではペリプラズムに亜硫酸酸化酵素が存在することは知られていた。しかし硫黄の酸化はサイトプラズム内で行われることから、サイトプラズムに局在する亜硫酸酸化酵素の存在が示唆された。本菌の SreABC は光合成細菌において近年発見された新規な亜硫酸酸化酵素と相同性を持っていた。そこで本研究では、主に SreABC に着目し、本菌の持つ亜硫酸酸化酵素についての解析を行った。

始めに *sreA* の遺伝子破壊株 ($\Delta sreA$) を作製し、その表現型を観察した。 $\Delta sreA$ は野生株と比較して、培養液中により多くの亜硫酸の蓄積が見られたことから、本菌の *sreA* は *in vivo* で亜硫酸酸化酵素として機能することが示唆された。本菌の膜画分を用いて、SreABC による亜硫酸酸化酵素の測定を試みた。複数種の活性測定系を検討したが、酵素活性を測定することはできなかった。ペリプラズムにおける亜硫酸酸化酵素の活性が測定され、 $\Delta sreA$ においてはより強い活性が見られた。

第3章 Sulfur globule

本菌はチオ硫酸を電子源とした際に、菌体外に硫黄由来の粒子を形成する。このような現象は一部の光合成細菌においても確認されており、その性質が研究されている。しかし本菌のような好熱性細菌では、硫黄粒子の研究は進んでいない。そこで本章では、本菌が生成する硫黄粒子に着目して研究を行った。本菌をチオ硫酸存在下で培養し、スクロース溶液中を通すことで菌体と硫黄粒子を分画した。ゼータサイザーによって硫黄粒子の粒子径を測定した結果、3種類の粒子径(約 70 nm, 約 300 nm, 約 2 μm)が得られた。 SDS-PAGE によって、硫黄粒子中に特有のタンパク質が存在するか調べた。その結果、明らかに硫黄粒子特有のタンパク質が確認され、プロテインシーケンサーによってタンパク質が同定された。このタンパク質は既知の硫黄粒子関連タンパク質とは相同性のない新規なものであった。

総括

以下の図に示すような、*H. thermophilus* におけるチオ硫酸酸化代謝を提唱した。各遺伝子の生理学的な役割を推察することができた。

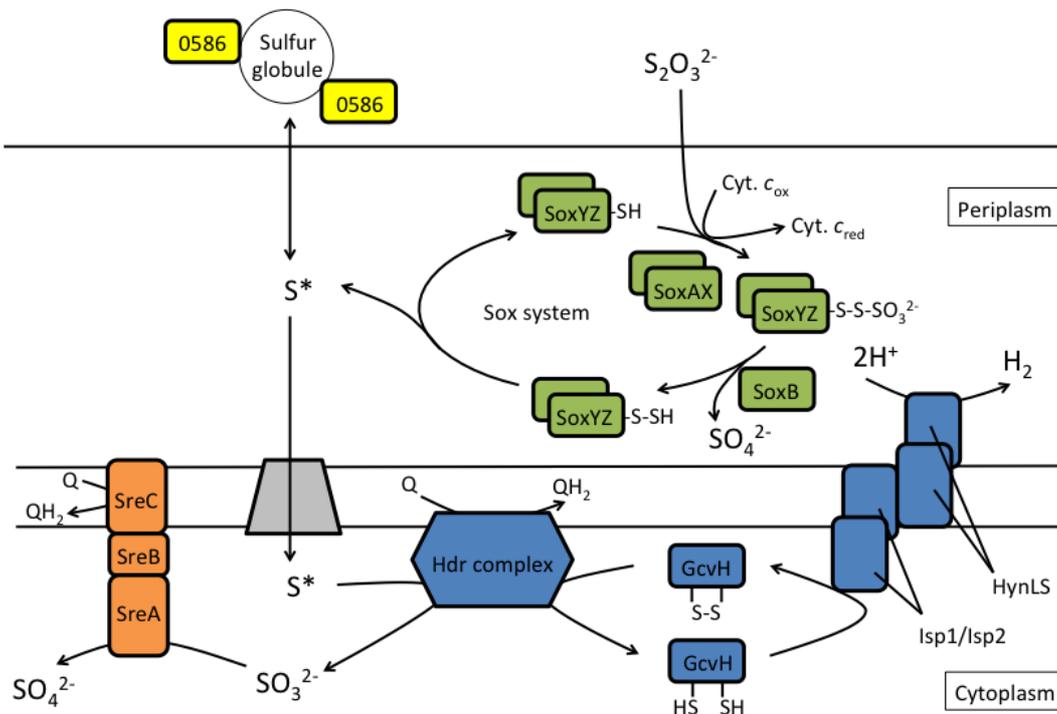


Fig. *H. thermophilus* TK-6 のチオ硫酸代謝