

氏名 川 口 洋

授与した学位

博 士

専攻分野の名称

農 学

学位授与番号

博 甲 第 1358 号

学位授与の日付

平成 7 年 3 月 25 日

学位授与の要件

自然科学研究科生物資源科学専攻
(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題目

*Thiobacillus*属細菌の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素に関する研究

論文審査委員

教授 田中 英彦,

教授 杉尾 剛,

教授 小林 昭雄

教授 白石 友紀,

教授 土屋 友房

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* は2価鉄または還元型硫黄化合物を唯一のエネルギー源として生育する好酸性の独立栄養細菌である。本研究では, *T. ferrooxidans* の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の生化学的, 分子生物学的研究を行った。独立栄養細菌として初めて *T. ferrooxidans* の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素遺伝子(*leuB*) を大腸菌にクローニングし, 全塩基配列を決定した。N-末端アミノ酸配列など蛋白質側の情報と総合して, 酵素蛋白質の全一次構造を明らかにした。次に, 大腸菌クローンから *T. ferrooxidans* の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の精製を行った。均一酵素標品を用いて諸性質を検討したところ, これまで精製され性質が明らかにされている *Thermus thermophilus* 等の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素が基質として3-イソプロピルリンゴ酸しか利用できないのに対し, *T. ferrooxidans* の酵素はD, L-リンゴ酸も利用できることを明らかにした。また, 同じ好酸性の独立栄養細菌である硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thiooxidans* の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の部分精製を行い, *T. ferrooxidans* の酵素とは異なりリンゴ酸を基質として利用できないことを明らかにした。

論文審査結果の要旨

本論文の研究は、鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* における3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の生化学的、分子生物学的研究を行ったものである。*T. ferrooxidans* は好酸性の独立栄養細菌であるが、その遺伝学的研究は遅れている。この点に着目して、*T. ferrooxidans* のロイシン生合成系に関与する3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素について検討を行い、次のようにまとめた。1) 独立栄養細菌として初めて *T. ferrooxidans* の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素遺伝子(*leuB*) を大腸菌にクローニングし、全塩基配列を決定することにより酵素蛋白質の一次構造を明らかにした。*T. ferrooxidans* の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の一次構造は大腸菌や高度好熱菌 *Thermus thermophilus* などの従属栄養細菌のものと非常によく類似していた。しかし、*leuB* 遺伝子周辺の解析を行った結果、*T. ferrooxidans* におけるロイシン生合成系遺伝子が、大腸菌やネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* にみられるようなロイシンクラスター (–*leuA*, *leuB*, *leuC*, *leuD*–) を形成していないことを明らかにした。2) 大腸菌クローンから *T. ferrooxidans* の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の精製を行い、酵素化学的・蛋白質化学的検討を行った。その結果、これまでに単一精製が行われている *Th. thermophilus* と *S. typhimurium* 由来の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素が基質として3-イソプロピルリンゴ酸以外の構造類似体を利用できないのに対し、*T. ferrooxidans* の酵素は3-イソプロピルリンゴ酸以外にも D-, L-リンゴ酸を利用できることを明らかにした。また、発現ベクター pKK223-3 の下流に *leuB* 遺伝子を接続することにより、*tac* プロモーターの制御による3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の大量発現系の構築を行った。3) 同じ好酸性の独立栄養細菌である硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thiooxidans* の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の精製を行った。その結果、*T. ferrooxidans* の酵素とは異なりリンゴ酸を基質として利用できないことを明らかにした。

T. ferrooxidans のアミノ酸関連酵素やその遺伝子に関する研究例は少なく、本論文はこれらの解明に資するものとする。本学位審査会は、上記の論文内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が博士（農学）の学位に値するものと判定した。