

Title	A Study on localization, mutual stabilization and function of Rhodobacter capsulatus rnf gene products
Author(s)	熊谷, 浩高
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41896
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	くま かい ひろ たか 熊 谷 浩 高
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 5 1 8 9 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	A study on localization, mutual stabilization and function of <i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>rnf</i> gene products (<i>Rhodobacter capsulatus</i> の窒素固定に必須な <i>rnf</i> 遺伝子産物の局在性、相互作用と機能に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 福山 恵一 (副査) 教授 長谷 俊治 教授 金澤 浩 講師 佐伯 和彦

論 文 内 容 の 要 旨

生物窒素固定は、ニトロゲナーゼの触媒作用による分子窒素のアンモニアへの還元反応である。*Klebsiella* 等を用いてニトロゲナーゼに関わる遺伝子と産物の研究がなされてきたが、ニトロゲナーゼへの直接の電子供与体であるフェレドキシン、フラボドキシンの還元系は不明な点が多い。*Rhodobacter capsulatus* において、ニトロゲナーゼへの直接の電子供与体フェレドキシンI (Fd_xN) の遺伝子周辺の解析により、既知の遺伝子とほとんど類似しない、遺伝子群 *rnf* (*rhodobacter nitrogen fixation*) が見出されてきた。この遺伝子群の産物は、膜蛋白質やフェレドキシン様ドメインを持つ蛋白質であると考えられ、フェレドキシン還元に関わることが示唆された。本研究では *rnf* 遺伝子産物の酵素的機能を解明する目的で、局在性の解析、複合体構成の検証、アミノ酸配列に基づく機能予測を行い、さらに暗所における窒素固定での働きについて調べた。

RnfA は、大腸菌アルカリ性フォスファターゼ (PhoA) との融合遺伝子を用いた解析、RnfB と RnfC は、大腸菌で発現させた産物に対する抗体を用いた解析の結果から、これらが膜蛋白質であることを示した。また、*rnfA*、*rnfB*、*rnfC* いずれかが破壊された株では、残りの *rnf* 遺伝子産物の含量が痕跡程度に減少すること、すなわち、RnfA、RnfB、RnfC の相互安定化作用を見出した。次に、(His)₆ 付加した活性型の RnfB を可溶化後、ニッケル NTA アガロースカラム、Sephacryl S-400カラムにかけた結果、RnfC が (His)₆ 付加 RnfB と同一の画分に検出された。従って、少なくとも RnfB と RnfC は複合体を構成することが示された。

非窒素固定菌 *Haemophilus influenzae* 全ゲノムの塩基配列内に *rnf* と相同性の高い ORF 群の存在が判明した。これを手がかりにして、実験的に得られた *Escherichia coli* 由来の塩基配列を基に *rnf* 遺伝子群のホモログを見出した。また、詳細なアミノ酸配列比較の結果、Rnf 蛋白質複合体は H⁺ 輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素 (H⁺-NDH) 類似の膜表在サブ複合体 (RnfB、RnfC) と Na⁺ 輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素 (Na⁺-NDH) 類似の膜貫通サブ複合体 (RnfA、RnfD、RnfE) から構成される、キメラ様構造を持つと考えられた。この複合体の機能は、膜電位の解消に伴う NADH からフェレドキシンへの電子伝達であると予想された。

R. capsulatus は、暗所嫌気条件下でも窒素固定も行う。暗所における窒素固定が明所と同じ遺伝子産物によるものかどうかは不明であった。そこで、種々の遺伝子破壊株の暗所における窒素固定能を調べた。*rnf* 遺伝子破壊株各種の生育がいずれも痕跡程度であったことから、暗所でも Rnf 蛋白質は窒素固定で主要な役割を持つことが示された。また、光合成の環状電子伝達系の構成成分欠損株 3 種の生育は、いずれも野生株と同様であった。これらの結果

は、Rnf 蛋白質の機能にこれら電子伝達系成分との直接的な反応が必要ないことを示しており、上述の Rnf 蛋白質複合体の機能予想と合致する。

論文審査の結果の要旨

本研究は、紅色光合成細菌の窒素固定に必須な遺伝子群 *mf* オペロンの産物が、クロマトフォア膜に局在する膜蛋白質複合体を形成すること、そして、光合成条件下だけでなく非光合成条件下でも窒素固定に必須な機能を持つことを明らかにするとともに、形成される複合体の酵素機能の推定を行うことによってこの分野の展開への道標を与えた。この内容は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。