Osaka University Knowledge Archive

Title	MOLECULAR EVOLUTIONARY STUDIES ON THE NITROGEN FIXATION OF HELIOBACTERIA
Author(s)	Jigjiddorj, Enkh-Amgalan
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46973
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	Jigjiddorj Enkh-Amgalan（ジグジドドルジ エンク アムガラン）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　２０２８９　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学　位　論　文　名	MOLECULAR EVOLUTIONARY STUDIES ON THE NITROGEN FIXATION OF HELIOBACTERIA （グラム陽性光合成細菌ヘリオバクテリアの窒素固定に関する分子進化学的研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　関　　達治 （副査） 教　授　原島　　俊　　教　授　仁平　卓也　　助教授　大岡　宏造 教　授　福井　希一　　教　授　大竹　久夫　　教　授　卜部　　格 教　授　小林　昭雄　　教　授　塩谷　捨明　　教　授　清水　　浩 教　授　金谷　茂則

論　文　内　容　の　要　旨

生物学的窒素固定は、特定の原核生物が有する代謝系である。多くの光合成細菌が生物学的窒素固定能を有していることも示唆されていた。そこで本研究は、グラム陽性細菌の中で、唯一光合成能を有するヘリオナクテリアに注目した。ヘリオバクテリアは、その生態を始めとする多くが不明な細菌である一方、その光合成色素が新規であり、光合成系が植物型に類似していることからも進化学的に非常に興味深い細菌であった。本研究では、ヘリオバクテリアの窒素固定に興味を持ち、特に、本細菌の窒素固定に関する分子進化学的研究を行った。

最初に、窒素固定反応に重要である二つの酵素に注目し、ヘリオバクテリアの現時点で培養可能な全種に対し、dinitrogenase reductase をコードする遺伝子 *nifH* と、dinitrogenase をコードする遺伝子 *nifD* の全長を決定し、分子系統解析を行った。その結果、ヘリオバクテリアは、グラム陽性細菌であるにも関わらず、好気性細菌で構成される Group I の大きな系統の中に、独立した一つの系統をなしていることを明らかとした。また、16S rDNA の分子系統では比較的近縁である、*Clostridium* や *Paenibacillus* とは異なる系統であることも非常に興味深い結果であった。これまで、ヘリオバクテリアの窒素固定について、生化学的報告はあったが、遺伝子レベルで明らかにしたのは本研究が初めてであった。

つぎに、ヘリオバクテリアの *NifH* と *nifD* 遺伝子が、興味深い系統学的位置を示していたことから、*Heliobacterium chlorum* について、窒素固定遺伝子群の取得を試みた。そして、窒素固定を行う生物に共通したコア遺伝子について分子系統学的解析を行うと同時に、窒素固定遺伝子群としての比較解析を行った。*H. chlorum* の窒素固定遺伝子群は、$nifI_1$、$nifI_2$、*nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifE*、*nifN*、*nifX*、*fdx*、*nifB*、*nifV* で構成されていることを明らかにした。NifH、NifD、NifK、NifE、NifN で作成したアミノ酸配列に基づく系統樹から、ヘリオバクテリアの窒素固定は好気性細菌窒素固定 Group I と嫌気性細菌の窒素固定の中間的位置であることを明らかにした。さらに、そのことは、窒素固定遺伝子群の比較解析からも指示された。特に、アーキア（古細菌）を含む嫌気性細菌にその存在が報告されている $nifI_1$、

nifI₂ をヘリオバクテリアにおいて発見した。

さらに、ヘリオバクテリアの窒素固定をより理解するために、転写レベルの知見を得ることとした。その結果、アンモニアの有無により、窒素固定反応が転写レベルで制御されていることを明らかにした。プロモーター位置を推定すると同時に、これまでの窒素固定生物の窒素固定遺伝子群には存在しない、新たな窒素固定遺伝子（*orf1*）が *nifI₁* の上流に存在していることを明らかにした。そして、それら窒素固定遺伝子群は、単一の mRNA として転写されていることも明らかにした。*Orf1* のアミノ酸配列と、*orf1* と *nifI₁* の間の塩基配列の推定二次構造より、*Bacillus* 属細菌の *hut* オペロンの調節機構と同様な RNA レベルのアンチターミネーター様式である可能性を示唆した。

本研究によって、窒素固定生物としてだけではなく多くの特徴的性質を有するヘリオバクテリアにおいて、窒素固定遺伝子群やその調節様式も、他の窒素固定細菌とは異なる特徴的な性質を有していることを発見した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、グラム陽性細菌で唯一光合成を行うヘリオバクテリアの窒素固定に関して、分子進化学的研究を行ったものである。本研究によって、多くの特徴的性質を有するヘリオバクテリアにおいて、窒素固定遺伝子群やその調節様式も、他の窒素固定細菌とは異なる特徴的な性質を有してたことを明かにしている。

第１章では、ヘリオバクテリアの生態、進化、生化学に関する最新の情報が、簡潔にかつ明瞭に述べられている。ヘリオバクテリアという細菌のユニークな性質がまとめられており、未だその多くが解明されていないことが指摘されていて、ヘリオバクテリアに着目した研究背景が理解できる内容となっている。さらに、ヘリオバクテリアが水田に生息の場を持っていることからイネへの関与が考えられ、その生物学的窒素固定の解明が工学的にも農学的にも重要な知見を与えてくれる可能性についても指摘されており、本研究の意義が理解できる内容となっている。

第２章は、ヘリオバクテリアの培養可能なほぼ全種に対し、窒素固定反応に関わる遺伝子クラスターの内の dinitrogenase reductase をコードする *nifH* 遺伝子と、dinitrogenase をコードする *nifD* 遺伝子に基づく分子系統解析を行ったものである。ヘリオバクテリアが窒素固定能を有することはアセチレン還元試験により生化学的に明らかにされていたが、本論文で初めて、窒素固定に関わる分子情報を明らかにし、その分子系統学的位置を決定している。その結果、ヘリオバクテリアは、グラム陽性細菌であるにも関わらず、好気性細菌で構成される *nifH* クラスターGroup I の大きな系統の中に独立した系統群を形成することを発見している。このことは、窒素固定細菌の系統進化を考える上で非常に興味深い。また、16S rDNA の分子系統では比較的近縁である *Clostridium* や *Paenibacillus* とは異なる系統であることも、予想しえなかった結果であり、ヘリオバクテリアの特異な性質を示している。

第３章では、ヘリオバクテリアの窒素固定について、窒素固定遺伝子群から考察した内容となっている。まずは、窒素固定遺伝子群の取得を、サザンハイブリダイゼーション法を用いて行い、*Heliobacterium chlorum* の窒素固定遺伝子群が 11 個の遺伝子より構成されていることを明らかにしている。次ぎに、窒素固定を行う生物に共通したコア遺伝子について分子系統学的解析を行うと同時に、窒素固定遺伝子の構成を比較解析している。*Heliobacterium chlorum* の窒素固定遺伝子群は、*nifI₁*、*nifI₂*、*nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifE*、*nifN*、*nifX*、*fdx*、*nifB*、*nifV* で構成されており、同じ gruop I の好気性細菌に比べて極めてシンプルな構成であることが特徴的である。*NifH*、*NifD*、*NifK*、*NifE*、*NifN* のアミノ酸配列に基づく分子系統解析の結果、ヘリオバクテリアの窒素固定は好気性細菌で構成される Group I 系統には入るもののその最も外側に位置し、嫌気性細菌の窒素固定遺伝子クラスターとの中間的位置であることを明らかにしている。そのことは、窒素固定遺伝子群の各遺伝子構成とアミノ酸相同性の比較解析からも指示できるとしている。特に、アーキア（古細菌）を含む嫌気性細菌にのみその存在が報告されている *nifI₁* と *nifI₂* について、ヘリオバクテリアにおいてもその存在を発見したことは、大変興味深く、生物学的窒素固定の進化の解明にとって重要な発見であるといえる。現在までに、アーキアの *nifI₁* と *nifI₂* については、アンモニアスイッチオフシステムに関与していることが推測されており、同じくその機能を有している可能性も考えられる。しかし、全窒素固定遺伝子群の中で *nifI₁* と *nifI₂* の遺伝子座がアーキアとは異なることから、ヘリオバクテリア特有の機能を有している可能性も考えられるとしている。第２章では、ヘリオバクテリアの窒素固定の分子進化が、これまで明らかにされ

ている細菌のそれとは異なっていることと、その進化的位置が、嫌気性菌と好気性菌の中間的位置にあることから、好気性菌の窒素固定の祖先型である可能性を提案している。

第３章では、ヘリオバクテリアの窒素固定遺伝子群の転写解析を行い、ヘリオバクテリアの窒素固定の調節について新知見を明らかにしている。まず、アンモニアの有無により、窒素固定反応が転写レベルで制御されていることを見出している。つぎに、プロモーター位置を推定すると同時に、これまでの窒素固定生物の窒素固定遺伝子群には存在しない、新たな窒素固定遺伝子（*orf1*）が *nifI₁* の上流に存在することを発見している。さらに、それら窒素固定遺伝子群は、単一の mRNA として転写されていることも明らかにしている。*Orf1* のアミノ酸配列と、*orf1* と *nifI₁* の間の塩基配列の推定二次構造より、*Bacillus* 属細菌の *hut* オペロンの調節機構と同様の RNA レベルのアンチターミネーター様式である可能性を提案している。推定モデルではあるものの、分子情報が極めて少なく、遺伝子工学技術も未だ開発されていないヘリオバクテリアについて、窒素固定の分子進化と、転写レベルの解明が進んだことは、価値ある成果であると思われる。

本論文は、ヘリオバクテリアの分子情報を明らかにし、それに基づく進化的考察がなされている論文である。ヘリオバクテリアは、グラム陽性有胞子細菌であるにも関わらず植物型光合成系を持つという極めてユニークな性質を持っている細菌だが、培養が非常に困難で、その生態が未だ不明な点が多い細菌であった。本研究によって、重要な生物代謝系の一つである生物学的窒素固定に関する進化学的情報と、窒素固定反応の調節機構を分子レベルで解明し、ヘリオバクテリアがこれまで報告されている多くの細菌とは異なるユニークな生物であることを証明している。地球上の微生物多様性を示すものでもあり、今後の研究の発展も期待できる。微生物の進化を解明するためにも、本細菌が重要な鍵を握ることも示唆しており、今後のヘリオバクテリア研究が加速していくことが大いに期待できる。

以上のように、本論文は、生物学的に非常に興味深いヘリオバクテリアについて、分子進化学的に多くの新しい知見を見出したものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。