

氏 名(本 籍)	やま だ かず たか 山 田 一 隆 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,652 号
学位授与年月日	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	Rhysiological and phylogenetical properties of the anaerobic free-living ciliate <i>Trimyema compressum</i> (嫌気性原生動物 <i>Trimyema compressum</i> の生理学的特性および分子進化に関する研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副 査	筑波大学教授 農学博士 中 原 忠 篤
副 査	筑波大学教授 Ph. D 多比良 和 誠
副 査	筑波大学助教授 理学博士 沼 田 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

原生動物は真核生物の一員であるが、人類誕生以降とは比較にならない長い歳月のなかで細胞レベル、器官レベルでの進化を積み重ねてきて多様に進化した多くの種から構成されている。これらの原生動物のなかには嫌気性原生動物なるものが存在する。これらの原生動物は好気的環境に適さず、またミトコンドリアを持たない代わりに Hydrogenosome と呼ばれる特異な細胞小器官とメタン生成細菌を細胞内に保持するといったユニークな特徴を有している。本論文は嫌気性原生動物の一つとして知られる *Trimyema compressum* について生理学的特性および分子系統学的考察を行い、真核生物の多様性について検討したものである。本論文ではまず *T. compressum* の増殖および代謝特性とメタン生成細菌の共生との相関関係について検討した。その結果共生メタン生成細菌の存在下では *T. compressum* は主として酢酸・メタン発酵を行っているのに対して、メタン生成細菌の非存在下では原生動物の収量が約20%程減少すると同時に代謝系を酢酸・酪酸発酵系に大きく変化させていることを示した。嫌気条件下において物質（細菌）の酢酸発酵には還元力の生成が伴うが、共生メタン生成細菌が還元力の除去（メタン生成）を行うため *T. compressum* は安定して酢酸発酵を行うことが可能である。しかしながらメタン生成細菌が消失した場合には、非水素発生的な発酵系が要求されるため酪酸発酵を行うことによって自ら余剰還元力を消費しているためと考えられた。酪酸発酵は酢酸発酵に比べてエネルギー獲得効率の面で劣るものの、*T. compressum* の増殖においてメタン生成細菌の共生は絶対的なものではなく、メタン生成細菌の非存在下でも酪酸発酵という非水素発生的な発酵系にシフトすることにより単独生育が可能であることを示した。

ところで *T. compressum* は生命進化の面からミトコンドリアを持たない真核生物としてその系統関係に興味を持たれる。そこで本研究では次に Small subunit ribosomal DNA の塩基配列情報と Elongation factor 1 α のアミノ酸配列情報を基に最大節約法を用いて *T. compressum* の分子系統解析を行った。その結果 *T. compressum* は、分子生物学的にみて一度獲得したミトコンドリアを消失した形跡がある *E. histolytica* よりも後に分岐しており、また好気性原生動物繊毛虫と同じクラスターに位置していた。この結果より *T. compressum* は、ミトコンドリアが細胞内共生する以前の極めて原始的な真核生物ではなく、初期は好気的環境で生息していた生物種が嫌気的環境に適用して派生してきたものではないかという可能性が示唆された。一方 *T. compressum* が細胞内に保持する Hydrogenosome がピルビン酸の嫌気代謝と基質レベルでのリン酸化に寄与していることから、最近ではその器官

と嫌気代謝に関わる構成成分の起源について注目されている。そこで本論文では *T. compressum* の Hydrogenosome に局在し、かつ嫌気代謝に大きく関わる膜タンパク Hydrogenase を精製し、その諸性質について検討した。その結果 *T. compressum* の精製 hydrogenase は分子量120kDaであり、また SDS-PAGE の結果から67, 33, 18kDa の3つのサブユニットから構成されていることが判明した。3つのサブユニット構造をとる Hydrogenase は既存のものとは異質で新規なタイプであることが予想された。N末のアミノ酸配列の比較では、67kDaのサブユニットが、硫酸還元菌や窒素固定細菌にみられる、活性中心にNiを含む [NiFe] -hydrogenase あるいは [NiFeSe] -hydrogenase に若干の相同性を示した。しかし *Clostridium* sp.や、同じ原性動物の仲間である *Trichomonas vaginalis* にみられる [Fe] -hydrogenase には全く相関を示さなかった。現在精製タンパクの情報を基に遺伝子の解析を試みている段階であるが、これらの発見は Hydrogenosome の多様性と構築、機能との相関解明を行う上で有効であると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、嫌気性原生動物繊毛虫毛口類に属する *Trimyema compressum* について、生理学的および分子系統学的側面からの解析を行った。*T. compressum* をはじめとした嫌気性原生動物は、真核生物であるにも関わらずミトコンドリアを持たないため、嫌気環境という特殊な条件でのみ生息が可能で、また他の生物には見られない Hydrogenosome という特殊な細胞小器官とメタン生成細菌を細胞内に保持することから、生物レベル、器官レベルにおいて注目すべき生物として認識されつつある。本論文では *T. compressum* の培養に関し、それが栄養源である細菌の種に依存していることを明らかにし、さらにその代謝系は共生メタン生成細菌の存在の有無により調節している可能性を示した。*T. compressum* は生命進化の面からミトコンドリアを持たない真核生物としてその系統関係に興味を持たれるが、small subunit ribosomal DNA や Elongation 1 α の情報を基にした系統解析から、*T. compressum* はミトコンドリアの細胞内共生が起きる以前の極めて原子的な生物ではなく、もともと好気的環境で生息していたものが、生存競争などからの回避手段として、あるいは何らかの要因で嫌気的環境に適用して派生した生物種ではないかという可能性を示した。Hydrogenosome は物質の嫌気代謝系の一端を担う細胞小器官であり、その構成成分の起源について関心がそそがれつつある。鞭毛虫、カビについてのそれについては既存の細胞小器官に酷似することが明らかとなっており、繊毛虫の Hydrogenosome についても興味を持たれるところである。そこで本論文では *T. compressum* の Hydrogenosome に関する分子生物学的考察として、その膜タンパクである Hydrogenase の精製を行った。その結果精製 Hydrogenase タンパクは既存のものとは異質で新規なものであることを示した。遺伝子の解析については精製タンパクの情報を基にした今後の研究展開に期待されるところであるが、繊毛虫の Hydrogenosome に関する分子生物学的考察は報告例がないことから、これらの成果は Hydrogenosome の構築と機能との相関解明をめざす今後の研究の進展に大きな貢献をなすことは疑いがない。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。