

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高 木 基 樹

イソプレノイドの生合成基本単位である isopentenyl diphosphate (IPP) とそのアイソマーである dimethylallyl diphosphate (DMAPP) は、高等植物の色素体、緑藻、多くの真正細菌において、メバロン酸経路とは全く異なる新規経路、非メバロン酸経路によって生合成されている。本経路の初発の反応は、pyruvate と D-glyceraldehyde 3-phosphate から 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) が生成する縮合反応であり、第2段階の反応は、DXP から 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) が生成する反応である。しかし、MEP 以降の生合成経路については全く明らかにされていない。本研究は、MEP 以降の非メバロン酸経路の解析を行ったもので、4章からなる。

第1章では、非メバロン酸経路の変異株の取得および解析について延べている。非メバロン酸経路の欠損変異株は致死であるため、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株よりクローニングしたメバロン酸経路遺伝子を大腸菌に導入し、メバロン酸添加時には IPP および DMAPP を供給できる系を構築した。この形質転換株を変異処理することにより、非メバロン酸経路の欠損変異株を取得することができた。次に、大腸菌のゲノミックライブラリーで変異株を形質転換し、メバロン酸非存在下で生育が回復することを指標に、相補遺伝子として機能未知遺伝子であった4つの遺伝子 *gcpE*, *YACM*, *ygbB*, *ychB* を取得することに成功した。

第2章では、非メバロン酸経路の変異株を相補する遺伝子の解析を行っている。取得した4つの遺伝子 *YACM*, *ygbB*, *ychB*, *gcpE* を大腸菌で大量発現させ、遺伝子産物を精製した。それぞれの遺伝子産物と生合成中間体である MEP を様々な条件下で反応させた結果、*YACM* 遺伝子産物と MEP を CTP 存在下で反応したときのみ、反応の進行が確認され、*YACM* 遺伝子産物は、MEP を CTP 存在下で 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) に変換する酵素 MEP cytidyltransferase であることが明らかとなった。

次に、CDP-ME と *ygbB*, *ychB*, *gcpE* 遺伝子産物を様々な条件下で反応させた結果、*ychB* 遺伝子産物と CDP-ME を ATP 存在下で反応させたときのみ、反応の進行が確認され、*ychB* 遺伝子産物は CDP-ME を ATP 存在下で 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME2P) に変換する酵素 CDP-ME kinase であることが判明した。

さらに、CDP-ME2P と *ygbB*, *gcpE* 遺伝子産物を様々な条件下で反応させた結果、*ygbB* 遺伝子産物と CDP-ME2P を反応させたときのみ、反応の進行が確認され、*ygbB* 遺伝子産物は CDP-ME2P を 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) に変換する酵素 MECDP synthase であることが明らかとなった。

以上のように、非メバロン酸経路のMEP以降MECDPに至る3段階の反応を解明したが、*gcpE*遺伝子の機能についてはいまだ判明していない。

第3章では、非メバロン酸経路の後半部分の解析を行っている。その結果、IPPとDMAPPの相互変換を行うIPP isomerase遺伝子として、大腸菌は*idi*のみを有することが明らかになり、*idi*遺伝子が生育に必須ではないことから、大腸菌において、非メバロン酸経路はIPP経路とDMAPP経路とに分岐していることが示唆された。

第4章では、非メバロン酸経路の初発反応と第2段階反応を触媒する酵素の酵素学的解析を行い、1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthaseと1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomeraseの諸性質を明らかにした。

以上、本論文は大腸菌における非メバロン酸経路のMEP以降MECDPに至る3段階の反応を明らかにし、それらの反応を触媒する酵素をコードする遺伝子のクローニングに成功するとともに、MECDP以降、IPP経路とDMAPP経路に分岐することを示したものであり、学術上、応用上寄与するところが少ない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。